

# IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE ISOFLAVONŮ V ROSTLINNÝCH EXTRAKTECH ZA POUŽITÍ KOMBINACE HPLC S HMOTNOSTNÍM DETEKTOREM A DETEKTOREM S DIODOVÝM POLEM (HPLC-DAD-MS)

BOŘIVOJ KLEJDUS, DAGMAR ŠTĚRBOVÁ,  
PAVEL STRATIL a VLASTIMIL KUBÁŇ

Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno  
e-mail: kuban@mendelu.cz

Došlo 30.10.01, přepracováno 14.12.02, přijato 4.1.03.

Klíčová slova: isoflavony, hmotnostní spektrometrie, rostlinný materiál, HPLC

## Obsah

1. Úvod
2. Důkaz isoflavonů
3. Extrakce a izolace isoflavonů
4. Identifikace a stanovení isoflavonů
5. Závěr

## 1. Úvod

Rostlinná říše produkuje obrovská, a často řádově odlišná množství organických látek, které se většinou nezapojují přímo do procesu růstu a vývoje. Tyto látky označujeme jako sekundární metabolity. Základem jejich biosyntetické produkce jsou primární metabolity, přičemž hranice mezi primárními a sekundárními metabolity nejsou zcela jednoznačně definovány. Tyto látky jsou často odstupňovaně rozděleny mezi přesně vymezené taxonomické skupiny uvnitř rostlinné říše. Mnohé jejich funkce zůstávají doposud nepoznané.

Přírodní rostlinné metabolity můžeme rozdělit do tří hlavních skupin: terpeny, alkaloidy a fenylpropanoidy a jim příbuzné fenolické sloučeniny. Terpeny jsou odvozeny od prekurzoru isopentenyl-difosfátu (IPP) s pěti uhlíkovými atomy a zahrnují vedle primárních metabolitů také více než 25 000 sekundárních metabolitů. Alkaloidy, kterých je známo okolo 12 000, obsahují jeden nebo více atomů dusíku a jejich biosyntéza vychází především z aminokyselin.

Šikimátovou nebo malonát-acetátovou metabolickou cestou vzniká přes osm tisíc fenolických sloučenin. Převážná většina rostlinných fenolů, nikoliv však všechny, je odvozena z fenylpropanoidové a fenylpropanoid-acetátové cesty a v rostlině plní celou řadu významných fyziologických funkcí. Centrálními enzymy v fenylpropanoidovém metabolismu jsou fenylalaninamoniumlyasa (PAL) a tyrosinamoniumlyasa (TAL). Tyto enzymy konvertují fenylalanin (PAL) na skořicovou kyselinu a tyrosin (TAL) na *p*-kumarovou (4-hydroxy-skořicovou) kyselinu.

Jednotlivé skupiny fenolických látek sdílejí mnoho společných znaků vycházejících z jejich biochemických cest. K jedné z nejdůležitějších skupin fenolických sloučenin

patří flavonoidy. Tato skupina se skládá z rozmanitých skupin rostlinných metabolitů, mezi které patří chalkony, auryony, flavonony, isoflavonoidy, flavony, flavonoly, leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly), katechiny a anthokyanidiny. Skupina zahrnuje více než 4 500 sloučenin. Metabolické dráhy jednotlivých skupin jsou značně komplikované, jak ukazuje schéma A, které bylo modifikováno na základě literárních údajů<sup>1-4</sup> a které lze nalézt v internetovém doplňku k této práci na adrese [http://chemicke-listy.vscht.cz/index\\_cz1250.html](http://chemicke-listy.vscht.cz/index_cz1250.html).

Isoflavonoidy tvoří významnou podskupinu patřící mezi flavonoidy. Existuje asi 629 známých struktur a z toho je popsáno okolo 364 aglykonů. Tyto sloučeniny se odlišují strukturálně od dalších tříd flavonoidů vazbou benzenového kruhu (kruhu B) v pozici 3 heterocyklického systému. Jejich struktura (viz schéma A v internetovém doplňku a tabulka I) je založena na 3-fenylchromen-4-onu a liší se v míře hydroxylace, methylace a glykosylace<sup>5,6</sup>.

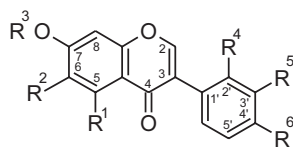
Isoflavony jsou polohové izomery častěji se vyskytujícími flavonů. Genistein je například biosynteticky odvozen přesunem arylu ze stejného chalkonového prekurzoru podobně jako flavon apigenin. Isoflavony jsou zastoupeny v rostlinné říši v menší míře než další flavonoidy. Tato skutečnost je potvrzena faktem, že isoflavony jsou zastoupeny převážně v omezeném počtu čeledí jako jsou *Fabaceae* a *Viciaceae*. V menší míře se vyskytují i v řadě dalších čeledí jako jsou *Papilionaceae*, *Iridaceae*, *Myristicaceae*, *Compositae*, *Amaranthaceae* a *Rosaceae*.

Isoflavony se vyskytují především v chloroplastech nadzemních částí orgánů rostlin, ve stopách i v kořenech (u některých rostlin pouze v kořenech, např. *Ononis spinosa*). Vyskytují se jako látky konstituční, nebo se objevují jako následek působení stresu či za obou okolností. Na obsah isoflavonů má vliv řada biotických a abiotických faktorů. Isoflavony plní určité funkce v obranném systému rostliny jako přirozená ochrana proti infekci, při klíčení semen, napadení hmyzem a poškození škůdci. Tyto látky mohou po určitou dobu udržovat svoji biologickou aktivitu a ovlivňovat mikrobiální poměry v půdě.

Mezi nejznámější isoflavony patří aglykony daidzein, genistein, formononetin a biochanin A, jakož i jejich glykosidy daidzin, genistin, ononin a sissostriin. Isoflavony jsou slabými estrogeny. Vykazují estrogenní účinky na centrální nervovou soustavu, vyvolávají falešnou říjí a stimulují růst pohlavních orgánů samic savců. Studie v oblasti humánní a veterinární medicíny i pokusy s tkáňovými kulturami dokládají důležitou roli těchto fytoestrogenů přijímaných v potravě v prevenci osteoporosy, menopausy, nádorových a srdečních onemocnění<sup>7,8</sup>.

