

Melanie Stürtz

---

# Analytik von Isoflavonen aus Soja, Rotklee und Iris sowie deren Quantifizierung in Nahrungsergänzungsmitteln



Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Analytik von Isoflavonen aus Soja, Rotklee und Iris  
sowie deren Quantifizierung in  
Nahrungsergänzungsmitteln

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Melanie Stürtz  
aus Hannover

## **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2008

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2008

978-3-86727-883-6

1. Referent:

Professor Dr. Peter Winterhalter

2. Referent:

apl. Professor Dr. Ulrich Engelhardt

eingereicht am:

13.08.2008

mündliche Prüfung (Disputation) am:

17.10.2008

Druckjahr 2008

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig, Fakultät für  
Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2008

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2008

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-883-6

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Stürtz, M., Lander, V., Schmid, W., Winterhalter, P.: Preparative isolation of isoflavones from soy and red clover, *Mol. Nutr. Food Res* 50: 356-361 (2006).

Rüfer, C. E., Bub, A., Möseneder, J., Winterhalter, P., Stürtz, M., Kulling, S. E.: Pharmacokinetics of the soybean isoflavone daidzein in its aglycone and glucoside form: a randomized, double-blind, cross-over study, *Am. J. Clin. Nutr.* 87: 1314-1323 (2008).

Stürtz, M., Lander, V., Schmid, W., Winterhalter, P.: Quantitative Determination of Isoflavones in Soy Based Nutritional Supplements by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Verbr. Lebensm.* 3: 127-136 (2008).

Stürtz, M., Maul, R., Kulling, S. E., Winterhalter, P.: Isolation and characterization of isoflavones with methylenedioxy-group from *Iris germanica*, *Mol. Nutr. Food Res.*, in Vorbereitung.

## **Tagungsbeiträge**

Stürtz, M., Lander, V., Winterhalter, P.: Preparative isolation of isoflavones from soy and red clover. (Poster) 34. Deutscher Lebensmittelchemikertag/Euro Food Chem XIII, Hamburg (2005). Veröffentlicht in Abstract Volume Deutscher Lebensmittelchemikertag/Euro Food Chem XIII, Hamburg, 2005, S. 157 und Lebensmittelchemie 60, 84 (2006).

Stürtz, M., Lander, V., Winterhalter, P.: Survey on the phytoestrogen content in nutritional supplements. (Poster) 34. Deutscher Lebensmittelchemikertag/Euro Food Chem XIII, Hamburg (2005). Veröffentlicht in Abstract Volume Deutscher Lebensmittelchemikertag/Euro Food Chem XIII, Hamburg, 2005, S. 180 und Lebensmittelchemie 60, 92 (2006).

Stürtz, M., Lander, V., Schmid, W., Winterhalter, P.: Preparative isolation of isoflavones from soy and red clover. (Poster) 25<sup>th</sup> Anniversary Chair of Food Chemistry Würzburg: Food chemistry – link between Chemistry, Biology and Medicine, Würzburg, 14. Oktober (2005).

Lander, V., Stürtz, M., Schmid, W., Winterhalter, P.: Beitrag zur Analytik von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln. (Poster) Arbeitstagung des Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft innerhalb der GDCh Freising-Weihenstephan (2006). Veröffentlicht in Lebensmittelchemie 60 (5), 116 (2006).

Stürtz, M., Lander, V., Winterhalter, P.: Analytik von Isoflavonen aus Rotklee (*Trifolium pratense* L.). (Poster) 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden (2006). Abstract veröffentlicht in: Lebensmittelchemie 61 (3): 50 (2007).

Stürtz, M., Lander, V., Schmid, W., Winterhalter, P.: Beitrag zur Analytik von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln (Vortrag), Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft innerhalb der GDCh, Oldenburg (2006). Kurzfassung veröffentlicht in Lebensmittelchemie 60 (5), 116 (2006).

Stürtz, M., Maul, R., Kulling, S. E., Winterhalter, P.: Isolierung von Isoflavon Aglykonen aus der Iriswurzel (*Iris germanica*). (Poster) 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg (2007). Veröffentlicht in Abstract-Band Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen-Nürnberg 2007, S. 201.

Stürtz, M., Winterhalter, P.: Isolierung von Isoflavonen aus *Iris germanica* unter Anwendung der High-Speed Countercurrent Chromatography. (Poster) 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg (2007). Veröffentlicht in Abstract-Band Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen-Nürnberg 2007, S. 202.

Stürtz, M., Ververidis, F., Winterhalter, P.: Preparative Isolation of Stilbenes. (Poster) 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg (2007). Veröffentlicht in Abstract-Band Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen-Nürnberg 2007, S. 203.

Trantas, E., Jerz, G., Stürtz, M., Winterhalter, P., Ververidis, F.: Engineering of biologically active plant pathways in yeast to produce compounds with high additive value. (Poster) 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg (2007). Veröffentlicht in Abstract-Band Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen-Nürnberg 2007, S. 210.

Maul, R., Stürtz, M., Winterhalter, P., Kulling, S. E.: Analysis of irilone and irilone derivatives in red clover supplements and *Iris germanica* extracts. (Poster) 25<sup>th</sup> Anniversary Symposium of "Food Chemistry & Toxicology – Cornerstones of Life Sciences in Chemistry", Kaiserslautern (2007) S. 69-70.

Stürtz, M., Winterhalter, P., Maul, R., Kulling, S. E.: Isolation and characterisation of isoflavones with methylenedioxy-group from *Iris germanica*. (Poster) 25<sup>th</sup> Anniversary Symposium of "Food Chemistry & Toxicology – Cornerstones of Life Sciences in Chemistry", Kaiserslautern (2007) S. 82-83.

Stürtz, M., Lander, V., Jerz, G., Winterhalter, P.: Isolation and characterization of isoflavones from iris (*Iris germanica* L.) and red clover (*Trifolium pratense* L.) by HSCCC. (Poster) CCC 2008 – 5th International Conference on Countercurrent Chromatography, Rio de Janeiro, Brasilien (2008).

## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die einen wichtigen Beitrag zum erfolgreichen Ausgang dieser Arbeit geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Peter Winterhalter, für die Überlassung des interessanten Themas, sein stetes Vertrauen, seine Förderung und anhaltende Unterstützung. Die gewährten Freiräume bei der Durchführung meiner Arbeit haben sicherlich zum Gelingen beigetragen, außerdem erhielt ich viel Freude am wissenschaftlichen Arbeiten und konnte wertvolle Erfahrung im Ausland sammeln.

Für die Übernahme des Koreferats bin ich Herrn Professor Ulrich H. Engelhardt dankbar. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Professor Dirk Selmar und Herrn Professor Hermann Wätzig für das Mitwirken an der Prüfungskommission.

Ebenso möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei Frau Dr. Vera Lander vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit bedanken, die Impulse für diese Doktorarbeit gab und die untersuchten Nahrungsergänzungsmittel zur Verfügung stellte.

Ein großer Dank gilt dem Botanischen Garten Braunschweig für die Aufzucht meiner Kleepflanzen, wobei namentlich insbesondere Michael Kraft und Thorsten Marschall zu erwähnen sind. Thorsten – vielen Dank für die hilfreichen Gespräche und außeruniversitären Treffen!

Ein dickes Dankeschön geht an Frau Carola Balcke für ihre ausdauernden und präzisen orthographischen Korrekturen bei dieser Doktorarbeit sowie bei anderen Veröffentlichungen! Ebenso war sie sehr hilf- und ideenreich bei der Beschaffung von schwerzugänglicher Literatur.

Monika Messerer, Dr. Silke Hillebrand und Dr. Gerold Jerz danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie für wertvolle Hilfestellungen bei der Auswertung.

Danke sagen möchte ich an meine Freunde und ehemaligen Laborkollegen Dr. Saskia Eichhorn, Dr. Michael Schwarz und Dr. Michael Rentzsch für Ihre tolle Unterstützung.

Für eine schöne und abwechslungsreiche Zeit möchte ich mich bei den „Kellerkindern“ (Susi, Steffi, Moni, Silke, Ely, Micha und Peter) bedanken. Allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie der TU Braunschweig sei ebenfalls mein herzlicher Dank für die gute Zusammenarbeit ausgesprochen.

Ich möchte mich bei meinen Freunden bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die notwendige Abwechslung sorgten. Manch´ Übereifer oder Frust wurde so durch schöne Freizeitaktivitäten gestoppt. Ein großer Dank geht an Matze und Romy für das Lesen dieser Arbeit!

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern! Vielen Dank für Eure ausdauernde Unterstützung, das mir entgegen gebrachte Vertrauen sowie Euer großes Verständnis für mein Studium und die Promotion.

Steffen - dir gilt vom Herzen größter Dank! Du warst immer da, wenn ich Dich brauchte und standest verlässlich hinter mir. Durch Deine motivierende Art und Deinen liebevollen Zuspruch konnte ich diese Arbeit abschließen. Danke!!



## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                       |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Inhaltsverzeichnis.....                                                               | VII  |
| Abbildungsverzeichnis.....                                                            | XI   |
| Tabellenverzeichnis.....                                                              | XVII |
| Abkürzungs- und Symbolverzeichnis .....                                               | XIX  |
| 1 Einleitung und Kenntnisstand .....                                                  | 1    |
| 1.1 Phytoestrogene: Chemische Struktur, Vorkommen und<br>biologische Funktion .....   | 1    |
| 1.1.1 Definition von Phytoestrogenen.....                                             | 1    |
| 1.1.2 Vorkommen und chemische Struktur.....                                           | 3    |
| 1.1.3 Verbreitung in Lebensmitteln .....                                              | 8    |
| 1.1.4 Metabolismus und Bioverfügbarkeit.....                                          | 12   |
| 1.1.5 Physiologische Eigenschaften von Isoflavonen .....                              | 18   |
| 1.1.6 Bedeutung für die Pflanze .....                                                 | 37   |
| 1.2 Soja: Pflanze, Bedeutung, Verbreitung.....                                        | 39   |
| 1.2.1 Soja ( <i>Glycine max</i> L.) – Morphologie und chemische Zusammensetzung ..... | 39   |
| 1.2.2 Isoflavonspektrum von Soja und daraus produzierten Lebensmitteln .....          | 43   |
| 1.2.3 Bedeutung und Anbaugebiete .....                                                | 48   |
| 1.3 Rotklee .....                                                                     | 50   |
| 1.3.1 Wissenswertes zur Pflanze Rotklee ( <i>Trifolium pratense</i> L.) .....         | 50   |
| 1.3.2 Inhaltsstoffe von Rotklee .....                                                 | 53   |
| 1.3.3 Isoflavone in Rotklee .....                                                     | 56   |
| 1.3.4 Verwendung von Rotklee.....                                                     | 59   |



---

|       |                                                                                                                          |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.4   | Iris.....                                                                                                                | 59  |
| 1.5   | Kudzu.....                                                                                                               | 62  |
| 1.6   | Alfalfa.....                                                                                                             | 65  |
| 1.7   | Weintraubenschalen.....                                                                                                  | 66  |
| 1.8   | Nahrungsergänzungsmittel.....                                                                                            | 67  |
| 1.8.1 | Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Phytoestrogenen.....                                                             | 69  |
| 2     | Problemstellung und Zielsetzung.....                                                                                     | 72  |
| 3     | Ergebnisse und Diskussion.....                                                                                           | 73  |
| 3.1   | Analytik von Isoflavonen.....                                                                                            | 73  |
| 3.1.1 | Nasschemische Methoden.....                                                                                              | 73  |
| 3.1.2 | HPLC-Untersuchungen und HPLC-(ESI)-MS-Kopplung.....                                                                      | 74  |
| 3.1.3 | Dünnschichtchromatographie.....                                                                                          | 93  |
| 3.2   | Isolierung von Isoflavonen.....                                                                                          | 95  |
| 3.2.1 | Prinzip der Countercurrent Chromatography.....                                                                           | 95  |
| 3.2.2 | Isolierung von Isoflavonen aus Soja ( <i>Glycine max.</i> L.).....                                                       | 98  |
| 3.2.3 | Isolierung von Isoflavonen aus Rotklee ( <i>Trifolium pratense</i> L.).....                                              | 110 |
| 3.2.4 | Isolierung von Isoflavonen aus Iris ( <i>Iris germanica</i> L.).....                                                     | 129 |
| 3.3   | Isolierung weiterer Phytoestrogene.....                                                                                  | 139 |
| 3.3.1 | Analyse der Rhizomen von Kudzu ( <i>Pueraria lobata</i> ) und Isolierung eines Isoflavon-C-Glucosides mittels HSCCC..... | 139 |
| 3.3.2 | Isolierung von Resveratrol aus Weintraubentrester.....                                                                   | 145 |
| 3.3.3 | Isolierung des Coumestans Coumestrol aus Alfalfa-Sprossen.....                                                           | 147 |

---

|       |                                                                                                  |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4   | Quantifizierungsmethoden .....                                                                   | 149 |
| 3.4.1 | Quantifizierung von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Soja-Extrakten ..... | 149 |
| 3.4.2 | Quantifizierung von Isoflavonen aus Nahrungsergänzungsmitteln mit Rotklee-Zusatz .....           | 173 |
| 3.5   | Analytik von Rotklee und weiterer Kleesorten.....                                                | 182 |
| 3.6   | Biologische Testungen .....                                                                      | 185 |
| 3.6.1 | Test auf Zytotoxizität.....                                                                      | 186 |
| 3.6.2 | Bestimmung des antioxidativen Potentials von Isoflavonen .....                                   | 191 |
| 4     | Experimenteller Teil .....                                                                       | 193 |
| 4.1   | Material, Geräte und Chemikalien .....                                                           | 193 |
| 4.1.1 | Chemikalien .....                                                                                | 193 |
| 4.1.2 | Pflanzenmaterial .....                                                                           | 194 |
| 4.1.3 | Probenmaterial (Nahrungsergänzungsmittel) .....                                                  | 195 |
| 4.1.4 | Sonstige Materialien .....                                                                       | 195 |
| 4.2   | Methoden und Geräte .....                                                                        | 196 |
| 4.2.1 | Analytische Methoden .....                                                                       | 196 |
| 4.2.2 | Massenspektrometrie .....                                                                        | 196 |
| 4.2.3 | Analytische Säulen .....                                                                         | 197 |
| 4.2.4 | Verwendete Fließmittelsysteme und Gradienten.....                                                | 197 |
| 4.2.5 | NMR.....                                                                                         | 198 |
| 4.2.6 | Photometer .....                                                                                 | 199 |

---

|        |                                                                            |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.7  | Präparative Methoden .....                                                 | 199 |
| 4.2.8  | Extraktionen .....                                                         | 201 |
| 4.2.9  | Amberlite® XAD-7-Festphasenextraktion .....                                | 203 |
| 4.2.10 | Amberlite® XAD-2-Festphasenextraktion .....                                | 203 |
| 4.2.11 | Polyamid-Festphasenextraktion .....                                        | 203 |
| 4.2.12 | Gelchromatographie .....                                                   | 204 |
| 4.2.13 | Dünnschichtchromatographie .....                                           | 204 |
| 4.2.14 | Bestimmung eines geeigneten Fließmittelsystems für die HSCCC .....         | 205 |
| 4.2.15 | Quantitative Bestimmungen .....                                            | 206 |
| 4.2.16 | Screening von Trifolium-Proben und verschiedener Klee-Arten .....          | 218 |
| 4.2.17 | Biologische Evaluierungen .....                                            | 219 |
| 4.3    | Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Verbindungen ..... | 224 |
| 5      | Zusammenfassung .....                                                      | 249 |
| 6      | Literaturverzeichnis .....                                                 | 255 |
| 7      | Anhang .....                                                               | 287 |

## Abbildungsverzeichnis

|               |                                                                                                                                                             |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abbildung 1:  | Vergleich der Strukturen des weiblichen Follikelhormons 17- $\beta$ -Estradiol mit den Phytoestrogenen Coumestrol (Coumestan) und Daidzein (Isoflavon). . 2 |
| Abbildung 2:  | Strukturell wichtige Klassen von Phytoestrogenen. .... 3                                                                                                    |
| Abbildung 3:  | Chromon als Strukturelement von 2-Phenylchromone (Flavone) und 3-Phenylchromone (Isoflavone). .... 4                                                        |
| Abbildung 4:  | Überblick über die Strukturen der wichtigsten Isoflavone. .... 5                                                                                            |
| Abbildung 5:  | Strukturen der Stilbene Resveratrol und dessen Glucosid Piceid. .... 6                                                                                      |
| Abbildung 6:  | Substitutions- und Variationsmuster von Lignanen. .... 7                                                                                                    |
| Abbildung 7:  | Die ernährungsphysiologisch wichtigen Lignane SDG und Matairesinol. .... 8                                                                                  |
| Abbildung 8:  | Metabolismus von Daidzein durch Darmbakterien. .... 13                                                                                                      |
| Abbildung 9:  | Metabolismus des Isoflavons Genistein durch die assoziierte Darmflora. ... 14                                                                               |
| Abbildung 10: | Metabolismus von Glycitein durch die Darm assoziierte Mikroflora. .... 15                                                                                   |
| Abbildung 11: | Oxidativer Metabolismus von Daidzein durch Humanlebermikrosomen. ... 16                                                                                     |
| Abbildung 12: | Metabolisierung von Secoisolariciresinol-diglucosid und Matairesinol. .... 17                                                                               |
| Abbildung 13: | Übersicht über die biologischen Aktivitäten von Isoflavonen. .... 20                                                                                        |
| Abbildung 14: | Artspezifische Symbiose von Rhizobien einer Sojapflanze. .... 38                                                                                            |
| Abbildung 15: | Weltweite Verbreitung von Sojabohnen. .... 40                                                                                                               |
| Abbildung 16: | Sojabohne ( <i>Glycine max</i> (L.)). .... 41                                                                                                               |
| Abbildung 17: | Sojabohnen-Hülse mit gereiften Samen. .... 42                                                                                                               |
| Abbildung 18: | Isoflavone aus Soja in der Aglykon-Form. .... 43                                                                                                            |
| Abbildung 19: | Konjugationsformen, der in Soja enthaltenen Isoflavone. .... 44                                                                                             |
| Abbildung 20: | Die 15 größten Sojaproduzenten weltweit. .... 50                                                                                                            |

---

|               |                                                                           |    |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 21: | Rotklee ( <i>Trifolium pratense</i> L.).                                  | 51 |
| Abbildung 22: | Dreiblatt von Rotklee.                                                    | 52 |
| Abbildung 23: | Inhaltsstoffe aus Rotklee: Pterocarpane und Clovamide.                    | 54 |
| Abbildung 24: | Grundgerüst eines Flavones.                                               | 54 |
| Abbildung 25: | Grundstruktur eines Isoflavons.                                           | 57 |
| Abbildung 26: | Pflanzenteile von <i>Iris germanica</i> (L.) ohne Wurzel.                 | 60 |
| Abbildung 27: | Buschartige Wuchsweise von <i>Iris germanica</i> .                        | 60 |
| Abbildung 28: | Isoflavone mit einer Methylendioxystuktur aus <i>Iris germanica</i> (L.). | 62 |
| Abbildung 29: | Kudzupflanze mit der typischen Blattform.                                 | 63 |
| Abbildung 30: | Invasives Wachstum der Kudzu-Pflanze.                                     | 64 |
| Abbildung 31: | Foto von Luzerne (Alfalfa, <i>Medicago sativa</i> ).                      | 66 |
| Abbildung 32: | HPLC-Chromatogramm eines XAD-7-Extraktes aus Soja.                        | 75 |
| Abbildung 33: | HPLC-DAD-Chromatogramm eines Extraktes von Sojaflocken.                   | 76 |
| Abbildung 34: | Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung bei Isoflavonen.                | 77 |
| Abbildung 35: | HPLC-Chromatogramm von Daidzin und Glycitin aus Soja.                     | 78 |
| Abbildung 36: | Totalionen-Chromatogramm eines Sojamehls.                                 | 79 |
| Abbildung 37: | Massenspektren der malonylierten Isoflavone aus Soja.                     | 80 |
| Abbildung 38: | HPLC-Chromatogramm von frisch geernteten Soja-Bohnen.                     | 80 |
| Abbildung 39: | Schwarzer Soja ( <i>Glycine max</i> (L.), Merr forma Nigra).              | 81 |
| Abbildung 40: | MS <sup>2</sup> -Spektren von Schwarzen Soja.                             | 83 |
| Abbildung 41: | HPLC-DAD-Chromatogramm eines Extraktes aus schwarzem Soja.                | 84 |
| Abbildung 42: | HPLC-DAD-Chromatogramm des ethanolischen Rotklee-Extraktes.               | 85 |
| Abbildung 43: | HPLC-DAD-Chromatogramm des XAD-7-Extraktes von Rotklee.                   | 86 |

---

|               |                                                                                                                              |     |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 44: | TIC eines Extraktes aus Rotkleeblättern ( <i>Trifolium pratense</i> L.). . . . .                                             | 87  |
| Abbildung 45: | HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus Rotkleeblüten. . . . .                                                                | 88  |
| Abbildung 46: | LC-(ESI)-MS <sup>2</sup> -Analyse eines Extraktes aus Rotkleeblüten (oben) und Struktur von Peonidin-3-glucosid (unten)..... | 89  |
| Abbildung 47: | HPLC-Chromatogramme verschiedener Extrakte von Iris-Varietäten. ....                                                         | 90  |
| Abbildung 48: | HPLC-MS-Totalionenstrom eines Extraktes von <i>Iris germanica</i> L. ....                                                    | 91  |
| Abbildung 49: | DC-Screening der Isoflavone Daidzin und Glycitin aus Soja. ....                                                              | 93  |
| Abbildung 50: | DC-Untersuchungen von <i>Iris germanica</i> . ....                                                                           | 94  |
| Abbildung 51: | Aufbau eines Coils (J-Typ) der CCC. ....                                                                                     | 96  |
| Abbildung 52: | Aufbau einer CCC-Anlage. .. .                                                                                                | 97  |
| Abbildung 53: | Fließschema zur Isolierung von Isoflavonen aus Soja ( <i>Glycine max</i> L.). .                                              | 100 |
| Abbildung 54: | HSCCC-Trennung des XAD-7-Extraktes von Soja. ....                                                                            | 102 |
| Abbildung 55: | HSCCC-Trennung der Fraktion 2 aus Soja. ....                                                                                 | 104 |
| Abbildung 56: | UV-Spektrum von Glycitin.....                                                                                                | 104 |
| Abbildung 57: | HSCCC-Trennung von Glycitin und Daidzin mittels Stufengradienten. ....                                                       | 105 |
| Abbildung 58: | LC-(ESI)-MS-Analyse der isolierten Isoflavone Daidzin und Glycitin. ....                                                     | 106 |
| Abbildung 59: | <sup>1</sup> H-NMR von Daidzin (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) im aromatischen Bereich. ...                                  | 107 |
| Abbildung 60: | Kristallbildung des Isoflavons Glycitin nach der HSCCC-Trennung. ....                                                        | 110 |
| Abbildung 61: | Übersicht über die Isolierung von Isoflavonen aus Rotklee.....                                                               | 112 |
| Abbildung 62: | HSCCC-Trennung der glykosidischen Isoflavone aus Rotklee.....                                                                | 113 |
| Abbildung 63: | Übersicht über die aus Rotklee isolierten glucosidischen Isoflavone. ....                                                    | 115 |
| Abbildung 64: | Relevante <sup>2,3</sup> J C-H Long-range Kopplungen (HMBC) von Sissotrin. ....                                              | 117 |
| Abbildung 65: | Heteronukleare Fernkorrelation des HMBCs von Sissotrin. ....                                                                 | 117 |

|               |                                                                                                              |     |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 66: | HSCCC-Lauf der Trennung von Isoflavon-Aglykonen aus Rotklee. ....                                            | 119 |
| Abbildung 67: | Aufreinigung der F4 der HSCCC-Trennung der Isoflavon-Aglykone. ....                                          | 120 |
| Abbildung 68: | Massenspektrometrischer Fragmentierungsweg von Isoflavonen. ....                                             | 120 |
| Abbildung 69: | Massenspektrometrische Fragmentierung der F5 aus der HSCCC-Trennung der Rotklee-Aglykone. ....               | 121 |
| Abbildung 70: | TIC der F2 aus der HSCCC-Trennung der Isoflavon-Aglykone. ....                                               | 122 |
| Abbildung 71: | HSCCC-Trennung der F2 aus der Trennung der Isoflavon-Glykoside. ....                                         | 124 |
| Abbildung 72: | HPLC-Chromatogramme der Fraktionen der Polyamid-Aufreinigung. ....                                           | 126 |
| Abbildung 73: | HSCCC-Trennung der Polyamid-Fraktion 10 aus Rotklee. ..                                                      | 127 |
| Abbildung 74: | Getrocknete Rhizome von <i>Iris germanica</i> L..                                                            | 130 |
| Abbildung 75: | Fließschema zur Herstellung eines Iris-Hydrolysates. ....                                                    | 130 |
| Abbildung 76: | HPLC-Chromatogramm des Iris-Hydrolysates. ....                                                               | 131 |
| Abbildung 77: | Fließschema zur Herstellung von Extrakten aus <i>Iris germanica</i> . ....                                   | 132 |
| Abbildung 78: | Chromatogramm der HSCCC-Trennung von glykosidischen gebundenen Isoflavonen aus <i>Iris germanica</i> L. .... | 133 |
| Abbildung 79: | HSCCC-Trennung des hydrolysierten Extraktes von <i>Iris germanica</i> . ....                                 | 135 |
| Abbildung 80: | HMBC-Korrelationen von Nigricin. ....                                                                        | 136 |
| Abbildung 81: | HSCCC des hydrolysierten Iris-Extraktes im „continuous-flow- Modus“ ...                                      | 137 |
| Abbildung 82: | Grundstruktur eines Isoflavons mit den Substitutionsmöglichkeiten. ....                                      | 138 |
| Abbildung 83: | Totalionenstrom des Rohextraktes von Kudzu. ....                                                             | 140 |
| Abbildung 84: | HSCCC der Trennung eines Extraktes aus den Rhizomen von Kudzu. ...                                           | 141 |
| Abbildung 85: | (MS/MS-Spektrum) der beiden Isoflavone Puerarin und Daidzin. ....                                            | 142 |
| Abbildung 86: | LC-MS/MS-Analyse der F4 der HSCCC-Trennung des Kudzu. .                                                      | 144 |
| Abbildung 87: | HSCCC des Weintraubenschalen-Extraktes. ....                                                                 | 146 |

---

|                |                                                                                                                                   |     |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 88:  | Isolierung von Resveratrol aus Weintraubenschalen.....                                                                            | 147 |
| Abbildung 89:  | HSCCC-Trennung von Coumestrol aus Alfalfa-Sprossen. ....                                                                          | 148 |
| Abbildung 90:  | Fließschema zur Aufarbeitung von Nahrungsergänzungsmitteln. ....                                                                  | 151 |
| Abbildung 91:  | HPLC-DAD eines Soja-Extraktes und Nahrungsergänzungsmittels. ....                                                                 | 152 |
| Abbildung 92:  | TIC eines aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittels. ....                                                                         | 153 |
| Abbildung 93:  | Beispiele von NEM in Kapselform (aufgeschnittene Kapseln).....                                                                    | 154 |
| Abbildung 94:  | Variation des Extraktionsmittels.....                                                                                             | 156 |
| Abbildung 95:  | Einfluss der Extraktionsdauer eines NEM auf Soja-Basis. ....                                                                      | 158 |
| Abbildung 96:  | Lineare Kalibrierfunktionen der isolierten Isoflavone aus Soja. ....                                                              | 160 |
| Abbildung 97:  | Varianz der Isoflavon-Zusammensetzung ausgesuchter NEMs. ....                                                                     | 163 |
| Abbildung 98:  | Darstellung des Gesamtgehaltes an Isoflavonen der NEMs ....                                                                       | 165 |
| Abbildung 99:  | Gehalte von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln ....                                                                         | 168 |
| Abbildung 100: | HPLC-Chromatogramm eines Nahrungsergänzungsmittels. ....                                                                          | 171 |
| Abbildung 101: | MS-Analyse eines NEM auf Soja-Basis mit Leinsamen-Extrakt. ....                                                                   | 173 |
| Abbildung 102: | Fließschema zur Aufarbeitung von NEMs mit Rotklee-Extrakt. ....                                                                   | 174 |
| Abbildung 103: | HPLC-Chromatogramm eines NEMs mit Rotklee-Extrakt. ....                                                                           | 175 |
| Abbildung 104: | Variation des Extraktionsmittels. ....                                                                                            | 176 |
| Abbildung 105: | Lineare Kalibrierfunktionen der isolierten Isoflavone. ....                                                                       | 178 |
| Abbildung 106: | Isoflavon-Gehalte der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel mit Rotklee-Extrakt im Vergleich mit den Angaben der Hersteller. .... | 180 |
| Abbildung 107: | Rotklee in verschiedenen Wachstumsphasen. ....                                                                                    | 182 |
| Abbildung 108: | HPLC-Chromatogramme eines Screenings der Rotklee-Pflanze. ....                                                                    | 183 |
| Abbildung 109: | Screening der Blätter von Rotklee. ....                                                                                           | 183 |



---

|                |                                                                             |     |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 110: | HPLC-Chromatogramme diverser Klee-Spezies. ....                             | 185 |
| Abbildung 111: | Nauplien des Salinenkrebses ( <i>Artemia salina</i> ; Brine Shrimp). . .... | 187 |
| Abbildung 112: | Strukturformel von Podophyllotoxin. ....                                    | 187 |
| Abbildung 113: | Ergebnisse des Brine Shrimp-Assays für pflanzliche Extrakte. ....           | 188 |
| Abbildung 114: | Ergebnisse des Brine Shrimp-Assays. ....                                    | 190 |
| Abbildung 115: | HPLC-Chromatogramm der Wiederfindung mit Ononin. ....                       | 215 |
| Abbildung 116: | Getrocknete Antibiotika-Testplättchen für den Brine Shrimp-Assay. ....      | 220 |
| Abbildung 117: | Weiteres Beispiel eines HPLC-DAD-Chromatogramms. . ....                     | 287 |

## Tabellenverzeichnis

|             |                                                                                                                                             |     |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 1:  | Gehalte an Daidzein und Genistein in verschiedenen Lebensmitteln. ....                                                                      | 9   |
| Tabelle 2:  | Lignangehalte verschiedener Nahrungsmittel. ....                                                                                            | 11  |
| Tabelle 3:  | Hormonabhängige und –unabhängige Wirkung von Isoflavonen. ....                                                                              | 24  |
| Tabelle 4:  | Prozentualer Anteil der verschiedenen Konjugate der Soja-Isoflavone Daidzein, Genistein und Glycitein in Lebensmitteln auf Soja-Basis. .... | 45  |
| Tabelle 5:  | Übersicht über verschiedene Lebensmittel auf Sojabasis. ....                                                                                | 46  |
| Tabelle 6:  | Faktoren, die die Isoflavon-gehalte von Sojapflanzen beeinflussen. ....                                                                     | 48  |
| Tabelle 7:  | Eigenschaften von verschiedenen Sojaproteinformen in Lebensmitteln. ....                                                                    | 49  |
| Tabelle 8:  | Substitutionsmuster der Flavone aus Rotklee (vgl. Abbildung 24). ....                                                                       | 55  |
| Tabelle 9:  | Isoflavone aus Rotklee (vgl. Abbildung 25). ....                                                                                            | 57  |
| Tabelle 10: | Verteilung von Phytoestrogenen in Kudzu.....                                                                                                | 64  |
| Tabelle 11: | Peak-Identifizierung im HPLC-DAD eines Sojaflockenextraktes. ....                                                                           | 77  |
| Tabelle 12: | Varianz der Konzentration an Isoflavonen in Sojabohnen ....                                                                                 | 82  |
| Tabelle 13: | Identifizierung der relevanten Isoflavone von <i>Iris germanica</i> .....                                                                   | 92  |
| Tabelle 14: | Massenspektrometrische Analyse der HSCCC-Fraktion aus Soja. ....                                                                            | 107 |
| Tabelle 15: | <sup>1</sup> H-NMR-Daten von Genistin und 6''-O-Acetyl-genistin im Vergleich. ....                                                          | 109 |
| Tabelle 16: | Vergleich der NMR-Daten der Konstitutionsisomere Sissotrin und Trifosid..                                                                   | 116 |
| Tabelle 17: | Isolierte Isoflavone aus Rotklee.....                                                                                                       | 128 |
| Tabelle 18: | Übersicht über die aus <i>Iris germanica</i> L. isolierten Isoflavone. ....                                                                 | 138 |
| Tabelle 19: | Vergleich der NMR-Daten von Daidzin mit Puerarin. ....                                                                                      | 143 |
| Tabelle 20: | Identifizierung der Isoflavone eines untersuchten NEMs.....                                                                                 | 154 |
| Tabelle 21: | Individuelle Isoflavon-Gehalte der untersuchten NEMs mit Soja-Extrakt. ....                                                                 | 161 |

---

|             |                                                                           |     |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 22: | Isoflavon-Gehalte der untersuchten NEMs mit Soja im Vergleich. ....       | 164 |
| Tabelle 23: | Gehalte an Isoflavonen berechnet als „Aglykone“. ....                     | 167 |
| Tabelle 24: | Individuelle Isoflavon-Gehalt der einzelnen untersuchten NEMs. ....       | 179 |
| Tabelle 25: | Kenndaten zur Linearität der Kalibrierreihen der Soja-Isoflavone. ....    | 209 |
| Tabelle 26: | Grubbs-Tabelle zur Quantifizierung von Soja-Isoflavonen. ....             | 212 |
| Tabelle 27: | Lagerversuch der Stammlösungen. ....                                      | 213 |
| Tabelle 28: | Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Soja-Isoflavone. ....                | 216 |
| Tabelle 29: | Ergebnisse der Rohextrakte zur Prüfung der Zytotoxizität. ....            | 222 |
| Tabelle 30: | Ergebnisse der Reinsubstanzen zur Prüfung der Zytotoxizität. ....         | 222 |
| Tabelle 31: | Verwendete HSCCC-Systeme. ....                                            | 279 |
| Tabelle 32: | Gehalte von Isoflavonen in NEMs auf der Basis von Soja-Extrakt. ....      | 289 |
| Tabelle 33: | Vergleich der bestimmten Gehalte von Isoflavonen aus NEMs. ....           | 290 |
| Tabelle 34: | Ermittelten Gehalte an Isoflavonen in NEMs mit Rotklee im Vergleich. .... | 291 |
| Tabelle 35: | Geeignete Extraktionsdauer für die Aufarbeitung von NEMs. ....            | 291 |
| Tabelle 36: | Ergebnisse zur Variation des Extraktionsmittels. ....                     | 292 |

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

|                     |                                                                                |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Abb.                | Abbildung                                                                      |
| AC-DAI              | Acetyl daidzin (6''-O-Acetyl-daidzin)                                          |
| AC-GEN              | Acetylgenistin (6''-O-Acetyl-genistin)                                         |
| analyt.             | analytisch                                                                     |
| BIOA                | Biochanin A                                                                    |
| C                   | Konzentration                                                                  |
| CCC                 | Countercurrent Chromatography (dt. Gegenstrom-Verteilungs-<br>chromatographie) |
| COU                 | Coumestrol                                                                     |
| CD <sub>3</sub> OD  | deutერიertes Methanol                                                          |
| C <sub>mob.</sub>   | Konzentration der mobilen Phase oder in der mobilen Phase                      |
| C <sub>stat.</sub>  | Konzentration der stationären Phase oder in der stationären Phase              |
| d                   | Dublett                                                                        |
| DAD                 | Diodenarray-Detektion; Dioden-Array-Detektor                                   |
| DAI                 | Daidzin                                                                        |
| dd                  | Dublett von Dubletts („Doppeldublett“)                                         |
| dem.                | demineralisiert                                                                |
| DMSO                | Dimethylsulfoxid                                                               |
| DMSO-d <sub>6</sub> | deutერიertes Dimethylsulfoxid                                                  |
| dest.               | destilliert                                                                    |
| DR                  | Detektionsreagenz                                                              |

---

|         |                                                                     |
|---------|---------------------------------------------------------------------|
| ENL     | Enterolacton                                                        |
| END     | Enterodiol                                                          |
| ER      | Estrogen-Rezeptor                                                   |
| ESI     | Electron Spray Ionization                                           |
| EtOH    | Ethanol                                                             |
| FM      | Fließmittel                                                         |
| FORM    | Formononetin                                                        |
| GEN     | Genistin                                                            |
| Glc/glc | glucosid                                                            |
| GLY     | Glycitin                                                            |
| HMBC    | Heteronuclear Multiple Bond Correlation (C-H Fernkorrelation)       |
| HPLC    | Hochdruckflüssigkeitschromatographie                                |
| HSCCC   | High Speed Countercurrent Chromatography                            |
| HSQC    | Heteronuclear Single Quantum Coherence (C-H Korrelation)            |
| i.D.    | innerer Durchmesser                                                 |
| IRI     | Irilon                                                              |
| k       | Verteilungskoeffizient                                              |
| kcal    | Kilokalorien                                                        |
| konz.   | konzentriert(e)                                                     |
| kV      | Kilovolt                                                            |
| LC-MS   | Kombination von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie |
| m       | Multiplett                                                          |
| M       | Molekülmasse                                                        |

---

|             |                                                                 |
|-------------|-----------------------------------------------------------------|
| $[M^+]$     | Molekülion                                                      |
| $[M + H]^+$ | Pseudomolekülion (positiver Modus)                              |
| MAT         | Matairesinol                                                    |
| MeCN        | Acetonitril                                                     |
| MeOH        | Methanol                                                        |
| MLCCC       | Multi-Layer Countercurrent Chromatography                       |
| MS          | Massenspektrometrie                                             |
| mV          | Millivolt                                                       |
| $m/z$       | Masse-Ladungsverhältnis                                         |
| N           | Normalität (Äquivalentkonzentration in mol/L)                   |
| neg.        | negativ                                                         |
| NEM         | Nahrungsergänzungsmittel                                        |
| NMR         | Kernmagnetische Resonanz (englisch: Nuclear Magnetic Resonance) |
| PEG         | Polyethylenglykol                                               |
| pos.        | positiv                                                         |
| präp.       | präparativ                                                      |
| PTFE        | Polytetrafluorethylen (Teflon <sup>®</sup> )                    |
| RDA         | Retro-Diels-Alder                                               |
| ROS         | reactive oxygen species                                         |
| RP          | Reversed Phase                                                  |
| $R_t$       | Retentionszeit                                                  |
| s           | Singulett                                                       |
| s.          | siehe                                                           |

|       |                                                                                                            |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SDG   | Secoisolariciresinoldiglucosid                                                                             |
| SEC   | Secoisolariciresinol                                                                                       |
| SERM  | Selektive Estrogenrezeptormodulatoren                                                                      |
| SPE   | Festphasenextraktion                                                                                       |
| TBME  | <i>tert.</i> -Butylmethylether                                                                             |
| TEAC  | Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (deutsch: Antioxidative Aktivität - angegeben als Troloxäquivalent) |
| TIC   | Total-Ionen-Chromatogramm                                                                                  |
| U/min | Umdrehungen pro Minute                                                                                     |
| verd. | verdünnt(e)                                                                                                |
| VIS   | Licht im sichtbaren Bereich                                                                                |

#### Symbole

|               |                              |
|---------------|------------------------------|
| $\delta$      | chemische Verschiebung [ppm] |
| $\Delta$      | Differenz                    |
| $\lambda$     | Wellenlänge                  |
| $\mu$         | Mikro-                       |
| $\varnothing$ | Durchmesser; Durchschnitt    |
| J             | Kopplungskonstante           |
| °C            | Grad Celsius                 |

---

Juristische Abkürzungen

|        |                                                                       |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|
| ABl.   | Amtsblatt                                                             |
| Bek.   | Bekanntmachung                                                        |
| BfR    | Bundesinstitut für Risikobewertung                                    |
| BGBI.  | Bundesgesetzblatt                                                     |
| BMVEL  | Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft |
| BVL    | Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit            |
| i.d.F. | in der Fassung (vom)                                                  |
| LFGB   | Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch                              |
| LMKV   | Lebensmittelkennzeichnungsverordnung                                  |
| NemV   | Nahrungsergänzungsmittelverordnung                                    |





# 1 Einleitung und Kenntnisstand

## 1.1 Phytoestrogene: Chemische Struktur, Vorkommen und biologische Funktion

Dieses Kapitel gibt eine allgemeine Übersicht über das Vorkommen, die chemische Struktur, die biologischen Aktivitäten sowie die einzelnen Gruppen der Phytoestrogene. In der vorliegenden Arbeit wird die Bezeichnung „Estrogene“ bzw. „Phytoestrogene“ verwendet und nicht „Östrogene“<sup>1</sup>. Diese Schreibweise wird auch im klinischen Wörterbuch Pschyrembel [2004] benutzt, weshalb aus Gründen der Einheitlichkeit Ausdrücke wie „estrogene Wirkung“ oder „estrogenartig wirksam“ entsprechend angepasst wurden.

### 1.1.1 Definition von Phytoestrogenen

Unter der Bezeichnung „Phytoestrogene“ werden strukturell verschiedenartige, sekundäre Pflanzenstoffe zu einer Gruppe zusammengefasst, deren Gemeinsamkeit eine potentielle estrogene Wirkung im menschlichen Körper darstellt [Setchell, 1998]. Der Begriff „sekundäre Pflanzenstoffe“ ist hierbei als eine Art Sammelbezeichnung für chemisch sehr unterschiedliche Verbindungen zu verstehen, welche nicht am primären Stoffwechsel (Energiestoffwechsel) der Pflanzen beteiligt sind. Diese sekundären Pflanzenstoffe werden u.a. als Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten, als Farbstoffe oder als Wachstumsregulatoren in bestimmten Entwicklungsphasen der Pflanze gebildet und kommen deshalb nur in geringen Mengen vor [Watzl und Leitzmann, 1999].

Die klassische Definition von „Estrogenen“ nach Liebermann [Lieberman, 1996] weist eine gewisse Komplexität auf. Die „Britische Arbeitsgruppe über Phytoestrogene“ (British Working Group on Phytoestrogens) des „Committee of Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment“ hat den Begriff „Phytoestrogene“ näher definiert. Demnach werden Phytoestrogene als Verbindungen oder Metabolite definiert, die biologische Effekte in Wirbeltieren hervorrufen und die Wirkung von endogenen Estrogenen durch Bindung an die Estrogen-Rezeptoren nachahmen oder modulieren können [COT, 2003]. Chemisch gesehen handelt es sich bei den Phytoestrogenen um nicht-steroidale phenolische Verbindungen, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu menschlichen Estrogenen (Steroidhormonen) aufweisen. Verdeutlicht wird dies anhand eines Vergleichs der Strukturen von 17- $\beta$ -Estradiol (weibliches Follikelhormon) mit dem Coumestan Coumestrol oder dem Isoflavon Daidzein (vgl. Abbildung 1). Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit zeigen

---

<sup>1</sup> „Estrogene“ ist ebenfalls nach Roche Lexikon Medizin [2003] der internationale Freiname für Östrogene.

Phytoestrogene hormonähnliche Wirkungen, wodurch auch die Fähigkeit zur Bindung oder Modulation an die Estrogen-Rezeptoren ( $\alpha$  und/oder  $\beta$ ) erklärt werden kann (vgl. Kapitel 1.1.5.1). Voraussetzung für eine Bindung an einen Estrogen-Rezeptor (ER) ist das Vorhandensein eines phenolischen Ringes der Verbindung, wobei im Vergleich mit den menschlichen Estrogenen der Abstand zwischen den Hydroxylgruppen an den Enden von beiden Molekülen nahezu identisch sein muss [Setchell und Cassidy, 1999].

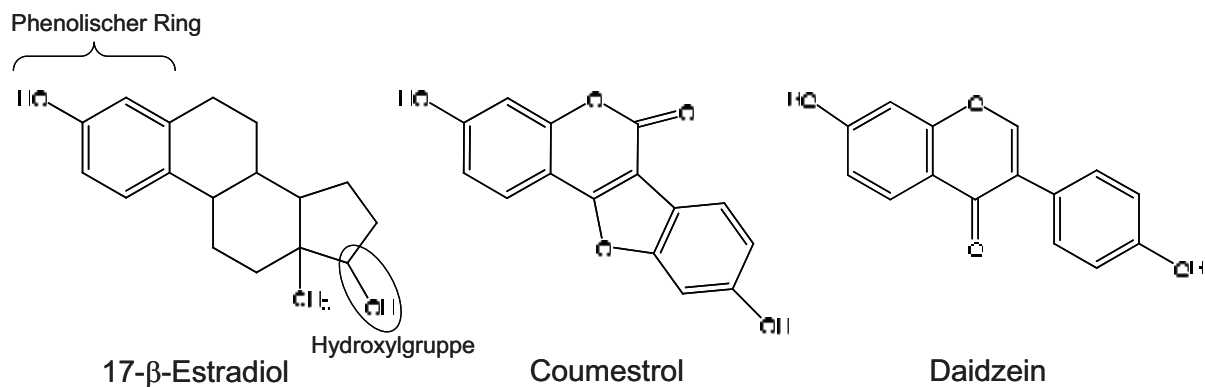


Abbildung 1: Vergleich der Strukturen des weiblichen Follikelhormons 17-β-Estradiol mit den Phytoestrogenen Coumestrol (Coumestan) und Daidzein (Isoflavon).

Die meisten Phytoestrogene gehören zur Gruppe der Flavonoide, wozu hauptsächlich Isoflavone, Coumestane, aber auch die prenylierten Flavonoide sowie Stilbene gezählt werden. Bei den „Nicht-Flavonoiden“ haben die Lignane die größte Bedeutung als Phytoestrogene erlangt [Cassidy et al., 2000]. Die einzelnen Strukturklassen sind in Abbildung 2 dargestellt. Im Wesentlichen werden drei Strukturklassen unterschieden: Isoflavone, Lignane und Coumestane [Kurzer und Xu, 1997]. Aus ernährungsphysiologischer Sicht stellen besonders Leinsamen (Lignane) und Soja (Isoflavone) reichhaltige Quellen an Phytoestrogenen dar [Adlercreutz, 1998a; Adlercreutz, 1998b].

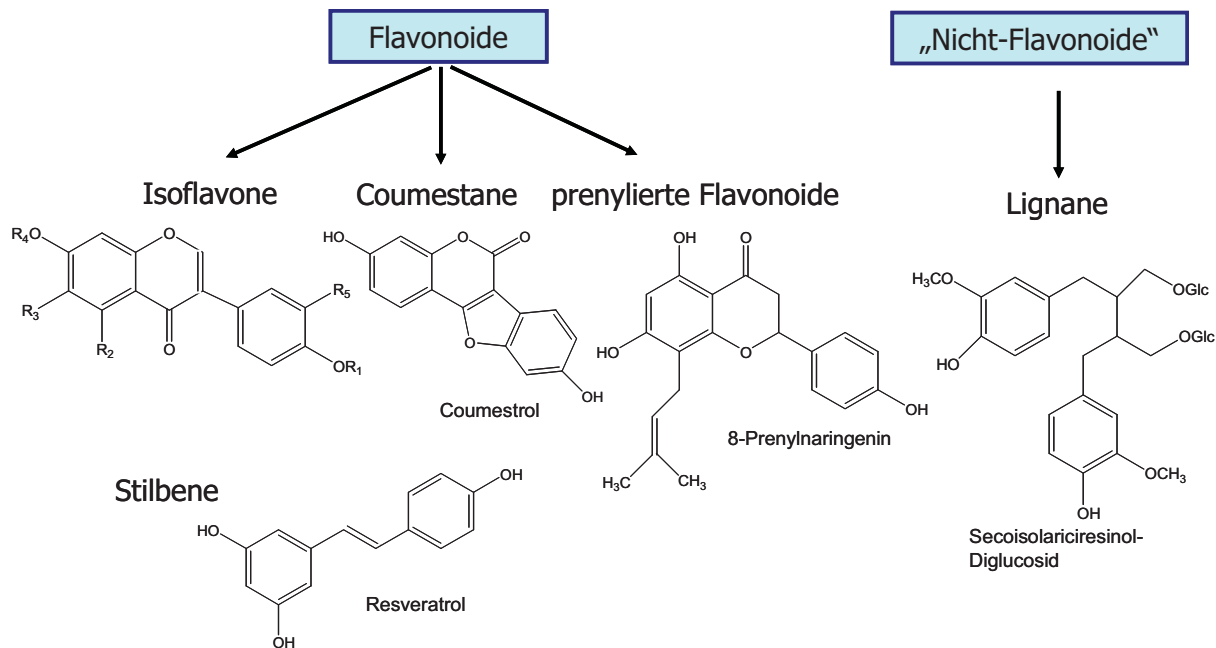


Abbildung 2: Strukturell wichtige Klassen von Phytoestrogenen.

