

Märehtijöiden rehujen isoflavonit ja niiden pitoisuudet plasmassa



ELK Marika Karjalainen

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

Helsingin Yliopisto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos

29.7.2008



Tiedekunta- Fakultet – Faculty		Laitos - Institution – Department	
Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos	
Tekijä - Författare – Author			
ELK Marika Karjalainen			
Työn nimi - Arbetets titel – Title			
Märehtijöiden rehujen isoflavonit ja niiden pitoisuudet plasmassa			
Oppiaine - Läroämne – Subject			
Eläinlääketiede			
Työn laji - Arbetets art – Level		Aika - Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages
Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma		29.7.2008	48 sivua
Tiivistelmä - Referat – Abstract			
<p>Tämä syventävienopinnoton projekti on tehty osana maa- ja metsätaloustieteellisen tiedekunnan kotieläintieteen laitoksen lypsylehmien puna-apilaruokintatutkimusprojektia. Työ jakautuu kirjallisuuskatsaukseen ja kokeelliseen osaan. Kirjallisuuskatsauksessa kootaan ja vertaillaan märehtijöiden rehukasveista mitattuja kasviestrogeenipitoisuuksia, sekä selvitetään erilaisten ympäristötekijöiden vaikutusta kasviestrogeenien (KE) pitoisuuksiin. Kokeellisessa osuudessa tutkittiin valkuaislisän määrän ja laadun vaikutusta plasman isoflavonipitoisuuksiin. Tavoitteena oli selvittää aiheuttaako eri valkuaisäydennys merkittävää eroa lehmien plasman isoflavonipitoisuuksissa. Tutkimushypoteesina oli, että valkuaisiivisteiden määrän ja laadun vaihtelut vaikuttavat plasman isoflavonipitoisuuksiin. Puna-apilasäilörehun ja valkuaisiivisteiden sisältämien kasviestrogeenien sekä koe-lehmien plasman KE-pitoisuus mitattiin nestekromatografisesti (HPLC = High-Performance Liquid Chromatography). Koe-eläiminä oli 6 Viikin koe-tilan ayrshire lehmää.</p> <p>Kasviestrogeenit (KE) ovat kasveissa esiintyviä väriaineita, jotka kuuluvat isoflavoni- ja kumariiniryhmiin. Nimensä mukaisesti kasviestrogeeneillä voi olla elimistössä luontaisen estradiolin kaltaisia vaikutuksia, minkä vuoksi niiden liiallinen saanti voi aiheuttaa erilaisia lisääntymishäiriöitä. Tunnetuimpia kasviestrogeeneja ovat isoflavoneihin kuuluvat genisteiini, biokaniini A, formononetiini ja daitseiini sekä kumariiniaineisiin kuuluva kumesteroli. Kasviestrogeenien todellinen estrogeeninen teho vaihtelee näiden aineiden rakenteen, metabolian ja toisaalta eläinlajin mukaan. Märehtijöistä lampaat ovat huomattavasti nautoja herkempiä kasviestrogeenien lisääntymishäiriöitä aiheuttaville vaikutuksille. Koska kasviestrogeenien aiheuttamia lisääntymishäiriöitä on raportoitu myös Suomessa ja muualla Pohjoismaissa, halusimme selvittää Suomen oloissa käytettävien rehukasvien kasviestrogeenipitoisuuksia ja siihen vaikuttavia tekijöitä, sekä tutkia kasviestrogeenien imeytymistä lehmien plasman isoflavonipitoisuuksien avulla.</p> <p>Suomalaisista rehukasveista puna-apila sisältää eniten kasviestrogeeneja. Puna-apilan isoflavonipitoisuus vaihteli eri tutkimuksissa välillä 0,15-2,5% kuiva-aineesta ja formononetiini-pitoisuus välillä 0,22-0,8% kuiva-aineesta. Muista laidun- ja nurmikasveista mm. koiranheinä, sinimailanen ja nurminata voivat sisältää pienempiä määriä estrogeenisesti vaikuttavia aineita. Muista Suomessa käytössä olevista rehukasveista isoflavoneja sisältävät soija ja valko-apila. Timotei, vuohenherne ja rypsi ovat kasvilajeja, joissa estrogeenisesti vaikuttavia aineita ei juuri ole.</p> <p>Kasvilajin lisäksi myös kasvilajike ja viljelyolosuhteet, kuten sää ja muut abioottiset tekijät vaikuttavat rehun isoflavonipitoisuuksiin ja koostumukseen. Mm. kylmien öiden tiedetään nostavan kasvien isoflavonipitoisuutta. Isoflavonipitoisuudet vaihtelevat myös kasvien kasvuvaiheen ja kasvin osan mukaan. Isoflavonipitoisuudet ovat esim. puna-apilassa korkeimmillaan kevään nuorena kasvustossa ja syksyn odelmikossa. Eniten kasviestrogeeneja on keskimäärin puna-apilan lehdissä, kun taas soijassa suurimmat pitoisuudet ovat itse pavussa. Rehukasvien isoflavonipitoisuutta voidaan myös muokata erilaisilla säilöntämenetelmillä. Kuivauksen tiedetään pienentävän rehun isoflavonipitoisuutta jopa 75%, kun taas säilöntäaineista riippuen säilörehun isoflavonipitoisuus voi jopa suurentua tuorerehuun verrattuna.</p> <p>Tässä tutkimuksessa lehmien merkittävin ravinnon kasviestrogeenilähde oli säilörehun sisältämä formononetiini (0,44% kuiva-aineesta). Myös säilörehun biokaniini A:n pitoisuus oli huomattava (0,31% kuiva-aineesta). Biokaniini A:n esiintyminen rehussa näyttäisi kuitenkin olevan merkityksetön sen pötsimetabolian vuoksi. Tätä tukee myös koelehmien plasman biokaniini A:n pitoisuus 0 µg/ml. Rehun formononetiini sen sijaan metaboloituu märehtijöiden elimistössä pääasiassa tehokkaaksi equoliksi ja osittain O-DMA:ksi (= O-desmetyyliangolensiini). Puna-apilan suuri formononetiini-pitoisuus näkyikin lehmien plasmanäytteissä suurena equolipitoisuutena. Koe-lehmien plasman equolin pitoisuus vaihteli välillä 7-7,9, O-DMA:n välillä 0,1-0,9 ja formononetiinin välillä 0,01-0,04 µg/ml. Puna-apilasäilörehun kokonaisisoflavonipitoisuus vaihteli tutkimuksessamme välillä 0,73-0,91% kuiva-aineesta. Sekä rehujen että plasman pitoisuudet ovat samaa suuruusluokkaa kirjallisuudessa esiintyvien vastaavien tutkimustulosten kanssa.</p> <p>Tämän tutkimuksen perusteella valkuaisiivisteiden kasviestrogeenipitoisuudet olivat pieniä, eikä valkuaisrehuruokinnan laadun tai määrän vaihtelut aiheuttaneet tilastollisesti merkittävää eroa lypsylehmien plasman isoflavonipitoisuuksissa. Syynä tähän on todennäköisesti ruokintakokeessa lehmille syötetyn puna-apilasäilörehun moninkertainen isoflavonipitoisuus valkuaisiivisteisiin nähden.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Märehtijä, kasviestrogeeni, isoflavoni, equoli, formononetiini, daitseiini, biokaniini A ja genisteiini, puna-apila			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitoksen kirjasto, Saari / Mäntsälä			
Työn valvoja (professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s)			
Työn valvoja: ELT Hannu Saloniemi Työn ohjaajat: ELL Eeva Mustonen ja ELT Juhani Taponen			



HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	1
2 TYÖN TARKOITUS.....	2
3 KASVIESTROGEEENIT.....	3
4 LUONTAISEN 17 β -ESTRADIOLIN VAIKUTUS ELIMISTÖSSÄ.....	4
5 KASVIESTROGEEENIEN PITOISUUKSIA SUOMALAISISSA REHUKASVEISSA.....	5
5.1 Apilat (<i>Trifolium</i> -suku).....	5
5.2 Soija.....	7
5.3 Muut rehukasvit.....	7
6 KASVIESTROGEEENIPITOISUUKSIIN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT.....	8
6.1 Kasvilaji ja -lajike.....	8
6.2 Ilmasto ja muut abioottiset tekijät.....	9
6.3 Kasvin osa ja kasvuvaihe.....	10
6.4 Säilöntä.....	12
6.5 Yhteenveto KE-pitoisuuksiin vaikuttavista tekijöistä.....	13
7 KASVIESTROGEEENIEN VAIKUTUKSET MÄREHTIJÖILLÄ.....	14
7.1 Kasviestrogeenien metabolia märehitijöillä.....	14
7.2 Kasviestrogeenien vaikutukset lampailla.....	16
7.3 Kasviestrogeenien vaikutukset naudoilla.....	17
7.4 Yhteenveto kasviestrogeenien vaikutuksista märehitijöillä.....	19
KOKEELLINEN OSA	
8 AIKATAULU.....	20
9 MATERIAALI.....	20
9.1 Koe-eläimet.....	20
9.2 Rehut.....	20
10 MENETELMÄT.....	21
10.1 Ruokinta.....	21
10.2 Verinäytteet.....	22
10.3 Kasviestrogeenien rehuanalyysit.....	23
10.4 Tilastollinen analyysi.....	24
11 TULOKSET.....	24
11.1 Puna-apilasäilörehun kasviestrogeenipitoisuudet.....	24
11.2 Soija- ja rypsiivistein kasviestrogeenipitoisuudet.....	25
11.3 Plasman kasviestrogeenipitoisuudet.....	26
12 TULOSTEN POHDINTA.....	29
13 YHTEENVETO.....	31
14 KIRJALLISUUSLUETTELO.....	34
LIITE 1.....	39
LIITE 2.....	43
LIITE 3.....	46
LIITE 4.....	48

1 JOHDANTO

Jo 1940-luvulla herättiin ensimmäistä kertaa pohtimaan kasviestrogeenien mahdollisia haittavaikutuksia Australiassa esiintyneen lampaiden steriliteetti ongelman myötä. Lampailla todettiin tavallista enemmän lisääntymishäiriöitä, kuten dystokiaa ja kohtuprolapseja. Lampaiden hedelmällisyys laski merkittävästi niiden laidunnettua maa-apilaa (*Trifolium subterraneum*) sisältävällä laitumella ja ilmiötä alettiin kutsua ”lampaiden apilasairaudeksi” (Bennetts ym. 1946). Useissa tutkimuksissa on tämän jälkeen osoitettu rehun sisältämien kasviestrogeenien aiheuttavan lisääntymishäiriöitä niin lampailla kuin naudoillakin (Thain 1965, Kallela 1968, Kelly ym. 1980, Kallela ym. 1984, Adams 1990, Nwannenna ym. 1994 & 1995 ja Sarelli ym. 2001)

Kasviestrogeenit ovat kasveissa esiintyviä väriaineita ja niitä tavataan hyvin erilaisissa rehukasveissa, mutta erityisesti niitä on todettu hernekasvien heimon lajeissa (Kallela 1962a). Suomessa hernekasveja ja etenkin puna-apilaa (*Trifolium pratense*) hyödynnetään maaperän typen sidontaan. Näin voidaan luontaisella tavalla korvata osa typpilannoituksesta. Merkittävin kasviestrogeenilähde märehäijöillä Suomessa onkin puna-apila (Kallela 1964, Petterson ym., 1984, Saloniemi ym. 1995 ja Sarelli ym. 2003).

Kasviestrogeeneilla on myös hyödyllisiä vaikutuksia. Steroidihormonien tapaan estrogeenit ja myös kasviestrogeenit ovat anabolisia eli kasvua lisääviä hormoneja. Esim. Moorby ryhmiseen (2004) havaitsi paljon kasviestrogeeneja sisältäneellä puna-apila –laitumella kasvaneiden lampaiden kasvavan nopeammin (40g/pv) kontrolliryhmiin verrattuna. Todennäköisesti onkin kyse tasapainosta, jossa sopiva määrä kasviestrogeeneja saa aikaan positiivisen vaikutuksen, kun taas liialliset pitoisuudet aikaansaavat mm.

hedelmällisyshäiriöitä. Sopivan annostason löytäminen voi olla vaikeampaa. Eläinten herkkyys kasviestrogeeneille vaihtelee selvästi eläinlajin, rodun ja jopa yksilöiden välillä. Esim. märehäijöistä lampaiden on todettu olevan lehmiä herkempiä kasviestrogeenien negatiivisille vaikutuksille (Kallela 1964, Lundh 1990, Adams 1995 ja McDonald 1995).

Kasviestrogeenien vaikutuksia on tutkittu paljon myös ihmisillä (Wiseman ym. 2000, Atkinson ym. 2004, Zhuo ym. 2004, McVeigh ym. 2006, Ma ym. 2008 ja Song ym. 2008). Suurimpana kiinnostuksen kohteena on ollut kasviestrogeenien hyödyntäminen vaihdevuosisien aikaansaamien haitallisten muutosten, kuten osteoporoosin hidastamisessa. Useissa tutkimuksissa on todettu soijan isoflavonien hidastavan luun resorptiota ja lisäävän luiden mineralisaatiota (Atkinson ym. 2004, Ma ym. 2008 ja Song ym. 2008). Soijan isoflavonien on todettu toimivan myös antioksidantteina mm. vähentämällä lipidien peroksidaatiota (Wiseman ym. 2000, Zhuo ym. 2004, McVeigh ym. 2006 ja Barbosa ym. 2006) ja siten vähentävän mm. ateroskleroosin ja muiden sydän- ja verisuonitautien sekä syövän riskiä.

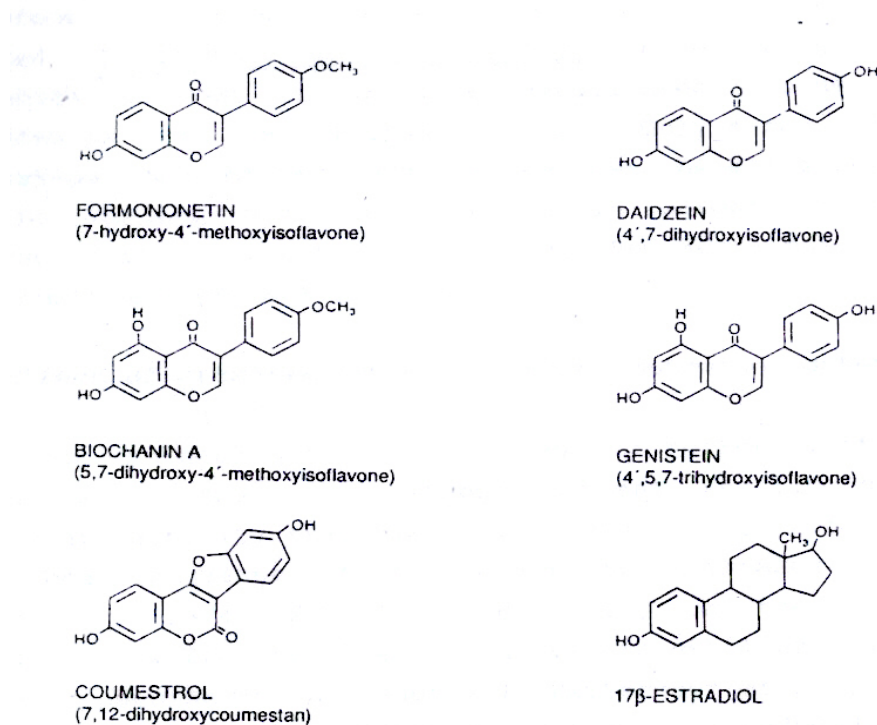
2 TYÖN TARKOITUS

Tämä eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma on osa maa- ja metsätaloustieteellisen tiedekunnan kotieläintieteen laitoksen lypsylehmien puna-apilaruokintatutkimusprojektia. Tässä ruokintakokeessa selvitettiin sisäruokintakaudella 2005-2006 puna-apilasäilörehun valkuaisäydennyksen vaikutuksia lypsylehmien rehun syöntiin, maidontuotantoon ja maidon koostumukseen. Tavoitteena oli saada lisätietoa valkuaislisän tuotosvasteesta apilaruokinnalla. Ruokintakokeen kasviestrogeeneja (=isoflavoneja) käsittelevässä osuudessa vastaavasti selvitettiin valkuaislisän määrän ja laadun vaikutuksia plasman isoflavonipitoisuuksiin.

