

KANIEWSKA Joanna
Katedra Technologii i Aparatury Przemysłu Chemicznego i Spożywczego
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy

Przegląd metod oznaczania izoflawonów

Streszczenie

W pracy przedstawiono przegląd metod oznaczania izoflawonów. Izoflawony są związkami występującymi w roślinach. Stosowane metody oznaczania, jak chromatografia cieczowa, gazowa czy elektroforeza kapilarna mają swoje wady i zalety. Przedstawiono zastosowanie tych metod w badaniu żywności i płynach ustrojowych.

Słowa kluczowe: izoflawony, GC, HPLC, CE

Review of the methods used in determination of isoflavones

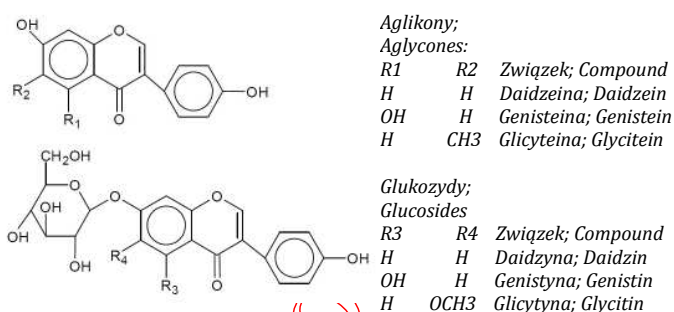
Summary

This paper presents an overview of determination methods of isoflavones. Isoflavones are compounds present in plants. Used techniques as liquid chromatography, gas chromatography and capillary electrophoresis have their advantages and disadvantages. The use of these methods in the study of food and fluids are presented.

Key words: isoflavones, GC, HPLC, CE

Wstęp

Izoflawony tworzą dużą grupę związków naturalnie obecnych w roślinach. Należą one do grupy fitoestrogenów, czyli związków, które w ludzkim organizmie działają podobnie jak estrogeny – hormony płciowe. Izoflawony występują w roślinach strączkowych – przede wszystkim soi, fasoli szparagowej, lucernie, spotykane są także w koniczynie czerwonej. Dostępne na rynku produkty sojowe, także zawierają sporą ich ilość – suplementy, dodatki do żywności, czy najbardziej popularne – mleko sojowe, tofu oraz sos sojowy. Najczęściej spotykane izoflawony to daidzeina, genisteina oraz glicyteina. Izoflawony występują głównie w postaci glikozydów. Struktury genisteiny i daidzeiny oraz ich glikozydów przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Struktury form aglikonowych i glikozydowych izoflawonów (Song i in. 1998)

Fig. 1. Structure of isoflavones aglycons and glucosides (Song et al. 1998)

Wpływ produktów sojowych na ludzkie zdrowie jest ogromny. Badania dowodzą, że dieta bogata w soję, może przyczynić się do zmniejszenia stopnia występowania hormonalnie zależnych i niezależnych nowotworów, w tym raka jelita grubego, raka piersi u kobiet i raka prostaty u mężczyzn (GolKhuo i in. 2008). Żywność sojowa obniża ryzyko zachorowania na choroby krążeniowo-naczyniowe.

Izoflawony ograniczają procesy utleniania LDL (tzn. dobrego cholesterolu), jak również są odpowiedzialne za obniżanie poziomu cholesterolu we krwi (Aramendia i in. 1995). Spożywanie produktów sojowych wpływa na ograniczenie utleniania DNA w limfocytach (Hurst 2003). Izoflawony mogą bezpośrednio spowalniać resorpcję kości (osteoporoza) (Tekeł i in. 1999b), wpływają na nawilżenie skóry, stymulując produkcję kwasu hialuronowego. Stwierdzono również ich działanie ochronne wobec promieniowania radioaktywnego, czy promieniowania UV (Vranova 2005). Ze względu na różnorodność działania izoflawonów na ludzki organizm i w związku z tym, różne szlaki metaboliczne, w których tworzą się dziesiątki pochodnych (Grynkiewicz i in. 2005). Taka mnogość pochodnych izoflawonów powoduje poszukiwanie metod analitycznych do badań tych związków w żywności i płynach ustrojowych.

