



Biologicky aktivní látky v sóji
Diplomová práce

Vedoucí práce:
Prof., RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D

Vypracovala:
Bc. Eliška Sedláčková

ZADÁNÍ

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci na téma Biologicky aktivní látky v sóji vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ze srdce ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce, panu prof. Bořivoji Klejdusovi, Ph.D za čas věnovaný mé práci, odborné vedení, cenné rady při vypracovávání diplomové práce, nekonečnou trpělivost a celkově za pomoc s vyhodnocováním a zpracováním výsledků.

ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce shrnuje dosavadní poznatky o biologicky aktivních látkách obsažených v sóji luštinaté (*Glycine max* L. Merrill). Zejména se zabývá problematikou isoflavonů, mechanismem vzniku a účinků na lidské zdraví. Dále teoretická část shrnuje především moderní instrumentální techniky využívané ke stanovení isoflanů.

Praktická část je zaměřena na identifikaci sojových isoflavonů získaných z osmi odrůd (Brunensis, Bohemians, Naya, Moravians, Silesia, Toutatis, Korus, Kofu) sójových bobů nejvíce pěstovaných na území České Republiky. K detekci volných, konjugovaných a celkových isoflavonů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie v tandemu s hmotnostním spektrometrem (LC-MS/MS).

Klíčová slova:

biologicky aktivní látky, sekundární metabolity, fytoestrogeny, isoflavony, extrakce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem

ABSTRACT

Submitted master thesis summarizes current knowledge about biologically active substances contained in soybeans (*Glycine max* L. Merrill). Mainly deals with problematics of isoflavones, mechanism of origin and effects on human health. Then the theoretical part summarizes mainly modern instrumental techniques using for determination of isoflavones.

The experimental part is concentrated on identification of soy isoflavones gathered from eight varieties (Brunensis, Bohemians, Naya, Moravians, Silesia, Toutatis, Korus, Kofu) of soybeans cultivated in Czech Republic. For detection of free, conjugated and total isoflavones was used high performance liquid chromatography with mass spectrometer (LC-MS/MS).

Key words:

biologically active substances, secondary metabolites, phytoestrogens, isoflavones, extraction, highperformance liquid chromatography with mass spectrometer

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍLE PRÁCE.....	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
3.1	Charakteristika rostliny	11
3.2	Chemické složení sójových bobů.....	12
3.2.1	Primární metabolity	12
3.2.1.1	Bílkoviny.....	12
3.2.1.2	Lipidy	13
3.2.1.3	Sacharidy.....	13
3.2.1.4	Vitamíny a minerální látky.....	14
3.2.2	Sekundární metabolity.....	14
3.2.2.1	Fytoestrogeny	14
3.2.2.2	Biologicky aktivní proteiny a peptidy.....	18
3.2.2.3	Fytosteroly.....	18
3.2.2.4	Kyselina fytová	18
3.3	Mechanismus účinku isoflavonů.....	19
3.3.1	Biosyntéza isoflavonů	20
3.3.2	Zdravotní přínos isoflavonů	21
3.4	Přehled metod analýzy isoflavonů	22
3.4.1	Příprava vzorku	22
3.4.2	Izolace isoflavonů z matrice.....	23
3.4.3	Extrakce.....	24
3.4.3.1	Solid-Liquid extrakce (SLE).....	25
3.4.3.2	Superkritická fluidní extrakce (SFE)	25
3.4.3.3	Extrakce urychleným tokem rozpouštědla (PLE).....	26

3.4.3.4	Mikrovlnná extrakce (MASE).....	26
3.4.3.5	Extrakce ultrazvukem (UAE).....	27
3.4.4	Post-extrakční úpravy	28
3.4.4.1	Extrakce kapalina-kapalina (LLE)	28
3.4.4.2	Extrakce na pevné fázi (SPE).....	28
3.4.5	Separční metody	29
3.4.5.1	Chromatografie na tenké vrstvě (TLC).....	29
3.4.5.2	Plynová chromatografie (GC).....	30
3.4.5.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	30
3.4.5.4	Elektromigrační separační metody.....	31
3.4.5.5	Imunoanalýza	32
3.4.6	Identifikace a detekce	32
3.4.6.1	UV/VIS detekce	32
3.4.6.2	Detekce pomocí fluorescence a chemiluminiscence	33
3.4.6.3	Elektrochemická detekce (ED)	33
3.4.6.4	Hmotnostní spektrometrie (MS)	34
3.4.6.5	Nukleární magnetická rezonance (NMR)	35
4	MATERIÁL A METODIKA.....	36
4.1	Materiál	36
4.1.1	Použité odrůdy sóji	36
4.1.2	Použité chemikálie.....	36
4.2	Metodika	36
4.2.1	Příprava vzorků	36
4.2.1.1	Extrakce.....	37
4.2.1.2	Separace a identifikace isoflavonů metodou HPLC.....	38
4.2.1.3	Statistické zpracování naměřených dat	41
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41

5.1	Porovnání účinnosti extrakčních technik isoflavonů	42
5.2	Stanovení koncentrace celkového obsahu isoflavonů.....	43
5.3	Obsah isoflavonů v jednotlivých odrůdách sójových bobů	44
5.4	Stanovení koncentrace volných isoflavonů – aglykony.....	53
5.5	Stanovení koncentrace konjugovaných isoflavonů – glykosidy	55
6	ZÁVĚR.....	57
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY.....	58
8	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	69
9	SEZNAM TABULEK.....	71
10	SEZNAM PŘÍLOH.....	72
11	SEZNAM ZKRATEK.....	76

1 ÚVOD

Sója luštinatá (*Glycine max* L. Merrill) je důležitým zdrojem celé řady biologicky aktivních látek obecně označované jako fytochemikálie, které jsou zodpovědné za mnohé pozitivní účinky přínosné pro lidské zdraví. Díky tomu se sója a sójové výrobky řadí mezi funkční potraviny. Funkční potravina je jakákoli potravina, která má kromě nutriční hodnoty příznivý účinek na zdraví konzumenta, především na jeho fyzický či duševní stav.

V posledních několika letech vzrostl zájem o studium látek, které sice z nutričního hlediska nemají příliš význam, avšak jsou cenným přínosem pro lidské zdraví. Tyto látky se běžně označují jako nutraceutika. Mezi ně se právě mimo jiné řadí i sójové isoflavony, které jsou prospěšné právě svojí biologickou aktivitou (Shimoni 2004). Koncentrace a distribuce isoflavonů je ovlivněna genotypem, pěstitelskou lokalitou a podmínkami sklizně.

Isoflavony jsou přirozeně se vyskytující sekundární metabolity produkované rostlinami. Řadí se do třídy fytoestrogenů a v současné době nabízí potenciální alternativní terapii pro celou řadu hormonálně dependentních onemocnění, především se jedná o rakovinu prsu a prostaty, symptomy menopauzy, kardiovaskulárních onemocnění a osteoporózy. Mezi nejvíce zastoupené a důležité isoflavony patří daidzein a genistein. Daidzein a genistein mají antioxidační aktivitu a jejich příjem ve stravě poskytuje ochranu vůči oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě (LDL). Přestože jsou isoflavony v podstatě velice dobře prozkoumány, zájem vědců stále přetrvává zejména právě díky jejich pozitivním účinku na lidské zdraví.

Nejběžnější technika využívaná k extrakci isoflavonů z pevné matrice je extrakce v systému pevná látka-kapalina (SLE) s využitím extrakčního rozpouštědla. Nejčastěji se používá směs metanolu a vody (80:20) nebo acetonitrilu. Nejvhodnější analytickou metodou k detekci isoflavonů a fytoestrogenů obecně je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) v zapojení s UV/VIS detektorem, detektorem diodového pole (DAD) nebo hmotnostním spektrometrem (MS).

2 CÍLE PRÁCE

- Zpracovat literární rešerši na téma "Biologicky aktivní látky v sóji"
- Příprava vzorků ze sójových bobů
- Využití extrakce pevná látka-kapalina (SLE)
- Provést monitoring isoflavonů extrahovaných ze sójových bobů pomocí metody HPLC v tandemu s MS
- Statisticky zpracovat naměřená data
- Vyhodnotit přítomnost a koncentraci jednotlivých, volných, konjugovaných a celkových isoflavonů v jednotlivých odrůdách sójových bobů

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika rostliny

Sója luštinatá (*Glycine max* L. Merrill) se řadí mezi jednoleté teplomilné rostliny. Z biologického hlediska ji řadíme mezi luštěniny z čeledi bobovité (*Fabaceae*). Patří do rodu *Glycine* Willd, jenž zahrnuje přes 75 druhů. V současné době je sója, co se do plochy týče, čtvrtou nejrozšířenější plodinou na světě. Tato luštěnina se pěstuje v různých částech světa zejména pro vysoký obsah oleje a bílkovin, což se považuje za velkou výhodu při výrobě potravin a krmných směsí pro zvířata (Pimentel et al. 2006).

Kulturní sója (obrázek 1) je keříčkovitá rostlina dosahující výšky 0,75 – 1,25 m, v závislosti na růstových podmínkách a odrůdě. Rostlina se vyznačuje silným křivým kořenem zúžujícím se směrem dolů, z něhož se větví dlouhé postranní kořeny, které pronikají do hloubky až 2 m a tím přerůstají hlavní kořen. V orniční vrstvě půdy se na nich vytvářejí hlízky vyvolané symbiotickým působením bakterie *Bradyrhizobium Japonicum* (*Rhizoctonium japonicum*). Četnost hlízek závisí na vzájemném vztahu odrůdy a bakterií, dále na vlastnostech půdy, především na pH, teplotě, její vlhkosti a provzdušnění. Bakterie přináší rostlinám atmosferický dusík, jež je začleňován do organických sloučenin (MIKELOVÁ et al. 2004).



Obrázek 1: Sója luštinatá (*Glycine max* L. Merrill) – Převzato z Botany.cz

3.2 Chemické složení sójových bobů

Sójové boby jsou vynikajícím zdrojem makronutrientů, jako jsou bílkoviny, sacharidy a lipidy). Chemické složení sójových bobů (tabulka 1) závisí na mnoha faktorech (Maestri et al. 1998). Především na genotypu, vegetačním období, geografické poloze a životním prostředí. Je také známo, že dokonce i zavlažování má vliv na produkci oleje a proteinů v sójových bobech (Boydak et al. 2002).

Tabulka 1: Průměrné chemické složení zralých sójových bobů

Sloučenina	Obsah (%)
Voda	8,5
Bílkoviny	36,5
Lipidy	19,9
Sacharidy	30,2
<i>Vláknina</i>	9,3
Popel	4,9
Energie	1742 kJ (416 kcal)

3.2.1 Primární metabolity

Primární metabolismus má zásadní význam pro existenci života a přímo se účastní normálního růstu, vývoje a reprodukce. Primární metabolity jsou přítomny v mikroorganismech, rostlinách, tělech živočichů i houbách (Akula and Ravishankar 2011).

3.2.1.1 Bílkoviny

Sojové boby obsahují přibližně 35% – 45% proteinů. Tyto proteiny jsou tvořeny třemi hlavními frakcemi: albuminy, globuliny a gluteliny. Největší podíl však tvoří globuliny, až 80% (Yang et al. 2011). Jedná se o globulin 7S (β -konglycinin) a globulin 11S (glycinin). Vzájemně se tyto globuliny liší funkčními a fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Trimerní 7S globulin je glykoprotein, který se skládá ze tří typů podjednotek: α , α' a β v sedmi různých kombinacích s molekulovou hmotností 180 kDa. Druhý zásobní protein, glycinin je hexamerní 11S globulin o molekulové hmotnosti 360 kDa se skládá z kyselého

(A) a zásadní (B) frakce polypeptidů a je kódován pěti podjednotkami. Na základě fyzikálních vlastností těchto pět podjednotek, se dělí na dvě hlavní skupiny. Skupina I. se skládá z G1, G2 a G3 proteinů, a skupina II. se skládá z G4 a G5 podjednotek. Podjednotky I. skupiny obsahují více methioninových zbytků než ve skupině II. Tato informace je důležitá zejména pro pěstitel, kteří využívají methionin v sojových bobech ke zlepšení jejich nutriční kvality. Ze tří vědeckých studií (Beilinson et al. 2002); (Krishnan et al. 2009); (Herman et al. 2003) vyplývá, že existují tři typy alergenů nacházející se v sojových bobech. Dále se tu vyskytují i alergenům podobné antinutriční proteiny, které omezují použití sóji jako krmiv nebo potravy (Tavakolan et al. 2013)

3.2.1.2 Lipidy

V poslední době je věnována i zvýšená pozornost produkci oleje, jehož zastoupení v sojových bobech tvoří 18 – 22%. Tukovou frakci tvoří zejména triglyceridy, které tvoří většinu obsahu sojového oleje. Minoritní složky zahrnují nezmýdelnitelné látky (tokoferoly, fytoosteroly a sacharidy) a volné mastné kyseliny (MK). Sója vyniká svým vysokým obsahem polynenasycených MK, jako je kyselina linolová (C18:2) a linolenová (C18:3). Dále také obsahuje značné množství nenasycené kyseliny olejové (C18:1) a menší množství tvoří nasycené MK, kyselina palmitová (C16:0) a kyselina stearová (C18:0). Převládající MK je kyselina linolová, která tvoří přibližně 53% z celkového obsahu MK v sojových bobech. Za pozornost stojí rovněž obsah kyseliny linolenové, který se pohybuje přibližně kolem 7-8%. Tato kyselina je dobrým zdrojem $\omega - 3$ MK (Redondo-Cuenca et al. 2008).

3.2.1.3 Sacharidy

Sacharidy tvoří přibližně 30% obsahu sojového bobu a jsou tak druhou nejvíce zastoupenou sloučeninou. Rozpustné sacharidy tvoří 15% (sacharóza, stachyóza a rafinóza) a stejně tak i podíl nerozpustných činí kolem 15%.

Strukturní části buněčných stěn tvoří nerozpustné neškrobové polysacharidy (NNP) a pokrývají širokou škálu polysacharidových molekul s výjimkou α -glukanů (škrob). NNP se dělí do tří skupin: celulóza, hemicelulóza a pektiny. Buněčná stěna obsahuje 92 % polysacharidů, které jsou v sóji přítomné. Hlavní cukernatou složkou těchto polysacharidů jsou arabinosa, galaktosa, uronová kyselina, a glukosa (Redondo-Cuenca, Villanueva-Suárez and Mateos-Aparicio 2008).

3.2.1.4 Vitamíny a minerální látky

Sójové boby obsahují vitamíny rozpustné ve vodě i v tuku. Z vitamínů rozpustných ve vodě se jedná především o vitamíny skupiny B (thiamin, riboflavin, niacin), kyselinu pantothenovou a listovou. Co se týče vitamínů rozpustných v tucích, v sójových bobech se nachází zejména vitaminy A a E. Vitamin E je známý jako tokoferol, dělí se na čtyři izomery α -, β -, γ - a δ -tokoferol a je významnou složkou sójového oleje.

Obsah minerálních látek v sušině se pohybuje okolo 4,5 – 5%. Nejhojněji je zastoupen vápník, draslík a hořčík. Železo, měď a zinek jsou v sójových bobech zastoupeny pouze ve stopovém množství (Zhao et al. 2005b). Sója je rovněž dobrým zdrojem vitamínů skupiny B, zejména thiaminu, riboflavinu, niacinu a také kyseliny listové.

3.2.2 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity představují širokou skupinu látek, které vykazují různé biologické účinky od potenciálně toxických, až po preventivně terapeutické. Sójové boby obsahují celou řadu biologicky aktivních látek, které mají vliv na zdraví člověka. Jsou tedy využívány pro tvorbu léčiv, potravinových aditiv, ochucovadel a k výrobě jiných průmyslových materiálů (Zhao et al. 2005a). Tyto metabolity zahrnují anti-živiny, jako jsou například inhibitory trávení a sloučeniny, které ovlivňují metabolismus konzumenta, což může vést i k ovlivnění mozkové a hormonální činnosti. Je zajímavé, že některé tyto metabolity mohou inhibovat činnost rakovinných buněk nebo vykazují antioxidační aktivitu.

Do sekundárních metabolitů řadíme také polyfenoly. Z hlediska chemického složení se jedná o různorodou skupinu chemicky příbuzných látek, které se dělí do několika tříd a podtříd. Rovněž se podílí na ochraně rostliny před UV-zářením a agresivními patogeny. Fyziologické působení polyfenolů je dáno funkcí jejich chemické povahy a biologické dostupnosti. Tyto účinky mohou být pozitivního charakteru – antioxidační, antikarcinogenní, antimutagenní, protizánětlivý, antibakteriální, antiparazitární nebo antidiabetické účinky. Avšak jejich účinky se mohou vykazovat i negativní aktivitu, jako je prooxidační aktivita, karcinogenita, genotoxicita, estrogení aktivita, antinutriční reakce, interakce s farmaceutiky a tyreoidní toxicita (Manach et al. 2004).

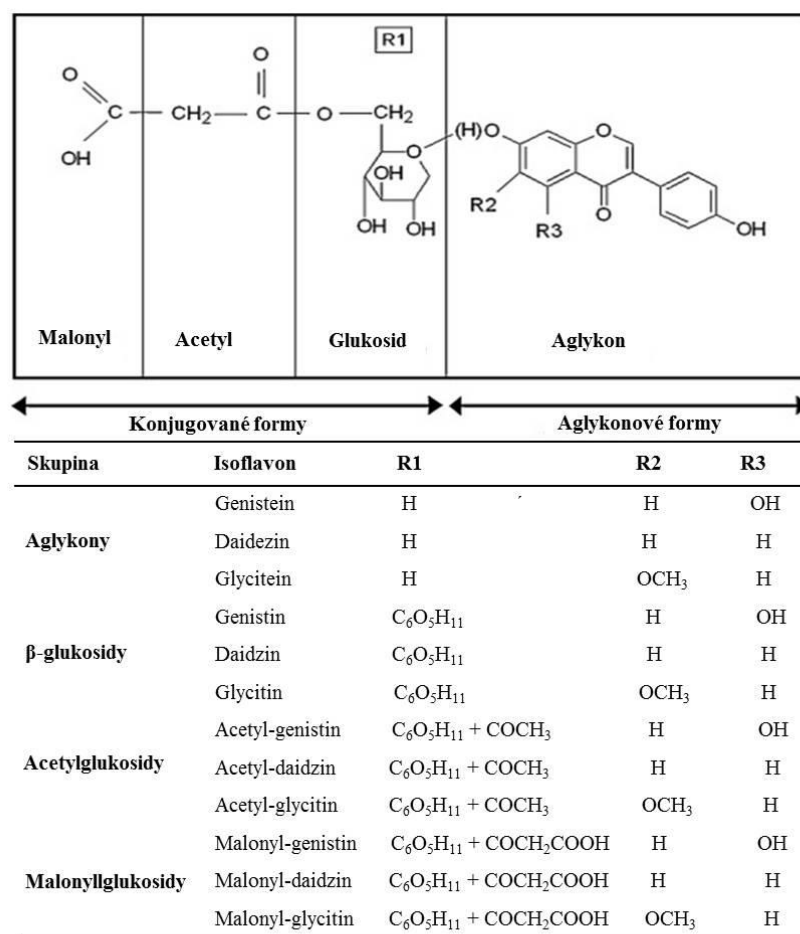
3.2.2.1 Fytoestrogeny

V posledních několika letech vzrostl zájem o biologickou aktivitu rostlinných látek podobných svým složením estrogenům (Klejduš et al. 2004b). Fytoestrogeny jsou nesteroidní sloučeniny nacházející se v rostlinách. Lze je rozdělit do čtyř skupin: lignany, kumestany, stilbeny a flavonoidy s podskupinou isoflavonů (Wu et al. 2004). Prokazují estrogení nebo antiestrogení aktivitu a tvoří různorodou skupinu sloučenin, jež mají podobné chemické struktury a biologickou aktivitu jako estrogeny. Další vlastností fytoestrogenů je schopnost vázat se na estrogení receptor (ER) v lidském těle. Patří mezi skupinu exogenních látek, které se nazývají endokrinní disruptory, neboli hormonálně aktivní látky. Mohou mít negativní dopad na endokrinní soustavu a fyziologické funkce organismu člověka i zvířat (El-Shemy 2011).

Isoflavony

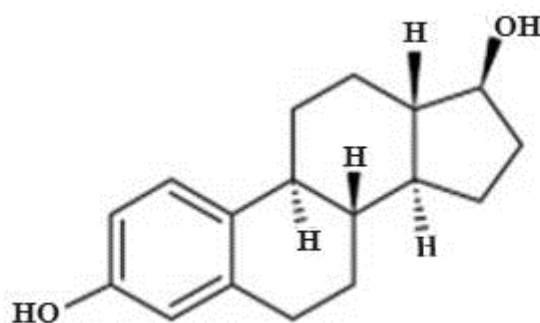
Isoflavony představují odlišnou skupinu sekundárních metabolitů, které jsou produkovány převážně v luštěninách. Jsou známy 4 chemické isoformy (obrázek 2) sójových isoflavonů. Konkrétně se jedná o aglykony (daidzein, glycitein a genistein), β -glykosidy (daidzin, glycitin a genistin), malonylglykosidy (6"-O-malonyldaidzin, 6"-O-malonylglycitin a 6"-O-malonyldaidzin) a acetylglykosidy (6"-O-acetyldaidzin, 6"-O-acetylglycitin a 6"-O-acetylgenistin). Rozdíly mezi chemickými formami isoflavonů mohou mít vliv na jejich biologickou dostupnost. Aglykony jsou snadněji absorbovány než konjugované glukosidy, protože jejich nízká molekulová hmotnost usnadňuje difuzi. Konjugované glykosidy musí být před gastrointestinální absorpcí hydrolyzovány (Andrade et al. 2016).

Isoflavony jsou ve velké míře metabolizovány ve střevním traktu. Po absorpci jsou krví transportovány do jater, kde podléhají enterohepatálnímu oběhu. Střevní bakteriální glukosidázy odštěpují zbytky cukru a uvolňují biologicky aktivní isoflavony, konkrétně daidzein a genistein. Ty mohou být biotransformovány dalšími bakteriemi na specifické metabolity equol, desmethyangolensin a p-ethylfenol. Všechny tyto fytoestrogeny jsou pak převážně eliminovány v ledvinách a proto sdílejí fyziologické vlastnosti a chování endogenních estrogenů (Isanga and Zhang 2008).



Obrázek 2: Chemické struktury a zkratky isoflavonů. Převzato a upraveno dle (Rostagno et al. 2007).