Tämä syventävien opintojen työ jakautuu kirjallisuuskatsaukseen ja kokeelliseen osaan. Kirjallisuuskatsauksen tavoitteena on koota ja vertailla märehitijöiden rehukasvien mitattuja kasviestrogeenipitoisuuksia, sekä selvittää erilaisten ympäristötekijöiden vaikutusta kasviestrogeenien pitoisuuksiin. Kokeellisen osan tarkoituksena on verrata kasviestrogeenien pitoisuutta rehussa (puna-apila, soijapuriste ja rypsipuriste) ja rehua syöneen lypsylehmän plasmassa. Tutkimushypoteesina oli, että valkuaisliivisteiden määrän ja laadun vaihtelut vaikuttavat lypsylehmien plasman isoflavonipitoisuuksiin.

3 KASVIESTROGEENIT

Kasviestrogeenit (KE) ovat kasveissa esiintyviä väriaineita, jotka kuuluvat isoflavoni- ja kumariiniryhmiin. Tunnetuimpia kasviestrogeeneja ovat isoflavoneihin kuuluvat genisteiini, biokaniini A, formononetiini ja daitseiini sekä kumariiniaineisiin kuuluva kumesteroli. Kasviestrogeenit ovat aineita, joilla on luonnollisen estrogeenihormonin kaltaisia vaikutuksia elimistössä. Erilaiset estrogeenisesti vaikuttavat aineet eivät välttämättä rakenteeltaan muistuta täysin luonnollista 17 β -estradiolia, mutta ne pystyvät joko suoraan tai metaboliittiansa kautta vaikuttamaan estrogeenisesti mm. sitoutumalla estrogeenireseptoreihin (Morito ym. 2001 ja Muthyala ym. 2004).



Kuva 1. Estradiolin ja yleisimpien isoflavonien rakennekaavat (Lundh 1990).

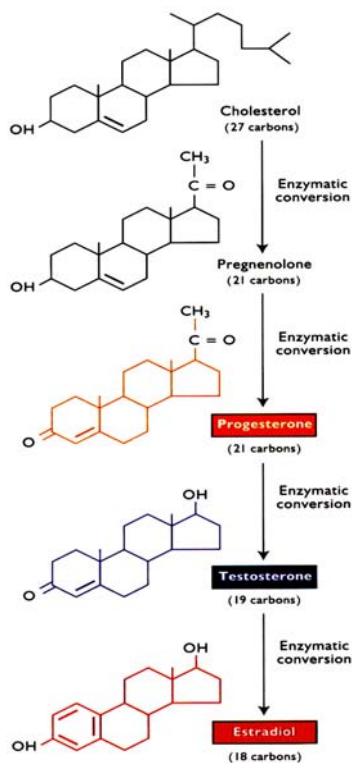
Kasviestrogeenien todellinen estrogeeninen teho vaihtelee näiden väriaineiden rakenteen, metabolian ja toisaalta eläinlajin mukaan.

Suomalaisista rehuksveista puna-apila sisältää eniten kasviestrogeeneja. Muista laidun- ja nurmikasveista mm. koiranheinä (*Dactylis glomerata*),

sinimailanen (*Medicago sativa*) ja nurminata (*Festuca pratensis*) voivat sisältää estrogeenisesti vaikuttavia aineita (Kallela 1964). Timotei (*Phleum pratense*) on kasvilaji, jossa estrogeenisesti vaikuttavia aineita ei juuri ole. (Kallela 1974). Myös Saloniemen (ym. 1995) tutkimuksessa puna-apila sisälsi selvästi eniten kasviestrogeeneja. Isoflavoneja sisälsivät lisäksi valko-apila (*Trifolium repens*) ja sinimailanen. Vuohenherneessä (*Galega orientalis*) ei ollut lainkaan tunnettuja isoflavoneja.

4 LUONTAISEN 17 β -ESTRADIOLIN VAIKUTUS ELIMISTÖSSÄ

Estradioli on kolesterolista progesteronin ja testosteronin kautta muodostuva steroidihormoni (kuva 2.). Estradiolia tuotetaan mm. naaraan munasarjoissa follikkelien granuloos soluissa ja istukassa sekä uroksilla kivesten sertolinsoluissa. Myös lisämunuaiset ja rasvakudos tuottavat vähäisiä määriä estrogeenejä. Steroidihormonit läpäisevät rasvaliukoisuutensa vuoksi solukalvon ja vaikuttavat tumassa sijaitsevien reseptorien kautta solun proteiinisynteesin säätelyyn. (Senger, 2003).



Kuva 2. Estradiolin synteesi (Senger 2003).

Estradioli vaikuttaa hypotalamuksen kautta GnRH:n tuotantoon ja säätelee siten aivolisäkkeen FSH:n ja LH:n tuotantoa. Naaraalla estradioli vaikuttaa kokonaisvaltaisesti koko lisääntymiselimistöön maitorauhasia myöden. Estradiolin vaikutukset näkyvät uroksilla ja naarailla pääasiassa keskushermoston kautta lisääntyneenä seksuaalisena aktiivisuutena. Naarailla estradioli lisää myös kohdun motiliteettia ja genitaalisen sekreetiota. Naarailla estradiolin ovulaatioon johtava positiivinen vaikutus GnRH:n tuotantoon välittyy hypotalamuksen aaltoja tuottavan keskuksen kautta, kun taas negatiivinen FSH:n ja LH:n erittymisen palautevaikutus välittyy toonisen keskuksen kautta. (Senger 2003).

Estradiolilla on myös kasvua lisäävä anabolinen vaikutus. Estradioli lisääkin märehäijöillä eläinten kasvua, utarekudoksen kasvua sekä mahdollisesti myös maidontuotantoa (Kallela 1962b).

Steroidihormonit metaboloidaan maksassa glukuronideiksi ja sulfaateiksi ja eritetään munuaisten tai sapen kautta virtsan ja / tai ulosteen mukana (Senger 2003).

5 KASVIESTROGEENIEN PITOISUUKSIA SUOMALAISISSA REHUKASVEISSA

5.1 Apilat (*Trifolium* –suku)

Ylivoimaisesti eniten kasvi-estrogenien pitoisuuksia on tutkittu Suomessa ja maailmalla apilan (*Trifolium*) sukuisista kasveista ja etenkin puna-apilasta. Wong huomasi jo 1962 tekemässään tutkimuksessa puna-apilan pääasiallisten kasviestrogenien olevan formononetiini ja biokaniini A. Saman ovat todenneet monet tutkijat myös sen jälkeen (Kallela 1962b, Saloniemi ym. 1995, Sivensindin ym. 2005, Tsaon ym., 2006 ja Swinny ym. 2005).

Puna-apilan isoflavoni-pitoisuudet vaihtelivat Petterssonin ym. (1984) tutkimuksessa välillä 0,5-2,5% ja Saloniemen ryhmän tutkimuksessa (1995) välillä 1,0-2,5% kuiva-aineesta. Sivesindin ja Seguinin (2005) tutkimuksessa puna-apilan isoflavonipitoisuus oli hieman pienempi vaihdellen välillä 0,15-1,65% kuiva-aineesta lajikkeesta, viljelypaikasta ja sadonkorjuuajasta riippuen. Kallelan ryhmän (1987) tutkimuksessa puna-apilan kasviestrogeenipitoisuudet vaihtelivat kasvuvaiheen mukaan välillä 1-1,9% kuiva-aineesta.

Sarelli ryhmineen totesi (2003) kasviestrogeeni-pitoisuuden laskevan puna-apilan siirtyessä nappuvaiheesta kukintavaiheeseen pitoisuuden vaihdeltaessa välillä 0,8-1,1% kuiva-aineesta. Sivesind ym. (2005) totesi tutkimuksessaan kukinnan isoflavonipitoisuuden olevan nappuvaiheessa samaa luokkaa kuin lehdissä, mutta putoavan nopeasti kukinnan edettyä jopa 11 kertaa lehtiä alemmalle tasolle. Mustosen ryhmineen (2006) 2003-2004 kasvukausilla tekemässä tutkimuksessa kasviestrogeenien määrä vaihteli eri puna-apilalajikkeiden välillä 1,1-1,4% ja formononetiinin 0,6-0,8% kuiva-aineesta lajikkeesta riippuen. Kallela tutki 1980 eritavoin säilöttyä puna-apila -nurmi – säilörehua (50%-50%). Tutkimuksessa rehun isoflavonipitoisuus vaihteli säilytysajan ja säilöntätavan mukaan välillä 0,33-0,9% kuiva-aineesta ja formononetiinin pitoisuus välillä 0,22-0,45% kuiva-aineesta.

Puna-apilan isoflavonipitoisuus vaihteli eri tutkimuksissa kaiken kaikkiaan välillä 0,15-2,5% kuiva-aineesta ja formononetiinin pitoisuus välillä 0,22-0,8% kuiva-aineesta.

Puna-apilan lisäksi maa-apilan on huomattu sisältävän merkittäviä määriä kasviestrogeeneja. Maa-apilaa viljellään erityisesti Uudessa-Seelannissa ja Australiassa lampaiden ja lehmien laitumilla (McDonald, 1995). Adamsin (1995) mukaan maa-apila saattaa sisältää isoflavoneja jopa 5% kuiva-aineesta. Pääosa isoflavoneista on formononetiiniä, genisteiiniä ja biokaniini A:ta (Beck, 1964, Braden ym. 1971 ja Adams 1995). Beckin tutkimuksessa (1964) maa-apilan formononetiinin pitoisuus vaihteli välillä 0,1-1,7%, genisteiinin välillä 0,61-3,5% ja Biokaniini A:n välillä 0,1-3,6% kuiva-aineesta kokonaisisoflavonipitoisuuden noustessa lähelle 5% kuiva-aineesta. Maa-

apilan isoflavonipitoisuus vaihteli eri tutkimuksissa kaiken kaikkiaan välillä 2,2-5,0% kuiva-aineesta.

Muiden apilalajikkeiden kuin puna-apilan ja maa-apilan isoflavonipitoisuudet ovat olleet verrattaen pieniä. Wun ym. (2006) tutkimuksessa valkoapilan kokonaisisoflavonipitoisuus vaihteli välillä 0,02-0,04% ja pyökkiapilan (*T. alpestre*) välillä 0,007-0,04% kuiva-aineesta. Myös Saloniemen ym. (1995) tutkimuksessa valkoapilan isoflavonipitoisuus oli samaa luokkaa, 0,01-0,06% kuiva-aineesta.

5.2 Soija

Soijaa (*Glycine max*) ja erityisesti soijapavuista tehtyä tiivistettä käytetään jonkin verran märehitijöillä valkuaisen lähteenä. Tutkittaessa soijan sisältämiä flavonoideja, lehtien on todettu sisältävän pääasiassa kamferoli-glykosideja, kun itse pavuissa on pääasiassa isoflavoneja, kuten genisteiiniä ja daitseiinia (Ho ym. 2002). Klejdusin ryhmän tekemässä tutkimuksessa (2005) soijan juurten isoflavonipitoisuus oli korkeimmillaan 0,0013% kuiva-aineesta, kun soijapavussa pitoisuus vaihteli välillä 0,0003-0,11% kuiva-aineesta. Barbosan ryhmän tutkimuksessa (2006) soijapapujen isoflavonipitoisuus oli myös 0,11% kuiva-aineesta. Eniten soijapavut sisälsivät daitseiinia (0,05-0,10% KA:sta) ja genisteiiniä (0,04-0,10% KA:sta) (Barbosa ym., 2006).

5.3 Muut rehukasvit

Laidun- ja nurmikasveista mm. koiranheinä, sinimailanen ja nurminata voivat sisältää estrogeenisesti vaikuttavia aineita (Kallela 1964). Saloniemen ym. tutkimuksessa (1995) sekä sinimailanen että valkoapila saivat rotilla aikaan estrogeenisen muutoksen, joka näkyi kohdun painon lisääntymisenä.

Timotei (Kallela 1987), vuohenherne (Saloniemi ym. 1995) ja rypsi (*Brassica rapa*) ovat kasvilajeja, joissa estrogeenisesti vaikuttavia aineita ei juuri ole. Myös muiden nurmikasvien (koiranheinä ja nurminata) KE-pitoisuudet ovat hyvin pieniä (Kallela 1974). Khoedabandehloun ym. tutkimuksessa (1997)

Saksassa jotkut nurmisäilörehunäytteistä sisälsi mitattavia määriä kasviestrogeeneja (daitseiinia, genisteiiniä, kumesterolia ja biokaniini A:ta). Kuivaheinästä ja maissista ei sen sijaan löytynyt kasviestrogeenejä.

Taulukossa 1 on esitetty merkittävimpien kasviestrogeeneja sisältävien rehukasvien tutkimuksissa havaitut isoflavonipitoisuudet sekä niissä esiintyvät pääasialliset isoflavonit.

Taulukko 1. Isoflavonien pitoisuudet eri tutkimuksissa eniten kasviestrogeeneja sisältävissä märehitjoiden rehukasveissa.

Rehukasvi	Isoflavoneja % KA:sta	Pääasialliset isoflavonit
Puna-apila	0,15 - 2,5	formononetiini ja biokaniini A
Maa-apila*	2,2 – 5,0	genisteiini, formononetiini ja biokaniini A
Soija	0,0003 - 0,11	daitseiini ja genisteiini

* Ei viljellä rehuksi Suomessa.

6 KASVIESTROGEENIPITOISUUKSIIN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT

6.1 Kasvilaji ja -lajike

Eri kasvien ja kasvilajikkeiden isoflavonipitoisuudet eroavat toisistaan. Kasvilajeista jopa läheiset sukulaiset kuten puna-apila ja maa-apila eroavat isoflavonikoostumuksensa osalta merkittävästi. Puna-apilan pääasialliset isoflavonit ovat formononetiini ja biokaniini A, kun maa-apilassa on edellä mainittujen lisäksi lähes yhtä paljon genisteiiniä (Vetter ym. 1991). Tutkiessaan seitsemää *Trifolium*-suvun apilalajia Unkarissa (1995) Vetter havaitsi isoflavonipitoisuuksien olevan matalia vuoriapilassa (*T. montanum*), ranta-apilassa (*T. fragiferum*), veriapilassa (*T. incarnatum*) ja valkoapilassa, kun taas pyökkiapilan, puna-apilan ja maa-apilan pitoisuudet olivat huomattavasti korkeampia. Lisäksi Vetter (1995) huomasi sekä apilalajien että eri kasvinosien välillä eroja eri isoflavonien pitoisuuksissa.

Kasvilajin lisäksi kasvilajikkeella on vaikutusta kasvin kasviestrogeenipitoisuuteen. Jo 1962 tehdyssä tutkimuksessa (Kallela 1962b) huomattiin puna-apilan tetraploidin lajikkeen Ulvan sisältävän isoflavoneja diploideja lajikkeita enemmän (vastaten 25-30 μ g dietyylitilbesterolia / 100g kuiva-ainetta). Kallelan ym. tekemässä tutkimuksessa 1988 havaittiin kahdella eri koeasemalla samansuuntaiset erot puna-apilalajikkeiden kasviestrogeenipitoisuuksissa. Tetraploidilajike Tapa sisälsi diploideja lajikkeita (Venla ja Bjursele) selvästi enemmän kasviestrogeeneja (Kallela ym. 1988). Myös Puolassa tehdyssä tutkimuksessa (Burda ym. 1997) tetraploidit lajikkeet sisälsivät diploideja enemmän isoflavoneja. Mustosen ym. (2006) tutkimuksessa puna-apilalajikkeista Ilte sisälsi eniten kasviestrogeeneja (1,4% kuiva-aineesta). Bettyn ja Jokioisen kasviestrogeenipitoisuus oli 1,2 ja Bjurselen ja Borin 1,1% kuiva-aineesta.