### 1.1.2 Vorkommen und chemische Struktur

Flavonoide haben ein phenolisches C6-C3-C6-Grundgerüst mit 15 Kohlenstoffatomen, wobei die beiden benzolischen Ringe A und B heterozyklisch über einen Ring C miteinander verknüpft sind (wie z.B. bei der Gruppe der Flavanone, Flavone, Flavonole, Flavanole sowie den Isoflavonen, vgl. Abbildung 3). Chemisch betrachtet können Flavonoide deshalb als Phenylchromonderivate angesehen werden [Franzke, 1996; Belitz und Grosch, 1992].

Die Gruppe der Isoflavonoide stellt mit bislang über 1600 verschiedenen identifizierten Verbindungen (inklusive der glykosidisch gebundenen) eine ausgeprägte Unterklasse der Flavonoide dar [Lapčík, 2007, Donnelly und Boland, 1995]. Strukturell gesehen weisen Isoflavonoide ebenfalls ein C6-C3-C6-Grundgerüst auf, wobei im Gegensatz zu den Flavonoiden eine Verknüpfung des phenolischen Rings (B-Ring) mit Chromon als Strukturelement an der Position 3 erfolgt und nicht an Position 2 (s. Abbildung 3) [Akashi et al., 1999; Dixon, 2004]. Diese Verbindungen besitzen als ursprüngliches Ringsystem folglich ein 3-Phenylchromon (3-Phenyl-4*H*-1-benzopyran-4-on) und können an den Ringen A und B weitere Hydroxyl-, Methoxyl- und Prenylgruppen tragen [Harborne, 1994; Dixon und Steele, 1999]. Vermutlich entstehen Isoflavonoide durch eine 1,2-Aryl-Wanderung von der Position 2 des Chromanringes in die Position 3. Das Isoflavon Genistein (s.u.) geht auf diese Weise aus dem Flavanon Naringenin unter Beteiligung des katalytischen Cytochrom-P-450-Enzymes Isoflavon-Synthase hervor [Grisebach und Barz, 1969; Dixon und Ferreira, 2002]. Die Isoflavonoide können in verschiedene Unterklassen unterteilt werden, wie z.B. den

Isoflavonen oder Coumestanen, wobei sich die Unterscheidung primär auf deren Struktur oder Biosynthese stützt [Veitch, 2007].

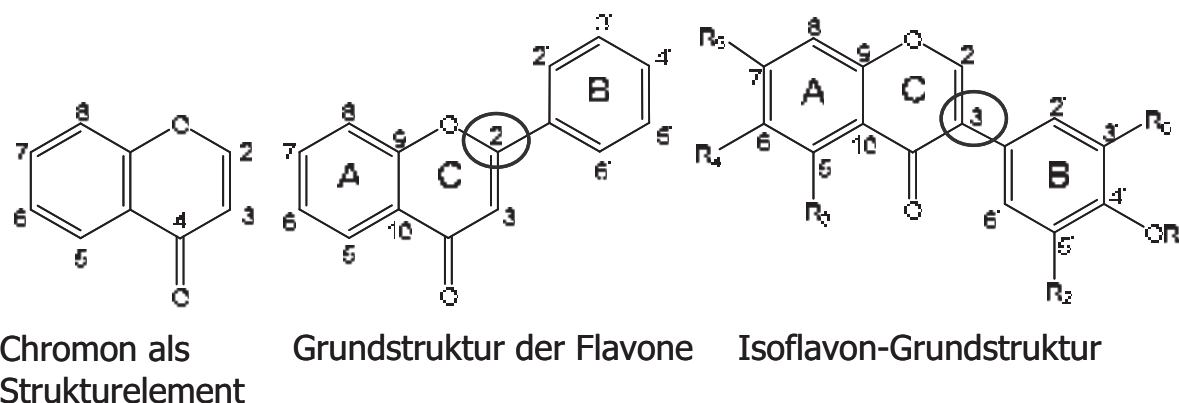


Abbildung 3: Chromon als Strukturelement von 2-Phenylchromon (Flavone) und 3-Phenylchromon (Isoflavone).

Phytoestrogene kommen ubiquitär im Pflanzenreich vor. Beträchtliche Mengen an Phytoestrogenen, insbesondere an Isoflavonoiden, wurden in Pflanzen der Familie Leguminosae, Subfamilie *Fabaceae*, Ordnung Fabales nachgewiesen [Harborne, 1994; Reynaud et al., 2005]. Die reifen Samen von Pflanzen aus der Familie der Fabaceae (Schmetterlingsblütler; früher Papilionaceae) werden unter der Bezeichnung Leguminosen oder Hülsenfrüchte (wie z.B. Erbsen, Linsen, Bohnen) zusammengefasst und bilden einen wertvollen Beitrag zur menschlichen Ernährung [Belitz und Grosch, 1992; und Franzke, 1996]. Für die Biosynthese von Isoflavonoiden wird ein bestimmtes Enzymsystem (Isoflavon-Synthasen) benötigt, welches nur wenige Pflanzenarten bilden können [Tahara und Ibrahim 1995]. In den letzten Jahren wurden immer mehr Isoflavonoide in Pflanzen, welche nicht zur Familie der Fabaceae gehören, nachgewiesen. Deren Anzahl wurde nach neuen Berichten auf 59 Pflanzenfamilien höherer taxonomischer Ordnung geschätzt, wobei insbesondere die Iridaceae (*Iris germanica* L.) sowie die Rosaceae (Prunus-Arten) zu erwähnen sind. In anderen Pflanzenfamilien (Chenopodiaceae, Astaraceae, Moraceae, Myristicaceae) wurden ebenfalls unterschiedliche Isoflavonoide gefunden. Vereinzelt konnten Isoflavonoide in Brassicaceae (Brokkoli, Rotkohl), Lauraceae (Avocado), Juglandaceae (Walnuss), Pedaliceae (Sesam), Rubiaceae (Kaffee), Theaceae (Tee) und Apiaceae (Kümmelkörner) nachgewiesen werden [Mackova et al., 2006; Whiting, 2001; Lapcik, 2006].

Isoflavone bilden die größte und ernährungsphysiologisch bedeutendste Gruppe der Phytoestrogene [Harborne, 1994; Dixon, 2004]. Rund 95% aller natürlich vorkommenden Isoflavon-Aglykone werden von Pflanzen aus der Leguminosen-Familie produziert [Hegnauer und Grayer-Barkmeijer, 1993]. Isoflavone besitzen die Fähigkeit über Etherbindungen verschiedene Zuckerreste (v.a. Glucose) glykosidisch an Hydroxylgruppen des Grundgerüsts

zu binden, was die Variation der natürlich vorkommenden Isoflavone vergrößert. In vielen Pflanzen liegen Isoflavone deshalb als Zuckerkonjugate vor, wie z.B. in Soja [Wisemann et al., 2002]. Wichtige und quantitativ dominierende Isoflavone im gesamten Pflanzenreich sowie für die menschliche Ernährung sind die beiden 7-O- $\beta$ -D-Glucoside Genistin und Daidzin aus Soja (vgl. Kapitel 1.2.2), sowie die beiden Aglykone Formononetin und Biochanin A aus Rotklee (vgl. Kapitel 1.3.2), deren Strukturen in Abbildung 4 aufgeführt sind.

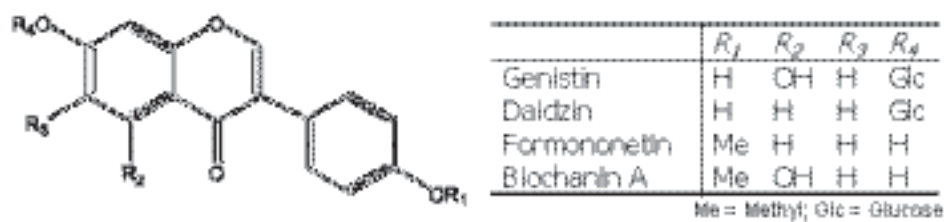


Abbildung 4: Überblick über die Strukturen der wichtigsten Isoflavone.

Coumestane sind strukturell mit den Isoflavonen verwandt. Als wichtigster Vertreter der Coumestane hat Coumestrol (s. Abbildung 1) nur eine untergeordnete Rolle in der menschlichen Ernährung. Nur sehr wenige pflanzliche Lebensmittel wie Alfalfa- oder Kleesprossen erhalten dieses Coumestan in nennenswerter Konzentration [Humpfrey, 1998; Harborne, 1994; Moravcová et al., 2004]. Coumestrol hat eine sehr hohe Bindungsaffinität zu den beiden verschiedenen Estrogen-Rezeptoren (ER;  $\alpha$  und  $\beta$ ), weshalb es u.a. eines der stärksten Phytoestrogene ist [vgl. Dixon, 2004].

Prenylierte Polyphenole sind weit verbreitet in Pflanzenfamilien höherer Ordnung, wie unter anderem in Berberidaceae, Leguminosae, Compositae, Moraceae, Boraginaceae, Rutaceae, Umbeliferaceae und Guttiferae [Yamamoto et al., 1997]. Für die Isoprenylierung von Flavonoiden ist bei der Biosynthese in der Pflanze das Schlüsselenzym Prenyltransferase besonders wichtig, welches streng spezifisch in Hinblick auf den Isoprenyl-Donor ist [Vitali et al., 2004; Laflamme et al., 1993]. Bekannte prenylierte Flavonoide sind Xanthohumol, Isoxanthohumol, 6-Prenylnaringenin sowie 8-Prenylnaringenin. Das Flavonoid 8-Prenylnaringenin (s. Abbildung 2) ist ein besonders potentes Phytoestrogen im Vergleich mit der Gruppe der Isoflavone [Milligan et al., 1999]. In geringen Konzentrationen enthalten ist es in den weiblichen Blüten des Hopfens (*Humulus lupulus*), welche zur Geschmacksverbesserung und Haltbarmachung des Bieres durch Bitterstoffe verwendet werden [Tahara und Ibrahim, 1995].

Stilbene sind 1,2-Diarylethene, welche aus Hydroxy-Zimtsäuren synthetisiert werden [Schröder, 1997]. Eine weite Reihe von Pflanzenfamilien (bsp. Pinaceen, Moraceen, Liliaceen oder Vitaceen) enthält Stilbene, wobei sie zumeist in der Rinde, den Wurzeln oder den Blättern nachgewiesen wurden. Es handelt sich dabei jedoch fast ausschließlich um Pflanzen oder Pflanzenteile, welche nicht zum menschlichen Verzehr geeignet sind. Am A-Ring tragen Stilbene normalerweise zwei Hydroxylgruppen in meta-Position (s. Abbildung 5), wohingegen der B-Ring in ortho-, meta- und/oder para-Stellung mit Hydroxyl- oder Methoxyl-Gruppen substituiert ist. Das am häufigsten vorkommende Stilben ist das monomere Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben), welches zum Teil in Pflanzen glykosidisch gebunden vorliegt (z.B. als das 3- $\beta$ -D-Glucosid; Piceid) und erstmals 1963 in einer japanischen Knöterich-Pflanze (*Polygonum cuspidatum*) isoliert und identifiziert wurde [Nonomura et al., 1963]. Nur sehr wenige Pflanzen enthalten dieses Stilben, wobei insbesondere Weintrauben und Erdnüsse zu erwähnen sind. Deshalb ist es ebenfalls in Produkten aus Weintrauben, wie Saft oder Wein enthalten. Stilbene kommen ebenso in dimerer, trimerer oder oligomerer Form (Viniferine) vor [Cassidy et al., 2000].

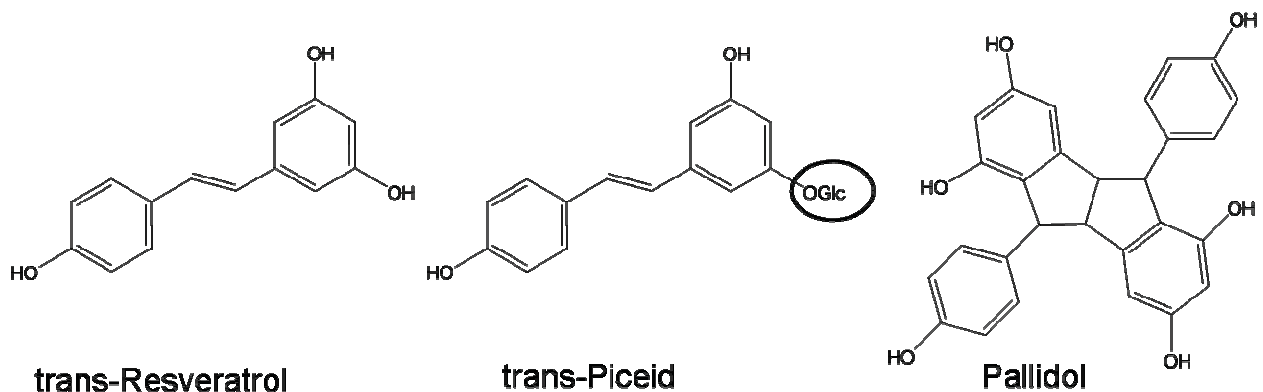


Abbildung 5: Strukturen der Stilbene Resveratrol, dessen Glucosid Piceid sowie als Pallidol in dimerer Form.

Eine Reihe von gesundheitlich positiven Effekten konnten auf die physiologischen Eigenschaften von Resveratrol zurückgeführt werden, wozu u.a. eine antitrhombotische und anticancerogene Wirkung gehören soll [Dietrich et al., 1999; Clement et al., 1998].

Eine weitere bedeutende Gruppe von Phytoestrogenen bilden die Lignane, die keine flavonoide Struktur aufweisen. Diese sind im Gegensatz zu den Isoflavonen als sekundäre Pflanzenstoffe weit verbreitet und bilden in Nahrungspflanzen die Ausgangssubstanz für den Zellwandbestandteil Lignin. Die Lignane entstammen dem Phenylpropanstoffwechsel der Pflanzen, werden somit häufig aus einem seiner Produkte, z.B. dem Coniferylalkohol, synthetisiert. Es handelt sich bei ihnen um dimere  $C_6-C_3$ -Körper (Phenylpropanderivate), die über das  $\beta$ -C-Atom der  $C_3$ -Seitenkette miteinander verbunden sind (s. Abbildung 6). Bei ihrer

Verknüpfung wird ein radikalischer Mechanismus einer oxidativen Kupplung postuliert, wodurch sich eine Reihe von Variationsmöglichkeiten, wie z.B. Ringschlüsse oder Mehrfachverknüpfungen, ergeben. Die Benennung der Lignane erfolgt aufgrund des gebildeten Ringsystems und des zugrunde liegenden Substitutionsmusters (vgl. Abbildung 6). Sind die Phenylpropaneinheiten nicht über die  $\beta$ -ständigen C-Atome verknüpft, handelt es sich um ein Neolignan [Ayres und Loike, 1990]. Ein weit bekanntes Lignan ist die Nordihydroguajaretensäure, die früher häufig als Antioxidans in Lebensmitteln verwendet wurde. Lignane kommen in den meisten Pflanzen glykosidisch gebunden vor.

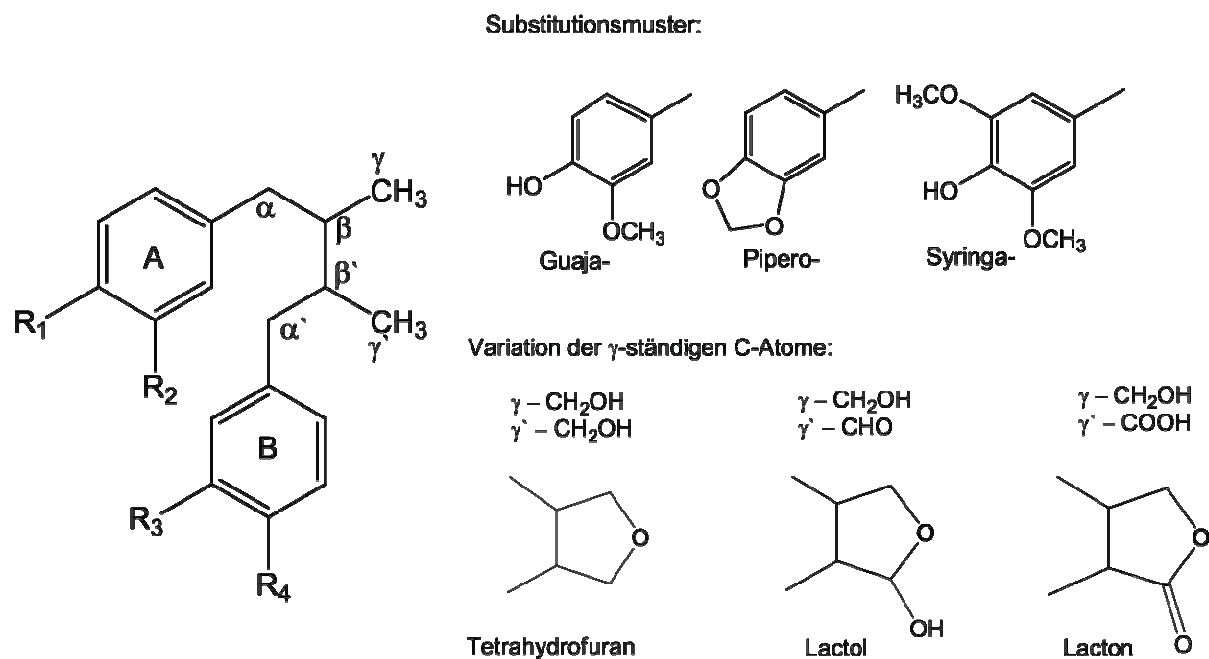


Abbildung 6: Substitutions- und Variationsmuster von Lignanen.

Hauptvertreter der Lignane sind Secoisolariciresinol-Diglucosid (SDG) und Matairesinol (s. Abbildung 7), die in vielen Nahrungspflanzen wie Ölsaaten oder Getreide vorkommen [Mazur und Adlercreutz, 1998]. Eine Vielzahl verschieden substituierter Lignane konnte aus diversen Pflanzen isoliert werden, wobei diese unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen [Ward, 1999]. Einige von ihnen sind von besonderer Bedeutung und in das Interesse der Forschung gerückt, da sie potentiell wirksame Agenzien gegen HIV darstellen [Vlietinck et al., 1998]. Eine Anti-Tumor-Aktivität geht unter anderem von dem Lignan Podophyllotoxin aus [Borsche und Niemann, 1932], welches als chemische Grundlage für die pharmazeutische Herstellung des Krebsmedikamentes Etoposid dient (vgl. auch 3.6.1)].



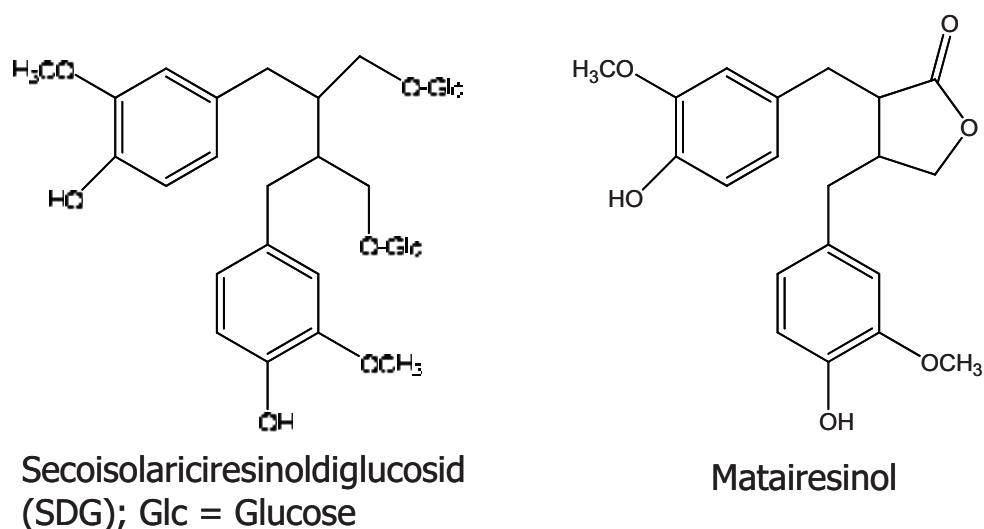


Abbildung 7: Die ernährungsphysiologisch wichtigen Lignane SDG und Matairesinol.

### 1.1.3 Verbreitung in Lebensmitteln

Innerhalb der Nahrungsmittel sind als besonders reichhaltige Quellen von Phytoestrogenen zwei Pflanzen zu nennen: Leinsamen (Lignane) und Soja (Isoflavone). Höhere Konzentrationen dieser beiden Phytoestrogen-Gruppen sind ebenfalls in Leguminosen sowie in Getreide vorhanden. In etwas geringerer Konzentration sind Phytoestrogene auch in vielen Gemüse- und Obstsorten, Samen, Hopfen, Salbei, Tee und in einigen alkoholischen Getränken wie Bier oder Wein enthalten.

Für die menschliche Ernährung bedeutend ist vorwiegend Soja (*Glycine max* L.), in dem die Isoflavone Daidzein und Genistein dominieren. Eine Vielzahl von Lebensmitteln wie Tofu oder Miso werden aus Soja hergestellt. Nicht nur diese traditionellen asiatischen Lebensmittel werden auf der Grundlage von Soja zubereitet, sondern ebenfalls eine Vielzahl anderer Verarbeitungsprodukte wie unter anderem Sojasauce, Suppen, Backwaren, Milcherzeugnisse, Baby- oder Sportlernahrung. Aufgrund ihrer hochwertigen Protein-zusammensetzung ist die Sojabohne vielfach verbreitet (siehe Kapitel 1.2.1). In einigen anderen Leguminosen wie Kichererbsen (*Cicer arietinum*), Linsen (*Lens culinaris*) oder Kidney-Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) konnten auch höhere Konzentrationen von Daidzein und Genistein nachgewiesen werden. In Gemüse, Ölsaaten und Cerealien sind ebenfalls geringe Mengen dieser beiden Isoflavone enthalten, wohingegen in Obst und Nüssen lediglich Spuren detektiert werden konnten [Mazur und Adlercreutz, 1998; Liggins et al., 2000; Mazur et al., 1998; Liggins et al., 2007]. Eine Übersicht über den Gehalt der beiden Soja-Isoflavone Daidzein und Genistein in verschiedenen Lebensmitteln ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Gehalte der Isoflavone Daidzein und Genistein in verschiedenen Lebensmitteln nach Mazur und Adlercreutz [1998], und Mazur et al. [1998].

|                    | Lebensmittel         | Daidzein [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] | Genistein [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] |
|--------------------|----------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
| Leguminosen        | Sojabohne            | 10500-56000                             | 26800-84100                              |
|                    | Kichererbse          | 11-192                                  | 69-214                                   |
|                    | Linsen               | 3-10                                    | 7-19                                     |
|                    | Kudzu; Wurzel        | 185000                                  | 126000                                   |
|                    | Erbse                | 4-11                                    | 0-23                                     |
|                    | Kidneybohnen         | 7-40                                    | 18-518                                   |
| Getreide           | Gerste; ganzes Korn  | 14                                      | 8                                        |
|                    | Hafer, Mehl          | 0                                       | 0                                        |
|                    | Weizen; Kleie        | 4                                       | 7                                        |
|                    | Roggen, Mehl         | 0                                       | 0                                        |
| Ölsamen und Nüsse  | Sesam; Samen         | 140                                     | 14                                       |
|                    | Erdnuss              | 58                                      | 64                                       |
|                    | Mandel               | 4                                       | 0                                        |
|                    | Leinsamen            | 0                                       | 0                                        |
|                    | Klee; Samen          | 178                                     | 323                                      |
| Früchte und Beeren | Erdbeere             | 0                                       | 0                                        |
|                    | Apfel                | 12                                      | 0                                        |
|                    | Banane               | 0                                       | 0                                        |
| Gemüse             | Zucchini, mit Schale | 0                                       | 0                                        |
|                    | Rotkohl              | 5                                       | 14                                       |
|                    | Kartoffel, gepellt   | 0                                       | 0                                        |
|                    | Blumenkohl           | 5                                       | 9                                        |

Deutlich hervortretend ist der hohe Gehalt von Isoflavonen in Soja, aber auch in Kudzu (vgl. 1.5). Kichererbsen weisen ebenso einen sehr hohen Gehalt auf. Daidzein konnte vereinzelt in Getränken wie Bier [Lapcik, 1998] nachgewiesen werden.

Zwei weitere wichtige Isoflavone sind Formononetin und Biochanin A, die jeweiligen 4'-O-Methylderivate von Daidzein und Genistein (vgl. Abbildung 4). Die beiden Isoflavone treten vereinzelt in Nahrungsmitteln, jedoch hauptsächlich in Futtermitteln wie z.B. Rotklee auf. Das Isoflavon Biochanin A wurde sogar aus Bourbon-Whisky isoliert [Gavaler et al., 1987].

Lignane sind insbesondere in Leinsamen (*Linum usitatissimum* L.), sowie in Raps (*Brassica nápus*), Cerealien, Gemüse und Früchten enthalten [Meagher und Beecher, 2000]. Die beiden Lignane Secoisolariciresinol und Matairesinol werden häufig mit der Nahrung aufgenommen, da diese Phytoestrogene in vielen Pflanzen enthalten sind. In Tabelle 2 sind die Gehalte in verschiedenen Lebensmitteln aufgeführt.

Deutlich zu erkennen ist der hohe Gehalt von Lignanen in Leinsamen, in dem diese als Diglucoside vorliegen. Bei den Getreidesorten, wie z.B. Gerstenkörnern, sind die höchsten Konzentrationen an Lignan in der Aleuronschicht sowie im Perikarp zu finden. In Spuren kommt das Lignan Secoisolariciresinol in Erdnüssen und in Soja vor. Das Lignan Matairesinol liegt in allen Pflanzen und Nahrungsmitteln in deutlich geringerer Konzentration vor als SEC. Bei einem Vergleich zwischen den beiden Gruppen der Isoflavone und der Lignane hinsichtlich ihres Gehaltes in Nahrungsmitteln werden einige Unterschiede ersichtlich. Leguminosen (z.B. Kichererbsen) enthalten weitaus mehr Isoflavone als Lignane, hingegen ist die Bandbreite an Lebensmitteln, in denen Lignane vorkommen, weitaus größer. Lignane sind weit verbreitet und kommen beispielsweise in einigen Früchten wie Erdbeeren vor, in denen bislang keine Isoflavone detektiert werden konnten. Ebenso ist in verschiedenen Teesorten ein durchaus hoher Gehalt an Lignan vorhanden, was sich sowohl auf die Blätter als auch auf den fertig aufgebrühten Tee bezieht [Mazur und Adlercreutz, 1998].

Tabelle 2: Lignangehalte verschiedener Nahrungsmittel, basierend auf den Daten von Mazur und Adlercreutz [1998]; sowie Hoja und Jahreis [2000].

| Produkt                          | Secoisolariciresinol<br>(SEC) [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] | Matairesinol (MAT)<br>[ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Brokkoli                         | 414                                                          | 23                                                   |
| Gerstenkörner                    | 58                                                           | 0                                                    |
| Knoblauch                        | 379                                                          | 4                                                    |
| Kümmel                           | 221                                                          | 6                                                    |
| Leinsamen                        | 546000                                                       | 1300                                                 |
| Möhren                           | 192                                                          | 3                                                    |
| Preiselbeeren                    | 1510                                                         | 0                                                    |
| Roggenkörner                     | 47                                                           | 65                                                   |
| Sonnenblumenkerne                | 610                                                          | 0                                                    |
| Earl Grey Tee, aufgebrüht        | 1650                                                         | 106                                                  |
| Chinesischer Grüntee, aufgebrüht | 2887                                                         | 195                                                  |
| Zucchini, mit Schale             | 817                                                          | tr.                                                  |
| Kichererbse                      | 7-8                                                          | 0                                                    |
| Kudzu                            | 31                                                           | tr.                                                  |
| Schwarze Johannisbeere           | 388                                                          | 10                                                   |
| Erdbeere                         | 1205                                                         | 5                                                    |
| Kürbiskerne                      | 21370                                                        | 0                                                    |
| Kürbis, geschält                 | 3870                                                         | 4                                                    |

tr. = nur in Spuren vorhanden

Das Coumestan Coumestrol ist nur in wenigen Lebensmitteln, v.a. in jungen Gemüse-Sprossen (Klee-, Soja- oder Alfalfa-), enthalten. Eine der reichhaltigsten Quellen bezogen auf Nahrungsmittel mit einem Gehalt von ungefähr  $1000\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$  sind Mungobohnen-

Sprossen, die den ca. zwanzigfachen Gehalt von Coumestrol im Vergleich zu Alfalfa-Sprossen aufweisen [Mazur und Adlercreutz, 1998]. Geringe Konzentrationen an Coumestrol befinden sich in Kudzu, sowie in einigen anderen Leguminosen wie der Limabohne (*Phaseolous lunatus*) mit einem Gehalt von 10 µg/100 g [Mazur et al., 1998].

Erdnüsse (*Arachis hypogea*) sind ebenso wie Weintrauben (*Vitis Vinifera*) und deren Produkte (Saft und Wein) gute Quellen für das Stilben Resveratrol [Cassidy et al., 2000]. In geringen Mengen ist es in Himbeeren, Blaubeeren und Maulbeeren enthalten.

#### 1.1.4 Metabolismus und Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit der beiden Isoflavone Genistein und Daidzein wurde in verschiedenen Humanstudien untersucht. Dabei ließ sich feststellen, dass Isoflavone relativ rasch resorbiert werden, da ihre maximale Konzentration im Plasma bereits 6-8 Stunden nach ihrem Verzehr erhalten wird [Rowland et al., 1999]. Die Halbwertszeiten betragen je nach Isoflavon 6-8 Stunden für Genistein und 5-6 Stunden für Daidzein. Der Plasmaspiegel ist bereits 24 Stunden nach einer einmaligen Aufnahme auf den Ausgangswert zurück gefallen. Bezüglich der Aufnahme von Isoflavonen muss zwischen Aglykonen und Glykosiden unterschieden werden. So liegen in der Sojabohne hauptsächlich die glykosidisch gebundenen Isoflavone vor, wohingegen in den traditionellen Soja-Nahrungsmitteln wie Miso oder Tofu durch die Fermentation hauptsächlich Aglykone vorliegen (s. Kapitel 1.2.2 und 1.1.3). Der Metabolismus von Isoflavonen (hauptsächlich anhand der beiden Soja-Isoflavone Daidzein und Genistein) wurde im Rahmen verschiedener *in vitro*- und *in vivo*-Studien ausführlich untersucht [u.a. Rüfer et al., 2008]. Als Aglykone aufgenommene Isoflavone werden aufgrund ihrer Lipophilie im Dünndarm durch passive Diffusion resorbiert. Die nicht resorbierten Isoflavone gelangen in den Dickdarm und werden durch die Darmflora (Darmbakterien) reduktiv metabolisiert. Daidzein wird zu Dihydrodaidzein reduziert, woraufhin zwei verschiedene Verstoffwechselungen erfolgen können. Einerseits kann durch Spaltung des C-Rings O-Demethylangolensin entstehen, andererseits bildet sich unter Erhalt des C-Rings der Metabolit Equol (7,4'-Dihydroxyisoflavan, vgl. Abbildung 8). Diesbezüglich konnte festgestellt werden, dass nur etwa ein Drittel der erwachsenen Bevölkerung der westlichen Industriestaaten (und in einigen epidemiologischen Studien höchstens 50% der asiatischen Bevölkerung) in der Lage ist, Equol nach dem Verzehr von Soja oder reinem Daidzein zu bilden [Rowland et al., 1999; Heinonen et al., 1999]. Faktoren für die Bildung von Equol sind genetischer (u.a. die individuelle Zusammensetzung der jeweiligen Darmflora) sowie nicht genetischer Art [Frankenfeld et al., 2004]. Das Zusammenwirken von gleichzeitig aufgenommenen Nahrungsbestandteilen kann ebenfalls bei der Bildung von Equol eine Rolle spielen. Daraufhin entwickelte sich eine Terminologie, nach der zwischen

„Equol-Produzenten“ und „Nicht-Equol-Produzenten“ unterschieden wird [Heinonen et al., 2003]. Die Einteilung erfolgt anhand der ausgeschiedenen Menge Equol im Urin bzw. über die Plasmakonzentration [Setchell et al., 2002]. In diesem Zusammenhang stellt sich unweigerlich die Frage, welche Population („Equol-Produzenten“ oder „Nicht-Equol-Produzenten“) mehr Vorteile bei der Prävention und Behandlung von z.B. hormonbedingten Krebsarten hat.

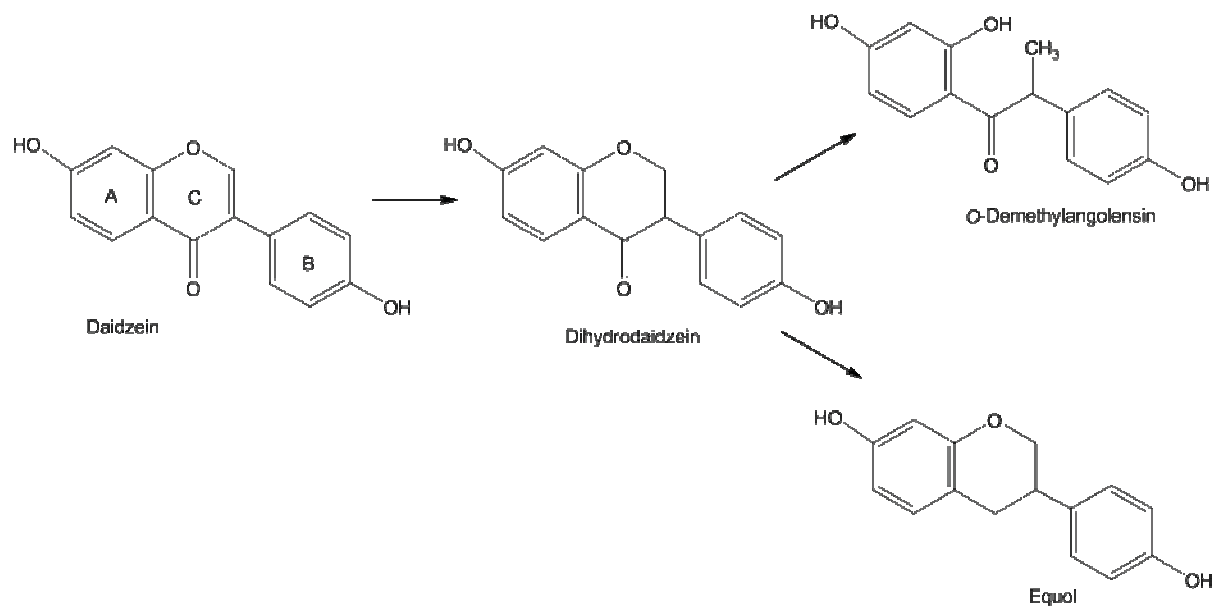


Abbildung 8: Metabolismus von Daidzein durch Darmbakterien. Die Bildung von O-Demethylangolensin beinhaltet mehrere reduktive Reaktionsschritte.

Die Metabolisierung von Genistein erfolgt zunächst analog zu der von Daidzein. Dabei wird Genistein zu Dihydrogenistein reduziert und weiter zu 6'-Hydroxy-O-demethylangolensin metabolisiert. Allerdings wird im weiteren Verlauf kein Equol-analoger Metabolit produziert (in diesem Fall 5-Hydroxyequol), stattdessen erfolgt der Abbau zu p-Ethylphenol über 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure (vgl. Abbildung 9). Bislang konnte der Metabolit 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure lediglich im Urin von Ratten und nach *in vitro*-Inkubation mit humaner Faezesflora detektiert werden [Coldham et al., 1999; Coldham et al., 2002].

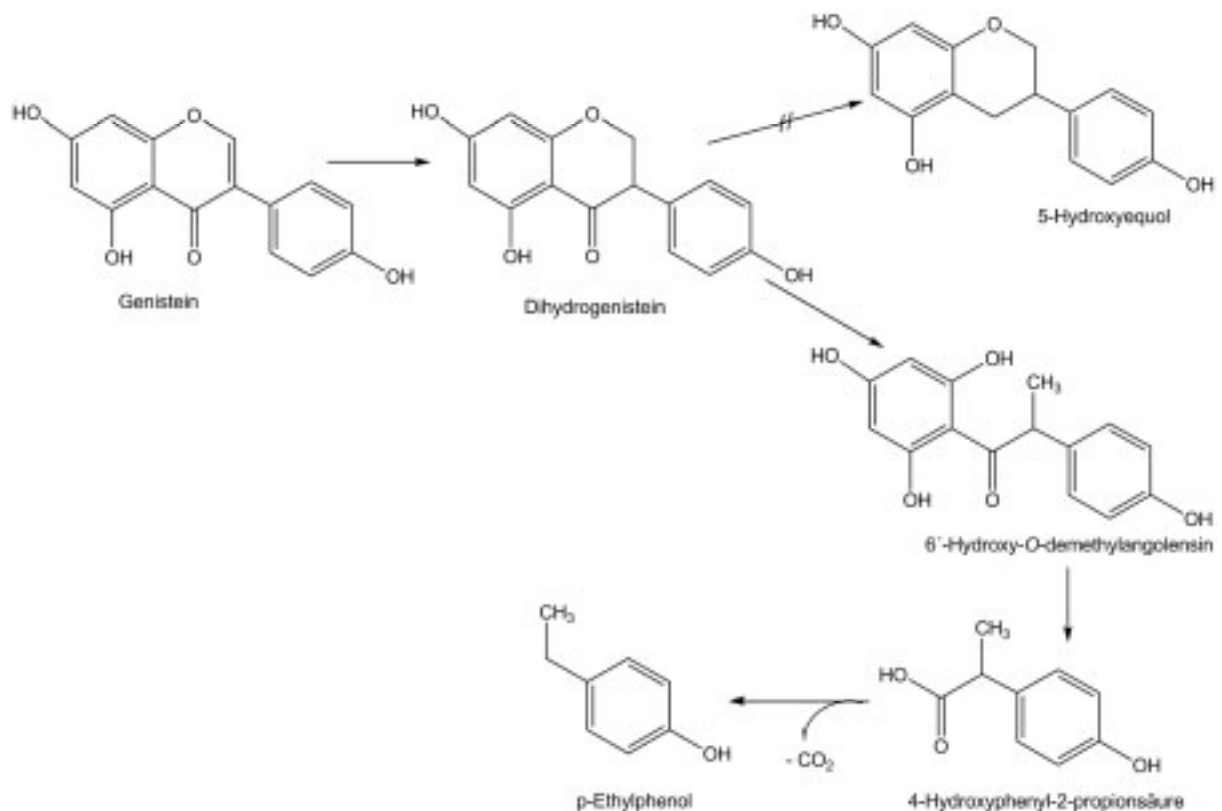


Abbildung 9: Metabolismus des Isoflavons Genistein durch die assoziierte Darmflora.

Bislang wurde der Metabolismus von Glycitein kaum untersucht [Simons et al., 2005]. Einige *in vitro*-Untersuchungen deuten darauf hin, dass Glycitein zunächst demethyliert und zu 6'-Hydroxy-dihydrodaidzein reduziert wird. Anschließend erfolgt die weitere Metabolisierung durch Spaltung des C-Rings zu 5'-Hydroxy-O-demethylangolensin oder alternativ unter Beibehaltung der Ringstruktur zu 5-Hydroxyequol (vgl. Abb. 10) [Rüfer et al., 2007; Heinonen et al., 2003].

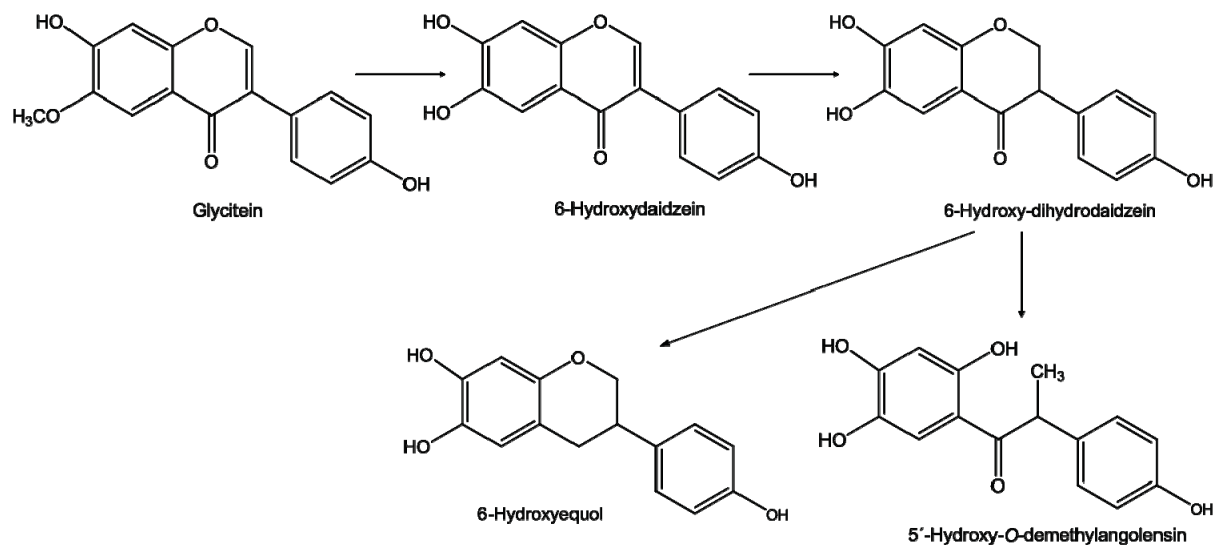


Abbildung 10: Metabolismus von Glycitein durch die Darm assoziierte Mikroflora nach [Rüfer et al., 2007].

Isoflavone, welche nicht über einen reduktiven Metabolismus aus dem Darm resorbiert werden, gelangen *via* Pfortader in die Leber. Dort unterliegen sie dem Phase-II-Metabolismus. Durch die Leberenzyme Uridin-5'-Diphosphat-Glucuronyltransferase und Sulfotransferase erfolgt eine Konjugation der Isoflavone mit Glucuronsäure oder respektive mit Sulfat. Größtenteils bilden sich hierbei die Monoglucuronide und nur sehr wenig Diglucuronide, Mono- und Disulfate oder Sulfoglucuronide [Clarke et al., 2002]. Dieser Phase-II-Metabolismus ist der Hauptentgiftungsweg für Isoflavone, was u.a. mittels eines Tierversuches untermauert wurde. Im letzteren konnte gezeigt werden, dass bei Fütterung mit sojahaltiger Nahrung Geparden an Leberschäden und Infertilität leiden, da deren Stoffwechsel nicht in der Lage ist, Isoflavone zu konjugieren [Setchell et al., 1987a]. Die konjugierten Isoflavone treten in die systemische Zirkulation ein und werden renal über den Harn und teilweise über die Galle ausgeschieden. Gelangen diese Isoflavone über die Galle in den Darm, so werden die Konjugate mit Hilfe der Darmenzyme zu Aglykonen gespalten und erneut resorbiert, so dass sie einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen [Chang und Nair, 1995; Day et al., 1998; Atkinson et al., 2005].

Isoflavone liegen im Plasma sowie im Urin fast ausschließlich als konjugierte Verbindungen vor, jedoch sind sie in Geweben überwiegend in Form ihrer Aglykone enthalten [Doerge et al., 2001]. Nach Lampe [2003] können Isoflavone in einer weiten Reihe von Körperflüssigkeiten enthalten sein, wie u.a. auch in Muttermilch, Fruchtwasser oder Speichel. Es gibt darüber hinaus einige Hinweise, nach denen Isoflavone die Blut-Hirnschranke und die Plazenta passieren können [Doerge et al., 2001].



Isoflavone können auch über den Phase-I-Metabolismus metabolisiert werden. Sie werden nach ihrer Resorption oxidativ durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen in der Leber verstoffwechselt. *In vitro* konnten mit induzierten Rattenlebermikrosomen und Humanlebermikrosomen unter Zugabe von Daidzein und Genistein eine Reihe von hydroxylierten Derivaten detektiert werden. Diese konnten teilweise auch im Humanurin nach einem definierten Sojakonsum identifiziert werden [Zhang et al., 1999; Xu et al., 1994]. Der oxidative Metabolismus von Daidzein durch Humanlebermikrosomen [Kulling et al., 2001] ist in Abbildung 11 aufgeführt. In einem *in vitro*-Test wurde darüber hinaus der Phase-I-Metabolismus von Equol untersucht, wobei sich zahlreiche mono- und dihydroxylierte Verbindungen bildeten, wobei 8-Hydroxyequol und 3'-Hydroxyequol mengenmäßig dominierten [Rüfer et al., 2006a].

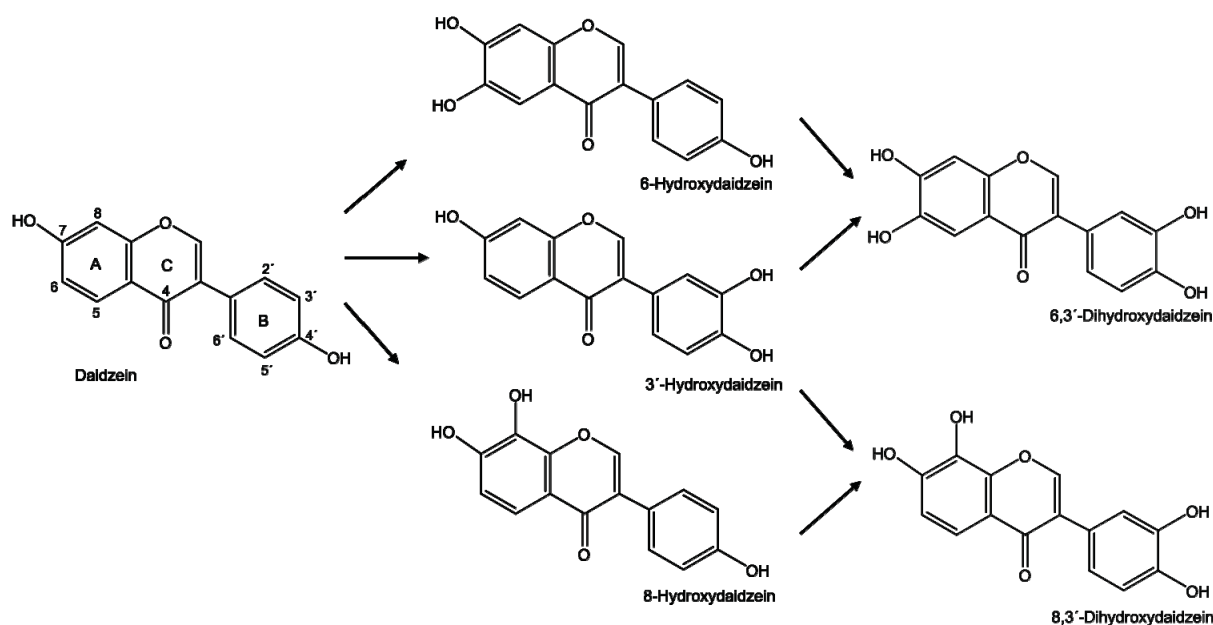


Abbildung 11: Oxidativer Metabolismus von Daidzein durch Humanlebermikrosomen nach Kulling et al., [2001].