Z vědeckých studií je zřejmé, že isoflavony u lidí podporují estrogení aktivitu díky jejich podobnosti s hormonem 17-β-estradiol (obrázek 3), zejména svojí strukturou a molekulovou hmotností (Russell et al. 2017); (Moras et al. 2017). Isoflavony jsou poměrně tepelně stabilní, pečení či smažení nemá vliv na jejich celkový obsah (Messina and Messina 2000).



Obrázek 3: Struktura 17- β -estradiolu. Převzato a upraveno dle (Ketha et al. 2015).

Kumestany a lignany

Kumestany jsou podskupinou isoflavonoidů, metabolitů rostlin se zajímavými biologickými účinky. Kumestany vznikají převážně klíčením semen luskovin. Nejvýznamnějším zástupcem kumestanů je kumestrol, který zároveň patří mezi neúčinnější fytoestrogeny. Mezi významné kumestany s estrogenními účinky jsou kumestrol a 3' a 4'-methoxykumestrol (Oshima et al. 2016).

Termín lignan se používá pro různorodou třídu fenylypyranoidové dimery a oligomery. Sekoisolariciresinol a matairesinol 5 jsou dva lignanové dimery, které nejsou estrogeny sami o sobě, ale snadno konvertují na savčí lignany, enterodiol a enterolakton, které už estrogenní aktivitu vykazují. Ke konverzi dochází ve střevě, za účasti střevní mikroflóry a tím dochází ke snadnějšímu vstřebání savčích lignanů (Cornwell et al. 2004).

Saponiny

Saponiny jsou přirozeně se vyskytující triterpenoidy. Jejich struktura je převážně odvozena od pentacyklických triterpenoidů, jako je lupelol, α -amyrin a β -amyrin. Jsou to sekundární rostlinné metabolity, které obsahují steroid nebo triterpenový aglykon s řadou odlišných sacharidových částí, jež jsou spojeny prostřednictvím etherové nebo esterové vazby v průběhu glykosylace (Zhang et al. 2016).

Sójové boby obsahují 0,6 – 6,2% saponinů v sušině a tento obsah závisí na odrůdě a obecných pěstitelských podmínkách. Typický obsah se však uvádí kolem 1%. Na základě svých aglykonových struktur se označují jako sojasapogenol A, B a E, medikagenová kyselina, hederagenin a bayogenin (Haralampidis et al. 2002). Saponiny odvozené od sojasapogenolu A jsou bisdesmosidy s cukry vázanými v poloze C-3 a C-22. Některý

z cukrů může být acetylován. Tyto acetylované deriváty se vyznačují hořkou a svíravou chutí (Chang and Han 2016).

3.2.2.2 *Biologicky aktivní proteiny a peptidy*

Lektiny a inhibitory trypsinu

Lektiny jsou jedinečnou skupinou proteinů a glykoproteinů, které vykazují silnou biologickou aktivitu. Lektiny jsou vysoce specifické proteiny vážící sacharid s nejvyšší afinitou k N-acetyl-D-galaktosaminu, jenž kromě schopnosti aglutinovat erytrocyty má také schopnost prioritně aglutinovat maligní buňky. Inhibitory trypsinu zahrnují několik proteinů a peptidů, včetně Bowman-Birk inhibitorů (BBI), inhibitor Kunitz typu a lunasin. BBI je polypeptid složený ze 71 aminokyselin (AMK), které patří do skupiny inhibitorů serin-proteázy (El-Shemy 2011). BBI interaguje s trypsinem nebo chymotrypsinem a silně inhibuje jejich enzymatické aktivity. Lektiny a inhibitory proteáz byly dříve považovány za anti-nutriční látky, protože mohou snižovat nutriční hodnotu sóji. Nicméně příjem těchto látek se ukázal být pozitivní. Hrají roli při prevenci v případě několika onemocnění, například v případě rakoviny. BBI se rovněž zapojuje do protizánětlivých procesů bránící rozvoji rakoviny a koronárních chorob. Kromě toho existují i další peptidy obsažené v sójových bobech, které vykazují antihypertenzní vlastnosti, což vyplývá z výsledku studií (CHEN et al. 2004; Mallikarjun Gouda et al. 2006) na krysách.

3.2.2.3 *Fytosteroly*

Fytosteroly, nebo-li rostlinné steroly se řadí mezi lipofilní sloučeniny vyskytující se ve všech potravinách rostlinného původu, přičemž největší koncentrace je v rostlinných olejích. V současné době bylo identifikováno více než 40 různých fytosterolů (Barnes 2010). Obecně pojem fytosteroly popisuje steroly a stanoly rostlinného původu s chemickou strukturou podobné svým složením cholesterolu, avšak s odlišnou konfigurací bočního řetězce. Jedná se o 28- nebo 29-uhlíkaté alkoholy. Vědecké studie (Halling and Slotte 2004);(Awad et al. 2003) udávají, že vysoká spotřeba rostlinných sterolů může snižovat celkový a HDL (lipoproteiny o vysoké hustotě) cholesterol v krevním séru u lidí, čímž se snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění.

3.2.2.4 *Kyselina fytová*

Kyselina fytová (myo-inositol-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexafosforová kyselina) je přirozená složka sójových bobů a je hojným zdrojem fosfátu. Může tak tvořit 65% - 80% z celkového obsahu fosfátu. V sušině se její obsah pohybuje od 1 do 2,3 %. Kyselinu fytovou lze v sóji nalézt ve formě směsi fytátu a fytinových solí. Nabité fytinové soli mají chelatační účinky na kovové kationty jako jsou nutričně významné minerály – zinek, vápník, horčík a železo, čímž je činní dostupné pro člověka, nikoli však pro přežvýkavce. Navzdory tomu je však kyselina fytová považována za antinutriční látku v potravinách a krmivech. Rovněž vykazuje silnou schopnost asociovat se zásobními proteiny sóji a ovlivňovat tím jejich funkční vlastnosti (například izoelektrický bod a rozpustnost).

Na druhé straně existují studie (Rickard and Thompson 1997); (Thompson and Zhang 1991); (Ferry et al. 2002; Vucenik and Shamsuddin 2003), které naznačují, že fytát může mít i pozitivní vliv na zdraví zvířat a lidí, neboť působí antikarcinogenně a antioxidačně tím, že tvoří komplex železa a zároveň snižuje počet volných radikálů a peroxidaci membrán (Medic et al. 2014).

Z chemického hlediska se jedná o ester myo-inositolu a kyselinu fosforečnou (myo-inositol hexakisfosfát, IP6) a tím představuje nejrozšířenější inositol fosfát na Zemi (Hitz et al. 2002).

Inositol se formálně řadí mezi cukerné alkoholy, tzv. cyklitoly. Je složen z inositolového kruhu a nejméně jedné fosfátové skupiny. Předpona myo- značí jeden z osmi možných izomerů a jednotlivé izomery se liší orientací hydroxylových skupin vůči cyklohexanovému kruhu. Myo-inositol je nutričně nejvýznamnější formou inositolu, který se vyskytuje jako volná nebo vázaná sloučenina. V přírodě se nachází především ve vázaných formách a nejčastěji ji můžeme nalézt ve formě aniontu, jako fytát (Zhou et al. 1992).

Myo-inositol hexakisfosfát se skládá ze šesti fosfátových skupin, které jsou připojeny k inositolovému kruhu. Předpona „hexakis“ značí, že fosfátové skupiny nejsou propojené. Sloučenina je tedy ligandem, neboli chelatační látkou a může se tak vázat na více než jedno koordinační místo atomu kovu. Každá fosfátová skupina je připojena k inositolovému kruhu a dohromady mohou vázat až 12 protonů (Isanga and Zhang 2008).

3.3 Mechanismus účinku isoflavonů

Isoflavony patří k nejlépe probádaným fytoestrogenům a jejich molekuly jsou schopné vázat se na estrogenní receptory (ER). V rostlinách působí jako antioxidanty, protože jsou

schopny inhibovat tvorbu superoxidových aniontů. Ačkoli jsou isoflavony nazývány fytoestrogeny, s estradiolem totožné nejsou a nevyznačují se schopností buněčné proliferace. Bývají také označovány přívlastkem „anti-aging“, zejména pro svoji schopnost ochránit rostlinu od agresivního slunečního záření. Kromě antioxidační aktivity vykazují také aktivitu na progesteronových, estrogenových či androgenních receptorech a to s různou vnitřní aktivitou i s různou afinitou (Xu et al. 1998).

K pochopení mechanismu účinku isoflavonů a fytoestrogenů obecně je nutné uvést, že u člověka existují dva typy humánních receptorů pro estrogény (ER- α a ER- β). Fytoestrogeny mají malou afinitu k receptorům ER- α , ale silnou afinitu k receptorovému podtypu ER- β . Existuje předpoklad, že účinky jejich jsou umožněny nejen vazbou na ER, ale i na příklad vazbou na nukleární receptory typu PPAR (peroxisome proliferator activated receptor). U těchto receptorů se předpokládá, že by mohly zprostředkovat antidiabetický účinek fytoestrogenů. Dále se projevuje prospěšný vliv fytoestrogenů na funkci myokardu a cév a jejich role při prevenci osteoporózy, která je umožněna právě přítomností receptorů ER- β v kardiovaskulárním systému a kostech (Winkel-Shirley 2001).

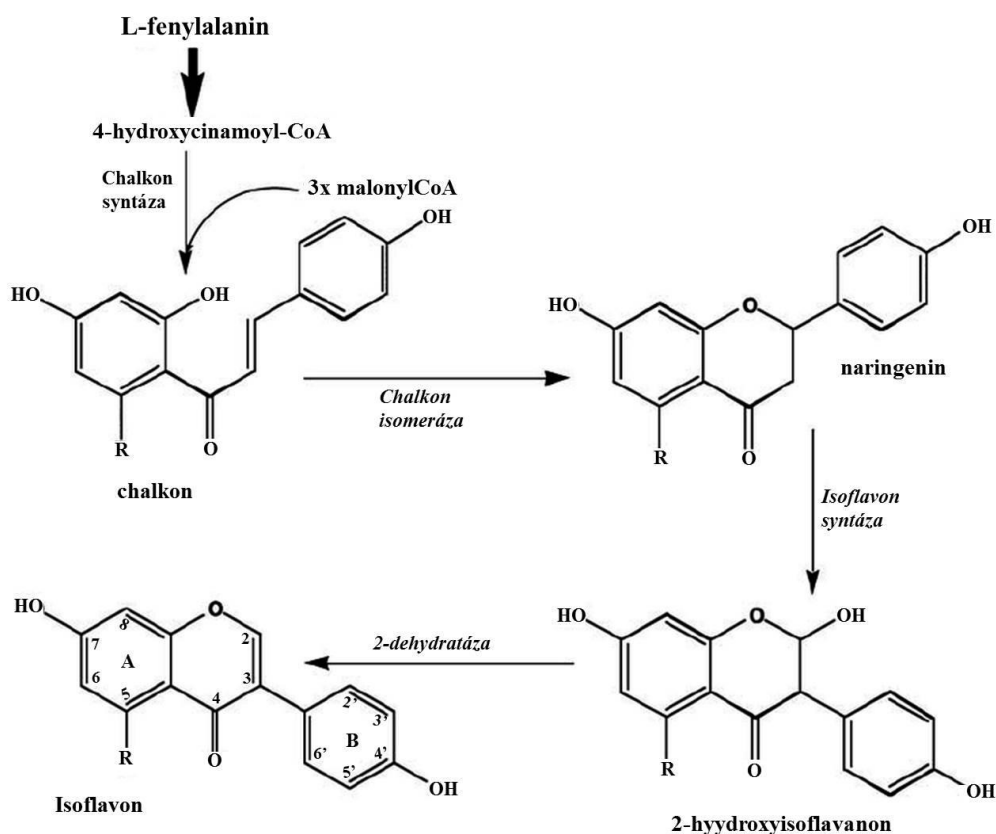
3.3.1 Biosyntéza isoflavonů

Isoflavonoidy, konkrétně isoflavony jsou tvořeny biosyntetickou drahou, přičemž naringenin (4', 5', 7' -trihydroxyflavanon) vzniká při biosyntéze genisteinu a liquiritigenin (4', 7' -dihydroxyflavanon) při biosyntéze daidzeinu.

Začátek biosyntézy zahajuje fenylalanin, který reaguje s malonylCoA za vzniku 4-hydroxycinamoyl-CoA (obrázek 4). Při vstupu do dráhy isoflavonoidů, musí dojít u flavanonu k abstrakci uhlíku v poloze C-3 s následnou migrací B-kruhu z polohy C-2 do polohy C-3 a následnou hydroxylací výsledný C-2 radikál. K migraci fenylu dochází v průběhu biosyntézy a chalkonsyntáza indukuje, že k arylovému přesunu dochází až po formaci C₆-C₃-C₆.

Tato reakce vyžaduje redukovaný nikotinamid dinukleotid adenin fosfát (NADPH) a molekulární kyslík. Reakce je katalyzována mikrosomálním enzymem cytochrom P450, 2-hydroxyisoflavanonsyntázy (2-HIS). Obecněji se tento enzym označuje jako isoflavon-syntáza (IFS) (Dixon and Steele 1999). IFS je stereoselektivním, nereaguje s (2R)-flavonony. Výsledný 2-hydroxyisoflavon je nestabilní a lehce podléhá dehydrataci za vzniku genisteinu nebo daidzeinu při kyselém pH. Daidzein se od glyciteinu liší chybějící hydroxylovou skupinou v poloze 5, jež vzniká kondenzací reziduí malonylCoA po celou

dobu formace naringeninchalkonu. Ke ztrátě hydroxylové skupiny dochází v průběhu tvorby polyketidového intermediátu, který se zacyklí při tvorbě chalkonu. Tato reakce je katalyzována specifickou NADPH dependentní reduktázou nazývanou mimo jiné jako chalkon reduktáza (CHR). Aktivita CHR je nezbytná k produkci druhého substrátu pro syntézu isoflavonů, tedy liquiritigenin, který je přeměněn na daidzein (Dixon 2004).



Obrázek 4: Zjednodušené schéma biosyntézy isoflavonů (Barnes 2010). Nejdříve reaguje fenylalanin s malonyl-CoA za vzniku 4-hydroxycinnamoyl-CoA. Za katalytického působení chalkon izomerázy 4-hydroxycinnamoyl-CoA se třemi molekulami 3 malonyl-CoA na formuformu chalkonu. Chalkon izomeráza uzavírá kruh za vzniku naringenin. B-kruh je přesunut z 2. pozice do 3. pomocí isoflavon syntázy. Isoflavon dehydratáza odstraní vodu a vytvoří 2,3 dvojnou vazbu v heterolytickém kruhu (viz číslované schéma). Schéma vychází z éterického kyslíku v heterocyklickém kruhu. B-kruh má samostatný systém číslování (1' - 6').

3.3.2 Zdravotní přínos isoflavonů

Z mnohých studií (Villares et al. 2011); (Dong et al. 2013); (Filiberto et al. 2013) vyplývá, že isoflavony mají blahodárné účinky na lidské zdraví. Jejich účinky spočívají ve snížení

výskytu kardiovaskulárních onemocnění, některých typů rakoviny, hyperglykémie, Alzheimerovy choroby, symptomy menopauzy a výskytu *diabetes mellitus* typu 1 a 2 (Andrade, Mandarino, Kurozawa and Ida 2016). Isoflavony jsou výborným příkladem skupiny fytochemických látek, které nejsou vyžadovány pro normální růst, normální rozvoj nebo udržování normální hladiny homeostázy u dospělých, ale jsou biologicky aktivní u savců a potenciálně mohou ovlivňovat zdraví. V tomto ohledu se isoflavony neřadí mezi nutrienty, ale spíše se jedná o důležité modulátory buněčných funkcí, které mají vliv na zdraví (Cornwell, Cohick and Raskin 2004).

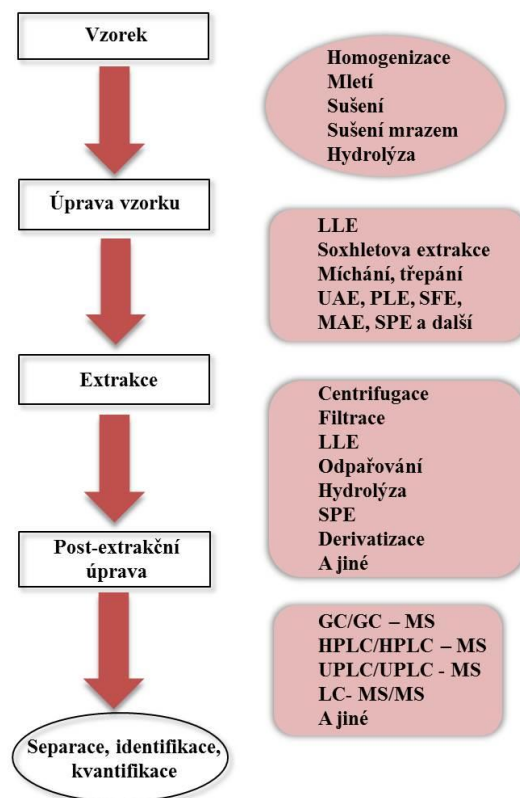
3.4 Přehled metod analýzy isoflavonů

V rostlinné matrici se biologicky aktivní látky vyskytují ve velmi složitých směsích, proto k jejich izolaci nelze použít žádná univerzální metoda. Nejdůležitějším hlediskem je charakter použité matrice a vlastnosti izolované látky (de Rijke et al. 2006).

3.4.1 Příprava vzorku

Mezi základní úkony při analýze biologických vzorků patří příprava vzorku. Na jejím provedení závisí celkový úspěch analytického stanovení z kvalitativního i kvantitativního hlediska. Výběrem vhodné metody přípravy vzorku rozhodujeme nejen o přesnosti stanovení dané látky (analytu), ale také o možnosti jejího určení (Rostagno et al. 2009).

Základními kroky pro vlastní analýzu jsou odběr reprezentativního vzorku, dezintegrace a homogenizace, extrakce a purifikace surového extraktu, separace a identifikace analytu a v konečné fázi probíhá detekce a kvantifikace analytu (Obrázek 5).



Obrázek 5: Nejběžnější postupy přípravy vzorku ke stanovení sójových isoflavonů. Převzato a upraveno dle (Rostagno, Villares, Guillamon, Garcia-Lafuente and Martinez 2009)

Pro izolaci přírodních látek z matic pevného vzorku je nutné vzorek nejdříve zhomogenizovat. Před samotnou extrakcí je nutné, aby byl pevný vzorek rozemlet na homogenní prášek.

Při zpracování kapalných vzorků je třeba tyto vzorky zbavit pevného podílu filtrací nebo centrifugací. Vzorek může, ale také nemusí být podroben další úpravě. V nezbytných případech, kdy je třeba odstranit vodu se tekuté vzorky lyofilizují a následně se zpracovávají jako pevné vzorky. Vzorek je buď přímo vpraven do separačního systému, nebo mohou být sloučeniny zakoncentrovány a purifikovány různými typy extrakčních metod. Záleží na zvolené detekční metodě (de Rijke, Out, Niessen, Ariese, Gooijer and Brinkman 2006).

3.4.2 Izolace isoflavonů z matrice

Existuje celá řada isoflavonů a lignanů s rozdílnou chemickou strukturou, mezi kterými může docházet ke vzájemným konverzím, mezi jednotlivými formami. Tyto konverze

závisí na několika faktorech, jako je skladování, zpracování a extrakce. K rozrušení biologické matrice se obvykle používá hydrolýza, zejména kyselá a alkalická. Cílem tohoto kroku je uvolnit analyt z biologické matrice, případně zvolit vhodné podmínky k jejímu rozštěpení tak, aby byla biologická matrice rozrušena a analyt by mohl být dále analyzován.

Hydrolýza má univerzální využití. Lze ji použít před, během a po extrakci za různých podmínek a různými prostředky. Alkalická hydrolýza narušuje esterové vazby mezi acylem a hydroxylovou skupinou sacharidů v glykosidech, což vede ke vzniku volných glykosidů. Nejčastěji se využívá hydroxid sodný (Setchell et al. 1987).

Kyselá hydrolýza naopak narušuje vazby uhlík-kyslík mezi aglykonem a sacharidem a tím vznikají volné aglykony. K narušení vazeb se využívají vodné roztoky organických rozpouštědel (acetonitril, metanol a etanol) s přidavkem kyseliny chlorovodíkové (HCl). Účinnost závisí především na koncentraci HCl, extrakční době a koncentraci rozpouštědla (Franke and Custer 1994).

V případě enzymatické hydrolýzy se využívají různé enzymy, u isoflavonů se jedná především o endogenní β -glukosidázy, β -glukuronidázy/sulfatázy a celulázy. Před samotnou hydrolýzou se provede extrakce vzorku 96% etanolem. Po úplném odpaření ve vakuu následuje digesce acetátovým pufrem, který obsahuje již zmíněné enzymy, inkubace a centrifugace. Enzymatická hydrolýza je v porovnání předchozími postupy mnohem šetrnější a vyznačuje se vyšší selektivitou (Cordisco et al. 2016).

3.4.3 Extrakce

Samotný proces extrakce je rovněž nedílnou součástí procesu při analýze isoflavonů. Obecně se jedná o separační proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze, mezi něž jsou rozděleny analyty na základě různé rozpustnosti v použitých rozpouštědlech (Cordisco, Haidar, Coscueta, Nerli and Malpiedi 2016).

Cílem extrakce je selektivní až specifické oddělení analytu od ostatních složek vzorku nebo naopak oddělení rušících složek od analytu. Proces extrakce by měl být rychlý, kvantitativní, jednoduchý a zároveň by měl minimalizovat případné interference. Při extrakci daného analytu z matrice lze využít široké spektrum extrakčních technik, které zahrnují digesci vzorku solventem, extrakci na ultrazvukové lázni, přes extrakci podle Soxhleta až po nové instrumentální extrakční metody (Murphy et al. 2002). Mezi moderní metody extrakce patří extrakce na pevné fázi (SPE), což je jedna z nejvíce používaných

technik pro separaci funkčních materiálů (Cho et al. 2009). Dále superkritická fluidní extrakce (SFE), extrakce urychleným tokem rozpouštědla (PLE), extrakce ultrazvukem (UAE) nebo mikrovlnná extrakce. Výhodou těchto metod je redukce času potřebného k extrakci, nižší spotřeba organického rozpouštědla, eliminace některých kroků extrakce (předčištění a zakoncentrování vzorku) před samotnou analýzou. Tyto moderní metody jsou efektivnější a přesnější díky plné automatizaci (Murphy, Barua and Hauck 2002).