## 2. Detekce isoflavonů

Detekce a identifikace biologicky aktivních látek hraje strategickou roli ve fytochemickém výzkumu. Mezi rychlé orientační techniky patří především papírová (PC), tenkovrstvá (TLC) a případně i sloupcová chromatografie (CC). Pro

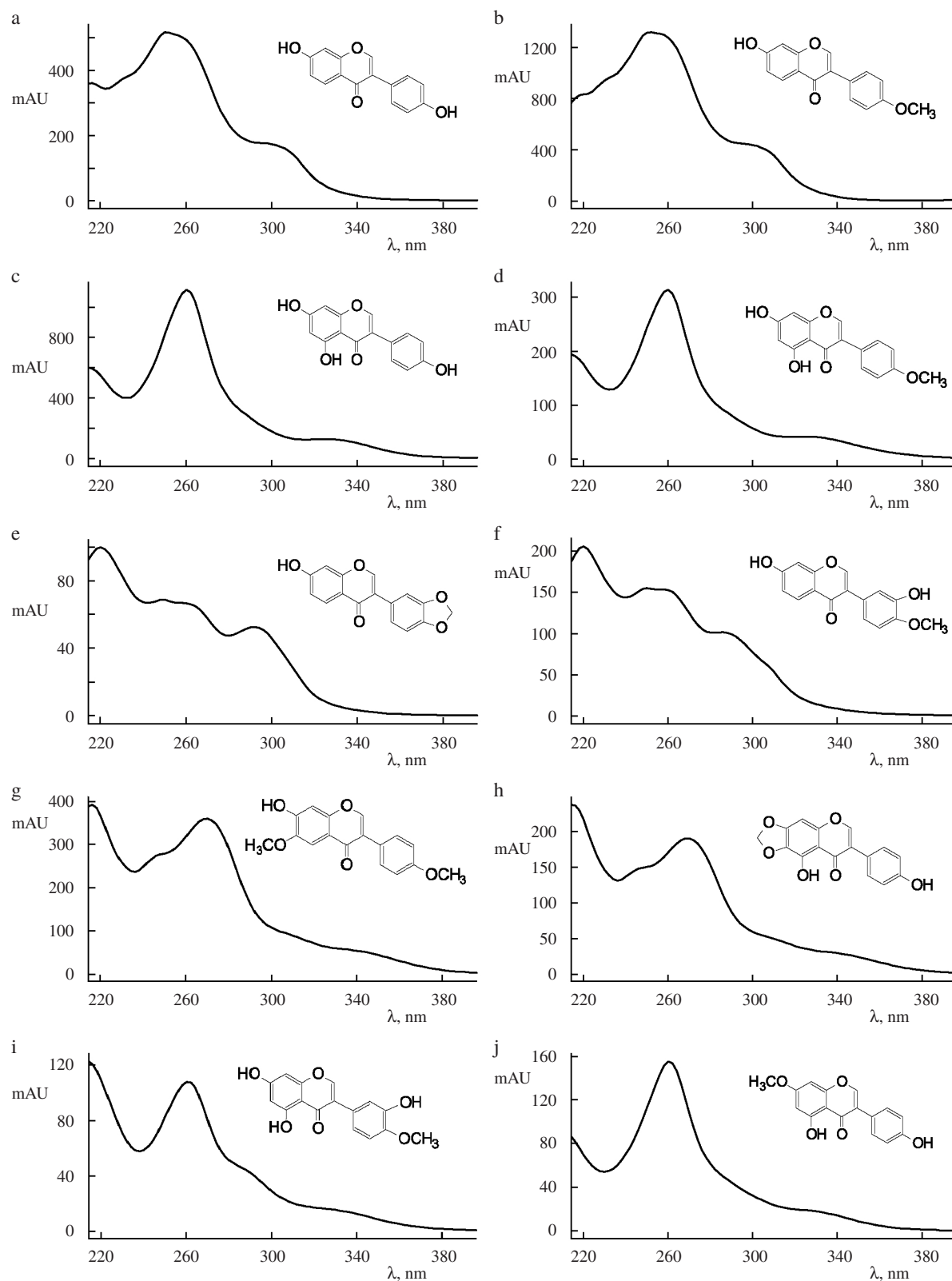
Tabulka I  
Struktury isoflavonů

Isoflavony	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>
Daidzin	H	H	Glc	H	H	OH
Glycetin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid	H	OCH <sub>3</sub>	Glc	H	H	OH
Kalykosin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid	H	H	Glc	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Genistin	OH	H	Glc	H	H	OH
Daidzein-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	H	H	GlcMal	H	H	OH
3-Methylorobol-7- <i>O</i> -β-D-glukosid	OH	H	Glc	H	OCH <sub>3</sub>	OH
Pratensein-7- <i>O</i> -β-D-glukosid	OH	H	Glc	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Kalykosin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	H	H	GlcMal	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Pseudobaptigenin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid	H	H	Glc	H		OCH <sub>2</sub> O
Daidzein-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -acetát	H	H	GlcAc	H	H	OH
Ononin (formononetin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid)	H	H	Glc	H	H	OCH <sub>3</sub>
Genistein-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	OH	H	GlcMal	H	H	OH
Orobol-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	OH	H	Glc	H	OH	OH
3-Methylorobol-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	OH	H	GlcMal	H	OCH <sub>3</sub>	OH
Pratensein-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	OH	H	GlcMal	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Daidzein	H	H	H	H	H	OH
Irilon-4'- <i>O</i> -β-D-glukosid	OH	O-	CH <sub>2</sub> -	H	H	Glc
Pseudobaptigenin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	H	H	GlcMal	H		OCH <sub>2</sub> O
Glycitein	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	OH
Orobol	OH	H	H	H	OH	OH
Kalykosin	H	H	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Formononetin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	H	H	GlcMal	H	H	OCH <sub>3</sub>
Afrormosin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid	H	OCH <sub>3</sub>	Glc	H	H	OCH <sub>3</sub>
Sissotrin (biochanin A-7- <i>O</i> -β-D-glukosid)	OH	H	Glc	H	H	OCH <sub>3</sub>
Irilin B-7- <i>O</i> -β-D-glukosid	OH	OCH <sub>3</sub>	Glc	OH	H	H
Irilon-4'- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	OH		OCH <sub>2</sub>	H	H	GlcMal
Trifosid (prunetin-4'- <i>O</i> -β-D-glukosid)	OH	H	CH <sub>3</sub>	H	H	Glc
Afrormosin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	H	OCH <sub>3</sub>	GlcMal	H	H	OCH <sub>3</sub>
Pseudobaptigenin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -acetát	H	H	GlcAc	H		OCH <sub>2</sub> O
Formononetin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -acetát	H	H	GlcAc	H	H	OCH <sub>3</sub>
Texasin-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	H	OH	GlcMal	H	H	OCH <sub>3</sub>
Irilin B-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	OH	OCH <sub>3</sub>	GlcMal	OH	H	H
3'-Methylorobol	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH
Genistein	OH	H	H	H	H	OH
Biochanin A-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	OH	H	GlcMal	H	H	OCH <sub>3</sub>
Pratensein	OH	H	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Prunetin-4'- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát	OH	H	CH <sub>3</sub>	H	H	GlcMal
Pseudobaptigenin	H	H	H	H		OCH <sub>2</sub> O
Irilon-4'- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -acetát	OH		OCH <sub>2</sub>	H	H	GlcAc
Formononetin	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>
Prunetin-4'- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -acetát	OH	H	CH <sub>3</sub>	H	H	GlcAc
Texasin	H	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>
Biochanin A-7- <i>O</i> -β-D-glukosid-6''- <i>O</i> -acetát	OH	H	GlcAc	H	H	OCH <sub>3</sub>
Irilon	OH		OCH <sub>2</sub>	H	H	OH
Prunetin	OH	H	CH <sub>3</sub>	H	H	OH
Biochanin A	OH	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>