Rozdzielanie, identyfikację oraz oznaczanie ilościowe izoflawonów można przeprowadzić z pomocą technik chromatograficznych – chromatografii gazowej (GC), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), czy elektroforezy kapilarnej (CE). Wybór techniki chromatograficznej zależy od czułości i rozdzielczości, jakie są wymagane, złożoności matrycy biologicznej, co przekłada się na czas przygotowania próbki oraz od kosztów. Ważna przy wyborze metody analizy jest forma izoflawonów – czy oznaczać je w formie związanej, czy wolnej. W produktach żywnościowych są one w większości glikozydami, wyjątek stanowi żywność sfermentowana, gdzie w przewadze występują aglikony izoflawonów (Wang i in. 2002). Płyny fizjologiczne i tkanki zawierają głównie β -glukuronidy albo wolne izoflawony.

Oznaczanie ilościowe pociąga za sobą konieczność użycia wzorca wewnętrznego w celu wyznaczenia odzysków. Wzorce te, mogą być izotopowymi formami izoflawonów lub substancjami o podobnej strukturze i właściwościach, ale nie występującymi w badanej próbce.

Chromatografia gazowa

Związki analizowane przy użyciu chromatografii gazowej (GC), muszą charakteryzować się odpornością termiczną i odpowiednią lotnością. Składniki trudnolotne i nielotne, również można analizować metodą GC. Jednak oznaczanie musi poprzedzić derywatyżacja, czyli przeprowadzenie związku nielotnego w bardziej lotny, w wyniku reakcji chemicznej. Chromatografia gazowa sprzężona z spektrometrią mas jest podstawową techniką w oznaczaniu fitoestrogenów od 20 lat, szczególnie przy małych stężeniach tych związków w płynach ustrojowych ludzi (Wang i in. 2002). Pomimo zapewnienia wysokiej rozdzielczości chromatograficznej jest metodą pracochłonną. Izoflawony zawierają przynajmniej jedną grupę hydroksylową w swojej strukturze, co powoduje trudność oznaczania ich metodą chromatografii gazowej sprzężonej z spektrometrią mas (GC-MS), bez wcześniejszej derywatyżacji. Często do two-

żenia pochodnych o większej lotności, bardziej termicznie stabilnych, tworzy się pochodne trimetylosilanu (TMS). Wymóg derywatyżacji badanych związków spowodował zmniejszenie zainteresowania tą techniką na rzecz chromatografii cieczowej. Obecnie publikowane prace dotyczą głównie chromatografii cieczowej (Machowski i in. 2010).

W literaturze, spotyka się oznaczanie izoflawonów obecnych w moczu przy użyciu chromatografu gazowego sprzężonego z spektrometrem mas. Izoflawony w ludzkim moczu występują głównie w formie związanej, jako glukuronidy. Przekształcenie do wolnych form, odbywa się dzięki hydrolizie enzymatycznej. Przed oznaczaniem izoflawony przeprowadza się w trimetylosilanowe pochodne. W tabeli 1 przedstawiono przykłady oznaczeń izoflawonów w próbkach żywności i płynach biologicznych, za pomocą chromatografii gazowej.

Tabela 1. Przykłady oznaczeń izoflawonów za pomocą chromatografii gazowej

Table 1. Examples of isoflavones determination using gas chromatography

Związek oznaczany; Analyzed compound	Próbka (matryca); Sample (matrix)	Metoda oznaczania; Detection method	Komentarz; Comment	Autor (źródło); Author (references)
daidzeina i genisteina	mocz, surowica krwi, tkanki	GC-MS	Porównanie poziomów izoflawonów u Brytyjczyków i Japończyków.	Pumford i in. (2002)
genisteina, daidzeina, biochanina A i formononetina (biochanina B)	mocz	GC-MS-SIM po uprzedniej hydrolizie enzymatycznej i derywatyżacji próbki trimetylosilanem (TMS)	Granica oznaczalności izoflawonów metodą opracowaną przez autorów wynosi 10 ppb.	Tekeł i in. (1999a)
daidzeina, equol, genisteina, bisfenol A	mocz	GC-MS po uprzednim oczyszczeniu próbki SPE (ekstrakcją do fazy ciekłej), hydrolizie i derywatyżacji TMS	Nieskomplikowane badanie i dokładność metody pozwala na stosowanie jej do oznaczania poziomów izoflawonów w próbkach biologicznych.	Moors i in. (2007)
biochanina A i formononetina (biochanina B)	mocz	GC-MS po uprzedniej derywatyżacji próbki TMS	Oznaczono nowe metabolity badanych izoflawonów.	Heinonen i in. (2004)
daidzeina, O-desmethylangolensin, equol, genisteina, glicyteina	mocz	GC-MS po derywatyżacji i SPE próbki	Metoda jest czuła i dokładna przy wielkości próbki 0,2 ml. Przygotowanie próbki jest proste i sprowadza się do derywatyżacji i oczyszczeniu SPE.	Grace i in. (2003)
8-prenylnaringenina	piwo	GC-MS	W 14 z 32 przebadanych piw, nie wykryto fitohormonu. Może mieć to związek z postacią chmielu używanego do produkcji piwa.	Tekeł i in. (1999b)
bisfenol A i fitoestrogeny	mleko w proszku dla niemowląt	GC-MS poprzedzone derywatyżacją próbki (BSTFA + TMCS + DTE)	Przedstawiona metoda pozwala na oznaczenie śladowych ilości bisfenolu A w mleku w proszku i modyfikowanym dla niemowląt.	Kuo, Ding (2004)