3.4.3.1 Solid-Liquid extrakce (SLE)

Touto extrakcí se přenášejí selektivně některé složky směsí analyzovaných látek do vhodných rozpouštědel buď na základě pouhého fyzikálního principu rozpouštění, nebo v kombinaci s chemickou reakcí. Principem SLE je těsný kontakt mezi pevným vzorkem a solventem, ve kterém je analyt maximálně rozpustný. K úspěšnému převedení analytu ze vzorku do extraktu je důležitý výběr, množství a polarita rozpouštědla, objem a druh vzorku, dále délka a teplota extrakce, intezita třepání. Při extrakci polární kapalinou z úplně homogenizovaných vzorků se jako rozpouštědlo nejčastěji používá etanol, metanol nebo acetonitril, případně jejich vodné roztoky. V některých případech je možné využít dichlormethanu nebo dimethylsulfoxidu (Rostagno et al. 2005). Doba extrakce se v závislosti na použité extrakční kapalině a druhu vzorku pohybuje od jednotek hodin až po několik dní.

Mezi nejčastěji používané SLE metody se řadí Soxhletova extrakce, míchání, třepání a louhování. Extrakce v Soxhletově extraktoru patří mezi nejstarší extrakční techniky. Je součástí normovaných postupů a také se často používá jako standard pro nově vznikající extrakční techniky (Bucic-Kojić et al. 2007).

3.4.3.2 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Jedná se o separační techniku, která využívá specifické vlastnosti pro nadkritické tekutiny. Extrakčním činidlem je superkritická (nadkritická) tekutina. V SFE se k extrakci pevného vzorku běžně používá oxid uhličitý (CO₂). CO₂ má kritickou teplotu 31°C a kritický tlak 7149 kPa. To je dáno především možností využít některé vlastnosti látek, které se v tomto stavu nachází k optimalizaci stávajících extrakčních postupů. Kromě velké rozpouštěcí schopnosti mají nadkritické tekutiny i další výhodné vlastnosti. Díky nízké viskozitě a vysoké schopnosti difuze v sobě spojují solvatační sílu kapalin s výhodnými podmínkami pro přestup pevné látky v průběhu extrakce (Ganzera 2015).

Nejpoužívanějším superkritickým rozpouštědlem je oxid uhličitý (CO₂) pro své nízké hodnoty kritických veličin, jež má kritickou teplotu 31°C a kritický tlak 7149 kPa. Mezi výhody této reakce patří její rychlost (méně než 30 minut). Prakticky pracujeme s tlaky 40 – 70 MPa a teplotami 60 – 150°C. Nadkritický CO₂ je ideálním rozpouštědlem pro analyty dále analyzované instrumentálními metodami. Je nepolární, a proto rozpouští nepolární a málo polární sloučeniny. Dále tato metoda redukuje používání nebezpečných rozpouštědel a umožňuje on-line spojení s kapalinovou, plynovou či superkritickou fluidní chromatografií. Jednou z výhod aplikace SFE je omezení degradace aktivních sloučenin (Santos et al. 2017).

3.4.3.3 Extrakce urychleným tokem rozpouštědla (PLE)

Extrakce urychleným tokem rozpouštědla - pressurized liquid extraction (PLE) je technika, která při přípravě vzorku využívá teploty a tlaku k extrakci látek z pevných a semi-pevných vzorků. Tlak se používá ke zvýšení kontaktu mezi extrakční kapalinou a vzorkem. Teplota naopak slouží k rozbití vazby analyt-matrice a tím může významně měnit selektivitu extrakční tekutiny. Tyto podmínky umožňují snadnější rozpustnost analytu a jeho desorpci z matrice. Významným faktorem pro rychlou a efektivní extrakci analytu z pevné matrice je extrakční teplota. Dalším důležitým faktorem je vedle teploty a tlaku výběr vhodného rozpouštědla (Rostagno et al. 2004).

Výhodou techniky PLE je nižší spotřeba solventu, zkrácená doba extrakce a možnost provést extrakci bez přístupu světla a vzduchu. I přes tyto výhody není PLE vhodná pro termolabilní sloučeniny, neboť vysoká teplota může narušit strukturu analytu (Azmir et al. 2013).

3.4.3.4 Mikrovlnná extrakce (MASE)

Mikrovlnná extrakce – microwave assisted solid extraction (MASE) se řadí mezi alternativní metody extrakce isoflavonů z rostlinného materiálu a potravin. Tato metoda je založena na selektivní a rychlé lokalizaci vlhkosti ve vzorku mikrovlnami, tedy závisí na absorpci energie mikrovln molekulami polárních sloučenin. Účinnost mikrovlnného záření závisí na povaze vzorku, typu extrahovaných látek, vlastnosti rozpouštědla a také na dielektrické konstantě materiálu, která je přímo úměrná velikosti absorpce mikrovlnného záření (Bajkacz and Adamek 2017). Často bývá upřednostňováno rozpouštědlo s vysokou

dielektrickou konstantou, aby docházelo k silné absorpci záření. MASE může být aplikována na několik vzorků současně, což může také vést k dramatickému poklesu doby extrakce. Z hlediska snížení extrakčního času je využití mikrovlnné energie velice výhodné, protože mikrovlny ohřívají rozpouštědlo, či směsi rozpouštědel téměř okamžitě. Tato technika je často aplikována na stopovou analýzu organických sloučenin v pevných a kapalných vzorcích. Tato skutečnost vedla k použití MASE na extrakci isflavonů, polyfenolů z čaje a hroznových semen a pro extrakci kofeinu (Rostagno, Palma and Barroso 2007).

MASE patří mezi nejrychlejší extrakce a nachází využití i při extrakci termolabilních látek, rovněž našla uplatnění zejména v oboru environmentální chemie a zároveň byla úspěšně použita ke stanovení biologicky aktivních látek.

3.4.3.5 Extrakce ultrazvukem (UAE)

Při ultrazvukové extrakci- ultrasound assisted extraction (UAE) se uplatňuje fyzikální jev zvaný kavitace. V ultrazvukové lázni se vzorek intenzivně pohybuje, což způsobuje rozpad shluku částic a tepelný rozklad je redukován. Pohlcením ultrazvukové vlny solventem dochází k náhlým tlakovým změnám a vzniku kavitačních bublin. Bubliny se vlivem rostoucího tlaku a teploty rozpadají a vzniklá „vlna“ podporuje míchání. Zvýšená účinnost UAE je vysvětlována narušením buněčných stěn, zmenšením velikosti částic a zvýšením účinnosti přenosu hmoty buněčného obsahu při tvorbě a zániku kavitačních dutin (Rostagno et al. 2003).

Ultrazvuk působí na buněčné stěny dvěma způsoby. Může usnadnit bobtnání rostlinných materiálů, což může vést k rozšíření pórů buněčné stěny. Dochází ke zvýšení rychlosti přenosu hmoty, to může vést i k narušení buněčných stěn, což má za následek snížení extrakčního času a zvýšení účinnosti extrakce (Vilkhu et al. 2008).

Některé rostlinné buňky jsou součástí žláz (vnějších nebo vnitřních), které jsou zaplněny esenciálním olejem. Vnější žlázy jsou charakterizovány tenkým povrchem, který může být ultrazvukem lehce rozrušen a tím dojde k uvolnění esenciálního oleje do extrakčního rozpouštědla (Rostagno, Palma and Barroso 2003).

Optimalizací podmínek extrakce, jako je výkon ultrazvuku, teplota a čas jsou klíčovými kroky účinné extrakce. Při UAE lze použít jako extrakční činidlo vodný roztok obsahující neiontový surfaktant. Takový roztok poskytuje rychlejší extrakční kinetiku a vyšší návratnost ve srovnání s metanolem a vodou.

Při extrakci β -glukosidů poskytuje UAE lepší výsledky ve srovnání s klasickou extrakcí mícháním. UAE lze využít i pro extrakci liganů a kumestrolu (Konar et al. 2012).

3.4.4 Post-extrakční úpravy

Po extrakci isoflavonů z matrice je možné extrakt podrobit různým úpravám před samotnou analýzou. Tyto kroky mohou být minimální s ohledem na použitou techniku extrakce. Nejčastější techniky používané pro úpravu vzorků jsou filtrace, centrifugace, prekoncentrace a purifikace, evaporace do sucha, opětovné sušení v jiném solventu nebo SPE. Z extraktu se centrifugací nebo filtrací odstraní nerozpustné části, což však neplatí v případě PLE a SFE, kde tento krok nutný není (Rostagno, Palma and Barroso 2003). Výhodou centrifugace však je možnost úpravy objemu extraktu a tím vyloučení ztrát solventu s vyextrahovaným analytem. K odstranění možných interferujících sloučenin lze použít extrakci kapalina-kapalina liquid liquid extraction (LLE). Další možností je částečné nebo úplné odpaření rozpouštědla na rotační odparce a opětovné rozpouštění v 80% methanolu nebo přímo v MF pro HPLC (Rostagno, Villares, Guillamon, Garcia-Lafuente and Martinez 2009).

3.4.4.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Extrakce kapalina-kapalina (LLE) představuje nejjednodušší techniku frakcionace, přečištění a zkoncentrování cílových analytů surového extraktu. Mimo jiné může představovat první extrakční krok u kapalného vzorku. LLE je založena na ustavení fázové rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. V případě, že nalezneme vhodné extrakční činidlo, je tato extrakce velmi účinnou separační metodou. Je Rozpouštědlo je zvoleno tak, aby v něm byl analyt co nejvíce rozpustný. Nejvíce používaná rozpouštědla pro extrakci z biologických kapalných vzorků jsou etylacetát nebo dietyléter (Nguyen et al. 2010).

3.4.4.2 Extrakce na pevné fázi (SPE)

Extrakce na pevné fázi-solid phase extraction (SPE) patří mezi nejrozšířenější techniky, především díky její snadné použitelnosti a široké aplikovatelnosti. Výhodou SPE je oproti LLE redukce mnohých problémů související s LLE, jako je použití speciálního skla a likvidace velkého množství organických rozpouštědel. Hledané analyty mohou být přednostně izolovány ze složitých matric, přičemž izolace, přečištění a zkoncentrování analytu může být dosaženo v jediném kroku.

Při SPE je prvním krokem digesce rozpouštědlem. Poté je extrakt nanesen na vhodný sorbent. Vedle modifikovaného silikagelu patří k nejpoužívanějším rozpouštědlům především polymerní sorbenty na bázi divinylbenzenu a N-vinylpyrrolidu a kopolymeru styren –divinylbenzenu (PS-DVB).

Kopolymerní sorbenty na bázi divinylbenzenu a N-vinylpyrrolidinu umožňují extrakci v širokém rozmezí hodnot pH. Těto vlastnosti je využito u tzv. 2-D (dvoudimenzionální) SPE extrakce. Podstata techniky 2-D SPE spočívá v adjustaci vzorku a především v promývacích krocích, kde vhodnou úpravou pH dle typu analytu a optimalizace koncentrace organického rozpouštědla se dosáhne maximální selektivity a separace sledovaného analytu (Setchell et al. 2002).

SPE lze také provést formou mikroextrakce (SPME). SPME je velmi jednoduchá a efektivní metoda bez použití rozpouštědla a je ideální ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS), s kapilární elektroforézou, s plynovou chromatografií a HPLC. SPME je oproti SPE citlivější a dovoluje automatizaci extrakčního procesu, což vede ke zkrácení času celé analýzy. Nevýhoda SPE spočívá v nezbytném provedení hydrolyzy před extrakcí, protože podmínky metody nedovolují stanovit všechny formy isoflavonů (Vas and Vekey 2004).

3.4.5 Separální metody

3.4.5.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) se používá k identifikaci isoflavonů. Ve srovnání s papírovou chromatografií je TLC rychlejší, citlivější a univerzálnější. Společně s papírovou chromatografií se řadí mezi planární uspořádání chromatografie. Výhodou metody TLC je rychlost analýzy a malé nároky na vybavení, protože stacionární fáze jsou běžně dostupné. Základem stacionární fáze je skleněná nebo hliníková plocha, na kterou je nanesen sorbent (Sherma 2000). Nejčastěji se jedná o oxid hliníku, silikagel nebo celulózu. Vedle běžných sorbentů jako je, celuloza, silikagel, alumina, polyamid či Sephadex nebo jejich kombinace, se často používá chemicky modifikovaný silikagel. Povrch stacionární fáze je polární. Pro separaci na normální fázi se volí mobilní fáze méně polární, pro separaci na reverzní fázi je povrch stacionární fáze upraven a mobilní fáze se pak volí více polární. Planární chromatografie je v současné době používána metoda pro screening fytoestrogenů, rovněž nachází uplatnění v předběžné separaci či identifikaci (Mukerjea et al. 1996).

3.4.5.2 Plynová chromatografie (GC)

V roce 1985 byla základní metodou pro stanovení isoflavonů plynová chromatografie (GC). S rozvojem kapalinové chromatografie (LC) ustoupila GC v analýze fytoestrogenů do pozadí. V současnosti se však opět dostává do popředí zájmu díky rozvoji vysokoteplotní GC (HT-GC) a vylepšení procesu derivatizace. Mezi nevýhody techniky GC patří omezená separace pouze na aglykony isoflavonů a především nízká těkavost většiny isoflavonů. Před samotnou GC analýzou je nutné vzorek nejdříve upravit. Je nezbytné odstranit lipidy, dochází k uvolnění esterových a glykosidických vazeb procesem alkalické, kyselé či enzymatické hydrolýzy a derivatizaci. Proto je derivatizace nezbytným krokem analýzy. Vznik derivátů je při metodě GC potřebný ke zvýšení těkavosti analytů, což vede ke zvýšení citlivosti a selektivity detekce. Nejpoužívanějším derivatizačním činidlem je trimethylsilyléter (TMS). Pokud však analyt obsahuje více hydroxylových skupin, vznikne více derivátů a to zhoršuje stanovení. Problémy s derivací byly popisány u polyhydroxylových derivátů isoflavonů, jako je genistein. TMS deriváty jsou analyzovány nepolárními kapilárními kolonami s využitím lineárního teplotního gradientu (Grace et al. 2003).

3.4.5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je nejpoužívanější separační technikou v kombinaci s řadou detekčních technik. Nejčastěji nachází využití uspořádání s reverzní fází na stacionární matici (alkylovaných silikagelech C18, C8 popřípadě i na modifikovaných sorbentech fenylovou nebo diolovou skupinou), většinou se směsí acetonitrilu a metanolu jako mobilní fází. Tato technika se ukázala jako vhodná pro analýzu isoflavonů (Barnes et al. 1994).

Sledované analyty lze s omezenou pravděpodobností identifikovat na základě jejich retenčních časů nebo metodou standardního přídatku. HPLC pracuje s vysokým tlakem, vysokými průtoky mobilních fází a nízkou teplotou v kontrastu s hmotnostní spektroskopií, která využívá nízký průtok, vakuum a plynnou fázi při vysokých teplotách (Magiera and Sobik 2017).

Separace na reverzní fází je založena na hydrofobní interakci jednotlivých analytů se stacionární fází. Retenční čas analytu závisí na rozpustnosti ve vodě, tedy roste s jejich vzrůstajícím hydrofobním charakterem. Hydrofobní charakter roste dle následující řady:

β -glukosid, malonyl a acetylglukosid, a nejvíce hydrofobní je volný aglykon. V případě separace založené na hydrofilních interakcích je pořadí eluce opačné (Prokudina et al. 2012).

3.4.5.4 Elektromigrační separační metody

Elektromigrační separační metody využívají rozdílnou pohyblivost nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost částic závisí na velikosti a tvaru molekul, na velikosti náboje, na síle elektrického pole a taktéž na podmínkách prostředí. Ve srovnání s chromatografickými metodami jako je GC a LC je kapilární elektroforéza (CE) relativně novou separační technikou (Bustamante-Rangel et al. 2012).

V současné době existuje několik módů: kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární isoelektrická fokusace (CIEF), kapilární isotachoforéza (CITP), kapilární elektrochromatografie (CEC) a kapilární elektroforéza v nevodném prostředí (NACE).

CE je metoda účinná a rychlá, která nevyžaduje velký objem vzorku a v porovnání s kolonami HPLC mají kapiláry v CE delší životnost. Ve srovnání s HPLC mají elektromigrační metody nižší citlivost, což nedovoluje jejich použití v analýze malého množství vzorků. Další nevýhodou je také špatná reprodukovatelnost vůči HPLC především z důvodu překrytí píků analytu píky interferujících látek ve vzorku (Urbánek et al. 2002).

Nejjednodušší a nejuniverzálnější uplatnění při stanovení isoflavonů nachází CZE. Vzorek je umístěn do prostředí základního elektrolytu, jehož složení zaručuje v celé separační kapiláře konstantní podmínky, tj. homogenní elektrické a chemické pole. Separace při CZE je rychlejší než u HPLCE, avšak méně selektivní.

MEKC je modifikovanou elektroforetickou technikou založenou na přidání surfaktantů do základního elektrolytu. Surfaktanty tvoří micely nesoucí náboj, které migrují v kapiláře působením elektrického pole podobně jako všechny částice s nábojem. Analyty se rozdělují mezi micely a pufr, což vede k další selektivě separace. Díky tomu je micela považována za pseudostacionární fázi, podobnou stacionární fázi v kapalinové chromatografii. Nejčastěji se jako pseudostacionární fáze používá dodecylsulfát sodný (SDS), jako MF borátový pufr ve směsi s etanolem. MEKC umožňuje snadnější separaci hydrofilních aglykonů isoflavonů, jež jsou méně rozpustné v pufrech používaných při CZE. Další výhodou MEKC je i nízký detekční limit (Weston and Brown 1997). CE našla v po-

sledních letech uplatnění především při detekci isoflavonů ve spojení s elektrochemickým detektorem, detektorem diodového pole nebo s hmotnostním detektorem (Bustamante-Rangel, Delgado-Zamarreno, Carabias-Martinez and Dominguez-Alvarez 2012).

3.4.5.5 Imunoanalýza

Imunochemické metody jsou vhodným doplňkem obecně používaných instrumentálních technik. Svoji jednoduchostí, nenákladností a adaptabilitou pro sériová měření představují obrovský potenciál zejména ve screeningovém stanovení. Také vysoká citlivost a značné rozpětí koncentrací, v němž mohou tyto metody pracovat, dává možnost jejich využití k detekci isoflavonoidů v nejrůznějších matricích.

Ve většině případů se používá enzymová imunoanalýza (ELISA), která patří mezi velmi specifické metody. Vazba mezi antigenem a protilátkou je detekována pomocí enzymu navázaného na antigenu nebo protilátce, přičemž nejčastěji se používá peroxidáza. Po vzniku vazby přemění enzym bezbarvý substrát na barevný produkt. Intenzita zbarvení produktu se měří spektrofotometricky a můžeme stanovit protilátku nebo antigen.

Isoflavony jsou nízkomolekulární látky a proto je nutné před samotnou imunizací navázat na mikrotitrační destičku vysokomolekulární nosič. Tímto nosičem nejčastěji bývá bovinní sérový albumin (BSA). V případě daidzeinu a genisteinu byly vytvořeny konjugáty pomocí vazby v polohách 7 a 4, pro biochanin A pouze přes polohu 7. Stejný postup byl použit pro syntézu konjugátu 7-karboxymethylgenisteinu s ovalbuminem (OVA). ELISA nahradila dříve používanou radioimunanalýzu (RIA), zejména kvůli nižší ceně, rychlosti reakce a stanovení poměrně velkého množství vzorků.

3.4.6 Identifikace a detekce

3.4.6.1 UV/VIS detekce

UV/Vis detektory, zejména detektor diodového pole (DAD), mohou pracovat v širokém rozmezí vlnových délek a jsou nejčastěji používanými detektory ve spojení s HPLC nebo při elektromigračních separacích. Fytoestrogeny a jejich prekurzory mají velmi podobnou strukturu. Obsahují minimálně jeden aromatický kruh, což umožňuje jejich detekci v oblasti UV/Vis spektra. Detekce v ultrafialové a viditelné oblasti se provádí spektrofotometricky, pro isoflavony je to v rozmezí 240 – 285 nm (Vacek et al. 2008).

Identifikace analytu spočívá ve vyhodnocení retenčních časů nebo se používá metoda přidavku interního standardu. V současnosti se pro přesnější vyhodnocení kombinuje porovnání retenčních časů s DAD absorpčními spektry z knihovny spekter. K tomu slouží faktor shody (match faktor), který vzniká matematickým srovnáním spektrální křivky sledovaného analytu se spektrální křivkou standardu a toto tvrzení je nutné ještě potvrdit alespoň jedním nezávislým faktorem, například shodou retenčních časů. Spektrální knihovny musí být vytvořeny za přesně definovaných podmínek separace, tj. shodná mobilní fáze, průtok, typ chromatografického čerpadla, kolona i teplota. Komerčně dostupné knihovny nelze použít, neboť isoflavony vykazují velmi podobná spektra a jejich jednotlivé izoformy mají téměř shodná spektra. V tomto případě se lze řídit podle retenčních časů eluce v pořadí malonylglukosid, β -glukosid, acetylglukosid a aglykon. Nevýhodou UV detekce je nedostatek strukturních informací a neúplná specifita vedoucí k interferencím a neoznačených píkům (Klejduš et al. 2005).

3.4.6.2 Detekce pomocí fluorescence a chemiluminiscence

Fluorescencenční detektory jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního (emisního) záření, které látka vydá po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření.

Absorpcí elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního vibračního stavu do různých vibračních hladin excitovaného stavu. Vlnová délka záření emitovaného je větší než záření absorpčního. Fluorescencenční detekce je citlivější než UV/Vis detekce. Pro lepší detekovatelnost analytu se provádí derivatizace, která je však omezená vlastní fluorescencí některých fytoestrogenů.

Chemiluminiscence (CL) se provádí v kombinaci s průtokovou injekční analýzou (FIA). Vzorek je smíchán s chemiluminiscenční látkou a vpraven do reakční cely luminometru. Tato metoda představuje efektivní optickou detekci vybraných isoflavonů bez složité separace a lze ji aplikovat nejen v klinické praxi, ale také v potravinářství.