Lignane unterliegen einem anderen Metabolismus als die Isoflavone. Nach einem Verzehr von z.B. Leinsamen werden die in ihm enthaltenen Lignane (Secoisolariciresinol-Diglucosid und Matairesinol) im Colon von Darmbakterien metabolisiert, wobei die eigentliche „Wirkform“ der Lignane - die sogenannten „Säugelignane“ - entstehen. Die beiden Lignane werden dabei fast vollständig in Enterodiol und Enterolacton überführt. Durch bakterielle Enzyme wird bei SDG eine Dekonjugierung katalysiert, auf die eine Demethylierung und Dehydroxylierung folgt. Das entstandene Enterodiol kann durch Darmbakterien zu Enterolacton oxidiert werden, welches ebenfalls durch Demethylierung und Dehydroxylierung von Matairesinol entsteht. Im Unterschied zu den pflanzlichen Lignanen besitzen die beiden „Säugelignane“ phenolische Gruppen in der meta-Position und treten racemisch auf [Ayres

und Loike, 1990; Setchell et al., 1980]. Diese Metabolisierung wird in Abbildung 12 verdeutlicht.

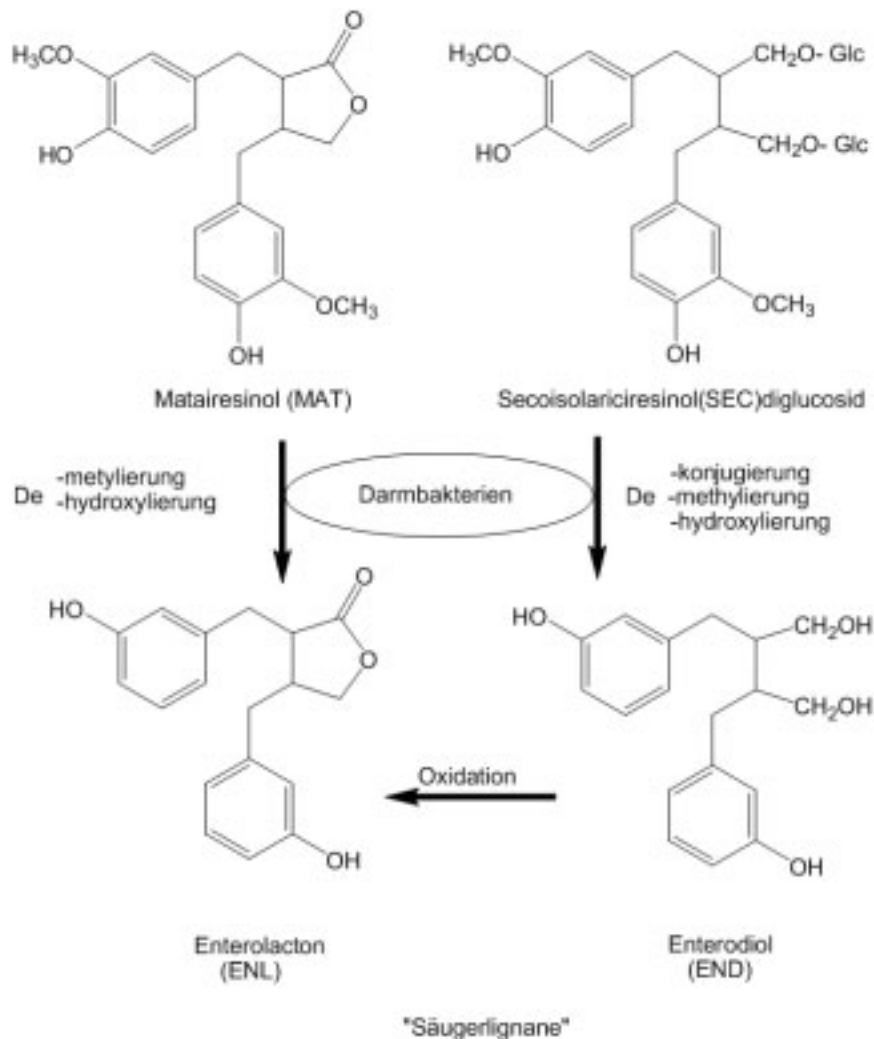


Abbildung 12: Metabolisierung von Secoisolariciresinol-diglucosid und Matairesinol.

Die im Darm gebildeten Säugerlignane werden resorbiert und gelangen über die Pfortader in die Leber, in der sie zu Sulfaten und Glucuroniden umgesetzt werden (Phase-II-Konjugation). Da sie nun wasserlöslich sind, können sie in die systemische Zirkulation eintreten, oder über die Galle erneut in den Darm gelangen. Durch  $\beta$ -Glucuronidasen werden die „Säugerlignane“ abermals konjugiert, wodurch eine erneute Resorption möglich ist. Demnach unterliegen Lignane (ähnlich wie die Isoflavone) dem enterohepatischen Kreislauf. In vielen Studien konnte ein signifikant höherer Gehalt an den sogenannten Säugerlignanen nach dem Verzehr von lignanhaltigen Lebensmitteln (wie Leinsamen) im Urin sowie im Blut nachgewiesen werden [Heinonen et al., 2001]. Die beiden pflanzlichen Ausgangsverbindungen SDG und Matairesinol konnten dabei nur in Spuren detektiert werden, weshalb dieser Metabolismus eingehend untersucht wurde. Die Säugerlignane sind in allen Körperflüssigkeiten des Menschen nachweisbar. Die Lignan-Metabolisierung ist

jedoch weitestgehend von der jeweiligen Darmflora abhängig. Der oxidative Metabolismus durch Cytochrom-P450-abhängige Enzyme konnte *in vitro* nachgewiesen werden, wobei dieser *in vivo* augenscheinlich kaum eine Rolle spielt, da keine hydroxylierten Derivate der pflanzlichen Lignane bis dato in nennenswerten Mengen nachgewiesen werden konnten [Adlercreutz et al., 1995]. Die Enterolacton-Konzentrationen im Plasma erreichen bei Europäern und Asiaten ähnliche Werte - anders als bei den Isoflavonkonzentrationen.

#### 1.1.5 Physiologische Eigenschaften von Isoflavonen

Seit einiger Zeit wurde aufgrund von epidemiologischen Studien häufig eine Korrelation zwischen einer niedrigen Mortalitätsrate für hormonabhängige Krebsarten (Prostata-, Brust-, Gebärmutterhalskrebs etc.) mit einer phytoestrogenreichen Ernährung gezogen. So ist z.B. die Brustkrebsrate in Japan wesentlich niedriger als bei Frauen in den westlichen Industrieländern, was in Verbindung gebracht wird mit der phytoestrogenreichen traditionellen asiatischen Ernährung. Die Ernährungsweise der Bevölkerung in den westlichen Industrieländern weist im Vergleich hierzu deutliche Unterschiede auf und ist gekennzeichnet durch einen vermehrten Konsum von tierischen Fetten und Proteinen. Hingegen ist der Verzehr von Obst und Gemüse geringer, was sich in niedrigen Gehalten an Vitaminen, Mineralstoffen, Spurenelementen und Ballaststoffen zeigt [Bingham et al., 1998; Dittrich und Leitzmann, 1996]. Die asiatische Kost hingegen basiert auf einem äußerst hohen Verzehr an pflanzlichen Lebensmitteln, wobei der isoflavonreiche Soja eines der Hauptnahrungsmittel in asiatischen Ländern darstellt [Adlercreutz und Mazur, 1997]. Epidemiologisch betrachtet ist dies von großem Interesse, da diskutiert wird, dass die im Soja enthaltenen Isoflavone eine geringere Mortalität und Morbidität mitbewirken sollen [Bingham et al., 1998; Nakamura, 2000]. Die Bevölkerung asiatischer Länder, wie China oder Japan, zeigt deutlich geringere Raten von Osteoporose (ebenso osteoporotischen Frakturen), Wechseljahresbeschwerden, Herzkreislaufbeschwerden oder hormonabhängiger Krebserkrankungen als die der westlichen Industrieländer [Yamamoto et al., 2003]. Die gesundheitlich positiven Effekte beruhen offensichtlich auf den Ernährungsgewohnheiten und nicht auf genetischen „Unterschieden“. Dieser Befund stützt sich auf eine Reihe von Untersuchungen, nach denen japanische Frauen, welche nach Amerika ausgewandert sind und dort die westlichen Ernährungsgewohnheiten adaptierten, ein erhöhtes Risiko für hormonabhängige maligne Erkrankungen aufweisen. Wurde jedoch die traditionelle asiatische Ernährungsweise (und damit einhergehend v.a. ein Verzehr von verschiedenen Sojaprodukten) weitergeführt, so änderte sich dieses Risiko nicht signifikant [Adlercreutz und Mazur, 1997; Shimizu, et al., 1990; Fujuwara et al., 1999; Rice et al., 2007; Wu et al., 1998].

Phytoestrogenen, insbesondere den Isoflavonen und den beiden „Säugelignan“ ENL und END, konnten eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten und Wirkungen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 13) [Adlercreutz, 1999]. Die relevanten Wirkungen finden an dieser Stelle nur eine kurze Erwähnung und werden im Anschluss weiter erläutert:

- estrogene/ antiestrogene Wirksamkeit
- Linderung klimakterischer Beschwerden
- präventive Effekte auf den Calcium- und Knochenstoffwechsel (Knochendichte)
- Milderung von Herz- Kreislaufbeschwerden: blutdrucksenkende Wirkung

Zu den verschiedenen biologischen Aktivitäten, die eine Reihe von Phytoestrogenen besitzen sollen, gehört u.a. die antioxidative Wirksamkeit. Da in der vorliegenden Arbeit überwiegend mit Isoflavonen gearbeitet wurde und diese aus verschiedenen Pflanzen isoliert sowie charakterisiert werden konnten, wird in Abbildung 13 insbesondere auf diese Phytoestrogengruppe eingegangen. Dabei sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass bei der Untersuchung der biologischen Wirkungen von Phytoestrogenen zunächst immer die positiven Effekte betont wurden. Kritische Aspekte, wie z.B. eine mögliche Toxizität rückten erst später in den Blickwinkel der Forschung. Für fundierte Aussagen hinsichtlich möglicher negativer Wirkungen von Phytoestrogenen fehlen bis heute aussagekräftige Langzeitstudien. Dies gilt insbesondere für den Fall einer Supplementierung, die meist nur mit einzelnen Isoflavonen erfolgt [z.B. Cornwell et al., 2004]. Dies wirft die Frage auf, in wieweit diese Ergebnisse auf ein Gemisch von Isoflavonen zusammen mit anderen Sekundärmetaboliten, wie sie u.a. im Rotklee vorliegen, bezogen werden können. Für die Darstellung der biologischen Wirkungen bezieht sich die vorliegende Arbeit auf vorhandene Untersuchungen aus der Fachliteratur, die jedoch nicht den Anspruch auf Vollständigkeit erheben sollen.

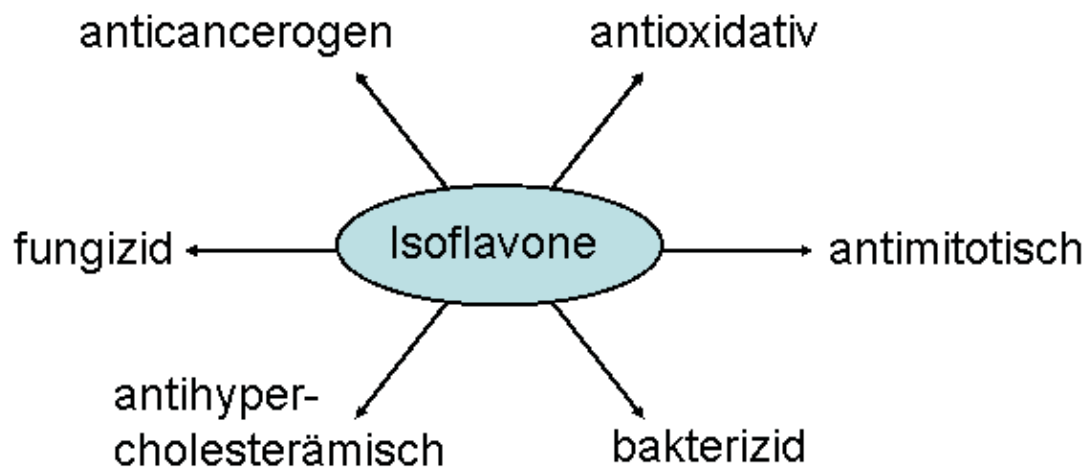


Abbildung 13: Übersicht über die biologischen Aktivitäten von Isoflavonen.

Eine Reihe positiver gesundheitlicher Effekte von Phytoestrogenen seien an dieser Stelle erwähnt und werden in den folgenden Unterkapiteln kurz erläutert:

- Stimulation der Produktion von „Sex-Hormone-Binding-Globulin“ (SHBG)
- Hemmung des Steroidhormonstoffwechsels
- Einschränkung der Kanzerogenaktivität durch Hemmung Cytochrom P450-abhängiger Enzyme
- Beeinflussung des Gallensäure- bzw. Cholesterinstoffwechsels: Hemmung der Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase durch ENL und END

#### 1.1.5.1 Hormonabhängige/-unabhängige Wirkung

In ihrer Struktur ähneln die Phytoestrogene dem physiologisch wichtigen 17- $\beta$ -Estradiol, dem weiblichen Keimdrüsenhormon. Dieses so genannte Follikelhormon regelt unter anderem den Menstruationszyklus und wirkt spezifisch auf die weiblichen Geschlechtsorgane, die Brustdrüsen und auf bestimmte Zentren im Zwischenhirn. Deshalb wird über einen Schutz vor hormonabhängigen Krebsarten durch Phytoestrogene diskutiert.

Eine hohe Konzentration von Phytoestrogenen im Urin resultiert als Folge des Verzehrs von phytoestrogenhaltigen Pflanzen (Soja, Leinsamen, Roggen). Phytoestrogene besitzen zwar nur etwa ein Tausendstel (mindestens Faktor 100, höchstens 10000) der Wirkung von tierischen, steroidalen Estrogenen, jedoch können sie im Urin des Menschen in 10-1000fach höheren Konzentrationen gefunden werden als die endogen gebildeten Estrogene. Im Blutplasma lassen sich bis zu 10000fach höhere Konzentrationen von Isoflavonen als von

17- $\beta$ -Estradiol nachweisen. Damit liegen sie in einer um ein Mehrfaches höheren Konzentration vor als diejenige Konzentration, welche überschritten werden muss, um hormonelle Effekte bei einem Erwachsenen auszulösen [Setchell, 1998]. Phytoestrogene können demzufolge agonistische oder antagonistische Wirkungen zeigen. Aufgrund ihrer phenolischen Struktur und den Abstand der Hydroxylgruppen in Ring X und Y (vgl. Kapitel 1.1.1), können sie an Estrogenrezeptoren (ER) anbinden. Durch die Interaktion mit den ER können Phytoestrogene die physiologischen Wirkungen des Steroidhormons 17- $\beta$ -Estradiol nachahmen oder blockieren. Es resultiert eine estrogen- oder antiestrogen- Wirkung. Dies hängt im Wesentlichen von dem Hormonumfeld und dem betreffenden Gewebe ab. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass bei einem niedrigen endogenen Estrogenspiegel estrogen- Effekte durch die Wechselwirkung von Phytoestrogenen mit den ER hervorgerufen werden. Liegt eine hohe Konzentration an endogenen Estrogenen vor, dann „maskieren“ Phytoestrogene die Estrogenrezeptoren und rufen aufgrund ihrer wesentlich schwächer ausgeprägten Estrogenität eine Verminderung oder ein Ausbleiben der estrogen- Wirkung hervor [Totta et al., 2005; Mousavi und Adlercreutz, 1993; Davis et al., 2008]. Ein estrogen- Effekt von Phytoestrogenen liegt z.B. in Hinblick darauf vor, dass sie die Fähigkeit aufweisen, das Wachstum von estrogen-abhängigen, humanen MCF-7-Krebszellen zu stimulieren [Martin et al., 1978]. Als einer der antiestrogen- Effekte lässt sich das Verdrängen der Bindung von 17- $\beta$ -Estradiol zu ER durch Genistein und Coumestrol ansehen, sobald sie zu Ratten- oder humanen Brust-Tumorzell-Geweben gegeben wurden [Verdeal et al., 1980]. Demzufolge gehören Phytoestrogene zu den selektiven Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM). Im Cytosol gibt es zwei unterschiedliche Estrogenrezeptoren, den Subtypus ER-alpha ( $ER\alpha$ ) und ER-beta ( $ER\beta$ ), an denen 17- $\beta$ -Estradiol gleich gut bindet. Bei Phytoestrogenen liegen jedoch verschieden starke Bindungsaffinitäten zu den einzelnen ERs vor. Isoflavone binden zumeist besser an  $ER\beta$  als an  $ER\alpha$ . Innerhalb von verschiedenen „Rezeptorbindungsstudien“ wurden diese Effekte genauer untersucht. Verallgemeinert kann folgende Reihenfolge bezüglich der Bindungsstärke und des estrogen- Potentials aufgeführt werden: Equol  $\geq$  Genistein  $\geq$  Daidzein  $\geq$  Glycitein. Die Estrogenität nimmt innerhalb dieser Reihe ab [Morito et al., 2001]. Wichtig bei der Betrachtung der unterschiedlichen Estrogenrezeptoren ist auch deren Vorkommen innerhalb des Gewebes. So ist der „klassische  $ER\alpha$ “ hauptsächlich im Uterus, in der Brust und in der Leber lokalisiert. In der Prostata, im Knochengewebe, in den Eierstöcken, im Darm sowie in den Gefäßwänden ist hauptsächlich der  $ER\beta$  vorhanden [Kuiper et al., 1998]. Dadurch können auch die verschiedenen Wirkungen in den einzelnen Organen besser erklärt werden. Die beiden unterschiedlichen Estrogenrezeptoren sollen darüber hinaus unterschiedliche biologische Wirkungen vermitteln, was für einige Erkrankungen (z.B. kardiovaskuläre) von Bedeutung sein könnte. So weist  $ER\alpha$

insbesondere proliferative sowie entzündungsfördernde Effekte auf, was sich bei ER $\beta$  genau gegenteilig verhält [Totta et al., 2005].

Phytoestrogene können eine Reihe weiterer hormonabhängiger Effekte zeigen, welche unabhängig von den Estrogenrezeptoren sind. Die Hemmung von Enzymen wie der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, der Aromatase oder der Steroidsulfatase beeinflussen so das System der Geschlechtshormone. Die Modulation des Estrogenmetabolismus wird wahrscheinlich beeinflusst durch die Hemmung der Enzyme der Estrogenbiosynthese. Außerdem können Phytoestrogene mit dem System des Geschlechtshormon-bindenden Proteins (SHGB; Sex Hormone Binding Globulin) wechselwirken [Kurzer und Xu, 1997]. Durch die Induktion der SHGB-Synthese in der Leber werden vermehrt endogene Estrogene gebunden, wodurch diese nicht mehr in ihrer freien und aktiven Form vorliegen, woraus ein antiestrogener Effekt resultiert [Mousavi und Adlercreutz, 1993]. Hormonunabhängige Wirkmechanismen sind insbesondere für das Isoflavon Genistein beschrieben. Dazu gehören hauptsächlich die Induktion der Apoptose, die Hemmung der Zellproliferation verschiedener Tumorzelllinien und der Angiogenese, sowie die Inhibierung verschiedener Proteintyrosinkinasen. Diese Effekte sind durchaus *in vitro* messbar, jedoch stellt sich die Frage, ob die jeweilige Konzentration an Genistein im Körper/Gewebe ausreicht, um die beschriebenen Effekte zu erzielen [Hsieh et al., 1998; Kurzer und Xu et al., 1997; Bouker et al., 2000; Bingham et al., 1998].

Unabhängig von den beschriebenen Wirkungen soll die pränatale Exposition mit dem Isoflavon Genistein einen Einfluss auf die geschlechtliche Differenzierung ausüben. Dies wurde anhand einer Studie mit trächtigen „Charles River CD Ratten“ ermittelt [Levy et al., 1995].

#### 1.1.5.2 Antikarzinogene Effekte auf hormonabhängige Krebsarten

Hormonabhängige Krebserkrankungen wie Brust- oder Prostatakrebs sind häufige Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Nach Herz-Kreislaufkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland [Statistisches Bundesamt, 2007]. Laut der Deutschen Krebsstatistik [GEKID, 2006] ist das Mammakarzinom mit einem Anteil von ca. 25% von allen Krebserkrankungen der häufigste bösartige Tumor in der weiblichen Bevölkerung in Deutschland. Weltweit gesehen ist es ebenso der häufigste maligne Tumor bei Frauen [Adlercreutz und Mazur, 1997]. Die Brustkrebsinzidenz steigt in Deutschland seit 1970 stetig an und die Erkrankungsrate liegt im europäischen Bereich im Mittel. Aus umfangreichen epidemiologischen Datenerhebungen geht hervor, dass hormonabhängige Krebserkrankungen in asiatischen Ländern weitaus seltener auftreten als in den westlichen



Industrienationen. In den westlichen Ländern (wie u.a. Großbritannien, Niederlanden, Nordamerika, Australien oder Deutschland) erkranken rund viermal mehr Menschen an Brust- oder Prostatakrebs als in Asien [Stewart und Kleinhues, 2003]. Auch in den USA ist die Erkrankungsrate des Mammakarzinoms vier- bis fünfmal höher als in Asien, was mit einer deutlichen Senkung der Lebenserwartung einhergeht. Aus der Vielzahl von epidemiologischen Studien wird ein Zusammenhang zwischen dem geringeren Risiko, an hormonabhängigen Krebsarten zu erkranken und der Ernährungsweise in asiatischen Ländern gezogen. Neben den hormonellen und den genetischen Faktoren hat demzufolge eine phytoestrogenreiche Ernährung große Bedeutung für die Erkrankungswahrscheinlichkeit [Strauss et al., 1998; Adlercreutz, 2003]. Die traditionelle asiatische Ernährung ist geprägt durch einen hohen Anteil an Soja, welcher viele Isoflavone enthält, (vgl. 1.2.2), einen hohen Ballaststoffanteil, niedrigen Fettkonsum und häufigen Fischkonsum. In einigen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Brustkrebsrate und einem hohen Konsum von Soja aufgezeigt werden [Witte et al., 1997]. Ein Indiz dafür gaben Studien mit asiatischen Migranten. Wurde westliche Nahrung, bei in die USA ausgewanderten Asiaten adaptiert, so stieg die Krebsrate in der Gruppe der Migranten stark an. Innerhalb von zwei Generationen erfolgte bereits eine dreifache Zunahme der Brustkrebserkrankungen bei den ausgewanderten asiatischen Frauen. Aus den epidemiologischen Daten geht hervor, dass Isoflavone sowohl eine antikanzerogene als auch eine krebsvorbeugende Wirkung ausüben und daher das Auftreten bestimmter Krebsarten wie Brustkrebs zu reduzieren vermögen [Barnes, 1998; Adlercreutz et al., 1995]. Dabei spielt insbesondere Genistein in der Prophylaxe dieser Krebsarten eine bedeutende Rolle. Isoflavone können antiestrogene Wirkungen ausüben, wobei Genistein eine hemmende Wirkung auf estrogeninduzierte Tumore der Brust ausübt. Die krebspräventive Wirkung wurde insbesondere für die Brust [Shu et al., 2001] und die Prostata [Kolonel et al., 2000] festgestellt. Tierexperimentelle Studien, bei denen weiblichen Ratten („Sprague Dawley“) mit experimentell induzierten Tumoren Sojaproteinisolate ins Futter gemischt wurden, belegen dies [Hakkak et al., 2000; Zhou et al., 1999].

Isoflavone können hormonabhängige, als auch hormonunabhängige Wirkungen in Bezug auf eine Prävention von Krebserkrankungen zeigen (s. Kapitel 1.1.5.1 und Tabelle 3), die einzelnen Mechanismen werden teilweise noch diskutiert [Mousavi und Adlercreutz, 1993; Adlercreutz, 2002].



Tabelle 3: Hormonabhängige und –unabhängige Wirkung von Isoflavonen.

| Hormonabhängige Wirkung                                                                                                                                                                                                                                                   | Hormonunabhängige Wirkung                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Freisetzung des SHBG in der Leber</li> <li>• Hemmung der Aromatase</li> <li>• Interaktion mit dem Steroidmetabolismus</li> <li>• „Belegung“ des Hormonrezeptors</li> <li>• Stimulans: Freisetzung inaktiver Estrogene</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemmung der Phase-I-Enzyme</li> <li>• Hemmung der DNS-Topoisomerase II</li> <li>• Antiproliferative und antioxidative Effekte</li> <li>• Einfluss auf Apoptose und Zellzyklus</li> <li>• Hemmung der Angiogenese</li> <li>• Hemmung von Proteintyrosinkinasen</li> </ul> |

Phytoestrogene können mit dem System der endogenen Estrogene wechselwirken. Wichtig zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass Isoflavone den SHBG-Spiegel anheben können und damit die Konzentration an frei zirkulierenden und frei verfügbaren endogenen Estrogenen verringern (vgl. Kapitel 1.1.5.1, dort werden diese Aspekte näher erläutert) [Hebert et al., 1998]. Die Schutzwirkung von Isoflavonen auf die Entstehung von Brustkrebs ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt; ebenso wirken Isoflavone auf Biomarker von Brustkrebs durch eine verringerte  $16\alpha$ -Hydroxyestron-Konzentration (ein toxischer Metabolit von endogenen Estrogenen), was sich negativ auf die Entstehung der Krebszellen auswirken kann [Xu et al., 2000; Duncan et al., 1999; Low et al., 2005; Xu et al., 1998; Nettleton et al., 2005].

Eine antikanzerogene Wirkung von Isoflavonen, welche hormonunabhängig ist, basiert im Wesentlichen in der Inhibierung der Proteintyrosinkinase [Akiyama et al., 1987] bzw. zusätzlich auf der Inhibierung der DNS-Topoisomerase II [Markovits et al., 1989]. Das heißt, antiproliferative Effekte auf Tumorzellen sind bei der antikanzerogenen Wirkung von Isoflavonen mit eingeschlossen, wie die Hemmung des Mitoseenzym Topoisomerase II. Darüber hinaus kann es zu einem Interagieren von Isoflavonen mit dem Multi-Drug-Resistance-Protein (MRP) kommen [Castro und Altenberg, 1997; Versantvoort et al., 1994]. Tumorprotektive Wirkungen können ebenso auf antioxidative Eigenschaften zurückgeführt werden, welche zusätzlich noch Effekte auf das Zellwachstum und die Differenzierung ausüben können.

Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs bei Frauen sollen neben der genetischen Disposition eine frühe erste Regelblutung (Menarche), Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt sowie der späte Eintritt ins Klimakterium sein [GEKID, 2006]. Ein hoher

Estrogenspiegel bei postmenopausalen Frauen stellt ebenso ein erhöhtes Risiko für eine Erkrankung dar [Henderson et al., 1985]. Umgekehrt sollen ausgetragene Schwangerschaften in jungen Jahren, mehrere Geburten und längere Stillzeiten das Risiko einer Brustkrebserkrankung senken. In einigen Studien wurde beobachtet, dass durch Übergewicht, Bewegungsmangel und in gewissem Umfang durch regelmäßigen Alkoholkonsum das Brustkrebsrisiko anstieg. Der gegenteilige Effekt war in geringerem Maße bei regelmäßiger körperlicher Aktivität und Sport zu beobachten. Die präventive Wirkung von Isoflavonen auf die Entstehung von Brustkrebs geht vor allem von ihrer antiestrogenen Wirkung aus. Nach Cassidy et al. [1994] konnte in einer Interventionsstudie gezeigt werden, dass eine Verlängerung des Menstruationszyklus (insbesondere der folliculären Phase) nach einer einmonatigen Supplementierung von 45 mg Isoflavonen in Form von texturiertem Sojaprotein erfolgte. Diese Ergebnisse konnten jedoch in einer weiteren dreimonatigen Studie nicht bestätigt werden [Duncan et al., 1999]. In diesem Zusammenhang ist es schwierig, die einzelnen Untersuchungen und Studien miteinander zu vergleichen, da teilweise mit Sojaextrakt oder mit isoliertem Genistein supplementiert wurde. Darüber hinaus scheint der Zeitpunkt der ersten Soja-Supplementierung einen Einfluss auszuüben. So konnte in tierexperimentellen Studien mit Genistein beobachtet werden, wie bei der Gabe vor der Pubertät die Ausdifferenzierung des Brustgewebes beeinflusst wird, was zu einer schützenden Wirkung der chemischen Kanzerogenese führen kann, wodurch das Brustkrebsrisiko ebenfalls abnimmt [Wu et al., 2002]. Bei einer Supplementierung mit Genistein im „erwachsenen Alter“ konnte diese schützende Wirkung bislang nicht bestätigt werden [Adlercreutz, 2002]. In einer Reihe von Humanstudien wurde eine positive Korrelation zwischen einer Isoflavon-Supplementierung und der Reduktion von Mammakarzinomen gezogen [Rohr, 2006]. Das Deutsche Krebsforschungszentrum in Heidelberg war an einer Studie beteiligt, laut der durch eine Supplementierung mit Isoflavonen oder Lignanen eine Minimierung des Krebsrisikos um bis zu 50% erfolgen kann [Linseisen et al., 2004]. Mittels mammographischen Untersuchungen konnten bei einer solchen Supplementierung keine Gewebsverdickungen in der Brust festgestellt werden [Powles, 2004; Atkinson et al., 2004]. Die Langzeitanwendung von Isoflavonen und Lignanen wird laut der Meta-Studie von Tempfer et al. [2007] als unkritisch angesehen, wobei über die Schutzwirkung erneut diskutiert wurde. Diesbezüglich geben einige tierexperimentelle Studien Anlass, die positive Schutzwirkung von Isoflavonen vorsichtiger zu beurteilen – insbesondere wenn Tumorzellen bereits vorhanden sind. Bei der Verfütterung von Genistein oder der äquivalenten Menge von Sojaproteinisolat an athymischen Nacktmäusen mit implantierten MCF-7-Zellen (menschliche, östrogenabhängige Brustkrebszellen) kam es zu einem beschleunigten Wachstum dieser Zellen. Bei der Kontrollgruppe, welche nicht mit isoflavonhaltigem Futter ernährt wurde, kam es zu keiner verstärkten Proliferation dieser

Zellen. Die Konzentration von Isoflavonen, die bereits eine Stimulierung auf die Proliferation der Tumorzellen ausübt, ist mit denen in Nahrungsergänzungsmitteln vergleichbar oder kann bereits mit einer phytoestrogenreichen Kost aufgenommen werden [Ju et al., 2001; Allred et al., 2001a; Allred et al., 2001b]. Ebenfalls wurde die Initiationsphase der Brustkrebsentstehung an Ratten bei der Supplementierung des Tierfutters mit Genistein untersucht. Dabei wuchsen die Tumore wesentlich schneller als bei den Tieren in der Kontrollgruppe. Im Plasma der Ratten lag eine Konzentration von 3,4  $\mu\text{M}$  Genistein vor, welche durch hochdosierte Nahrungsergänzungsmittel durchaus vom menschlichen Körper aufgenommen werden kann. Das endogene Estradiol im Plasma der Ratten ähnelte dem Estradiol-Spiegel postmenopausaler Frauen [Allred et al., 2001a; Takimoto et al., 2003; Busby et al., 2002; Bloedon et al., 2002]. Durch einige *in vitro*-Untersuchungen mit MCF-7-Zellen werden diese Ergebnisse bestätigt. Isoflavone stimulieren in niedrigen Konzentrationsbereichen die Proliferation von Tumorzellen - hingegen ist eine Hemmung der Kanzerogenese erst in einem sehr hohen Konzentrationsbereich zu erkennen. Laut einer klinischen Studie von Petrakis et al. [1996] hat eine vermehrte Aufnahme von Genistein einen stimulierenden Effekt auf das weibliche Brustdrüsengewebe bei prä- sowie postmenopausalen Frauen. In einer weitreichenden Kohortenstudie konnte bei Frauen eines Alters von 45–75 Jahren ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Ausscheidung von Isoflavonen(-Metaboliten) im Urin und einem erhöhten Brustkrebsrisiko festgestellt werden [Grace et al., 2004]. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass die Aufnahme von Isoflavonen in hoher Konzentration bei Frauen mit Brustkrebs, einer präkanzerogenen Veränderung in der Brust oder einer genetischen Prädisposition kontrainduziert sein könnte [Newbold et al., 2001]. Diesbezüglich kann als Faktor auch die Form der aufgenommenen Isoflavone eine Rolle spielen. Isoflavone in isolierter Form können dabei nicht gleichgesetzt werden mit einem komplexen Lebensmittel. Werden verschiedene Soja-Verarbeitungsprodukte wie Sojamehl, Sojaextrakt und das isolierte Isoflavon Genistein zum Futter von Mäusen mit implantierten MCF-7-Zellen gegeben, dann sind die beobachteten Effekte unterschiedlich. Wird Sojamehl verfüttert, dann kommt es zu keinem vermehrten Wachstum von Tumorzellen, ganz im Gegensatz zu der Supplementierung mit Genistein [Allred et al., 2004]. Bislang fehlen geeignete (Langzeit)-Studien, um eine abschließende Beurteilung vornehmen zu können [Peeters et al., 2003; Bouker und Hilakivi-Clarke, 2000].

Neben Brustkrebs ist Prostatakrebs die am häufigsten vorkommende Krebserkrankung. Circa 40% aller Männer zwischen 60-70 Jahren beherbergen maligne Zellen in ihrer Prostata, wobei es von der genetischen Disposition abhängt, ob diese invasiv werden [Hänsel, 2007]. Anhand von epidemiologischen Studien ist bekannt, dass Männer aus den ostasiatischen Ländern viel seltener an Prostatakrebs erkranken als in den westlichen Industrieländern, was - wie im Falle von Brustkrebs - mit der isoflavonhaltigen Ernährung in

Verbindung gebracht wird. Das Risiko der Entstehung von Prostatakrebs ist um 40-65% reduziert [Messina, ASA (online)]. In verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen wurde die mögliche Schutzwirkung von Isoflavonen und Lignanen hinsichtlich der Entstehung von Prostatakrebs untersucht. Bylund et al. [2000] implantierten Nacktmäusen LNCaP-Zellen (Prostatakrebszellen) und beobachteten die Tumorentwicklung und den PSA-Wert (engl.: prostate specific antigen; Prostata-spezifisches Antigen) über einen Zeitraum von neun Wochen unter verschiedenartiger Fütterung. Im Falle einer sojaproteinhaltigen Fütterung verzögerte sich das Wachstum von Tumoren. Dieser Effekt war noch ausgeprägter bei einer Supplementierung mit Roggen, welcher Lignane enthält. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Untersuchung mit transgenen Mäusen erhalten, was darauf hindeutet, dass sich bei der phytoestrogenreichen Kost eher latente, klinisch nicht in Erscheinung tretende Prostatatumore bilden [Mentor-Marcel et al., 2005]. Bei der protektiven Wirkung durch Isoflavone spielt die Bindung an ER $\beta$ -Rezeptoren in der Prostata eine große Rolle. Ein anderer diskutierter Mechanismus ist die Induktion von Apoptose der Prostatakrebszellen. Anhand einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate von Tumorzellen mit mittlerer oder niedriger Aktivität bei Männern mit Prostatakrebs nach der Aufnahme von Isoflavonen aus Rotklee deutlich erhöht war [Stephens, 1997]. Nicht unbedeutend scheint hierbei die Metabolisierung von Isoflavonen zu sein (s. Kapitel 1.1.4), da unter den sogenannten Equol-Produzenten eine signifikant geringere Inzidenz für Prostatakrebs zu beobachten war [Kumar et al., 2004; Lee et al., 2003]. Das Ernährungsverhalten von 200 Japanern, welche an Prostatakarzinom litten, wurde ebenfalls in einer Fallkontrollstudie untersucht, wobei es mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen wurde. Diejenigen, welche einen hohen Konsum der beiden Soja-Isoflavone Daidzein und Genistein aufwiesen, hatten ein signifikant reduziertes Risiko für die Entwicklung der Krebserkrankung. Nagata et al. [2007] erklärten dieses Ergebnis mit einer durch die Isoflavone induzierten Hemmung der 5 $\alpha$ -Reduktase und einem dadurch folgendem reduzierten Testosteron-Spiegel.

#### 1.1.5.3 Antioxidative Eigenschaften

Den Isoflavonen wird eine Reihe von weiteren positiver („gesundheitsfördernder“) Wirkungen nachgesagt, zu denen auch die antioxidative Wirkung gehört. Isoflavone sind wichtige Antioxidantien, da sie durch ihre „Radikalfängereigenschaften“ (s.u.) den Körper vor einer Lipid- und Proteinoxidation sowie vor DNA-Schädigungen schützen, und damit für den Organismus zellschädigende Wirkungen abwehren. Darüber hinaus geht von ihnen ein gewisser UV-Schutz aus (aufgrund des "Abfangens von Radikalen") [Berhow und Vaughn, 1999]. Bei einer Vielzahl von biochemischen Prozessen im Organismus entstehen beim Umsatz von Sauerstoff „freie Radikale“ und sogenannte „reaktive Sauerstoffverbindungen“ (engl.: reactive oxygen species; ROS), wie u.a. Hydroxyl- oder Peroxylradikale oder auch

Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff. Nur ein geringer Teil des im Energiestoffwechsel umgesetzten Sauerstoffs wird in Form von freien Radikalen frei, worunter grundsätzlich immer hochreaktive Teilchen zu verstehen sind. Sie besitzen im Körper (wie auch die ROS) eine wichtige Rolle, da sie aufgrund ihrer Aggressivität dem Immunsystem dienen und so z.B. einen Schutz vor körperfremden Eindringlingen wie Bakterien oder Viren bieten [Papadimitrakaki, 1999]. Der menschliche Organismus verfügt daher über einen komplexen, antioxidativen Schutzmechanismus, um Schädigungen durch einen Angriff dieser freien Radikale entgegenzuwirken. Dabei kann zwischen einem enzymatischen und nicht-enzymatischen Mechanismus unterschieden werden [Halliwell und Gutteridge, 1990; McCord, 1993]. Die Enzyme Katalase und Superperoxid-Dismutase (SOD) gehören zum körpereigenen, enzymatischen Abwehrmechanismus. Die nicht-enzymatischen Antioxidantien werden nicht vom Körper gebildet, sondern mit der Nahrung aufgenommen. Dazu gehören vor allem wasserlösliche Stoffe wie Ascorbinsäure oder Harnsäure sowie lipophile Stoffe wie Carotinoide oder Tocopherole. Ebenso spielen Polyphenole eine große Rolle, die mit Gemüse- und Obstreicher Kost aufgenommen werden [Vogel, 1997]. Unter „oxidativem Stress“ versteht man den Zustand, bei dem vermehrt freie Radikale und ROS gebildet werden, wobei es folglich zu einer Disbalance zwischen antioxidativer Abwehr und Prooxidation kommt. Unter dem Begriff „Free Radical Diseases“ wird eine Reihe von Erkrankungen zusammengefasst, welche durch diese vermehrte Bildung entstehen können. Als Beispiele wären zu nennen: Arteriosklerose, Krebs, Herz-Kreislauferkrankungen, Diabetes mellitus, Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, Entzündungsreaktionen und multiple Sklerose [Araya et al., 2004; Chan, 1998; Gutteridge und Halliwell, 1989; Fang et al., 1996].

Isoflavone können auf zwei verschiedenen Wegen antioxidativ wirken; einerseits über den Transfer von Elektronen (Wasserstoffatomen) und andererseits durch eine Komplexbildung mit Metallionen [Guo et al., 2002; Arora et al., 1998; Mitchell et al., 1998]. Dabei wurden die meisten *in vitro*-Studien mit den beiden Isoflavonen Daidzein und Genistein aus Soja durchgeführt. Die antioxidative Kapazität wird dabei durch verschiedene Faktoren beeinflusst, vor allem jedoch grundsätzlich durch die strukturellen Eigenschaften der Substanzen. Bei den beiden Rotklee-Isoflavonen Formononetin und Biochanin A erfolgt im Vergleich mit den Soja-Isoflavonen Daidzein und Genistein an der Position C-4' des jeweiligen Moleküls eine Methylierung der Hydroxylgruppe. Die antioxidative Kapazität wird dadurch erniedrigt, was ebenfalls der Fall ist bei einer Maskierung oder Glykosylierung an der Position C-7 am Isoflavon-Grundgerüst. Zu den antioxidativen Eigenschaften von Genistein gehört u.a. die Inhibierung von DNA-Schäden - welche durch UV-Bestrahlung hervorgerufen werden - die möglicherweise die Photo-Kanzerogenität implizieren [Record et al., 1995]. In der Regel können ähnliche antioxidative Wirkungen mit den bakteriellen

Metaboliten im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen erzielt werden, wobei jedoch bislang nur wenige Untersuchungen hierzu vorliegen. Hierbei bildet Equol jedoch eine Ausnahme, da es eine höhere Antioxidativität als sein Ausgangsprodukt Daidzein aufweist [Rüfer et al., 2006b]. Dabei sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass Isoflavone *in vivo* überwiegend als Phase-II-Metabolite vorkommen (vgl. Kapitel 1.1.4) und sich daraufhin unterschiedliche Wirkmechanismen durch Veränderungen in deren Löslichkeit, der Molekülgeometrie sowie dem Molekulargewicht ergeben. Isoflavone können überdies hinaus oxidative Reaktionen durch Proteinbindung verhindern. Eines der Proteinkomponenten des LDLs (Lipoproteins geringer Dichte), das Apolipoprotein B, besitzt eine spezifische Bindungsstelle für Metallionen, welche für die Oxidation der LDL essentiell sind. Eine Oxidation wird dadurch verhindert, dass die Isoflavone mit den Metallionen um die Bindung an die Proteine konkurrieren [Ferretti et al., 2004; Hwang et al., 2000]. Es ist schwierig, die bis dato bestehenden *in vivo*-Untersuchungen über die antioxidative Wirksamkeit von Isoflavonen in Einklang zu bringen. Innerhalb von Studien, bei denen eine Supplementierung mit Soja-Nahrungsmitteln stattfand, erfolgte eine Verringerung der Marker für den oxidativen Stress [Chen et al., 2005; Wisemann et al., 2000; Djuric et al., 2001; Jenkins et al., 1999]. In anderen Studien konnte jedoch keine Reduktion dieser Marker beobachtet werden, obwohl ebenfalls mit Soja-Nahrungsmitteln oder –Extrakten supplementiert wurde [Vega-Lopez et al., 2005; Pool-Zobel et al., 2000; Hodgson et al., 1999; Samman et al., 1999]. Diesbezüglich wird die Fragestellung aufgeworfen, ob diese Bestimmungen sich generell für die Vorhersage für oxidative Schäden *in vivo* eignen lassen. Dies ist z.B. bei Arteriosklerose der Fall, wobei im Allgemeinen angenommen wird, dass ein Risiko für Arteriosklerose die Oxidation von LDL darstellt [Steinberg und Witztum, 2002; Parthasarathy et al., 1992].

Für die Bestimmung des antioxidativen Potentials gibt es unterschiedliche Methoden, welche sich im Messprinzip und in ihrer Funktionsweise voneinander unterscheiden. Deshalb können die unterschiedlichen Testsysteme nicht unmittelbar miteinander verglichen werden. Am häufigsten verwendet wird der TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) -Test. Dabei wird ein Peroxidase-Substrat mittels Metmyoglobin und Wasserstoffperoxid zum Radikalkation umgesetzt und die entstandene Färbung photometrisch bestimmt (s. unter 3.6.2). Verwendet wird überdies hinaus z.B. der FRAP-Test (Ferric Reducing/Antioxidant Power) sowie der LDL-Oxidationstest.

Die Studie von Lee et al. [2005] untersuchte das antioxidative Potential der beiden Isoflavone Daidzein und Genistein in deren unterschiedlichen Konjugationsformen. Die Glykoside wiesen dabei eine vergleichbare antioxidative Wirkung auf wie die Aglykone, was mittels DPPH- und FRAP-assays ermittelt wurde. Bei der Untersuchung des Potentials unter Verwendung von LDL-Oxidationstests konnte festgestellt werden, dass Genistein und



Daidzein im Vergleich zu Epicatechin und  $\alpha$ -Tocopherol eine eher unbedeutende antioxidative Wirkung aufweisen.

Als Resümee stellt sich die Frage, ob Isoflavone mittels antioxidativer Effekte überhaupt in der Lage sind, die Entstehung oder den Verlauf von Krankheiten zu verhindern oder zu verzögern.

#### 1.1.5.4 Klimakterische Beschwerden

Laut einiger epidemiologischer Studien leiden Frauen aus asiatischen Ländern weniger an klimakterischen Beschwerden, wie Hitzewallungen, Schweißausbrüche, Depressionen etc., als Frauen in den westlichen Industrieländern [Anderson et al., 1999; vergleichend auch Lock, 1991; Adlercreutz et al., 1992]. Zur Linderung dieser Beschwerden wurde in den vergangenen Jahrzehnten häufig die Hormonersatztherapie angewandt, die Estrogen mit Gestagen- oder nur Estrogen (lediglich für Frauen ohne Gebärmutter) verabreichte. Durch einige Studien weiß man heute, dass diese klassische Form der Hormon-Ersatztherapie nicht ganz ungefährlich ist. Zwei voneinander unabhängige Studien haben sich mit der Langzeitwirkung dieser Substanzen befasst, wobei ein erhöhtes Risiko für koronare Erkrankungen sowie Brustkrebs assoziiert wurde [Gray, 2003 - Million Women Study; Womens Health Initiative]. Aufgrund der estrogenen Wirkung von Phytoestrogenen werden diese zunehmend als Alternative oder Adjuvans zur klassischen Hormonersatztherapie eingesetzt. Deshalb gibt es ein vielfältiges Angebot an Nahrungsergänzungsmitteln, welche zunächst nur in Apotheken oder Reformhäusern zu erwerben waren. Heutzutage sind diese Nahrungsergänzungsmittel jedoch auch frei verkäuflich in Drogerien und Supermärkten sowie verstärkt im Internet erhältlich. Überwiegend handelt es sich bei diesen Produkten um Präparate mit Soja- oder Rotklee-Extrakten, welche verschiedene Isoflavone enthalten (vgl. Kapitel 1.8) [Wuttke, et al., 2002a]. Neuere Studien über den Einsatz von Phytoestrogenen als „natürliche Alternative“ zur klassischen Hormon-Ersatztherapie kamen zu einem interessanten Ergebnis. Das Risiko an Brustkrebs zu erkranken sank deutlich bei postmenopausalen Frauen, die statt der klassischen Hormon-Ersatztherapie zur Linderung der klimakterischen Beschwerden Phytoestrogene eingenommen hatten. Dies zeigte sich insbesondere am Rückgang der Mammakarzinom-Erkrankungen [Clarke et al., 2006]. Inzwischen liegt eine ganze Reihe von klinischen Studien über den Einfluss von Isoflavonen auf klimakterische Beschwerden vor, die sich insbesondere auf die Postmenopause, aber auch auf die Perimenopause beziehen. In diesen Studien wurden den Probandinnen Isoflavone in Form von Soja-Extrakten oder –Proteinisolaten in einem Zeitraum von bis zu sechs Monaten verabreicht, wobei je nach Form zwischen 50 und 120 mg Isoflavone pro Tag supplementiert wurden [Van de Weijer und Barentsen, 2002]. Insgesamt konnte eine leichte

Verbesserung der klimakterischen Beschwerden beobachtet werden, jedoch keine signifikante Abnahme der Symptome wie z.B. Hitzewallungen [Nahas et al., 2004; Knight et al., 2001; Howes et al., 2006]. Allerdings sollte diesbezüglich nicht außer Acht gelassen werden, dass die Datenerhebung in diesem Falle schwer und subjektiv geprägt ist. (Länge, Intensität der Symptome und Schweregrad werden von den Probandinnen womöglich unterschiedlich „skaliert“ und subjektiv empfunden.) Wahrscheinlich ist ebenso der Zeitpunkt der Verabreichung von Phytoestrogenen entscheidend. So konnten mit den Gruppen von Probandinnen, welche sich in einem frühen Stadium der Menopause befanden, bessere Ergebnisse erzielt werden als mit solchen in einer späteren Phase [Kurzer, 2003]. Bis dato fehlen Langzeitstudien und Daten über eventuelle Wechselbeziehungen, um eine Empfehlung von Nahrungsergänzungsmitteln mit Isoflavon-Zusatz vornehmen zu können [Cassidy und Faughnan, 2000].