Chromatografia cieczowa

Chromatografia cieczowa znajduje większe zastosowanie do rozdzielania próbek, niż chromatografia gazowa. Analizowane próbki mogą zawierać trudnolotne związki, związki jonowe i związki o ciężarze cząsteczkowym większym niż 300. Współczesna chromatografia cieczowa to głównie wysokosprawną chromatografią cieczową HPLC. Rozdział przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej eliminuje potrzebę derywatyżacji izoflawonów i jest szeroko stosowany z detektorami UV i/lub fluorescencyjnym. W RP-HPLC, czyli chromatografii w odwróconym układzie faz, przy oznaczaniu izoflawonów, jako fazę ruchomą, stosuje się acetonitryl i/lub metanol, w różnych stosunkach

z wodą. Przy nieskomplikowanych próbkach, np. przy moczu, przygotowanie próbki może sprowadzać się do odfiltrowania. Przy próbkach, takich jak żywność, czy tkanki, trzeba zastosować ekstrakcję do cieczy, czy hydrolizę związanych form.

Izoflawony oraz ich metabolity zawierają przynajmniej jeden pierścień aromatyczny, a to oznacza, że absorbują promieniowanie UV przy maksymalnej długości fali 250 – 270 nm.

W tabeli 2 umieszczono przykłady oznaczeń izoflawonów w próbkach żywności i płynach biologicznych za pomocą chromatografii cieczowej.