3.4.6.3 Elektrochemická detekce

Elektrochemická detekce – electrochemical detection (ED) je vhodná pro stanovení elektroaktivních analytů (snadno oxidovatelné látky). Pro stanovení isoflavonů s využitím elektrochemické detekce se velmi často používá ve spojení s HPLC nebo elektromigrač-

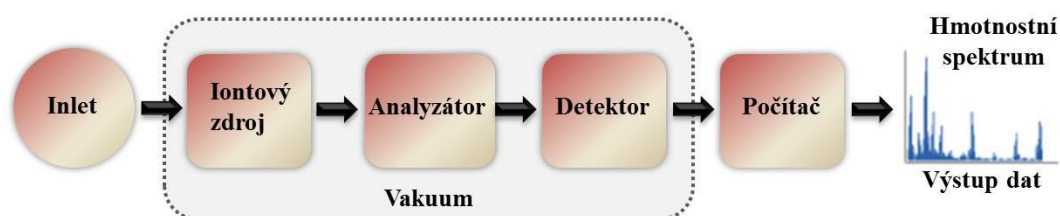
ními separačními technikami. Používá se buď amperometrický, nebo coulometrický detektor. Coulometrický detektor je ve srovnání s amperometrickým citlivější. Mobilní fáze obsahuje analyt, který prochází skrz porézní elektrodu. To vede ke zvětšení povrchu a dochází k úplné oxidaci/redukci analytu. Na principu coulometrického detektoru byl vynalezen multikanálový elektrochemický detektor (CEAD), principem podobný DAD. Systém je tvořen analytickou celou. V cele je obsažena referenční platinová (Pt) elektroda a čtyři pracovní elektrody. Elektrody jsou zapojené v sérii a tvoří elektrodové pole. Mobilní fáze je v ideálním případě elektrochemicky inertní. Vhodné je použití metanolu nebo acetonitrilu. Obecně se tento typ detekce používá ve spojení s elektromigračními metodami. Mimo jiné se ke stanovení daidzeinu a genisteinu používá i uhlíková pastová elektroda (CPE).

Výhodou CEAD je citlivost detekce i při měření koncentrací blížících se limitu detekce, dále je možné analyzovat i komplexní směsi, a rovněž není vyžadována hydrolyza vzorku. Na druhou stranu je tento typ detekce velmi náročný na čistotu vzorku.

3.4.6.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda obecně používaná k detekci organických látek z biologických materiálů. MS se nejčastěji používá ve spojení s HPLC nebo GC. Vysoký průtok, tlak a nízká teplota, jsou veličiny charakteristické pro průběh HPLC, což je v rozporu s podmínkami hmotnostní detekce (Cuyckens and Claeys 2004).

Problémy s online propojením vyřešilo rozhraní pro spojení separačních a spektrálních metod. Úkolem rozhraní je provést rozprášení a ionizaci vzorku a také odstranit rozpouštědlo. Vzniklé ionty jsou analyzovány ve hmotnostním detektoru (obrázek 6) poměrem hmotnosti a náboje vzniklého iontu (m/z).



Obrázek 6: Schéma hmotnostního detektoru. Převzato a upraveno dle (van Baar 2000).

Vývojem nových ionizačních metod pomocí elektrospreje (ESI) nebo chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) došlo k začlenění MS mezi běžně používané techniky. Ionty mohou být aktivovány přímo v iontovém zdroji. Vznikají kolizní spektra, která umožňují podrobnou analýzu struktury analytu. Velikost fragmentace závisí na kolizním napětí, složení mobilní fáze a koncentraci složek mobilní fáze, na zvoleném modifikátoru a na struktuře analytu (Barnes et al. 1998). APCI slouží k detekci méně polárních sloučenin, naopak ESI se používá pro látky ionizovatelné v roztoku. Tandemové zapojení ESI-MS a ACPI-MS s HPLC patří mezi nejpoužívanější. V analýze isoflavonů je vhodnější ESI mód, neboť je šetrnější. Oba typy ionizace lze provést v pozitivním i negativním módu. Negativní mód je v obou případech ionizace citlivější. Novějšími technikami v analýze fytoestrogenů vedle již běžně používané ESI jsou nanoESI a ionizace pomocí desorpce elektrosprejem (DESI), která tvoří přechod mezi ESI a MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization). Její výhodou je citlivost provedené analýzy za podmínek in situ, neboť se zkracuje čas potřebný na přípravu vzorku k analýze (Griffith and Collison 2001).

Jsou známy různé typy MS, přičemž v analýze fytoestrogenů se nejčastěji používá kvadrupólový analyzátor (QMS), trojitý kvadrupólový analyzátor (QqQMS) nebo průletový analyzátor (TOFMS). Alternativní metodou pro stanovení glykosidů je MALDI-TOF MS. Výhodou této metody je minimální úprava vzorku, schopnost analyzovat směsi a nižší nároky na čistotu vzorku. Pro analýzu fytoestrogenů ve vodných vzorcích se používá hmotnostní detekce s kvadrupólem a TOF analyzátozem. Detekce pomocí MS je přesnější než UV/Vis detekce a zapojení dvou detektorů za sebou v tandemu MS/MS citlivost detekce ještě zvyšuje (Prokudina, Havlíček, Al-Maharik, Lapčík, Strnad and Gruz 2012).

3.4.6.5 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Nukleární magnetická rezonance (NMR) společně s MS patří mezi nejpoužívanější techniky ve strukturní analýze látek rostlinného původu. Vazba HPLC v návaznosti na NMR je přímá a již není nutné použít rozhraní jako v případě MS detekce. Citlivost NMR je nižší než u MS. Pro úspěšnou analýzu je nutné použít větší množství vzorku. Vhodnou mobilní fází pro NMR je acetonitril nebo metanol. Ve většině případů se jedná o komplexní sloučeniny, není vždy možná identifikace analytu v jediném kroku.

Existují dva režimy provedení NMR, one-flow a stop-flow režim. Z one-flow režimu jsou spektra získávána kontinuálně během separace a výsledkem je 2D spektrum. Detekční limit tohoto módu je nižší než u stop-flow režimu. Obecně se NMR detekce používá pro analýzu rostlinných materiálů, včetně sójových produktů. Kombinace NMR s dalšími způsoby detekce je stejně efektivní, jako v případě MS.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Použité odrůdy sóji

V experimentu bylo použito osm odrůd sóji luštinaté (Brunensis, Bohemians, Naya, Moravians, Silesia, Toutatis, Korus a Kofu). Zmíněné odrůdy poskytl k analýze pan Ing. Vojtěch Hlavjenka (AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk), které pocházely ze zkušební oblasti Šumperk.

Jedná se o výběr nejvíce pěstovaných odrůd na území České Republiky (EAGRI 2016). Převážně se jedná o ranné odrůdy s vysokým výnosem semene.

4.1.2 Použité chemikálie

Veškeré chemikálie použité v experimentu byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA), v případě, že není uvedeno jinak. Chemikálie odpovídají čistotě ACS.

V analýze byly použity standardy isoflavonů (daidzin, genistin, glycitin, daidzein, glycitein, genistein) od firmy Extrasynthese (Francie). Rozpuštěním standardů v 80% metanolu byl připraven zásobní roztok standardních látek o koncentraci 10 mg.l⁻¹. Zásobní roztok standardních látek byl skladován v lednici bez přístupu světla při teplotě 4 °C.

Pro HPLC analýzu byl použit acetonitril a 0,2% kyselina octová. Metanol, dietyléter nestabilizovaný, hexan a bezvodý síran sodný pocházely od firmy Penta Švec, Chrudim. Demineralizovaná voda byla připravena systémem Milli Q RG (Millipore, Massachusetts, USA).

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava vzorků

Vzorky sójových bobů odrůd Brunensis, Bohemians, Naya, Moravians, Silesia, Toutatis, Korus a Kofu byly pomlety laboratorním mlýnkem IKA A11 basic (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo) na homogenní částice o velikosti menší než 0,1 mm. K pomletí

bylo odebráno cca 20 g sójových bobů. Drcení a homogenizace byly nezbytným krokem ke zvětšení povrchu vzorku, který byl v průběhu extrakce vystaven působení solventu. Zároveň tento krok vedl k dosažení lepších výsledků extrakce. Z každého vzorku bylo odváženo potřebné množství v [g] s přesností na 4 desetinná místa. Veškeré vážení probíhalo na analytických vahách Precisa 240 A (Německo).

4.2.1.1 Extrakce

V experimentální části byla využita solid-liquid extrakce (SLE) s využitím tří různých technik, které jsou uvedeny níže. Celkem byly zvoleny tři různé techniky provedení extrakce. Ve všech případech byl použit 80% metanol. (Rostagno, Villares, Guillamon, Garcia-Lafuente and Martinez 2009) ve své studii uvádí, že 80% poskytuje nejvyšší výťažnost isoflavonů a reprodukovatelnost výsledků. Metanol pro analýzu byl získán zředěním 99.9% metanolu (PENTA)

První sada vzorků byla připravena odvážením 1 g suchého homogenního prášku. Ke každému vzorku bylo přidáno 50 ml 80% metanolu. Vše bylo smícháno v odměrné baňce a poté mícháno na třepače IKA KS 4000 iconcontrol (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo) při teplotě 50°C a otáčkách 200 rpm po dobu 60 minut.

Druhá extrakční technika zahrnovala odvážení 0,02 g vzorku do eppendorfovy zkumavky. Ke každému vzorku byl přidán 1 ml 80% metanolu. Do každé ze zkumavek byly přidány tři skleněné kuličky a následně byly vzorky homogenizovány na homogenizátoru IKA ULTRA-TURRAX® Tube Drive Workstation (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo) po dobu 120s. Po vytažení z homogenizátoru byly vzorky zcentrifugovány na centrifuze Z 326K HERMLE (HERMLE Labortechnik GmbH, Německo) při otáčkách 20 000 ref po dobu 15 min při teplotě 19°C.

Třetí extrakční technikou byla extrakce s využitím třecí misky. Rovněž bylo odváženo 0,02 g vzorku, ke kterému byl přidán 1 ml 80% metanolu. K této směsi byl přidán mořský písek praný (PENTA) v množství cca 0,1 g. Po homogenizaci vzorku s mořským pískem byl opětovně přidán mořský písek v množství cca 0,1 g. Opět byla provedena homogenizace, tentokrát do mírného odpaření metanolu. Dále byl přidán 1 ml 80 % metanolu k promytí misky a vzniklé směsi. Vzniklý objem byl napipetován do eppendorfovy zkumavky. Následovala centrifugace o stejných parametrech, jako u předchozí extrakce. Vzorky byly skladovány ve tmě a v chladu při teplotě 4°C.

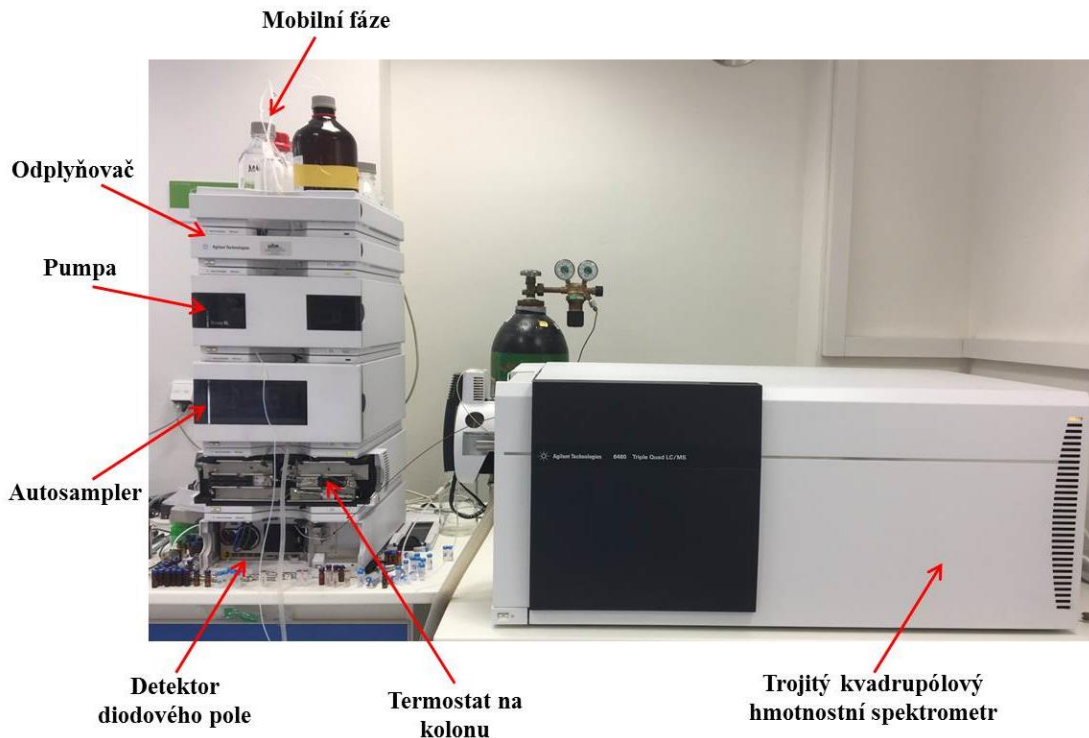
Před použitím pro chromatografickou analýzu byly všechny vzorky přefiltrovány přes LUT Syringe Filter Nylon (Labicom) s parametry 13mm; 0,45 µm, pk/100.

4.2.1.2 Separace a identifikace isoflavonů metodou HPLC

Chromatografická analýza

Pro analýzu množství isoflavonů ve vybraných odrůdách sójových bobů byla zvolena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v tandemu s hmotnostním detektorem (MS), konkrétně trojitým quadrupólem (LC-MS/MS). Kombinace vysoce efektivní chromatografické techniky s efektivními izolačními a purifikačními technikami je pro kvantitativní analýzu isoflavonů zcela vyhovující (Zhao et al. 2015).

Detekce isoflavonů probíhala na chromatografu HPLC Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Systém byl sestaven z vakuové odplyňovací jednotky (model G1379B), binárního čerpadla mobilní fáze (model G1312B), automatického dávkovače vzorku (model G1367D) a termostatu na kolonu (model G1316B). Vysokoúčinný kapalinový chromatograf byl propojen s detektorem diodového pole (model G1315C) a trojitým kvadrupólovým hmotnostním detektorem 6460 Triple Quad LC/MS (model G6460A).



Obrázek 7: Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu. Zdroj: Foto vlastní.

- *Parametry a podmínky HPLC*

Separace isoflavonů byla provedena na reverzní fázi. Pro separaci byla zvolena kolona Zorbax SB Poroshell 120 EC-18 (4,6x100mm; velikost částic 2,7 μm). Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu (organická složka MF, solvent A) a 0,2% kyseliny octové (vodná složka MF, solvent B). Vodný roztok kyseliny octové byl připraven následujícím postupem. 2 ml kyseliny octové byly napipetovány do odměrné baňky o objemu 1l a celý roztok byl doplněn po rysku ACS vodou. Pro separaci byla zvolena gradientová eluce se složením mobilní fáze: 10% (A): 90% (B) v čase 0 minut; 40% (A): 60% (B) v čase 2 minut; 0% (A): 100% (B) v čase 4 minuty; 90% (A): 10% (B) v čase 6 minut. Celkový čas analýzy byl 7 minut.

Rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplota termostatu byla nastavena na teplotu 60°C .

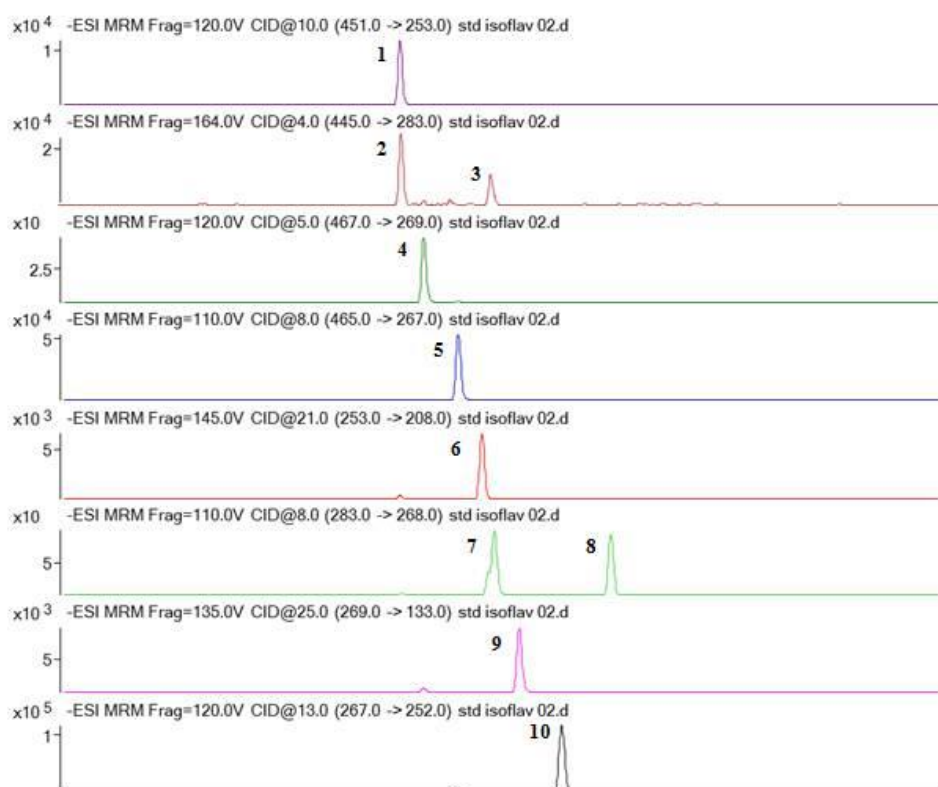
- *Parametry trojitého kvadrupólu*

U hmotnostního detektoru (MS) byl zvolen jako sušící plyn dusík, který protékal rychlostí $31\cdot\text{min}^{-1}$ při teplotě 350°C a při napětí na kapiláře 3500V. Tlak v neulizéru činil 50

psi. Zaostřovací plyn protékal rychlostí $121.\text{min}^{-1}$ při teplotě 400°C . Hmotnostní spektra byla snímána v trojitém quadropólu, který pracoval v negativním ESI módu.

Laboratorní měření

Extrakt vzorků byly přefiltrovány do vialek určených pro HPLC a následně proběhla separace pomocí HPLC zapojeném v tandemu s hmotnostním spektrometrem (LC-MS/MS). Chromatogramy a spektra jednotlivých vzorků byly nahrány do počítače. Na obrázku číslo 8 je znázorněn záznam z měření standardů isoflavonů. Parametry použité k detekci isoflavonů v MS jsou uvedeny v tabulce č. 2.



Obrázek 8: MRM chromatogramy standardu isoflavonů. Identifikace píků: 1. Daidzin, 2. Glycitin, 3. Sissotrin, 4. Genistin, 5. Ononin, 6. Daidzein, 7. Glycitein, 8. Biochanin A, 9. Genistein, 10. Formononetin.

Bylo provedeno kvalitativní vyhodnocení na základě porovnání retenčních časů analyzovaných vzorků s retenčními časy standardů. Kvantitativní vyhodnocení bylo vypočteno z plochy píku pomocí softwaru MassHunter a následně přepočteno na jednotku

mg/100g vzorku. Kalibrační údaje ke stanovení jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka 2: Parametry hmotnostního spektrometru (trojitý quadrupól)

Sloučenina	Rovnice regresní přímky	Korelační koeficient
Daidzein	$y = 73\,414,31x + 13,40$	0,998
Daidzin	$y = 12917,14x + 33,81$	0,986
Genistein	$y = 6\,683,13x + 106,22$	0,998
Genistin	$y = 36\,957,08x + 283,06$	0,981
Glycitin	$y = 16626,82x - 307,71$	0,999
Glycitein	$y = 391\,367,24x - 1746,19$	0,999

Tabulka 3: Kalibrační údaje hmotnostního spektrometru (trojitý quadrupól)

Název sloučeniny	Prekurzorový ion	Produktový ion	Fragmentační napětí (V)	Kolizní energie (eV)	Polarita
Glycitin	481	283	100	8	Neg
Genistin	467	269	120	5	Neg
Daidzin	451	253	120	10	Neg
Glycitein	283	268	110	8	Neg
Genistein	269	159	112	24	Neg
Daidzein	253	208	145	21	Neg

4.2.1.3 Statistické zpracování naměřených dat

Každý vzorek byl změřen třikrát. Kvantitativní množství každé sledované látky bylo vyjádřeno jako průměr tří naměřených hodnot, včetně směrodatné odchylky. Jednotlivé grafy jsou doplněny o chybové úsečky. Naměřené hodnoty byly zpracovány pomocí softwaru STATISTICA 12 a Microsoft EXCEL. Veškeré komentáře jsou uvedeny ve výsledcích.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V experimentální části této diplomové práce byla hodnocena přítomnost a koncentrace isoflavonů extrahovaných ze sójových bobů jednotlivých odrůd sóji luštinaté (Brunensis, Bohemians, Naya, Moravians, Silesia, Toutatis, Korus a Kofu).

Byla hodnocena účinnost jednotlivých extrakcí a ze získaných dat byla následně zhodnocena celková výtěžnost vybraných isoflavonů v závislosti na typu použité extrakce. Rovněž byla porovnána výtěžnost celkových, volných (aglykony) a konjugovaných (β -glukosidy) isoflavonů v závislosti na odrůdě.

Množství isoflavonů bylo vyjádřeno v mg na 100g vzorku a také byla vypočtena směrodatná odchylka činila u všech stanovení v rozmezí od 1% až 8%. Naměřené koncentrace u jednotlivých druhů odrůd jsou uvedeny v příloze.

Průměrné hodnoty obsahu jednotlivých isoflavonů jsou brány z výsledků dosažených extrakcí s využitím třepačky a následné centrifugace. Výsledky zbylých dvou technik jsou také uvedeny v příloze.

5.1 Porovnání účinnosti extrakčních technik isoflavonů

Při optimalizaci metody extrakce vzorků byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi zvolenými extrakčními metodami.