#### 1.1.5.5 Knochenstoffwechsel

Die häufigste Ursache von Osteoporose ist der Estrogenmangel bei Frauen nach dem Klimakterium. Dabei kommt es in der Postmenopause unter anderem zu einer Abnahme der Knochendichte und damit einhergehender gesteigerter Osteoporosegefahr [Button und Patel, 2004]. Laut der „Million Women Study“ sind ein Drittel der Frauen von einer Osteoporose betroffen [www.millionwomenstudy.org].

Es liegen einige klinische Studien über einen kurzen Zeitraum vor, in dem die Knochendichte oder Marker des Knochenabbaus im Serum gemessen wurden, um das Potenzial von Isoflavonen zur Prävention von Osteoporose festzustellen [Branca, 2007].

Innerhalb einer einjährigen Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie wurde insbesondere die Einwirkung des Isoflavons Genistein bei postmenopausalen Frauen beobachtet. Dabei wurden die Knochendichte und die Biomarker der Knochenausbildung und –resorption untersucht [Morabito et al., 2002]. Am Oberschenkelhals und in der Lendenwirbelsäule konnte dabei eine Erhöhung der Knochendichte beobachtet werden.

Mei et al. [2001] stellten in einer Kohorten-Studie (cross-sectional) die Aufnahme von Phytoestrogenen der Knochendichte von chinesischen Frauen (19-86 Jahre alt) gegenüber. In der Gruppe mit der größten Menge an verzehrten Isoflavonen konnte eine Erhöhung der Knochendichte in der Lendenwirbelsäule (lumber spine) beobachtet werden – jedoch nur bei Frauen nach der Menopause. Darüber hinaus konnte keine Assoziation zwischen einer präventiven Wirkung auf den Knochenstoffwechsel und der Aufnahme von anderen Phytoestrogenen wie Lignanen oder Coumestanen gezogen werden - weder bei prä- noch post-menopausalen Frauen. Innerhalb einer weiteren dreijährigen Studie wurde eine



signifikante Erhöhung der Knochendichte in den Lendenwirbeln unabhängig vom Alter und des Body-Indexes bei Zugabe von Isoflavonen zur Nahrung festgestellt [Woo et al., 2001]. So erhöhte sich auch bei chinesischen Frauen vor der Menopause (30-40 Jahre alt) proportional zur Isoflavon-Gabe die Knochendichte. Ebenfalls konnte in einigen Studien eine positive Veränderung der biochemischen Parameter des Knochenstoffwechsels (u.a. Anstieg der Serum-Osteokalzinkonzentration, Rückgang der N-Telopeptide im Harn) festgestellt werden [Arjmandi et al., 2005; Scheiber et al., 2001]. Im Rahmen der Studie von Anderson [2002] hingegen konnte gezeigt werden, dass bei jungen Frauen vor der Menopause kein präventiver Effekt hinsichtlich einer Osteoporose zu verzeichnen war. Die Probandinnen erhielten hierbei innerhalb eines Jahres eine tägliche Supplementierung von Sojaprotein mit definiertem Isoflavongehalt.

Aus tierexperimentellen Studien kann gefolgert werden, dass Isoflavone die Aktivität der Osteoklasten hemmen und die Osteoblasten fördern. Dies reduziert insgesamt das Risiko für den Knochenverlust. Einige Studien wiesen darauf hin, dass Frauen in der Menopause in Abhängigkeit von der Dosis und vom Ort, an dem die Knochendichte gemessen wurde, zum Teil eine Zunahme der Knochendichte aufweisen. Diese Effekte waren jedoch nur sehr klein und insgesamt stellt sich die Datenlage in der Literatur sehr widersprüchlich dar. Die jeweilige Isoflavon-Gabe (Menge und Verabreichungsform) innerhalb der einzelnen Studien ist sehr unterschiedlich, ebenso wurde die Knochendichte an verschiedenen Stellen, wie an den Lendenwirbeln oder auch am Schenkelhals gemessen. Dies lässt sich nur schwer für eine einheitliche Bewertung zusammenfassen. Frühere Studien wurden mit dem synthetisch hergestellten Isoflavon „Ipriflavon“ (7-Isopropoxyisoflavon; aus Daidzein) durchgeführt, welches Osteoporose-Patienten verabreicht wurde [Hale et al., 2000]. Dies lässt sich nach heutigem Kenntnisstand nicht mehr eindeutig mit den genuinen Isoflavonen aus Soja für die Prophylaxe von Osteoporose vergleichen [Arjmandi et al., 2005]. Eine neuere Studie über die Wirkungskraft von Ipriflavon über einen Zeitraum von vier Jahren kam zu dem Ergebnis, dass dieses nicht einen Knochen-Verlust verhindern kann [Alexandersen et al., 2001]. Darüber hinaus fehlen generell fundierte Aussagen zu möglichen Nebenwirkungen von Isoflavonen bei einer langzeitigen Aufnahme.

Aus einigen Untersuchungen in Hinblick auf den Knochenstoffwechsel lassen sich zwar tendenziell positive Effekte und eine Beteiligung der Isoflavone an der anti-osteoporotischen Wirkung ableiten, jedoch ist die derzeitige Datenlage für eine fundierte Beurteilung keinesfalls ausreichend. Bislang fehlen Langzeitstudien zur Wirksamkeit von Isoflavonen hinsichtlich einer Prävention vor Osteoporose. Es wurden lediglich längerfristige Versuche mit Affen über einen Zeitraum von drei Jahren gemacht [Register et al., 2003]. Dabei konnte kein präventiver Effekt bezüglich der Abnahme der Knochenmineraldichte

festgestellt werden. Auf der Grundlage der derzeitig vorhandenen Daten kann noch nicht von einer Schutzwirkung der Isoflavone in der Prävention von Osteoporose ausgegangen werden, obwohl es durchaus einige Hinweise auf eine solche gibt. Insgesamt ist noch zu wenig über die Sicherheit und Wirksamkeit von Isoflavonen bekannt, um eine eindeutige Empfehlung aussprechen zu können.

#### 1.1.5.6 Kardiovaskuläres System

Im Zusammenhang mit Isoflavonen wird nicht nur eine krebspräventive Wirkung diskutiert, sondern auch ein kardioprotektiver Effekt. In den asiatischen Ländern treten weitaus seltener Herz-Kreislaufkrankungen als in den westlichen Industrieländern auf. Daraufhin wurde die Korrelation gezogen, dass Isoflavone (die zusammen mit den proteinreichen Soja-Lebensmitteln z.B. in Asien aufgenommen werden) ebenso einen Schutz vor koronaren Herzerkrankungen bieten können [Beaglehole, 1990; Zhou, 2004; Bairey Merz et al., 2006; Yang et al., 2005; Moline et al., 2000]. Untermuert wird diese These durch die strukturelle Ähnlichkeit von Isoflavonen mit endogenen Estrogenen, welche hypocholesterämische Effekte aufweisen [Sudhir et al., 1996; Cassidy und Griffin, 1999]. Darüber hinaus ist die Inzidenz von koronaren Herzerkrankungen bei Vegetariern geringer als bei Omnivoren („Allesfresser“) [Knight und Eden, 1996]. Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter leiden wesentlich seltener an koronaren Herzerkrankungen (wie Arteriosklerose oder Bluthochdruck) als Männer im gleichen Alter. Nach der Menopause steigt die Erkrankungsrate bei Frauen beträchtlich und stellt eine der Haupttodesursachen dar [Baker et al., 2003; Ouyang et al., 2006; Ottesen et al., 1997]. Als Grund hierfür ist der auftretende Estrogenmangel anzusehen. Estrogene senken die Blutfettwerte und den Cholesteringehalt. Darüber hinaus verhindern sie die Bildung von Ablagerungen an den Gefäßwandungen und beeinflussen die Vasolidation und sorgen für die Erhaltung der Gefäßelastizität [Tostes et al., 2003; Williams et al., 1998].

In verschiedenen randomisierten Doppelblindstudien wurden bestimmten Bevölkerungs-Gruppen (z.B. „postmenopausalen“ Frauen) definierte Mengen an Sojaproteinen (mit einem konkret bestimmten Isoflavon-Gehalt in Höhe von 50 bis 150 mg pro Tag) über definierte Zeiträume (bsp. vier bis zwölf Wochen) verabreicht und die jeweiligen Serum-Lipoprotein-Profile ermittelt [COT, 2003].

Als Resümee dieser verschiedenen Untersuchungen ist hervorzuheben, dass einhergehend mit der Aufnahme von Sojaprotein, der Serum-Cholesterinspiegel und das LDL-Cholesterin signifikant verringert werden [Zhou et al., 2004; Tikkanen et al., 2000]. Die Konzentration an HDL-Cholesterin wird jedoch deutlich erhöht. Hingegen erfolgt bei der Gabe einer

äquivalenten Menge von Isoflavonen ohne Sojaprotein keine Verbesserung des Serum-Lipoprotein-Profiles [Zhan und Ho, 2005; Simons et al., 2000; Sirtori und Lovati, 2001; Dewell et al., 2006]. Im Rahmen dieser Studien gab es Hinweise darauf, dass Isoflavone zur Verbesserung der arteriellen Elastizität beitragen und darüber hinaus die Oxidationsresistenz von LDL-Cholesterin verbessern können [Lichtenstein, 1998].

Gute kardioprotektive Effekte können jedoch nur durch die Aufnahme des intakten Sojaproteins erzielt werden. Nur eingeschränkt ist dieses auf den Gehalt an Isoflavonen zurückzuführen [This et al., 2001; Zhou, 2004; Nestel et al., 1999]. Dafür spricht ebenfalls die Beobachtung, dass Isoflavone aus Rotklee in ähnlichen Konzentrationen keine kardioprotektiven Effekte aufweisen [Nestel et al., 1999]. Trotz der ausführlichen Literatur und verschiedener Studien ist bislang noch nicht vollständig geklärt, welcher Mechanismus der Senkung des Cholesterinspiegels im Blut zugrunde liegt. Wahrscheinlich spielen dabei neben den Aminosäuren der Proteine, die weiteren Inhaltsstoffe des Sojas wie Saponine, Phytinsäure oder Ballaststoffe eine Rolle. Diesbezüglich wurde die These aufgestellt, dass durch die Kombination der verschiedenen Inhaltsstoffe, der resultierenden Matrix und deren Zusammenwirken, der Cholesterin-Metabolismus verändert wird, woraus die Senkung des Cholesterinspiegels im Blut resultieren soll [Potter, 1995].

In einer Kohortenstudie sowie in verschiedenen Tierstudien wurde ein Schutz vor Arteriosklerose durch die Aufnahme von Isoflavonen nachgewiesen [Wagner et al., 2003; van der Schouw et al., 2002; Adams et al., 2005].

Die amerikanische Food and Drug Administration hat bereits im Jahre 1999 ein „Health Claim“ festgelegt, welches die positiven Eigenschaften von Sojaprotein in der Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen hervorhebt [Food and Drug Administration, 1999]. Zu einer abschließenden Beurteilung der physiologischen Wirkung von Isoflavonen auf das kardiovaskuläre System fehlen jedoch noch Daten und entsprechende Langzeitstudien [Sacks et al., 2006].

Bislang gibt es nur wenige Studien über Lignane aus Leinsamen in Hinblick darauf, ob diese als hypercholesterämische Agenzien angesehen werden können. Jenkins et al. [1999] untersuchten dies in einer randomisierten „Überkreuz-Studie“ (cross-over), wobei das Gesamt-Cholesterin im Plasma abnahm, aber keine Änderung in der Lipoprotein-Zusammensetzung (den Verhältnissen) zu verzeichnen war. Innerhalb eines Tierversuches mit dem Lignan Secoisolariciresinol-Diglucosid wurde bei Kaninchen eine Verringerung von hypercholesterolämischer Arteriosklerose während einer cholesterinreichen Fütterung beobachtet [Prasad et al., 1999]. Für eine abschließende Beurteilung, ob Lignane einen

präventiven Effekt auf das kardiovaskuläre System ausüben, liegen jedoch noch keine ausreichende Daten vor.

#### 1.1.5.7 Sonstige physiologische Eigenschaften

Weitere physiologische Eigenschaften wurden im Falle der Isoflavone beobachtet. So können sie als schwache Estrogenantagonisten ebenfalls Zellen und Organe des Immunsystems beeinflussen. Die Effekte können dabei über Estrogenrezeptoren vermittelt werden, die auf Leukozyten nachgewiesen wurden. Einige Phytoestrogene besitzen eine hohe Affinität zum ER- $\beta$ , der im hohen Maße einige Gewebe wie Thymus oder die lymphatischen Organe exprimiert, welche die Immunantwort beeinflussen. Physiologische Eigenschaften entstehen nicht nur über die direkte Interaktion mit den ER der Immunzellen, sondern ebenso können Phytoestrogene auch über Wechselwirkungen mit den Enzymen der Estrogensynthese (SHGB) wechselwirken. Einige *in vitro*-Studien zeigen, dass hohe Genistein-Konzentrationen ( $> 10 \mu\text{M}$ ) zu einer Hemmung von Immunfunktionen führen können, währenddessen eine erhöhte Daidzein-Konzentration die Lymphozytenproliferation stimuliert [u.a. Atluru et al., 1991; Mousavi und Adlercreutz, 1993]. Tierexperimentelle Untersuchungen deuten sowohl auf suppressive als auch auf stimulierende Effekte hin [Guo et al., 2002]. Keine signifikanten Effekte von Isoflavonen auf das Immunsystem konnten bei einer *in vivo*-Studie mit Säuglingen beobachtet werden. Die Kontrollgruppe an Säuglingen, die mit Muttermilch gestillt wurde, wies den gleichen Phänotyp verschiedener Immunzellen auf, wie die Gruppe, welche innerhalb der ersten beiden Lebensmonate mit Sojamilch ernährt wurde [Cordle et al., 2002].

Isoflavone üben darüber hinaus ebenso physiologische Wirkungen auf die Schilddrüse aus, wobei von einer goitrogenen (= kropfbildenden) Wirkung berichtet wird. Bereits Mitte der 60er Jahre gab es diesbezüglich einige Hinweise, da ab diesem Zeitpunkt Baby-Folgenahrung mit Soja-Proteinisolen anstatt mit Sojamehl hergestellt wurde. Die Soja-induzierte Kropfbildung war bis dato wohlbekannt, in der Folgezeit wurde keine Hyperthyreose (Schilddrüsenunterfunktion) in Bezug auf Soja-Folgenahrung dokumentiert. Diesbezüglich lässt sich nach Chorazy et al. [1995] auf einen Zusammenhang mit der Verwendung von Sojanahrung im Säuglingsalter und autoimmunbedingten Schilddrüsenerkrankungen bei einer retrospektiven Studie an Kindern schließen. Bislang gibt es noch zu wenige klinische Studien, die über einen genauen Wirkmechanismus hierzu Auskunft geben könnten oder die physiologische Relevanz diskutieren. Einige *in vitro*-Studien zeigen, dass Isoflavone aus Soja selbst als Substrate der thyroidalen Peroxidase fungieren können und damit selbst jodiert werden (als kompetitive Substrate) [Divi et al., 1997]. Bei einer tierexperimentellen Studie von Chang und Doerge [2000] wurde eine Dosisabhängigkeit der Aktivität der

thyroidalen Peroxidase mit der Konzentration an supplementierten Genistein herausgestellt. Darüber hinaus kann es zu einer direkten Hemmung des Enzyms durch kovalente Bindungen der Isoflavone bei einem Jodmangel-Zustand kommen. Die Daten deuten im Falle des Isoflavons Genistein bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf eine halbmaximale Hemmung ( $\text{IC}_{50}$ ) der thyroidalen Peroxidase hin [Divi et al., 1997; Doerge und Chang, 2002]. Ebmeier und Anderson [2004] beschreiben einen weiteren Angriffspunkt der Isoflavone auf die Funktion der Schilddrüse. Demzufolge soll das Sulfotransferase-Enzym gehemmt werden, welches für die Inaktivierung und Eliminierung von Schilddrüsenhormonen und an der Wiedergewinnung von Jod maßgeblich beteiligt ist. Außerdem wurde von der Hemmung von Transthyretin durch Genistein berichtet, was zu einer veränderten Verteilung der Schilddrüsenhormone im Körper führt. Transthyretin ist ein wichtiges Schilddrüsenhormonbildungsprotein - u.a. bindet es ca. 20% des Thyroxin [Doerge et al., 2001].

Diese physiologische Eigenschaft ist besonders für die Personengruppe der postmenopausalen Frauen von Bedeutung, da mit zunehmendem Alter die Inzidenz für eine Hyperthyreose zunimmt. Bislang ist unklar, welche Effekte Isoflavone auf Menschen haben, welche lebenslänglich auf eine Substitution mit Schilddrüsenhormonen angewiesen sind, weshalb bezüglich dieser Eigenschaft noch weiterer Forschungsbedarf besteht.

#### 1.1.5.8 Toxizität von Isoflavonen

Bezüglich einer möglichen Toxizität von Isoflavonen wurden bislang hauptsächlich Genistein und Daidzein (Aglykon-Form) aus Soja untersucht, vereinzelt auch deren Metabolite. In einigen Studien wurde ermittelt, dass Genistein ein genotoxisches Potential *in vitro* besitzt. So sind u.a. chromosomale Abberationen und Genmutation in verschiedenen Zellsystemen beschrieben, oder die Induktion von DNA-Strangbrüchen und Mikrokernen. Typisch sind die Chromosomenabberationen, wie sie von Genistein beschrieben wurden für Topoisomerase-II-Inhibitoren (ähnlich wie z.B. Etoposid), welche irreguläre, nicht behebbare DNA-Brüche und spontane Vernetzungen bewirken [Kulling et al., 2002; Schmitt et al., 2003; Di Virgilio et al., 2004; Kulling et al., 1999; Galati und O'Brien, 2004; Record et al., 1995; Yamashita et al., 1990; Metzler et al., 1998]. Ebenso wurde in einigen Studien ein tetratogenes Potential von Genistein *in vitro* beobachtet [McClain et al., 2007], sowie eine klastogene, d.h. Chromosomenabbrüche verursachende Wirkung beschrieben [McClain et al., 2006a; McClain et al., 2006b]. In einer placebo-kontrollierten Studie mit post-menopausalen Frauen kam es unter Isoflavon-Supplementierung zu einer Vergrößerung/Verdickung der Gebärmutterschleimhaut (Hyperlasie des Endometriums) [Unfer et al., 2004]. Bei einer neonatalen Exposition von CD-1-Mäusen mit Genistein (subkutan, täglich), konnten im

Uterus histomorphologische Veränderungen beobachtet werden. Nach einem längeren Zeitraum verursachte die Exposition mit Genistein Adenokarzinome [Newbold et al., 2001]. Über einen weiten Zeitraum hinweg gab es keine Hinweise, ob sich diese Wirkungen auch beim Menschen ergeben könnten [Hale et al., 2002; Balk et al., 2002].

#### 1.1.6 Bedeutung für die Pflanze

Phytoestrogene wie Lignane oder Isoflavone stellen für die Pflanze einen Teil ihres Abwehrmechanismus dar und sind „induzierbare Abwehrstoffe“ (worauf u.a. die antimitotische, antifugale, oder antibakterielle Wirkung Bezug nimmt). Diese so genannten Phytoalexine sind antimikrobielle Verbindungen (unterschiedlicher chemischer Substanzklassen), welche von Pflanzen direkt nach einer Infektion zur Abwehr von Schadorganismen (Bakterien, Viren oder Pilze), in den betroffenen pflanzlichen Geweben synthetisiert werden [Schildknecht, 1981; Smith und Banks, 1986]. Der Begriff „Phytoalexin“ wurde von Müller und Börger 1940 geprägt [Müller et al., 1976] und stammt aus dem Griechischen (phytos = Pflanze und alexein = abwehren) [Langenscheidt, 2004]. Phytoalexine sind konstitutiv in einer Pflanze vorhanden und innerhalb einer bestimmten Pflanzenart einer Stoffklasse zugehörig. Eine Akkumulation von Phytoalexinen wird z.B. für die Resistenz einiger Pflanzen gegenüber pathogenen Pilzen verantwortlich gemacht [Akashi et al., 1999]. Auslösendes Element für die Bildung von Phytoalexinen sind nicht nur Mikroorganismen, sondern auch Umweltfaktoren wie UV-Strahlungen, Kälte, Schwermetalle, Verletzungen etc. („Stress-Auslöser“). Einige Pflanzen bilden bei einer Verletzung z.B. Coumarine oder bei einer hohen UV-Einwirkung Isoflavonoide [Dixon und Paiva, 1995]. Phytoalexine haben eine antimikrobielle sowie antibakterielle Wirkung. Ebenso konnten fungizide Effekte bei Sojabohnen und Kichererbsen in Zusammenhang mit deren Isoflavon-Gehalten beobachtet werden [Sequeira, 1983; Krämer, 1984]. Besonders fungizid wirken prenylierte Isoflavone, wie sie unter anderem aus Lupinen gewonnen werden konnten [Tahara et al., 1984].

Isoflavone haben noch weitere wichtige Funktionen innerhalb der Pflanze, indem sie nicht nur an dem pflanzlichen Abwehrsystem, sondern auch an der Signaltransduktion sowie der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sind. Isoflavone in Wurzeln von Leguminosen, wie z.B. Soja besitzen die Fähigkeit, mit der Hilfe von symbiotischen, Stickstoff-fixierenden Bakterien (Knöllchenbakterien; Rhizobien) Stickstoff aus der Luft aufzunehmen und in Proteine umzuwandeln. In diesem Prozess wird der Stickstoff aus der Luft zunächst gebunden und anschließend zu löslichen Ammoniumverbindungen reduziert, welche in dieser Form für die Pflanze verwertbar sind. Die Rhizobien (griechisch: riza = Wurzel und bios = Leben) besitzen ein spezielles Enzymsystem zur Stickstoff-Fixierung [Spaink, 1995]. Durch die Symbiose von

Pflanzen mit den Rhizobien kann dadurch proteinreiche Nahrung unabhängig vom Stickstoffgehalt des Bodens produziert werden [Rolfe et al., 1995; Kosslak et al., 1987]. Diese Fähigkeit wird als so genannte Gründüngung zur Bodenverbesserung in der traditionellen Landwirtschaft nutzbar gemacht. Die Rhizobien, welche speziell mit den Wurzeln der Sojabohne eine symbiotische Verbindung eingehen, gehören zur Untergruppe der *Bradyrhizobium*, Art *Bradyrhizobium japonicum* und sind langsam wachsend (s. Abbildung 14). Dagegen gehören die *Rhizobium trifolii* zur Untergruppe Rhizobium und sind schnell wachsende Knöllchenbakterien [Kosslak et al., 1987].



Abbildung 14: Artspezifische Symbiose von Rhizobien mit den Wurzeln einer Sojapflanze. Die Nodulation wird durch Isoflavone initiiert. Quelle: <http://ipp.boku.ac.at/pz/fieldcrops/index.html>.



## 1.2 Soja: Pflanze, Bedeutung, Verbreitung

Die folgenden Unterkapitel geben wichtige Informationen über die Pflanze „Soja“ und deren Morphologie. Soja zählt zu den weltweit bedeutendsten Kulturpflanzen. Aufgrund dessen soll an dieser Stelle die chemische Zusammensetzung, Verwendung und Verbreitung kurz erläutert werden.

Für die vorliegende Arbeit wurden einerseits Isoflavone aus Sojamehl isoliert und andererseits die Gehalte von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln quantifiziert. Deshalb erscheint es wichtig, das Isoflavonspektrum von Soja und dessen Produkte an dieser Stelle näher zu erläutern.

### 1.2.1 Soja (*Glycine max* L.) – Morphologie und chemische Zusammensetzung

Die Sojabohne ist eine der ältesten Nutzpflanzen überhaupt und genießt als eine bedeutende Kulturpflanze enorme wirtschaftliche Bedeutung. Seit über 5000 Jahren wird die Sojapflanze angebaut. So wurde sie in China als eine der fünf heiligen Körnerfrüchte neben Reis, Weizen, Gerste und Hirse verehrt (jedoch gibt es bezüglich der Altersangabe keine eindeutigen Beweise, so dass andere Quellen von einer 3000 Jahre alten Sojakultur ausgehen, die eindeutig dokumentiert wurde [Brücher, 1977]). Die in Ostasien beheimatete Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merr.) wurde wahrscheinlich aus der einjährigen Wildart *Glycine soja* SIEB. et ZUCC. domestiziert (heute noch in China als „Unkraut“ vorhanden). Im 1. Jahrhundert n.Chr. erfolgte die Ausbreitung der Sojabohne nach Japan, Korea, Burma, Palästina und Indien. Durch eine Japanreise des Naturforschers Kaempfer wurde die Pflanze bereits am Ende des 17. Jahrhunderts in Europa bekannt und in die botanischen Gärten Europas eingeführt. Allerdings sind die Anfänge einer Sojakultur in verschiedenen europäischen Ländern erst auf das Jahr 1840 datiert. Bei der Wiener Weltausstellung 1873 engagierte sich der österreichische Botaniker Friedrich Haberland für den Anbau der Sojabohne und präsentierte einige Studien. Damit verhalf er ihr zu großer Beachtung. Vermutlich erkannte er den Wert dieser Bohne für Europa und organisierte demzufolge einige ausgedehnte Anbauversuche. Jedoch erfolgte in Europa seit Beginn des 20. Jahrhunderts (im Gegensatz zu den USA) lediglich ein begrenzter Anbau, welcher sich vorwiegend auf den Süden des Kontinents beschränkte. Die weltweite Verbreitung der Sojabohne ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Sojabohne bietet eine Fülle von Verwendungsmöglichkeiten, weshalb das Interesse an dieser Pflanze ausgesprochen groß ist (s.u.).



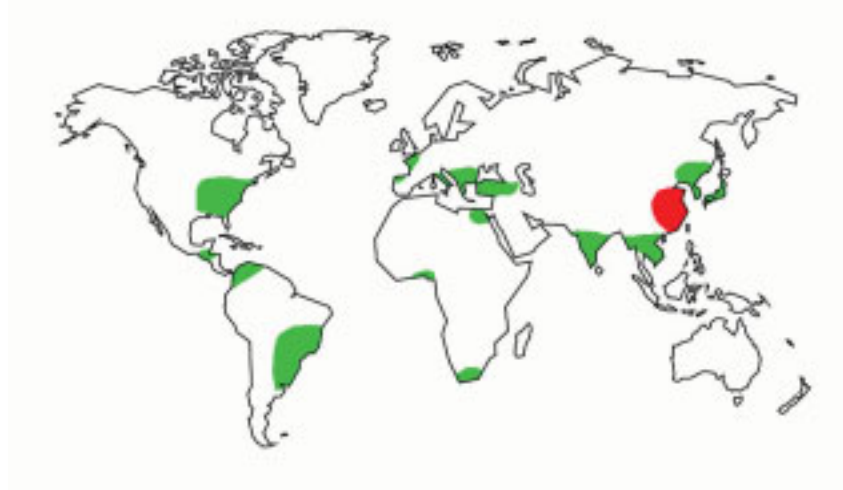


Abbildung 15: Weltweite Verbreitung von Sojabohnen. Die Herkunft ist dunkel gekennzeichnet, die Anbauregionen hell. Quelle: [www.mpiz-koeln.mpg.de/.../L/Web\\_Zoom.jpg](http://www.mpiz-koeln.mpg.de/.../L/Web_Zoom.jpg).

Die Sojabohne gehört zur Familie der Hülsenfrüchtler (Fabaceae; Leguminosae), Unterfamilie Faboideae (Schmetterlingsblütler). Bei dieser Familie stellt der Fruchttyp eine Hülse dar, welche nur bei dieser Familie vorhanden ist. Mit ca. 12000 Arten ist die Familie der Fabaceae eine der artenreichsten innerhalb der Samenpflanzen überhaupt. Die Sojabohne ist eine einjährige, borstig behaarte Pflanze, die strauchig wächst. Die Gattung *Glycine* umfasst neun Arten, welche in zwei verschiedene Subgenera unterteilt werden. Aufgrund von zahlreichen Züchtungen gibt es viele Varietäten und Convarietäten, weshalb sich unterschiedliche Merkmale für die einzelnen Varietäten herausbilden, da diese hauptsächlich an die entsprechenden Klimaverhältnisse angepasst wurden. Die Pflanze hat eine Wuchshöhe von ca. 80 cm; bei einigen Varietäten ist diese jedoch deutlich geringer. Die Sojapflanze trägt drei- bis fünfzählige Blätter mit eiförmigen Blättchen, aus deren Achseln Büschel von kleinen, unauffälligen kurz gestielten weißen oder violetten Blüten entspringen (s. Abbildung 16).



Abbildung 16: Sojabohne (*Glycine max* (L.)). Quelle: [www.rezkonv.de/proj/herbs/seiten/soja.htm](http://www.rezkonv.de/proj/herbs/seiten/soja.htm)

Nach der Selbstbestäubung setzen die Blüten zwei bis zehn Zentimeter lange, behaarte Hülsen an. Diese Hülsen enthalten ca. 3-5 rundlich-ovale Samen in zumeist gelber oder auch schwarzbrauner Farbe (vgl. Abbildung 17). Die Sojabohne hat im Wesentlichen drei Bestandteile: Die Schale, das Hypokotyl und zwei Kotyledonen. Die Kotyledonen sind reich an Proteinen und Öl. In der Schale hingegen befinden sich hauptsächlich unlösliche Faserbestandteile und ca. 20% des gesamten Kohlenhydrat-Gehaltes. Charakteristisch für die Sojabohne ist ihre ausgeprägte Pfahlwurzel, welche bis zu zwei Meter tief den Boden durchwurzeln kann und insbesondere für die Symbiose mit Knöllchenbakterien von Bedeutung ist. Die Blüte der Leguminosen wird als Schmetterlingsblüte bezeichnet und besteht aus einer Fahne, zwei Flügeln und aus dem durch zwei zusammengewachsenen Blütenblättern gebildeten Schiffchen [Franke, 1997; Brücher, 1977; Diepenbrock et al., 1999].



Abbildung 17: Sojabohnen-Hülse mit gereiften Samen. Quelle: USDA, image number K4389-11.

Sojabohnen enthalten ca. 30-50% Protein – so viel, wie kaum eine andere Pflanze bilden kann. Da die Proteinzusammensetzung für die menschliche Ernährung nahezu ideal ist und alle essentiellen Aminosäuren aufweist, ist die Sojabohne aufgrund dessen ein sehr effektiver Proteinlieferant [Souci et al., 1986].

Darüber hinaus ist die Sojabohne weltweit eine der bedeutendsten Ölpflanzen. Der größte Teil des hergestellten Pflanzenöls stammt von der Sojabohne. Ölpalmen liegen an zweiter Stelle. Der Ölgehalt der Sojabohne liegt mit 20% zwar unter dem von Raps (40%), jedoch wird die Sojaölproduktion durch die Herstellung von proteinreichen Nahrungs- und Futtermitteln vorangetrieben. Die Nachfrage nach Sojaöl steigt in den westlichen Industrienationen stetig an. Aufgrund des hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren wie Linolsäure sowie Linolensäure und des Fehlens von Cholesterin, gilt Sojaöl als ein wertvolles pflanzliches Öl und findet z.B. in der Margarineproduktion breite Verwendung. Ebenso enthält es weitere wertvolle Bestandteile wie Lecithin oder Tocopherole und ca. 25% verdauliche Kohlenhydrate.

Mit einem Mineralstoffgehalt von 4,7% ist die Sojabohne besonders mineralstoffreich und enthält ebenfalls mehrere essentielle Spurenelemente (Kalium, Magnesium, Eisen) und Vitamine (hauptsächlich aus der B-Gruppe wie B2 und B6). Weitere Bestandteile sind 22% Ballaststoffe, sowie Saponine, Flavonylglykoside, Cholin, Betain, Trigonellin, Guanidin und Aminosäuren. Aufgrund des hohen Gehalts an Proteinen ist der Nährwert von Soja besonders hoch. Ein Kilogramm Soja entspricht dem Nährwert von 2,5 kg Rindfleisch.

Neben den wertvollen Bestandteilen der Sojabohne sind auch wenige antinutritive Substanzen enthalten. Eine dieser Substanzen ist die Phytinsäure, die in Ölsamen als Speicher für Phosphat und Ionen dient, welche der jeweilige Keimling zum Wachsen

benötigt. Phytinsäure weist komplexbildende Eigenschaften auf, was verantwortlich gemacht wird für eine schlechtere Bioverfügbarkeit von Mineralstoffen. Phytinsäure lässt sich nur unzureichend inaktivieren, da sie hitzestabil ist [Cheryan, 1980; Carnovale et al., 1988]. Darüber hinaus soll Phytinsäure das proteolytische Enzym Trypsin inhibieren, wodurch die Proteinverdaulichkeit sinkt. Teilweise wird die Phytinsäure als „gesund“ angesehen, da sie z.B. den Stärkeabbau verzögert und sich dadurch der Blutzuckerspiegel leichter regulieren lässt, ebenso werden ihr krebopräventive Wirkungen zugeschrieben [Singh und Krikorian, 1982].

Für die vorliegende Arbeit ist insbesondere der hohe Gehalt von Isoflavonen in der Sojabohne von großem Interesse. Dabei sind hauptsächlich drei verschiedene Isoflavone in der Sojabohne enthalten: Genistein (GEN), Daidzein (DAI) und Glycitein (GLY) (vgl. Abbildung 18), worauf im folgendem Unterkapitel näher eingegangen wird.

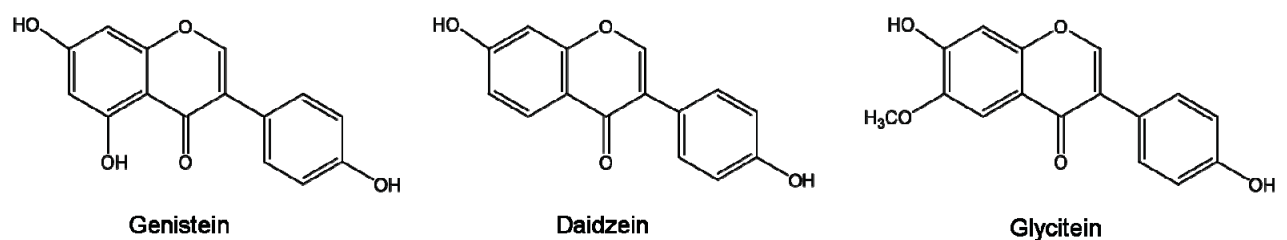


Abbildung 18: Isoflavone aus Soja in der Aglykon-Form.

### 1.2.2 Isoflavonspektrum von Soja und daraus produzierten Lebensmitteln

In der Sojabohne sind die drei Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein, sowie deren 7-O- $\beta$ -D-Glucoside, 6''-O-Acetyl-7-O- $\beta$ -D-glucoside und 6''-O-Malonyl-7-O- $\beta$ -D-glucoside enthalten (s. Abbildung 19). Den mengenmäßig größten Anteil machen dabei die beiden Isoflavone Genistein und Daidzein aus (s.u.) [Wang und Murphy, 1994a; Wiseman et al., 2002]. (Laut früheren Untersuchungen liegen die Isoflavone GEN, DAI, GLY dabei in folgendem Verhältnis zueinander vor: 10:8:1 [Wang und Murphy, 1994b; Naim et al., 1973]).

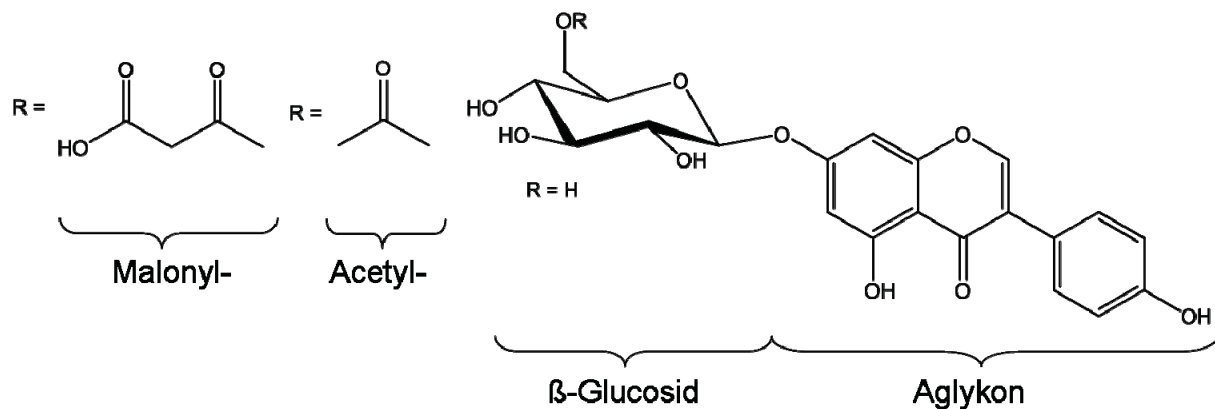


Abbildung 19: Konjugationsformen der in Soja enthaltenen Isoflavone.

Bereits im Jahr 1931 konnte von Walz [1931] ein hoher Gehalt von Isoflavonen in Soja bestimmt werden. Darüber hinaus isolierte er Genistein aus Sojamehl. Das Isoflavon Genistein als Aglykon als auch in der glucosidisch gebundenen Form Genistin wurde in Sojabohnen 1941 von Walter [1941] nachgewiesen. Bereits im Jahr 1899 wurde dieses Isoflavon aus Färber-Ginster *Genista tinctoria* isoliert, welche ebenfalls zur Familie der Fabaceae gehört. Naim et al. [1973] gelang es im Jahr 1973, Glycitein aus Sojabohnen zu isolieren und dessen Struktur aufzuklären.

In der Sojabohne, sowie in nicht fermentierten Lebensmitteln aus Soja, liegen die Isoflavone in der Regel glucosidisch gebunden vor und nur in geringen Mengen als freie Aglykone. Die malonylierten Formen dienen der Pflanze als eigentliche Speicherformen und sind weniger aktiv als die entsprechenden Aglykone. In nativen Soja-Produkten wie in Tofu oder in Sojamilch ähnelt das Isoflavonspektrum sehr dem der Sojabohne (vgl. Tabelle 4) [Graham et al., 1990]. Jedoch sind insbesondere die malonylierten Konjugate empfindlich gegenüber Hitzeeinwirkung und decarboxylieren schnell zu den entsprechenden acetylierten Derivaten [Farmakalidis und Murphy, 1985; Kudou et al., 1991]. Sojaprodukte, welche während ihrer Produktion einen mikrobiellen Fermentationsprozess durchlaufen, wie z.B. Sojasauce oder Tofu weisen hingegen einen hohen Anteil an Aglykonen auf, da der Glucoseresst enzymatisch durch die eingesetzten Mikroorganismen (u.a.  $\beta$ -Glucosidasen) gespalten wird. Isoflavon-Konjugate unterliegen nicht nur einer thermischen oder mikrobiellen Degradation, sondern sind auch pH-Wert labil [Stinzing et al., 2006; Liggins et al., 2000]. Bei einem Vergleich von beispielsweise Sojamehl mit gerösteten Sojabohnen ist deutlich ersichtlich, dass der Anteil an Malonyl-Glucosiden bei Sojamehl deutlich höher ist als bei dem gerösteten Produkt; umgekehrt hingegen ist dies der Fall bei den Acetyl-glucosiden. Miso enthält als fermentiertes Produkt hingegen hauptsächlich Aglykone, was deutlich auf die Verarbeitung der verwendeten Sojabohnen hindeutet (vgl. Tabelle 4) [Mathias et al., 2006]. Bei allen

fermentierten Produkten dominieren deshalb die Aglykone, während in nicht fermentierten Lebensmitteln die Glykoside überwiegen (s. Tabelle 5).

Tabelle 4: Prozentualer Anteil der verschiedenen Konjugate der Soja-Isoflavone Daidzein, Genistein und Glycitein in diversen Lebensmitteln auf Soja-Basis. Die Berechnung erfolgt anhand der Daten von Song et al. [1998]; sowie Wang und Murphy [1994a].

| Isoflavon [%]    |     | Tofu  | Bohne <sup>1</sup> | Milch | Mehl  | Miso  | TVP <sup>2</sup> | Getränk | Käse  |
|------------------|-----|-------|--------------------|-------|-------|-------|------------------|---------|-------|
| Malonylglucoside | DAI | 23,39 | 2,80               | 18,34 | 15,61 | 42,09 | 3,99             | 2,35    | 34,01 |
|                  | GEN | 24,48 | 3,96               | 23,15 | 14,45 | 34,93 | 8,28             | 8,66    | 3,55  |
|                  | GLY | 4,07  | 4,27               | 1,04  | 0,75  | 7,74  | 2,65             | 2,41    | n.d.  |
| Acetylglucoside  | DAI | 1,68  | 2,44               | 0,58  | 26,83 | 0,00  | 8,11             | 0,30    | n.d.  |
|                  | GEN | 2,05  | 4,33               | 21,79 | 22,45 | 0,00  | 14,04            | 1,44    | tr.   |
|                  | GLY | 0,00  | 4,51               | 2,36  | 0,91  | 0,00  | 3,91             | 1,99    | 13,71 |
| Glykoside        | DAI | 14,07 | 28,88              | 10,89 | 7,67  | 5,60  | 22,03            | 26,71   | 8,12  |
|                  | GEN | 17,46 | 34,61              | 18,86 | 9,54  | 4,35  | 27,74            | 46,63   | 23,35 |
|                  | GLY | 4,04  | 4,27               | 1,73  | 1,01  | 1,32  | 6,31             | 4,57    | 8,63  |
| Aglykone         | DAI | 3,60  | 2,68               | 0,48  | 0,29  | 2,17  | 0,55             | 1,08    | tr.   |
|                  | GEN | 4,35  | 4,69               | 0,50  | 0,26  | 1,39  | 1,30             | 2,65    | 4,57  |
|                  | GLY | 0,81  | 3,53               | 0,26  | 0,21  | 0,39  | 1,09             | 1,20    | 4,06  |
| Summe            |     | 3219  | 1641               | 3763  | 6124  | 2803  | 2379             | 1662    | 197   |
| [µg/100 g]       |     |       |                    |       |       |       |                  |         |       |

n.d. = nicht detektiert; tr. = es sind nur Spuren vorhanden; eine Quantifizierung ist nicht möglich;

<sup>1</sup> geröstet; <sup>2</sup> TVP = textured soy protein (zu Fasern gesponnenes und gepresstes Protein)

In Asien werden verschiedene Formen von Soja konsumiert. Zu den traditionellen Lebensmitteln gehören Sojamilch oder Sojamehl. Bei den fermentierten Lebensmitteln haben

Miso und Tempeh einen hohen Beliebtheitswert [Nakamura et al., 2000; Murakami et al., 1984]. Höheren Bekanntheitsgrad insbesondere auch in den westlichen Ländern besitzt die Sojasauce, welche ein fermentiertes Zweitprodukt darstellt.

Tabelle 5: Übersicht über verschiedene Lebensmittel auf Sojabasis (nach Coward et al., 1993).

|                               | Lebensmittel         | Gehalt<br>Daidzin<br>[mg/g] | Gehalt<br>Genistin<br>[mg/g] | Gehalt<br>Daidzein<br>[mg/g] | Gehalt<br>Genistein<br>[mg/g] |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Primäre Soja-<br>Materialien  | Tofu                 | 0,12                        | 0,25                         | 0,02                         | 0,03                          |
|                               | Sojamehl             | 0,58                        | 0,74                         | n.d.                         | 0,2                           |
|                               | Soja-Nüsse           | 0,85                        | 1,39                         | 0,05                         | 0,07                          |
|                               | Soja-Milch           | 0,10                        | 0,13                         | 0,01                         | 0,01                          |
| Fermentierte<br>Soja-Produkte | Miso                 | 0,04                        | 0,04                         | 0,35                         | 0,50                          |
|                               | Sojabohnen-<br>Paste | 0,04                        | 0,08                         | 0,20                         | 0,25                          |
|                               | Tempeh               | 0,04                        | 0,11                         | 0,11                         | 0,16                          |
| Soja-<br>Lebensmittel         | Soja-Sauce           | n.d.                        | n.d.                         | 0,01                         | 0,01                          |
|                               | Soja-Käse            | 0,02                        | 0,03                         | 0,001                        | 0,002                         |

n.d. = nicht detektiert

Die sensorische Beurteilung einiger Sojaprotein-Produkte hat ergeben, dass die enthaltenen Isoflavone wahrscheinlich einen Beitrag zu dem unerwünschten bitteren und adstringierenden Geschmack leisten [Huang et al., 1982; Kitamura et al., 1991]. Die unverarbeiteten Sojabohnen sind schwerverdaulich und weisen ebenfalls einen bitteren Geschmack auf, der zudem mit dem Vorhandensein von Saponinen zusammenhängt. Die Soja-Saponine wirken hemmend auf eiweißabbauende Verdauungsenzyme [Berhow et al., 2006].

In Sojaöl sind lediglich Spuren von Isoflavonen nachweisbar, da sich die hydrophilen Isoflavone nicht im lipophilen Öl anreichern [Wang und Murphy, 1994b; Kiely et al. 2003; Horn-Ross et al., 2000].

Innerhalb der Sojabohne sind die Isoflavone Genistein, Daidzein, Glycitein und deren entsprechende Konjugate unterschiedlich verteilt. Sie liegen in der Samenschale in einer 5-6fach höheren Konzentration vor als im Kotyledon [Heldt, 1996; Kulling und Watzl, 2003]. Die Samenschale als solche enthält nur sehr geringe Mengen an Isoflavonen. Genistein und dessen entsprechende Derivate kommen in der ganzen Sojabohne vor, die beiden Isoflavone Daidzein und Glycitein sowie deren unterschiedliche Konjugationsformen sind hauptsächlich im Hypocotyl (d.h. im untersten Abschnitt der Sprossachse vom Wurzelhals bis zu den Kotyledonen) angereichert. Die Akkumulation der drei Isoflavone, insbesondere in deren malonylierter Form, erfolgt in einer Zeitspanne von 35-60 Tagen nach der Blüte der Sojapflanze. Der Gehalt an Genistein (mit den verschiedenen Konjugationsformen) erfolgt erst spät in der Entwicklung [Song et al., 1998; Kodou et al., 1991; Eldridge und Kwolek, 1983]. Ribeiro et al. [2007] konnten zeigen, dass in der frühen Phase der pflanzlichen Reifung hauptsächlich die Isoflavon-Aglykone dominieren. In den Sojasamen sollen nach Tsukamoto et al. [1995] etwa 80-90% des totalen Isoflavon-Gehaltes in den Kotyledonen enthalten sein.

Der Isoflavongehalt in verschiedenen Produkten variiert nicht nur aufgrund der unterschiedlichen Verteilung in den Samen und der Pflanze als solche, sondern wird ebenfalls von einer ganzen Reihe unterschiedlicher Faktoren beeinflusst. So haben neben der Sorte insbesondere die Anbaubedingungen einen großen Einfluss auf die biosynthetische Bildung von Isoflavonen. Der Erntezeitpunkt, die klimatischen Bedingungen, der Nährstoffgehalt im jeweiligen Anbaugebiet, die geographische Lage etc. sind dabei in Betracht zu ziehen [Tsai et al., 2007; Riedl et al., 2007; Setchell und Cole, 2003; Eldridge und Kwolek, 1983]. In folgender Tabelle 6 [nach Wang und Murphy, 1994b] werden einige Einfluss-Faktoren dargestellt. Nach Kim et al. [2005] haben nicht nur die Sorte, Reifung und das Erntejahr einen Einfluss auf die Isoflavon-Zusammensetzung, sondern auch die jeweiligen Lagerungsbedingungen. Dabei sinkt der Isoflavongehalt in den Sojabohnen beträchtlich bei einer Lagerung von über einem Jahr.