Tabela 2. Przykłady oznaczeń izoflawonów za pomocą chromatografii cieczowej

Table 2. Examples of isoflavones determination using liquid chromatography

Związek oznaczany; Analyzed compound	Próbka (matryca); Sample (matrix)	Metoda oznaczenia; Detection method	Komentarz; Comment	Autor (źródło); Author (references)
daidzeina, genisteina i equol	osocze i mocz	HPLC-ECD (detektor wychwytu elektronów)	Oznaczanie izoflawonów w osoczu i moczu ochotników, będących na diecie bogatej w produkty sojowe.	King, Bursill (1998)
pueraryna, daidzeina, bajkalina, wogonozyd, likwirytyna	osocze szczura	UPLC-MS (ultrasprawną chromatografię cieczową sprzężoną z spektrometrią mas)	Metoda jest czuła do oznaczeń ilościowych pueraryny, daidzeiny, bajkalidy oraz wogonozydu w osoczu.	Wang i in. (2009)
daidzeina i genisteina	owoce mango trzech odmian	HPLC – UV-DAD (detektor z matrycą diod)	Porównywano metody ekstrakcji próbki. Najlepsze warunki jej przygotowania, to wytrząsanie w zakwaszonym etanolu w $T = 80^{\circ}\text{C}$ przez 90 minut.	Khoo, Ismail (2008)
daidzeina i genisteina	mleko sojowe	HPLC- UV-Vis	Przygotowanie próbki zajmuje ok. 2 godziny, a rozdzielanie maksymalnie 18 minut.	Golkhoo i in. (2008)
daidzyna, glicytyna, genistyna, ononina, daidzeina, glicyteina, beta-sitosterol, biochanina A i formononetina (biochanina B)	kotlety sojowe	HPLC-UV-DAD z wcześniejszą ekstrakcją próbki PLE i/lub Soxhlet	PLE/HPLC-UV-DAD okazała się metodą dokładną, szybką (ok. 8 minut) i czułą (1ppb).	Klejodus i in. (2005)
genistyna, genisteina, daidzeina, daidzyna, glicytyna, glicyteina	odtłuszczone dania sojowe, izolat białka sojowego	HPLC UV-DAD, wcześniejsza ekstrakcja 1-5 krotna lub sonifikacja	Pięciokrotna ekstrakcja może być zastąpiona sonifikacją.	Achouri i in. (2005)
daidzeina, genisteina	kiełbasa wieprzowo-wołowa, szynka wieprzowa, salami,	HPLC UV-DAD,	Próby odtłuszczone, poddano hydrolizie i poddano ekstrakcji SPE. Oznaczenie (rozdział) nastąpiło po 15 minutach. Oznaczenie można prowadzić w zakresie 0,1 – 10% w obecności dodatków soi w mięsie.	Vranova (2005)
daidzeina, genisteina	mleko sojowe, sojowa żywność dla dzieci, suplementy sojowe	HPLC-CEAD (detektor kulometryczny)	HPLC-CEAD jest wiarygodną metodą do oznaczania izoflawonów w mleku sojowym, żywności dla dzieci i suplementach.	Müllner, Sontag (2000)
daidzyna, glicytyna, genistyna,	suplementy sojowe	HPLC-PDA (detektor z matrycą diodową)	Praca podkreśla konieczność podawania przez producentów składu izoflawonów na etykietach suplementów.	Stürtz i in. (2008)
daidzyna, daidzeina, glicytyna, glyteina, genistyna, genisteina	mąka sojowa, izolat białka sojowego, tofu, melasa sojowa, mleko sojowe	HPLC-MS	W mleku sojowym, tofu i melasie sojowej, ze względu na technologiczną obróbkę w $T > 100^{\circ}\text{C}$, znajduje się więcej form glukozydowych.	Barnes i in. (1994)
daidzeina, genisteina, biochanina A i formononetina (biochanina B)	koniczyna łąkowa	HPLC poprzedzona SPE (ekstrakcją do fazy stałej)	Opisana metoda charakteryzuje się łatwością i prostotą procedury oraz relatywnie niskim kosztem reagentów i użytego sprzętu.	Klejodus i in. (1999)

Elektroforeza kapilarna

Elektroforeza kapilarna (CE) jest stosunkowo nową techniką separacyjną, w porównaniu z chromatografią gazową, czy cieczową. Ma ona zastosowanie do oznaczania substancji polarnych jonowych i niejonowych oraz niepolarnych niejonowych (Cieślak i in. 2008). Ta technika w analizie związków roślinnych może być dużo lepszym rozwiązaniem, niż wysokosprawną chromatografię cieczową (Machowski i in. 2010). Rozdzielanie za pomocą CE zachodzi dzięki różnicy ruchliwości elektroforetycznej ładunków w polu elektrycznym w kapilarze wypełnionej buforem. Przy końcu kapilara ma „okienko”, czyli odkrytą część, bez

warstwy zabezpieczającej. Jest ono umieszczone w celce pomiarowej detektora. Zastosowanie w metodzie CE detektorów spektrofotometrycznych, powoduje uzyskanie mniejszej czułości detekcji, niż w przypadku HPLC. Spowodowane jest to, krótką drogą optyczną wynikającą z małej średnicy kapilary (Machowski i in. 2010). O wiele większą czułość uzyskuje się w wyniku detekcji elektrochemicznej. Techniki elektroforetyczne cechują się bardzo dobrą sprawnością, krótkim czasem analizy, małymi objętościami próbki i odczynników, dobrą selektywnością, dużą czułością i niską granicą oznaczalności. Przykłady wykorzystania elektroforezy kapilarnej do oznaczeń izoflawonów zebrano w tabeli 3.

Tabela 3. Przykłady oznaczeń izoflawonów za pomocą elektroforezy kapilarnej
Table 3. Examples of isoflavones determination using capillary electrophoresis