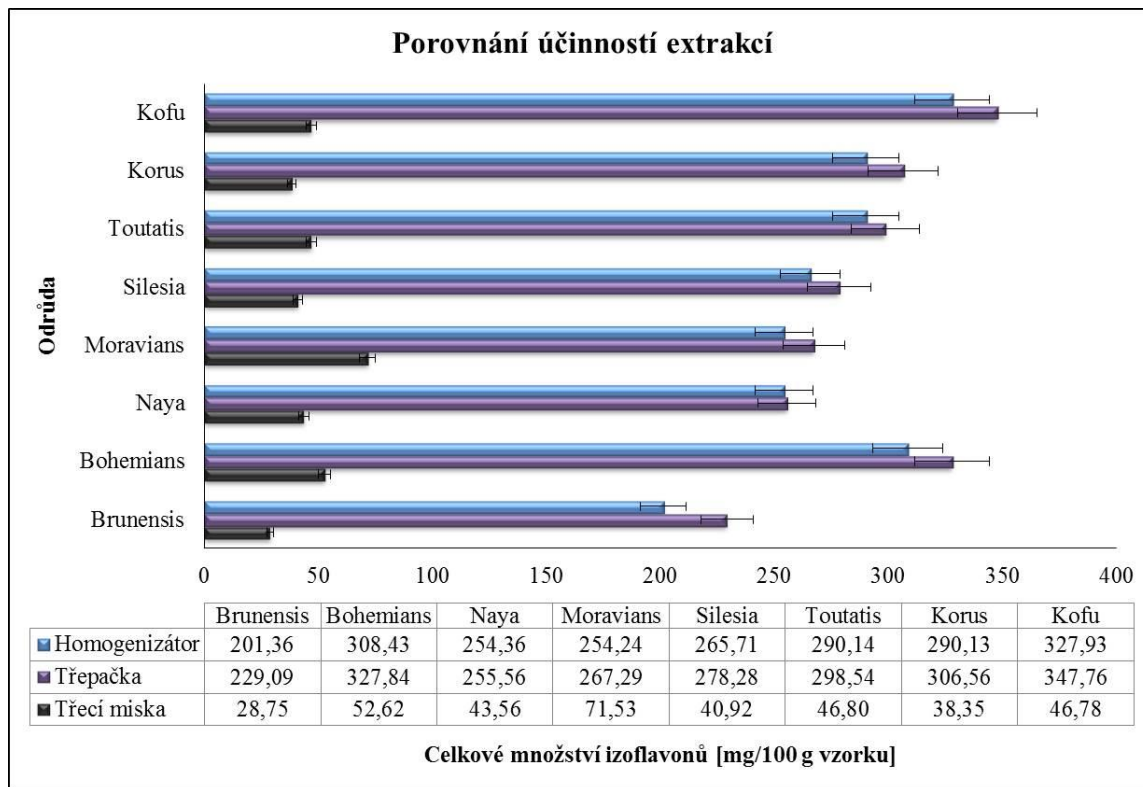
Ke statistickému vyhodnocení bylo použito mnohonásobné porovnání mezi metodami extrakce – třecí miska, homogenizátor a třepačka.

Nulová hypotéza zněla, že mezi jednotlivými metodami extrakce nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. U žádné z technik nebyla Shapiro-Wilkovým testem zamítnuta hypotéza o normálním rozdělení dat. Dále bylo potřeba ověřit homogenitu rozptylu. Ke zjištění homogenity dat byl použit Levenův test. P-hodnota ($p = 0,034$) vyšla menší než 0,05, tudíž byl zamítnut předpoklad o homogenitě rozptylu a bylo třeba data otestovat s využitím Kruskal-Wallisova testu. U tohoto testu vyšla hodnota $p=0,0004$, je tedy menší jak 0,05 a mezi skupinami byl prokázán statisticky významný rozdíl. Proto byl použit post-hoc test, který určil, mezi kterými skupinami je rozdíl.

Post-Hoc test potvrdil, že je statisticky významný rozdíl mezi metodou extrakce třecí miskou v porovnání s extrakcí třepačky a homogenizátoru, přičemž mezi těmito dvěma metodami není statisticky významný rozdíl.

Potvrzení statistického vyhodnocení je patrné z grafu č. 1, kde je možné pozorovat, že nejúčinnější metodou byla extrakce pomocí laboratorní třepačky s následnou centrifugací. Je možné, že tato metoda byla nejúčinnější právě z toho důvodu, že byla využita

vyšší teplota, což mohlo vést k narušení silných interakcí (van der Wallsovy síly a vodíkové můstky) mezi analytem a maticí (Klejdus et al. 2004a).



Obrázek 9: Porovnání účinností extrakcí prostřednictvím tří metod extrakce s využitím extrakčního rozpouštědla (80% metanol) ze vzorků jednotlivých odrůd sójových bobů.

5.2 Stanovení koncentrace celkového obsahu isoflavonů

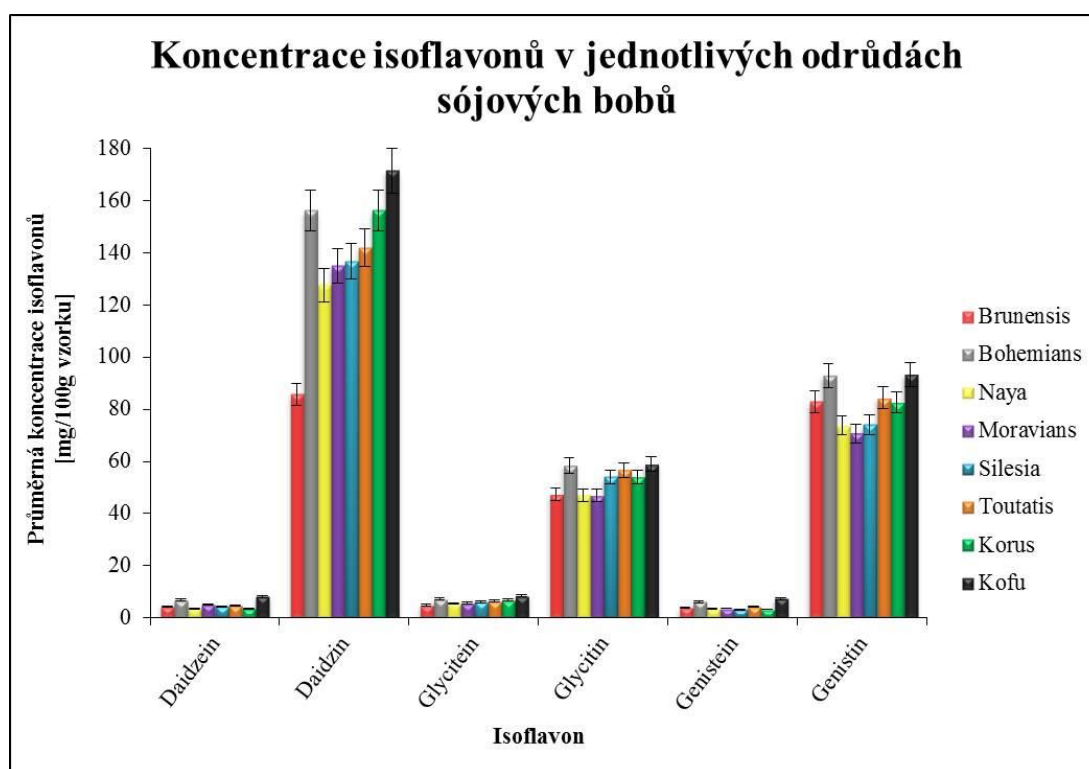
Z grafu vyplývá, že nejvyšší koncentrace byla koncentrace daidzinu a celkově byla potvrzena vyšší koncentrace volných forem isoflavonů. Kromě výše zmíněných isoflavonů byly také detekovány formononetin, biochanin A, ononin a sissotrin. Jejich koncentrace však byla velmi nízká, proto jejich v experimentální části nejsou uvedeny.

Celkové množství isoflavonů ve zralých sojových bobech se v Evropě pohybuje v průměru od 45,38 – 161,22 mg/100g vzorku (Bhagwat et al. 2008). Nejvyšší množství isoflavonů obsažené v sojových bobech bylo dosaženo ve Spojených státech amerických. Hodnota celkového množství isoflavonů se pohybovala od 18,08 – 388,08 mg/100g vzorku (Bhagwat, Haytowitz and Holden 2008). Z poměrně nedávné studie (Lee et al. 2015) vyplývá, že celkový obsah isoflavonů se také může pohybovat od 676,30 mg/100g

– 930,30 mg/100g vzorku. Ve studii (Devi et al. 2009) vědci uvádí, že se celkový obsah isoflavonů ve speciálních kultivarech pohyboval v rozmezí od 52,5 mg/100g do 98,6 mg/100g vzorku.

Data uvedená v obrázku (obrázek 10) byla převzata z extrakce pomocí třepačky, neboť se u ní prokázala nejvyšší účinnost, čemuž odpovídá i výtěžnost. V dalších kapitolách jsou uvedeny i výsledky isoflavonů získaných ze všech extrakčních technik, aby vznikl komplexní pohled na výtěžnost isoflavonů jednotlivými metodami.

Zároveň můžeme říci, že nejvíce celkových isoflavonů bylo v odrůdách Kofu a Bohemians, naopak nejméně celkových isoflavonů obsahovala odrůda Brunensis.



Obrázek 10: Stanovení průměrné koncentrace celkových isoflavonů prostřednictvím extrakční techniky SLE s využitím třepačky a následné centrifugace.

5.3 Obsah isoflavonů v jednotlivých odrůdách sójových bobů

V návaznosti na předchozí kapitolu lze porovnat obsah jednotlivých isoflavonů detekovaných v následujících odrůdách. Z níže uvedených grafů je patrné, že nejvyšších hodnot

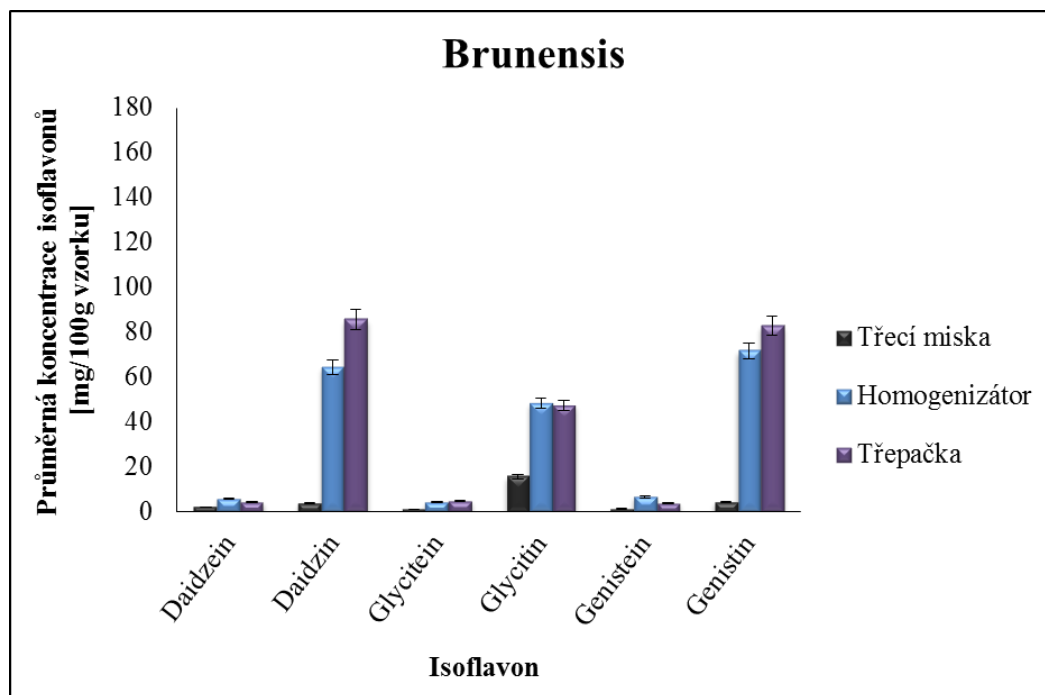
dosahoval daidzin všemi metodami extrakce. A bylo tomu tak i u všech osmi odrůd. Následoval obsah genistinu a glycitinu. β -glukosidy byly detekovány v podstatně nižší koncentraci.

Brunensis

V případě odrůdy Brunensis (obrázek 11) je v grafu zohledněna závislost extrakční metody na výtěžnosti isoflavonů. Nejvíce byl zastoupen daidzin, u kterého byla dosažena nejvyšší koncentrace $85,74 \pm 1,51$ mg/100g vzorku, extrakcí třepačkou. Následoval obsah genistinu ($82,86 \pm 1,13$ mg/100g vzorku), glycitinu ($47,44 \pm 1,23$ mg/100g vzorku). Množství glyciteinu ($4,86 \pm 0,07$) a genisteinu ($3,88 \pm 0,08$) bylo poměrně nízké.

Pro srovnání byly uvedeny i výsledky dosažené extrakcí s využitím homogenizátoru a třecí misky. V případě homogenizátoru byla dosažena nejvyšší výtěžnost genistinu ($71,65 \pm 1,41$ mg/100g vzorku), následoval daidzin ($64,40 \pm 2,44$ mg/100g vzorku), glycitin ($48,38 \pm 1,43$ mg/100g vzorku), genistein ($6,70 \pm 0,24$ mg/100g vzorku), daidzein ($5,79$ mg/100g vzorku) a nejméně zastoupen byl glycitein ($4,44 \pm 0,10$ mg/100g vzorku).

Co se týče třecí misky, tak nejvyšší obsah byl glycitinu ($15,65$ mg/100g vzorku), následoval genistin ($4,50 \pm 0,23$ mg/100g vzorku), daidzin ($3,98 \pm 0,24$ mg/100g vzorku). Nejméně bylo daidzeinu ($2,12 \pm 0,11$ mg/100g vzorku) a genisteinu ($1,33 \pm 0,08$ mg/100g vzorku).



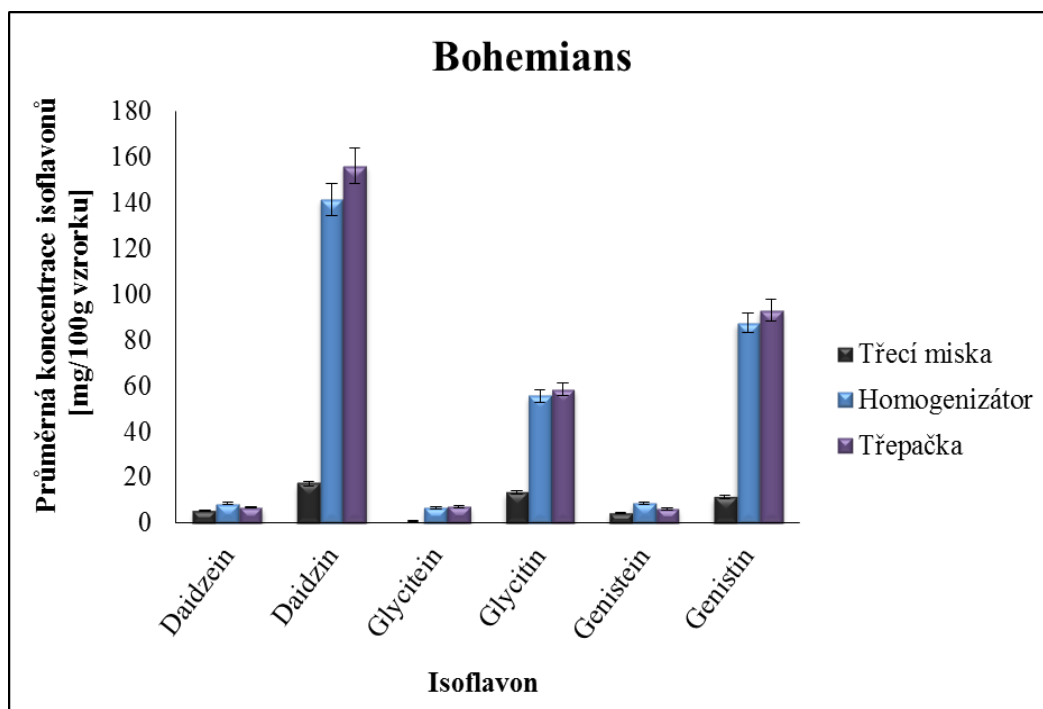
Obrázek 11: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Brunensis.

Bohemias

Odrůda Bohemias (obrázek 12) obsahovala nejvíce daidzinu ($156,14 \pm 3,58$ mg/100g vzorku) při použití extrakce pomocí třepačky. Následoval genistin ($92,98 \pm 2,12$ mg/100g vzorku), glycitin ($58,46 \pm 1,13$ mg/100g vzorku) rovněž za použití extrakce pomocí třepačky. Množství glyciteinu ($7,22 \pm 0,21$ mg/100g vzorku), daidzeinu ($6,88 \pm 0,13$ mg/100g vzorku) a genisteinu ($6,16 \pm 0,08$ mg/100g vzorku) bylo poměrně nízké.

Pro srovnání byly uvedeny i výsledky dosažené extrakcí s využitím homogenizátoru a třecí misky. V případě homogenizátoru byla dosažena nejvyšší výtěžnost daidzinu ($141,46$ mg/100g vzorku), následoval genistin ($87,45 \pm 2,80$ mg/100g vzorku), glycitin ($55,65 \pm 1,94$ mg/100g vzorku), genistein ($8,68 \pm 0,20$ mg/100g vzorku), daidzein ($8,52 \pm 0,28$ mg/100g vzorku) a nejméně zastoupen byl glycitein ($6,66 \pm 0,19$ mg/100g vzorku).

Co se týče třecí misky, tak nejvyšší obsah byl daidzinu ($17,23 \pm 1,12$ mg/100g vzorku), glycitinu ($13,34 \pm 0,49$ mg/100g vzorku), následnoval genistin ($11,44$ mg/100g vzorku). Méně bylo zastoupen daidzein ($5,42$ mg/100g vzorku) a genistein ($4,27 \pm 0,29$ mg/100g vzorku). Nejmenší výtěžnosti dosahoval glycitein ($0,90 \pm 0,05$ mg/100g vzorku).



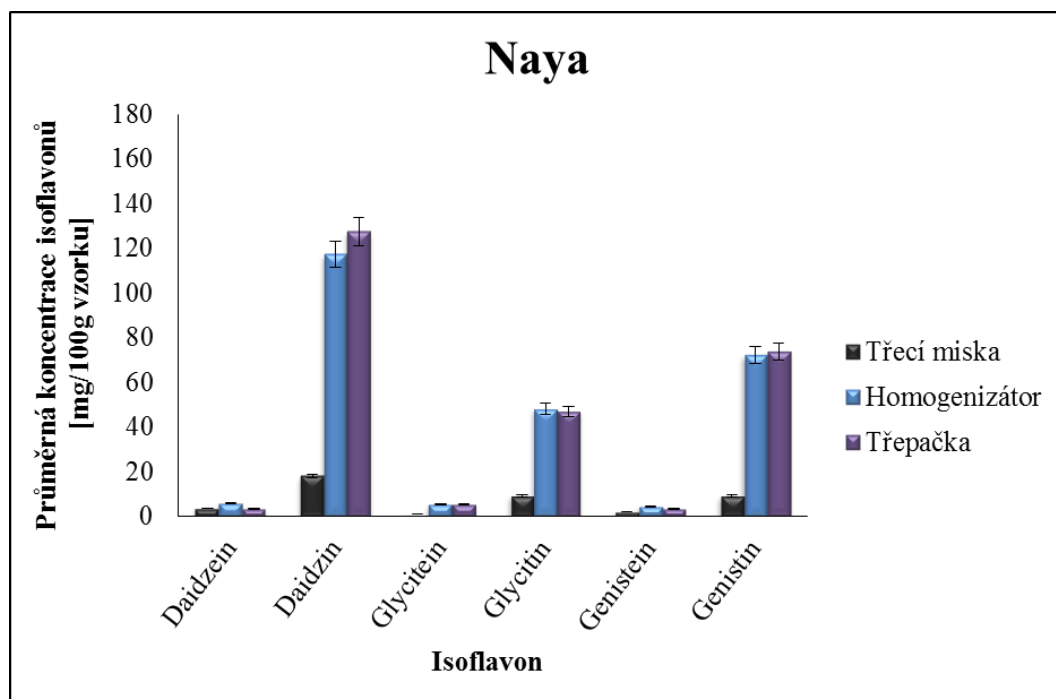
Obrázek 12: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Bohemias.

Naya

Odrůda Naya (obrázek 13) obsahovala nejvíce zastoupen daidzin, u kterého byla dosažena nejvyšší koncentrace $156,14 \pm 3,58$ mg/100g vzorku, při použití extrakce pomocí třepačky. Následoval genistin ($92,98 \pm 2,12$ mg/100g vzorku), glycitin ($58,46 \pm 1,13$ mg/100g vzorku) rovněž za použití extrakce pomocí třepačky. Množství glyciteinu ($7,22 \pm 0,21$ mg/100g vzorku), daidzeinu ($6,88 \pm 0,13$ mg/100g vzorku) a genisteinu ($6,16 \pm 0,08$ mg/100g vzorku) bylo poměrně nízké.

Pro srovnání byly uvedeny i výsledky dosažené extrakcí s využitím homogenizátoru a třecí misky. V případě homogenizátoru byla dosažena nejvyšší výtěžnost daidzinu ($117,57 \pm 2,56$ mg/100g vzorku), následoval genistin ($72,45 \pm 2,10$ mg/100g vzorku), glycitin ($48,37 \pm 1,79$ mg/100g vzorku), daidzein ($6,17 \pm 0,13$ mg/100g vzorku), genistein ($4,38 \pm 0,13$ mg/100g vzorku) a nejméně zastoupen byl glycitein ($5,41 \pm 0,21$ mg/100g vzorku).

Co se týče třecí misky, tak nejvyšší obsah byl daidzinu ($18,11 \pm 1,01$ mg/100g vzorku), glycitinu ($9,32 \pm 0,45$ mg/100g vzorku), následnoval genistin ($9,14 \pm 0,55$ mg/100g vzorku). Méně bylo daidzeinu ($3,74 \pm 0,21$ mg/100g vzorku) a genisteinu ($2,20 \pm 0,10$ mg/100g vzorku). Nejmenšího výtěžku bylo dosaženo u glyciteinu ($1,06 \pm 0,05$ mg/100g vzorku).