Tabelle 6: Faktoren, die die Isoflavon-gehalte von Sojapflanzen beeinflussen [nach Wang und Murphy, 1994b; COT, 2003].

| Faktor              | Isoflavongehalte [mg/kg] |
|---------------------|--------------------------|
| Sojakultur          | 2053-4216                |
| Erntejahr (1989-91) | 1176-3309                |
| Anbaugebiet         | 1176-1749                |

Auf den Einfluß der verschiedenen Pflanzensorten wird in Kapitel 3.1.2.2 (Schwarzer Soja im Vergleich zu gelben Soja) noch eingegangen.

Gentechnisch veränderte Soja-Bohnen, wie u.a. Roundup Ready® unterscheiden sich hinsichtlich ihres Isoflavonspektrums nicht von den herkömmlichen Sorten [Rupp et al., 2000]. Diese Sorte ist gegen das Herbizid Roundup® tolerant, d.h. die Sojapflanzen sind unempfindlich gegenüber der Wirkung des Herbizids, so dass nur die Unkräuter bei einer Einbringung dieses Herbizides absterben, nicht jedoch die Sojapflanzen [Rott et al., 2004]. Seit dem Jahr 1994 sind in den USA und seit 1995 in Großbritannien gentechnisch veränderte Soja-Bohnen dieser Linie zugelassen und dürfen in die EU importiert werden. In vielen wichtigen Erzeugerstaaten wie u.a. USA, Brasilien oder Argentinien wird dieses Saatgut bereits überwiegend eingesetzt (s. auch Kapitel 1.2.3).

Isoflavone aus anderen Nahrungsmitteln oder Pflanzen haben nur eine sehr untergeordnete Rolle, so sind die Methylderivate von Daidzein und Genistein – Formononetin und Biochanin A – in Klee- oder Alfalfasprossen sowie Biochanin A in Gabanzabohnen zu finden.

### 1.2.3 Bedeutung und Anbaugebiete

Die Sojabohne liefert für die menschliche Ernährung den größten Beitrag an Isoflavonen. In anderen Lebensmitteln sind Isoflavone nur in geringen Mengen enthalten. Aufgrund ihrer vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten wird die Sojabohne einer Vielzahl von Lebensmitteln zugesetzt bzw. von ihnen verarbeitet. Dabei besitzt besonders das Sojaprotein vielfältige funktionelle Eigenschaften bei der Verarbeitung von Lebensmitteln (z.B. Gelbildung,

Stabilisierung, Viskosität oder Schaumbildung) und wird in verschiedenen Lebensmitteln wie u.a. Fleischprodukten, Backwaren, Getränken, Soßen, Suppen oder Speiseeis verarbeitet (s. Tabelle 7). Ebenso sind Sojamehle und Sojalecithine häufig in den verschiedensten Lebensmitteln als Rezepturkomponenten verarbeitet, wodurch oftmals eine Qualitätssteigerung des Endproduktes erfolgt. So wird u.a. durch Zusatz von Soja zu Brotmehlen aus Mais oder Maniok der Eiweißgehalt im Brot oder anderer Backwaren erhöht, was ernährungsphysiologische Vorteile mit sich bringt. Dies hat insbesondere Bedeutung für Entwicklungsländer [Franke, 1997]. In der Lebensmitteltechnologie sind derzeit mindestens 30000 Rezepturen mit Zusatz von Soja (oder -produkten) bekannt [ASA, 2006 (online); Franke, 2007]. Verbleibende Pressrückstände und Grünmassen der Sojaproduktion werden weiter als Tierfutter vermarktet. Zudem werden aus Bestandteilen des Sojas ebenfalls Grundstoffe für Farben, Folien, Dünger, Lacke oder verwandte Erzeugnisse hergestellt. Seit kurzem wird über den Einsatz von Sojaöl zur Gewinnung von Biodiesel diskutiert, da dies eine sehr hohe Energie-Effizienz besitzt [Walla, 2006].

Tabelle 7: Funktionelle Eigenschaften von verschiedenen Sojaproteinformen in Lebensmitteln, nach Wolf [1970] und Fukushima [1979].

| Funktionelle Eigenschaft | Proteinform   | Lebensmittel (bsp.)                           |
|--------------------------|---------------|-----------------------------------------------|
| Stabilisierung           | SPM, SPC, SPI | Würstchen, Wurst, Saucen, Sahne, Garnierungen |
| Wasserbindung            | SPM, SPC      | Brot, Kuchen, Fleischprodukte                 |
| Teigausbildung           | SPM, SPC, SPI | Backwaren                                     |
| Elastizität              | SPI           | Backwaren, Fleischprodukte                    |
| Farbregulierung          | SPM           | Brot, Waffeln, Pfannkuchen                    |
| Adhäsion                 | SPC, SPI      | Wurstwaren, Fleischprodukte, Teigwaren        |
| Textur - Viskosität      | SPM, SPC, SPI | Suppen, Saucen,                               |
| Textur - Gelbildung      | SPI           | Käse, Fleischprodukte                         |
| Schaumbildung            | SPI           | Konfekt, Desserts, Crèmes, Kuchen             |

SPM = Sojamehl, SPC = Sojakonzentrat, SPI = Sojaisolat

Laut einer Statistik der FAO [Faostat, 8/2006 (online)] sind die wichtigsten Exportländer für Sojabohnen die USA, Argentinien und Brasilien. Rund 41% der Weltproduktion von

Sojabohnen stammt aus den USA, wobei die Anbauflächen sich hauptsächlich in Iowa und Illinois befinden. Die Welternte betrug 2005 über 214 Millionen Tonnen, wobei die größten Produzenten - nach den USA, Argentinien und Brasilien – China und Indien sind (vgl. Abbildung 20). Dabei entfielen 2006 rund 93% der Welternte von Sojabohnen auf vier Länder. In der EU werden näherungsweise ein Prozent der Welternte produziert, wobei Italien, Frankreich und Österreich hauptsächlich beitragen.

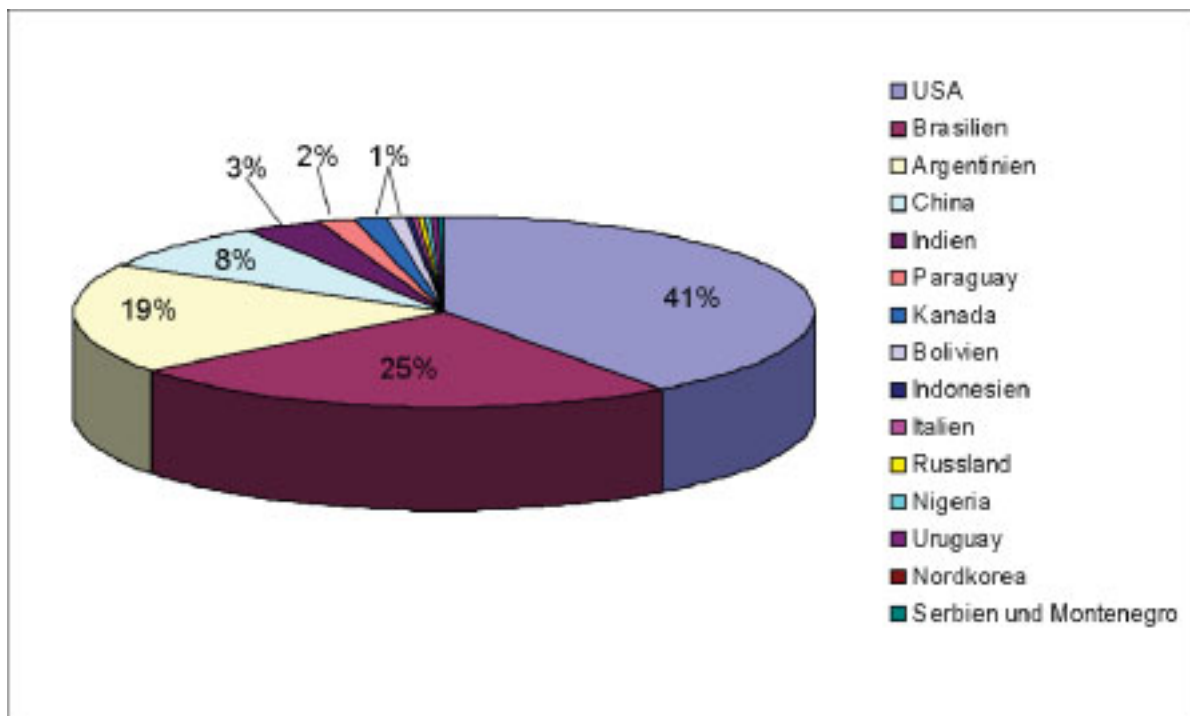


Abbildung 20: Die 15 größten Sojaproduzenten weltweit (Grafik erstellt nach Daten der FAO).  
[Faostat, 8/2006 (online); Franke, 2007]

Als bedeutenste Importländer von Sojabohnen sind Japan, die Niederlande und Deutschland zu nennen.

In Europa wird die Sojabohne hauptsächlich in den südlichen und südöstlichen Ländern angebaut, wie u.a. Italien, Frankreich, Bulgarien, Rumänien, Spanien und Ungarn (s.o.) [Diepenbrock et al., 1999].

## 1.3 Rotklee

### 1.3.1 Wissenswertes zur Pflanze Rotklee (*Trifolium pratense* L.)

Die Gattung *Trifolium* umfasst ungefähr 300 Arten, wobei die einzelnen Gruppen aus zahlreichen Familien (in Europa und Sibirien) sowie aus verschiedenen Kultursorten

bestehen. Die Ausdauer der Kulturformen ist unterschiedlich. Sie beträgt zumeist ein bis zwei Jahre und kann gegebenenfalls auch mehrjährig sein. Die kurzdauernde Form wird häufig als Ackerklee bezeichnet [Keller et al., 1999]. Beim Acker(rot)klee wird zwischen zwei Typen unterschieden – dem Früh- und dem Spätklee – welche beide den Wiesenklee (var. *spontaneum* WILLK.) als Stammpflanze haben. Der Frühlklee wird häufig in Mitteleuropa angebaut und zeigt bei einem Vergleich mit dem Spätklee eine raschere Entwicklung und höhere Ertragszunahme. In Nord- und Osteuropa erfolgen hingegen Anpflanzungen mit dem Spätklee [Diepenbrock et al., 1999]. Die Gattung *Trifolium* war ursprünglich im Mittelmeergebiet weit verbreitet [Smit, 2005].

Rotklee (*Trifolium pratense* L.), auch Wiesen- oder Hummelklee (weitere Synonyme sind Honigblumen, Hummellust und Fleischklee) genannt, ist in Asien, Europa und Nordamerika beheimatet und gehört zur Familie der Schmetterlingsblütler (*Fabaceae*); Ordnung der Fabales (s. Abbildung 21). Wahrscheinlich wird Rotklee seit dem 3. oder 4. Jahrhundert v. Chr. im Mittelmeerländern in Kultur genommen, wobei er zuvor bereits in seiner Wildform genutzt wurde [Hondelmann, 2002]. Seit dem 15. Jahrhundert wird Rotklee in Flandern, Spanien und Oberitalien angebaut, später auch im Rheingebiet. In Mitteldeutschland wird er seit Mitte des 18. Jahrhunderts kultiviert [Mansfeld, 1959].



Abbildung 21: Rotklee (*Trifolium pratense* L.); Zeichnung nach Otto Wilhelm Thomé (1885).

Es handelt sich dabei um eine zweijährige oder ausdauernde Pflanze mit langer (ca. 1 m) Pfahlwurzel und zahlreichen Nebenwurzeln (Abbildung 21). Diese Pflanze wächst 15-50 cm hoch mit aufrechten Stängeln, welche teilweise verzweigt, kantig und anliegend behaart sind. Die Blätter des Rotklees bestehen aus einem Blattstiel mit zwei dreieckigen, verwachsenen

Nebenblättern und drei Fiedernblättern. Der lateinische Name des Rotkleees „*Trifolium*“ nimmt auf die dreiteiligen Blätter Bezug („tres“ = drei, „folium“ = Blatt und „pratense“ = auf der Wiese wachsend). Die Blätter sind langgestielt, wechselständig und können ca. 3 cm lang werden, dabei sind sie zwei- bis dreimal so lang wie breit. Die Form der Blätter ist elliptisch-eiförmig, wobei sich ein charakteristischer weißer Fleck (wie ein dreieckige Pfeilspitze) auf der Oberseite abzeichnet (s. Abbildung 22). Die Nebenblätter sind eiförmig, leicht behaart und grannenartig zugespitzt [Becker und John, 2000]. Der Anteil an Blättern nimmt bei späterer Nutzung auf <30% vom Trockenmassenertrag ab [Diepenbrock et al., 1999]. Die köpfchenartigen Blütenstände sind kugel- oder eiförmig und umfassen 80-120 rosa bis kaminrote Blütchen, welche einen Durchmesser von 1,5-2,5 cm erreichen können (s. Abbildung 22). Aus den einzelnen Blütchen dieser zygomorphen Schmetterlingsblüten können langrüsslige Insekten Nektar entnehmen, worauf Rotklee als strenger Fremdbefruchter angewiesen ist. Darüber hinaus weisen sie während der Blüte von Juni bis September einen süßlichen, honigartigen Geruch auf. Für Raupen verschiedene Schmetterlingsarten stellt Rotklee eine wertvolle Futterpflanze dar. Die Samen des Rotkleees sind eiförmig, können violett gefärbt sein und wachsen in einsamigen Hülsen [Becker und John, 2000; Diepenbrock et al., 1999; Keller et al., 1999].



Abbildung 22: Dreiblatt von Rotklee (links; Quelle: <http://www.dkimages.com/discover/previews/933/45010132.JPG>) und Blüte (rechts; Quelle: Thomas J. Elpel; <http://www.wildflowers-and-weeds.com>).

Der Anbau von Rotklee ist in weiten Gebieten möglich, wobei er bevorzugt auf Wiesen und Weiden wächst. Er mag feuchte Stellen, gedeiht ebenfalls auf armen Boden und hat keine besonderen Anforderungen. Sandige, saure Standorte sowie Moorböden eignen sich nur bedingt für einen Anbau. Rotklee wird, ähnlich wie Weißklee (*Trifolium repens* L.) und Schwedenklee (*Trifolium hybridum* L.; Bastardklee), als ausdauernde Kleeart für Reinbestände oder Stoppelnachfrucht ausgebracht. Er dient vielfach als Gründüngungspflanze oder zur Silagebereitung, ist jedoch auch eine bedeutende

Futterleguminose [Franke, 1997]. Die Wurzeln des Rotkleees können mit symbiotischen Rhizobien zur Stickstoff-Fixierung im Boden beitragen (vgl. 1.1.6) [Hegnauer und Hegnauer, 1996; Rolfe et al., 1995]. Dies ist durch verschiedene Faktoren beeinflussbar, so spielen z.B. das Bestandsalter, die Nutzungsart, der Nährstoffgehalt im Boden oder die Begleitmaterialien eine Rolle [Loges et al., 1997; Heichel et al., 1985]. Die optimale Nutzungszeitspanne von Rotklee hängt vom Verwendungszweck (Nutztierart, Futterverfahren) ab, sowie von den Anforderungen an die Qualität des Futtermittels oder des Gründüngers. Bei einer späteren Ernte z.B. ist die Wuchshöhe des Rotkleees größer und der Rohprotein- und Fettgehalt nehmen ab, wo hingegen die Verdaulichkeit (Energiedichte) und der Rohfaser- sowie Trockensubstanzgehalt zunehmen. Als proteinreiches Beifutter ist Rotklee in einer frühen Erntephase am geeignetsten [Diepenbrock et al., 1999].

Aufgrund seines hohen Proteingehaltes ist der Rotklee als Futterpflanze weit verbreitet [Smith und Sund, 1965]. In den 40er Jahren konnte bei Schafen, Rindern und Pferden das „Clover Disease“ (Trifoliose) beobachtet werden, wobei die Tiere je nach Expositionsdauer und -menge einen veränderten Hormonhaushalt aufwiesen. Der Anteil der gebärenden Schafe ging auf etwa 30% zurück und es kam häufig zu Aborten oder Lactationen nicht-trächtiger Schafe [Adams, 1990; Benetts et al., 1946]. Darüber hinaus konnte innerhalb eines Versuches mit noch nicht geschlechtsreifen Mäusen eine estrogene Aktivität beobachtet werden, da sich bei den Versuchstieren die Gebärmutter vergrößerte [Pieterse und Andrews, 1956].

### 1.3.2 Inhaltsstoffe von Rotklee

Im Rotklee (*Trifolium pratense* L.) konnten diverse sekundäre Pflanzenstoffe nachgewiesen werden, u.a. Pterocarpane und Clovamide. Diese beiden Substanzgruppen werden ebenfalls zu den Phytoalexinen gezählt [Dewick und Ward, 1978; Dewick, 1975]. Clovamide kommen in Rotklee in der trans- und in der cis-Form vor. Einige Beispiele werden in der Abbildung 23 aufgeführt [Tebayashi et al., 2000].

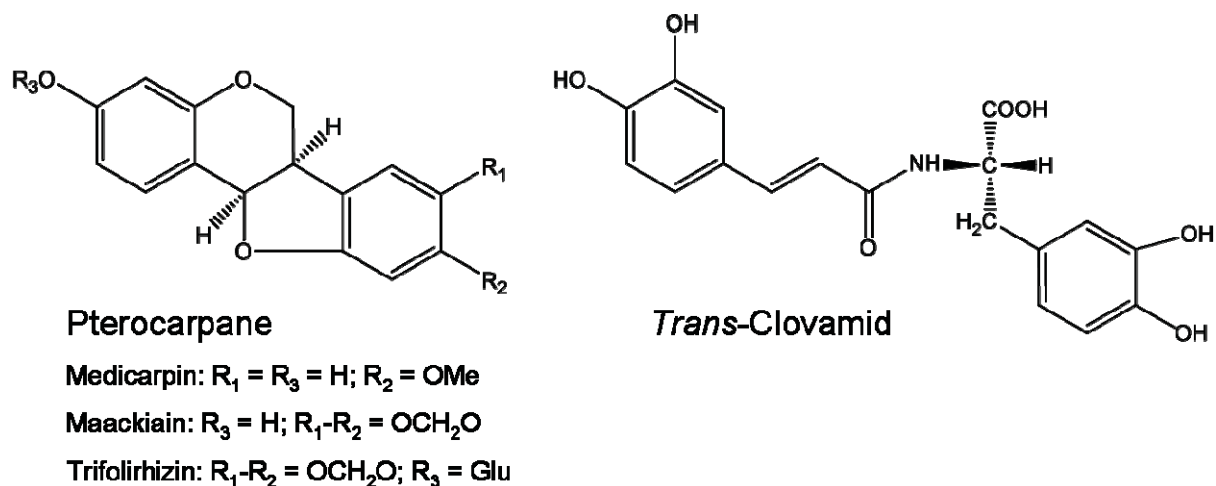


Abbildung 23: Inhaltsstoffe aus Rotklee: Pterocarpane und Clovamide.

Eine Reihe von verschiedenen Flavonoiden, u.a. die Flavone Luteolin, Kämpferol, Apigenin oder Quercetin konnten darüber hinaus in Rotklee nachgewiesen werden (s. Abbildung 24 in Kombination mit Tabelle 8) [Bandyukova und Kazakov, 1978].

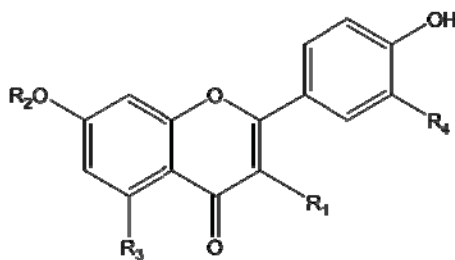


Abbildung 24: Grundgerüst eines Flavones. Die entsprechende Substitution der unterschiedlichen Verbindungen ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Substitutionsmuster der Flavone aus Rotklee (vgl. Abbildung 24) [nach Lin et al., 2000.]

| Flavon                                            | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | M   |
|---------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----|
| Apigenin                                          | H              | H              | OH             | H              | 270 |
| Luteolin                                          | H              | H              | OH             | OH             | 286 |
| Kämpferol                                         | OH             | H              | OH             | H              | 286 |
| Quercetin                                         | OH             | H              | OH             | OH             | 302 |
| Isorhamnetin                                      | OH             | H              | OH             | OMe            | 316 |
| 3-Methylquercetin                                 | OMe            | H              | OH             | OH             | 316 |
| Apigenin-7-O-β-D-glucosid                         | H              | Glc            | OH             | H              | 432 |
| Luteolin-7-O-β-D-glucosid                         | H              | Glc            | OH             | OH             | 448 |
| Isoquercitrin (Quercetin-3-O-β-D-glucosid)        | O-Glc          | H              | OH             | OH             | 464 |
| Hyperosid (Quercetin-3-O-β-D-galactosid)          | O-Gal          | H              | OH             | OH             | 464 |
| 3-Methylquercetin-7-O-β-D-glucosid                | OMe            | Glc            | OH             | OH             | 478 |
| Isoquercitrin-6''-O-malonat                       | 6-Mal          | H              | OH             | OH             | 550 |
| 3-Methoxyquercetin-7-O-β-D-glucosid-6''-O-malonat | OMe            | 6-Mal          | OH             | OH             | 564 |

M = Mol. Gewicht; Me = Methyl; Glc = Glucose; Gal = Galactose; Mal = Malonsäure

Meagher et al. [2006] untersuchten zehn verschiedene *Trifolium*-Arten auf ihren Gehalt an Proanthocyanidinen, wobei jede Art unterschiedliche Polymere (Trimere bis Heptamere) aufwies. In der Blüte der Rotklee-Pflanze konnten einige Procyanidin-Polymere identifiziert werden, bei der die terminale Einheit oftmals aus Epicatechin besteht und bei den Extender-Einheiten Catechin überwiegt [Sivakumaran et al., 2004]. Darüber hinaus konnte im ätherischen Öl des Rotklees eine Reihe von Aromakomponenten bestimmt werden, zu denen Kohlenwasserstoffe, Aldehyde, Ketone, Alkohole, Ester, Phenole und verschiedene Säuren gehören [Kami, 1978]. Viele der flüchtigen Inhaltsstoffe des Rotklees gelten als Lockstoffe für Insekten, wie z.B. (Z)-3-Hexenyl-Acetat oder (Z)-3-Hexenol aus den Blättern oder Acetophenon und Methyl-Cinnamat aus den Blüten [Buttery et al., 1984].



Die estrogenische Wirkung von Rotklee als Futterpflanze bei Schafen etc. wird auf den hohen Gehalt an Isoflavonen in dieser Pflanze zurückgeführt. Dieser Aspekt wird im nächsten Unterkapitel näher erläutert (1.3.3).

### 1.3.3 Isoflavone in Rotklee

Die hormonähnliche Wirkung des Rotklees geht von Isoflavonen aus, von denen bislang etwa 50 identifiziert worden sind. Die beiden Isoflavone Formononetin und Biochanin A sind die Hauptkomponenten, während eine Reihe anderer Isoflavone nur in geringen Mengen detektierbar sind [Booth et al., 2006b; Klejdus et al., 2001; Piersen et al., 2004]. Formononetin und Biochanin A sind die 4'-O-Methyl-derivate von Genistein und Daidzein, welche in Soja enthalten sind. Glucosidisch gebunden liegen sie ebenfalls im Rotklee vor (Ononin = Formononetin-7-O- $\beta$ -D-glucosid und Sissotrin = Biochanin A-7-O- $\beta$ -D-glucosid) und machen den Hauptteil der gesamten glykosidisch gebundenen Isoflavone aus. Eine Übersicht über Isoflavone aus Rotklee gibt Tabelle 9 mit Abbildung 25.

Das Spektrum der Isoflavone umfasst einen weiten Polaritätsbereich, wobei diese einerseits unkonjugiert vorliegen, andererseits aber auch mit Monosacchariden verestert sind (z.T. auch Malonyl- und Acetyl-Derivate) [De Rijke et al., 2001]. Laut einiger Studien dominieren die Aglykone in der Rotkleepflanze. Aufgrund der Instabilität der malonylierten Isoflavone überwiegen bei einigen Untersuchungen die Gehalte an glykosidisch gebundenen Isoflavonen [Barnes et al., 1994; Coward et al., 1998; Swinny und Ryan, 2005]. Innerhalb der unterschiedlichen Pflanzenteile variiert die Isoflavon-Zusammensetzung stark. Eine Variation der unterschiedlichen individuellen Zusammensetzung lässt sich auch anhand von verschiedenen Rotkleesorten, Anbauregionen und Erntezeitpunkten erklären [Tsao et al., 2006; Booth et al., 2006a]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede im jeweiligen Isoflavon-Profil in Rotklee von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden, wobei insbesondere Umwelteinflüsse, die jeweilige Kultivierung, der Reifezustand der Pflanze, klimatische Einflüsse (z.B. die Sonnenbestrahlung), die Pflanzenteile sowie die entsprechenden Aufbewahrungs- und Konservierungsprozesse zu nennen sind [Sivesind und Seguin, 2005; Swinny und Ryan, 2005]. Insbesondere die unterschiedlichen Trocknungsprozesse haben einen entscheidenden Einfluss auf die Isoflavongehalte. Bei langsamen Verarbeitungsprozessen kommt es durch das Enzym  $\beta$ -Glucosidase zur Umsetzung von glucosidisch gebundenen Isoflavonen und damit zur Bildung der Aglykon-Form [Toebe et al., 2005].

Wahrscheinlich war Ononin das erste isolierte Isoflavonoid überhaupt, welches Hlasiwetz 1855 aus *Ononis spinosa* (Dornige Hauhechel) isoliert und chemisch charakterisiert hat

[Hlasiwetz, 1855; Veitch, 2007]. Prunetin wurde 1910 von Finckh isoliert [Shriner und Hull, 1945]. Die beiden Isoflavone Calycosin und Pseudobaptigenin wurden erstmals 1978 aus Rotklee isoliert [Biggs und Lane, 1978] und haben eine Funktion bei der Bildung von Pterocarpanen (z.B. Maackiain) oder auch Coumestanen.

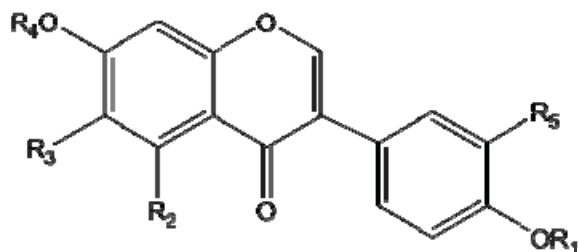


Abbildung 25: Grundstruktur eines Isoflavons.

Tabelle 9: Isoflavone aus Rotklee (vgl. Abbildung 25) in Anlehnung an Lin et al., 2000.

| Isoflavon        | R <sub>1</sub>    | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>      | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> | M   |
|------------------|-------------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|-----|
| Daidzein         | H                 | H              | H                   | H              | H              | 254 |
| Formononetin     | Me                | H              | H                   | H              | H              | 268 |
| Genistein        | H                 | OH             | H                   | H              | H              | 270 |
| Pseudobaptigenin | CH <sub>2</sub> - | H              | H                   | H              | O-             | 282 |
| Biochanin A      | Me                | OH             | H                   | H              | H              | 284 |
| Calycosin        | Me                | H              | H                   | H              | OH             | 284 |
| Prunetin         | H                 | OH             | H                   | Me             | H              | 284 |
| Glycitein        | H                 | H              | OMe                 | H              | H              | 284 |
| Irilon           | H                 | OH             | -OCH <sub>2</sub> - |                | H              | 298 |
| Afrormosin       | Me                | H              | OMe                 | H              | H              | 298 |
| Pratensein       | Me                | OH             | H                   | H              | OH             | 300 |
| Pectolinarigenin | Me                | OH             | OMe                 | H              | H              | 314 |
| Daidzin          | H                 | H              | H                   | Glc            | H              | 416 |

|                                           |                   |    |                     |         |    |     |
|-------------------------------------------|-------------------|----|---------------------|---------|----|-----|
| Ononin                                    | Me                | H  | H                   | Glc     | H  | 430 |
| Genistin                                  | H                 | OH | H                   | Glc     | H  | 432 |
| Rothindin                                 | CH <sub>2</sub> - | H  | H                   | Glc     | O- | 444 |
| Sissotrin                                 | Me                | OH | H                   | Glc     | H  | 446 |
| Calycosin-7-O-β-D-galactosid              | Me                | H  | H                   | Gal     | OH | 446 |
| Calycosin-7-O-β-D-glucosid                | Me                | H  | H                   | Glc     | OH | 446 |
| Trifosid (Prunetin-4'-β-D-glucosid)       | Glc               | OH | H                   | Me      | H  | 446 |
| Glycitin                                  | H                 | H  | OMe                 | Glc     | H  | 446 |
| 6''-O-Acetyl-daidzin                      | H                 | H  | H                   | Glc-Ace | H  | 458 |
| Afrormosin-7-O-β-D-glucosid               | Me                | H  | OMe                 | Glc     | H  | 460 |
| Irilon-4'-O-β-D-glucosid                  | Glc               | OH | -OCH <sub>2</sub> - |         | H  | 460 |
| Pratensein-7-O-β-D-glucosid               | Me                | OH | H                   | Glc     | OH | 462 |
| 6''-O-Acetyl-genistin                     | H                 | OH | H                   | Glc-Ace | H  | 474 |
| 6''-O-Acetyl-glycitin                     | H                 | H  | OMe                 | Glc-Ace | H  | 488 |
| 6''-O-Malonyl-daidzin                     | H                 | H  | H                   | Glc-Mal | H  | 502 |
| Formononetin-7-O-β-D-glucosid-6''-malonat | Me                | H  | H                   | Glc-Mal | H  | 516 |
| 6''-O-Malonyl-glycitin                    | H                 | H  | OMe                 | Glc-Mal | H  | 532 |
| Calycosin-7-O-β-D-glucosid-6''-malonat    | Me                | H  | H                   | Glc-Mal | OH | 532 |
| Biochanin A-7-O-β-D-glucosid-6''-malonat  | Me                | OH | H                   | Glc-Mal | H  | 532 |
| Trifosid-6''-O-malonat                    | Glc-Mal           | OH | H                   | Me      | H  | 532 |
| Irilon-4'-O-β-D-glucosid-6''-malonat      | Glc-Mal           | OH | -OCH <sub>2</sub> - |         | H  | 546 |
| Pratensein-7-O-β-D-glucosid-6''-malonat   | Me                | OH | H                   | Glc-Mal | OH | 548 |

M = Mol. Gewicht; Me = Methyl; Glc = Glucose; Gal = Galactose; Ace = Acetyl-glucose; Glc-Mal = Malonyl-glucose

Die Metabolisierung von Isoflavonen aus Rotklee nach der Aufnahme durch den menschlichen Organismus ist noch nicht vollständig untersucht worden und beinhaltet aufgrund der Vielzahl der unterschiedlichen Verbindungen vermutlich eine größere Anzahl an Metaboliten. Die beiden Hauptisoflavone Formononetin und Biochanin A werden zunächst demethyliert und liegen daraufhin in den Substitutionsformen der beiden Soja-Isoflavone Daidzein und Genistein vor. Der weitere metabolische Abbau erfolgt analog zu diesen beiden Isoflavonen (vgl. 1.1.4), wobei jedoch bereits vor der Demethylierung eine Reihe verschiedenster Metabolite entstehen können [Heinonen et al., 2004].

#### 1.3.4 Verwendung von Rotklee

Extrakte von Rotklee werden aufgrund ihres hohen Gehaltes von Isoflavonen als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben, wie z.B. Promensil® von Novogen (Novogen, Australien). Diese Präparate werden als Alternative zur klassischen Hormonersatztherapie angeboten, da die enthaltenen Isoflavone als SERM wirken und klimakterischen Beschwerden (vgl. 1.8.1) [Beck et al., 2005a und 2005b] bzw. einem Verlust der Knochendichte entgegenwirken (s. 1.1.5.5) [Occhiuto et al., 2007]. Standardisierte Extrakte von Rotklee wurden deshalb auf ihre Estrogenität untersucht [Dornstauder et al., 2001].

Unter den Leguminosen gehört Rotklee zu einer der drei bedeutendsten Futterpflanzen, neben Weißklee und Luzerne. Es ist in den letzten Jahrzehnten gelungen, die Züchtung ertragsreicher Sorten gezielter voranzutreiben [Gierus et al., 2005; dr-rnh, 2008 (online); und Igl.bayern, 2006 (online)].

### 1.4 Iris

*Iris germanica* L. gehört zur Familie der Schwertliliengewächse (*Iridaceae*). Sie stammt ursprünglich aus dem östlichen Mittelmeerraum und Südwestasien. Die Familie der Iridaceae ist weit verbreitet. Es sind mit Rhizomen, Knollen oder Zwiebeln überwinternde Pflanzen, welche oftmals eine schwertförmige Blattform aufweisen (s. Abbildung 26). Von diesen mehrjährigen, winterharten, krautigen Schwertliliengewächsen sind ca. 300 verschiedene Arten aus den gemäßigten Zonen bekannt. Vermutlich handelt es sich bei der deutschen Schwertlilie (*Iris germanica*) um einen Bastard, da diese sich nur über den Wurzelstock und nicht über den Samen vermehren. Die Herkunft der einzelnen Arten lässt sich nur sehr schwer bestimmen, da es im Laufe der Züchtung zu einer vermehrten Kreuzung zwischen den natürlichen Formen und den Hybriden kam, so dass es wahrscheinlich weitaus mehr als 1000 gezüchtete Arten gibt. *Iris germanica* ist vermutlich bereits während des Mittelalters im Mittelmeerraum gezüchtet worden, wobei der Name auf

die verwildert vorkommenden Irisarten an einigen deutschen Burgen zurückgeht. Neben der Rose zählt die Iris zu den ältesten Gartenpflanzen überhaupt und ist derzeit fast überall auf der Welt verbreitet.



Abbildung 26: Pflanzenteile von *Iris germanica* (L.), ohne Wurzel. Foto von N. Fletcher und D. Kindersley, Quelle: <http://www.dkimages.com/.../Iris-germanica-2.html>.

Besonders gut wächst die Iris auf kalkhaltigen und nährstoffreichen Böden in klimatisch begünstigten Lagen. Häufig vertreten ist die *Iris germanica* sowie andere Iridaceen im Mittelmeergebiet, in Amerika und Südafrika [Hegnauer, Band II und VII]. Die Wuchshöhe bei einem Anbau in Deutschland beträgt circa 80 cm, wobei diese stark zwischen 20-100 cm variieren kann (vgl. Abbildung 27).



Abbildung 27: Buschartige Wuchsweise von *Iris germanica*. Foto: Stürtz, 2007

Häufig sind große, prächtige, farbenfrohe Blüten vorhanden, weshalb viele Zierpflanzen aus der Familie der Iridaceae stammen. Besonders in Deutschland wird die „robuste und pflegeleichte“ Iris in vielen Gärten angepflanzt, und daher auch als „Orchidee des kleinen Mannes“ bezeichnet. Ein Charakteristikum bei der *Iris germanica* sind die Blüten, welche zumeist in Blau- oder Violetttönen gefärbt sind, vereinzelt jedoch auch eine gelbe Farbe aufweisen. Die Blüten entwickeln sich zwischen Mai und Juni. Diese zwittrigen Blüten bestehen aus sechs blütenkronblättrig gefärbten Perianthblättern<sup>2</sup>, davon sind drei äußere am Grund röhrig verwachsen und dunkel geadert und dort dicht gelb behaart. Die drei inneren Blütenblätter stehen aufrecht, haben Griffeläste mit dreieckigen Narbenlappen. Die Samen dieser dreiseitigen Kapselfrucht besitzen ein horniges, braunes Endosperm [Becker und John, 2000].

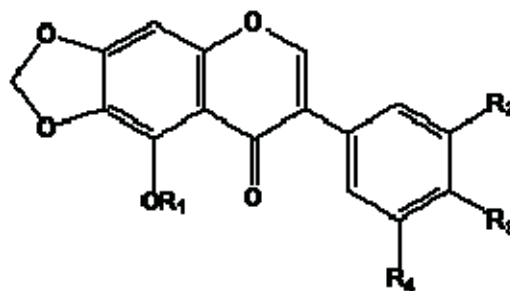
Die Pflanze enthält eine Fülle von Inhaltsstoffen, zu denen eine Vielzahl an Flavonoiden gehört, aber auch verschiedene Zucker, Harze, Schleim- und Gerbstoffe [Arifkhodzhaev et al., 1986]. In der Kosmetikindustrie und Parfumerie wird das ätherische Öl („Veilchenwurz“) aus der Iriswurzel zur Aromatisierung von z.B. Zahncremes, Mundwässern und Lebensmitteln (Back- und Süßwaren, Liköre wie „Danziger Goldwasser“), sowie als Parfuminhaltsstoff verwendet [Belitz und Grosch, 1992]. Darüber hinaus hat das Rhizom angeblich beruhigende, harntreibende, schleimlösende und mild abführende Effekte, weshalb die Iris schon im Alten Ägypten und Antiken Rom als Naturheilpflanze Verwendung fand. Das getrocknete Rhizom wird seit alters her in der Volksmedizin u.a. als Brechmittel, gegen Infektionen und Entzündungen sowie als Zahnungshilfsmittel für kleine Kinder verwendet. Ebenso wurde aus den Extrakten dieser Pflanze Tee hergestellt, der bei Nieren- oder Blasenleiden sowie Husten verabreicht wurde. Neuere Studien weisen auf anticancerogene und cholesterinsenkende Wirkungen hin, welche auf die große Varianz an Sekundärmetaboliten wie Flavonoide oder Isoflavonoide in der Iris zurückzuführen sind. So konnte in einer Tierstudie (Ratten) gezeigt werden, dass ein Extrakt aus Iris einen positiven Einfluss auf die Fettbestandteile im Serum hat. Dabei wurde der Anteil an Triglyceriden und Cholesterol gesenkt, wodurch das Risiko für koronare Herzerkrankungen vermindert wurde [Wollenweber et al., 2003; Choudhary et al., 2005; Atta-ur-Rahman et al., 2002]. In den verschiedenen Iris-Arten konnte eine Reihe von unterschiedlichen sekundären Pflanzenstoffen identifiziert werden. So sind u.a. Triterpenoide (Iridal-Typ), Benzoquinone, Iridalglykoside, Xanthone, Flavanone, Flavanoide, Flavon-Glykoside und Isoflavonoide in Iris detektiert und charakterisiert worden [Fang et al., 2007; Mahmood et al., 2002; Marner et al., 2002; Takahashfi et al., 2000; Bonfils und Sauvaire, 1996; Al-Khalil et al., 1995; Kojima et al., 1997; Williams et al. 1986; Hanawa et al., 1991; Purev et al., 2002; Farag et al., 1999]. Diese

---

<sup>2</sup> Perianth = Blütenhülle

Naturstoffe weisen alle verschiedene biologische Wirkungen auf, so besitzen sie z.B. antioxidative und Anti-Tumor-Eigenschaften, wirken gegen Tuberkulose etc. [Nadaroğlu et al., 2007; Wong et al., 1986; Rahman et al., 2003].

Eine Vielzahl verschiedener substituierter Isoflavone konnte bereits in *Iridaceae* nachgewiesen werden [Pailer und Franke, 1973]. Mehr als 46 verschiedene Aglykone wurde in *Iridaceae* identifiziert [Iwashina und Ootani, 1998]. Teilweise besitzen diese Isoflavone eine Methylendioxy-Gruppe (s. Abbildung 28), über deren Metabolismus bislang wenig bekannt ist.



| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub>   |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| OCH <sub>3</sub> | H                | OH               | H                |
| OCH <sub>3</sub> | H                | OCH <sub>3</sub> | H                |
| OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OH               | H                |
| OH               | H                | OH               | H                |
| OH               | OH               | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> |

Abbildung 28: Isoflavone mit einer Methylendioxystruktur aus *Iris germanica* (L.), nach Al-Khalil et al., [1994].

Hauptsächlich liegen diese Isoflavone glykosidisch oder diglykosidisch gebunden vor [Qin et al., 2007; Atta-ur-Rahman et al., 2002; Agrawal et al., 1984a; Agrawal et al., 1984b]. Eines der ersten isolierten Isoflavone überhaupt - Iridin - wurde beispielsweise aus *Iris florentina* gewonnen [de Laire und Tiemann, 1893].

## 1.5 Kudzu

Kudzu (*Pueraria lobata* (Willd.), Synonym: *P. javanica*, *P. thunbergiana*), die Kudzubohne, Kudzuwein oder auch Koupubohne genannt, ist eine Pflanze aus der Familie der Fabaceae, Unterfamilie Faboideae, die ursprünglich nur in China beheimatet war. Sie ist ein bohnenartiger Halbstrauch, wächst hoch kletternd und entwickelt einen fleischigen Wurzelstock. Kudzu weist ein dichtes Blattwerk auf, wobei die Blätter dreizählig sind bei einer Länge von bis zu 10-20 cm und an den Rändern leicht gelappt sind. Die Blätter sind stark behaart, was bei der Verfütterung dieser Pflanze als nachteilig empfunden wird. Die



Blüten dieser Pflanze blühen schmuckvoll, schmetterlingsförmig in Violettrot. Aus ihnen können sich in bestimmten Wachstumsphasen 3-5 Zentimeter lange, behaarte Früchte entwickeln, deren Samen klein und hartschalig sind. Es besteht eine enge Verwandtschaft zu unseren heimischen Bohnengewächsen [Bärtels, 2002].



Abbildung 29: Kudzupflanze mit der typischen Blattform. Quelle:  
<http://www.biosurvey.ou.edu/okwild/images/kudzu3.jpg>.

In den Subtropen und Tropen wird diese Pflanze hauptsächlich als Weide-, Futter-, sowie Gründüngungspflanze angebaut und gilt als älteste Faserpflanze Ostasiens. Diese immergrüne Pflanze zeichnet sich durch ein invasives Wachstum aus, da sie schnell ihre Grenzen überwächst und dabei andere Pflanzen derart dicht überwuchert, dass diese sogar absterben können [Keung, 2002]. In den Vereinigten Staaten von Amerika wurde Kudzu zeitweise als Bodenbedecker, zur Befestigung von Straßenrändern und zur Vermeidung von Erosionen verwendet. Jedoch kam es einige Zeit nach der Einführung dieser Pflanze in die USA aufgrund der für diese Pflanze dort herrschenden sehr guten Wachstumsbedingungen zu einem explosionsartigen Wachstum, wobei ganze Häuser binnen kurzer Zeit überwuchert wurden, da die Wachstumsgeschwindigkeit teilweise bis zu 30 Zentimetern am Tag beträgt (s. Abbildung 30) [Davis und Funderburk, 1964]. Spaßeshalber wird sie u.a. “mile-a-minute vine”, “miracle plant” oder “vegetable bulldozer” genannt. Das BMVEL hat für verschiedene Pflanzen eine “Risikobewertung für gebietsfremde Pflanzenarten” aufgestellt. Demnach verändert und zerstört die Kudzupflanze das Ökosystem und Habitate; sie verdrängt, erstickt und gefährdet eine Reihe von anderen Pflanzen. Von einer Anpflanzung im Freiland wird abgeraten [Schrader, 2003].





Abbildung 30: Invasives Wachstum der Kudzu-Pflanze. Quelle: <http://grandpacliff.com/InvSp/Img-v/Img-Kudzu/kudzu-car.jpg>.

Die Kudzuwurzel bildet essbare, stärkehaltige Knollen. In Japan werden die Pflanze und ihre entwickelten Knollen als Heilpflanze bzw. -mittel verwendet. In China wurde sie aufgrund ihres hohen Eiweißgehaltes hauptsächlich als Futterpflanze genutzt. Die knolligen Wurzeln sind auch in der Traditionellen Chinesischen Medizin seit langem bekannt und werden für eine ganze Reihe von verschiedenen Krankheiten verwendet, wozu unter anderem Schmerzen, Migräne, Bluthochdruck, Angina oder sonstige Beschwerden gehören [Brücher, 1977; Keung und Vallee, 1998]. In einigen Nahrungsergänzungsmitteln ist Kudzu enthalten, da es bei Entzugerscheinungen aufgrund eines Nikotinmangels die Beschwerden lindern soll. Ebenso wird Kudzu auch zur Behandlung der Alkoholabhängigkeit eingesetzt. Als Wirksubstanzen enthält Kudzu u.a. Isoflavone, wobei insbesondere Daidzein und sein Glucosid Daidzin zu nennen sind [Carai et al., 2000; Kinjo et al., 1987; Ma et al., 2005]. Nach Mazur und Adlercreutz [1998] enthält der Samen von Kudzu die höchste Konzentration an Isoflavonen (in Summe) von allen verzehrbaren Samen überhaupt. So sind in Kudzu-Samen mehr als 200 mg/100 g Isoflavone enthalten, wobei es in der Sojabohne 140,3 mg/100 g sind. In Tabelle 10 wird eine kleine Übersicht über den Phytoestrogen-Gehalt in verschiedenen Pflanzenteilen von Kudzu aufgeführt.

Tabelle 10: Verteilung von Phytoestrogenen in den unterschiedlichen Pflanzenteilen von Kudzu (basierend auf den Daten von Mazur und Adlercreutz, 1998; Mazur et al., 1998.)

| [mg/100 g] | DAI  | GEN  | FORM | BIOA | COU  | SECO* | MAT |
|------------|------|------|------|------|------|-------|-----|
| Blätter    | 0,37 | 2,52 | 0,09 | 1,24 | 0,02 | 0,47  | tr. |
| Wurzel     | 185  | 12,6 | 7,09 | 1,40 | 1,57 | 31    | tr. |

\* Gesamtgehalt von Anhydrosecoisolariciresinol und Secoisolariciresinol; tr. = nur in Spuren vorhanden

Der Gehalt an Isoflavonen und damit die individuelle Zusammensetzung der hergestellten Pflanzenextrakte ändert sich innerhalb der verschiedenen Sorten sowie mit der jeweiligen geographischen Lage des Anbauortes [Chen et al., 2006]. Ebenso ändert sich der Flavonoidgehalt dieser Pflanze mit dem jeweiligen Erntezeitpunkt. Lian et al. konnten 1995 zeigen, dass die Gehalte einiger wichtiger Flavonoide (wie u.a. Puerarin) in dem Zeitraum von Mitte Januar bis Februar am höchsten sind. Dies korreliert mit der Zeitspanne, in der traditionell in China Kudzu geerntet wird [Keung, 2002].

Darüber hinaus enthält die Kudzu-Pflanze das Isoflavon Puerarin, welches eines der wenigen C-glykosidisch gebundenen Isoflavone darstellt [Murakami et al., 1960]. Es ist in größeren Mengen in den verschiedenen Pflanzenteilen der Kudzu-Pflanze enthalten und wird für eine Reihe biologischer und pharmakologischer Wirkungen verantwortlich gemacht [Lin et al., 2005; Ma et al., 2005; Yang et al., 2005; Setchell, 1998].