Związek oznaczany; Analyzed compound	Próbka (matryca); Sample (matrix)	Metoda oznaczania; Detection method	Komentarz; Comment	Autor (źródło); Author (references)
daidzeina, formononetyna (biochanina B), prunetyna, biochanina A, glukozyd biochaniny A, genisteina, izolikwirytygenina	roztwory standardowe	CE-UV-ESI-MS (elektroforeza kapilarna z detektorem UV sprzężona z spektrometrią mas z elektrorozplaniem)	CE-ESI-MS pozwala na wydajny rozdział i identyfikację izoflawonów z większą dokładnością, niż sama elektroforeza kapilarna z detektorem UV. Rozdział następuje w czasie 17 minut.	Aramedia i in. (1995)
genistyna, daidzyna, glicytyna, ich malonylowe pochodne, genisteina, daidzeina	mąka sojowa	CZE (strefowa elektroforeza kapilarna)	Rozdział z użyciem CZE trwał 17 minut.	Aussenac i in. (1998)
daidzeina, genisteina	mleko sojowe w proszku, mąka sojowa	CE-ED (detektor elektrochemiczny)	Metoda oznaczania CE-ED jest szybka, prosta, niezawodna i przydatna do oznaczania zawartości izoflawonów w żywności.	Peng i in. (2004)
genisteina, daidzeina, biochanina A	koniczyna łąkowa	CE-ED	Przydatna metoda do oznaczania zawartości izoflawonów	Peng, Ye (2006)

Podsumowanie

Istnieje wiele metod używanych w analizowaniu izoflawonów. Większość z nich jest czuła w zakresie kilku nmol·l⁻¹. Do oznaczania izoflawonów w próbkach biologicznych, albo żywności, obecnie najczęściej stosuje się metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Przy tej metodzie przygotowanie próbki nie pociąga za sobą derywatywacji, często nawet nie trzeba prowadzić hydrolizy glikozydów i aglikonów. Gdy stężenia izoflawonów są większe niż, 50 ppm, dobrze sprawdza się HPLC z detektorem promieniowania UV DAD. Samo oznaczanie nie jest czasochłonne, jednak wraz ze skomplikowaniem matrycy, wydłuża się czas przygotowania i oczyszczenia próbek.

Połączenie ze spektrometrią mas jest używane w przypadkach, gdy nieznane jest stężenie izoflawonów w analizie. Analiza za pomocą chromatografu gazowego, połączonego ze spektrometrem mas, pociąga za sobą długi i pracochłonny etap przygotowywania próbek. Jednak, metoda GC-MS daje wysoką czułość, a przy użyciu rozcieńczeń izotopowych, również wysoką precyzję. Chromatografia cieczowa, sprzężona ze spektrometrią mas, nie wymaga dużo pracy przy przygotowywaniu próbek i pozwala na oznaczanie, zarówno izoflawonów, ich metabolitów, jak i form związanych.

Połączenie spektrometrii mas z elektroforezą kapilarną, okazało się świetną metodą do identyfikacji związków z możliwością podania informacji o ich strukturze. W przypadku tej techniki, mamy do czynienia, ze stosunkowo małymi przepływaniami (mniejsze niż 1 μm·min⁻¹), niż w przypadku konwencjonalnego HPLC (przepływy 1 μm·min⁻¹). Elektroforeza kapilarna jest bardzo dobrą techniką separacyjną. Użycie kapilar zapewnia szybką i wysokiej rozdzielczości separację składników próbek o małej objętości. Do oznaczania izoflawonów szczególnie przydatna jest elektroforeza kapilarna z detektorem elektrochemicznym (amperometrycznym).

Bibliografia

1. Achouri A., Boye J.I., Belanger D. 2005. *Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of*

food type on extractability. Food Research International, 38, 1199–1204

2. Aramedia M.A., Garcia I., Lafont F., Marinas J.M. 1995. *Determination of isoflavones using capillary electrophoresis in combination with electrospray mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 707, 327–333.

3. Aussenac T., Lacombe S., Dayde J. 1998. *Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment*. American Journal of Clinical Nutrition, 68 (suppl), 1480S–1485S.

4. Barnes S., Kirk M., Cowardt L. 1994. *Isoflavones and Their Conjugates in Soy Foods: Extraction Conditions and Analysis by HPLC–Mass Spectrometry*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 42, 2466–2474.

5. Cieślak E., Niedośla A., Mickowska B. 2008. *Wykorzystanie elektroforezy kapilarnej w analizie żywności*. Żywność, Nauka. Technologia. Jakość, 2 (57), 5–14.

6. GolKhoo S., Ahmadi A.R., Hanachi P., Barantalab F., Vaziri M. 2008. *Determination of daidzein and genistein in soy milk in Iran by using HPLC analysis method*. Pakistan Journal of Biological Sciences 11 (18), 2254–2258.

7. Grace P.B., Taylor J.I., Botting N.P., Fryatt T., Oldfield M.F., Bingham S.A. 2003. *Quantification of isoflavones and lignans in urine using gas chromatography/mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 315 (1), 114–121.