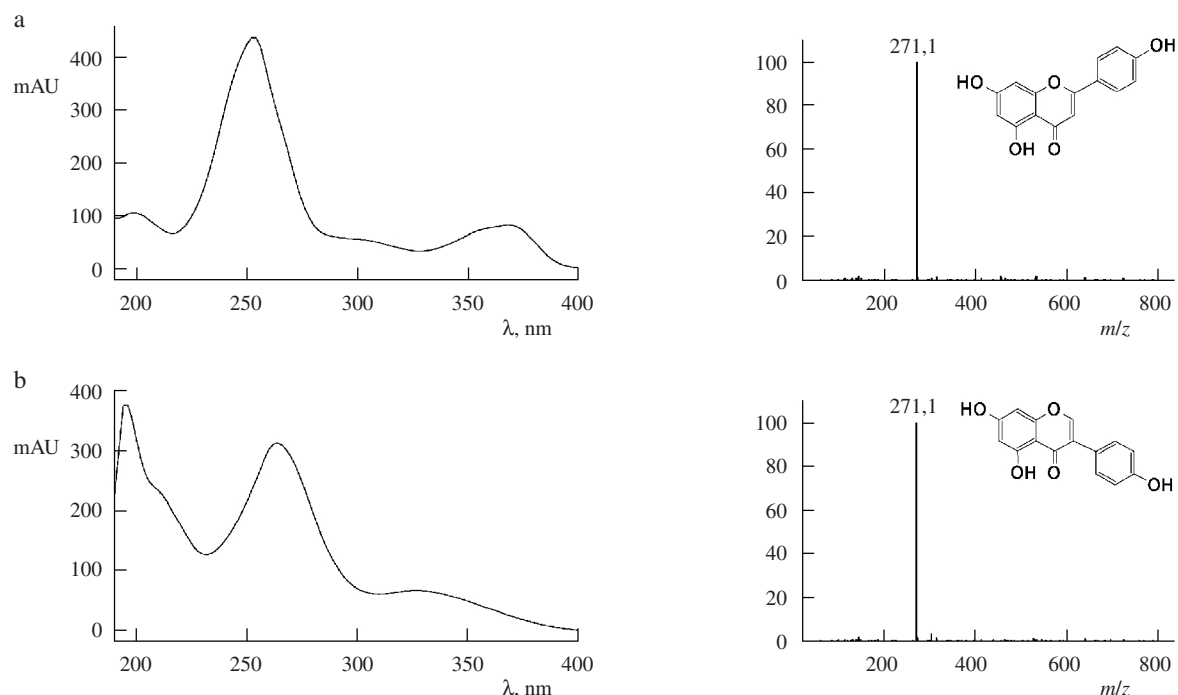
stanovení jednotlivých isoflavonů v rostlinných extraktech a biologických materiálech jsou s úspěchem používány především metody chromatografické (kapalinová a plynová chromatografie – HPLC a GC) a elektromigrační (kapilární elek-

troforéza a micelární elektrokinetická chromatografie – CE a MEKC).

Cenné informace o chemické struktuře studovaných metabolitů můžeme získat spektrálními technikami. Mezi off-line



Obr. 1. Srovnání UV spekter isoflavonů<sup>22</sup>; a – daidzein, b – formononetin, c – genistein, d – biochanin A, e – pseudobaptigenin, f – kalykosin, g – aformosin, h – irilon, i – pratensein, j – prunetin

Obr. 2. Porovnání UV a MS spekter apigeninu (a) a genisteinu (b) (cit.<sup>22</sup>)

Tabulka II

Identifikace píků a spektrální data extraktu *Trifolium pratense*<sup>22</sup>

Pík	$t_r$ [min]	$[M+H]^+$ [m/z]	Fragment [m/z]	$\lambda_{max}$ [nm]	Identifikované isoflavony
1	4,83	417	255	250,302	daidzin
2	5,30	447	285	258,286	glycetin-7-O-β-D-glukosid
3	6,20	447	285	250,286	kalykosin-7-O-β-D-glukosid
4	10,10	433	271	260,328	genistin
5	10,22	503	255	250,300	daidzein-7-O-β-D-glukosid-6''-O-malonát
6	11,15	463	301	264,330	3-methylorobol-7-O-β-D-glukosid
7	11,63	463	301	261,286,337	pratensein-7-O-β-D-glukosid
8	12,80	533	285	259,286	kalykosin-7-O-β-D-glukosid-6''-O-malonát
9	14,99	445	283	249,292	pseudobaptigenin-7-O-β-D-glukosid
10	16,70	431	269	251,300	ononin (formononetin-7-O-β-D-glukosid)
11	19,50	549	301	264,332	3-methylorobol-7-O-β-D-glukosid-6''-O-malonát
12	20,49	549	301	261,286,338	pratensein-7-O-β-D-glukosid-6''-O-malonát
13	22,70	517	269	250,298	isoformononetin-7-O-β-D-glukosid-6''-O-malonát)
14	23,20	255		250,302	daidzein
15	24,30	461	299	270,339	irilon-4'-O-β-D-glukosid
16	24,60	531	283	249,293	pseudobaptigenin-7-O-β-D-glukosid-6''-O-malonát
17	24,75	285		258,288	glycitein
18	26,50	517	269	250,298	formononetin-7-O-β-D-glukosid-6''-OD -malonát
19	26,80	461	299		afroformosin-7-O-β-D-glukosid
20	29,40	447	285	260,326	sissotrin (biochanin A-7-O-β-D-glukosid)
21	29,60	463	301	262,288,320	irilin B (5,7,2'-trihydroxy-6-methoxyisoflavon-7-O-β-D-glukosid)
22	30,10	547	299	271,340	irilon-4'-O-β-D-glukosid-6''-O-malonát
23	32,85	447	285	260,324	trifosid (prunetin-4'-O-β-D-glukosid)
24	33,02	547	299	270,337	afroformosin-7-O-β-D-glukosid-6''-O-malonát
25	36,10	533	285	260,326	texasin-7-O-β-D-glukosid-6''-O-malonát