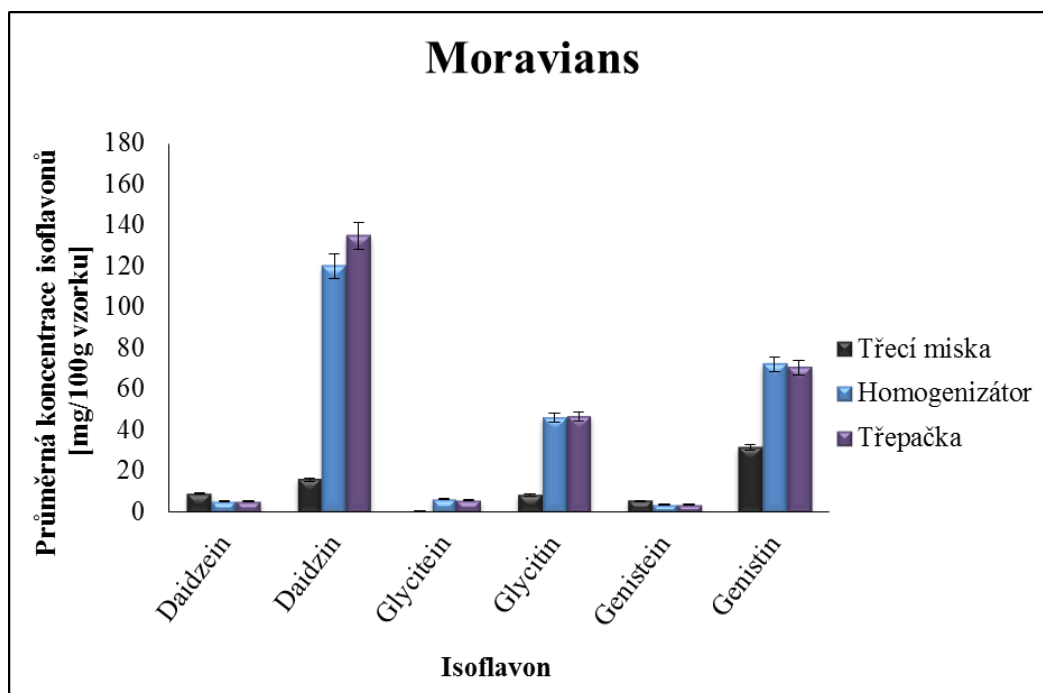
Obrázek 13: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Naya.

Moravians

Odrůda Moravians (obrázek 14) obsahovala nejvíce daidzinu, u kterého byla dosažena nejvyšší koncentrace $135,06 \pm 4,59$ mg/100g vzorku, při použití extrakce pomocí třepačky. Následoval genistin ($70,74 \pm 0,97$ mg/100g vzorku), glycitin ($46,87 \pm 0,96$ mg/100g vzorku) rovněž za použití extrakce pomocí třepačky. Množství glyciteinu ($5,52 \pm 0,06$ mg/100g vzorku), daidzeinu ($3,58 \pm 0,12$ mg/100g vzorku) a genisteinu ($3,36 \pm 0,08$ mg/100g vzorku) bylo poměrně nízké.

Pro srovnání byly uvedeny i výsledky dosažené extrakcí s využitím homogenizátoru a třecí misky. V případě homogenizátoru byla dosažena nejvyšší výtěžnost daidzinu ($120,42 \pm 2,41$ mg/100g vzorku), následoval genistin ($72,36 \pm 2,03$ mg/100g vzorku), glycitin ($46,17 \pm 1,13$ mg/100g vzorku), glycitein ($6,35 \pm 0,24$ mg/100g vzorku), daidzein ($5,31 \pm 0,21$ mg/100g vzorku) a nejméně zastoupen byl genistein ($3,63 \pm 0,08$ mg/100g vzorku).

Co se týče třecí misky, tak nejvyšší byl obsah genistinu ($31,68 \pm 1,57$ mg/100g vzorku), následoval daidzin ($15,99 \pm 1,01$ mg/100g vzorku), daidzein s obsahem $9,15 \pm 0,56$ mg/100g vzorku a glycitin ($8,35 \pm 0,40$ mg/100g vzorku). Méně byl zastoupen genistein ($5,47 \pm 0,28$ mg/100g vzorku) a nejmenšího výtěžku dosáhl glycitein ($0,88 \pm 0,04$ mg/100g vzorku).



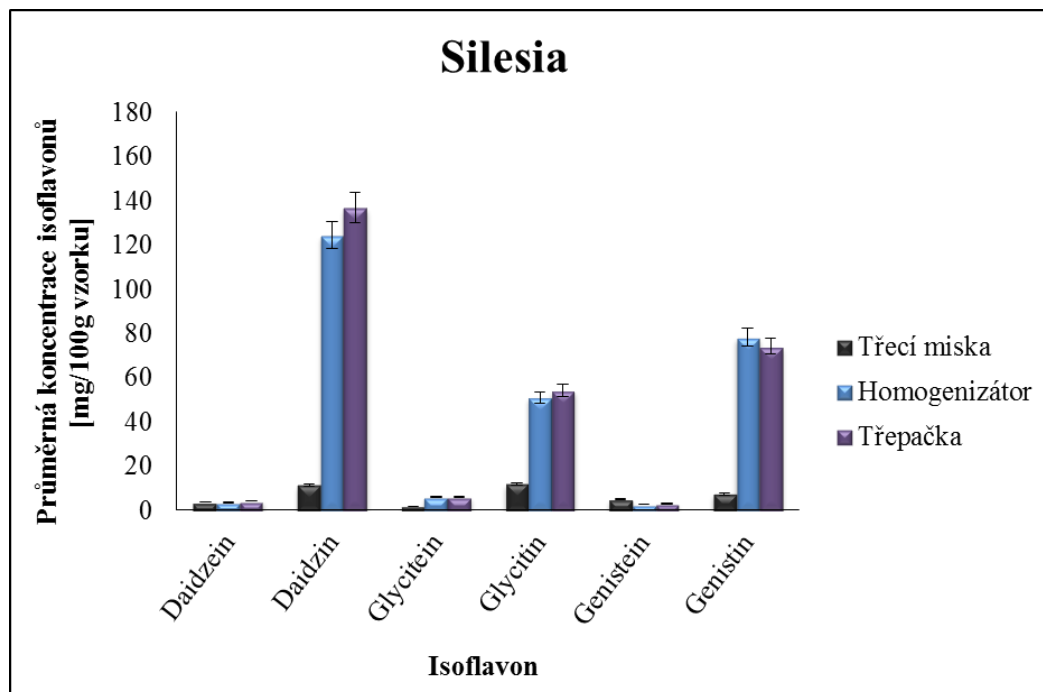
Obrázek 14: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Moravians.

Silesia

Odrůda Silesia (obrázek) obsahovala nejvíce daidzinu, u kterého byla dosažena nejvyšší koncentrace $136,71 \pm 3,57$ mg/100g vzorku, při použití extrakce pomocí třepačky. Následoval genistin ($74,12 \pm 1,50$ mg/100g vzorku), glycitin ($54,05 \pm 1,56$ mg/100g vzorku) rovněž za použití extrakce pomocí třepačky. Množství glyciteinu ($6,14 \pm 0,16$ mg/100g vzorku), daidzeinu ($4,23 \pm 0,11$ mg/100g vzorku) a genisteinu ($3,04 \pm 0,06$ mg/100g vzorku) bylo poměrně nízké.

Pro srovnání byly uvedeny i výsledky dosažené extrakcí s využitím homogenizátoru a třecí misky. V případě homogenizátoru bylo nejvyššího výtěžku u daidzinu ($124,46 \pm 2,82$ mg/100g vzorku), následoval genistin ($78,18 \pm 1,55$ mg/100g vzorku), glycitin ($51,09 \pm 1,68$ mg/100g vzorku), glycitein ($5,86 \pm 0,13$ mg/100g vzorku), daidzein ($3,52 \pm 0,11$ mg/100g vzorku) a nejméně zastoupen byl genistein ($2,60 \pm 0,07$ mg/100g vzorku).

Co se týče třecí misky, tak nejvyšší byl obsah glycitinu ($11,88 \pm 0,57$ mg/100g vzorku), následoval daidzin ($11,41 \pm 0,64$ mg/100g vzorku), genistin s obsahem $7,35 \pm 0,46$ mg/100g vzorku) a genistein ($4,81 \pm 0,21$ mg/100g vzorku). Méně byl zastoupen daidzein ($3,64 \pm 0,22$ mg/100g vzorku) a u glycitein bylo dosaženo obsahu $1,82 \pm 0,10$ mg/100g vzorku.



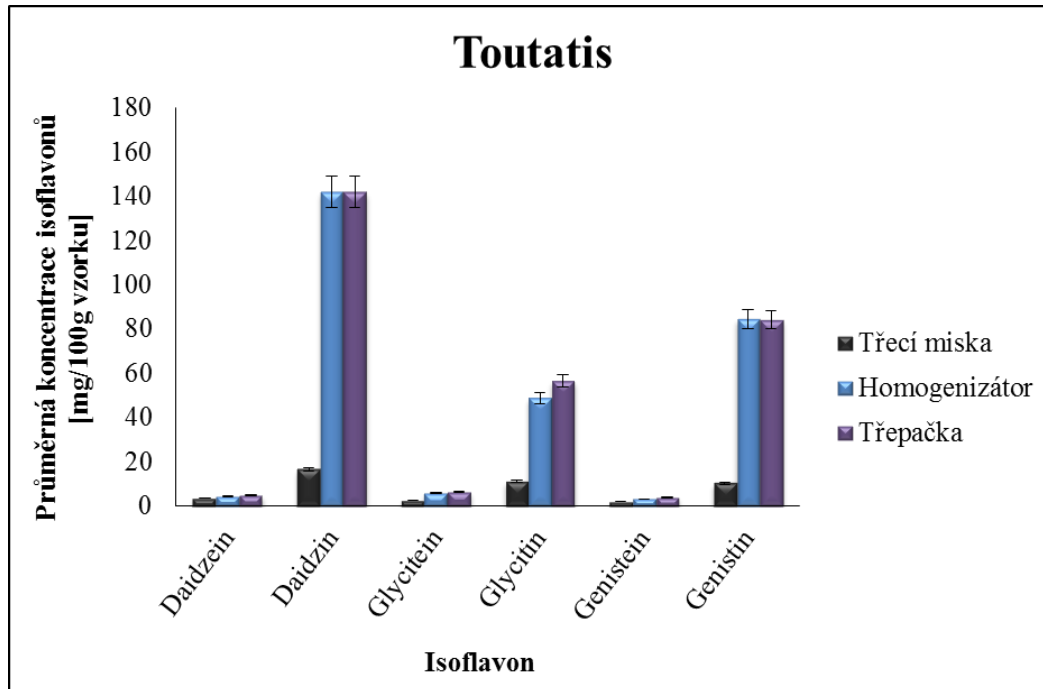
Obrázek 15: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Silesia.

Toutatis

Odrůda Toutatis (obrázek 16) obsahovala nejvíce daidzinu, u kterého byla dosažena nejvyšší koncentrace $142,05 \pm 3,21$ mg/100g vzorku, při použití extrakce pomocí třepačky. Následoval genistin ($84,34 \pm 1,85$ mg/100g vzorku), glycitin ($56,7 \pm 0,96$ mg/100g vzorku) rovněž za použití extrakce pomocí třepačky. Množství glyciteinu ($6,50 \pm 0,23$ mg/100g vzorku), daidzeinu ($4,80 \pm 0,12$ mg/100g vzorku) a genisteinu ($4,15 \pm 0,07$ mg/100g vzorku) bylo poměrně nízké.

Pro srovnání byly uvedeny i výsledky dosažené extrakcí s využitím homogenizátoru a třecí misky. V případě homogenizátoru byla dosažena nejvyšší výtěžnost daidzinu ($142,21 \pm 3,42$ mg/100g vzorku), následoval genistin ($48,96 \pm 1,82$ mg/100g vzorku), glycitin ($48,96$ mg/100g vzorku), glycitein ($6,09$ mg/100g vzorku), daidzein ($4,42 \pm 0,10$ mg/100g vzorku) a nejméně zastoupen byl genistein ($3,25 \pm 0,13$ mg/100g vzorku).

Co se týče třecí misky, tak nejvyšší byl obsah daidzinu ($16,67 \pm 1,09$ mg/100g vzorku), následoval glycitin ($11,23 \pm 0,61$ mg/100g vzorku), genistin s obsahem $10,46 \pm 0,42$ mg/100g vzorku a daidzein ($3,65$ mg/100g vzorku). Méně byl zastoupen glycitein ($2,63 \pm 0,13$ mg/100g vzorku) a genistein dosáhl výtěžku $2,16 \pm 0,13$ mg/100g vzorku.



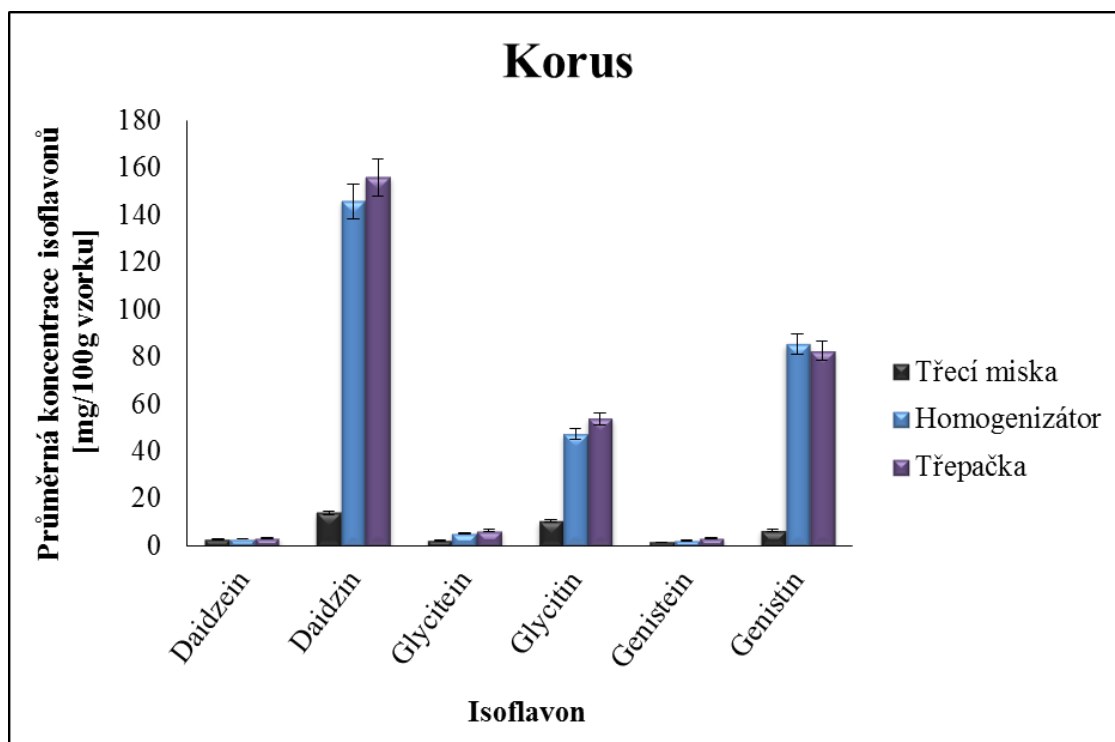
Obrázek 16: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Toutatis.

Korus

Odrůda Korus (obrázek 17) obsahovala nejvíce daidzinu, u kterého byla dosažena nejvyšší koncentrace $156,32 \pm 2,29$ mg/100g vzorku, při použití extrakce pomocí třepačky. Následoval genistin ($82,73 \pm 1,38$ mg/100g vzorku), glycitin ($53,99 \pm 0,93$ mg/100g vzorku) rovněž za použití extrakce pomocí třepačky. Množství glyciteinu ($6,76 \pm 0,17$ mg/100g vzorku), daidzeinu ($3,45 \pm 0,10$ mg/100g vzorku) a genisteinu ($3,31 \pm 0,07$ mg/100g vzorku) bylo poměrně nízké.

Pro srovnání byly uvedeny i výsledky dosažené extrakcí s využitím homogenizátoru a třecí misky. V případě homogenizátoru byla dosažena nejvyšší výtěžnost daidzinu ($146,09 \pm 4,35$ mg/100g vzorku), následoval genistin ($85,45 \pm 2,38$ mg/100g vzorku), glycitin ($47,55 \pm 1,73$ mg/100g vzorku), glycitein ($5,37 \pm 0,14$ mg/100g vzorku), daidzein ($3,13 \pm 0,14$ mg/100g vzorku) a nejméně zastoupen byl genistein ($2,54 \pm 0,07$ mg/100g vzorku).

Co se týče třecí misky, tak nejvyšší byl obsah daidzinu ($14,02 \pm 0,89$ mg/100g vzorku), následoval glycitin ($10,59 \pm 0,48$ mg/100g vzorku), genistin s obsahem $6,77 \pm 0,28$ mg/100g vzorku a daidzein ($2,84$ mg/100g vzorku). Méně byl zastoupen glycitein ($2,40 \pm 0,14$ mg/100g vzorku) a genistein dosáhl obsahu $1,74 \pm 0,11$ mg/100g vzorku.



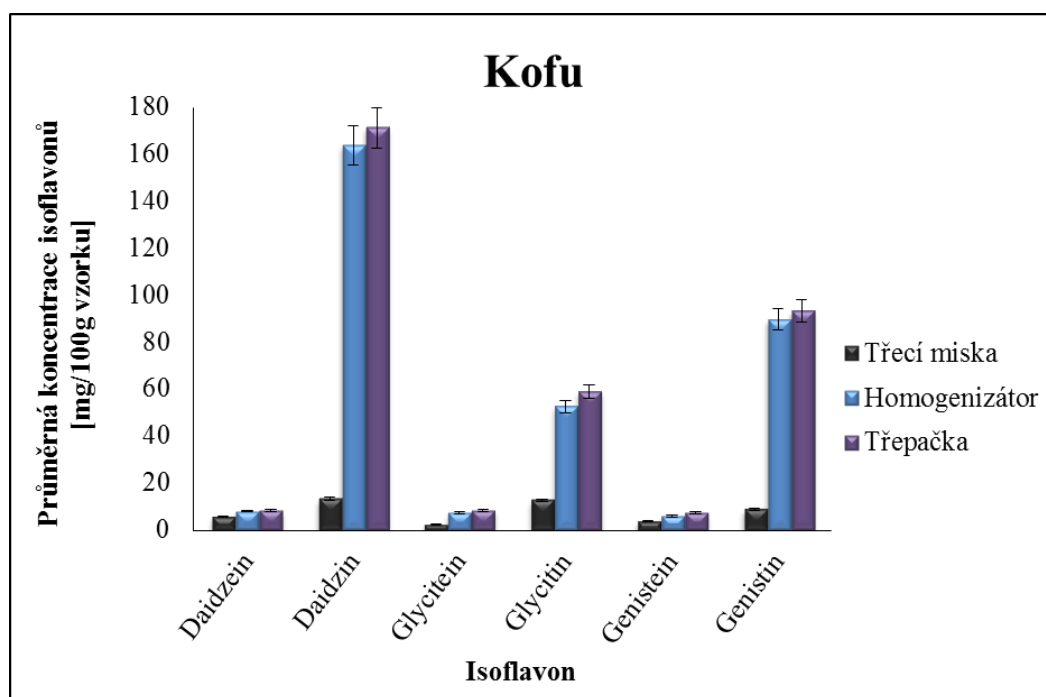
Obrázek 17: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Korus.

Kofu

Odrůda Kofu (obrázek 18) obsahovala nejvíce daidzinu, u kterého byla dosažena nejvyšší koncentrace $171,45 \pm 4,91$ mg/100g vzorku, při použití extrakce pomocí třepačky. Následoval genistin ($93,33 \pm 1,87$ mg/100g vzorku), glycitin ($58,99 \pm 0,95$ mg/100g vzorku) rovněž za použití extrakce pomocí třepačky. Množství glyciteinu ($8,39 \pm 0,26$ mg/100g vzorku), daidzeinu ($8,21 \pm 0,26$ mg/100g vzorku) a genisteinu ($7,41 \pm 0,11$ mg/100g vzorku) bylo poměrně nízké.

Pro srovnání byly uvedeny i výsledky dosažené extrakcí s využitím homogenizátoru a třecí misky. V případě homogenizátoru byla dosažena nejvyšší výtěžnost daidzinu ($163,99 \pm 7,74$ mg/100g vzorku), následoval genistin ($89,71 \pm 2,90$ mg/100g vzorku), glycitin ($52,79 \pm 1,89$ mg/100g vzorku), glycitein ($7,29 \pm 0,19$ mg/100g vzorku) a nejméně zastoupen byl genistein ($6,01 \pm 0,15$ mg/100g vzorku).

Co se týče třecí misky, tak nejvyšší byl obsah daidzinu ($13,22 \pm 0,99$ mg/100g vzorku), následoval glycitin ($12,59 \pm 0,65$ mg/100g vzorku), genistin s obsahem $8,94 \pm 0,45$ mg/100g vzorku a daidzein ($5,77$ mg/100g vzorku). Méně byl zastoupen genistein ($3,83 \pm 0,16$ mg/100g vzorku) a glycitein dosáhl obsahu $2,44 \pm 0,08$ mg/100g vzorku.



Obrázek 18: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Kofu.

5.4 Stanovení koncentrace volných isoflavonů

V současné době se vědci (Toscano and Russo 2016) zabývají potenciálními antioxidačními účinky volných isoflavonů (aglykonů). Jejich celkový obsah je však v sójových bobech poměrně nízký. Níže jsou uvedeny průměrné hodnoty volných isoflavonů získaných třemi metodami extrakce.

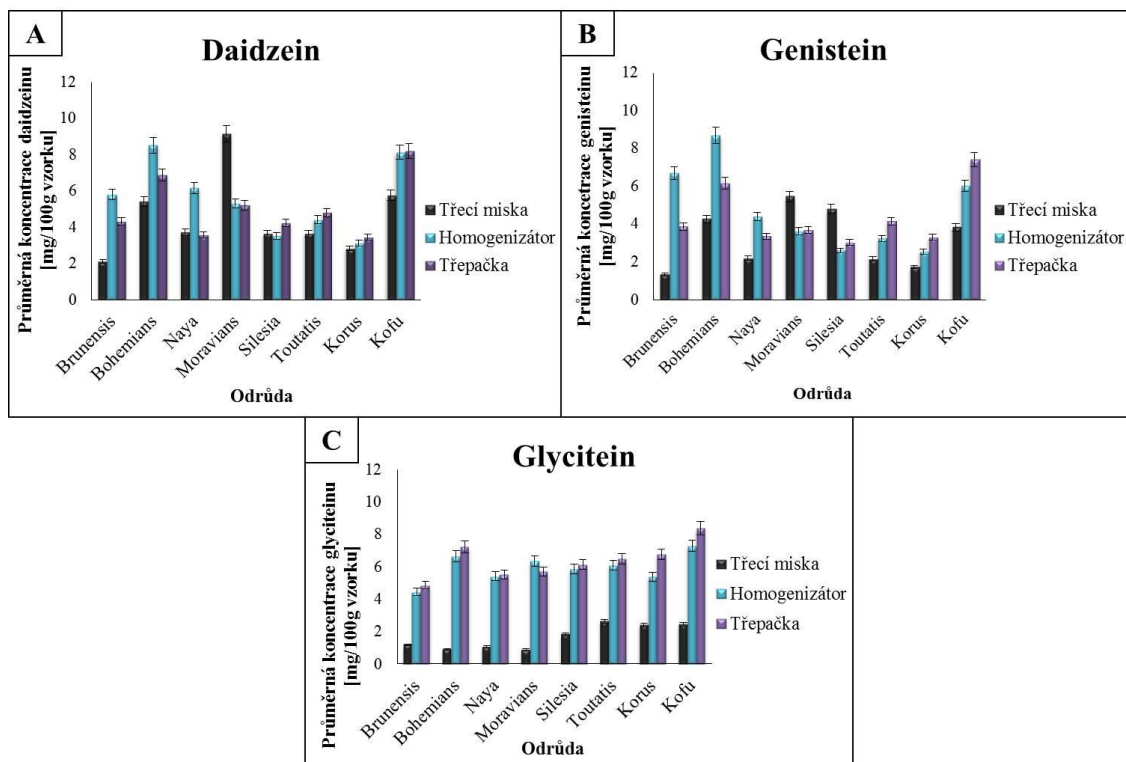
Na základě výsledků měření použitím metody extrakce třepačkou (obrázek 19) lze potvrdit obecně platný trend, že sójové boby obsahují více daidzeinu 6,39 mg/100g vzorku (A) a glyciteinu 5,09 mg/100g vzorku (C) a nižší obsah genisteinu 4,37 mg/100g vzorku (B).