6.2 Ilmasto ja muut abioottiset tekijät

Viileämmän ilmaston on todettu lisäävän kasvien kasviestrogeenipitoisuutta (Kallela ym. 1988). Myös syksyn kylmät yöt voivat lisätä pitoisuutta (Pettersson ym. 1984). McMurrayn ryhmän tutkimuksessa keskimäärin matalammassa lämpötilassa (23/15°C vs. 17/13°C) kasvaneen puna-apilan formononetiinipitoisuus oli korkeampi. Ilmaston lisäksi pitoisuuteen vaikuttaa myös monet muut tekijät, kuten lannoitus. Mm. typpi- ja fosforilannoitus vähentävät kasviestrogeenien määrää (Butler ym. 1967, Kallela 1964 ja McMurray ym. 1985). Schultzin tutkimuksessa (1967) magnesiumin puutos yksinään tai yhdessä fosfaatti- ja sulfaatti-puutoksen kanssa laskivat puna-apilan isoflavonipitoisuutta. Lisäksi voimakkaan UV-B säteilyn on todettu lisäävän rehun formononetiini- ja biokaniini A -tasoa (Swinny ym. 2005). Sadonkorjuu voimakkaan UV-B säteilyn aikana saattaa siten nostaa rehun isoflavonipitoisuutta.

6.3 Kasvin osa ja kasvuvaihe

Sinimailasessa (alfalfa) esiintyvän kasviestrogeenin, kumesterolipitoisuus oli melko matala vegetatiivivaiheessa (7mg/kg kuiva-ainetta) pitoisuuden kuitenkin noustessa kasvin kypsyessä (maksimi 147mg/kg kuiva-ainetta = 0,015% KA:sta). Suurimmillaan KE-pitoisuus oli täydessä kukassa tai siemenvaiheessa (Bickoff ym. 1960).

Pääosa puna-apilan isoflavoneista sijaitsee lehdissä ja varressa, kun taas kukinto ja hedelmä sisältävät isoflavoneja vain vähäisiä määriä (Vetter ym. 1991). Sivesindin ja Seguinin (2005) mukaan puna-apilan kehittyvässä kukinnossa oli yhtä paljon isoflavoneja kuin lehdissä. Kukinnon isoflavonipitoisuus kuitenkin putosi nopeasti kukinnon kehittyttyä jopa 11 kertaa alemmalle tasolle. Onkin tärkeää erotella apilan eri kasvuvaiheet myös kukinnon kypsymisen osalta.

Kasvien kasvuvaihe eli se kasvukauden vaihe jolloin rehu tehdään, vaikuttaa olennaisesti kasviestrogeenien määrään. Kallela ryhmineen totesi tutkimuksessaan (1987) kasviestrogeenipitoisuuden olevan korkein puna-apilan kevään nuorena kasvustossa, noin 1,7% kuiva-aineesta. Kasvukauden keskivaiheilla kesä- heinäkuussa pitoisuudet laskivat reilun prosentin tasolle ja nousivat uudelleen syksyn jälkikasvussa alkukevään tasolle. Eniten puna-apilassa esiintyi formononetiiniä ja biokaniini A:ta, yhteensä noin 90% isoflavonipitoisuudesta. Myös Mustonen ym. (2006) totesi tutkimuksessaan kasviestrogeenipitoisuuksien olevan puna-apilassa korkeimmillaan kukinnan alussa ja toisaalta syyskuussa odelmikkovaiheessa. Puolassa tehdyssä tutkimuksessa (Burda ym. 1997) puna-apilan lehtien formononetiini- ja biokaniini A -pitoisuudet olivat korkeammat heinäkuun lopussa ja elokuussa niitetyissä kasvustoissa kesäkuussa niitettyihin verrattuna. Syy tähän on todennäköisesti kasvin kehitysvaiheessa.

Tsao ryhmineen (2006) totesi Kanadassa puna-apilan lehtien isoflavonipitoisuuden (pääasiassa formononetiinin ja biokaniini A:n) nousevan lokakuun niitossa aikaisempaan niittoon verrattuna. Sen sijaan varren ja

lehtiruotien isoflavoni pitoisuus putosi myöhemmässä niitossa. Isoflavonien kokonaispitoisuus oli koko kasvin tasolla kuitenkin suurempi jälkimmäisessä niitossa.

Maa-apilaruokintakokeessa marsuilla on todettu niitetyn tai laidunnetun kasvuston sisältävän niittämätöntä tai laiduntamatonta kasvustoa enemmän estrogeenisesti vaikuttavia aineita (Alexander & Watson 1951).

Sen lisäksi, että isoflavonien kokonaispitoisuus vaihtelee eri kasvin osien välillä, myös isoflavonikoostumus on osittain erilainen. Sekä Sivensindin ym. (2005) että Tsaon ym. (2006) tutkimuksessa molemmissa puna-apilan lehdissä oli pääasiassa formononetiiniä ja biokaniini A:ta. Sen sijaan varren alueella biokaniini A:ta oli huomattavasti vähemmän.

Verrattaessa isoflavonipitoisuuksia puna-apilan eri osissa (lehti, varsi ja kukinto) eri kasvuvaiheissa, suurimmat isoflavonipitoisuudet olivat vegetatiivisen kasvunaikana kasvin varressa ja lehdissä. Formononetiinin pitoisuus kuitenkin laski hitaasti varressa ja lehdissä kukinnon alkuun saakka, minkä jälkeen pitoisuus nousi uudelleen etenkin lehdissä. Kukinnon osalta formononetiinin ja biokaniini A:n pitoisuudet olivat nuorena kehittyvässä kukinnossa samaa suuruusluokkaa kuin lehdissä pitoisuuden kuitenkin pudotessa kukinnon kehittyessä nopeasti jopa 11 kertaa alemmalle tasolle. Isoflavonien keskimääräiset pitoisuudet olivat kypsässä puna-apilassa lehdissä 1,20%, varressa 0,49% ja kukinnossa 0,33% kuiva-aineesta. (Sivesind & Seguin 2005).

Myös Tsaon ym. (2006) tutkimuksessa puna-apilan lehdissä oli eniten isoflavoneja (2,34%), varressa toiseksi eniten (1,47%), lehtiruodissa hieman vähemmän (1,35%) ja kukinnossa vähiten (0,24% kuiva-aineesta). Wun ym. (2006) tulokset olivat samansuuntaiset; lehdissä isoflavonipitoisuus oli 1,75-2,23%, varressa 1,06-1,85%, juuristossa 1,36-2,85% ja kukinnoissa 0,31-0,63%:a kuiva-aineesta.

Booth ryhmineen (2006) testasi puna-apilan sisältämien isoflavonien estrogeenisia vaikutuksia soluviljelmässä (Ishikawa cells) ja totesi kasvin

vihreiden osien sisältävän kukintoja enemmän estrogeenisesti vaikuttavia isoflavoneja. Lisäksi he huomasivat puna-apilan daitseiini- ja genisteiinipitoisuuden olevan korkeimmillaan kesä- ja heinäkuussa, kun formononetiinin ja biokaniini A:n pitoisuudet olivat huipussaan syyskuun niitossa.

Puna-apilan isoflavonipitoisuudet vaihtelivat kaikkiaan eri tutkimuksissa lehdissä välillä 1,20-2,34%, varressa välillä 0,49-1,85% ja kukinnossa välillä 0,24-0,63% kuiva-aineesta.

Myös maa-apilassa estrogeeninen aktiivisuus oli suurin lehdissä, kun kukinto sisälsi vain vähän tai ei ollenkaan estrogeenisesti vaikuttavia aineita (Alexander & Watson 1951).

6.4 Säilöntä

Kuivatus ja säilöntä menetelmät vaikuttavat ratkaisevasti kasviestrogeenien pitoisuuksiin. Rehun kuivaaminen vähentää KE-pitoisuutta huomattavasti. Bickoff ryhmineen (1960) huomasi sinimailasen isoflavonipitoisuuden putoavan jopa 75%:lla (vaihtelu 0-75%) kuivauksen yhteydessä. Smith ym. (1986) mukaan maa-apilan isofalvonipitoisuus laski kuivattaessa 30-50%. Myös Alexanderin ja Watsonin tutkimuksessa (1951) kuivaaminen laski maa-apilan estrogeenista aktiivisuutta. Sarellin ym. (2003) tutkimuksessa puna-apilan formononetiinin pitoisuus laski 25-40% kuivattaessa. Rehun säilöntä puolestaan nosti KE-pitoisuutta 18%:lla. Säilörehun valmistuksessa myös säilöntäaineella oli vaikutusta. *Lactobacillus plantarumia* sisältävällä ympillä säilötty rehu sisälsi enemmän genisteiiniä ja biokaniini A:ta kuin muurahaishapolla säilötty (Sarelli ym. 2003). Sivesindin & Seguinin (2005) tutkimuksessa tuore puna-apila sisälsi eniten isoflavoneja (1,44%), säilörehu hieman vähemmän (1,22%) ja kuiva heinä vähiten (1,15% kuiva-aineesta). Erot tutkimusten välillä johtuvat todennäköisimmin säilörehun valmistustavoista.

6.5 Yhteenveto KE-pitoisuuksiin vaikuttavista tekijöistä

Sivesind ja Seguin (2005) totesivat tutkimuksessaan tilastollisesti merkitsevän eron eri puna-apilalajikkeiden välillä eri kasvupaikoissa. He arvelivat erojen johtuvan paikan A ja B välisistä eroista abioottisten tekijöiden, kuten maaperän ravinteiden, lämpötilan ja kosteuden osalta. Kaiken kaikkiaan selkeimmät tilastolliset erot isoflavonipitoisuuksissa (formononetiini ja biokaniini A) olivat eri puna-apilalajikkeiden välillä. Erot lajikkeiden välillä säilyivät saman suuntaisina paikasta ja korjuuajasta huolimatta (Sivesind & Seguin 2005).

Karjan rehun kasviestrogeenipitoisuuksiin voidaan vaikuttaa monilla eri valinnoilla. Ensinnäkin rehukasvien ja kasvilajikkeiden valinnalla on todella suuri merkitys rehun KE-pitoisuuteen (Sivesind & Seguin 2005, Vetter ym. 1991 ja 1995, Kallela 1962b, Kallela ym. 1988, Burda ym. 1997 ja Mustonen ym. 2006). Lisäksi eri abioottisilla tekijöillä eli kasvatusolosuhteilla on ratkaiseva rooli kasviestrogeenien metaboliassa (Butler ym. 1967, Kallela 1964, Schultz 1967, Kallela ym. 1988 ja Pettersson ym. 1984). Kun edellä mainittuihin muuttujiin yhdistetään vielä sopiva säilöntä menetelmä, saadaan rehun KE-pitoisuus jo toista ääripäätä monta kertaa alemmalle tasolle. Useiden eri tutkimusten mukaan rehun kuivaaminen on tehokkain tapa alentaa sen isoflavonipitoisuutta (Sarelli ym. 2003, Smith ym. 1986 ja Sivesind & Seguin 2005).

Terveysvaikutteisia ravintolisiä valmistavien yritysten osalta hyödyllisintä tietoa lajien ja lajikkeiden välisten erojen lisäksi näyttäisi olevan eri kasvuvaiheiden ja kasvosien väliset huomattavatkin erot isoflavonipitoisuuksissa (Vetter ym. 1991 ja 1995, Kallela ym. 1987, Burda ym. 1997, Mustonen ym. 2006 ja Sivesind & Seguin 2005).

Gildersleeve ryhmineen (1991) on kehittänyt menetelmää, jolla voidaan valita puna-apilan eri lajikkeiden siemenistä ne, jotka tuottavat mahdollisimman vähän isoflavoneja sisältävää apilaa. Rumbal ym. (1997) sai puna-apila lajikkeen formononetiinipitoisuuden laskemaan merkitsevästi valinnan avulla 7 sukupolven aikana. Myös jalostuksella voidaan siis vaikuttaa merkitsevästi viljelykasvien ja etenkin apilan kasviestrogeeni-pitoisuuksiin.

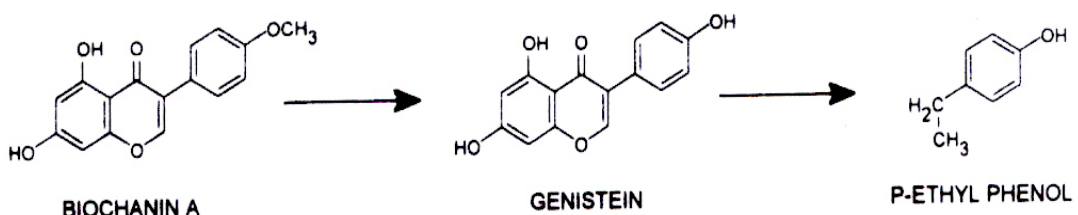
7 KASVIESTROGEENIEN VAIKUTUKSET MÄREHTIJÖILLÄ

Märehtijöistä lampaiden on todettu olevan selvästi lehmiiä herkempiä kasviestrogeenien aiheuttamille hedelmällisyyshäiriöille (Kallela 1964). Syyksi tähän on epäilty mm. lajien välistä eroa kasviestrogeenien detoksifikaatiokapasiteetissa, kuten maksan, suoliston tai pötsin demetylaatio- ja / tai konjugaatiokyvyssä (Lundh 1995). Yksi syy herkkyyseroihin saattaa olla Lundh:n (1990) lampailla toteama kaksinkertainen kohdun estrogeenireseptorien määrä lehmiiin verrattuna.

7.1 Kasviestrogeenien metabolia märehtijöillä

Isoflavonit esiintyvät kasveissa pääasiassa glykosideina ja ne metaboloituvat kasvin entsyymien tai pötsin mikro-organismien vaikutuksesta (Beck 1964). Pääosa isoflavonien metaboliasta tapahtuu märehtijöillä pötsin mikro-organismien toimesta (Nilsson ym. 1967).

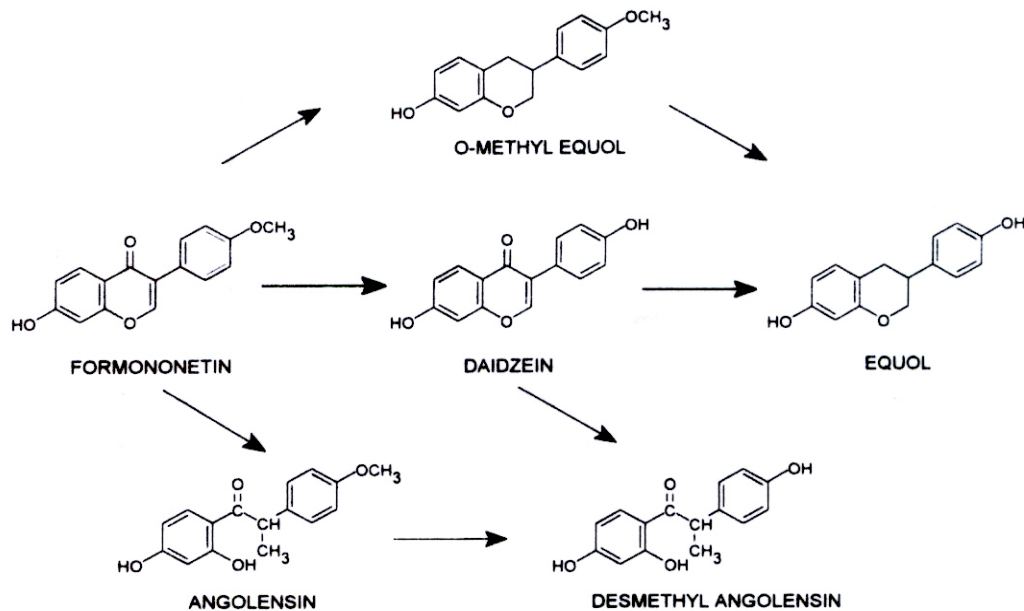
Kasviestrogeeneistä biokaniini A:n ja genisteiinin vaikutus märehtijöillä on varsin vähäinen. Syynä tähän on pötsin pieneliöstö, joka pilkkoo (demetyloi) biokaniini A:n genisteiiniksi ja edelleen tehottomaksi *para*-etyylifenoliksi ja orgaanisiksi hapoiksi (Batterham ym. 1965 ja 1971, Braden ym. 1967, Dickinson ym. 1988 ja Lundh 1990).



Kuva 3. Biokaniini A:n ja genisteiinin metabolia pötsissä. (Cox & Davies 1988).