Tabulka II – pokračování

Pík	$t_r$ [min]	[M+H] <sup>+</sup> [ $m/z$ ]	Fragment [ $m/z$ ]	$\lambda_{max}$ [nm]	Identifikované isoflavony
26	36,30	549	301	262,287,320	irilin B (5,7,2'-trihydroxy-6-methoxyisoflavon-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát)
27	36,68	301		264,334	3-methylorobol
28	39,28	271		260,330	genistein
29	39,60	533	285	260,326	biochanin A-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát
30	40,92	301		262,284,334	pratensein
31	41,20	533	285	260,325	trifosid (prunetin-4'- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukosid-6''- <i>O</i> -malonát)
32	43,20	283		249,296	pseudobaptigenin
33	45,37	269		249,302	formononetin
34	49,70	285		261,325	texasin
35	50,17	489	285	260,325	biochanin A-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukosid-6''- <i>O</i> -acetát
36	60,70	285		261,326	biochanin A

techniky patří spektrofotometrické metody v ultrafialové a viditelné (UV/VIS) nebo infračervené oblasti (IR), hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická resonance (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR). On-line techniky zahrnují GC, HPLC a CE ve spojení s detektorem s diodovým polem (UV/VIS DAD) nebo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie HPLC/MS, HPLC/MS/MS, GC/MS, CE/MS a v neposlední řadě i kombinace kapalinové chromatografie s nukleární magnetickou resonancí HPLC/NMR (cit.<sup>9-13</sup>).

Vyřešení konstrukce potřebných rozhraní pro spojení těchto technik a zavedení nových ionizačních metod, jako jsou elektrosprej (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), umožnilo provádění rutinních analýz biologických materiálů. Jednou z dalších výhod je možnost provádět aktivaci iontů přímo v iontovém zdroji. Možnost interpretace takto získaných kolizních spekter jednotlivých isoflavonů umožňuje upřesnit další strukturální informace o sledovaných metabolitech.

### 3. Extrakce a izolace isoflavonů

Výše uvedené techniky však vyžadují dokonalou předběžnou separaci jednotlivých skupin metabolitů, neboť klasické izolační postupy jsou značně neselektivní. Zvláště vysoké nároky jsou kladeny na zjednodušení matrice vzorků u biologických materiálů rostlinného původu. Postupy pro extrakci a izolaci isoflavonoidů lze rozdělit do několika skupin: 1) extrakce kapalinou, 2) kyselá hydrolyza, 3) enzymatická hydrolyza, 4) extrakce na tuhé fázi (SPE) a 5) extrakce kapalinou (oxidem uhličitým) v nadkritickém stavu (SFE).

Při extrakci isoflavonoidů polární kapalinou z dokonale homogenizovaných vzorků se používá methanol, ethanol nebo acetonitril, popř. jejich vodné roztoky. V některých případech se také používá dichlormethan. Doba extrakce se v závislosti na použité extrakční kapalině a druhu vzorku pohybuje od jednotek hodin až po několik dní. Doba a účinnost extrakce závisí především na zvoleném postupu, teplotě a způsobu a intenzitě třepání. Metody bývají málo selektivní a vykazují poměrně nízkou účinnost.

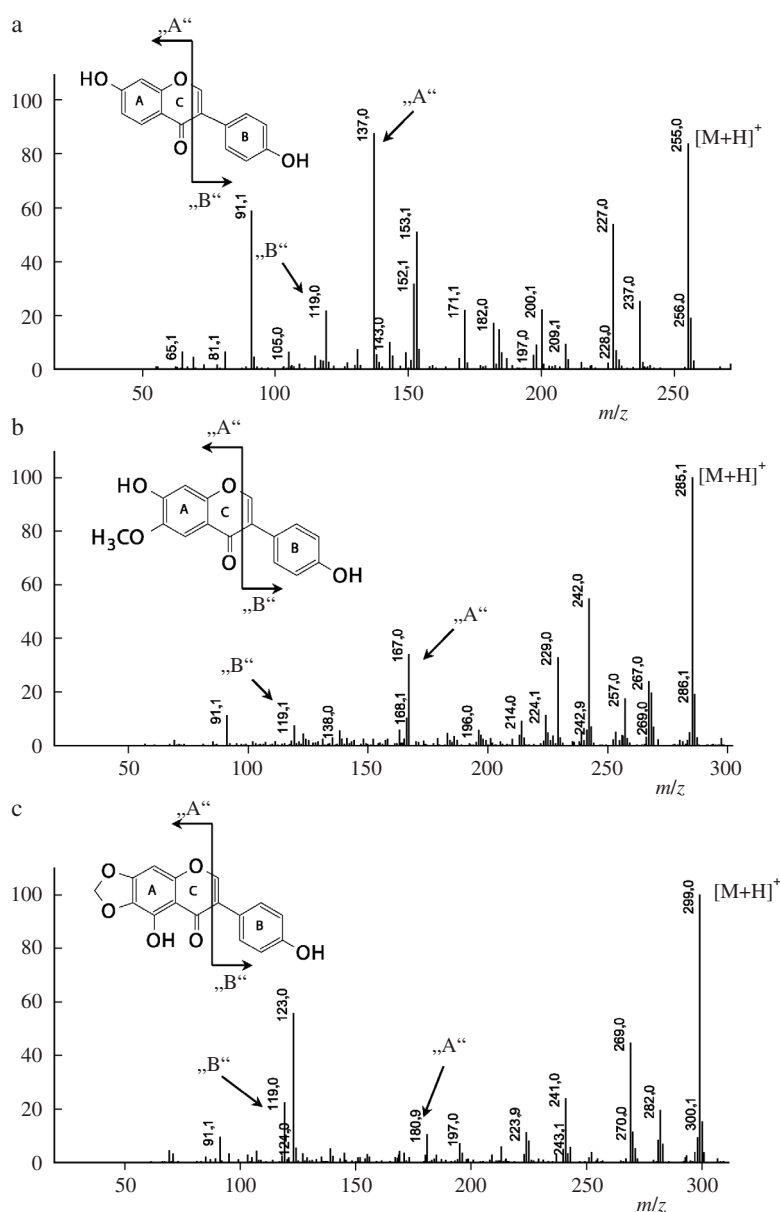
Postupy založené na kyselé hydrolyze využívají pro extrakci vodné roztoky organických rozpouštědel (methanol, acetonitril a ethanol) s přidavkem kyseliny chlorovodíkové. Účinnost je závislá především na koncentraci kyseliny chlorovodíkové, době extrakce a koncentraci rozpouštědla<sup>14,15</sup>. Přídavek kyseliny chlorovodíkové vede ke zvýšení extrakční účinnosti, přičemž selektivita zůstává zhruba zachována.