Využitím metody extrakce pomocí homogenizátoru (obrázek 19) lze říci, že nejvyšší obsah byl obsah glyciteinu 5,93 mg/100g vzorku (C), nižší obsah daidzeinu 5,63 mg/100g vzorku (A) a genisteinu 4,73 mg/100g vzorku (B).

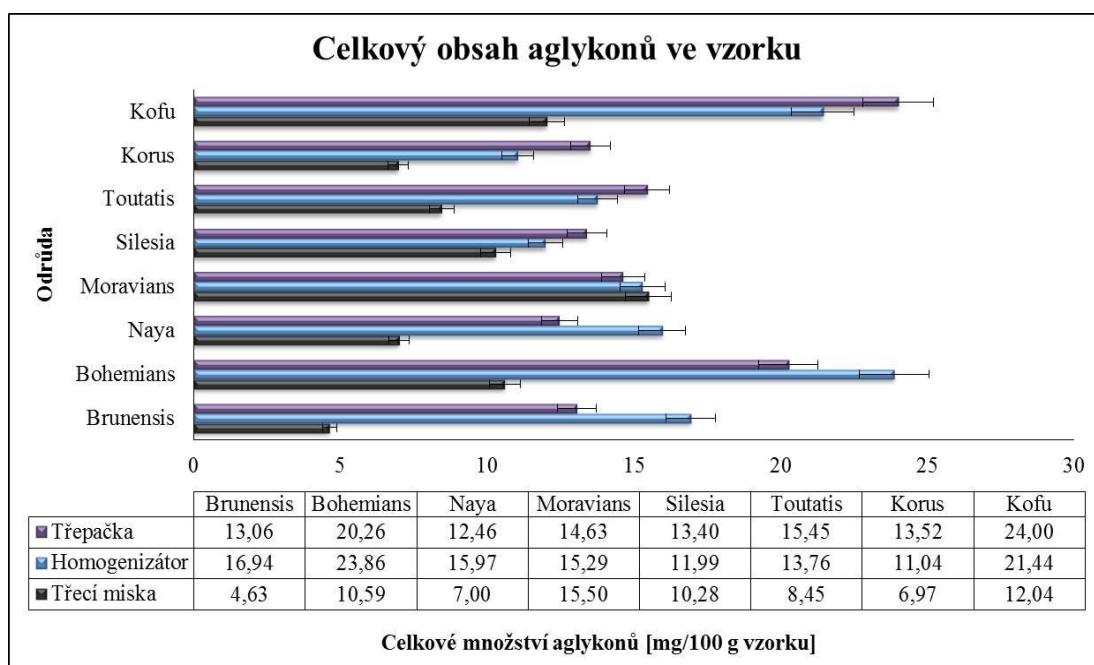
V případě metody extrakce s využitím třecí misky byl opět nejvyšší obsah daidzeinu 4,54 mg/100g vzorku (A), následoval obsah glyciteinu 3,23 mg/100g vzorku (C) a nejméně bylo obsahu genistinu 1,66 mg/100g vzorku (B).

Opět bylo potvrzeno, že metoda extrakce třepačkou byla v případě izolace aglykonů neúčinnější. Z obrázku 19 je však patrné, že v případě odrůdy Moravians byla účinnější extrakce za využití třecí misky, co se týče výtěžnosti daidzeinu a genisteinu.

Nejvyšší obsah aglykonů extrakční technikou s využitím třepačky byl v odrůdě Kofu (24,00 mg/100g vzorku) a nejméně aglykonů obsahovala odrůda Naya (12,46 mg/100g). Nejvyšší obsah aglykonů extrakcí pomocí homogenizátoru obsahovala odrůda Bohemians (23,86 mg/100g vzorku), nejméně obsahovala odrůda Korus (11,04 mg/100g vzorku). Extrakcí s využitím třecí misky bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti celkových aglykonů u odrůdy Kofu (12,04 mg/100g vzorků), nejméně odrůda Brunensis (4,63 mg/100g vzorku). Obecně je v analyzovaných sójových bobech vysoký obsah daidzinu a genistinu, například ve srovnání se studií (Lee et al. 2005), kde vědci uvádí, že obsah daidzinu byl 25 mg/100g vzorku a obsah genisteinu odpovídal 32 mg/100g vzorku. Glycitein byl detekován ve velmi nízké koncentraci, proto jeho obsah není ve studii uveden. Ve studii (Devi, Gondi, Sakthivelu, Giridhar, Rajasekaran and Ravishankar 2009) bylo zjištěno, že se průměrný obsah genisteinu pohyboval okolo 47,9 mg/100g vzorku a obsah daidzeinu byl 26,2 mg/100g vzorku. V této studii byly požitý 4 druhy speciálně vyšlechtěných odrůd. Celkový obsah aglykonů ve vzorku je znázorněn na obrázku 20.



Obrázek 19: Stanovení průměrné koncentrace daidzeinu (A), genisteinu (B) a glyciteinu (C) v mg/ 100g vzorku. V obrázku je zohledněna metoda extrakce SLE s využitím třecí misky, homogenizátoru a třepačky.



Obrázek 20: Stanovení celkového obsahu aglykonů v jednotlivých odrůdách sójových bobů. V obrázku jsou rovněž zohledněny všechny tři extrakční techniky.

5.5 Stanovení koncentrace konjugovaných isoflavonů

Z výsledků (obrázek 21) vyplývá, že v případě metody extrakce s využitím třepačky obsahovaly sójové boby nejvíce daidzinu (A), jehož průměrná hodnota se pohybovala kolem 138,89 mg/100g vzorku. Poté následoval genistin (B) s průměrnou hodnotou 81,87 mg/100g vzorku a nejméně byl ze tří β -glukosidů zastoupen glycitin (C), jehož obsah činil 52,94 mg/100g vzorku. Tyto výsledky byly získány průměrem naměřených hodnot u jednotlivých odrůd sójových bobů.

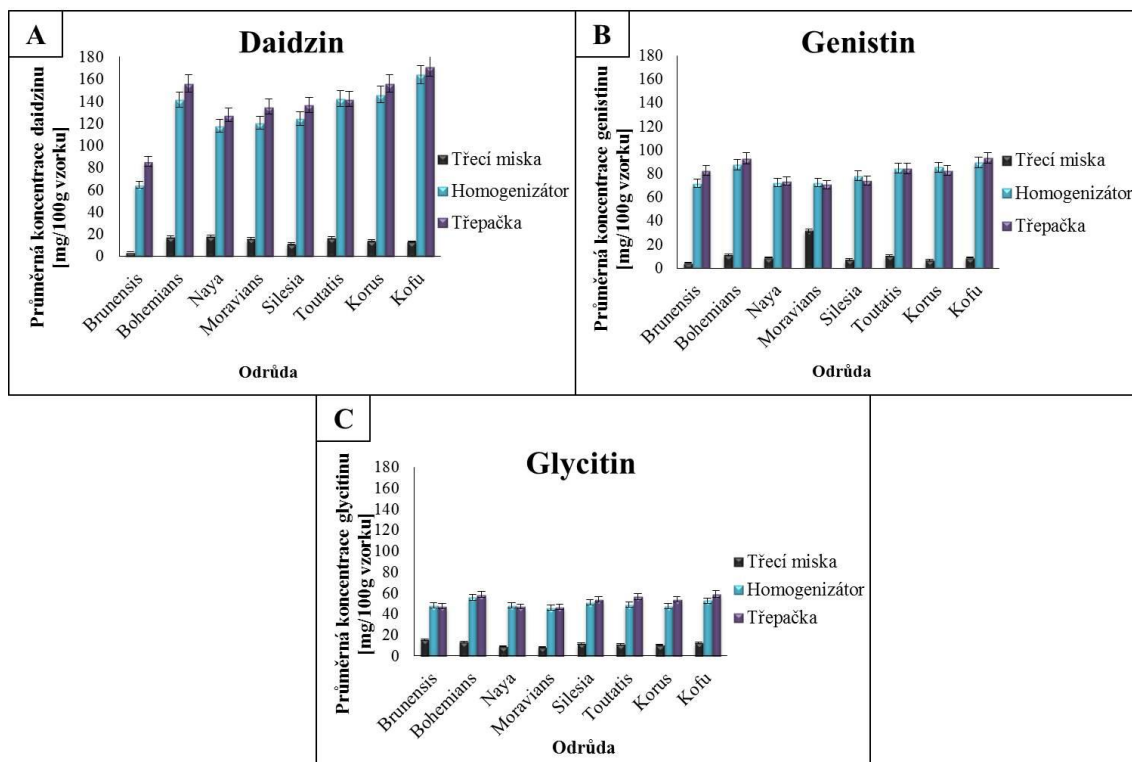
Využitím metody extrakce pomocí homogenizátoru (obrázek 21) lze říci, že nejvyšší obsah byl obsah daidzin 127,57 mg/100g vzorku (A), nižší obsah genistinu 80,25 mg/100g vzorku (B) a glycitinu 49,87mg/100g vzorku (C).

V případě metody extrakce s využitím třecí misky byl opět nejvyšší obsah daidzinu 13,83 mg/100g vzorku (A), následoval obsah glycitinu 11,82 mg/100g vzorku (C) a jen o několik málo desetin méně bylo obsahu genistinu 11,28 mg/100g vzorku (B).

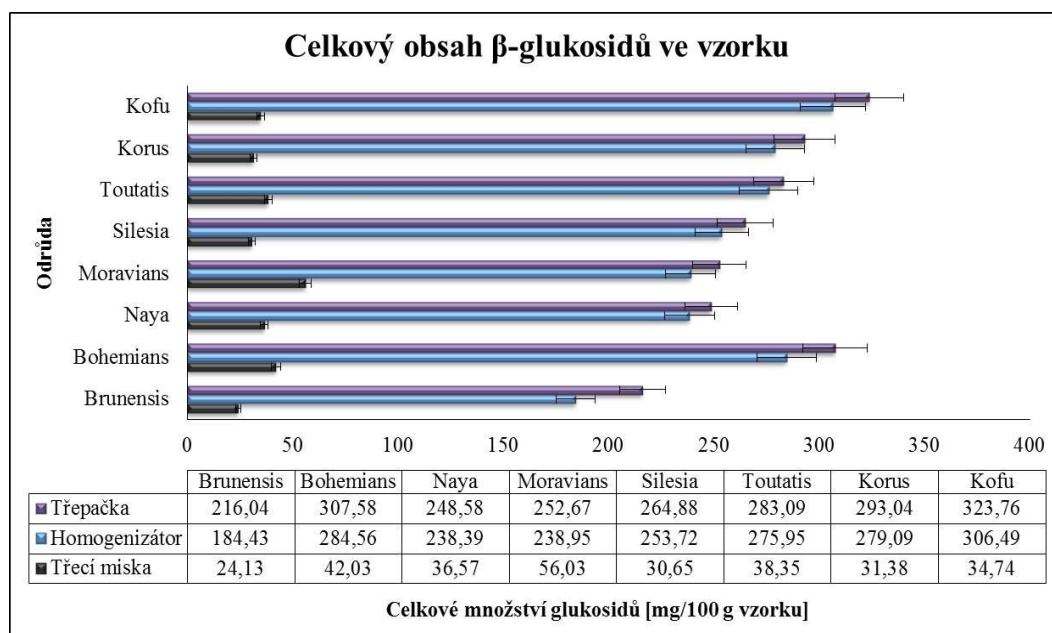
Obecně se opět potvrdilo, že metoda extrakce třepačkou byla v případě izolace konjugovaných forem isoflavonů neúčinnější.

Nejvyšší obsah β -glukosidů extrakční technikou s využitím třepačky byl v odrůdě Kofu (323,76 mg/100g vzorku) a nejméně aglykonů obsahovala odrůda Brunensis (216,04 mg/100g). Nejvyšší obsah β -glukosidů extrakcí pomocí homogenizátoru obsahovala odrůda Kofu (306,49 mg/100g vzorku), nejméně obsahovala odrůda Brunensis (184,43 mg/100g vzorku). Extrakcí s využitím třecí misky bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti celkových β -glukosidů u odrůdy Moravians (56,03 mg/100g vzorků), nejméně odrůda Brunensis (24,13 mg/100g vzorku).

Obrázek 22 shrnuje pro komplexní představu celkové množství konjugovaných isoflavonů v jednotlivých odrůdách sójových bobů.



Obrázek 21: Stanovení průměrné koncentrace daidzinu (A), genistinu (B) a glycitinu (C) v mg/ 100g vzorku. V obrázku je zohledněna metoda extrakce SLE s využitím třecí misky, homogenizátoru a třepačky.



Obrázek 22: Stanovení celkového obsahu β -glukosidů v jednotlivých odrůdách sójových bobů. V obrázku jsou rovněž zohledněny všechny tři extrakční techniky.

6 ZÁVĚR

Ze získaných výsledků měření vyplývá, že obsah isoflavonů v sójových bobech závisí nejen na pěstitelských podmínkách, lokalitě, genotypu, ale také na odrůdě. Obecně lze říci, že nejvyšší obsah isoflavonů je zastoupen v sójových bobech ve srovnání se zastoupením isoflavonů v celé rostlině (Lee et al. 2003).

Isoflavony jsou tepelně poměrně tepelně stabilní a tepelná úprava (vaření, pečení, smažení) má na jejich obsah pouze minimální vliv. Degradace isoflavonů nastává až při teplotě kolem 200 – 260 °C. Naopak jsme v experimentální části došli k závěru, že zvýšená teplota při extrakci může mít také pozitivní vliv na jejich uvolňování.

V diplomové práci byla optimalizována metoda extrakce isoflavonů ze sójových bobů extrakcí v systému pevná fáze-kapalina (SLE) s využitím třepačky a následné centrifugace. Tato metoda byla vyhodnocena jako nejúčinnější ve všech případech izolace isoflavonů. K ověření získaných výsledků bylo využito statistické analýzy, která potvrdila, že mezi metodami extrakce existuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 95%. Výsledky získané analýzou vzorků byly vyhodnoceny a porovnány s výsledky několika studií.

Z naměřených výsledků je patrné, že nejvyššího obsahu celkových isoflavonů bylo dosaženo v odrůdách Kofu ($347,76 \pm 1,75$ mg/100g vzorku) a Bohemians ($328,24 \pm 1,21$ mg/100g vzorku). Bohemians, Kofu a Moravians ($267,29 \pm 1,12$ mg/100g vzorku) patří mezi nejvíce pěstované odrůdy sóji luštinaté na území České Republiky. Sójové boby a sójové potraviny obecně mají výrazný obsah aglykonů daidzeinu a genisteinu, zejména jejich β -glukosidů daidzinu a genistinu, a nízký obsah glyciteinu a glycitinu.

Vzhledem k pozitivním fyziologickým účinkům isoflavonů je doporučeno sóju a sójové výrobky konzumovat jako prevenci proti zvýšenému cholesterolu, onemocnění kardiovaskulárního systému, symptomům menopauzy a rakovině. Samozřejmě v souladu s doporučenou denní dávkou, jež odpovídá množství 2 mg/ tělesné hmotnosti člověka (Slíva et. al 2009).

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

AKULA, R. AND G. A. RAVISHANKAR Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 2011, 6(11), 1720-1731.

ANDRADE, J. C., J. M. MANDARINO, L. E. KUROZAWA AND E. I. IDA The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors. *Food Chem*, Mar 01 2016, 194, 1095-1101.

AWAD, A. B., R. ROY AND C. S. FINK Beta-sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Oncol Rep*, Mar-Apr 2003, 10(2), 497-500.

AZMIR, J., I. ZAIDUL, M. RAHMAN, K. SHARIF, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 2013, 117(4), 426-436.

BAJKACZ, S. AND J. ADAMEK Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta*, 2017.

BARNES, S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic research and biology*, 2010, 8(1), 89-98.

BARNES, S., L. COWARD, M. KIRK AND J. SFAKIANOS HPLC-mass spectrometry analysis of isoflavones. *Experimental Biology and Medicine*, 1998, 217(3), 254-262.

BARNES, S., M. KIRK AND L. COWARD Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1994, 42(11), 2466-2474.

BEILINSON, V., O. V. MOSKALENKO, D. S. LIVINGSTONE, S. V. REVERDATTO, et al. Two subtilisin-like proteases from soybean. *Physiologia Plantarum*, 2002, 115(4), 585-597.

BHAGWAT, S., D. B. HAYTOWITZ AND J. M. HOLDEN USDA database for the isoflavone content of selected foods release 2.0. Maryland: US Department of Agriculture, 2008, 15.

BOYDAK, E., M. ALPASLAN, M. HAYTA, S. GERÇEK, et al. Seed composition of soybeans grown in the Harran region of Turkey as affected by row spacing and irrigation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002, 50(16), 4718-4720.

BUCIĆ-KOJIĆ, A., M. PLANINIĆ, S. TOMAS, M. BILIĆ, et al. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 2007, 81(1), 236-242.

BUSTAMANTE-RANGEL, M., M. M. DELGADO-ZAMARRENO, R. CARABIAS-MARTINEZ AND J. DOMINGUEZ-ALVAREZ Analysis of isoflavones in soy drink by capillary zone electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, Jan 04 2012, 709, 113-119.

CORDISCO, E., C. N. HAIDAR, E. R. COSCUETA, B. B. NERLI, et al. Integrated extraction and purification of soy isoflavones by using aqueous micellar systems. *Food Chem*, 2016, 213, 514-520.

CORNWELL, T., W. COHICK AND I. RASKIN Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, Apr 2004, 65(8), 995-1016.

CUYCKENS, F. AND M. CLAEYS Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass spectrometry*, 2004, 39(1), 1-15.

DE RIJKE, E., P. OUT, W. M. NIESSEN, F. ARIESE, et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A*, Apr 21 2006, 1112(1-2), 31-63.

DEVI, M. A., M. GONDI, G. SAKTHIVELU, P. GIRIDHAR, et al. Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chem*, 2009, 114(3), 771-776.

DIXON, R. A. Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55, 225-261.

DIXON, R. A. AND C. L. STEELE Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci*, Oct 1999, 4(10), 394-400.

DONG, X., W. XU, R. A. SIKES AND C. WU Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. *Food Chem*, 2013, 141(3), 1923-1933.

EL-SHEMY, H. A. *Soybean and health*. Edition ed.: InTech, 2011. ISBN 953307535X.

FERRY, S., M. MATSUDA, H. YOSHIDA AND M. HIRATA Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NFκB-mediated cell survival pathway. *Carcinogenesis*, 2002, 23(12), 2031-2041.

FILIBERTO, A. C., S. L. MUMFORD, A. Z. POLLACK, C. ZHANG, et al. Habitual dietary isoflavone intake is associated with decreased C-reactive protein concentrations among healthy premenopausal women. *J Nutr*, 2013, 143(6), 900-906.

FRANKE, A. A. AND L. J. CUSTER High-performance liquid chromatographic assay of isoflavonoids and coumestrol from human urine. *J Chromatogr B Biomed Appl*, Dec 02 1994, 662(1), 47-60.

GANZERA, M. Supercritical fluid chromatography for the separation of isoflavones. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2015, 107, 364-369.

GRACE, P. B., J. I. TAYLOR, N. P. BOTTING, T. FRYATT, et al. Quantification of isoflavones and lignans in urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 2003, 315(1), 114-121.

GRIFFITH, A. P. AND M. W. COLLISON Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2001, 913(1), 397-413.

HALLING, K. K. AND J. P. SLOTTE Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization. *Biochim Biophys Acta*, Aug 30 2004, 1664(2), 161-171.

HARALAMPIDIS, K., M. TROJANOWSKA AND A. E. OSBOURN Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 75, 31-49.

HERMAN, E. M., R. M. HELM, R. JUNG AND A. J. KINNEY Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiology*, 2003, 132(1), 36-43.

HITZ, W. D., T. J. CARLSON, P. S. KERR AND S. A. SEBASTIAN Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiol*, Feb 2002, 128(2), 650-660.

CHANG, S.-Y. AND S. HAN Changes of Soyasaponin Contents in Soybean Sprouts. *Korean Journal of Crop Science*, 2016, 61(1), 57-63.

CHEN, J. R., S. C. YANG, K. SUETSUNA AND J. C. J. CHAO SOYBEAN PROTEIN-DERIVED HYDROLYSATE AFFECTS BLOOD PRESSURE IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS. *Journal of food biochemistry*, 2004, 28(1), 61-73.

CHO, S. Y., Y. N. LEE AND H. J. PARK Optimization of ethanol extraction and further purification of isoflavones from soybean sprout cotyledon. *Food Chem*, 2009, 117(2), 312-317.

ISANGA, J. AND G.-N. ZHANG Soybean bioactive components and their implications to health—a review. *Food reviews international*, 2008, 24(2), 252-276.

KETHA, H., A. GIRTMAN AND R. J. SINGH Estradiol assays – The path ahead. *Steroids*, 7// 2015, 99, Part A, 39-44.

KLEJDUS, B., R. MIKELOVÁ, V. ADAM, J. ZEHNÁLEK, et al. Liquid chromatographic–mass spectrometric determination of genistin and daidzin in soybean food samples after accelerated solvent extraction with modified content of extraction cell. *Analytica Chimica Acta*, 7/26/ 2004a, 517(1–2), 1-11.

KLEJDUS, B., R. MIKELOVÁ, J. PETRLOVÁ, D. POTĚŠIL, et al. Determination of isoflavones in soy bits by fast column high-performance liquid chromatography coupled with UV–visible diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1084(1), 71-79.