Sen sijaan formononetiini demetyloidaan pötsissä pääasiassa daitseiiniksi ja metabolidaan edelleen tehokkaaksi equoliksi. Formononetiinin metabolia voi

joissain olosuhteissa edetä myös vaihtoehtoista reittiä, jolloin se metaboloidaan desmetyyliangolensiiniksi (O-DMA). (Lundh 1995).



Kuva 4. Formononetiinin ja daitseiinin metabolia pötsissä. Pääasiallinen lopputuote on equol. (Cox & Davies 1988).

Kumesteroli puolestaan imeytyy sellaisenaan pötsistä ja vaikuttaa muuttumattomana (Pettersson ym. 1984).

Sekä formononetiini, daitseiini että equoli esiintyvät veressä pääasiassa konjugaatteina (noin 95%). Plasman aktiivisten kasviestrogeenien määrä ei siis ole suoraan verrannollinen imeytyneiden aineiden määrään. Kasviestrogeenien konjugaatio tapahtuu pötsissä, ohutsuolessa ja maksassa. Maksan isoflavonien konjugaatioaktiivisuuden on todettu olevan sekä lampaalla että naudalla hyvin pientä. Pääosa konjugaatiosta tapahtuukin pötsissä, mutta myös ruuansulatuskanavan epiteelillä (juoksutusmaha ja suolisto) on merkittävä osa isoflavonien metaboliassa. (Lundh 1990 ja 1995).

Lampailla ruuansulatuskanavan epiteelin konjugaatioaktiivisuuden on todettu olevan jopa 3-20 kertaa tehokkaampaa kuin naudalla. Tämän tuloksen perusteella voisi olettaa lampaiden olevan nautoja parempia kasviestrogeenien

detoksifioinnissa ja siten vähemmän herkkiä niiden negatiivisille vaikutuksille. Koska näin ei kuitenkaan ole, on lampaiden herkkyydelle oltava jokin muu selittävä tekijä. Yhtenä mahdollisena syynä on pidetty kohdun estrogeenireseptoreiden määrää. Lampailla onkin todettu olevan kaksi kertaa enemmän estrogeenireseptoreita kohdussa kuin naudoilla. (Lundh, 1990 ja 1995).

Monista tutkimuksista huolimatta, jää lopullinen syy naudon ja lampaan välisiin herkkyyseroihin kasviestrogeenien lisääntymistä häiritsevien tekijöiden osalta vielä lopullisesti selvittämättä.

7.2 Kasviestrogeenien vaikutukset lampailla

Bennets ym. (1946) huomasi jo 40-luvulla Australiassa vakavia klinisiä oireita runsaasti kasviestrogeenejä sisältäneellä maa-apilalaitumella laiduntaneilla lampailla. Tähän ”apila-taudiksi” nimitettyyn syndroomaan kuului uuhien matala karitsointiprosentti, kohtuprolapsit ja dystokia sekä kuohittujen pässien suurentuneet lisäsukurauhaset.

Kelly ryhmineen (1980) vertasi Uudessa-Seelannissa puna-apilalaitumella ja valkoapilalaitumella laiduntaneiden lampaiden lisääntymismenestystä. Puna-apilalaitumen tiedettiin sisältävän formononetiiniä 0,8-1,2% kuiva-aineesta. Vain vähäisiä määriä kasviestrogeeneja sisältävää valkoapilalaidunta käytettiin kontrolliryhmän laitumena. Puna-apilalaitumella laiduntaneen ryhmän lampaat tulivat huonommin kiimaan ja ovulaatioprosentti oli selvästi kontrolliryhmää huonompi (noin 25% oli anovulatorisia). Lisäksi puna-apilalaitumella laiduntaneiden lampaiden karitsointiprosentti ensimmäisen kiiman osalta jäi 25%:iin, kun kontrolliryhmän vastaava luku oli 75%.

Ruotsissa ovariektomoiduilla lampailla tehdyssä puna-apilaruokintakokeessa 6,1 gramman isoflavoni –päiväannos (vastaa 3,5g formononetiiniä) sai aikaan vedinten koon kasvua, vulvan punertumista sekä lisäsi kohdun kokoa (Nwannenna ym. 1995). Lampaiden laiduntaminen apilalaitumilla ennen lisääntymiskautta voi aiheuttaa ohimenevää hedelmällisyyden laskua. Useita

vuosia jatkuneen laidunnuksen kasviestrogeeneja sisältävällä apilalaitumella on voitu osoittaa johtaneen joissakin tapauksissa jopa pysyvään hedelmättömyyteen (McDonald 1995).

Adamsin tutkimuksissa Australiassa (1990) havaittiin lyhytaikaisen laidunnuksen kasviestrogeenejä runsaasti sisältävällä laitumella lisääntymiskauden alussa saavan aikaan palautuvan laskun hedelmällisyydessä. Palautuvaa hedelmättömyyttä aiheuttaa kasviestrogeenien vaikutus aivolisäkkeen ja munasarjojen hormonitoimintaan. Tarkempaa mekanismia ei täysin tunneta. Pidempään kasviestrogeeneja sisältäneellä laitumella laiduntaneille eläimille voi kehittyä palautumattomia hedelmättömyyteen johtavia muutoksia. Adamsin (1990) tutkimuksessa havaittiin useilla lampaila subkliinistä pysyvää hedelmättömyyttä, jonka taustalla oli kohdunkaulan alueen rakenteen muuttuminen kohtua muistuttavaksi vähemmän poimuttuneeksi rakenteeksi. Lisäksi kohdunkaulan limakalvo muuttui endometriumin kaltaiseksi, jolloin kohdunkaulan toiminta spermatransportterina häiriintyi. (Adams 1990).

7.3 Kasviestrogeenien vaikutukset naudoilla

Ei ole täysin selvää kuinka vakavia lisääntymishäiriöitä kasviestrogeenit voivat aiheuttaa naudoilla. Naudoilla raportoidut tapaukset ovat olleet lampaita lievempiä, eikä palautumatonta hedelmättömyyttä ole havaittu.

Thain (1965) raportoi 1963 Australiassa sattuneesta tapauksesta, jossa karjan hedelmällisyys oli laskenut huomattavasti mitä ilmeisimmin hyperestrogeenisen syndrooman vuoksi. Kiimattomuuden taustalta löytyi pääasiassa munasarjarakkuloita. Tarkempien tutkimusten jälkeen todennäköisimmäksi aiheuttajaksi selvisi runsaasti kasviestrogeeneja sisältänyt maa-apilalaidun.

Kallela (1968) tutki kesällä 1965 puna-apilalaitumella (60-70% puna-apilaa) laiduntaneita ovariektomoituja hiehoja estrogeenisten muutosten varalta. Kontrolliryhmänä toimi kuivaa timotei-heinää syönyt ovariektomoitujen hiehojen ryhmä. Puna-apilaa syöneiden hiehojen ryhmässä havaittiin selviä

kasviestrogeenien aikaansaamia estrogeenisia muutoksia. Näitä olivat vaginan hyperemia ja vulvan turpoamien, kiimainen käytös, kohdun ja kohdunkaulan painon nousu sekä kohdun endometriumien paksuuntuminen (Kallela 1968).

Nwannenna sai ryhmineen (1994) Ruotsissa ovariektomoiduilla Friisiläis-hiehoilla samansuuntaisia tuloksia puna-apilasäilörehuruokintakokeessa. Puna-apilaa syöneiden hiehojen (noin 35g isoflavoneja/ pv) ryhmässä oli selvästi havaittavia estrogeenisia muutoksia: vulvan ödeema ja limainen erite, vedintenkoon kasvu ja kohdun tonuksen pienentyminen.

Sisäruokintakaudella 1982-1983 (Kallela ym. 1984) Etelä-Suomessa 10 lehmän karjassa alkoi esiintyä reilusti normaalia enemmän lisääntymishäiriöitä, kuten hiljaisia ja epäsäännöllisiä kiimoja, epämääräistä limoittelua, munasarjarakkuloita, abortteja ja ennenaikaisia synnytyksiä. Lisäksi eläinten tiinehtyminen oli erityisen heikkoa. Tarkempien tutkimusten jälkeen ongelmien todennäköisimmäksi aiheuttajaksi nousi lähestulkoon täysin puna-apilan jälkikasvusta elokuussa 1982 valmistettu säilörehu.

Kokkolalaisella 14 lypsylehmän luomutilalla sattui 14 kuukauden aikana (1999-2000) neljällä lehmällä 8 vaginaprolapsitapausta. Lisäksi tilalla esiintyi 1999-2000 sisäruokintakaudella normaalia enemmän hedelmällisyshäiriöitä. Tilalla syötettiin säilörehua ja heinää, jotka sisälsivät 30% puna- ja valkoapilaa. Säilörehusta otetuissa näytteissä oli formononetiinia 0,24, daitseiniä 0,01, genisteiiniä 0,02 ja biokaniini A:ta 0,15% kuiva-aineesta. Rotilla tehdyssä ruokintakokeessa, kyseistä säilörehua syöneiden rottien kohdun paino nousi tilastollisesti merkitsevästi verrokkiryhmään verrattuna, mikä osoitti rehulla olevan estrogeenista vaikutusta. Lehmille syötetty säilörehu saattoikin edesauttaa vaginaprolapsien syntyä. (Sarelli ym. 2001).

Päinvastaisia tutkimustuloksiakin löytyy. Austinin ym. (1982) tutkimuksessa, jossa 42 hiehoa jaettiin puna-apilasäilörehua (formononetiinia noin 0,7% kuiva-aineesta) ja nurmisäilörehua syövään ryhmään, ei havaittu eroa kahden ruokintaryhmän hedelmällisyydessä.

7.4 Yhteenveto kasviestrogeenien vaikutuksista märehäijöillä

Useiden tutkimusten ja käytännön kokemusten perusteella voidaan todeta lampaiden olevan lehmiä herkempiä isoflavonien lisääntymishäiriöitä aiheuttaville estrogeenisille vaikutuksille (Kallela 1964, McDonald, 1995 ja Lundh 1990). Lisääntymishäiriöt sekä kliiniset oireet ovat lyhytaikaisissa altistumistapauksissa olleet palautuvia. Lampailla pidempiaikaisen altistumisen on kuitenkin todettu johtavan pysyviin hedelmättömyyttä aiheuttaviin muutoksiin (Adams 1990). Eniten tutkimusta tarvittaisiin pidempiaikaisesta ja jatkuvasta altistumisesta pienemmille kasviestrogeenipitoisuuksille.

Hyvänä apuna kasviestrogeenien vaikutusten hallitsemiseksi toimii rehukasvien hyvä tuntemus ja sitä kautta rehukasvilajien ja –lajikkeiden järkevä valinta eläinryhmän mukaan. Teuraaksi kasvatettavilla eläimillä voidaan huoletta hyödyntää kasviestrogeenien anabolisia vaikutuksia, kun taas siitoseläinten rehuissa tulisi välttää liian suuria kasviestrogeenipitoisuuksia. McDonaldin mukaan (1995) nykyisten tutkimustulosten valossa maissa, joissa apilan aiheuttamat lisääntymisongelmat ovat huomattavia, onkin jopa annettu suosituksia, joiden mukaan lampaita ja lehmiä ei laidunneta astutusaikaan apilapitoisilla laitumilla.

KOKEELLINEN OSA

8 AIKATAULU

Kokeellinen osa suoritettiin neljässä kolmen viikon ruokintajaksossa:

Jakso

I 12.1-2.2.06

II 2.2-23.2.06

III 23.2-16.3.06

IV 16.3-6.4.06

9 MATERIAALI

9.1 Koe-eläimet

Koe-eläiminä tutkimuksessa oli 6 Viikin opetus- ja tutkimustilan navetan ayrshire-lehmää, joiden poikimisesta oli vähintään 3 viikkoa. Lehmistä 2 oli varalehmiä.

9.2 Rehut

Kaikki eläimet söivät samaa apilan jälkikasvusta tehtyä säilörehua. Jälkikasvu niitettiin 2.8.2005, esikuivattiin noin 44 tuntia ja paalattiin pyöröpaalaimella 4.8.2005. Säilöntäaineena oli AIV2Plus (5litraa/1000kg).

Valkuaisrehuina olivat Mildolan rypsipuriste (1,5 ja 3,0 kg/pv) ja Mildolan soijapuriste (0,95 ja 1,9 kg/pv) kahdella annostasolla.

10 MENETELMÄT

10.1 Ruokinta

Lehmien väkirehuruokinta kullakin jaksolla määräytyi taulukon 2 tasapainotetun latinalaisen neliön mukaan.

Taulukko 2. Koekaavio valkuaistiivisteille: Tasapainotettu latinalainen neliö

Jakso	Lehmä 9	Lehmä 10	Lehmä 11	Lehmä 12
I 12.1-2.2.06	A	B	C	D
II 2.2-23.2.06	B	C	D	A
III 23.2-16.3.06	D	A	B	C
IV 16.3-6.4.06	C	D	A	B

Ruokinnat: A = Rypsipuriste taso 1 (pieni) = RP1

B = Rypsipuriste taso 2 (suuri) = RP2

C = Soijapuriste taso 1 (pieni) = SP1

D = Soijapuriste taso 2 (suuri) = SP2

Väkirehuna oli ohran, kauran, valkuaistiivisteiden ja kivennäisen seos taulukon 3 mukaan. Ohraa ja kauraa annettiin suhteessa 1:1. Valkuaisrehuina olivat Mildolan rypsipuriste ja Mildolan soijapuriste. Rypsipuristeen määrä oli joko 1,5 tai 3,0 kg/pv. Soijapuristetta annettiin niin, että väkirehun raakavalkuaispitoisuus oli sama kuin rypsilvaihtoehdossa eli 0,95 ja 1,9 kg/pv. Väkirehu sekoitettiin käsin ja jaettiin kuusi kertaa päivässä (klo 5, 8, 11, 14, 17 ja 20).

Rypsipuristeesta ja soijapuristeesta otettiin jokaisen jakson viimeisellä viikolla päivittäin näytteitä kuiva-aineen määrittämistä ja analyysistä varten (kasviestrogeenipitoisuus). Kuiva-aine määritettiin jaksoittain. Rehuanalyysiä varten eri jaksojen näytteet yhdistettiin yhdeksi näytteeksi.

Taulukko 3. Eri ruokintaryhmien saamat päivittäiset väkirehut ja valkuaistiivisteet.

Väkirehut / Tiivisteet ja kivennäiset	RP1	RP2	SP1	SP2
Ohra kg/pv	4,5	3,75	4,80	4,3
Kaura kg/pv	4,5	3,75	4,75	4,3
Rypsipuriste kg/pv	1,5	3,0		
Soijapuriste kg/pv			0,95	1,9
Tarmo-kivennäinen g/pv	300	100		
Tunnutus-Namino kiv g/pv			350	250
Ruokasuola g/pv	100	100	100	100
Yhteensä	10,9	10,7	10,95	10,85

Säilörehua jaettiin kolmesti päivässä (klo 5.00, 12.00 ja 15.00). Säilörehua syötettiin vapaasti siten, että jätettä jäi vähintään 5% annetusta säilörehun määrästä.

Jokaisen jakson viimeisellä viikolla säilörehusta kerättiin rehupunnitusten yhteydessä näytteitä pakastettavaksi analyysejä varten (rehuanalyysi, varanäyte ja kasviestrogeeninäyte). Pakastetut näytteet yhdistettiin ennen analyysiä rehuittain ja jaksoittain. Tarkoituksen oli saada mahdollisimman edustava näyte kustakin rehuerästä.

Rehunkulutusta tarkkailtiin päivittäin punnitsemalla rehujäännös. Myös eläinten painoa seurattiin punnitsemalla eläimet ennen kokeen alkua kahtena peräkkäisenä päivänä ja jakson lopussa kahtena peräkkäisenä päivänä.

10.2 Verinäytteet

Nollanäytteet otettiin ennen kokeen alkua 10.1.2006 klo 9.00 Litium-Hepariiniputkiin (3x10ml) kaulasuonesta (*Vena jugularis*).