Enzymatické hydrolyze předchází extrakce homogenizovaného vzorku 96% ethanolem. Po dokonalém odpaření pod vakuem následuje digesce acetátovým pufrům obsahujícím  $\beta$ -glukosidasu a  $\beta$ -glukoronidasu/sulfatasu, inkubace a centrifugace. Enzymatická hydrolyza je mnohem šetrnější a vyznačuje se zlepšenou selektivitou v porovnání s předchozími postupy.

Při extrakci na tuhé fázi bývá v prvním kroku provedena digesce rozpouštědlem. Potom je extrakt vzorku nanesen na vhodný sorbent. K nejpoužívanějším sorbentům patří, vedle modifikovaného silikagelu C18, především polymerní sorbenty na bázi kopolymeru *N*-vinylpyrrolidonu a divinylbenzenu a kopolymeru styren-divinylbenzen (PS-DVB) (cit.<sup>16-23</sup>). Limitujícím faktorem pro využití sorbentů na bázi alkylovaného silikagelu (např. C18) je jejich nedostatečná retence polárních analytů, což může způsobit nízkou návratnost analytu. Při aplikaci vzorku na sorbent může docházet ke ztrátám analytu jeho průnikem do odpadu.

Radu těchto limitujících faktorů eliminují sorbenty na bázi kopolymeru styren-divinylbenzen (PS-DVB). Zaručují stabilitu sorbentu v širokém rozsahu pH, zvyšují použitelnost pro širokou škálu analytů<sup>24-25</sup> a vykazují vyšší retenci polárních analytů. Jejich částečnou nevýhodou je poněkud nižší hydrofobní charakter, který způsobuje horší smáčivost.

Tento nedostatek odstraňují hydrofilně-lipofilní kopolymery na bázi *N*-vinylpyrrolidonu a divinylbenzenu. Hydrofilní charakter *N*-vinylpyrrolidonu zvyšuje smáčivost kopolymeru a naopak lipofilní charakter divinylbenzenu zvyšuje retenci reverzní fáze potřebnou k záchytu analytů. Přítomnost *N*-vinylpyrrolidonu umožňuje aplikaci vzorku přímo na sorbent bez kondičních kroků. Tyto vlastnosti zvýhodňují polymerní sorbenty před klasickými sorbenty na bázi silikagelu, kde kondiční krok může být kritickým místem extrakce.



Obr. 3. RDA fragmentace daidzeinu (a), glyciteinu (b) a irilonu (c)

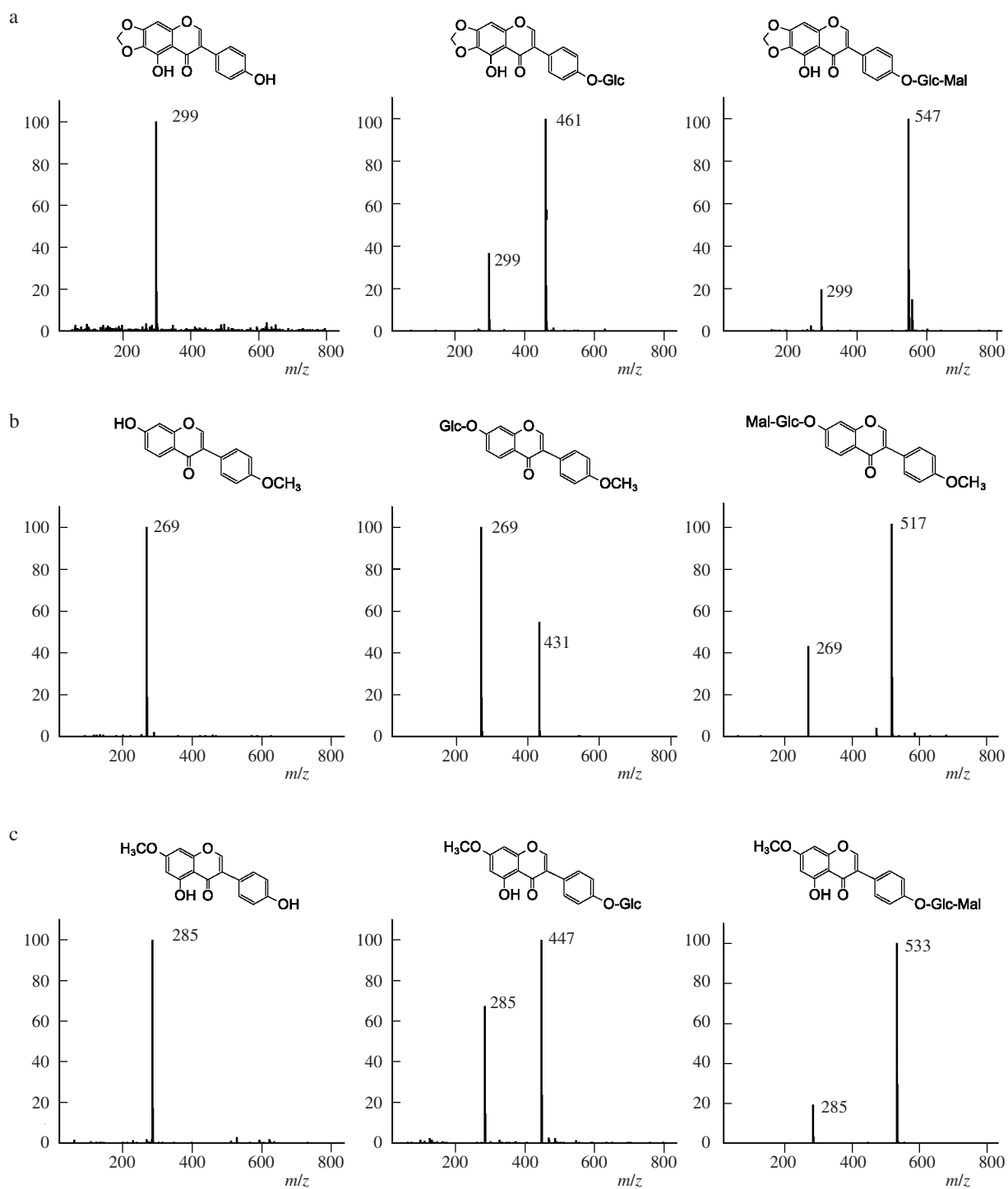
Všechny výše uvedené postupy jsou vesměs vhodným doplňkem ke klasickým postupům izolace, neboť vlivem vysoké selektivity separace dochází k výraznému zjednodušení následného separačního kroku. Komplikovanější příprava vzorku vede vesměs ke snížení počtu balastních látek, avšak je provázána i určitými ztrátami některých složek a vyšší časovou náročností. Výběru sorbentu i rozpouštědel je tedy nutno věnovat velkou péči.

V ojedinělých případech byla použita extrakce kapalinou v nadkritickém stavu (SFE) s použitím oxidu uhličitého<sup>26</sup>. Při extrakci glykosidů isoflavonů nebyla SFE příliš úspěšná, avšak pro stanovení aglykonů isoflavonů se uplatnila s poměrně dobrými výsledky. Použití modifikátorů (methanol, acetonitril aj.) může v řadě případů zvýšit účinnost i selektivitu SFE.