## 1.6 Alfalfa

Alfalfa (deutsch: Luzerne, *Medicago sativa*) gehört zu der Pflanzenfamilie der Fabaceae (Hülsenfrüchtler) und der Unterfamilie der Schmetterlingsblütler. Sie ist eine bedeutende, weltweit angebaute Futterpflanze, welche sehr eiweiß- und mineralstoffhaltig ist. Die Wurzeln der Alfalfa-Pflanze (Luzerne) sind genauso wie viele andere Vertreter aus der Familie der Fabaceae in der Lage, mit symbiotischen Knöllchenbakterien Stickstoff aus der Luft in proteinreiche Nahrung zu überführen. In diesem Fall handelt es sich um eine wirkspezifische Spezies dieser Knöllchenbakterien, den *Rhizobium meliloti* [Wall und Favelukes, 1991; Dylan et al., 1986]. Ursprünglich kommt die Luzerne aus den vorderasiatischen Steppenländern und wurde bereits im Altertum in Europa eingeführt. Der Anbau in Griechenland ist seit 500 v. Chr. dokumentiert. Sie stellt eine der ältesten Kulturpflanzen zur Futtergewinnung dar, und wird insbesondere zur Fütterung von Pferden und Kühen verwendet, wobei die Milchleistung gefördert werden soll [Becker und John, 2000; Keller et al., 1999]. Bei der Luzerne handelt es sich um eine mehrjährige Staude, welche buschig und verzweigt bis zu 80 cm hoch wächst. Die Sprossachsen sind mit dreizähligen Blättern besetzt, welche wechselständig, oval, kurzstielig und gezähnt sind (s. Abbildung 31). Die Blüten wachsen in länglichen oder kugeligen Trauben und weisen eine purpurne bis blau-violette Farbe während der Blütezeit von ca. Juni bis Oktober auf [Becker und John, 2000; Franke, 2007]. Luzerne ist nicht nur reich an Proteinen, sondern auch an Kalzium, Vitamin K sowie einer Vielzahl an Provitaminen und Mineralstoffen. Die in ihr enthaltenen Chlorophylle und Carotinoide liefern industriell die jeweiligen grünen (E 140) und gelben (E 160a) Farbstoffe. Traditionell werden

die Blattaufgüsse zur „allgemeinen Stärkung“, bei Blutungen, Anämie oder klimakterischen Beschwerden verwendet [Becker und John, 2000]. Neben Soja und Rotklee ist Luzerne in Hinblick auf alle konsumierten Pflanzen diejenigen mit dem höchsten Gehalt an Phytoestrogenen. Dabei sind vor allem Coumestane sowie Isoflavone in den Luzernen enthalten [Shore et al., 1995; Moravcová et al., 2004].



Abbildung 31: Foto von Luzerne (Alfalfa, *Medicago sativa*). Quelle: Leo Michels (<http://michels.de/images/0005042jpg>.)

## 1.7 Weintraubenschalen

Die Weinrebe ist von weltwirtschaftlicher Bedeutung und gehört zu den ältesten Kulturpflanzen überhaupt. Der Ursprung des Weinbaus geht wahrscheinlich bereits auf 6000 v. Chr. in den Flusstälern Mesopotamiens zurück. Dokumentiert wurde der Weinanbau spätestens durch die Ägypter, Babylonier und Assyrer um 3500 v. Chr. Botanisch gesehen gehört die Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *Vinifera*) zur Familie der Vitaceae und Ordnung Vitales. Die Gattung *Vitis* kommt in zahlreichen Arten und Unterarten vor, wobei die heute in Europa wichtigsten Weinreben zur ertragsreichen Weinherstellung unter *Vitis vinifera* L. ssp. *Vinifera* zusammengefasst werden [Franke, 2007; Becker und John, 2000]. Die Trauben der Weinrebe enthalten 15-25% Zucker, 5% Weinsäure, sowie Vitamine und Mineralstoffe. Weintrauben werden vielseitig verwendet, u.a. zur Herstellung von Saft und Gelee, oder zum Verzehr als Obst bzw. Rosinen. Der Gehalt an Polyphenolen ist in den Weinbeeren sehr hoch, wobei insbesondere in größeren Mengen die Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide (z.B. Catechine) in diesen Trauben vorkommen [Franzke, 1998]. Bei roten Weintrauben (bzw. im Rotwein) liegt der Polyphenolgehalt deutlich über dem von weißen Trauben bzw. Weißwein [Würdig und Woller, 1989]. Zur Mostgewinnung werden die Trauben zunächst entrappt, anschließend in Traubenmühlen durch Anreißen geöffnet und ausgequetscht, wobei darauf zu achten ist, dass die Traubenkerne nicht mit zerrieben werden

(aufgrund der dort vorkommenden Bitterstoffe). Nach der Vorentsaftung und dem Keltern bleiben die festen Maischebestandteile (Trester) zurück [Franzke, 1998]. Stilbenoide können u.a. im Tresterrückstand nach der Weinbereitung nachgewiesen werden. Die Grundstruktur hierbei lässt sich vom trans-Resveratrol ableiten (s. 1.1.2; und Abbildung 5). Dieses Stilben wurde bereits 1963 von Laurent aus Bittermandelöl isoliert [Gorham, 1980].

## 1.8 Nahrungsergänzungsmittel

Nahrungsergänzungsmittel (NEM) sind Lebensmittel des allgemeinen Verkehrs, die dazu bestimmt sind, die normale Ernährung zu ergänzen. Deshalb müssen die allgemein gültigen Vorschriften des Lebensmittelrechts berücksichtigt werden. Eine explizite, rechtliche Definition des Begriffs „Nahrungsergänzungsmittel“ wird in der Richtlinie 2002/46/EG vom 10.06.2002 zur Angleichung von Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Nahrungsergänzungsmittel gegeben. Diese Richtlinie wurde in nationales Recht durch die „Verordnung über Nahrungsergänzungsmittel“ (NemV) vom 24.05.2004 umgesetzt (Inkrafttreten 28.05.2004). Es gelten die horizontalen Vorschriften des deutschen Lebensmittelrechts, so dass die Vorgaben des Lebensmittel- und Futtermittelgesetz (LFGB) und der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung (LMKV) für eine rechtliche Beurteilung anzuwenden sind. Die NemV regelt u. a. die Zusammensetzung, die Kennzeichnung sowie die Anzeigepflicht von Nahrungsergänzungsmitteln. In § 1 der NemV werden Nahrungsergänzungsmittel definiert - gemäß Art. 2 VO (EG) 178/2002 - wobei verschiedene Anforderungen kumulativ vorliegen müssen. Danach ergänzen diese die allgemeine Ernährung, indem sie ein Konzentrat von Nährstoffen oder sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung allein oder in Zusammensetzung darstellen. Sie werden in dosierter Form in den Verkehr gebracht, insbesondere in Form von Kapseln, Pillen, Tabletten, Pastillen oder ähnlichen Darreichungsformen wie Pulverbeutel oder Flüssigampullen zur Aufnahme in abgemessenen kleinen Mengen. Im Sinne dieser Verordnung sind „Nährstoffe“ nur Vitamine und Mineralstoffe, einschließlich Spurenelemente. (Der Begriff „Nährstoff“ wird im allgemeinen Verständnis jedoch weiter gefasst, wenn er auf andere Lebensmittel und damit kein Nahrungsergänzungsmittel im Sinne der NemV bezogen wird, so wie u. a. im Codex Alimentarius.) Die erlaubten Inhaltsstoffe sind in Anhang 1 der NemV aufgeführt, so dass sie nach den Maßgaben der Absätze 2 und 3 verwendet werden dürfen. Die Verwendung „sonstiger Stoffe mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung“ ist im Gegensatz zu den Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen nicht in der NemV oder der Richtlinie 2002/46/EG definiert. Allerdings wird ein Hinweis in Erwägungsgrund 6 zur RL 2002/46/EG gegeben. Demnach können Nahrungsergänzungsmittel eine breite Palette von Nährstoffen und anderen Zutaten

enthalten, unter anderem, aber nicht ausschließlich, Vitamine, Mineralstoffe, Aminosäuren, essentielle Fettsäuren, Ballaststoffe und verschiedene Pflanzen und Kräuterextrakte. Demzufolge können solche „sonstige Stoffe“ Einzelstoffe oder Stoffgemische sein, die aus Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen gewonnen oder chemisch synthetisiert werden. Es ist jeweils im Einzelfall zu überprüfen, ob sich das Erzeugnis mit/ aus diesen Stoffen im Einklang mit den jeweiligen Rechtsvorschriften befindet. So sind in Deutschland bestimmte zu ernährungsphysiologischen Zwecken verwendete Stoffe den Zusatzstoffen gleichgestellt. Sie unterliegen damit dem Verbotsprinzip mit Erlaubnisvorbehalt und dürfen bei der Herstellung von Lebensmitteln nur dann verwendet werden, wenn sie ausdrücklich durch Rechtsvorschriften für den jeweiligen Zweck zugelassen sind. Nach Art. 4 Abs. 8 der RL 2002/46/EG soll die Kommission dem Europäischen Parlament und dem Rat bis spätestens zum 12.07.2007 einen Bericht über die noch nicht geregelten Nährstoffe und sonstigen Stoffe unterbreiten. Dies soll entsprechende gesetzgeberische Aktivitäten erleichtern und die Harmonisierung des europäischen Rechts weiter fördern [BLL, 2007 (online)]. Bislang liegt ein solcher Bericht nicht vor, und es gelten jeweils die nationalen lebensmittelrechtlichen Vorschriften. Eine Höchstmengenregelung bezüglich der möglichen Inhaltsstoffe wie Vitamine oder Aminosäuren sowie für pflanzliche Stoffe fehlt gänzlich und ist bis dato gesetzlich nicht geregelt. Für eine solche Regelung ist zu beachten, dass die Dosierungen unbedenklich sein müssen und nicht über eine ernährungsphysiologische Wirkung hinausgehen dürfen (aufgrund der Abgrenzung zum Arzneimittel – s.u.).

Nach § 4 NemV ist die LMKV anzuwenden, die für Lebensmittel insbesondere Vorgaben über die Angabe des Verzeichnisses der Zutaten, des Mindesthaltbarkeitsdatums etc. angibt. Demnach sind für ein Nahrungsergänzungsmittel, welches gewerbsmäßig in einer Fertigpackung in den Verkehr gebracht wird, bestimmte Angaben vorgeschrieben. Dazu gehören die Namen und Kategorien von Nährstoffen oder sonstigen Stoffen, die für das Erzeugnis kennzeichnend sind. Eine Charakterisierung dieser Stoffe ist ebenfalls zulässig. Darüber hinaus anzugeben ist die empfohlene (tägliche) Verzehrsmenge in Portionen des Erzeugnisses. Dabei ist sowohl eine absolute Mengenangabe als auch die prozentuale vorgegeben, wobei sich die prozentuale Vorgabe auf die in der Nährwert-Kennzeichnungs-Verordnung (NKV) festgelegten Referenzwerte bezieht. Ebenso sollen verpflichtend auf dem Etikett Hinweise wie z.B. „Die angegebene empfohlene tägliche Verzehrsmenge darf nicht überschritten werden“ aufgeführt werden. Die Anzeigepflicht nach § 5 NemV zeigt die Erforderlichkeit auf, dass beim ersten Inverkehrbringen eines Nahrungsergänzungsmittels das entsprechende Etikett dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) anzuzeigen ist. Ebenso ist beim BVL ein Antrag zu stellen, falls ein Hersteller beabsichtigt, eine neuartige Lebensmittelzutat in Nahrungsergänzungsmitteln zu verwenden.

Nahrungsergänzungsmittel liegen häufig in einem Grenzbereich zwischen Lebensmittel und Arzneimittel. Dabei sind Arzneimittel Erzeugnisse, die insbesondere dazu bestimmt sind, Krankheiten, Leiden, krankhafte Beschwerden oder Körperschäden zu lindern, zu heilen, zu verhüten oder zu erkennen. Auch können diese die Beschaffenheit, den Zustand oder die Funktion des Körpers oder seelischer Zustände beeinflussen. Arzneimittel unterliegen dem Arzneimittelgesetz (AMG) und sind nur verkehrsfähig, wenn sie zugelassen werden. Diesbezüglich dürfen Nahrungsergänzungsmittel nicht als Arzneimittel aufgemacht werden oder auf dem Etikett/den beiliegenden Informationen Aussagen enthalten, die sich auf die Beseitigung, Linderung oder Verhütung von Krankheiten beziehen. Die Einstufung und rechtliche Beurteilung zwischen NEM und Arzneimittel unterscheidet sich in verschiedenen Ländern teilweise deutlich. Auf dem amerikanischen Markt sind z.B. Produkte erhältlich, die nach deutschem Recht Arzneimittel und keine Nahrungsergänzungsmittel wären. Am 1. Juli 2007 trat die neue „Health-Claims-Verordnung“ in Kraft (VO EG Nr. 1924/2006). Damit werden Werbeaussagen über Nahrungsergänzungsmittel geregelt. Nicht zulässig sind hierbei, ähnlich wie für andere Lebensmittel, krankheitsbezogene Aussagen und Indikationen (§ 12 LFGB).

#### 1.8.1 Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Phytoestrogenen

Phytoestrogene, insbesondere Isoflavone mit estrogenen Wirkung sind Bestandteile von Nahrungsergänzungsmitteln, welche vor allem für Frauen in der Menopause ausgelobt sind. Dabei handelt es sich größtenteils um Isoflavone aus Soja (*Glycine max* L.) oder Soja-Extrakten und darüber hinaus um Präparate mit der Basis auf Rotklee-Extrakten (*Trifolium pratense* L.) oder daraus isolierter Isoflavone. Weitere Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Phytoestrogenen sind ebenfalls auf dem Markt erhältlich, spielen jedoch eher eine untergeordnete Rolle. Dazu gehören einerseits Präparate mit Extrakten aus den Bohnen oder Wurzeln der Kudzu-Pflanze (*Pueraria lobata*). Die NEM auf dieser Grundlage sollen zur Rauchentwöhnung beitragen und Entzugerscheinungen sowie das gesteigerte Verlangen nach Nikotin unterbinden. Andererseits handelt es sich dabei um Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Resveratrol. Diese werden als „Antiaging-Mittel“ vermarktet und werben u.a. mit der antioxidativen Wirkung dieses Stilbens. Zurzeit sind keine Präparate mit angereicherten oder isolierten Lignan auf dem Markt erhältlich, obwohl diese Gruppe der Phytoestrogene in vielen Lebensmitteln vorhanden sind.

Das größte wirtschaftliche Interesse besitzen die Isoflavone, weshalb in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Soja oder Rotklee liegt. Diese Präparate sind in Apotheken, Reformhäusern, Drogerien, im Internet, sowie teilweise in Supermärkten frei verkäuflich zu erwerben. Aufgrund dessen sollten diese Präparate eine



gesundheitliche Unbedenklichkeit aufweisen, da mit verstärkter Selbstmedikation ohne fachliche Beratung zu rechnen ist. Durch die entsprechenden Werbeanzeigen auf den Etiketten dieser Präparate, den Umverpackungen oder entsprechender Zeitungswerbung, werden diese als „natürlich“, „unbedenklich“, „nebenwirkungsfrei“ und „wirkungsvoll“ beschrieben. Darüber hinaus erfolgen häufig gesundheitsbezogene Auslobungen, wonach diese Produkte „einen positiven Effekt auf die Knochen (Schutz vor Osteoporose) oder das Herz ausüben“, sie sollen ebenfalls „eine Prophylaxe für Brustkrebs bei Frauen/ respektive Prostatakrebs bei Männern“ bieten. Die einzelnen Isoflavonspektren von Soja und Rotklee sind in den entsprechenden Kapiteln (1.2.2 und 1.3.2) dieser Arbeit aufgeführt. Für die Herstellung von NEM basierend auf Soja gibt es bislang keine standardisierten Verfahren. Diesbezüglich ist davon auszugehen, dass die verschiedenen Präparate sich nicht nur in ihrem Gehalt an Isoflavonen unterscheiden, sondern auch in ihren unterschiedlichen Begleitmatrices und Formulierungen. So ist es durchaus denkbar, dass in einigen Präparaten die in Soja enthaltenen Saponine ebenfalls in das fertige NEM eingebracht werden, woraus durch die zusätzlichen Wirkkomponenten eine geänderte biologische Aktivität resultieren kann. Außerdem werden unterschiedlichste Stoffe wie Vitamine oder Pflanzenöle den Nahrungsergänzungsmitteln beigemischt, was einen ähnlichen Effekt verursachen kann und wodurch die Vergleichbarkeit der einzelnen Präparate nicht mehr unmittelbar gegeben ist. Die Hersteller geben zumeist nur einen Summenwert der enthaltenen Isoflavone an, äußerst selten sind Angaben über die Gehalte der individuellen Isoflavone in dem entsprechenden Produkt, sowie zu dessen vorliegender Konjugationsform. Bei Präparaten, welche auf Rotklee basieren, werden häufig nur Angaben über die Menge des eingesetzten Extraktes aufgeführt, jedoch keine Angaben zu dem entsprechenden Isoflavongehalt als solchen. Darüber hinaus sind Präparate auf der Basis von Rotklee schwer zu charakterisieren, da bei ihnen eine Vielzahl von Isoflavonen vorliegt, die sich je nach den jeweiligen Erntebedingungen sowie der darauf folgenden Extrakterstellung ändern kann. Bislang stehen die meisten Isoflavone aus Rotklee nicht als Referenzmaterialien zur Verfügung und bis dato fehlen noch viele Daten, die für eine biologische Evaluierung (z.B. die Bioverfügbarkeit) oder für eine Empfehlung bezüglich der Verzehrsmenge erforderlich sind [Wuttke et al., 2002b].

Die empfohlene tägliche Dosis von Isoflavonen ist seitens der Hersteller sehr unterschiedlich und eine allgemein gültige Empfehlung gibt es bislang nicht. Diskutiert wird für Soja eine empfohlene Menge, wie sie mittels einer traditionellen Ernährung aufgenommen werden kann (s. Kapitel 1.1.3). Isoflavone besitzen im Vergleich zu vielen anderen Flavanoiden eine relativ hohe Bioverfügbarkeit. Dabei haben die begleitende Lebensmittelmatrix sowie die vorliegende Konjugationsform einen Einfluss [De Pascual-Teresa et al., 2006; Rüfer et al., 2008].

Einige Studien weisen auf mögliche nachteilige Effekte durch hoch dosiert zugefügte Mengen an Isoflavonen hin (vgl. Kapitel 1.1.5.8) [Krebs et al., 2004; Wuttke et al., 2007], weshalb eine rechtliche Überprüfung und Regelung der jeweiligen Isoflavonkonzentrationen in Hinblick auf den im Lebensmittelrecht verankerten Gesundheitsschutz notwendig und sinnvoll erscheint. Die DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM) hat diesbezüglich eine Stellungnahme mit dem Titel „Isoflavone als Phytoestrogene in Nahrungsergänzungsmitteln und diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke“ verfasst [SKLM, 2007]. Darin wird die gesundheitliche Unbedenklichkeit von Isoflavonen neu bewertet. In ihrer Stellungnahme konnte die Senatskommission aufgrund von wissenschaftlichen Untersuchungen sich nicht für eine Unbedenklichkeit aussprechen. Dies wird in der Hauptsache mit zwei Punkten begründet. Einerseits wurde das toxikologische Potential der entsprechenden Präparate und isolierten Isoflavone bislang nicht hinreichend untersucht, um eventuell nachteilige Wirkungen auf die menschliche Gesundheit sicher ausschließen zu können. Andererseits unterscheiden sich die verschiedenen, auf dem Markt befindlichen NEMs sehr stark voneinander, was sich in der Dosierung, der Zusammensetzung der einzelnen Isoflavone sowie in der Begleitmatrix zeigt. Bislang gibt es z.B. keine gesetzlichen Höchstmengen für den Gehalt an Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln.

Für die Bestimmung von Höchstmengen für Phytoestrogene bzw. Isoflavone in Nahrungsergänzungsmitteln ergeben sich national einige Anhaltspunkte aus Vorschlägen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR). Für die Bewertung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit bzw. des gesundheitlichen Nutzens von Isoflavonen als „sonstige Stoffe“ (s. unter 1.8) fehlen noch wissenschaftlich begründete Beurteilungskriterien. Gleichwohl werden diese Stoffe insbesondere in Nahrungsergänzungsmitteln aber auch in Lebensmitteln verwendet. Diese Situation gab dem BfR Anlass für die Erarbeitung einer Stellungnahme. Deshalb hat das BfR am 12. August 2007 ein überarbeitetes Gutachten zur Bewertung von Isoflavonen aus Rotklee und Soja mit dem Titel „Isolierte Isoflavone sind nicht ohne Risiko“ veröffentlicht. Dieses Gutachten wurde am 29. Oktober 2007 nochmals aktualisiert [BfR, 2007]. Die Quintessenz dieses Gutachtens ist, dass die Sicherheit von Produkten mit isolierten Isoflavonen auf Soja- und Rotkleebasis nicht ausreichend belegt sei und die nachgesagten positiven Wirkungen von Isoflavonen bei klimakterischen Beschwerden nicht hinreichend gesichert seien. Das BfR und das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL) sind beide der Ansicht, dass die wissenschaftliche Diskussion zu diesem Thema noch nicht abgeschlossen sei und weitere Studien ausgewertet werden müssen, bevor eine „gesicherte“ und unschädliche Höchstmenge festgesetzt werden kann [BLL und BMVEL, 2007 (online)]. Die SKLM kommt in ihrer Stellungnahme zu Isoflavonen zu einer ähnlichen Schlussfolgerung und untermauert



den Forschungsbedarf zur Verbesserung der Datenlage für eine entsprechende Risikobewertung und Empfehlung.

Einzelne Punkte dieser Ausführungen werden in der Diskussion über die Quantifizierung von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln weiter aufgegriffen und vertieft (s. 3.4.1.6). Dabei wird auch auf einen weiteren Eckpfeiler des Lebensmittelrechts eingegangen - den Täuschungsschutz.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Phytoestrogene, insbesondere die Isoflavone, stellen aus ernährungsphysiologischer Sicht eine interessante Stoffgruppe dar. Aufgrund einer Vielzahl von epidemiologischen Studien werden Isoflavonen eine Reihe gesundheitsfördernder Wirkungen zugeschrieben, weshalb verschiedene Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Soja und Rotklee frei verkäuflich erhältlich sind. Bei den aktuellen Forschungsergebnissen gibt es allerdings große Wissenslücken hinsichtlich der Resorption, der Bioverfügbarkeit und des Metabolismus von Isoflavonen. Insbesondere gilt dieses für die Isoflavon-Aglykone aus Rotklee. Das toxikologische Potential dieser Isoflavone ist noch nicht hinreichend untersucht worden, um negative (Langzeit-)Wirkungen gänzlich ausschließen zu können. Die benötigten Standardverbindungen für entsprechende biologische Evaluierungen oder zur Quantifizierung des Gehaltes an Isoflavonen in z.B. Nahrungsergänzungsmitteln sind größtenteils kommerziell nicht erhältlich. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war daher die Isolierung von Isoflavonen aus Soja und Rotklee, welche nach der Identifizierung und Charakterisierung als Referenzmaterialien zur Verfügung gestellt werden können. Dazu sollten modernste chromatographische Methoden angewendet werden, insbesondere die High-speed Countercurrent Chromatography (HSCCC). Darüber hinaus sollten Methoden zur Quantifizierung des Isoflavon-Gehaltes in Nahrungsergänzungsmitteln mit Soja- und Rotklee-Zusatz erstellt werden. Die isolierten Standards dienten dabei als Referenzen für die qualitative Analyse und zur externen Kalibrierung bei der Gehaltsbestimmung. Dazu wurde eine geeignete Probenaufarbeitung für die verschiedenen Matrices entwickelt. Tests auf Antioxidativität und Cytotoxizität der hergestellten Pflanzenextrakte und einiger Reinverbindungen wurden ebenfalls durchgeführt, um die Charakterisierung dieser Verbindungen zu vervollständigen und einen Einblick in deren biologischen Aktivität zu gewinnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls Referenzmaterialien aus *Iris germanica* L. isoliert, wobei insbesondere die toxikologisch relevanten Isoflavone mit Methylendioxystruktur gewonnen werden sollten. Über die toxikologischen Eigenschaften, die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus dieser Isoflavone ist bislang nur sehr wenig bekannt, weshalb die Isolierung und Bereitstellung von Standardmaterialien von zentraler

Bedeutung ist. Weitere Phytoestrogene wie beispielsweise Resveratrol aus Weintraubentrester oder eines der wenigen C-glykosidisch gebundenen Isoflavone, das Puerarin, konnten ebenfalls isoliert werden. Diese Substanzen sind genauso in das wissenschaftliche Interesse gerückt und Methoden für ihre Isolierung sind dringend erforderlich.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Analytik von Isoflavonen

##### 3.1.1 Nasschemische Methoden

Zur Untersuchung der Struktur eines vorliegenden Isoflavons wurden früher oftmals nasschemische Methoden verwendet. Dazu wurden die Isoflavone zunächst in ihre Aglykon-Form überführt, indem mit 4%iger wässriger Kalilauge unter Rückfluss hydrolysiert wurde. Nach Zugabe von Phosphorsäure wurde eine Mikro-Wasserdampfdestillation vorgenommen, wobei als Vorlage eine 5%ige Quecksilber-(II)-Chlorid-Lösung diente. Daraufhin kam es zur Spaltung der Isoflavonstruktur und Ameisensäure wurde frei [Grasmeier, 1959]. Es erfolgt die Aufspaltung des Chromongerüsts zum Aryl-Alkylketon. Heutzutage wird allerdings auf die Bildung von schwermetallhaltigem Abfall verzichtet und auf schonendere Methoden zurückgegriffen (vgl. Kapitel 3.1.2 und 3.1.3).

Ein Hinweis bzw. gegebenenfalls sogar die Identifizierung von einigen Isoflavonen kann anhand der typischen UV-Spektren erfolgen (s.u.). Die Zuordnung einer Verbindung zu der Stoffklasse der Isoflavone kann vorgenommen werden, da durch die entsprechenden Absorptionsmaxima unterschieden werden kann, ob es sich bei der untersuchten Verbindung um eine 2- oder 3-Chromanverknüpfung des Phenylrings C handelt [Markham, 1982]. Deshalb werden die UV-Spektren von einigen der isolierten Isoflavone in Kapitel 3 an den entsprechenden Stellen diskutiert.

Mittels Photometrie ist es möglich, auf das Substitutionsmuster des entsprechenden Isoflavons zu schließen. Dabei kommt es zu einer bathochromen Verschiebung beim Vorliegen einer Hydroxylgruppe am C5 oder C7 im Molekül. Dazu wird eine ethanolische Lösung des zu testenden Isoflavons hergestellt, mit ethanolischer Aluminium-(III)-Chlorid-Lösung bzw. ethanolischer Natriumacetatlösung versetzt und photometrisch in einer Quarzküvette gegen einen Blindwert vermessen. Unter Zugabe der Natriumacetatlösung erfolgt eine bathochrome Verschiebung des ersten UV-Maximums ( $\lambda = 260\text{-}272\text{ nm}$ ) bei

denjenigen Verbindungen, welche eine Hydroxylgruppe am C7 tragen. Ein ähnlicher Effekt ist unter Zugabe des Aluminium-(III)-Chlorids zu beobachten, wobei die Verschiebung des  $UV_{max}$  in diesen Fällen auf das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe am C5 im Molekül hindeutet.

Das Isoflavon Biochanin A bildet mit Eisen-(III)-Chlorid-Lösung eine rote Farbe, die solange bestehen bleibt, wie das Isoflavon in Überschuss vorliegt. Bei weiterer Zugabe von Eisen-(III)-Chlorid verfärbt sich die ethanolische Lösung grün-grau. Wird Lauge zugegeben, so tritt die rote Farbe erneut auf. Liegt ein Überschuss an Säure vor, so verfärbt sich die Lösung erneut grün. Dieser Effekt wurde erstmals von Pope und Wright [1954] beobachtet. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Verfärbung der ethanolischen Lösungen von farblos zu einem schwachen Rosé bei den Verbindungen Genistin, Biochanin A und Prunetin beobachtet werden. Bei allen diesen Verbindungen ist die C5 Position des Moleküls mit einer Hydroxylgruppe substituiert, so dass es zu einem Chelatkomplex (Ringbildung) zwischen dem Eisen-(III)-Chlorid und der Hydroxylgruppe sowie der benachbarten Carbonylgruppe am C4 des jeweiligen Isoflavon-Moleküls kommen kann [Markham, 1982].

Mittels des Gibbs-Tests kann ermittelt werden, ob es eine unsubstituierte Position in para-Stellung zu einer freien Hydroxylgruppe in der Isoflavon-Struktur gibt. Dabei kann eine weitere Absorptionsbande zwischen 500 und 700 nm durch ein blaues Indophenol-Chromophor erhalten werden, welche sich innerhalb dieses Tests ausbildet [Lins Mesquita et al., 1968].

### 3.1.2 HPLC-Untersuchungen und HPLC-(ESI)-MS-Kopplung

In diesem Kapitel werden die hauptsächlich verwendeten Methoden zur Analytik von Isoflavonen erklärt. Diese sind die Hochdruckflüssigkeitschromatographie sowie massenspektrometrische Analysen. Mit diesen Untersuchungsmethoden wurden Extrakte aus Soja, Rotklee und Iris untersucht, um einen Überblick über die phytochemische Zusammensetzung der in dieser Arbeit untersuchten Pflanzenmaterialien zu erhalten.

#### 3.1.2.1 Soja

Von verschiedenen Sojamehlen oder -flocken wurden jeweils Extrakte hergestellt, welche mittels HPLC über DAD-Detektion auf die enthaltenen Isoflavone hin untersucht wurden. Die Extrakte wurden einerseits über Festphasenextraktion (XAD-7 Adsorberharz, s.u.) hergestellt und andererseits über einen Auszug mit Ethylacetat (vgl. Kapitel 4.2.8 und 4.2.9). Die chromatographischen Bedingungen wurden dabei an die Zusammensetzung des Sojas angepasst, was in einer Basislinien-Trennung der verschiedenen Isoflavone resultierte. Die

drei verschiedenen Isoflavone des Sojas (Genistin, Daidzin und Glycitin) mit ihren entsprechenden Konjugationsformen konnten mit dem entwickelten HPLC-System (s. Kapitel 4.2.4) gut voneinander getrennt sowie detektiert werden. Das entwickelte System ist daher für einen weiten Polaritätsbereich nutzbar; mit ihm können sowohl die stark polaren malonylierten Isoflavone als auch die vergleichsweise unpolaren Aglykone detektiert werden. Darüber hinaus ist es ebenfalls möglich, von der Polarität her ähnliche Isoflavone, wie z.B. Konstitutionsisomere, zu trennen. Bei der Analyse der unterschiedlichen Soja-Extrakte ergaben sich wenige Unterschiede zwischen dem XAD-7-Extrakt und dem Ethylacetat-Extrakt. Beide Methoden waren deshalb für die Herstellung eines geeigneten Extraktes zur Isolierung von Standardmaterialien geeignet. Innerhalb dieser Untersuchung der verschiedenen Extrakte (Sojamehl oder Sojaflocken) wurden lediglich die natürlichen Schwankungsbreiten innerhalb der Zusammensetzung des Sojas festgestellt (vgl. Kapitel 1.2.1). Ein typisches Chromatogramm der HPLC-Analyse eines XAD-7-Extraktes ist in Abbildung 32 dargestellt. Die hierfür verwendete Methode und das Material sind unter Kapitel 4.1.2 sowie 4.2 aufgeführt.

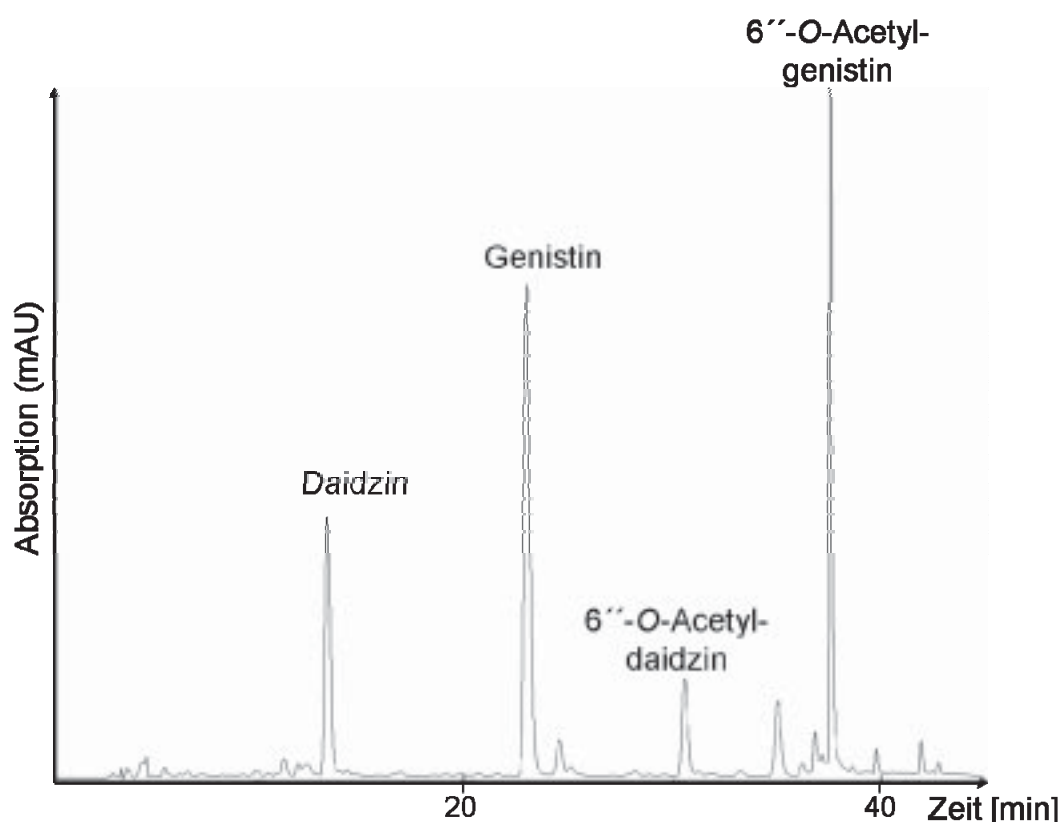


Abbildung 32: HPLC-Chromatogramm eines XAD-7-Extraktes aus Soja. Die Detektionswellenlänge beträgt  $\lambda = 254$  nm.

Die Hauptisoflavone des oben dargestellten XAD-7-Extraktes sind deutlich voneinander getrennt, was gut im HPLC-Chromatogramm sichtbar wird. In diesem Extrakt ist Genistin das

Majorisoflavin, die Isoflavone Daidzin und 6''-O-Acetyl-genistin sind ebenfalls in größeren Mengen enthalten. 6''-O-Acetyl-daizdin liegt in geringerer Konzentration vor. In diesem Extrakt konnten keine malonylierten Verbindungen detektiert werden, was durch massenspektrometrische Analysen bestätigt werden konnte. Ebenso wurden Aglykone nur in geringen Spuren detektiert, was bedeutet, dass diese für die quantitative Zusammensetzung des Extraktes eine deutlich untergeordnete Rolle spielten. Ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte das acetylierte Derivat von Glycitin. Dies steht im Einklang mit den Daten aus der Literatur [u.a. Wang und Murphy, 1994a], da dieses Isoflavon nur in geringen Mengen in Soja enthalten ist. Unter Verwendung einer weiteren Probe aus Sojaflocken zur Herstellung eines Extraktes konnte ein ähnliches HPLC-Chromatogramm erhalten werden (vgl. Abbildung 33). Dabei konnte in diesem Extrakt ebenso das Isoflavon Glycitin nachgewiesen werden, welches zumeist als Minorkomponente in Soja vorkommt.

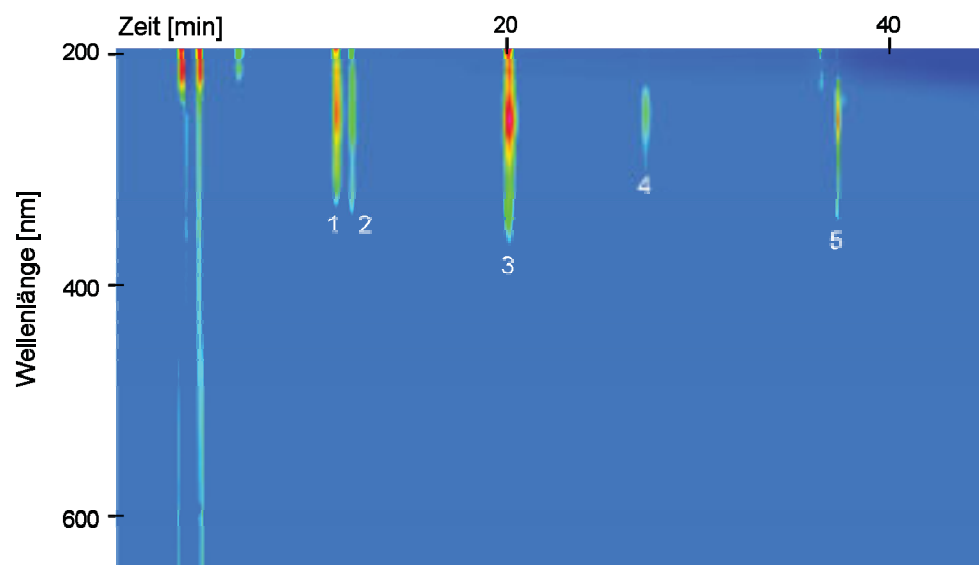


Abbildung 33: HPLC-DAD-Chromatogramm eines Extraktes von extrahierten Sojaflocken.

Im oben dargestellten HPLC-DAD-Chromatogramm sind im Wesentlichen fünf Peaks ersichtlich, darunter zwei Majorkomponenten (Peaks 3 und 1). Dieses sind Genistin (Peak 3) sowie Daidzin (Peak 1); die weiteren enthaltenen Isoflavone Glycitin (2), 6''-O-Acetyl-genistin (4) und 6''-O-Acetyl-daizdin (5) liegen in geringeren Konzentrationen vor. Für die vorliegenden Isoflavone werden folgende Retentionszeiten erhalten:

Tabelle 11: Peak-Identifizierung im HPLC-DAD-Chromatogramm eines Sojaflockenextraktes.

| Peak- Nr.               | 1       | 2        | 3        | 4                         | 5                        |
|-------------------------|---------|----------|----------|---------------------------|--------------------------|
| Retentionszeit<br>[min] | 11,4    | 12,2     | 20,2     | 27,2                      | 37,1                     |
| Identifizierung:        | Daidzin | Glycitin | Genistin | 6''-O-Acetyl-<br>genistin | 6''-O-Acetyl-<br>daidzin |

Das Isoflavon Genistin enthält eine Hydroxylgruppe mehr als Daidzin und ist damit polarer. Deshalb müsste es an einer RP-18-Phase unter der Verwendung des polaren Gradienten aus dem Gemisch Acetonitril und 0,1%iger Ameisensäure theoretisch früher eluieren als Daidzin. Im vorliegenden Beispiel ist dieses jedoch umgekehrt. Erklärt werden kann diese verstärkte Retention von Genistin durch die Fähigkeit dieses Moleküls, einen intramolekularen Ringschluss durch Wasserstoffbrückenbindung zu bilden, wodurch die Polarität des Moleküls herabgesetzt wird (s. Abbildung 34). Diese intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung kann sich zwischen der Hydroxylgruppe in 5-Position des Moleküls und der Ketogruppe des C-Ringes an 4-Position ausbilden [Setchell et al., 1987b]. Ein ähnlicher Effekt tritt ebenso bei dem Isoflavon Biochanin A aus Rotklee auf, welches im Vergleich zu Genistin in der 4'-Position eine Methoxy- statt Hydroxylgruppe trägt und zu einem späteren Zeitpunkt eluiert.

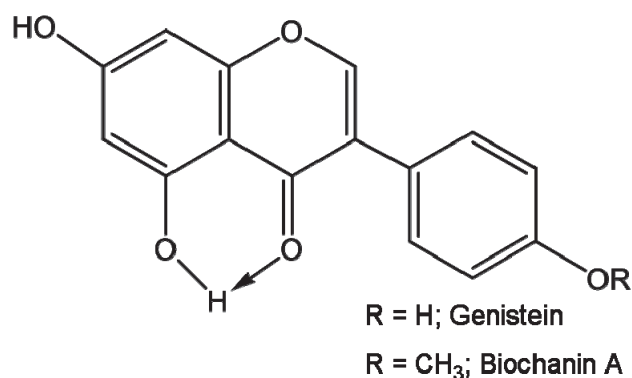


Abbildung 34: Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung bei Isoflavonen.

Am Beispiel des Chromatogramms in Abbildung 33 kann deutlich gezeigt werden, dass dieser Soja-Extrakt keine weiteren UV-aktiven Substanzen enthält und sich durch die beschriebene Aufarbeitung weniger komplex zusammengesetzt ist und sich hierdurch für eine Trennung mittels Countercurrent Chromatography (s.u.) anbietet.

Das Beispiel der Trennung von Daidzin und Glycitin wird in Abbildung 35 dargestellt, wobei das Isoflavon Glycitin als Minorkomponente vorliegt. Beide Isoflavone unterscheiden sich zwar hinsichtlich ihrer Polarität, da Glycitin im Vergleich zu Daidzin eine zusätzliche Methoxygruppe an der Position C6 des A-Ringes aufweist. Die Trennung dieser beiden Isoflavone brachte jedoch aufgrund der quantitativen Zusammensetzung in den Extrakten ein Problem mit sich: Unter Verwendung anderer HPLC-Systeme eluiert das weniger konzentrierte Glycitin oftmals unter dem Peak von Daidzin, welches in wesentlich größeren Mengen vorliegt.

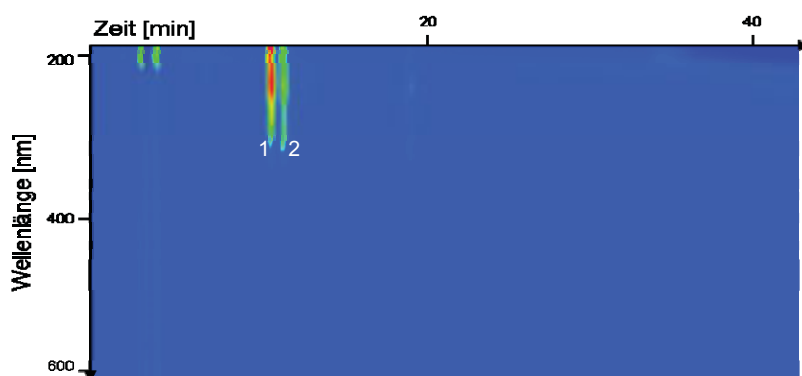


Abbildung 35: HPLC-DAD-Chromatogramm der Trennung von Daidzin und Glycitin aus Soja. [Fraktion 2 der Trennung von Soja-Isoflavonen (CCC-System 1; s. Abbildung 54)].

Das oben dargestellte HPLC-DAD-Chromatogramm zeigt die Trennung der beiden Isoflavone Daidzin (Peak 1) und Glycitin (Peak 2), wobei als Probe eine aus der präparativen Trennung mittels High-Speed Countercurrent Chromatography (s. 3.2.2.2) erhaltene Fraktion verwendet wurde. Die Bedingungen der HPLC-Methode konnten für die LC-(ESI)-MS-Läufe übernommen werden. Damit wurde die Identität der entsprechenden Isoflavone bestätigt, wobei die NMR-Daten der isolierten Reinsubstanzen (s.u.) einen weiteren Beweis dafür bieten. Bei einer Soja-Probe konnten in dem hergestellten Ethylacetat-Extrakt malonylierte Isoflavone nachgewiesen werden. Vermutlich wurden die entsprechenden Sojabohnen schonend geerntet und die Herstellung des vermarkteten Sojamehls erfolgte unter milden Bedingungen ohne starke Hitzeeinwirkung, so dass es zu keiner Decarboxylierung der an der Glucose befindlichen Malonsäuregruppe kam. Ein LC-MS-Lauf dieses Extraktes wird folgend dargestellt (vgl. Abbildung 36). Die Massenspektren dieser malonylierten Verbindungen sind separat unter Abbildung 37 aufgeführt. Deutlich ersichtlich wird hierbei, dass sich bei der verwendeten (ESI-)Ionisation entweder die gesamte Malonylglucose-Einheit absplattet, oder bei der Aufnahme eines MS<sup>2</sup>-Spektrums zunächst die Malonsäuregruppe fragmentiert und darauf folgend erst die Glucose (s. Abbildung 37).

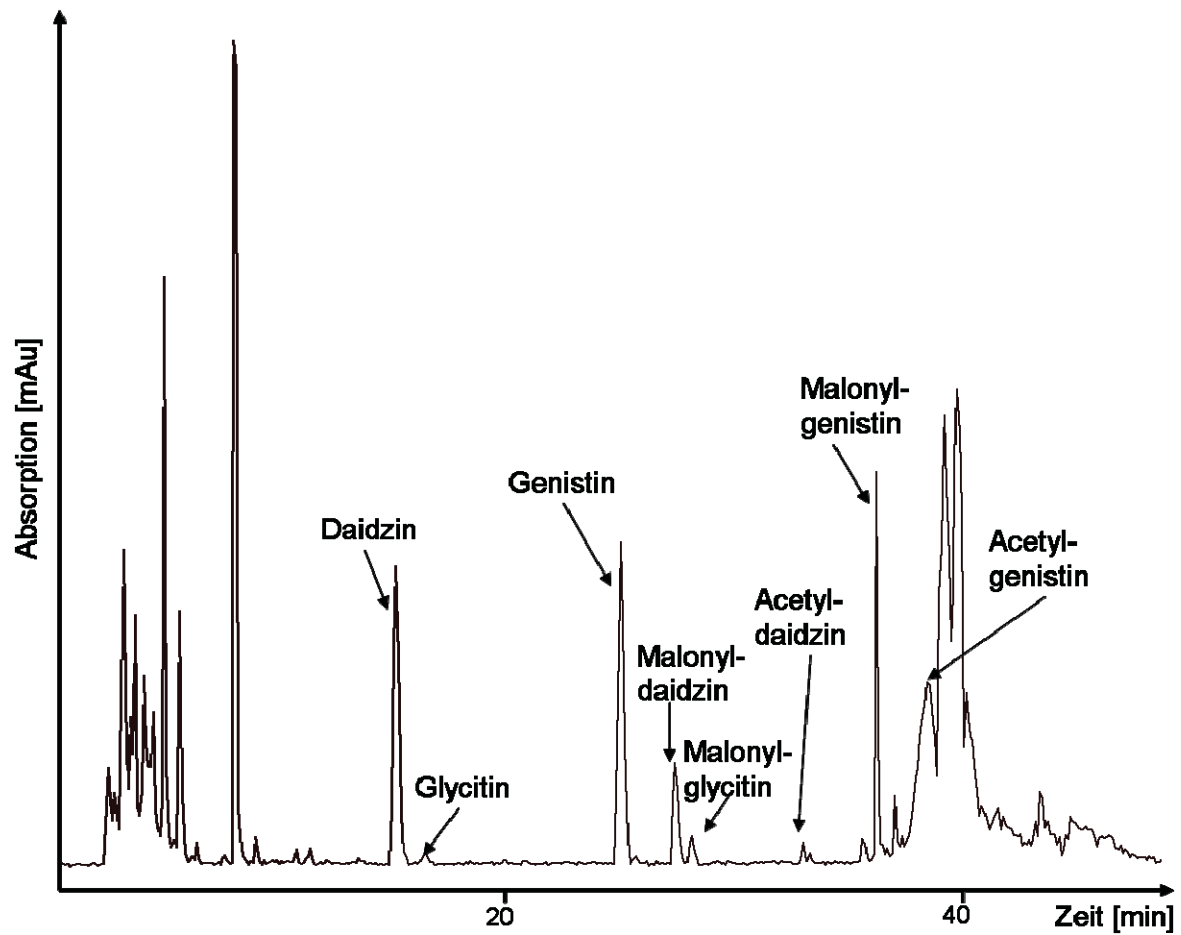


Abbildung 36: Totalionen-Chromatogramm eines Sojamehls nach schonender Aufarbeitung.