Verinäytteet otettiin aina kunkin ruokintajakson toiseksi viimeisenä iltana ja viimeisen yön ja päivän aikana häntäsuoneen asetetusta kanyylistä. Ennen kanyliointia lehmät rauhoitettiin kevyesti ksylatsiinilla maitosuoneen

(noin 0,5-1 ml Narcoxyl 20mg/ml, Intervet International). Lisäksi lehmille laitettiin epiduraalipuudutus 18G:n neulalla ensimmäisen ja toisen tai toisen ja kolmannen häntänikaman välistä (noin 5ml Lidocain 20mg/ml, Orion Pharma). Pistoalueelta ajettiin karvat veitsen terällä ja alue pestiin 3 kertaa Klorhexol-liuoksella (5mg/ml, Leiras).

Lehmät kanyloitiin illalla (klo17-22 välillä) häntävaltimeen (tai –laskimoon) (*Arteria tai Vena caudalis mediana*) 14 G:n kalkkineulan läpi pujotettavalla steriilillä silikoniletkulla. Silikoniletku liitettiin katkaistun ja tylpäksi hiotun 18G:n neulan avulla kolmitiehanaan ja kanyyli huuhdeltiin välittömästi 1%:lla NaCl-hepariiniliuoksella. Kanyyli kiinnitettiin leucoplastin, kipsinalusvanun ja liimasiteen avulla paikalleen.

Verinäytteitä otettiin häntäsuonesta (3x10ml) seerumiputkiin 3 tunnin välein (klo 23, 02, 05, 08, 11, 14 ja 17). Tämän jälkeen kanyylit poistettiin. Seeruminäytteistä määritettiin kasviestrogeenien pitoisuudet.

Lisäksi kaulasuonesta (*Vena jugularis*) otettiin klo 9 näytteenottopäivän aamuna 3 x 10ml näytteet LiHe-näyteputkiin. Myös näistä näytteistä määritettiin kasviestrogeenien pitoisuudet (tuloksia käytettiin maidon ja plasmapitoisuuksien vertailuun).

Kaikki näytteet laitettiin näytteenoton jälkeen välittömästi jäihin jatkokäsittelyä odottamaan. Seeruminäytteet sentrifugoitiin (3000 rpm 10min) ja seerumi pipetoitiin pasteur-pipetillä puhtaisiin koeputkiin.

Kasviestrogeenien (genisteiini, biokaniini A, formononetiini ja daitseiini) määrittäminen naudan seerumista tehtiin nestekromatografisesti (HPLC = High-Performance Liquid Chromatography) liitteen 1 ohjeen mukaan.

10.3 Kasviestrogeenien rehuanalyysit

Rehujen kuiva-ainepitoisuudet määritettiin (105°C 20-24h) seuraavan kaavan mukaan:

$$KA\% = m_a / m_b \cdot 100\%$$

m_a = kuivattu paino

m_b = tuorepaino

Kasviestrogeenien (genisteiini, biokaniini A, formononetiini, daitseiini ja kumesteroli) pitoisuudet määritettiin nestekromatografisesti puna-apilasäilörehusta liitteen 2 ohjeen mukaan ja valkuaisriivisteistä (soija ja rypsi) liitteen 3 ohjeen mukaan.

10.4 Tilastollinen analyysi

Ruokintaryhmien pohjana käytettiin tasapainotettua latinalaista neliötä, jonka tarkoituksena oli poistaa mahdollisista yksilöllisistä eroista aiheutuvat harhat tuloksissa. Siinä kukin koelehmä käy läpi kunkin valkuaisruokinnan.

Kullekin koejaksolle laskettiin isoflavonien plasmapitoisuuksien keskiarvot eri vuorokauden aikoina otettujen näytteiden perusteella. Tilastollisessa laskennassa käytettiin näitä jaksokohtaista plasmapitoisuuksien keskiarvoja (taulukko 5). Valkuaisruokinnan vaikutus plasmapitoisuuksiin testattiin latinalaiseen koemalliin soveltuvalla Anovalla. Plasmapitoisuuksien tilastollinen analyysi tehtiin STATA tilastolaskentaohjelmalla.

11 TULOKSET

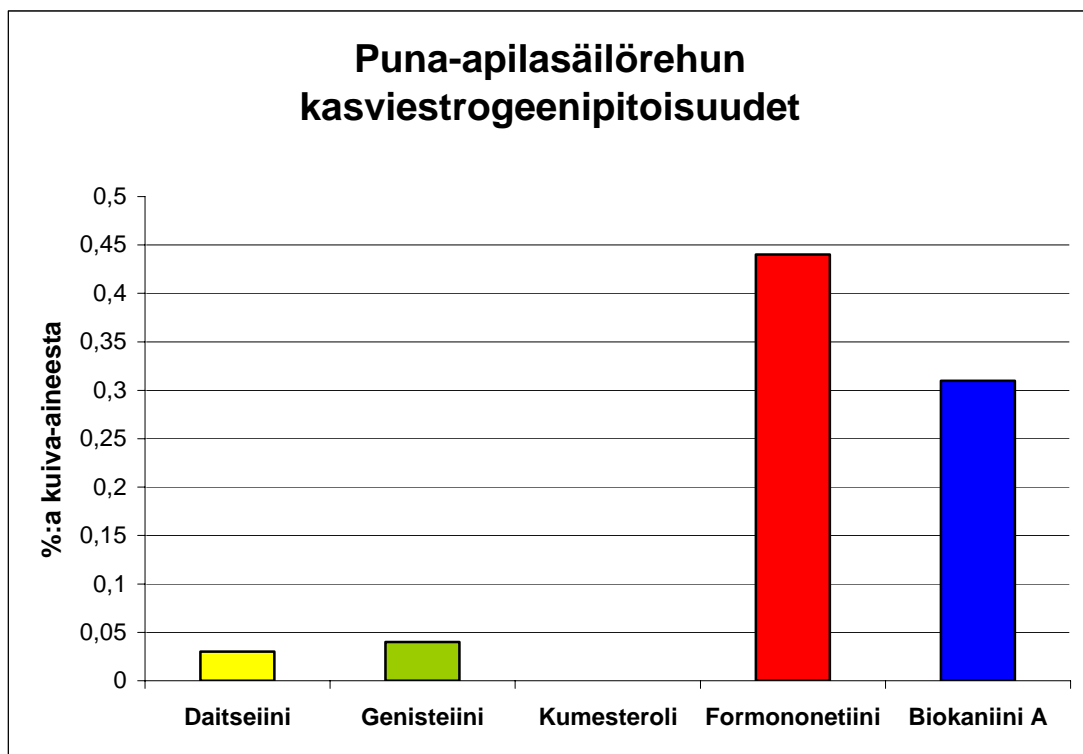
11.1 Puna-apilasäilörehun kasviestrogeenipitoisuudet

Puna-apilasäilörehun kuiva-ainepitoisuus oli noin 24,7% (23,4-25,3%), D-arvo 62,9%, raakavalkuaispitoisuus 18,6% ja NDF-pitoisuus 40% kuiva-aineesta.

Kokeessa määritettiin daitseiinin, genisteiinin, kumesterolin, formononetiinin ja biokaniini A:n pitoisuus rehun kuiva-aineesta. Tulokset on esitetty taulukossa 4 ja kuvassa 5. Säilörehu sisälsi eniten formononetiiniä ja biokaniini A:ta, yhteensä noin 75% kuiva-aineesta.

Taulukko 4 . Kasviestrogeenien prosenttiosuudet säilörehun kuiva-aineesta.

Kasviestrogeeni	%:a KA:sta	Vaihteluväli
Daitseiini	0,03	± 0,004
Genisteiini	0,04	± 0,006
Kumesteroli	0,00	± 0
Formononetiini	0,44	± 0,047
Biokaniini A	0,31	± 0,035
Isoflavoneja yht.	0,82	± 0,091



Kuva 5. Puna-apilasäilörehun kasviestrogeenipitoisuudet.

11.2 Soija- ja rypsiiviesteen kasviestrogeenipitoisuudet

Soijatiiviesteen kuiva-ainepitoisuus oli 89,6% ja rypsiiviesteen 89,2%. Rypsissä ei esiintynyt mitattavia määriä kasviestrogeenejä. Myös soijatiiviesteen kasviestrogeenipitoisuudet jäivät varsin pieniksi. Daitseiinia oli soija-tiivisteessä 0,02 ja genisteiiniä 0,03%:a kuiva-aineesta. Muita kasviestrogeenejä ei esiintynyt mitattavina pitoisuuksina.

11.3 Plasman kasviestrogeenipitoisuudet

Lehmien plasman kasviestrogeenipitoisuudet vaihtelivat välillä 0 - 7,9 µg/ml.

Tulokset on esitetty ruokintaryhmittäin taulukossa 5 ja 6 sekä kuvassa 6.

Merkittävin lehmien plasmasta mitatuista kasviestrogeeneistä oli equol, jonka pitoisuus vaihteli välillä 7,0 – 7,9 µg/ml. O-DMA:n pitoisuus vaihteli välillä 0,32 – 0,43 µg/ml. Myös formononetiiniä oli plasmassa pieninä pitoisuuksina (0 – 0,04 µg/ml). Biokaniini A:ta, genisteiiniä ja daitseiinia ei esiintynyt plasmassa yksittäisiä näytteitä lukuun ottamatta mitattavina pitoisuuksina. Eri ruokintaryhmien välillä ei ollut tilastollisia eroja plasman equolin ($p = 0,8852$), O-DMA:n ($p = 0,3543$) eikä formononetiinin ($p = 0,1033$) pitoisuuksissa.

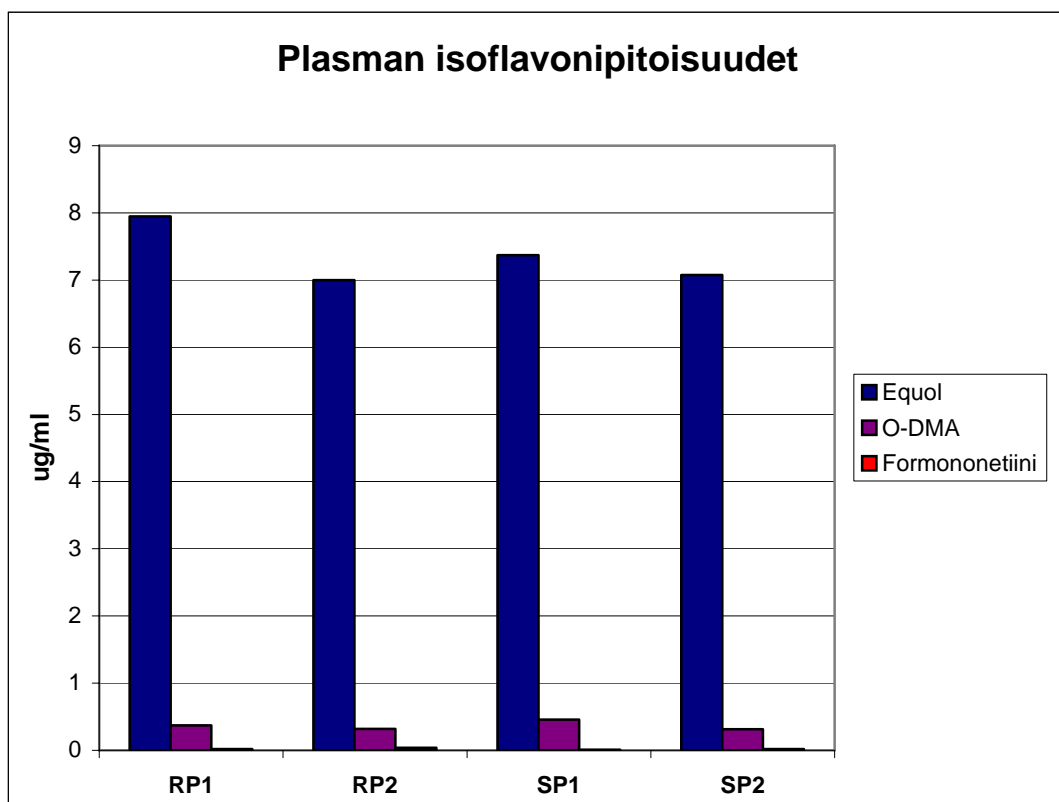
Taulukko 5. Eri ruokintaryhmien jaksokohtaiset plasmapitoisuudet (µg/ml) equolille, O-DMA:lle sekä formononetiinille.

LEHMÄ	Ruokintaryhmä	EQUOL	O-DMA	FORMONONETIINI
JAKSO I				
Rapsodia	SP1	5,98	0,14	0,00
Pihlaja	SP2	7,58	0,35	0,04
Pentagon	RP1	*	*	*
Ryvita	RP2	8,04	0,28	0,05
JAKSO II				
Ryvita	SP1	7,49	0,94	0,00
Rapsodia	SP2	6,06	0,16	0,00
Pihlaja	RP1	8,15	0,28	0,04
Pentagon	RP2	5,96	0,49	0,04
JAKSO III				
Pihlaja	SP1	8,11	0,47	0,00
Pentagon	SP2	7,59	0,45	0,00
Ryvita	RP1	7,75	0,46	0,00
Rapsodia	RP2	6,77	0,20	0,00
JAKSO IV				
Pentagon	SP1	7,91	0,28	0,05
Ryvita	SP2	*	*	*
Rapsodia	RP1	*	*	*
Pihlaja	RP2	7,23	0,31	0,06

* Kanylointi epäonnistui.

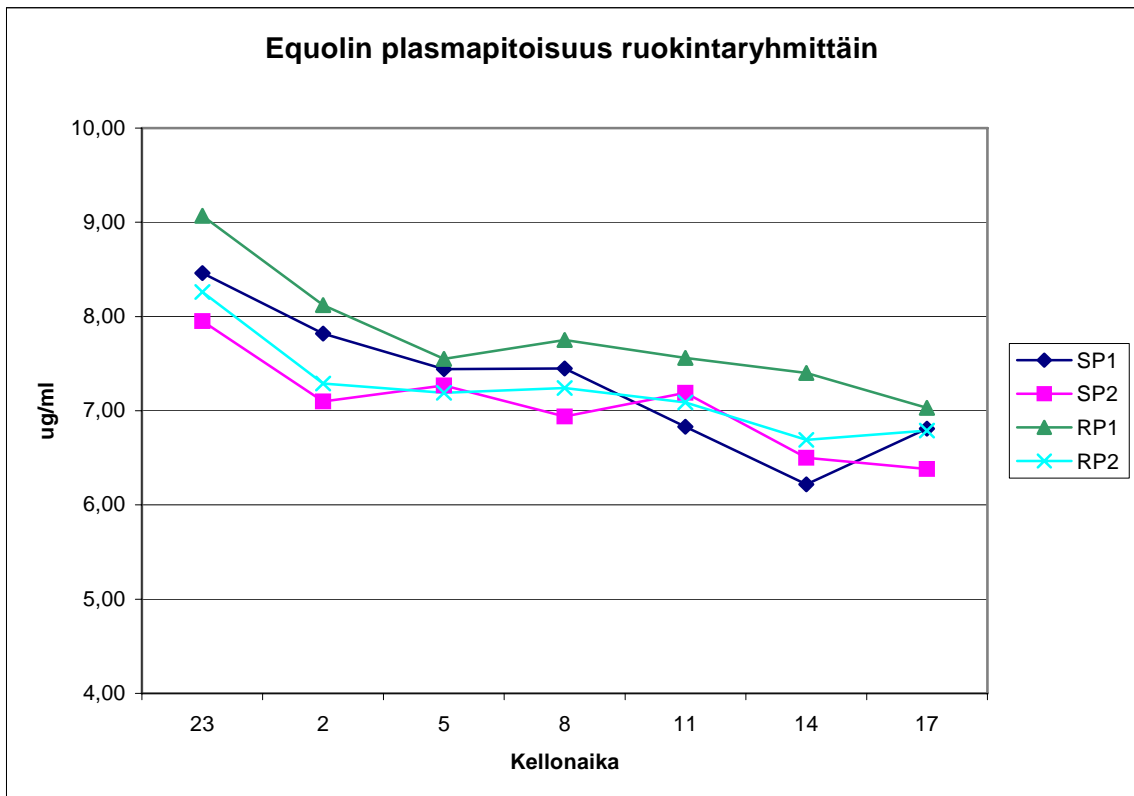
Taulukko 6. Eri ruokintaryhmien keskimääräiset plasmapitoisuudet ($\mu\text{g/ml}$) equolille, O-DMA:lle sekä formononetiinille.