8. Gryniewicz G., Ksycińska H., Ramza J., Zgrodzka J. 2005. *Chromatographic quantification of isoflavones (why and how)*. Acta Chromatographica, 15, 31–65.

9. Heinonen S.M., Wähälä K., Adlercreutz H. 2004. *Identification of urinary metabolites of the red clover isoflavones formononetin and biochanin A in human subjects*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (22), 6802–6809.

10. Hurst W.J. 2002. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*, CRC Press. 978–0–8493–7314–5.

11. Khoo H.E., Ismail A. 2008. *Determination of Daidzein and Genistein Contents in Mangifera Fruit*. Malaysian Journal of Nutrition 14(2), 189–198.

12. King R.A., Bursill D.B. 1998. *Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans*. The American Journal of Clinical Nutrition, 67, 867–872.

13. Klejdus B, Mikelová R, Petrlová J, Potesil D, Adam V, Stiborová M, Hodek P, Vacek J, Kizek R, Kubán V. 2005. *Determination of isoflavones in soy bits by fast column high-performance liquid chromatography coupled with UV-visible diode-array detection*. Journal of Chromatography A, 1084, 71-79.
14. Klejdus B., Vitamvasova D., Kuban V. 1999. *Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction*. Journal of Chromatography A, 839(1-2), 261-263.
15. Kuo H.W., Ding W.H. 2004. *Trace determination of bisphenol A and phyto-estrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1027 (1-2), 67-74.
16. Machowski M., Kaliszewska D., Kiss A. 2010. *Chromatograficzne metody izolacji i identyfikacji flawonoidów i saponin*. Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 4, 27-37.
17. Moors S., Blaszkewicz M., Bolt H.M., Degen G.H. 2007. *Simultaneous determination of daidzein, equol, genistein and bisphenol A in human urine by a fast and simple method using SPE and GC-MS*. Molecular Nutrition & Food Research, 51(7), 787-798.
18. Müllner C., Sontag G. 2000. *HPLC with coulometric electrode array detection. Determination of daidzein and genistein in soy based infant food, soy milk and soy based supplements*. European Food Research and Technology 211, 301-304.
19. Peng Y., Chu Q., Liu F., Ye J. 2004. *Determination of isoflavones in soy products by capillary electrophoresis with electrochemical detection*. Food Chemistry 87, 135-139.
20. Peng Y., Ye J. 2006. *Determination of isoflavones in red clover by capillary electrophoresis with electrochemical detection*. Fitoterapia, 77(3), 171-178.
21. Pumford S.L., Morton M.M., Turkes A., Griffiths K. 2002. *Determination of the isoflavonoids genistein and daidzein in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry*. Annals of Clinical Biochemistry, 39 (Pt 3), 281-292.
22. Song T., Barua K., Buseman G., Murphy P.A. 1998. *Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard*. American Journal of Clinical Nutrition, 68 (suppl), 1474S-1479S.
23. Stürtz M., Lander V., Schmid W., Winterhalter P. 2008. *Quantitative Determination of Isoflavones in Soy Based Nutritional Supplements by High-Performance Liquid Chromatography* Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 3, 2, 127-136.
24. Tekeł J., Daeseleire E., Heeremans A., van Peteghem C. 1999a. *Development of a simple method for determination of genistein, daidzein, biochanin A, formononetin (biochanin B) in human urine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3489-3494.
25. Tekeł J., De Keuleleire D., Rong H., Daeseleire E., Van Peteghem C. 1999b. *Determination of the hop-derived phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, in beer by gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 47: 5059-5063.
26. Vranova D. 2005. *Quantification of soy isoflavones in meat products by HPLC*. Scripta Medica (Brno) - 78 (4), 235-242.
27. Wang Ch., Prasain J.K., Barnes S. 2002. *Review of the methods used in the determination of phytoestrogens*. Journal of Chromatography B, 777, 3-28.
28. Wang Y., Yao Y., An R., You L., Wang X. 2009. *Simultaneous determination of puerarin, daidzein, baicalin, wogonoside and liquiritin of GegenQinlian decoction in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical Life Science, 877(20-21), 1820-1826.

Joanna Kaniewska

Katedra Technologii i Aparatury Przemysłu Chemicznego i Spożywczego
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy
ul. Seminaryjna 3 85-326 Bydgoszcz

pobrano z www.ips.wm.tu.koszalin.pl