Das Sojamehl, dessen massenspektrometrische Analyse in der obigen Abbildung (Abbildung 36) aufgeführt ist, enthält die drei Isoflavone Genistin, Daidzin und Glycitin in ihren unterschiedlich konjugierten Formen. Dabei dominieren generell die Glucokonjugate. Die Aglykone sind eher als Minorkomponenten zu betrachten. Ebenso enthält der analysierte Extrakt die entsprechenden malonylierten Konjugate 6''-O-Malonyl-genistin, 6''-O-Malonyl-daidzin und 6''-O-Malonyl-glycitin (s. Abbildung 37).



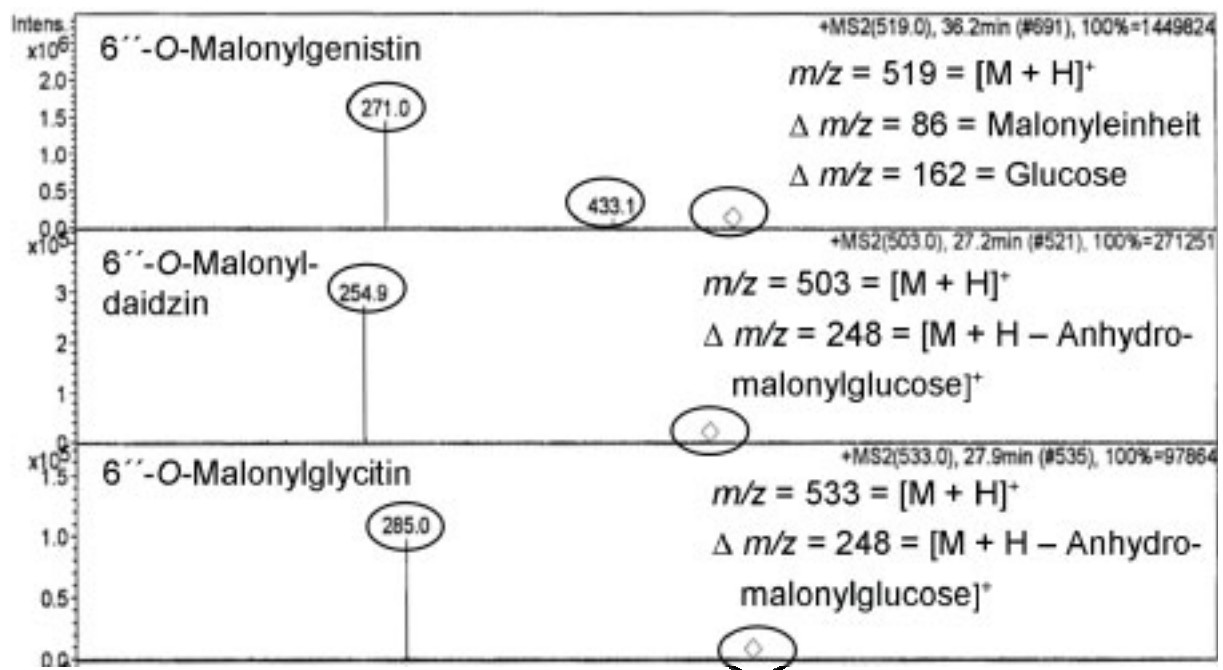


Abbildung 37: Massenspektren der malonylierten Isoflavone aus Soja.

Malonylierte Isoflavone konnten ebenfalls in einer Probe aus frisch geernteten Sojabohnen identifiziert werden, wobei das Malonyl-genistin überwiegt (s. Abbildung 38).

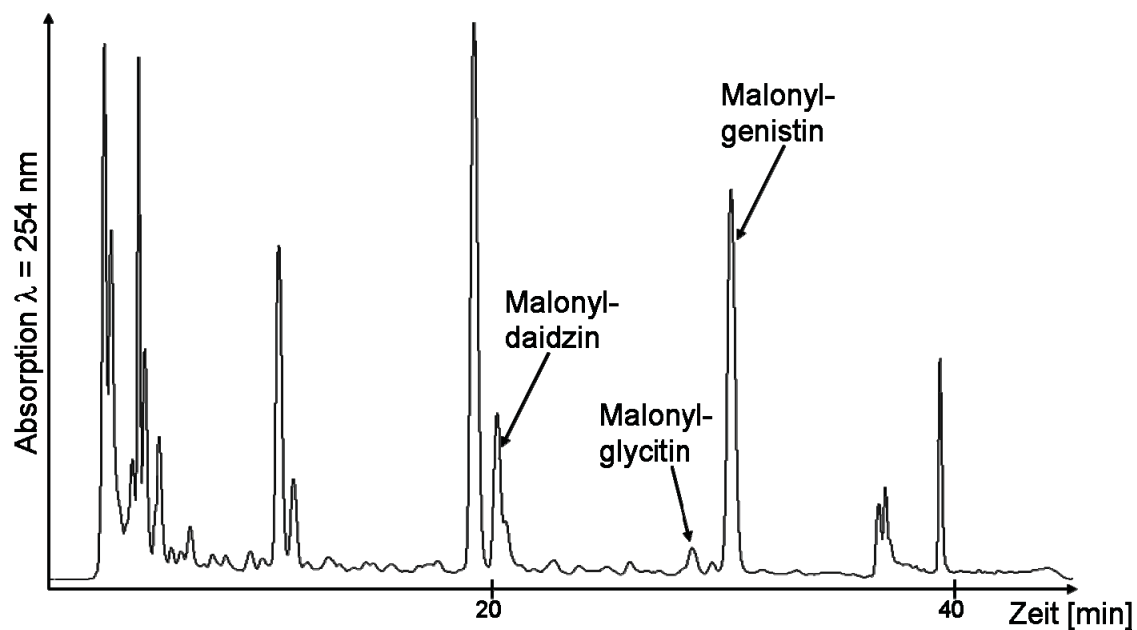


Abbildung 38: HPLC-Chromatogramm von frisch geernteten Soja-Bohnen.

### 3.1.2.2 Schwarzer Soja

Die Konzentration an Phytoestrogenen kann in unterschiedlichen Pflanzen stark variieren. Ebenso ist es möglich, dass sich der Gehalt innerhalb einer Pflanzenfamilie signifikant ändert. Franke et al. [1995] bestimmten den jeweiligen Isoflavon-Gehalt in verschiedenen Soja-Varietäten. Sojabohnen können ganz unterschiedliche Farben in ihrer Samenschale aufweisen. Weitläufig bekannt und kommerziell erhältlich sind die gelben oder geschälten Sojabohnen (welche ebenfalls eine gelbe Farbe aufweisen). Die Farbe der Schale kann stark variieren - von gelb, über grün, bis zu schwarz oder braun. In Abbildung 39 ist ein Foto der Schwarzen Sojabohne zu sehen, welche speziell auf japanischem Vulkanboden gezüchtet wurde. Die tiefschwarze Samenschale wurde für die Aufnahme dieses Fotos teilweise entfernt, auf diese Weise ist das Innere der dunkelgelben Bohne (ohne Schale) gut zu erkennen.

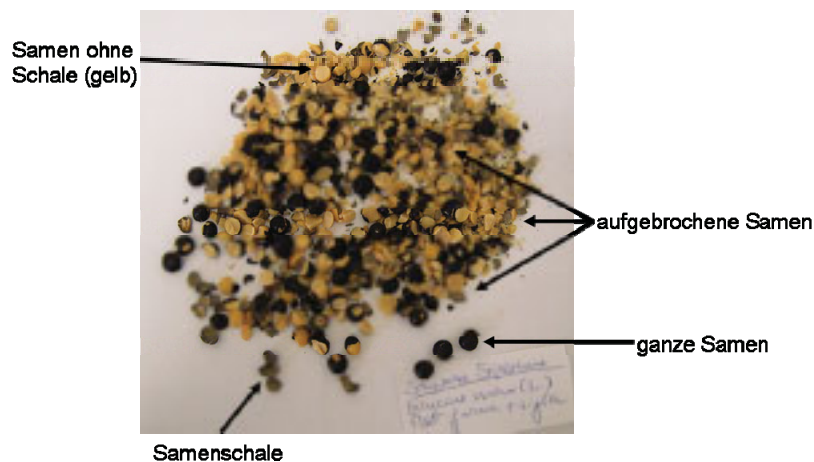


Abbildung 39: Schwarzer Soja (*Glycine max* (L.), Merr forma Nigra). Foto: Stürtz, 2007.

Verschiedene Pigmente sind für die Farbgebung der Epidermis der Sojabohne verantwortlich, wobei v.a. Chlorophylle und Anthocyane einen großen Anteil haben [Todd und Vodkin, 1993].

Die verwendete Soja-Varietät (Abbildung 39) sollte auf den Gehalt an Isoflavonen untersucht werden, um einen Vergleich mit der entsprechenden Zusammensetzung des in der vorliegenden Arbeit überwiegend verwendeten gelben Sojas ziehen zu können. In der folgenden Tabelle sind die modifizierten Werte aus der Literatur über den Vergleich beider Soja-Varietäten nach Franke et al. [1995] aufgeführt.

Tabelle 12: Varianz der Konzentration an Isoflavonen in gelben und schwarzen Sojabohnen (modifiziert nach Franke et al., 1995 und COT, 2003).

|                    | Isoflavon | Konzentration [mg/kg] |
|--------------------|-----------|-----------------------|
| Sojabohne          | Genistein | 18-1382               |
|                    | Daidzein  | 68-1006               |
| Schwarze Sojabohne | Genistein | 277-612               |
|                    | Daidzein  | 269-698               |

Die Schwarze Sojabohne wurde zur Analyse auf verschiedene Weisen aufgearbeitet. Einerseits wurde die ganze Bohne zermahlen, entfettet und mit Methanol extrahiert, um ein Screening über deren Inhaltsstoffe anfertigen zu können. Darauf folgend wurde mit diesem Extrakt eine Festphasenextraktion durchgeführt (vgl. 3.2.2.1), was zu einer Konzentrierung der enthaltenen Inhaltsstoffe führt. Im Falle der verwendeten Schwarzen Sojabohne wurde die Schale nach einer weiteren Aufarbeitung getrennt von dem Inneren der Bohne untersucht. Zum Abtrennen der Schalen wurden die harten Sojabohnen zunächst für einige Stunden in angesäuertem Wasser (dest. Wasser/Essigsäure im Verhältnis 19/1, V/V) aufgequollen. Die Schalen lösten sich dabei leicht vom gelben, inneren Samenkörper ab, woraufhin sie von den Samen entfernt und in Methanol/Essigsäure (19/1, V/V) gegeben wurden. Diese Schalen wurden mittels eines Ultraturrax zerkleinert und die entstandene zähe Lösung für mehrere Stunden gerührt, bevor der Extrakt filtriert und *in vacuo* aufkonzentriert und gefriergetrocknet wurde. Der lyophilisierte Extrakt wurde säulenchromatographisch weiter aufgearbeitet bevor er analysiert wurde (s. Abbildung 41). Mit dem Samen (Endosperm) der Schwarzen Sojabohne wurde genauso verfahren, jedoch wurde säurefrei gearbeitet, um einer möglichen Spaltung der enthaltenen Isoflavone entgegenzuwirken. Das Extrakt dieser Samen wurde für die weiteren Analysen verwendet (s.u.).

Die HPLC-Analyse der Schwarzen Sojabohne weist große Ähnlichkeiten mit der in der vorliegenden Arbeit im präparativen Maßstab verwendeten gelben Soja-Varietät auf. Die Majorisoflavone waren glucosidisch gebunden und der Anteil an Isoflavon-Aglykonen war

relativ gering. Eine LC-MS-Analyse gab über die Isoflavon-Zusammensetzung der Schwarzen Sojabohne weitere Informationen (vgl. Abbildung 40).

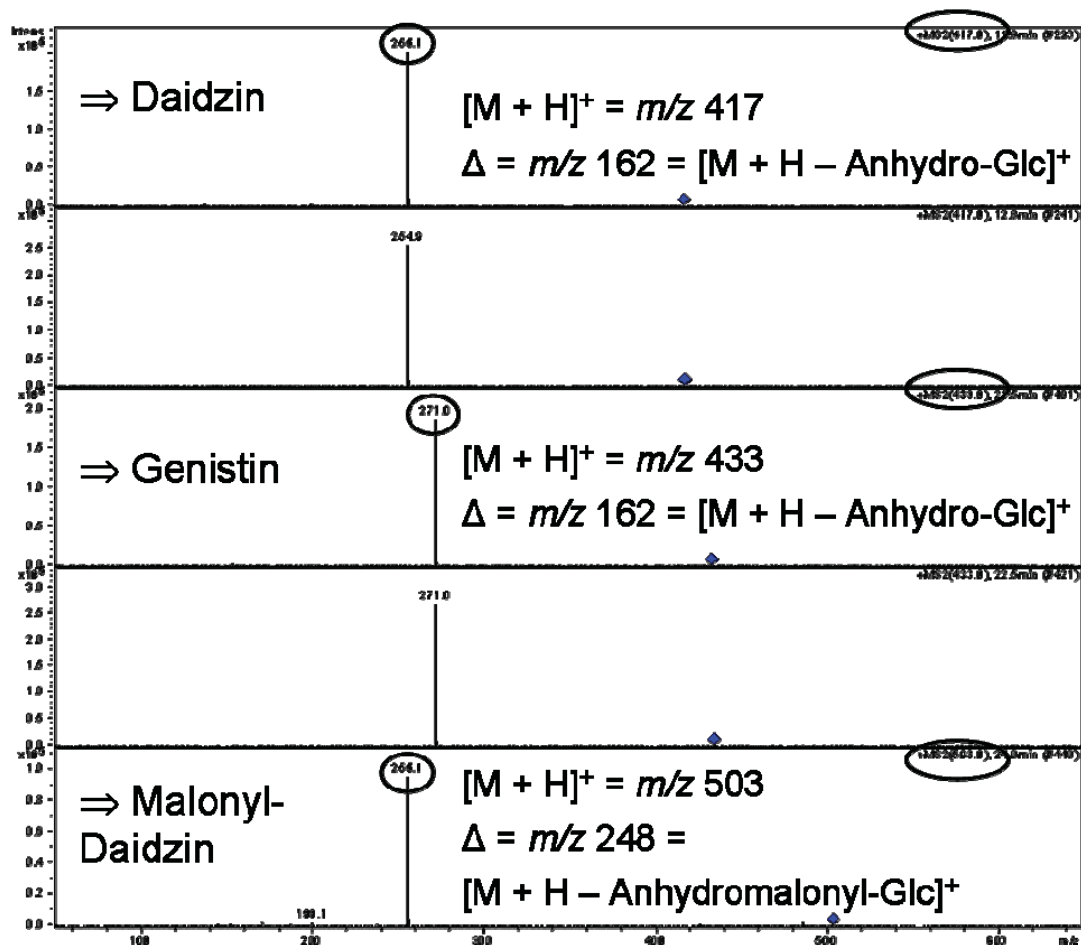


Abbildung 40: MS<sup>2</sup>-Spektren der relevanten Peaks der LC-MS-Analyse von Schwarzen Soja.

Die Hauptisoflavone des Sojas, Daidzin und Genistin, waren auch in dem untersuchten Schwarzen Soja als Majorisoflavone enthalten. Ebenso wurden teilweise malonylierte Derivate detektiert, wie z.B. Malonyl-Daidzin. Diese lagen jedoch in geringeren Konzentrationen vor als die Glykoside. Bei der massenspektrometrischen Analyse konnte das Isoflavon Glycitin nicht identifiziert werden.

Bei der HPLC-Analyse dieser Schwarzen Sojabohne wurde eine weitere Substanz mit einem Absorptionsmaximum von ca. 520 nm detektiert, welches sich deutlich vom Maximum der Isoflavone ( $\lambda \approx 260$  nm) unterscheidet. Verbindungen aus der Substanzklasse der Anthocyane haben hier ihr Absorptionsmaximum. Die Anthocyane (griechisch; anthos = Blüte; kyanos = blau) sind in vielen unterschiedlichen Früchten, Blättern und Blüten enthalten und bewirken oftmals deren typische Färbung. Diese kann von rot über violett und blau bis zu schwarz reichen. Die Anthocyane zählen zu den wichtigsten wasserlöslichen Pigmenten von Pflanzen, wo sie sich bevorzugt in den Randschichten ausbilden [Clifford,

2000]. Deshalb wurde der Extrakt der Schale der Schwarzen Sojabohne erneut mittels HPLC-DAD analysiert, wobei ein HPLC-System speziell für die Analytik von Anthocyanen verwendet wurde. Aufgrund der Retentionszeiten wurde vermutet, dass in der Schale das Anthocyan Cyanidin-3-glucosid enthalten ist. Unter Verwendung des Standardadditionsverfahrens konnte diese Annahme bestätigt werden, wobei die Analytlösung mit Cyanidin-3-Glucosid „gespiked“ wurde und lediglich ein Peak im aufgenommenen HPLC-Chromatogramm erhalten wurde. Die massenspektrometrische Analyse bestätigte das Vorliegen von Cyanidin-3-glucosid. Das Pseudomolekölion hatte eine Masse von  $m/z = 449 = [M + H]^+$  und fragmentierte im  $MS^2$  bei  $m/z = 287 [M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ , was von der Abspaltung der Glucose herrührte. Aufgrund der Retentionszeit handelte es sich dabei um das 3-Glucosid von Cyanidin [Hillebrand, 2004].

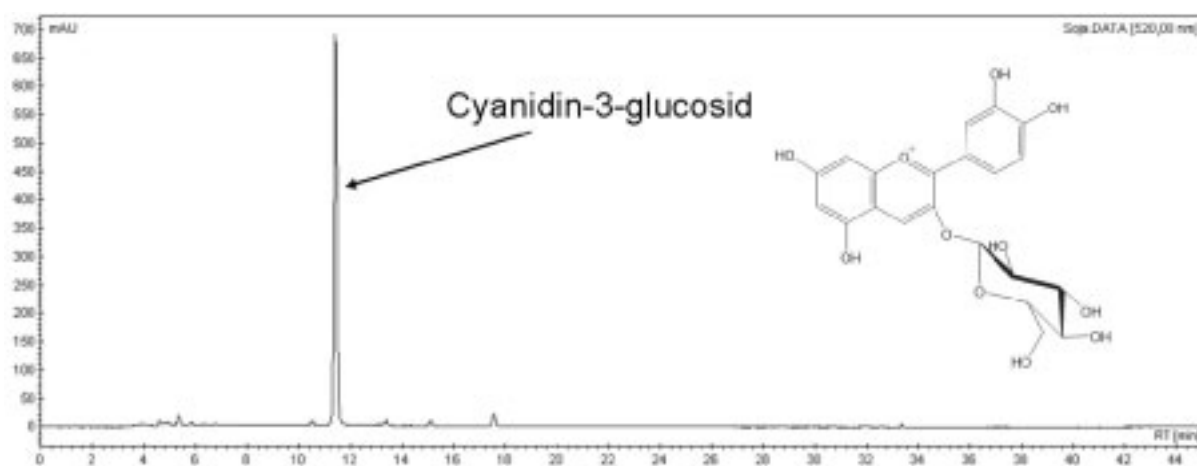


Abbildung 41: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus der Schale der Schwarzen Sojabohne. Detektiert wird bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 520 \text{ nm}$ .

In dem aus der Schale der Schwarzen Sojabohne hergestellten XAD-7-Extrakt ist das Anthocyan Cyanidin-3-glucosid in einer Reinheit von ca. 88% enthalten. Dabei wird sich auf die HPLC-DAD-Analyse bezogen und nicht auf die massenspektrometrischen Untersuchungen.

Todd und Vodkin [1993] untersuchten die Pigmentierung von verschiedenen Sojavarietäten sowie den Einfluss und die Akkumulierung von Proanthocyanidinen während der Entwicklung der Sojabohne. Zuerst wurde über das Vorkommen von Anthocyanen in der Epidermis der Sojabohne von Nagai [1921] berichtet. Verschiedene Anthocyane konnten bereits aus Schwarzem Soja isoliert und charakterisiert werden [Choung et al., 2001]. Dabei ist die jeweilige Zusammensetzung dieser Pigmente von der Sorte und den Anbaubedingungen abhängig [Yoshida et al., 1996]. Anthocyane weisen eine Reihe von protektiven Effekten und biologischen Funktionen mit potentielltem Nutzen für die menschliche Gesundheit auf; so besitzen sie u.a. eine hohe antioxidative Wirkung. Es besteht bezüglich einer

Supplementierung jedoch weiterhin Forschungsbedarf, u.a. über deren Metabolismus und weiteren biologischen Aktivitäten [Espín et al., 2007; Kong et al., 2003].

### 3.1.2.3 Rotklee

Rotklee wurde bereits von verschiedenen Forschungsgruppen mittels HPLC über Dioden-Array-Detektion untersucht [Lin et al., 2000; De Rijke et al., 2001; Klejdus et al., 2001; Krenn et al., 2002]. Dies bietet die Möglichkeit, die phenolischen Bestandteile besser charakterisieren zu können und so z.B. auf das Vorhandensein von Isoflavonen zu schließen. In vorliegender Arbeit wurde hauptsächlich mit einem kommerziell erhältlichen ethanolischen Extrakt aus Rotklee gearbeitet (s. 4.1.2). Ein HPLC-DAD-Chromatogramm wird in Abbildung 42 präsentiert. Bei der Darstellung des Wellenlängenbereichs von 200 bis 500 nm kann eine Klassifizierung der eluierenden Substanzen vorgenommen werden, da im Rotklee neben Isoflavonen eine Reihe weiterer Flavonoide oder auch Clovamide identifiziert wurde, welche in einem anderen Wellenlängenbereich absorbieren als die Isoflavone (vgl. Kapitel 1.3.3).

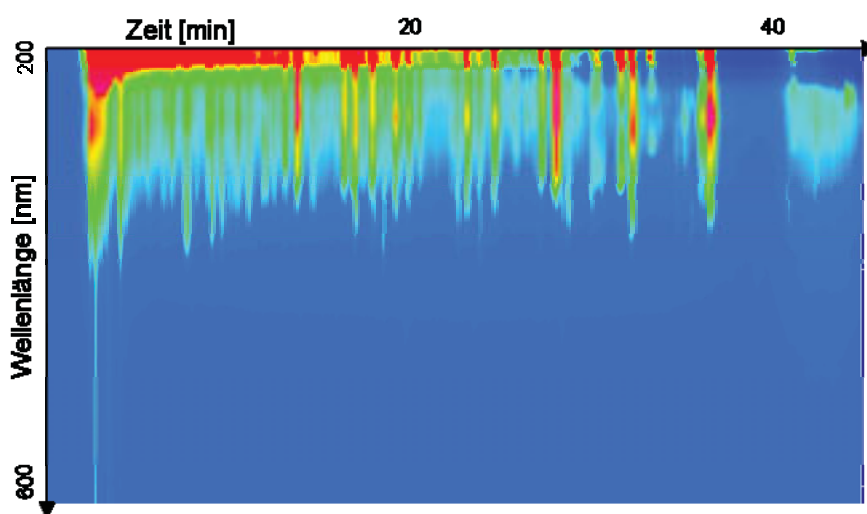


Abbildung 42: HPLC-DAD-Chromatogramm des ethanolischen Rotklee-Extraktes.

Eine Reihe von Substanzen eluiert mit dem verwendeten HPLC-System. In diesem Extrakt sind die wenigen Majorkomponenten gut voneinander getrennt. Viele Minorverbindungen sind ebenfalls enthalten, die im Vergleich zu den Majorverbindungen zumeist nur einen sehr geringen Anteil der gesamten eluierenden Substanzen ausmachen. Bei fast allen Peaks handelt es sich um Isoflavone. Das entsprechende UV-Spektrum jedes einzelnen Peaks und damit der dazugehörigen Verbindung kann am DAD aufgenommen werden. Isoflavone zeigen zwei typische Banden, wobei die erste Bande sehr ausgeprägt ist und in einem Bereich von 245 – 275 nm auftritt. Eine weitere Bande ist als kleine Schulter zwischen 310

und 330 nm nur schwach ausgeprägt [Markham, 1982]. Im vorliegenden Fall werden die UV-Spektren der entsprechenden Peaks daraufhin überprüft. Eine Ausnahme bildet allerdings das Isoflavon Pratensein, welches drei Banden aufweist (bei 260, 284 und 340 nm). Dieses Isoflavon konnte im Rahmen dieser Arbeit aus Rotklee isoliert werden [Klejdus et al., 2001; Delmonte et al., 2006]. Die Majorisoflavone in dem dargestellten HPLC-Chromatogramm sind Formononetin, Biochanin A sowie Irilon. Durch die Herstellung eines XAD-7-Extraktes (vgl. 3.2.3.1) erfolgt eine Aufreinigung und Konzentrierung des verwendeten Extraktes, so dass die Majorverbindungen in angereicherter Form vorliegen. Die drei im Rotklee dominant auftretenden Isoflavone sind in folgender Abbildung markiert.

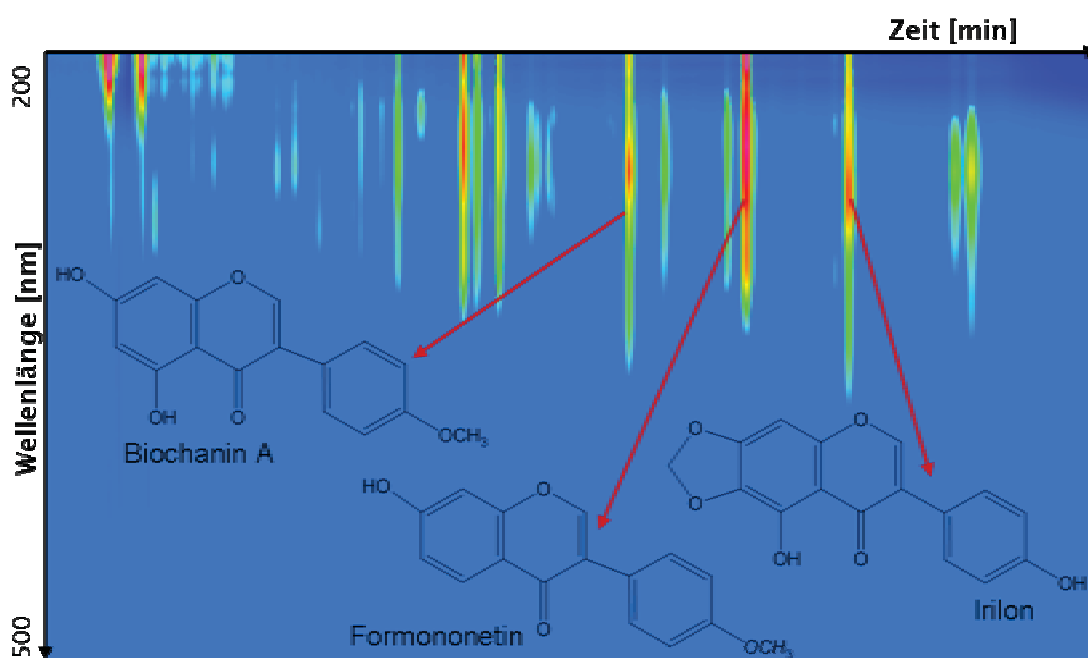


Abbildung 43: HPLC-DAD-Chromatogramm des XAD-7-Extraktes von Rotklee.

Mittels der HPLC-DAD-Analyse kann jedoch keine Aussage über die jeweiligen nicht-phenolischen Bestandteile, wie z.B. Monosaccharide erfolgen, da diese keine ausreichende UV-Aktivität aufweisen. Über eine massenspektrometrische Kopplung können weitaus mehr Informationen erhalten werden. Dabei sind für die Identifizierung das Molekulargewicht und die entsprechend gebildeten Fragmente nützlich. Klejdus et al. [2001] entwickelten eine Methode zur Identifizierung von Isoflavonen in Rotklee mittels LC-MS nach vorheriger zweidimensionaler Festphasenextraktion. Bei der vorliegenden Arbeit wurde bei der massenspektrometrischen Analyse auf eine umfangreiche Festphasenextraktionen oder Aufarbeitung verzichtet und die zu messenden Extrakte zumeist direkt durch einen methanolisch/wässrigen Auszug (50/50; V/V) und nachfolgender Filtration hergestellt. Vereinzelt wird in DMSO gelöst oder 50%iges wässriges Ethanol verwendet (s. Kapitel 3.5).



Die durchgeführten LC-MS-Analysen lieferten wertvolle Informationen über die Konstitution der einzelnen Isoflavone. Eindeutig voneinander zu unterscheiden sind die unterschiedlichen Konjugationsformen der Isoflavone, wie z.B. Aglykone oder Glykoside. Die Fragmentierung der O-glykosidischen Bindung unter dem speziellen Verlust eines Fragmentes mit  $m/z = 162$  u deutet auf eine Hexose-Einheit hin. Darüber hinaus kann durch den Verlust der Massenfragmente von  $m/z = 86$  u und  $m/z = 42$  u auf eine Malonyl- bzw. Acetyleinheit in der betreffenden Verbindung geschlossen werden. Die Ausbildung von Retro-Diels-Alder-Fragmenten (s. Kapitel 3.2.3.2 und Abbildung 68) kann darüber hinaus Informationen über die Substitution der beiden phenolischen Ringe liefern.

Lin et al. [2000] haben mittels LC-(ESI)-MS Extrakte von Blätter und Blüten von Rotklee auf ihren Flavonoid-Gehalt untersucht, wobei insbesondere auf die Detektion der malonylierten Verbindungen fokussiert wurde. In dieser Konjugationsform werden Isoflavone in der Pflanze gespeichert, wobei diese weitaus besser wasserlöslich sind als die äquivalenten Aglykone. Tritt eine Infektion der Pflanze ein, so werden die Aglykone aus diesen malonylierten Verbindungen binnen kurzer Zeit von der Pflanze „regeneriert“, weshalb den Malonylglykosiden eine große Bedeutung zukommt [Edwards et al., 1997; Sumner et al., 1996]. Am Beispiel der massenspektrometrischen Analyse eines frischen Extraktes aus Blättern von Rotklee wird auf das Vorhandensein dieser malonylierten Verbindungen eingegangen. Der Totalionen-Strom dieses Extraktes weist dabei eine komplexe Zusammensetzung auf, weshalb lediglich die entsprechenden Malonyl-Isoflavone markiert sind (s. Abbildung 44).

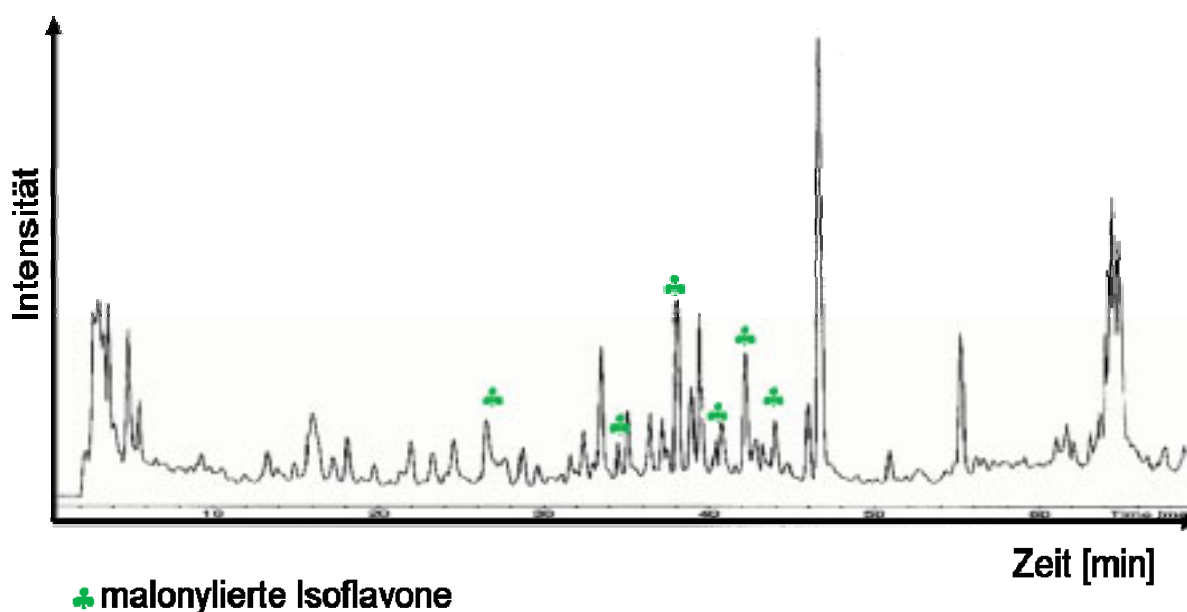


Abbildung 44: TIC eines Extraktes aus Rotkleeblättern (*Trifolium pratense* L.).



Die LC-MS-Bedingungen sind unter Kapitel 4.2.2 aufgeführt. Polasek et al. [2007] haben ebenso von verschiedenen *Trifolium*-Spezies ein Screening über LC-MS-Analyse durchgeführt. Die individuelle Zusammensetzung der unterschiedlichen Isoflavone innerhalb der untersuchten *Trifolium*-Art variierte dabei und wird durch die jeweiligen Wachstumsbedingungen beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diesbezüglich einige Analysen durchgeführt werden, welche in Kapitel 3.5 aufgeführt sind. Ebenso kann anhand eines solchen Screenings eindeutig festgestellt werden, dass Isoflavone innerhalb der verschiedenen Pflanzenteile (Blatt, Blüte, Stängel und Wurzel) nicht homogen verteilt sind (s.u.).

Isoflavone aus Rotklee konnten auch mittels Kapillarelektrophorese und elektrochemischer Detektion bestimmt werden [Peng und Ye, 2006].

Die Blüten des Rotklees weisen eine rosarote Farbe auf, die nicht von den enthaltenen Isoflavonen oder Flavonoiden herrührt. Aufgrunddessen wurde ein Extrakt dieser Blüten mittels HPLC-DAD und LC-(ESI)-MS untersucht. Dazu wurden fünf Blüten von *Trifolium pratense* L. in einen Mörser gegeben und mit wenigen Millilitern Methanol (I) oder einem Gemisch aus Wasser/Acetonitril/Ameisensäure 87/3/10; V/V/V (II) (Fließmittel A des analytischen HPLC-Systems für die Anthocyananalytik, s. 4.2.1) versetzt. Danach wurde mit Seesand zerrieben, um einen vollständigen Aufschluss des Pflanzenmaterials zu erreichen. Dadurch sollte die Extraktion der Inhaltsstoffe besser gewährleistet werden. Diese Aufarbeitung erfolgte nicht quantitativ und die filtrierten Extraktlösungen dienen lediglich der qualitativen Analyse. Über eine HPLC-DAD-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die farbgebende Substanz in der Extraktionslösung aus dem Gemisch (II) ein Absorptionsmaximum von  $\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$  besitzt (vgl. Abbildung 45).

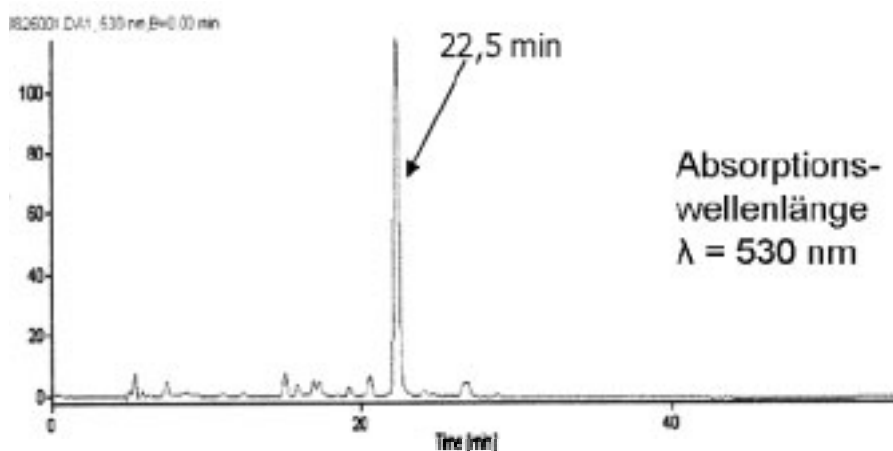


Abbildung 45: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus Rotkleeblüten bei einer Wellenlänge von 530 nm.

Das Absorptionsmaximum, die Färbung der Lösung sowie die entsprechende Retentionszeit im HPLC-System deuten auf das Vorhandensein eines Anthocyans hin. Zur strukturellen Identifizierung des vorhandenen Anthocyans in der Rotkleeblüte wurde deshalb eine LC-MS-Analyse durchgeführt, wobei das HPLC-System für Anthocyane verwendet wurde (s. 4.2.1.1) und die Extraktionslösung I injiziert wurde. Aufgrund der Retentionszeit (23,5 min) sowie der Masse des Pseudomoleküls bei  $m/z = 463$  und der Fragmentierung zu  $m/z = 301 = [M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$  wurde das vorhandene Anthocyan als Peonidin-3-glucosid identifiziert [Hillebrand, 2004]. Die massenspektrometrische Analyse im MS<sup>2</sup>-Modus sowie die Struktur sind in Abbildung 46 aufgeführt.

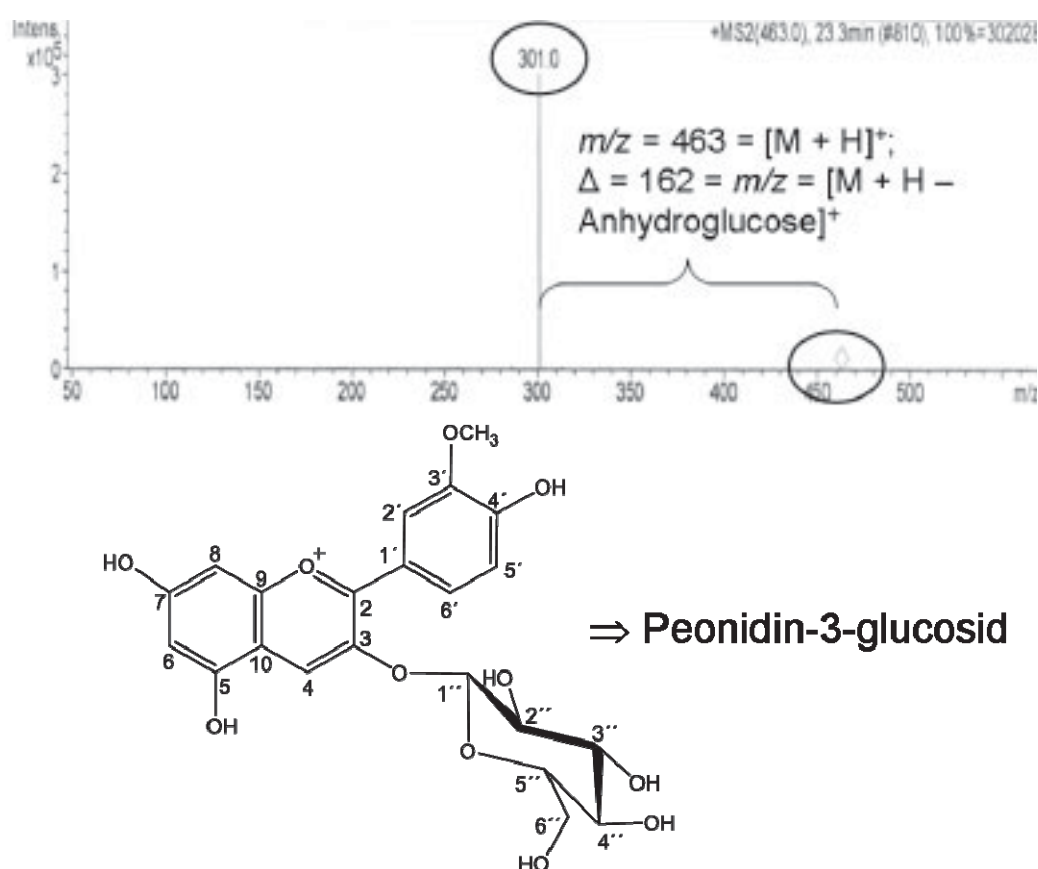


Abbildung 46: LC-(ESI)-MS<sup>2</sup>-Analyse eines Extraktes aus Rotkleeblüten (oben) und Struktur von Peonidin-3-glucosid (unten).

In den untersuchten Blüten konnte kein weiteres Anthocyan oder ein anderes farbgebendes Pigment detektiert werden. Nach einer Untersuchung von Cornelius und Taylor [1981] beeinflusst eine große Anzahl an Genen die Farbe der Rotkleeblüten. Diese kann von Rosarot bis Violett variieren und wird in der entsprechenden Arbeit auf verschiedene Anthocyane zurückgeführt. Dabei konnte anhand einer Studie über rekurrente Selektion

festgestellt werden, dass die Farbe der Blüte auch phänotypisch von den bestäubenden Insekten wie u.a. Hummeln beeinflusst wird.

#### 3.1.2.4 Iris

Die Iris gehört zu einer der verbreitetsten Gartenpflanzen überhaupt (vgl. Kapitel 1.4). Verschiedene Hybride sind durch die unterschiedlichen Züchtungen und variationsreichen Kreuzungen entstanden. In dieser Arbeit wurde mit der *Iris germanica* gearbeitet. Der Gehalt an den unterschiedlichen Isoflavonen ist von Sorte zu Sorte unterschiedlich und kann u.a. auf klimatische Gegebenheiten in dem Ursprungsland zurückzuführen sein. Eine Auswahl an HPLC-Analysen unterschiedlicher Sorten, welche alle im Botanischen Garten Braunschweig geerntet wurden, ist in Abbildung 47 zu sehen. In dieser Abbildung sind die Sorten *Iris germanica*, *Iris sibirica*, *Iris barbata* und *Iris aphylla* aufgeführt. Für die HPLC-Analyse wurden getrocknete Rhizome dieser verschiedenen Iris-Varietäten mit Seesand verrieben und mit 60%igem wässrigen Methanol unter halbstündigem Rühren extrahiert. Die filtrierten Lösungen wurden direkt für die Analyse verwendet.

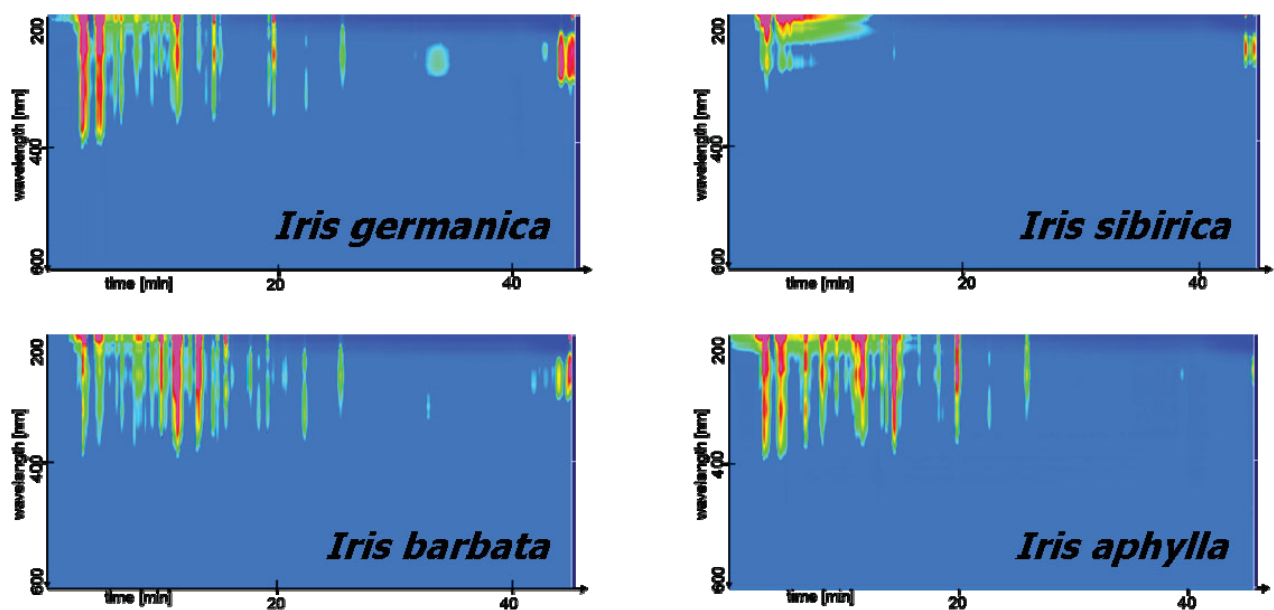


Abbildung 47: HPLC-Chromatogramme verschiedener Extrakte von Iris-Varietäten.

Die vier dargestellten Chromatogramme weisen diverse Unterschiede auf. Bei drei Proben (*Iris germanica*, *Iris barbata* und *Iris aphylla*) sind mehrere Peaks im vorderen Bereich des Chromatogrammes zu erkennen. Aufgrund der UV-Spektren konnte bewiesen werden, dass die meisten dieser Verbindungen Isoflavone sind. Einige Flavone liegen in den einzelnen Iris-Arten ebenfalls vor, wobei diese anhand ihres verschobenen zweiten Absorptionsmaximums bei einer höheren Wellenlänge zu erkennen sind. Die Chromatogramme von *Iris germanica*

und *Iris barbata* („Schokoladeniris“ aufgrund ihres Geruches) ähneln sich, wobei jedoch die Mengenverhältnisse voneinander verschieden sind. Im Chromatogramm von *Iris sibirica* sind nur wenige Peaks zu erkennen, die direkt nach der Injektion eluieren. Das Isoflavon, welches das Interesse für die Untersuchung der Iris geweckt hat, ist das Irilon (Strukturformel s.u. und vgl. Kapitel 3.2.4), welches in dem vorliegenden Extrakt hauptsächlich glykosidisch gebunden vorkommt. Es konnte bereits 1973 von Dhar und Kalla [1972] aus der *Iris germanica* durch Säulenchromatographie an Kieselgel gewonnen werden. Es ist nur in wenigen Pflanzen enthalten, zu denen neben Rotklee auch der Toromiro-Baum (*Sophora toromira*; eine Fabaceae) gehört.

Aufgrund der HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>-Analyse eines methanolischen Extraktes von *Iris germanica* konnte das Vorliegen einer Reihe von Isoflavonen bestätigt werden. Diese kommen dabei hauptsächlich in glykosidisch oder diglykosidisch gebundener Form vor. Das Total-Ionenstrom-Chromatogramm eines solchen Extraktes ist in Abbildung 48 dargestellt. Dabei sind diejenigen Peaks markiert, die einem bestimmten Isoflavon zugeordnet werden können. In Tabelle 13 sind die entsprechende Molekül-Massen und Fragmentierungen aufgeführt. Die Zuordnung erfolgt anhand von Literaturdaten [u.a. Pailer und Franke, 1973; Al-Khalil et al., 1994; Farag et al., 1999; Shawl et al., 1984; Wollenweber et al., 2003; Reynaud et al., 2005].

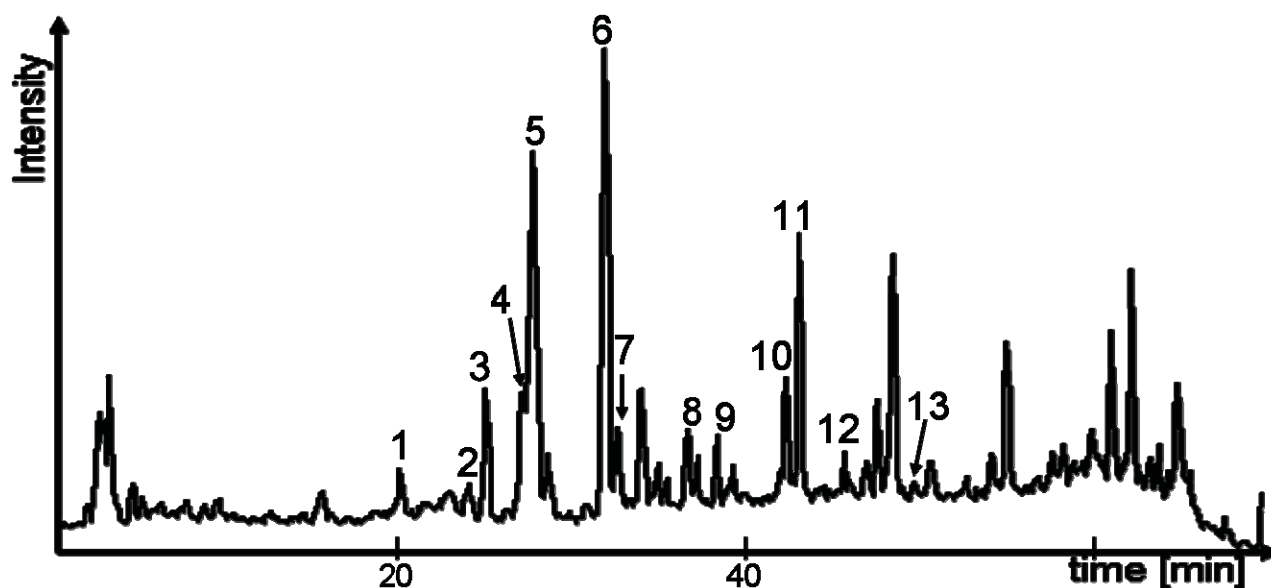


Abbildung 48: HPLC-MS-Totalionenstrom eines methanolischen Extraktes von *Iris germanica* L.