#### 4. Detekce a identifikace isoflavonů

Pro stanovení isoflavonů jsou nejčastěji používány chromatografické a elektromigrační metody. Při HPLC separacích se nejčastěji používá uspořádání s reverzní fází na alkylovanných silikagelech C18 popř. C8. Separace se provádí pomocí izokratické nebo gradientové eluce mobilní fáze, kterou tvoří směs methanolu, acetonitrilu, propan-1-olu, tetrahydrofuranu nebo ethanolu s vhodnými tlumiči (kyselina octová, mravenčí nebo trifluoroctová, octan amonný nebo fosfátový pufr). Jednotlivé látky se detegují převážně spektrofotometricky v UV oblasti (254–280 nm).

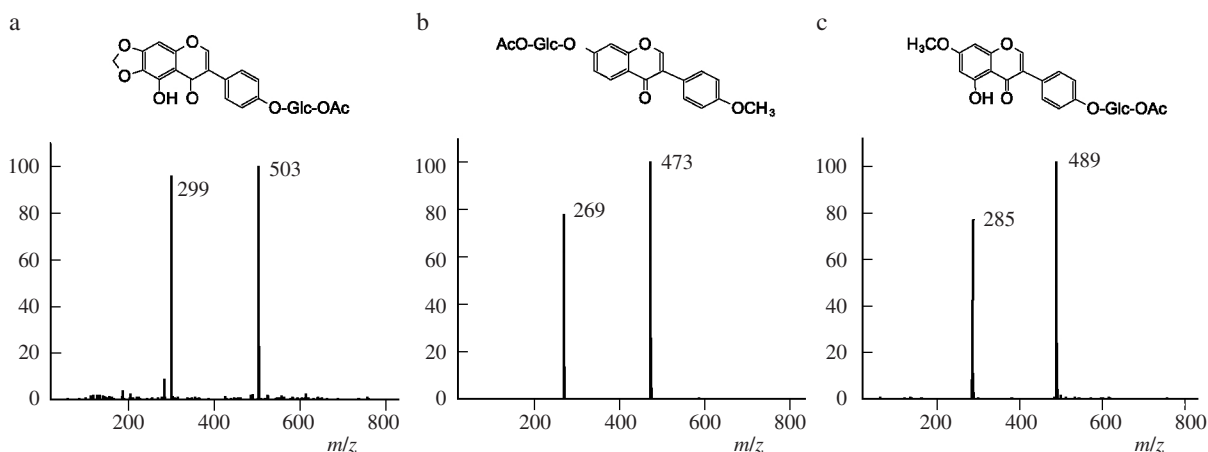
Sledované analyty lze s omezenou pravděpodobností identifikovat na základě jejich retenčních časů nebo metodou přidavku interního standardu. Pro zvýšení informační hodnoty

Obr. 4. MS spektra aglykonu, glukosidu a malonátu glukosidu irilonu (a), formononetinu (b) a prunetinu (c) (cit.<sup>23</sup>)

výsledků se v současnosti s výhodou využívá kombinace porovnání retenčních časů se současným porovnáním UV/VIS DAD absorpčních spekter měřených látek se spektry uloženými v knihovně spekter standardních látek s použitím faktorů shody (match factor). Tyto spektrální knihovny musí být uži-

vatelem vytvořeny za přesně definovaných separačních podmínek (stejná mobilní fáze, průtok, typ chromatografického čerpadla, kolona a teplota) a nelze využívat komerčně nabízené spektrální knihovny.

Faktor shody (match factor, číselná hodnota od 1 do 1000)

Obr. 5. MS spektra acetátu glukosidu irilonu (a) , formononetinu (b) a prunetinu (c) (cit.<sup>22</sup>)

vznikne matematickým porovnáním spektrální křivky standardu se spektrální křivkou sledované sloučeniny. U hodnot vyšších než 996 můžeme hovořit s velkou pravděpodobností o identitě sloučenin. Tento fakt je však nutno potvrdit ještě alespoň jedním nezávislým údajem (například shodou retenčních časů), neboť řada isoflavonů má velmi podobná spektra (viz např. spektra pro daidzein a formononetin, genistein a biochanin A (cit.<sup>22</sup>) na obr. 1).

Téměř identická spektra vykazují navíc i aglykon, glykosid, acetátglykosid a malonátglykosid. Zde pak platí pravidlo pořadí eluce dle retenčních časů malonátglykosid < glykosid < acetátglykosid < aglykon, které lze v řadě případů použít jako pomocné kritérium při identifikaci pík. Spektra isoflavonů jsou zpravidla zcela odlišná od jejich flavonových analogů<sup>27</sup>, jak ukazují například spektra<sup>22</sup> pro genistein a apigenin na obr. 2. Spektrální charakteristiky v UV/VIS oblasti spektra (viz tabulka II) jsou velmi užitečným prostředkem při identifikaci jednotlivých isoflavonů, ale často ani ony nejsou jednoznačným kritériem.

Ve sporných případech je pak velmi účinným nástrojem při identifikaci tandem HPLC-DAD/MS. Vývoj těchto technik byl v minulosti závislý na vyřešení vhodných rozhraní mezi kapalinovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem. Vysokou účinnou kapalinovou chromatografií pracuje s vysokými průtoky mobilních fází, vysokým tlakem a nízkou teplotou v kontrastu s hmotnostní spektrometrií, která používá nízký průtok, vysoké vakuum a plynnou fázi při vysokých teplotách.

Nástup nových ionizačních technik, jako jsou elektrospřej (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), umožnily rutinní propojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS) v širokém rozsahu průtokových rychlostí mobilní fáze (od  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  až po  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Možnost provádět aktivaci iontů přímo v iontovém zdroji dovoluje získávat kolizní spektra, která poskytují další detailní strukturní informace o jednotlivých isoflavonech (cit.<sup>22</sup>, obr. 3).

Na základě retro-Diels-Alderovy fragmentace (RDA) lze s určitou přesností určit substituci fragmentů u isoflavonů na fragmentu kruhu A a substituci na fragmentu kruhu B (viz příklady<sup>22</sup> na obr. 4 a 5). Z těchto informací lze potvrdit, popřípadě navrhnout, pravděpodobnou strukturu příslušného metabolitu. Intenzita fragmentace závisí na intenzitě kolizního

napětí (CID), použitím složení mobilní fáze (kyselina octová, kyselina mravenčí, acetát, atd.), koncentraci složek mobilní fáze, typu organického modifikátoru v iontovém zdroji a v neposlední řadě především na chemické struktuře sledovaného metabolitu. Tandemy HPLC/ESI-MS a HPLC/APCI-MS tak patří k velmi užitečným nástrojům k identifikaci a následně i ke stanovení nových isoflavonů v biologických materiálech<sup>22,28–40</sup>.