Ruokintaryhmä	EQUOL	O-DMA	FORMONONETIINI
RP1	7,95	0,37	0,02
RP2	7,00	0,32	0,04
SP1	7,37	0,46	0,01
SP2	7,08	0,32	0,02

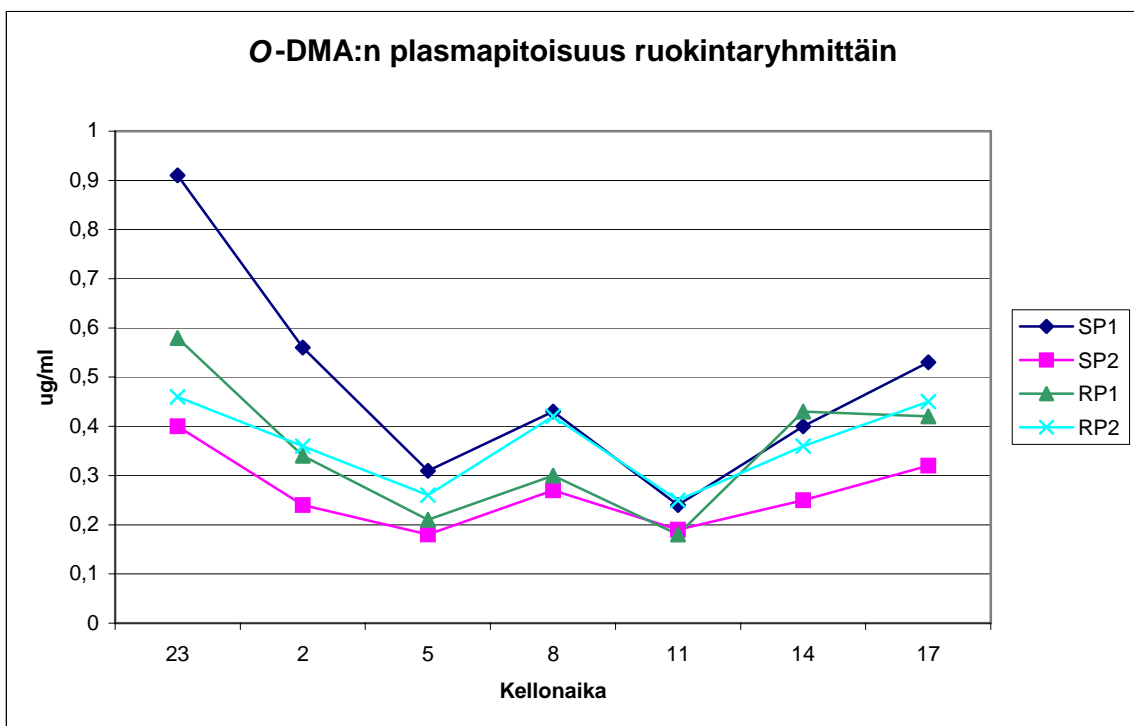


Kuva 6. Koe-lehmien plasman isoflavonipitoisuudet ruokintaryhmittäin.

Lehmien isoflavonien plasmapitoisuudet vaihtelivat jonkin verran vuorokauden ajan mukaan. Tulokset on esitetty graafisesti equolin osalta kuvassa 7 ja O-DMA:n osalta kuvassa 8. Equolin pitoisuus näyttää laskevan hitaasti kello 24:stä aina seuraavaan iltapäivään, kun taas O-DMA:n pitoisuus alkaa yön jäljiltä nousta jo kello 14:sta eteenpäin. Eri vuorokauden aikojen välisiä eroja ei testattu tilastollisesti.



Kuva 7. Equolin plasmapitoisuus ruokintaryhmittäin kellon ajan mukaan.



Kuva 8. O-DMA:n plasmapitoisuus ruokintaryhmittäin kellon ajan mukaan.

Taulukossa 7 on laskettuna lehmien päivittäinen isoflavonien saanti syönnin (soija, rypsi ja puna-apilasäilörehu) perusteella ruokintaryhmittäin.

Taulukko 7. Lehmien päivittäinen isoflavonien saanti (g/pv) syönnin perusteella ruokintaryhmittäin.

Isoflavoni	Valkuaistiiviste			
	RYPSI		SOIJA	
	RP1 matala	RP2 korkea	SP1 matala	SP2 korkea
Formononetiini	59,6	55,2	58,1	56,5
Daitseiini	4,0	3,6	3,9	4,1
Genisteiini	5,4	5,0	5,6	5,7
Biokaniini A	42,8	39,9	41,8	40,6
Yhteensä	111,7	103,7	109,4	106,9

Valkuaistiivisteen laadulla tai määrällä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa lehmien isoflavonien päivittäiseen saantiin (Mustonen ym. 2008). Liitteenä 4 on posterit puna-apilaruokintatutkimusprojektin laajemmasta osasta, jossa tutkittiin valkuaisruokinnan erojen vaikutusta lypsylehmien maidon isoflavonipitoisuuksiin.

12 TULOSTEN POHDINTA

Koska märehijöillä eri kasviestrogeenien metabolia eroaa toisistaan huomattavasti, on isoflavonien kokonaismäärää tärkeämpi tieto rehun yksittäisten isoflavonien ja erityisesti formononetiinin ja daitseiinin pitoisuus.

Tässä tutkimuksessa lehmien merkittävin ravinnon kasviestrogeenilähde oli säilörehun sisältämä formononetiini (0,44% kuiva-aineesta). Myös säilörehun biokaniini A:n pitoisuus oli huomattava (0,31% kuiva-aineesta). Biokaniini A:n esiintyminen rehussa näyttäisi kuitenkin olevan merkityksetön sen pötsimetabolian vuoksi. Tätä tukee myös koelehmien plasman biokaniini A:n pitoisuus 0 µg/ml. Säilörehu ei sisältänyt kumesterolia. Tulos tukee Kallelan

(1964) saamia tuloksia, jonka mukaan tutkituissa suomalaisissa rehukasveissa ei esiintynyt kumesterolia.

Puna-apilasäilörehun kokonaisisoflavonipitoisuus vaihteli tutkimuksessamme välillä 0,73-0,91% kuiva-aineesta. Tulos on samaa suuruusluokkaa muiden ryhmien tutkimusten kanssa (Pettersson ym. 1984, Kallela ym. 1987 Saloniemi ym. 1995, Sarelli ym. 2003, Sivensid & Sequin 2005 ja Mustonen ym. 2006)

Valkuaistiivisteiden kasviestrogeenipitoisuudet olivat pieniä, eikä valkuaisrehuruokinnan eroilla (4 eri ruokintaryhmää) ollut tilastollista merkitsevyyttä suhteessa lehmien plasman kasviestrogeenipitoisuuksiin. Syynä tähän on puna-apilasäilörehun moninkertainen isoflavonipitoisuus valkuastiivisteisiin nähden. Valkuaistiivisteiden määrän ja laadun mahdollisia vaikutuksia lypsylehmien plasman isoflavonipitoisuuksiin tulisi jatkossa testata suuremmalla otoskoolla ilman samanaikaista puna-apilaruokintaa.

Valkuaisrehuista rypsiäiviste ei sisältänyt lainkaan kasviestrogeeneja. Soijatiivisteessä esiintyi isoflavoneista genisteiiniä noin 0,03% kuiva-aineesta ja daitseiiniä 0,02% kuiva-aineesta. Isoflavoneja oli siis yhteensä 0,05% kuiva-aineesta. Tulokset ovat samaa suuruusluokkaa kuin aiemmin kirjallisuudessa esitetyt pitoisuudet (Kledjus ym., 2005 ja Barbosa ym., 2006). Myös Barbarosan ym. (2006) tutkimuksessa soijapavun pääasialliset isoflavonit olivat genisteiini ja daitseiini.

Kirjallisuudessa (Lundh 1990 ja 1995) apilasäilörehuruokintakokeessa (50% puna-apilaa) naudun plasman vapaan ja konjukoidun equolin pitoisuus liikkui välillä 1,7-2,0 µg/ml. Formononetiinin vastaava pitoisuus vaihteli välillä 0,01-0,09 µg/ml. Bradenin ym. (1971) puna-apila-ruokintakokeessa hiehojen plasman isoflavonipitoisuus oli 5-24 tuntia ruokinnan alusta tasolla 2,1-16,8 µg/ml, josta equolin pitoisuus vaihteli välillä 1,0-6,0, O-DMA:n välillä 0,5-6,0 µg/ml ja formononetiinin välillä 0,08-1,1 µg/ml. Tulokset ovat samaa suuruusluokkaa saamiemme tulosten kanssa. Tässä tutkimuksessa plasman

equolin pitoisuus vaihteli välillä 7-7,9, O-DMA:n välillä 0,1-0,9 ja formononetiinin välillä 0,01-0,04 µg/ml.

Säilörehun formononetiini metaboloituu märehitjoiden elimistössä pääasiassa equoliksi. Mustosen ym. (julkaisematon) tekemässä tutkimuksessa puna-apilasäilörehun formononetiini pitoisuus olikin voimakkaasti yhteydessä lehmien plasman equolipitoisuuteen. Toisin sanoen, mitä enemmän rehussa oli formononetiiniä sitä suurempi oli rehua syöneen lehmän plasman equolipitoisuus. Säilörehun formononetiinin määrä korreloi kuitenkin vain heikosti maidon equolipitoisuuden kanssa. Myös tässä tutkimuksessa puna-apilasäilörehun suuri formononetiinipitoisuus näyttäisi johtavan plasman suureen equolipitoisuuteen. Korrelaatiota ei ole kuitenkaan testattu tilastollisesti.

Lehmien isoflavonien plasmapitoisuudet vaihtelivat jonkin verran vuorokauden ajan mukaan. Equolin pitoisuus näyttää laskevan hitaasti kello 24:stä aina seuraavaan iltapäivään, kun taas O-DMA:n pitoisuus alkaa yön jäljiltä nousta jo kello 14:sta eteenpäin. Syy equolin ja O-DMA:n plasmapitoisuuksien muutoksiin saattaa olla eri metabolia reittien nopeudessa. Vuorokauden aikojen välisiä eroja plasman isoflavonipitoisuuksissa on kuitenkin erittäin vaikea arvioida tutkimuksemme pienen otoskoon vuoksi.

13 YHTEENVETO

Tämän tutkimuksen perusteella valkuaisrehuruokinnan laadun tai määrän vaihtelut eivät aiheuttaneet tilastollisesti merkitseviä eroja lypsylehmien plasman isoflavonipitoisuuksissa. Syynä tähän on ruokintakokeessa lehmille syötetyn puna-apilasäilörehun moninkertainen isoflavonipitoisuus valkuaiivisteisiin nähden. Puna-apilasäilörehu peittää alleen soija- ja rypsiivisteiden väliset mahdolliset vaikutukset plasman isoflavonipitoisuuksiin. Myös pieni otoskoko vaikuttaa tulosten merkitsevyyteen.

Vaikka valkuaisruokinnan erot eivät vaikuttaneet merkitsevästi plasman isoflavonipitoisuuksiin, näyttäisi lehmien plasman suuri equolipitoisuus olevan yhteydessä puna-apilasäilörehun suureen formononetiinipitoisuuteen. Sama ilmiö on huomattu myös Mustosen ym. (julkaisematon) tekemässä tutkimuksessa.

Suomessa märehitijöiden merkittävin kasviestrogeenien lähde on puna-apila, jota käytetään pelloilla erityisesti maaperän luontaiseen typensidontaan. Puna-apilan käyttö on kuitenkin vähentynyt 1900-luvun loppu puolella typpilannoitteiden edullisuuden myötä. Kuten useissa tutkimuksissa todettiin, yksittäisissä tapauksissa runsaasti puna-apilaa sisältävä säilörehu tai tuore puna-apilapitoinen heinä voivat aiheuttaa lisääntymishäiriöitä etenkin lampaille, mutta myös lehmillä. Tärkeintä onkin pitää puna-apilan osuus tuore- ja säilörehussa kohtuudessa. Tarvittaessa rehun kasviestrogeenipitoisuutta voidaan pienentää merkittävästi rehun kuivauksella.

Suomessa käytetään märehitijöiden ja erityisesti naudan valkuaisen lähteenä vähäisiä määriä myös soijatiivistettä. Soijan menekki on kuitenkin tällä hetkellä pientä ja sitä käytetäänkin rehuteollisuudessa lähinnä sen suuren valkuaispitoisuuden vuoksi valkuastiivisteissä, kuten rypsiivisteessä, rehun valkuaispitoisuuden tasaamiseen. Itse soijatiivistettä käytetään vähäisiä määriä yksittäisillä lihakarjaloilla seosrehuruokinnan osana. Soijan käyttö rehuna ei näyttäisi ainakaan tällä hetkellä olevan riskitekijä märehitijöiden kasviestrogeenien saannin kannalta. Soijapavun isoflavonipitoisuudet ovat suhteellisen pieniä ja soijan käyttö rehuna melko vähäistä.

Eri kasviestrogeenien suhteellinen määrä ja pitoisuudet vaihtelevat huomattavasti eri kasvilajien ja -lajikkeiden välillä. Kasviestrogeenien vaikutusten luotettavan arvioinnin kannalta olisi tärkeää tuntea eri rehukasvien väliset erot kasviestrogeenikoostumuksessa unohtamatta lukuisten eri ympäristötekijöiden, korjuuajan sekä säilönnän tuomaa vaihtelua niiden pitoisuuksissa. Kasviestrogeenien luotettavan vaikutusten arvioinnin eteen on tehtävä vielä paljon työtä. Palapelin eri palasten yhteen liittäminen ja kattavan

kokonaiskuvan muodostaminen vaatii laajaa asiantuntemusta ja perehtymistä paikallisiin olosuhteisiin, rehukasveihin ja eläinpopulaatioon.

Vaikka lampaiden ja nautojen ruokinta puna-apilarehuilla on Suomessa melko vähäistä, on puna-apilan runsaaseen käyttöön liittyvät riskit pidettävä mielessä etenkin lannoitteiden käytön minimointiin pyrkivän luomutuotannon osalta.

14 KIRJALLISUUSLUETTELO:

1. Adams, N. R. Permanent Infertility in Ewes Exposed to Plant Oestrogens. *Aust. Vet. J.*, 1990, 67 (6):197-201.
2. Adams, N. R. Detection of the Effects of Phytoestrogens on Sheep and Cattle. *J. Anim. Sci.*, 1995, 73:1509-1515.
3. Alexander, G. ja Watson, R. H. The Assay of Oestrogenic Activity of *Trifolium subterraneum* L. by Increase in Uterine Weight in the Spayed Guinea Pig. *Aust. J. agric. Res.*, 1951, 2:480-493.
4. Atkinson, C.; Compston, J. E.; Day, N. E.; Dowsett, M. ja Bingham, S. A. The Effects of Phytoestrogen Isoflavones on Bone Density in Women: a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial¹⁻³. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 79:326-333.
5. Austin, A. R.; Aston, K.; Drane, H. M. ja Saba, N. The Fertility of Heifers Consuming Red Clover Silage. *Grass and Forage Science*, 1982, 37:101-106.
6. Barbosa, A. C.; Hassimoto, N. M.; Lajolo, F. M. ja Genovese, M. I. Isoflavone Content and Profile and Antioxidant Activity of Soy and Soy Products. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 2006, 26 (4):921-926.
7. Batterham, T. J.; Hart, N. K. ja Lamberton, J. A. Metabolism of Oestrogenic Isoflavones in Sheep. *Nature*, 1965, 206:509.
8. Batterham, T. J.; Shutt, D. A.; Hart, N. K.; Braden, A. W. H. ja Tweeddale, H. J. Metabolism of Intraruminally Administered [4-¹⁴C] Biochainin A in Sheep. *Aust. J. agric. Res.*, 1971, 22:131-138.
9. Beck, A. B. The Oestrogenic Isoflavones of Subterranean Clover. *Aust. J. Agric. Res.*, 1964, 15:223-230.
10. Bennets, H. W.; Underwood, E. J. ja Shier, F. L. A Specific Breedingproblem of Sheep on Subterranean Clover Pastures in Western Australia. *Aust. Vet. J.*, 1946, 22:2-12.
11. Bickoff, E. M.; Booth, A. N.; Livingston, A. L. ja Hendrickson, A. P. Observations on the Effect of Drying on Estrogenic Activity of Alfalfa Samples of Varying Maturity. *J. Anim. Sci.*, 1960, 19:745-753.
12. Booth, N. L.; Overk, C. R.; Yao, P.; Totura, S.; Deng, Y.; Hedayat, A. S.; Bolton, J. L.; Pauli, G. F. ja Fransworth N. R. Seasonal Variation of Red Clover (*Trifolium pratense* L, Fabaceae) Isoflavones and Estrogenic Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54:1277-1282.
13. Braden, A. W. H.; Hart, N. K. ja Lamberton, J. A. The oestrogenic Activity and Metabolism of Certain Isoflavones in Sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 1967, 18:335-348.
14. Braden, A. W. H.; Thain, R. I. ja Shutt, D. A. Comparison of Plasma Phyto-oestrogen Levels in Sheep and Cattle After Feeding on Fresh Clover. *Aust. J. Agric. Res.*, 1971, 22:663-670.
15. Burda, S.; Scibior, H. ja Bawoslski, S. The Effect of Cutting Date on Isoflavone Content of Red Clover Leaves. *Acta Acrobotanica* 1997, 50 (1-2): 87-92.
16. Butler, G. W.; Steemers, M. A. ja Wong, E. The Effect of Nitrogen, Phosphorous, and Potassium Supply on the Isoflavone Content of Leaves of Red Clover (*Trifolium Pratense* L.). *N.A.Jl agric. Res.*, 1967, 10:312-315.