KLEJDUS, B., J. VACEK, V. ADAM, J. ZEHNÁLEK, et al. Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 7/5/ 2004b, 806(2), 101-111.

KONAR, N., E. S. POYRAZOĞLU, K. DEMIR AND N. ARTIK Effect of different sample preparation methods on isoflavone, lignan, coumestan and flavonoid contents of various vegetables determined by triple quadrupole LC–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, 26(1), 26-35.

KRISHNAN, H. B., W.-S. KIM, S. JANG AND M. S. KERLEY All three subunits of soybean β -conglycinin are potential food allergens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009, 57(3), 938-943.

LEE, C. H., L. YANG, J. Z. XU, S. Y. V. YEUNG, et al. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. *Food Chem*, 5// 2005, 90(4), 735-741.

LEE, M. J., I.-M. CHUNG, H. KIM AND M. Y. JUNG High resolution LC–ESI-TOF-mass spectrometry method for fast separation, identification, and quantification of 12 isoflavones in soybeans and soybean products. *Food Chem*, 6/1/ 2015, 176, 254-262.

LEE, S. J., J. K. AHN, S. H. KIM, J. T. KIM, et al. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, 51(11), 3382-3389.

MAESTRI, D. M., D. O. LABUCKAS, J. M. MERILES, A. L. LAMARQUE, et al. Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 77(4), 494-498.

MAGIERA, S. AND A. SOBIK Ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction coupled with liquid chromatography to determine isoflavones in soy foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 4// 2017, 57, 94-101.

MALLIKARJUN GOUDA, K., L. R. GOWDA, A. A. RAO AND V. PRAKASH Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine max*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, 54(13), 4568-4573.

MANACH, C., A. SCALBERT, C. MORAND, C. REMESY, et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, May 2004, 79(5), 727-747.

MEDIC, J., C. ATKINSON AND C. R. HURBURGH JR Current knowledge in soybean composition. *Journal of the American oil chemists' society*, 2014, 91(3), 363-384.

MESSINA, M. AND V. MESSINA Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health: a brief overview. *J Ren Nutr*, Apr 2000, 10(2), 63-68.

MIKELOVÁ, R., B. KLEJDUS, J. ZEHNÁLEK, J. VACEK, et al. Chromatografické stanovení isoflavonů ve vegetativních a generativních částech rostlin sóje (*glycine max*). In.: Biochemie, 2004.

MORAS, B., S. REY, G. VILAREM AND P. Y. PONTALIER Pressurized water extraction of isoflavones by experimental design from soybean flour and Soybean Protein Isolate. Food Chem, Jan 01 2017, 214, 9-15.

MUKERJEA, R., D. KIM AND J. F. ROBYT Simplified and improved methylation analysis of saccharides, using a modified procedure and thin-layer chromatography. Carbohydrate research, 1996, 292, 11-20.

MURPHY, P. A., K. BARUA AND C. C. HAUCK Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. Journal of Chromatography B, 2002, 777(1), 129-138.

NGUYEN, T. D., M. H. LEE AND G. H. LEE Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid–liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. Microchemical Journal, 2010, 95(1), 113-119.

OSHIMA, A., W. MINE, M. NAKADA AND E. YANASE Analysis of isoflavones and coumestrol in soybean sprouts. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2016, 80(11), 2077-2079.

PIMENTEL, I. C., C. GLIENKE-BLANCO, J. GABARDO, R. M. STUART, et al. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2006, 49, 705-711.

PROKUDINA, E. A., L. HAVLÍČEK, N. AL-MAHARIK, O. LAPČÍK, et al. Rapid UPLC–ESI–MS/MS method for the analysis of isoflavonoids and other phenylpropanoids. Journal of Food Composition and Analysis, 5// 2012, 26(1–2), 36-42.

REDONDO-CUENCA, A., M. J. VILLANUEVA-SUÁREZ AND I. MATEOS-APARICIO Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chem*, 2008, 108(3), 1099-1105.

RICKARD, S. E. AND L. U. THOMPSON. Interactions and biological effects of phytic acid. In.: ACS Publications, 1997.

ROSTAGNO, M., M. PALMA AND C. BARROSO Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 522(2), 169-177.

ROSTAGNO, M. A., M. PALMA AND C. G. BARROSO Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1012(2), 119-128.

ROSTAGNO, M. A., M. PALMA AND C. G. BARROSO Solid-phase extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1076(1), 110-117.

ROSTAGNO, M. A., M. PALMA AND C. G. BARROSO Microwave assisted extraction of soy isoflavones. *Anal Chim Acta*, Apr 11 2007, 588(2), 274-282.

ROSTAGNO, M. A., A. VILLARES, E. GUILLAMON, A. GARCIA-LAFUENTE, et al. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J Chromatogr A*, Jan 02 2009, 1216(1), 2-29.

RUSSELL, A. L., J. M. GRIMES, D. O. LARCO, D. F. CRUTHIRDS, et al. The interaction of dietary isoflavones and estradiol replacement on behavior and brain-derived neurotrophic factor in the ovariectomized rat. *Neurosci Lett*, Feb 15 2017, 640, 53-59.

SANTOS, Ê. R. M., H. N. M. OLIVEIRA, E. J. OLIVEIRA, S. H. G. AZEVEDO, et al. Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. *The Journal of Supercritical Fluids*, 4// 2017, 122, 1-9.

SETCHELL, K., M. B. WELSH AND C. LIM High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1987, 386, 315-323.

SETCHELL, K. D., N. M. BROWN, L. ZIMMER-NECHEMIAS, W. T. BRASHEAR, et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 2002, 76(2), 447-453.

SHERMA, J. Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A*, 2000, 880(1), 129-147.

SHIMONI, E. Stability and shelf life of bioactive compounds during food processing and storage: soy isoflavones. *Journal of food science*, 2004, 69(6), R160-R166.

TAVAKOLAN, M., N. W. ALKHAROUF, F. H. KHAN AND S. NATARAJAN SoyProDB: A database for the identification of soybean seed proteins. *Bioinformatics*, 2013, 9(3), 165-167.

THOMPSON, L. U. AND L. ZHANG Phytic acid and minerals: effect on early markers of risk for mammary and colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, Nov 1991, 12(11), 2041-2045.

TOSCANO, M. AND N. RUSSO Soybean aglycones antioxidant activity. A theoretical investigation. *Computational and Theoretical Chemistry*, 2/1/ 2016, 1077, 119-124.

URBÁNEK, M., L. BLECHTOVÁ, M. POSPÍŠILOVÁ AND M. POLÁŠEK On-line coupling of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis for the determination of flavonoids in methanolic extracts of *Hypericum perforatum* leaves or flowers. *Journal of Chromatography A*, 2002, 958(1), 261-271.

VACEK, J., B. KLEJDUS, L. LOJKOVA AND V. KUBÁN Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: a review. *Journal of separation science*, 2008, 31(11), 2054-2067.

VAN BAAR, B. L. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol Rev*, Apr 2000, 24(2), 193-219.

VAS, G. AND K. VEKEY Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of mass spectrometry*, 2004, 39(3), 233-254.

VILKHU, K., R. MAWSON, L. SIMONS AND D. BATES Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, 9(2), 161-169.

VILLARES, A., M. A. ROSTAGNO, A. GARCÍA-LAFUENTE, E. GUILLAMÓN, et al. Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 4(1), 27-38.

VUCENIK, I. AND A. M. SHAMSUDDIN Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. *J Nutr*, 2003, 133(11), 3778S-3784S.

WESTON, A. AND P. R. BROWN *High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis: Principles and Practices*. Edition ed.: Academic press, 1997. ISBN 0080534163.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 2001, 126(2), 485-493.

WU, Q., M. WANG AND J. E. SIMON Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, Dec 05 2004, 812(1-2), 325-355.

XU, X., A. M. DUNCAN, B. E. MERZ AND M. S. KURZER Effects of soy isoflavones on estrogen and phytoestrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 1998, 7(12), 1101-1108.

YANG, H. J., D. Y. KWON, K. R. CHUNG, S. PARK, et al. *Fermented soybean products and their bioactive compounds*. Edition ed.: INTECH Open Access Publisher, 2011. ISBN 953307535X.

ZHANG, Y., F. CHEN, J. CHEN, S. HUANG, et al. Soyasaponin Bb inhibits the recruitment of toll-like receptor 4 (TLR4) into lipid rafts and its signaling pathway by suppressing the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase-dependent generation of reactive oxygen species. *Molecular nutrition & food research*, 2016, 60(7), 1532-1543.

ZHAO, J., L. C. DAVIS AND R. VERPOORTE Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 2005a, 23(4), 283-333.

ZHAO, X., F. MA, P. W. LI, G. M. LI, et al. Simultaneous determination of isoflavones and resveratrols for adulteration detection of soybean and peanut oils by mixed-mode SPE LC-MS/MS. *Food Chemistry*, Jun 1 2015, 176, 465-471.

ZHAO, Y., B. R. MARTIN AND C. M. WEAVER Calcium bioavailability of calcium carbonate fortified soymilk is equivalent to cow's milk in young women. *J Nutr*, Oct 2005b, 135(10), 2379-2382.

ZHOU, J., E. FORDYCE, V. RABOY, D. DICKINSON, et al. Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats. *J Nutr*, 1992, 122(12), 2466.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Sója luštinatá (<i>Glycine max</i> L. Merrill).....	11
Obrázek 2: Chemické struktury a zkratky isoflavonů.....	16
Obrázek 3: Struktura 17- β -estradiolu.....	17
Obrázek 4: Zjednodušené schéma biosyntézy isoflavonů.....	21
Obrázek 5: Nejběžnější postupy přípravy vzorku ke stanovení sójových isoflavonů...	23
Obrázek 6: Schéma hmotnostního detektoru.	34
Obrázek 7: Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu.	39
Obrázek 8: MRM chromatogramy standardu isoflavonů.....	40
Obrázek 9: Porovnání účinností extrakcí prostřednictvím tří metod extrakce s využitím extrakčního rozpouštědla (80% metanol) ze vzorků jednotlivých odrůd sójových bobů.	43
Obrázek 10: Stanovení průměrné koncentrace celkových isoflavonů prostřednictvím extrakční techniky SLE s využitím třepačky a následné centrifugace.....	44
Obrázek 11: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Brunensis.....	45
Obrázek 12: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Bohemians.....	46
Obrázek 13: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Naya.	47
Obrázek 14: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Moravians.	48
Obrázek 15: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Silesia.	49
Obrázek 16: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Toutatis.	50
Obrázek 17: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Korus.....	51
Obrázek 18: Průměrná koncentrace isoflavonů vyjádřena v mg/100g vzorku zastoupených v odrůdě Kofu.	52
Obrázek 19: Stanovení průměrné koncentrace daidzeinu (A), genisteinu (B) a glycitinu (C) v mg/ 100g vzorku. V obrázku je zohledněna metoda extrakce SLE s využitím třecí misky, homogenizátoru a třepačky.	54

- Obrázek 20:** Stanovení celkového obsahu aglykonů v jednotlivých odrůdách sójových bobů. V obrázku jsou rovněž zohledněny všechny tři extrakční techniky. 54
- Obrázek 21:** Stanovení průměrné koncentrace daidzinu (A), genistinu (B) a glycitinu (C) v mg/ 100g vzorku. V obrázku je zohledněna metoda extrakce SLE s využitím třecí misky, homogenizátoru a třepačky. 56
- Obrázek 22:** Stanovení celkového obsahu β -glukosidů v jednotlivých odrůdách sójových bobů. V obrázku jsou rovněž zohledněny všechny tři extrakční techniky. 56

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Průměrné chemické složení zralých sójových bobů	12
Tabulka 2: Parametry hmotnostního spektrometru (trojitý quadrupól)	41
Tabulka 3: Kalibrační údaje hmotnostního spektrometru (trojitý quadrupól)	41

10 SEZNAM PŘÍLOH

Tabulka 4: Obsah aglykonů, β -glukosidů a celkových isoflavonů ve vzorcích odrůd v mg/100g (n=3) extrační (SLE) technikou s využitím třepačky. Výsledky jsou vyjádřeny jako *průměr \pm směrodatná odchylka*. 73

Tabulka 5: Obsah aglykonů, β -glukosidů a celkových isoflavonů ve vzorcích odrůd v mg/100g (n=3) extrační (SLE) technikou s využitím homogenizéru. Výsledky jsou vyjádřeny jako *průměr \pm směrodatná odchylka*. 74

Tabulka 6: Obsah aglykonů, β -glukosidů a celkových isoflavonů ve vzorcích odrůd v mg/100g (n=3) extrační (SLE) technikou s využitím třecí misky. Výsledky jsou vyjádřeny jako *průměr \pm směrodatná odchylka*. 75

Tabulka 4: Obsah aglykonů, β -glukosidů a celkových isoflavonů ve vzorcích odrůd v mg/100g (n=3) extrakční (SLE) technikou s využitím třepáčky. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka.

Isoflavon	Odrůda								
	<i>Brunensis</i>	<i>Bohemians</i>	<i>Nava</i>	<i>Moravians</i>	<i>Silesia</i>	<i>Toutatis</i>	<i>Korus</i>	<i>Kofu</i>	
Daidzein	4,32 \pm 0,06	6,88 \pm 0,13	3,58 \pm 0,12	5,22 \pm 0,14	4,23 \pm 0,11	4,80 \pm 0,12	3,45 \pm 0,10	8,21 \pm 0,26	
Daidzin	85,74 \pm 1,51	156,143 \pm 3,58	127,69 \pm 1,91	135,06 \pm 4,59	136,71 \pm 3,57	142,05 \pm 3,21	156,32 \pm 2,29	171,45 \pm 4,91	
Glycitein	4,86 \pm 0,07	7,22 \pm 0,21	5,52 \pm 0,06	5,71 \pm 0,13	6,14 \pm 0,16	6,50 \pm 0,23	6,76 \pm 0,17	8,39 \pm 0,26	
Glycitin	47,44 \pm 1,23	58,46 \pm 1,13	47,04 \pm 1,00	46,87 \pm 0,96	54,05 \pm 1,56	56,7 \pm 0,96	53,99 \pm 0,93	58,99 \pm 0,95	
Genistein	3,88 \pm 0,08	6,16 \pm 0,08	3,36 \pm 0,08	3,70 \pm 0,08	3,04 \pm 0,06	4,15 \pm 0,07	3,31 \pm 0,07	7,41 \pm 0,11	
Genistin	82,86 \pm 1,13	92,98 \pm 2,12	73,84 \pm 0,97	70,74 \pm 0,82	74,12 \pm 1,50	84,34 \pm 1,85	82,73 \pm 1,38	93,33 \pm 1,87	
<i>Aglykony celkem</i>	13,06 \pm 0,07	20,26 \pm 0,14	12,46 \pm 0,09	14,63 \pm 0,12	13,40 \pm 0,11	15,45 \pm 0,17	13,52 \pm 0,13	24,00 \pm 0,19	
<i>β-glykosidy celkem</i>	216,04 \pm 1,29	307,58 \pm 2,28	248,58 \pm 1,29	252,67 \pm 2,12	264,88 \pm 2,21	283,09 \pm 2,73	293,04 \pm 2,87	323,76 \pm 3,32	
<i>Isoflavony celkem</i>	229,09 \pm 0,72	328,24 \pm 1,21	261,04 \pm 0,69	267,29 \pm 1,12	278,28 \pm 1,16	298,54 \pm 1,45	306,56 \pm 1,50	347,76 \pm 1,75	

Tabulka 5: Obsah aglykonů, β -glukosidů a celkových isoflavonů ve vzorcích odrůd v mg/100g (n=3) extrakční (SLE) technikou s využitím homogenizéru. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka.

Isoflavon	Odrůda									
	<i>Brunensis</i>	<i>Bohemians</i>	<i>Naya</i>	<i>Moravians</i>	<i>Silesia</i>	<i>Toutatis</i>	<i>Korus</i>	<i>Kofu</i>		
Daidzein	5,79 \pm 0,19	8,52 \pm 0,28	6,17 \pm 0,13	5,31 \pm 0,21	3,52 \pm 0,11	4,42 \pm 0,10	3,13 \pm 0,14	8,14 \pm 0,21		
Daidzin	64,4 \pm 2,44	141,46 \pm 3,46	117,57 \pm 2,56	120,42 \pm 2,41	124,46 \pm 2,82	142,21 \pm 3,42	146,09 \pm 4,35	163,99 \pm 7,74		
Glycitein	4,44 \pm 0,10	6,66 \pm 0,19	5,41 \pm 0,21	6,35 \pm 0,24	5,86 \pm 0,13	6,09 \pm 0,26	5,37 \pm 0,14	7,29 \pm 0,19		
Glyctin	48,38 \pm 1,43	55,65 \pm 1,94	48,37 \pm 1,79	46,17 \pm 1,13	51,09 \pm 1,68	48,96 \pm 1,82	47,55 \pm 1,73	52,79 \pm 1,89		
Genistein	6,70 \pm 0,24	8,68 \pm 0,20	4,38 \pm 0,13	3,63 \pm 0,08	2,6 \pm 0,07	3,25 \pm 0,13	2,54 \pm 0,07	6,01 \pm 0,15		
Genistin	71,65 \pm 1,41	87,45 \pm 2,80	72,45 \pm 2,10	72,36 \pm 2,03	78,18 \pm 1,55	84,78 \pm 2,88	85,45 \pm 2,38	89,71 \pm 2,90		
<i>Aglykony celkem</i>	16,94 \pm 0,18	23,86 \pm 0,22	15,97 \pm 0,16	15,29 \pm 0,17	11,99 \pm 0,11	13,76 \pm 0,16	11,04 \pm 0,12	21,44 \pm 0,18		
<i>β-glykosidy celkem</i>	184,43 \pm 1,78	284,56 \pm 2,73	238,39 \pm 2,15	238,95 \pm 1,86	253,72 \pm 2,02	275,94 \pm 2,71	279,09 \pm 2,82	306,49 \pm 4,18		
<i>Isoflavony celkem</i>	201,36 \pm 0,98	308,43 \pm 1,48	254,36 \pm 1,16	254,24 \pm 1,02	265,71 \pm 1,06	290,14 \pm 1,44	290,13 \pm 1,47	327,93 \pm 2,18		

Tabulka 6: Obsah aglykonů, β -glukosidů a celkových isoflavonů ve vzorcích odrůd v mg/100g (n=3) extrakční (SLE) technikou s využitím třecí misky. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka.

Isoflavon	Odrůda									
	<i>Brunensis</i>	<i>Bohemians</i>	<i>Naya</i>	<i>Moravians</i>	<i>Silesia</i>	<i>Toutatis</i>	<i>Korus</i>	<i>Kofu</i>		
Daidzein	2,12 \pm 0,11	5,42 \pm 0,37	3,74 \pm 0,21	9,15 \pm 0,56	3,64 \pm 0,22	3,65 \pm 0,21	2,84 \pm 0,18	5,77 \pm 0,31		
Daidzin	3,98 \pm 0,24	17,23 \pm 1,12	18,11 \pm 1,01	15,99 \pm 1,01	11,41 \pm 0,64	16,67 \pm 1,09	14,02 \pm 0,89	13,22 \pm 0,99		
Glycitein	1,17 \pm 0,07	0,90 \pm 0,05	1,06 \pm 0,05	0,88 \pm 0,04	1,82 \pm 0,10	2,63 \pm 0,13	2,40 \pm 0,14	2,44 \pm 0,08		
Glycitin	15,65 \pm 0,80	13,34 \pm 0,49	9,32 \pm 0,45	8,35 \pm 0,40	11,88 \pm 0,57	11,23 \pm 0,61	10,59 \pm 0,48	12,59 \pm 0,65		
Gemistein	1,33 \pm 0,08	4,27 \pm 0,29	2,20 \pm 0,10	5,47 \pm 0,28	4,81 \pm 0,21	2,16 \pm 0,13	1,74 \pm 0,11	3,83 \pm 0,16		
Gemistin	4,50 \pm 0,23	11,44 \pm 0,48	9,14 \pm 0,55	31,68 \pm 1,57	7,35 \pm 0,46	10,46 \pm 0,42	6,77 \pm 0,28	8,94 \pm 0,45		
<i>Aglykony celkem</i>	4,63 \pm 0,09	10,59 \pm 0,26	6,99 \pm 0,12	15,50 \pm 0,30	10,28 \pm 0,18	8,45 \pm 0,16	6,97 \pm 0,14	12,04 \pm 0,18		
<i>β-glykosidy celkem</i>	24,13 \pm 0,43	42,03 \pm 0,70	36,57 \pm 0,67	56,03 \pm 0,99	30,65 \pm 0,56	38,35 \pm 0,71	31,38 \pm 0,55	34,75 \pm 0,70		
<i>Isoflavony celkem</i>	28,75 \pm 0,26	52,62 \pm 0,47	43,56 \pm 0,39	71,52 \pm 0,64	40,92 \pm 0,37	46,80 \pm 0,43	38,35 \pm 0,35	46,78 \pm 0,44		

11 SEZNAM ZKRATEK

ACPI	chemická ionizace atmosférickým tlakem
AMK	extrakce urychleným tokem rozpouštědla
BBI	Bowman-Birk inhibitor
CE	kapilární elektroforéza
CEAD	multikanálový elektrochemický detektor
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CHR	chalkon isomeráza
CIEF	kapilární isoelektrická fokusace
CITP	kapilární isotachoforéza
CPE	uhlíková pastová elektroda
CZE	zónová kapilární elektroforéza
CoA	acetylkoenzym A
CO ₂	oxid uhličitý
DAD	detektor diodového pole
DESI	ionizace pomocí desorpce elektrosprejem
ED	elektrochemická detekce
ELISA	enzymatická imunoanalýza
ER	estrogenenní receptor
ESI	ionizace elektrosprejem
FIA	fluoresceční imunoanalýza
GC	plynová chromatografie
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HCl	kyselina chlorovodíková
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IFS	isoflavon syntáza
kDa	kilo Dalton
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LLE	extrakce kapalina/kapalina
MASE	mikrovlákná extrakce
MALDI	laserem asistovaná desorpce a ionizace
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie

MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PLE	extrakce urychleným tokem rozpouštědla
QMS	kvadrupólový analyzátor
QqQMS	trojitý kvadrupólový analyzátor
RIA	radioimunoanalýza
SDS	dodecylsulfát sodný
SFE	superkritická fluidní extrakce
SLE	extrakce pevná látka/kapalina
SPE	extrakce pevnou fází
SPME	mikroextrakce pevnou fází
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	trimethylsilyléter
TOFMS	průletový analyzátor
UAE	extrakce ultrazvukem
UV/Vis	ultrafialové záření a záření ve viditelné oblasti