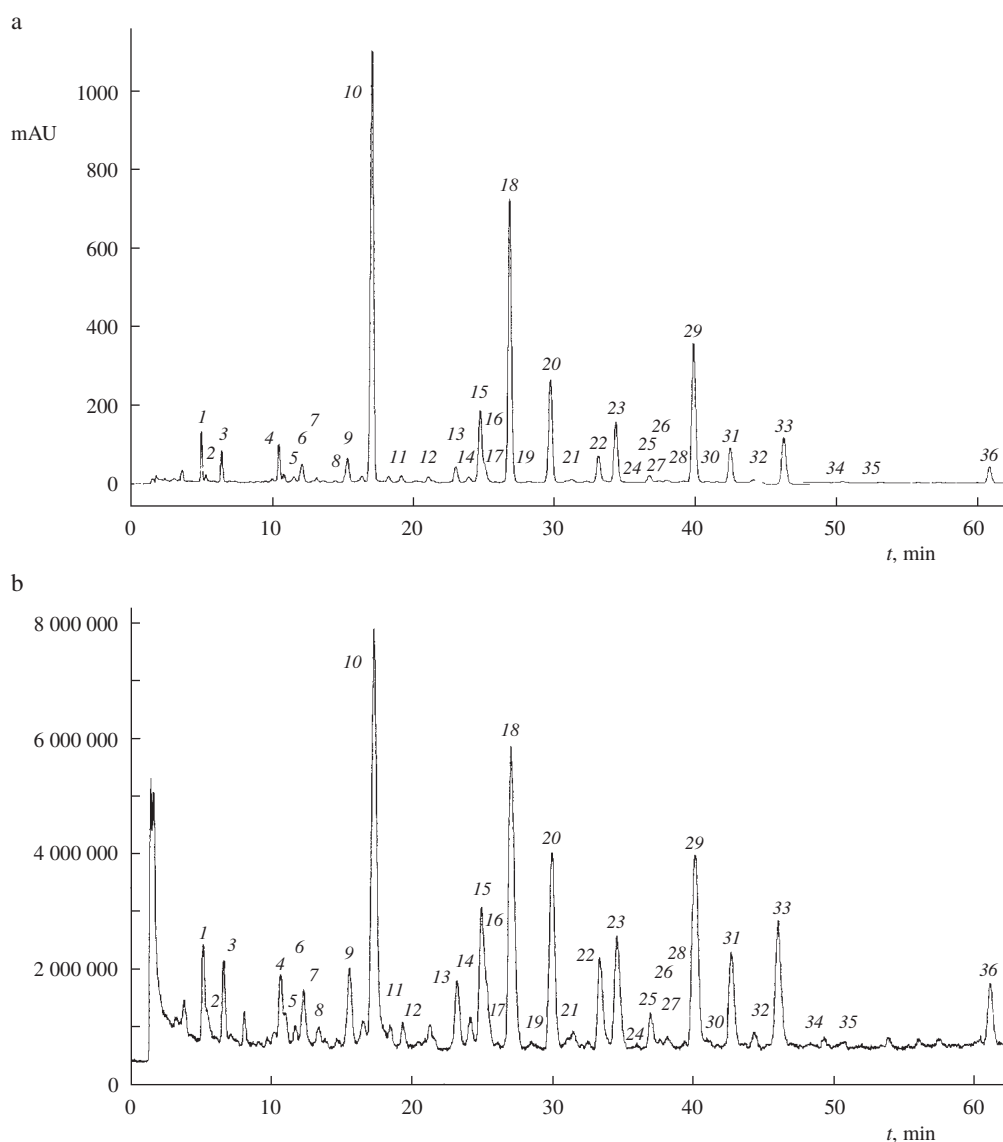
Pro identifikaci a stanovení isoflavonů v rostlinných materiálech (soja, traviny aj.) byla použita celá řada různých spojení HPLC/MS, jak v ESI módu, tak i v pozitivním i negativním APCI módu. Předností spojení HPLC/ESI-MS je šetrnější ionizace termolabilních konjugátů. Barnes a spol.<sup>33</sup> a Rijke a spol.<sup>40</sup> použili pro stanovení isoflavonů a jejich malonátů u leguminos chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Limitujícím faktorem při použití APCI módu pro identifikaci malonátových a acetátových glykosidů je jejich malá termická stabilita. Wang a Sporns<sup>38</sup> demonstrovali použití systému MALDI-TOF MS pro stanovení glykosidů daidzinu a genistinu v produktech ze soji. Přednosti uplatnění kombinace HPLC/MS při stanovení a identifikaci isoflavonů v *Trifolium pratense* demonstrují i naše výsledky<sup>22</sup>.

Jednotlivé analyty (viz tabulka II k obr. 6) byly identifikovány na základě jejich retenčních časů a porovnání absorpčních a hmotnostních spekter se spektry v uživatelské knihovně. U všech námi identifikovaných sloučenin byly faktory shody větší než 995, přičemž z celkového počtu asi 50 identifikovaných sloučenin byla u několika z nich jejich přítomnost v jetelovinách potvrzena v literatuře poprvé<sup>22</sup>.

## 5. Závěr

Biosyntetické dráhy flavonoidů patří k jedněm z nejsledovanějších metabolických systémů v rostlinách. Isoflavonoidy tvoří významnou podskupinu flavonoidů. Vyskytují se jako látky konstituční nebo se objevují jako následek působení stresu či za obou okolností. Isoflavony plní určité funkce v obranném systému rostliny jako přirozená ochrana proti infekci, při klíčení semen, napadení hmyzem a poškození škůdci. Tyto látky mohou po určitou dobu udržovat svoji biologickou aktivitu a ovlivňovat mikrobiální poměry v půdě.



Obr. 6. UV (a) a TIC (b) chromatogramy analýzy extraktu *Trifolium pratense*<sup>22</sup>

V rostlinách se tyto látky vyskytují převážně jako malonáty a acetáty glykosidů. V menší míře jsou přítomny ve formě svých aglykonů. Isoflavony jsou v rostlinné říši zastoupeny v omezeném počtu čeledí jako jsou *Fabaceae* a *Viciaceae*. V minoritních formách se vyskytují i v řadě dalších čeledí. Souvislosti mezi biosyntetickými návaznostmi flavonů a isoflavonů potvrzuje přítomnost isoflavonsynthasy a minoritních koncentrací příslušných isoflavonů i ve zcela netypických čeledích. Tyto skutečnosti dokazují přítomnost metabolické dráhy, která k těmto metabolitům vede (viz schéma A).