17. Cox, R. I. ja Braden, A. W. The Metabolism and Physiological Effects of Phyto-Oestrogens in Livestock. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 1974, 10:122-129.
18. Dickinson, J. M.; Smith, G. R.; Randel, R. D. ja Pemberton, I. J. In Vitro Metabolism of Formononetin and Biochanin A in Bovine Rumen Fluid. *J. Anim. Sci.*, 1988, 66:1969-1973.
19. Gildersleeve, R. R.; Smith, G. R.; Pemberton, I. J. ja Gilbert, C. L. Detection of Isoflavones in Seedling Subterranean Clover. *Crop. Sci.*, 1991, 31:889-892.
20. Ho, H.; Chen, R.; Leung, L.; Chan, F.; Huang, Y. ja Chen, Z-Y. Difference in Flavonoid and Isoflavone Profile Between Soybean and Soy Leaf. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2002, 56 (6):289-295.
21. Kallela, K. Kasviestrogeeneista ja niiden vaikutuksesta. *Suomen Eläinlääkärilehti*, 1962a, 68:257-258.
22. Kallela K. The Oestrogen Content of Forage Plants in Finland. *Suomen Kemistilehti*, 1962b (B 35):116-118.
23. Kallela, K. The Incidence of Plant Oestrogens in Finnish Pasture and Fodder Plants with Special Reference to Their Possible Effects in Cases of Sterility in Ruminants. Tampereen Kirjapaino Oy 1964, väitöskirja 132s.
24. Kallela, K. The Oestrogenic Effect of Red Clover Pasture on Ovariectomized Heifer. *Nord. Vet.-Med.*, 1968, 20:185-192.
25. Kallela, K. Estrogenic and Anti-estrogenic Characteristics of Common Finnish Fodders. *Nord. Vet.-Med.* 1974 (26):97-107.
26. Kallela K. The Estrogenic Effect of Silage Fodder. *Nord. Vet.-Med.*, 1980, 32:480-486.
27. Kallela, K. Heinonen, K. ja Saloniemi, H. Plant Oestrogens; the Cause of Decreased Fertility in Cows, A Case Report. *Nord. Vet.-Med.*, 1984, 36:124-129.
28. Kallela, K.; Saastamoinen, I. ja Huokuna, E. Variation on the Content of Plant Oestrogens in Red Clover-Timothy-Grass during the Growing Season. *Acta Vet. Scand.*, 1987, 28:255-262.
29. Kallela, K.; Saastamoinen, I.; Huokuna, E. ja Hakkola, H. Kasviestrogeenipitoisuuden vaihtelut muutamien puna-apilalajikkeiden välillä Pohjois- ja Etelä-Suomessa. *Suomen Eläinlääkärilehti*, 1988, 94 (6): 287-291.
30. Kelly, R. W.; Shackell, G. H. ja Allison, A. J. Reproductive Performance of Ewes Grazing Red Clover (Grasslands Pawera) or White Clover-Grass Pasture at Mating. *N. Z. J. Exp. Agric.*, 1980, 8:87-91.
31. Khodabandehlou, H.; Hoffman, B. ja Pallauf, J. Investigations on the Occurrence and Content of Oestrogenic Activity in Cattle Feed in the State of Central Hesse, Germany. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 1997, 104:269-340.
32. Klejdus, B.; Mikelova, R.; Petrlova, J.; Potésíl, D.; Adam, V.; Stiborova, M.; Hodek, P.; Vacek, J.; Kizek, R. ja Kubán, V. Evaluation of Isoflavone Aglycon and Glycoside Distribution in Soy Plants and Soybeans by Fast Column High-Performance Liquid Chromatography Coupled with a Diode-Array Detector. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53:5848-5852.
33. Lundh, T. Uptake, Metabolism and Biological Effects of Plant Estrogens in Sheep and Cattle. SLU/Repro, Uppsala 1990, väitöskirja 195s.

34. Lundh, T. Metabolism of Estrogenic Isoflavones in Domestic Animals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1995, 208 (1):33-39.
35. Ma D-F.; Qin, L-Q.; Wang, P-Y. ja Kato, R. Soy Isoflavone Intake Inhibits Bone Formation in Menopausal Women: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2008, 62:155-161.
36. McDonald, M. F. Effects of Plant oestrogens in Ruminants. *Nutritional Society of New Zealand*, 1995, 20:43-51.
37. McMurray, C. H.; Laidlaw, A. S. ja McElroy, M. The Effect of Plant Development and Environment on Formononetin Concentration in Red Clover (*Trifolium Pratense* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 1986, 37:333-340.
38. McVeigh, B. L.; Dillingham, B. L.; Lampe, J. W. ja Duncan A. L. Effect of Soy Protein Varying in Isoflavone Content on Serum Lipids in Healthy Young Men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2006, 83 (2):244-251.
39. Moorby, J. M.; Fraser, M. D.; Theobald, V. J.; Wood, J. D. ja Haresign, W. The Effect of Red Clover Formononetin Content on Live-Weight Gain, Carcass Characteristics and Muscle Equol Content of Finishing Lambs. *Animal Science*, 2004, 79:303-313.
40. Morito, K.; Hirose, T.; Kinjo, J.; Hirakawa, T.; Okawa, M.; Nohara, T.; Ogawa, S.; Inoue, S.; Muramatsu, M. ja Masamune, Y. Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α and β . *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24(4):351-356.
41. Mustonen, E.; Tuori, M.; Saastamoinen, I.; Nykänen-Kurki, P.; Isolahti, M.; Saloniemi, H. ja Vanhatalo A. Puna-apilalajikkeiden Kasviestrogeenit. Maataloustieteenpäivät 2006. www.smts.fi.
42. Mustonen, E.; Tuori, M.; Saastamoinen, I.; Taponen, J.; Wähälä, K. ja Vanhatalo A. Equol in Milk and Plasma of Red Clover Silage Fed Dairy Cows. *Julkaisematon*.
43. Mustonen, E.; Tuori, M.; Saastamoinen, I.; Taponen, J.; Saloniemi, H. ja Vanhatalo, A. Effect of Protein Supplementation on Milk Equol Content of Cows Fed Red Clover Silage. *Kongressikirja: World Buiatrics Congress XXV 6-11.7.2008, Budapest, Unkari*.
44. Muthyala, R. S.; Ju, Y. H.; Sheng, S.; Williams, L. D.; Doerge, D. R.; Katzenellenbogen, B. S.; Helferich, W. G. ja Katzenellenbogen, J. A. Equol, a Natural Estrogenic Metabolite from Soy Isoflavones: Convenient Preparation and Resolution of *R*- and *S*-equols and Their Differing Binding and Biological Activity Through Estrogen Receptors alpha and beta. *Biorg. Med. Chem.*, 2004, 12:1559-1567.
45. Nilsson, A.; Hill, J. L. ja Davies, H. L. An *in vitro* Study of Formononetin and Biochanin A Metabolism in Rumen Fluid From Sheep. *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 148:92-98.
46. Nwannenna, A. I.; Madej, A.; Lundh, T. J-O. ja Fredriksson, G. Effects of Oestrogenic Silage on Some Clinical and Endocrinological Parameters in Ovariectomized Heifers. *Acta Vet. Scand.*, 1994, 35:173-183.
47. Nwannenna, A. I.; Lundh, T. J-O.; Madej, A.; Fredriksson, G. ja Björnberg, G. Clinical Changes in Ovariectomized Ewes Exposed to Phytoestrogens and 17 β -Estradiol Implants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1995, 208 (1):92-97.
48. Pettersson, H.; Holmberg, T.; Kiessling, K-H. ja Rutqvist, L. Växtöstrogener i foder och rereproduktionsstörningar hos idisslare. *Svensk Veterinärtidning*, 1984, 36 (14):677-683.

49. Rumball, W.; Keogh, R. G.; Miller, J. E. ja Claydon, R. B. 'Grasslands G27' Red Clover (*Trifolium pratense* L.). N. Z. J. Agric. Res., 1997, 40 (3):369-372 (Abstrakti).
50. Saloniemi H.; Wähälä, K.; Nykänen-Kurki, P.; Kallela, K. ja Saastamoinen, I. Phytoestrogen Content and Estrogenic Effect of Legume Fodder. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1995, 208 (1):13-17.
51. Sarelli, L.; Saastamoinen, I.; Smolander, A. ja Saloniemi, H. Kasviestrogeenit Vaginaprolapsien Mahdollisena aiheuttajana – Tapausselostus. Helsingin Yliopisto, Kotieläintieteen laitos, 2001.
52. Sarelli, L.; Tuori, M.; Saastamoinen, I.; Syrjälä-Qvist, L. ja Saloniemi, H. Phytoestrogen Content of Birdsfoot Trefoil and Red Clover: Effects of Growth Stage and Ensiling Method. Acta Agric. Scand., Sect A, Animal Sci., 2003, 53:58-63.
53. Schultz, G. Oestrogen-Effective Isoflavones in *Trifolium Pratense* (Red Clover). Distribution in Superterranean Parts of Plants and Occurrence as "Bound" Isoflavones. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., 1967, 5 (74):118-120.
54. Senger, P. L. Pathways to Pregnancy and Parturition. 2. ed., Current Conceptions, Inc., Washington State University & Technology Park, 2003.
55. Sivesind, E. ja Sequin, P. Effects on the Environment, Cultivar, Maturity, and Preservation Method on Red Clover Isoflavone Concentration. J. Agric. Food Chem., 2005, 53 (16):6397-6402.
56. Smith, G. R.; Randel, R.D. ja Bradshaw, C. Influence on Harvest Date, Cultivar, and Sample Storage Method on Concentration on Isoflavones in Subterranean Clover. Crop Science, 1986, 26:1013-1016.
57. Song, YJ.; Paik, H. Y. ja Joung, H. Soybean and Soy Isoflavone Intake Indicate a Positive Change in Bone Mineral Density for 2 Years in Young Korean Women. Nutrition Research, 2008, 28:25-30.
58. Swinny, E. E. Red Clover *Trifolium pratense* L. Phytoestrogens: UV-B Radiation Increases isoflavone Yield, and Postharvest Drying Methods Change the Glukoside Conjugate Profiles. J. Agric. Food Chem., 2005, 53 (21):8273-8278 (Abstrakti).
59. Thain, R.I. Bovine Infertility Possibly Caused by Subterranean Clover: A Preliminary Report. Aust. Vet. J., 1965, 41:277-281.
60. Tsao, R.; Papadopoulos, Y.; Yang, R.; Young, C. J. ja McRae, K. Isoflavone Profiles of Red Clovers and Their Distribution in Different Parts Harvested at Different Growing States. J. Agric. Food Chem., 2006, 54:5797-5805.
61. Vetter, J.; Seregélyésné Csomós Á ja Nagy, G. Comparative Study of Oestrogenic Isoflavones in *Trifolium* Genus. Bot. Közlem, 1991, 78 (1-2):137-149.
62. Vetter, J. Isoflavones in Different Parts of Common *Trifolium* Species. J. Agric. Food Chem., 1995, 43:106-108.
63. Wiseman, H.; O'Reilly, J. D.; Adlercreutz, H.; Mallet, A. I.; Bowey, E. A.; Rowland, I. R. ja Sanders, T. Isoflavone Phytoestrogens Consumed in Soy Decrease F₂-Isoprostane Concentrations and Increase Resistance of Low-Density Lipoprotein to Oxidation in Humans. Am. J. Clin. Nutr., 2000, 72 (2):395-400.

64. Wong, E. Detection and Estimation of Oestrogenic Constituents in Red Clover. *J. Sci. Food Agric.*, 1963, 13:304-308.
65. Wu, Q.; Wang, M. ja Simon, J. E. Determination of Isoflavones in Red Clover and Related Species by High-Performance Liquid Chromatography Combined With Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. A.*, 2003, 1016:195-209.
66. Zhuo, X-G.; Melby, M. K. ja Watanabe, S. Soy Isoflavone Intake Lowers Serum LDL Cholesterol: A Meta-Analysis of 8 Randomized Controlled Trials in Humans. *Journal of Nutrition*, 2004, 134:2395-2400.

Kasviestrogeenien määrittäminen naudan seerumista

1. TARVIKKEET

- Kierrekorkillisia koeputkia, 10ml (Kimax)
- pasteuripipettejä
- finnpipetit ja kärjet
- 1ml ruiskuja
- neuloja 0,80 x 80mm / 40mm
- Acrodisc LC13 0,45 µm suodattimia (PN 4452T)
- kartiopohjaisia HPLC ampulleja ja korkit
- typpihaihdutus
- Multi-TubeWortexe
- koeputkien tasoravistelijat (Stuart Roller Mixers SRT 1, Bibby Steril)
- Sentrifugi
- kromatografiapylväät, Waters Oasis HLM 3 cc (60mg) WAT094226 + hanat
- painekamio (P/N WAT 058833)

2. REAGENSIT

- sisäinenstandardi (flavone) 12µg/ml EtOH
- 0.2M natriumasetaatipuskuri pH 5,0 CH₃COONa x 3H₂O
- β-glukuronidaasi 500 yksikköä/ analysoitava putki
- sulfataasi 40 yksikköä/ analysoitava putki
- metanoli
- 5% metanoli
- eluointiliuos: asetoniitrili 90% + metanoli 10%
- dietyylieetteri (C₂H₅)₂O
- nestekromatografian ajoliuos: 10mM Na₂HPO₄ x 2H₂O pH 6,5
- nestekromatografian ajoliuos: metanoli
- standardit:

Sisäinenstandardi

Flavone, pitoisuus 12 µg/ml, tehty kantastandardista

Seosstandardi

Pitoisuus 25 µg/ml, tehty kantastandardeista:

Biochainin A (2mg/ml)

Daizein (1mg/ml)

Genistein (2mg/ml)

Formononetin (1mg/ml)

Standardisarjat (1-8) (tehty kantastandardeista)

Equol (esim. 0,280 mg/ml)

ODMA [O-desmethylangloliini] (esim. 0,1 mg/ml)

Seosstandardi (25 µg/ml)

STD 1
Equol 75 µg/ml
ODMA 12,5 µg/ml
Seos-std 12,5 µg/ml

STD 2
Equol 37,5 µg/ml
ODMA 6,25 µg/ml
Seos-std 6,25 µg/ml

STD 3
Equol 18,75 µg/ml
ODMA 3,125 µg/ml
Seos-std 3,125 µg/ml

STD 4
Equol 9,375 µg/ml
ODMA 1,563 µg/ml
Seos-std 1,563 µg/ml

STD 5
Equol 4,688 µg/ml
ODMA 0,788 µg/ml
Seos-std 0,788 µg/ml

STD 6
Equol 2,344 µg/ml
ODMA 0,395 µg/ml
Seos-std 0,395 µg/ml

STD 7
Equol 1,172 µg/ml
ODMA 0,1975 µg/ml
Seos-std 0,1975 µg/ml

STD 8
Equol 0,586 µg/ml
ODMA 0,09875 µg/ml
Seos-std 0,09875 µg/ml

3. SUORITUS

3.1 Kokeen aloitus

tehdään kaksi rinnakkaista jokaisesta näytteestä.