Diskutovány jsou možnosti použití extrakčních a separačních technik pro izolaci a identifikaci isoflavonů v biologických materiálech a jsou navrženy způsoby identifikace na základě UV a MS spekter. Kombinace HPLC/ESI/MS a HPLC/APCI/MS umožňují identifikaci s vyšší pravděpodobností než systémy HPLC/UV-DAD.

Na základě kolizních spekter lze navrhnout pravděpodob-

nou strukturu sledovaných analytů. Tandemy HPLC-ESI-MS a HPLC-APCI-MS se tak stávají nedílnou součástí instrumentace při studiu metabolických dějů, identifikaci nových sloučenin v rostlinné říši, ale i v řadě dalších vědních oborů jako jsou chemie, biochemie, mikrobiologie, ekologie, farmacie a medicína. Další pokrok při jednoznačné identifikaci přírodních látek přinese s velkou pravděpodobností aplikace dalších spektrálních metod (IR, NMR aj.) v kombinaci s chromatografickými nebo elektromigračními technikami.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu MŠMT ČR č. 432100001 a grantu GA ČR č. 521/99/0863.

#### LITERATURA

- Jung W., Yu O., Lau S.-M. C., O'Keefe D. P., Odell J., Fader G., McGonile B.: *Nat. Biotechnol.* 18, 208 (2000).

2. He X-Z., Dixon R. A.: *Plant Cell* 12, 1689 (2000).
3. Dixon R. A., v knize: *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Sankawa U., ed.), sv. I, str. 773. Elsevier, Amsterdam 1999.
4. Shirley B. W.: *Seed Sci. Res.* 8, 415 (1998).
5. Bruneton J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Lavoisier, Paris 1996.
6. Williams C. A., Harborne J. B., v knize: *Methods in Plant Biochemistry* (Dey P. M., Harborne J. B., ed.), sv. I. Academic Press, London 1989.
7. Cassidy A., Bingham S., Setchell K. D. R.: *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 333 (1994).
8. Ingram D., Sandres K., Kolybaba M., Lopez D.: *Lancet* 350, 990 (1997).
9. He X-G.: *J. Chromatogr., A* 880, 203 (2000).
10. Stobiecki M.: *Phytochemistry* 54, 237 (2000).
11. Hostettman K., Wolfender J. L., Rodriguez S.: *Planta Med.* 63, 2 (1997).
12. Barnes S., Kirk M., Coward L.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 2466 (1994).
13. Aramendia M. A., García I., Lafont F., Marinas J. M.: *J. Chromatogr., A* 707, 327 (1995).
14. Franke A. A., Custer L. J., Cerna C. M., Narala K. K.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 1905 (1994).
15. Peterson H., Kiessling K. H.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67, 503 (1984).
16. Bouvier E. S. P., Martin D. M., Iraneta P. C., Capparella M., Cheng Y-F., Phillips D. J.: *LC-GC* 15, 152 (1997).
17. Cheng Y-F., Neue U. D., Bean L.: *J. Chromatogr., A* 828, 273 (1998).
18. Cheng Y-F., Phillips D. J., Neue U. D., Bean L. L.: *J. Liq. Chromatogr.* 20, 2461 (1997).
19. Klejdus B., Vitamvásová D., Kubáň V.: *J. Chromatogr., A* 839, 261 (1999).
20. Klejdus B., Kubáň V.: *Phytochem. Anal.* 11, 375 (2000).
21. Klejdus B., Třináctý J., Hrdlička P., Kubáň V.: *Chem. Pap.* 55, 285 (2001).
22. Klejdus B., Vitamvásová D., Kubáň V.: *Anal. Chim. Acta* 450, 81 (2001).
23. Fritz J. S., Macka M.: *J. Chromatogr., A* 902, 137 (2000).
24. Neue U. D.: *Am. Lab.* 1997 (2), 334.
25. Bolliet D., Poole C. F.: *Chromatographia* 46, 381 (1997).
26. Verotta L., Peterlongo F.: *Phytochem. Anal.* 4, 178 (1993).
27. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B., v knize: *The Systematic Identification of Flavonoids* (Mabry A. Y., Markham K. R., Thomas M. B., ed.), kap. 5 a 6. Springer-Verlag, New York 1970.
28. Balogh M. P.: *LC-GC* 15, 456 (1997).
29. Wolfender J. L., Rodriguez S., Hostettmann K., Wagner-Redeker W.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* S35–S46 (1995).
30. He X-G., Lin L-Z., Lian L-Z.: *J. Chromatogr., A* 755, 127 (1996).
31. Stobiecki M., Malosse C., Kerhoas L., Wojtaszek P., Einhorn J.: *Phytochem. Anal.* 10, 198 (1999).
32. Summer L. W., Paiva N. L., Dixon R. A., Geno P. W.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 31, 472 (1996).
33. Barnes S., Coward L., Kirk M., Sfakianos J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217, 254 (1998).
34. Lin L-Z., He X-G., Lindenmaier M., Nolan G., Yang J., Cleary M., Qiu S-X., Cordell G. A.: *J. Chromatogr., A* 876, 87 (2000).
35. Lin L-Z., He X-G., Lindenmaier M., Yang J., Cleary M., Qiu S-X., Cordell G. A.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 354 (2000).
36. Satterfield M., Black D. M., Brodbelt J. S.: *J. Chromatogr., B* 759, 33 (2001).
37. Griffith A. P., Collison M. W.: *J. Chromatogr., A* 913, 397 (2001).
38. Wang J., Sporns P.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 5887 (2000).
39. Choi Y. S., Row K. H.: *J. Liq. Chromatogr.* 23, 1671 (2000).
40. de Rijke E., Zafra-Gómez A., Ariese F., Brinkman U. A. T., Gooijer C.: *J. Chromatogr., A* 932, 55 (2001).

**B. Klejdus, D. Štěrbová, P. Stratil, and V. Kubáň** (*Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Identification and Characterization of Isoflavones in Plant Material by HPLC-DAD-MS Tandem**

Advantages and disadvantages of combined extraction and separation techniques for isolation of secondary metabolites in plant materials are discussed. The number of identified substances in crude extracts is often reduced due to co-elution of two or more compounds. Purification procedures are necessary for more detailed studies due to interference of other substances. Solid-phase extraction (SPE) is the most useful extraction procedure. Its advantages in the purification, especially for more precise identification of isoflavones, are presented. Application of HPLC-DAD-MS tandem to identification and structure characterization of isoflavones in plant materials is described. The presence of six isoflavone glycoside acetates and of eight malonates in *Trifolium pratense* was confirmed by HPLC-MS. Biosynthesis of flavonoids is described. Combination of SPE and HPLC-DAD-MS techniques improves the procedures and allows more precise identification of secondary metabolites due to reduced interferences and co-elution of other compounds. Application of SPE leads to simpler chromatograms but the sensitivity is sacrificed.