Putkiin pipetoidaan 200 µl sisäistä standardia. Haihdutetaan tyvellä kuiviin. Lisätään 1ml naudan seerumia, 100 µl β-glukuronidaasia, 80 µl sulfataasia ja 820 µl natriumasetaattipuskuria.

Suljetaan putket hyvin ja sekoitetaan vorteksoimalla. Viedään putket +37°C ravisteluun n. 18 tunniksi.

3.2 Pylvässuodatus

Sentrifugoidaan näytteet 5000 rpm 5min.

Asetetaan keräysputket, hanat ja pylväät alipainekammioon. Säädetään vesi-imulla pieni paine kammioon.

Pylväät esikäsitellään: 2ml etanolia ja sen jälkeen 2ml tislattua vettä (virtausnopeus noin 10ml/min)

Näytteet pipetoidaan pylväisiin ja säädetään virtausnopeudeksi hanalla noin 1-2 ml/min.

Näyteputkia huuhdellaan 5ml:lla 5% metanolia ja siirretään pylväisiin (virtausnopeus 10ml/min).

Kammioon vaihdetaan uudet keräysputket eluointia varten. Näyteputkia huuhdellaan 2 ml:lla eluointiliuosta (asetonitriili – metanoli seos), ja siirretään sitten pylväisiin. Virtausnopeus säädetään 1-2ml /min. Kun liuos on mennyt melkein kokonaan läpi, lisätään säiliöön vielä 2 ml eluointiliuosta. Lopuksi avataan hanat kokonaan ja nostetaan painetta niin, että saadaan pylväät kuiviksi.

Haihdutetaan eluointiputket kuivaksi typpellä ja lämmityksellä (n. 55-60°C) kuiviin.

3.3 Liuotus

Haihdutuksen jälkeen annetaan putkien jäähtyä ja lisätään 300 µl eetteriä. Vorteksoidaan 1min ja laitetaan sonikaattoriin 15minuutiksi sekä tasoravistelijaan 15 minuutiksi.

Sentrifugoidaan nopeasti 5000 rpm:lla.

Otetaan liuos putken pohjalta kartiopohjaiseen HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) pulloon.

Lisätään putkeen 300 µl eetteriä. Vorteksoidaan 1 min ja laitetaan sonikaattoriin 5minuutiksi sekä tasoravistelijaan 5 minuutiksi.

Sentrifugoidaan 500 rpm 5 min.

Siirretään liuos putken pohjalta samaan HPLC-pulloon, jossa on jo eetteri.

Haihdutetaan eetteri pois ampullista ja lisätään 150 µl metanolia ja korkitetaan. Vorteksoidaan ja laitetaan sonikaattoriin 15 minuutiksi.

Fuugataan nopeasti, jotta saadaan liuos pois korkista. Lisätään 50 µl 0,2M natriumasetaatipuskuri ja pakastetaan näytteet -20°C. Ennen HPCL ajoa suodatetaan 0,45 µm suodattimen läpi.

3.4 Standardit

Pipetoidaan putkiin jokaista standardia (8kpl) 200 µl sekä kaikkiin putkiin sisäinen standardi flavone (12 µg/ml) 200 µl ja haihdutetaan kuiviin typpellä. Jäähtymisen jälkeen lisätään 150 µl metanolia ja 50 µl natriumasetaatipuskuria. Sekoitetaan ja fuugataan 500rpm 5min.

Jaetaan valmiit standardit kahteen ampullipulloon. Näin standardeja tarvitsee tehdä vain joka toinen kerta.

3.5 Liuokset

0.2M natriumasetaatipuskuri pH 5.0

CH₃COONa x 3H₂O punnitaan 27,22g/l

Liuotetaan tislattuun veteen ja säädetään pH ensin väkevällä etikkahapolla lähelle pH-arvoa. Lopuksi pH:n säätö 20% etikkahapolla.

Täytetään merkkiin mittapullossa.

β -glukuronidaasi liuos (Sigma G-0751 500 000 units/1,12g)

Liuotetaan 0,56 g/ 50ml natriumasetaattipuskuriin. Sekoitetaan magneettisekoituksessa kunnes liukenee ja merkkiin puskurilla mittapullossa. Jaetaan kierrekorkillisiin putkiin á 1,1ml ja pakastetaan -80°C. Käytetään 100 μ l / tutkittava näyte -> on 500 yksikköä/ näyte.

sulfataasi (Sigma S-9626 5000 units/0,23)

Liuotetaan koko purkin sisältö (0,23g) / 10ml natriumasetaattipuskuriin. Ensin pienempään määrään ja pulloa puskurilla hyvin huuhdellen siirretään kaikki mittapulloon. Täytetään merkkiin. Jaetaan kierrekorkkisiin putkiin á 900 μ l ja pakastetaan -80°C.

Käytetään 80 μ l / tutkittava näyte -> on 40 yksikköä / näyte.

5% metanoli

100ml:n mittapulloon pipetoidaan 5ml metanolia ja täytetään merkkiin tislatulla vedellä.

eluointiliuos: asetonitriili 90% + metanoli 10%

100ml:n mittapulloon pipetoidaan 10ml metanolia ja täytetään merkkiin asetonitriilillä.

Liite 2

Kasviestrogeenien eristys nestekromatografiaa varten puna-apilasta (Petterssonin ohjeen mukaan)

1. LAITTEET JA VÄLINEET

- Mylly näytteen jauhamista varten, Buchi mixer B-400
- Sinikorkkisia 250ml pulloja
- Vaaka
- Vorteksi
- +100°C vesihaude
- Imupullot 1l sekä Büchnersuppilot
- Whatman 40 Ø 11cm tai vastaava
- teesiivilät ja lusikat
- mittalasi
- pyöröhaihdutin ja 1l:n haihdutuskolvit
- 50ml A-luokan mittapullot
- pieniä dekantterilaseja
- 20ml ruiskuja
- Acrodisc GF 0,45 µm suodattimia
- 10 ml A-luokan mittapulloja
- säilytyspullot
- Kromatografia-ampullit ja korkit ja sulkija
- finnpipetit ja kärjet

2. REAGENSIT

- Absolutoitu etanoli ETAX Aa (99,5%), kulutus noin 1110ml/ näyte
- 3.5 M HCl
- 0.2 M natriumasetaattipuskuri, pH 6,5
- Sisäinen standardi, flavone 6,25 mg/ml (Sigma F2003)

3. LIUOKSET

3.5 M HCl, 1l

Lisätään 290ml 37% HCL:a mittalasiin n. 500ml:aan tislattua vettä jäähauteessa olevaan dekantterilasiin. Kaadetaan 1000 ml:an mittapulloon ja täytetään tislattulla vedellä merkkiin.

0.2M natriumasetaattipuskur, 0,1l, pH 6,5

$\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ (M = 136,08 g/mol) punnitaan 2,7216g/0,1l

Liuotetaan tislattuun veteen ja säädetään pH 20% etikkahapolla. Täytetään merkkiin mittapullossa.

4. SUORITUS

4.1 Esikäsittely

Näytteet jauhetaan hienoksi myllyllä ja näytteen kuiva-aineprosentti määritetään (105°C 20-24h).

Jokaisesta näytteestä tehdään kolme rinnakkaismäärittystä. Punnitaan 5 g näytettä pulloihin. Pulloihin lisätään 25ml tislattua vettä pipetillä pullon reunoja huuhdellen niin, että kaikki näyte saadaan pullon pohjalle.

Pulloja ravistellaan vorteksilla 15 s ja jätetään näytteet hydrolysoitumaan huoneenlämpöön 60 minuutiksi.

Pulloihin lisätään 10ml 3.5 M HCl ja 80 ml EtOH, ravistellaan sekaisin ja kiehautetaan vesihautteessa. Pullojen annetaan jäähtyä huoneenlämmössä. Jos työtä ei jatketa heti, näytteet siirretään kylmähuoneeseen.

4.1 Näytteen suodatus ja haihuttaminen

Ennen suodattamista säilöpulloihin lisätään 500 µl sisäistä standardia (Flavone 6,25 mg/ml) ja sekoitetaan.

Näytteet suodatetaan seuraavasti:

Säilöpullon päälle laitetaan teesiivilä, kipataan ympäri ja rehu valutetaan teesiivilän avulla büchnersuppiloon siten, että rehu jää siivilään. Kun pulloa pidetään kallellaan, ei muodostu ilmataskua. Annetaan valua 3-5 min.

Pulloon rehun sekaan lisätään 40 ml etanolia, ravistellaan 1 min ja kipataan taas teesiivilään ja valutetaan 3-5 min. Tämä tehdään kaksi kertaa.

Pulloon lisätään vielä kolmannen kerran 40 ml etanolia ja ravistellaan 1 min. Tämän jälkeen näyte kaadetaan kokonaan suppiloon.

Huuhdellaan vielä pullon seinämiä etanolilla:

Lisätään pulloon 10 ml etanolia, ravistellaan ja kaadetaan suppiloon. Tämä tehdään kolme kertaa. Huuhdellaan myös näytepulloa, korkkia, lusikkaa, suppilon reunoja ja siivilää käyttäen 50ml etanolia. Kaiken etanolin erottamiseksi, näytettä voi painella lusikalla. Annetaan nesteen valua imupulloon, kunnes rehu on kuivaa (noin 10 min).

Imupullostsa näytteen voi joutua suodattamaan uudelleen suppilolla, jossa käytetään pehmeää ja tiheää suodatinpaperia (Whatman 42 tai 542), jotta saadaan uutteen hienojakoinen sakka pois ennen haihuttamista. Imupullo huuhdellaan kolme kertaa etanolilla (10 ml, 5 ml, 5 ml).

Etanoliuute siirretään isoon pyöröhaihuttimen kolviin ja imupullo huuhdellaan kolme kertaa etanolilla (10 ml, 5 ml, 5 ml). Haihdutetaan pyöröhaihuttimella +40-45°C vesihautteessa n. 20 ml tilavuuteen. Tämä kestää noin 15-20 min.

Näyte kaadetaan haihdutuskolvista 50 ml mittapulloon ja huuhdellaan kolvia 3-4 kertaa etanolilla (10 ml, 10 ml, 5 ml, 5 ml). Mittapullo täytetään etanolilla merkkiin asti ja ravistellaan hyvin.

Pullo laitetaan jääkaappiin ainakin parioksi vuorokaudeksi saostumisen vuoksi.

4.3 Laimennokset

Tehdään 48-72 h kuluttua (tai myöhemmin). Mittapullosta (älä sekoita) otetaan n. 20 ml pieneen dekanterilasiin ja suodatetaan se Acrodisc GF 0,45 µm suodattimella toiseen dekanteriin. Suodoksesta tehdään tarvittavat laimennokset 10ml mittapulloihin.

Laimennokset:

½ = 5 ml näytettä

1/5 = 2 ml näytettä

1/10 = 1 ml näytettä

1/100 = 100 µl näytettä

Täytetään mittapullot merkkiin asti etanolilla ja sekoitetaan huolellisesti. Loppu suodatettu näyte kaadetaan omaan 10 ml mittapulloon -> laimennos 1/1.

Loppu suodattamaton näyte laitetaan varalta isoon ampullipulloon.

Laimennospullot laitetaan jääkaappiin ainakin pariin vuorokaudeksi. (Laimennos 1/5 muodostaa paljon hienoa sakkaa. Kun pullo on ollut yön yli jääkaapissa, se ravistellaan, jolloin sakka laskeutuu tasaisesti pullon pohjalle ja reunoille -> helpottaa pipetointia.)

4.4 Pullotus

Tehdään tarraetiketit tietokoneella säilytys- kromatografiapulloihin sekä pullotelineisiin.

(Näytenro, laimennossuhde sekä valmistu tai pullotus pvm, työohjeen nro sekä tekijä).

Pipetoidaan suoraan mittapulloista 1 ml näytettä ampulleihin (kolme rinnakkaista). Jos saostumaa on niin paljon ettei pipetointi onnistu, suodatetaan näyte uudelleen: kaadetaan pullon sisältö pieneen dekanteriin, imetään injektioneulalla ruiskuun ja täytetään suodattimen läpi kolme rinnakkaista pulloa.

Lisäksi pipetoidaan kolme rinnakkaisnäytettä kromatografiapulloihin seuraavasti: 450 µl laimennosta + 150 µl 0.2 M natriumasetaattipuskuria, pH 6,5.

Valmiit näytteet viedään kylmähuoneeseen tai jääkaappiin odottamaan kromatografia-ajoa.

5. SISÄINEN STANDARDI

Flavone, pitoisuus 6,25 mg/ml EtOH.

6. VIITTEET

Alkuperäisviite: Hans Pettersson, J. Assoc. Off. Anal. Chem. (vol. 67, no. 3, 1984)

Kasviestrogeenien määrittäminen väkirehusta (soija, rypsi, täysrehu)

1. VÄLINEET

- Mylly (Fritsch)
- Sarjavesihaude pystyjäähdyttäjällä
- Ultraääni
- rotavapori
- sentrifugi
- hioksellisia keittokolveja, 250 ml
- pyröhaihdutuskolveja, 250 ml
- Finnpipetit ja kärjet
- Mittapulloja, 50 ml ja 10 ml
- muovisia korkillisia fuugiputkia, 50 ml
- Ampullipulloja, 50 ml
- Kromatografiampulleja
- Acrodisc-ruiskusuodattimia 0,45 µm
- 10ml tai 20ml ruiskuja

2. REAGENSIT

- 96% EtOH
- Absolutoitu etanoli ETAX Aa (99,5%)
- 2 M HCl (82,81 ml/500ml)
- 6.9 M 1.0 M ja 0.1 M NaOH-liuoksia pH:n säätöön
- Flavone 6,25 mg/ml sisäinen standardi saannon tarkkailuun

3. SUORITUS

- 1) Jauhetaan näyte hienoksi myllyllä ja tehdään kuiva-ainemääritys (105°C 20-24h).
- 2) Punnitaan 1 g jauhettua näytettä keittokolviin (250ml) ja lisätään 40 ml 96% EtOH sekä 500 µl Flavonea (6,26 mg/ml). Tehdään kolme rinnakkaismäärittystä.
- 3) Pidetään kolveja ultraäänessä 20 minuuttia
- 4) Lisätään 10 ml 2 M HCL ja keitetään vesihauteessa 80-100°C pystyjäähdyttäjällä 2 tuntia.
- 5) Kun liuos on jäähtynyt, säädetään pH NaOH:lla 4,00:ksi. Lisätään ensin 2,1 ml 6.9 M NaOH (kuumenee, annetaan jäähtyä). Jatketaan pH:n säätämistä 1.0 M ja 0.1 M NaOH:lla, kunnes pH on 4,00.
- 6) Siirretään haihdutuskolviin huuhdellen 96% etanolilla ja haihdutetaan rotavaporilla +45°C:ssa n. 30ml tilavuuteen.
- 7) Siirretään 50ml mittapulloon huuhdellen pyöröhaihdutuskolvia pienellä määrällä tislattua vettä ja etanolia (Aa) ja täytetään etanolilla merkkiin.
- 8) Siirretään sakkoineen 50 ml korkillisiin muovisiin koeputkiin ja sentrifugoidaan 20 min, 300rpm.

- 9) Otetaan kirkas supernatantti isoon ampullipulloon ja laitetaan pakastimeen yön yli.
- 10) Suodatetaan seuraavana päivänä supernatantti 0,45 µm Acrodisc-ruiskusuodattimen läpi ja tehdään tarvittavat laimennokset 10 ml mittapulloihin etanoliin.

4. LÄHDE

L.S. Hutabarat et al.: Isoflavones and coumesterol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia. Journal of food composition and analysis (no. 14: 14-58, 2001)