Tabelle 13: Identifizierung und massenspektrometrische Daten der relevanten Isoflavone eines methanolischen Extraktes von *Iris germanica*. Die Nummerierung erfolgt in Anlehnung an Abbildung 48.

| Peak | Molekular-Ion     | Fragmentierung im MS <sup>2</sup> | Verbindung                  |
|------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
|      | $m/z = [M + H]^+$ | $m/z$                             |                             |
| 1    | 655               | 493, 331                          | Iristectorigenin-diglucosid |
| 2    | 493               | 331                               | Iristectorigenin            |
| 3    | 637               | 475                               | Nigricin-diglucosid         |
| 4    | 493               | 331                               | Iristectorigenin            |
| 5    | 523               | 361                               | Irigenin-glucosid           |
| 6    | 475               | 313, (298)                        | Nigricin-glucosid           |
| 7    | 505               | 343                               | Nigricanin-glucosid         |
| 8    | 461               | 299                               | Irilon-glucosid             |
| 9    | 477               | 315                               | Irisolidon-glucosid         |
| 10   | 313               | 299                               | Nigricin                    |
| 11   | 361               | 183                               | Irigenin                    |
| 12   | 343               | (183, 155)                        | Nigricanin                  |
| 13   | 299               | (183, 167)                        | Irilon                      |

Es gelang im Rahmen dieser Arbeit, verschiedene Isoflavone aus der Iris zu identifizieren. Anhand der massenspektrometrischen Daten wird deutlich, dass die Zielverbindung Irilon in der verwendeten *Iris germanica* hauptsächlich glucosidisch gebunden enthalten ist (Peak 8)

und nur in geringer Konzentration als Aglykon (Peak 13) vorliegt. Weitere Isoflavone, welche eine Methylendioxygruppe im Molekül aufweisen und dadurch von pharmakologischem Interesse sein könnten, wie z.B. Nigricin (Peak 10), wurden ebenfalls detektiert.

### 3.1.3 Dünnschichtchromatographie

Eine kostengünstige Schnellmethode zur Identifizierung, Reinheitsüberprüfung oder zum Screening von Isoflavonen bietet die Dünnschichtchromatographie. Die entsprechenden Fließmittelsysteme sowie die Phasen der entsprechenden Dünnschichten (stationäre Phasen) lassen sich problemlos an das jeweils vorhandene Trennproblem anpassen.

Die Analyse von Isoflavonen aus Soja erfolgt üblicherweise über Normalphasen-DC, das heißt, die stationäre Phase besteht aus Kieselgel. Unter Verwendung des Fließmittelsystems Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis 75/20/0,5 (V/V/V) lassen sich sogar die beiden Isoflavone Daidzin und Glycitin voneinander trennen (vgl. Abbildung 49). Diese einfache Methode kann angewendet werden, um die Trennung beider Isoflavone mittels High-speed Countercurrent Chromatography zu überprüfen.

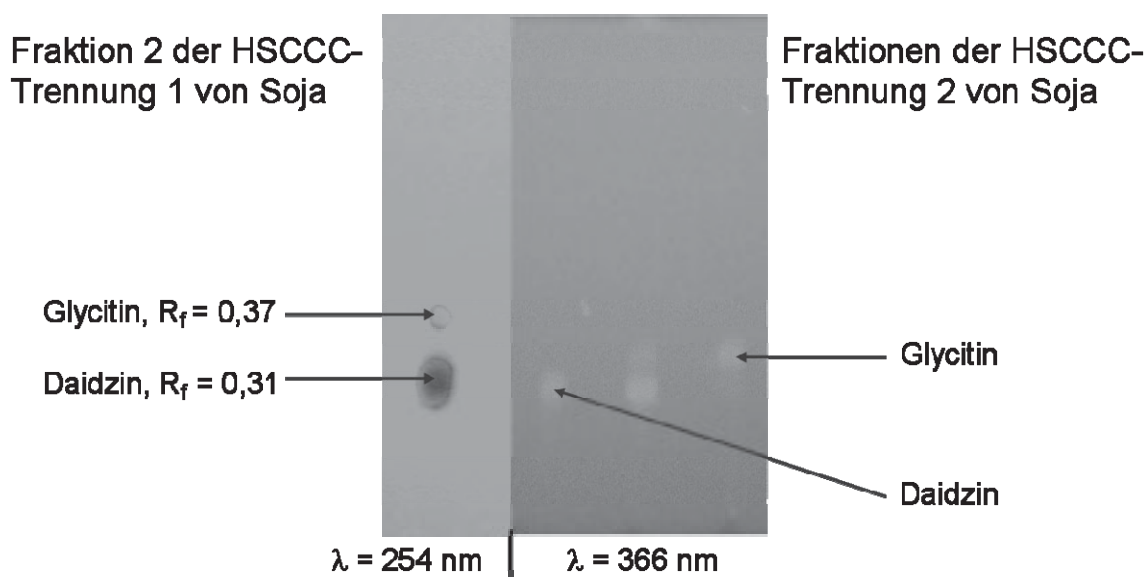


Abbildung 49: DC-Screening der Isoflavone Daidzin und Glycitin aus Soja.

Im Rotklee liegen Isoflavone hauptsächlich in der unsubstituierten Form vor, d.h. als Aglykone, weshalb ein weiteres DC-System für ihre Detektion entwickelt wurde. Die Aglykone konnten mit dem Fließmittelsystem Diethylether/Ethylacetat (1/1, V/V) auf Kieselgel entwickelt werden. Unter dessen Verwendung konnte je nach Polarität der zu enthaltenen Isoflavone ebenfalls auf RP-18-Material entwickelt werden. Die anschließende Detektion erfolgte mittels UV-Absorption. Beim Vorliegen von Hydroxylgruppen in der 5-Position des Isoflavons ist eine Derivatisierung mit Eisen-(III)-Chlorid-Lösung ebenfalls für eine

spezifische Detektion möglich (Rotfärbung). Zur dünnsschichtchromatographischen Bestimmung von glykosidisch gebundenen Isoflavonen muss die Polarität der mobilen Phase verändert werden, um eine optimale Trennung zu gewährleisten. Ein geeignetes Fließmittelsystem ist hierfür das Gemisch aus Chloroform/Methanol/Ameisensäure im Verhältnis 75/25/1 (V/V/V) auf Kieselgelplatten; oder Chloroform/Methanol/Ameisensäure 20/50/1 (V/V/V) auf RP-18-Material unter UV-Detektion. Darüber hinaus konnten die entwickelten DC-Platten mit Anisaldehyd-Reagenz-Lösung besprüht werden, wodurch auch eine Reihe von nicht UV-aktiven Verbindungen (z.B. phenolische Säuren oder Zucker) aufgrund unterschiedlicher Färbungen detektiert werden können.

Die dünnsschichtchromatographische Trennung von Isoflavonen aus *Iris germanica* L. wurde ebenfalls über Kieselgel erzielt. Dabei diene als mobile Phase das Gemisch aus n-Butanol/Essigsäure/Wasser im Verhältnis 4/2/5 (V/V/V). Nach der Entwicklung wurden die DC-Platten mit einer 1%igen methanolischen Lösung aus Naturstoffreagenz A derivatisiert. Durch ein weiteres Auftragen einer 5%igen ethanolischen Lösung von Polyethylenglykol (PEG 4000) wurden die Spots unter UV-Licht besser sichtbar. Die Trennungen verschiedener Fraktionen der Sephadex-Trennung von *Iris germanica* sind in Abbildung 50 abgebildet. Dabei treten nach der Derivatisierung unterschiedlich gefärbte Fluoreszenzen auf, wobei in der Abbildung insbesondere die hellblau-weiße Fluoreszenz des glucosidisch gebundenen Irilons dominiert.

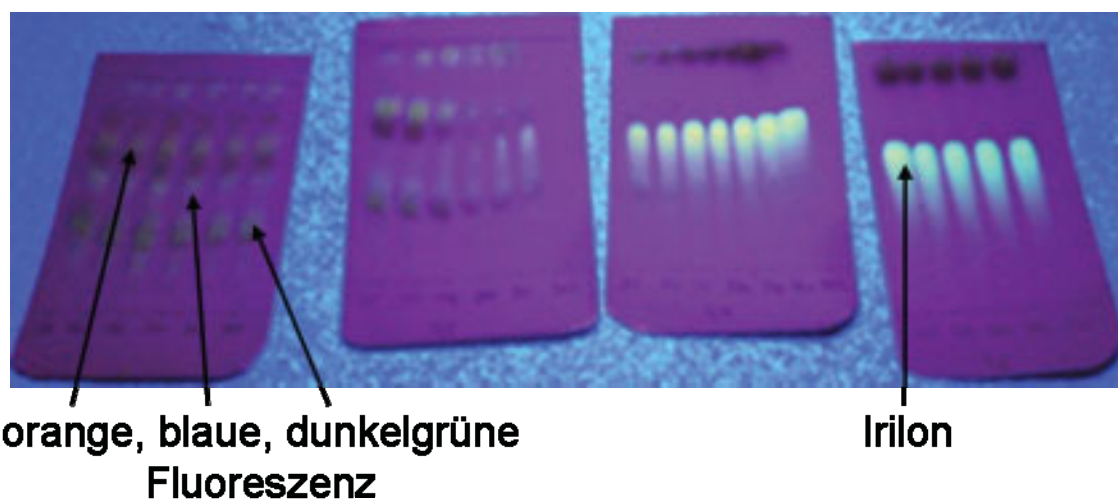


Abbildung 50: DC-Untersuchungen von *Iris germanica*. (Detektion bei  $\lambda = 366$  nm.)

Darüber hinaus ist es ebenfalls möglich, die entwickelten DC-Platten mit Anisaldehyd-Sprühareagenz zu derivatisieren. Irilon weist in diesem Fall eine bläulich-violette Farbe auf.



## 3.2 Isolierung von Isoflavonen

Verschiedene säulenchromatographische Verfahren wurden bereits zur Isolierung von Isoflavonen aus Pflanzenmaterialien eingesetzt. Hierbei werden als stationäre Phasen überwiegend Sephadex oder Polyamid verwendet [Marby et al., 1970]. In der vorliegenden Arbeit wird eine alternative Trenntechnik eingesetzt – die Countercurrent Chromatography.

### 3.2.1 Prinzip der Countercurrent Chromatography

Die Countercurrent Chromatography [dt. Gegenstromverteilungschromatographie; Abkürzung CCC] wurde ab dem Jahr 1965 von *Yoichiro Ito* zu einer leistungsfähigen Form der Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie weiterentwickelt. Daher sind die mobile sowie die stationäre Phase flüssig. Die chromatographische Trennung erfolgt in einem inerten Teflonschlauch, der spiralförmig um eine oder mehrere Spulen (Coils) gewickelt ist. Dabei wird durch die Einwirkung von Gravitations- oder Zentrifugalkräften die flüssige stationäre Phase in der Apparatur gehalten, so dass kein festes Trägermaterial benötigt wird [Ito et al., 1982]. Die chromatographische Trennung erfolgt bei dieser Methode durch die Verteilung der zu trennenden Substanzen zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen. Die Retention dieser Substanzen beruht nicht auf Adsorption, sondern auf Verteilungsvorgängen. Es gibt hierbei das Nernst'sche Verteilungsgesetz [Conway, 1990]:

$$K = \frac{C_{stat.}}{C_{mob.}}$$

Die Verteilungsvorgänge wiederholen sich dabei fortwährend. Limitierender Faktor bei einer Trennung ist hierbei die Löslichkeit der Substanz in den beiden Phasen, wobei der Verteilungskoeffizient des Weiteren abhängig ist von der Art der Phasen, der Temperatur sowie dem Druck. Diese Art der Verteilungschromatographie ist besonders schonend. Mit ihr können polare sowie unpolare Naturstoffe gleichermaßen getrennt [Ito und Conway, 1996] oder aber Rohextrakte fraktioniert werden.

Grundsätzlich können bei der Countercurrent Chromatography zwei Systeme voneinander unterschieden werden: Das HSES-System (hydrostatic equilibrium system) und das HDES-System (hydrodynamic equilibrium system). Beim HSES-System handelt es sich um ein Trennsystem, das einem konstanten Gravitationsfeld ausgesetzt ist. Als Beispiele hierfür sind das DCCC- (droplet countercurrent chromatography) sowie das CPC-System (centrifugal partition chromatography) zu nennen.



In dieser Arbeit wurde mit dem HDES-System gearbeitet (High-Speed Countercurrent Chromatography), bei welchem der Coil (mit dem aufgewickelten Teflonschlauch) zusätzlich zur Rotation um die Zentralachse, um seine eigene Achse rotiert, wodurch das Gravitationsfeld nicht konstant bleibt. Die Rotation erfolgt wie in einem Modell des planetaren Systems, wobei sich die Coils um eine stationäre Achse in epicyclischer Bewegung drehen, worum simultan die äußere Spule rotiert [Epicyclic Coil Planet Centrifuge]. Wie im Sonnensystem müssen sich zwei Achsen (Coil als „Planetenachse“ und die Zentrifugenbewegung als „Sonnenachse“) umeinander drehen, um ein hydrodynamisches Gleichgewicht zu erzeugen. Der Teflonschlauch (PTFE) stellt bei dieser chromatographischen Methode die „Säule“ dar, in der die chromatographische Trennung erfolgt (vgl. Abbildung 51). Am innersten Punkt der Umlaufbahn mischen sich die beiden Phasen (schwaches Kraftfeld), am äußersten sind sie hingegen komplett voneinander getrennt (starkes Kraftfeld). Folglich bildet sich durch die schnelle Rotation ein inhomogenes Kraftfeld aus, so dass aufgrund der unterschiedlichen Zentrifugalkräfte abwechselnd Zonen, in denen die Phasen gemischt sind, und Zonen, in denen beide Phasen voneinander getrennt sind, entstehen (s. Abbildung 51). In vielen aufeinander folgenden Schritten werden die Substanzen quasi „ausgeschüttelt“, ähnlich wie in einem Scheidetrichter. Durch die schnelle Rotation (600-1000 U/min) werden in einer Stunde bis zu 50000 alternierende Mischungs- und Entmischungsvorgänge erreicht. Dadurch werden die Substanzen chromatographisch voneinander getrennt, nacheinander eluiert und mit Hilfe eines Fraktionensammlers getrennt aufgefangen [Ito, 1986].

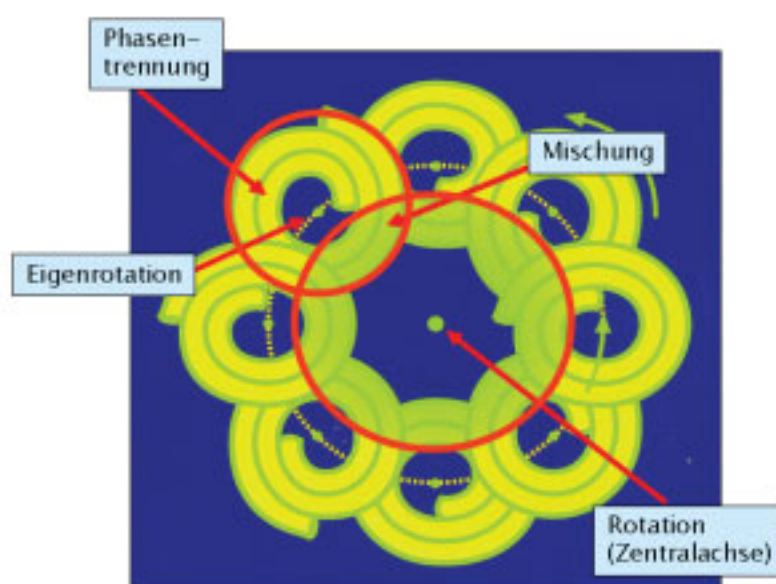


Abbildung 51: Aufbau eines Coils (J-Typ) der CCC (ergänzt nach Marston und Hostettmann [1994]).

Durch den Elutionsmodus kann die Trennung beeinflusst werden, da wahlweise die leichte (Head to Tail) oder die schwere (Tail to Head) Phase als stationäre Phase eingesetzt werden kann. Vereinfacht kann das Funktionsprinzip mit dem der „Archimedischen Schraube“ erklärt werden. In einem schraubenförmig gewundenen Schlauch wird dessen Inhalt unter Einwirkung einer vertikalen Beschleunigung (z.B. Gravitation) definitionsgemäß zum „Head“-Ende des Schlauches befördert. Dadurch kann im Gegenstrom die mobile Phase durch den Schlauch befördert werden, ohne dass es zur Verdrängung der stationären Phase kommt.

Der generelle Aufbau einer CCC-Anlage entspricht vom Prinzip her dem einer HPLC-Anlage (vgl. Abbildung 52). Nachdem ein geeignetes Lösungsmittelsystem für die zu trennenden Substanzen gefunden wurde (bei dem der Verteilungskoeffizient  $K$  bei  $0,75 \pm 0,5$  liegen sollte), wird die Anlage bzw. der Coil mittels einer HPLC-Pumpe mit der stationären Phase befüllt [Ito, 2005]. Danach kann die gelöste Probe (optional zu gleichen Teilen in beiden Phasen des Fließmittelsystems gelöst) durch eine Dosierschleife injiziert werden. Gleichzeitig wird mit dem Einpumpen der mobilen Phase in den Teflonschlauch sowie mit der Rotation begonnen. Ein Detektor (z.B. UV-Detektor) dokumentiert die Trennung und die einzelnen Fraktionen können mit einem Fraktionensammler getrennt aufgefangen werden.

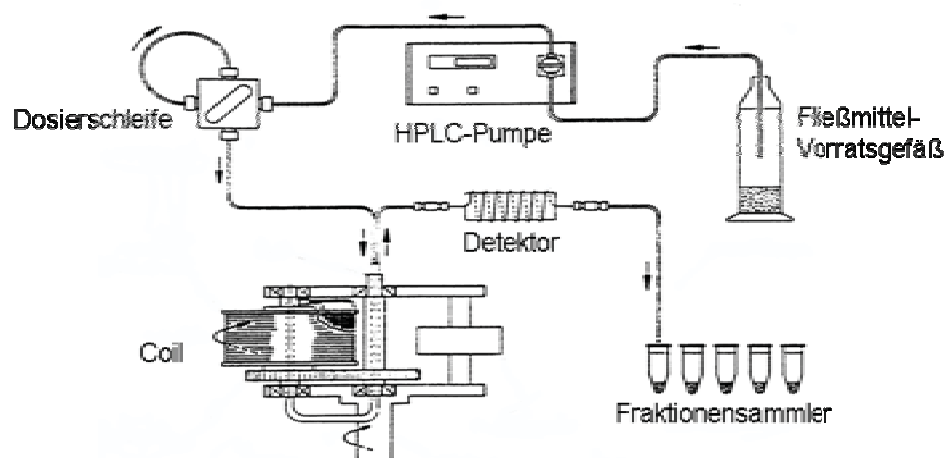


Abbildung 52: Aufbau einer CCC-Anlage nach Sutherland [1987].

Die CCC bietet einige Vorteile gegenüber der HPLC. So erlaubt die CCC viele Variationsmöglichkeiten durch die Wahl der verwendeten Phasensysteme. Je nach Polarität des Fließmittelsystems können polare und unpolare Substanzen getrennt werden, was bei der HPLC durch das Säulenmaterial begrenzt ist [Oka et al., 1991]. Darüber hinaus kann eine hohe Trennstufenzahl erreicht werden (s.u.). Für präparative Trennungen ist die CCC gut geeignet, da Substanzmengen im Gramm-Bereich injiziert werden können und die „Säulen“ deutlich preiswerter und langlebiger sind als vergleichbare präparative Säulen für die HPLC. Die PTFE-Schläuche sind universell einsetzbar, da sie mit keiner stationären

Phase befüllt sind, weshalb sie gleichermaßen für alle Trennungen verwendet werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei der CCC keine irreversible Probenadsorption an einer Festphase entstehen kann, wodurch keine Verluste des zu trennenden Materials resultieren. Materialien wie Kieselgel z.B. katalysieren dagegen eine solche Adsorption, was bei der CCC durch das ausschließliche Vorliegen von flüssigen Phasen minimiert wird. Außerdem kann die injizierte Probe größtenteils zurückgewonnen werden, in dem der auf dem Coil verbleibende Rückstand oder respektive die Fraktionen erneut vereint und getrocknet werden können. Bei der High-speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) kann eine mit der präparativen HPLC vergleichbare Auflösung erbracht werden. Für die Auflösung  $R$  zweier zu trennender Komponenten eines Substanzgemisches gilt eine aus der HPLC abgeleitete Beziehung:

$$R = \frac{1}{4}(\alpha - 1)\sqrt{N}\left(\frac{k'}{k' + 1}\right)$$

$$\text{mit} \quad k' = K \frac{V_s}{V_m}^3$$

Dabei werden wichtige Faktoren wie u.a. die Selektivität ( $\alpha$ ), die Trennstufenzahl ( $N$ ) und der Kapazitätsfaktor  $k'$  berücksichtigt. Die relativ niedrige Trennstufenzahl wird hierbei durch einen hohen Wert des Kapazitätsfaktors  $k'$  kompensiert, weshalb die HSCCC eine durchaus gute Trennleistung aufbieten kann [Conway, 1990].

### 3.2.2 Isolierung von Isoflavonen aus Soja (*Glycine max.* L.)

In diesem Unterkapitel wird erläutert, wie die Majorisoflavone aus Soja isoliert werden. Die Sojaiflavone liegen in den verwendeten Extrakten glucosidisch gebunden vor. Die entsprechenden Fließmittelsysteme für die Trennung mittels HSCCC werden dabei für das jeweilige Trennproblem optimiert. Die Polarität des Fließmittels (in Hinblick auf die Probenmatrix und die zu isolierenden Substanzen) übt einen großen Einfluss auf die Funktionalität und Wiederholbarkeit der Trennung aus, weshalb eine Optimierung notwendig ist.

#### 3.2.2.1 Extraktion und Anreicherung

Sojamehl wurde bei Raumtemperatur mit Hexan (bzw. mit Petrolether und anschließend mit Diethylether) entfettet, um das bei der Isolierung der Isoflavone störende Sojaöl abzutrennen. Ebenfalls verwendetes Sojaschrot wurde zur Entfettung zuerst zu einem Mehl verarbeitet bzw. gemahlen. Das entfettete, trockene Sojamehl wurde daraufhin mit

<sup>3</sup>  $V_s$  = Volumen der stationären Phase,  $V_m$  = Volumen der mobilen Phase

Methanol/Wasser im Verhältnis 75/25 (V/V) unter ständigem Rühren extrahiert. Nach Filtration wurde das Methanol unter reduziertem Druck abdestilliert und der verbleibende Rückstand gefriergetrocknet. Auf diese Weise wurde ein Rohextrakt erhalten. Da dieser für eine anschließende Trennung mittels CCC aufgrund seiner schlechten Löslichkeit und seines hohen Anteils an Proteinen nur bedingt geeignet ist, musste er im Folgenden weiter aufgereinigt und konzentriert werden.

Die Aufreinigung dieses Rohextraktes erfolgte über eine Festphasenextraktion an XAD-7-Material, wobei phenolische Verbindungen sowie deren Glykoside adsorbieren und andere Komponenten des Rohextraktes (wie z.B. Proteine) durch Spülen mit dest. Wasser entfernt werden können. Mit Methanol konnten die phenolischen Bestandteile (im vorliegenden Fall Isoflavone) vom XAD-7-Material eluiert werden. Das erhaltene Eluat wurde *in vacuo* abdestilliert und der Rückstand gefriergetrocknet. Mit diesem Aufarbeitungsschritt erfolgte nicht nur eine Aufreinigung des Rohextraktes, sondern gleichermaßen eine Konzentrierung der im Sojamehl enthaltenen Isoflavone. Der erhaltene Extrakt (XAD-7-Extrakt) konnte zur Trennung mittels HSCCC eingesetzt werden (s. Abbildung 53).

Darüber hinaus wurden weitere Extraktionen des Sojamehls durchgeführt und miteinander verglichen, um gegebenenfalls die Ausbeute an Isoflavonen in dem resultierenden Extrakt zu erhöhen. Eine mehrfache Extraktion mit Ethylacetat nach dem Entfetten hat sich insbesondere dann empfohlen, wenn im Sojaprodukt noch Malonyl-glykoside vorhanden sind, da diese zum Teil nicht an dem Adsorberharz haften bleiben. Durch die wiederholte Extraktion mit Ethylacetat/Wasser gelingt die Anreicherung der phenolischen Bestandteile.

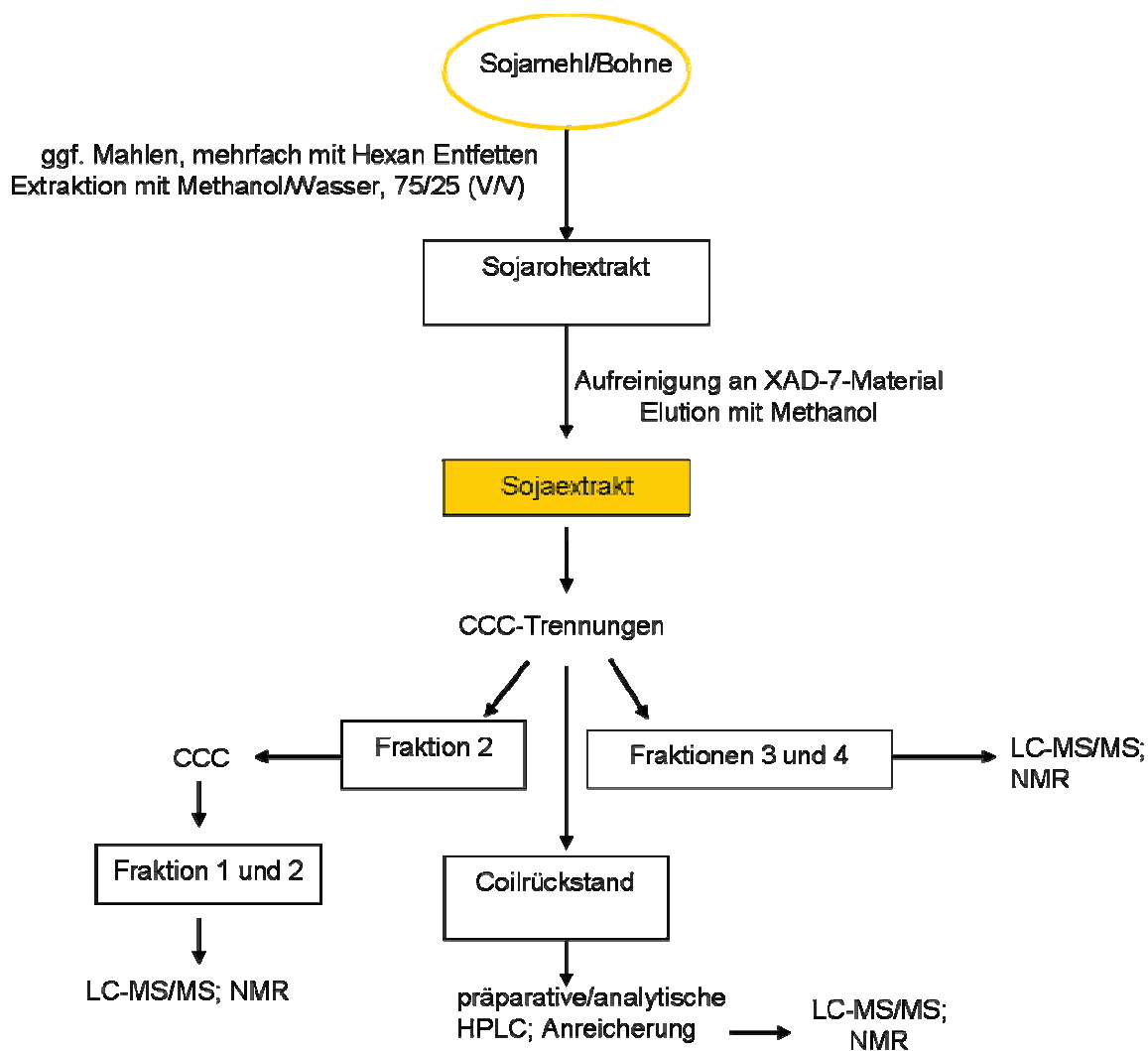


Abbildung 53: Fließschema zur Isolierung von Isoflavonen aus Soja (*Glycine max* L.).

Mittels HSCCC können verschiedene Fraktionen aus dem Soja-XAD-7-Extrakt erhalten und aufgetrennt werden (s. Abbildung 53). Einerseits handelt es sich dabei um Isoflavone in Reinform, andererseits liegen diese teilweise noch in Mischungen angereicht vor. Daraus können sie durch weitere Trennung mittels Countercurrent Chromatography unter Verwendung eines geeigneten Fließmittels isoliert werden (vgl. 3.2.2.2). Bei einer der erhaltenen Fraktionen (Coil) erfolgt eine weitere Aufreinigung über präparative HPLC. Die Fraktionen sowie die isolierten Reinverbindungen werden mittels LC-(ESI)-MS analysiert und über 1D- und ggf. 2D-NMR-Analysen identifiziert (s.u.).

### 3.2.2.2 Trennung der Sojaisoflavone mittels High-Speed Countercurrent Chromatography

Als Fließmittelsystem zur Trennung der Hauptisoflavone aus Soja (s. Abbildung 54) wurde ein Gemisch aus *tert.*-Butylmethylether/Acetonitril/Wasser im Verhältnis 2/2/3 (V/V/V)

verwendet [vgl. Degenhardt und Winterhalter, 2001]. Die beiden Phasen dieses Gemisches wurden zuvor mehrfach miteinander abgesättigt. Gearbeitet wurde im Head-to-Tail-Modus, wobei die leichtere Phase als stationäre Phase fungierte. Die Flussrate betrug bei dieser Trennung 3,2 mL/min und die Umdrehungsgeschwindigkeit des Countercurrent Chromatographen 600 U/min. Die Trennung wurde mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 254 \text{ nm}$  verfolgt. Aufgrund der Probenmatrix sowie den physikochemischen Eigenschaften des verwendeten Fließmittelsystems erschien eine geringere Umdrehungsgeschwindigkeit des Coils als angemessen. Bei höheren Geschwindigkeiten kam es zum Phasenübergang zwischen mobiler und stationärer Phase, wobei ein Teil der stationären Phase co-eluiert. Die Retention der stationären Phase war folglich schlecht, was sich negativ auf die Trennleistung des Systems auswirkte und unter Umständen zu einem „Zusammenbruch“ der Phasengrenze zwischen den beiden Flüssigkeiten führen kann. Soja enthält eine Reihe von Saponinen [Kim et al., 2006], die grenzflächenaktiv sind, so dass sie sich in Spuren bereits „negativ“ auf die Trennleistung auswirken können. Die eingewogene Probe wurde zunächst mit 2 mL DMSO, und danach mit 15 mL der schweren und 5 mL der leichten Phase des Fließmittelsystems versetzt und unter Ultraschall-Behandlung gelöst. Danach wurde die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert und anschließend membranfiltriert. Aus 400 mg des unter 3.2.2.1 hergestellten XAD-7-Extrakts konnten vier Fraktionen erhalten werden (s. Abbildung 54), wobei die Majorfraktion (Fraktion 3) reines Genistin enthält (19 mg). In der vierten Fraktion liegt reines 6''-O-Acetyl-daidsin vor. Die zweite Fraktion enthält ein Gemisch aus den beiden Isoflavonen Daidzin und Glycitin, die sich strukturell gesehen nur durch eine Methoxygruppe am C6 unterscheiden. Ein gewisser Unterschied in der Polarität dieser beiden Isoflavone ist zwar gegeben, er reicht jedoch nicht für eine Auftrennung unter den gewählten Bedingungen aus. Dies wird auch durch den Umstand erschwert, dass Daidzin in dieser Mischung deutlich überwiegt und einen Anteil von etwa 85-90% ausmacht. In dem verbleibenden Rest auf dem Coil war das Isoflavon 6''-O-Acetyl-genistin angereichert; daneben waren aber auch noch einige weitere Substanzen enthalten, welche nur eine untergeordnete Rolle spielen. Eine weitere Aufreinigung dieses Coil-Rückstandes erfolgte daher über präparative HPLC, wobei ein Gemisch aus Acetonitril und 0,1%iger Ameisensäure als Fließmittelsystem diente (s. Kapitel 4.2.7.2).

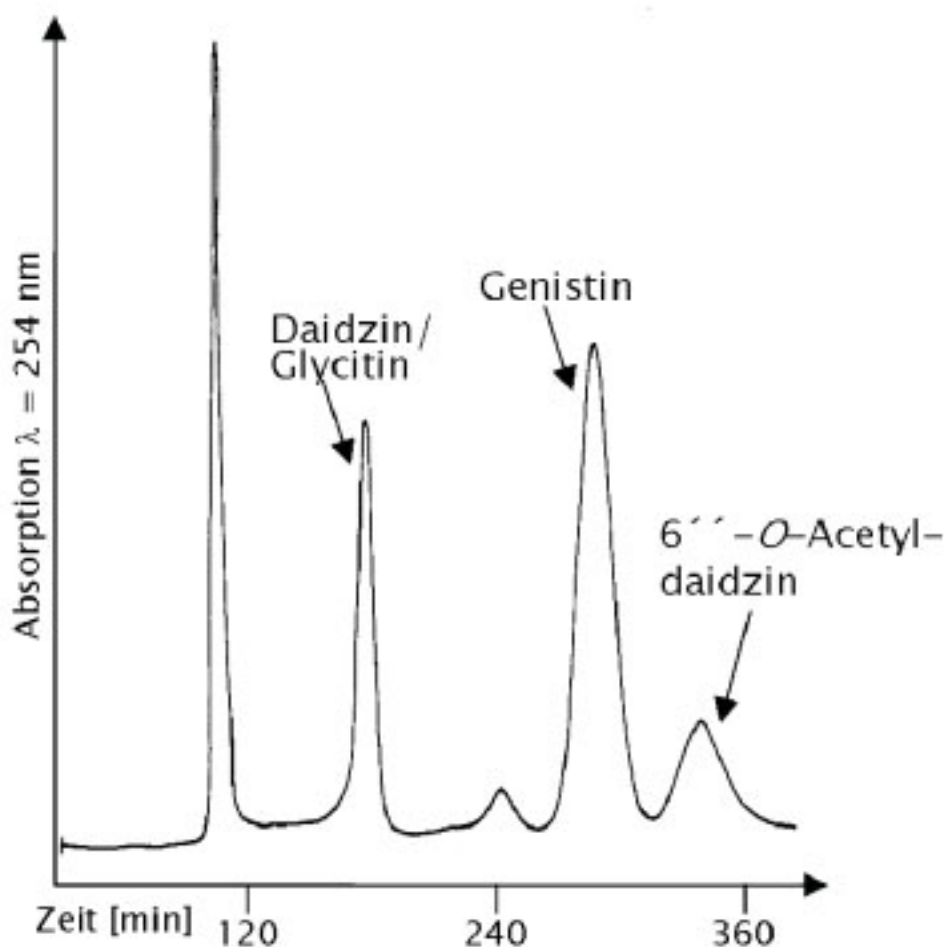


Abbildung 54: HSCCC-Trennung des XAD-7-Extraktes von Soja bei einer Detektionswellenlänge von  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

Zur vollständigen Trennung von Daidzin und Glycitin wurde das bisher isolierte Gemisch dieser beiden Verbindungen (Fraktion 2 des in Abbildung 54 dargestellten HSCCC-Laufs) erneut mittels Countercurrent Chromatography getrennt. Dabei wurde ein optimiertes Fließmittel verwendet, welches zuvor durch entsprechende Tests zur Fließmittelauswahl (vgl. 4.2.14) ermittelt wurde. Das Gemisch aus *tert.*-Butylmethylether/Acetonitril/n-Butanol/Wasser im Verhältnis 2/2/1/5 (V/V/V/V) erwies sich für eine Trennung dieser beiden Isoflavone als besonders geeignet, und es erfolgte eine „Antrennung“ dieser beiden Komponenten (s. Abbildung 55). Mittels eines geeigneten DC-Systems (s. 3.1.3) konnte ermittelt werden, wo die Grenze zwischen den jeweils reinen Verbindungen Daidzin und Glycitin verlief, so dass die entsprechenden Reagenzgläser aus der CCC-Trennung vereinigt werden konnten. Das Lösungsmittel der beiden Fraktionen wurde unter Vakuum abgezogen, die jeweiligen Rückstände in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die erhaltene Mischfraktion (zwischen den beiden Reinverbindungen) kann für eine erneute HSCCC-Trennung verwendet werden. Der Fluss der mobilen Phase betrug bei dieser Trennung 2,5 mL/min und

die Umdrehungsgeschwindigkeit des Countercurrent Chromatographen 600 U/min. Die Probe wurde vor der Injektion in 2 mL DMSO angelöst und zur vollständigen Lösung je 30 mL schwere und leichte Phase des Fließmittelsystems dazugegeben und die Probe unter kurzer Ultraschallbehandlung gelöst. Die Probenlösung wurde membranfiltriert, um eventuell ungelöste Bestandteile zu entfernen und um einem eventuellen, späteren Auskristallisieren einer Verbindung im Teflonschlauch entgegenzuwirken. Bei dieser Trennung war es jedoch wichtig, das System zu equilibrieren. Das heißt, eine Injektion der Probe erfolgte erst nach Durchbruch der mobilen Phase. Fraktion 2 wurde entsprechend im Fließmittel nach zuvoriger Zugabe von DMSO gelöst und über eine 60 mL Probenschleife nach einer Zeitspanne von 130 min in das System injiziert. Aus 205 mg eingewogener Probe (Fraktion 2 aus der Trennung der Hauptisoflavone des XAD-7-Extraktes von Soja) konnten auf diese Weise 127 mg Daidzin und 19 mg Glycitin gewonnen werden. Die beiden Isoflavone liegen dabei in Reinform vor. Im Falle der dargestellten Trennung (s. Abbildung 55) lag die injizierte Probenmenge bei 107 mg, aus denen 5 mg reines Glycitin gewonnen werden konnte. Diese Trennung eignete sich für die Isolierung von größeren Mengen Daidzin und Glycitin, da im Vergleich zur vollständigen Trennung (s.u.; Abbildung 57) die Aufgabemenge größer ist und darüber hinaus der zeitliche Aufwand zur Isolierung einer bestimmten Menge an z.B. Glycitin deutlich geringer ist.



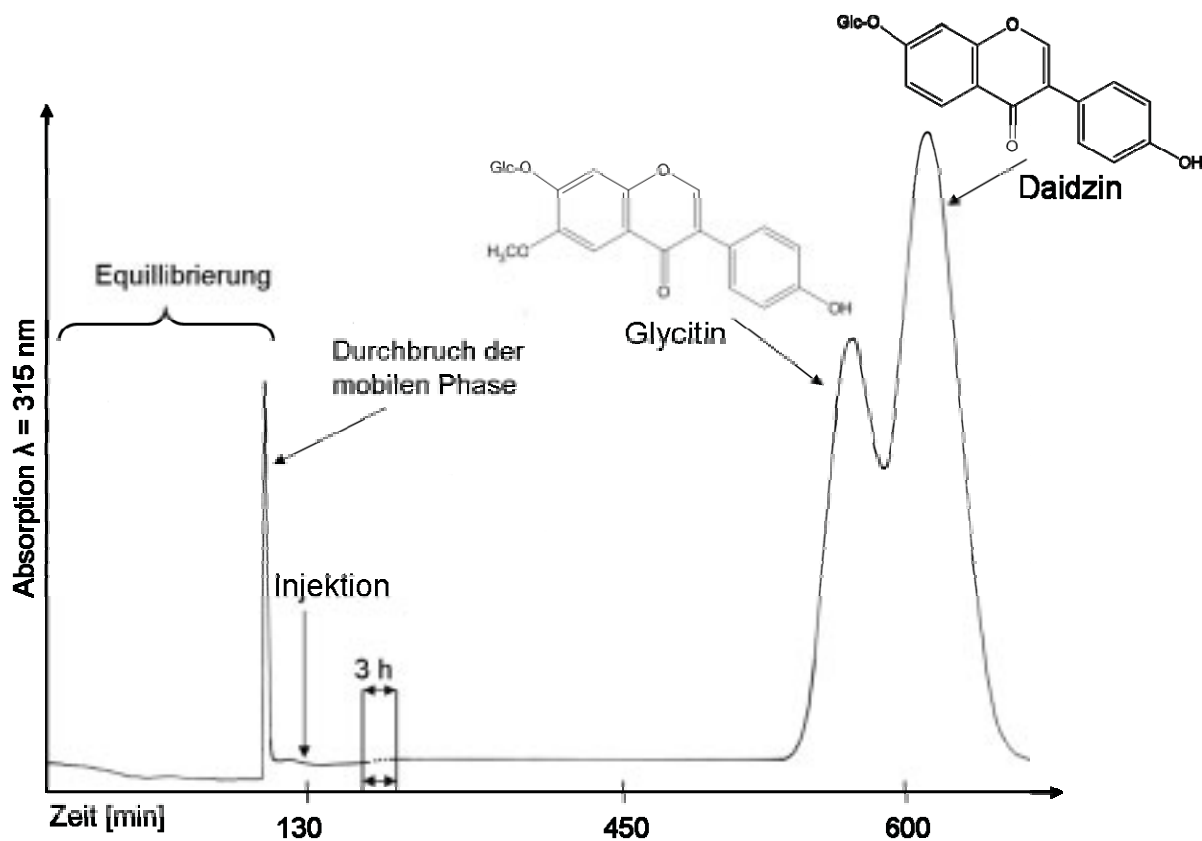


Abbildung 55: HSCCC-Trennung der Fraktion 2 aus der Trennung der Hauptisoflavone des XAD-7-Extraktes von Soja (vgl. Abbildung 54).

Detektiert wurde bei dieser Trennung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 315 \text{ nm}$ , da Glycitin in diesem Bereich ein zweites Maximum besitzt, weshalb eine Trennung eindeutiger zu erkennen ist (Abbildung 56). Deshalb konnte die aufgegebene Probemenge maximiert werden.

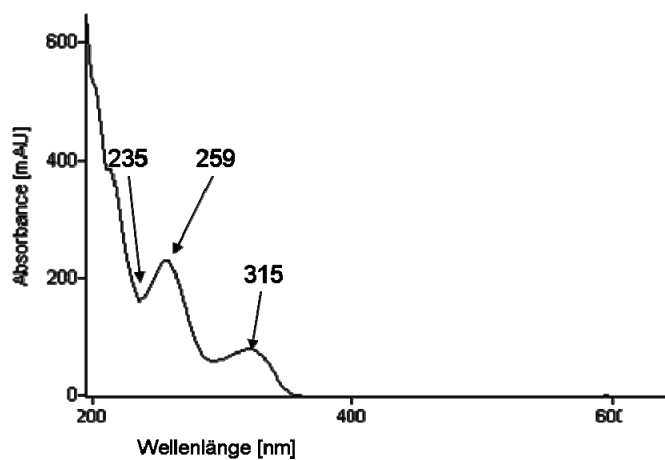


Abbildung 56: UV-Spektrum von Glycitin. Gemessen mittels HPLC-DAD unter Verwendung von Gradient I. Die Maxima liegen bei 259 und 315 nm.

Aufgrund der sehr ähnlichen Polarität beider Isoflavone wurde die vollständige Trennung mittels eines Stufen-Gradienten durchgeführt (s. Abbildung 57). Das Fließmittelsystem 1 bei dieser Trennung bestand aus den Komponenten *tert.*-Butylmethylether/Acetonitril/*n*-Butanol/Wasser im Verhältnis 2/1/2/5 (V/V/V/V). Nach 260 min wurde die mobile Phase durch TBME abgesättigtes Wasser und Acetonitril (im Verhältnis 10/1, V/V) als Fließmittel 2 ausgetauscht. Die Flussrate betrug dabei 2,5 mL/min. Deutlich ist eine Basislinientrennung der beiden Isoflavone zu erkennen, welche jeweils in Reinform vorliegen.

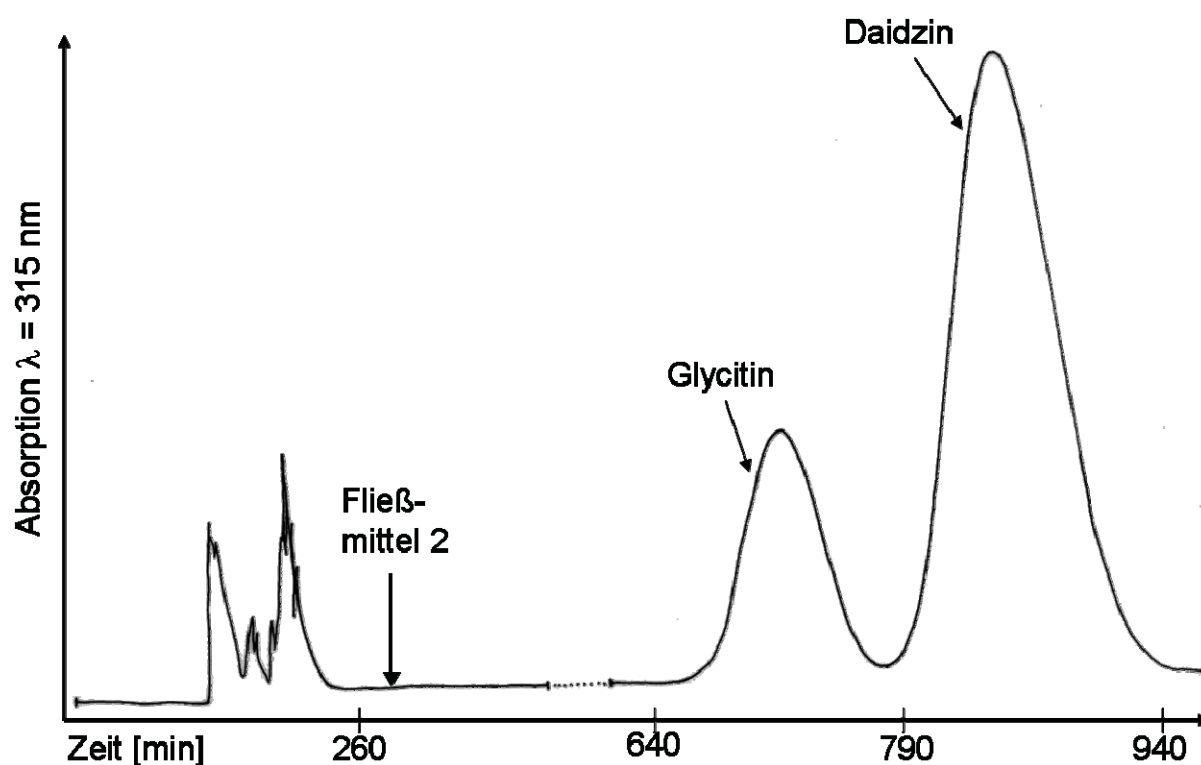


Abbildung 57: HSCCC-Trennung von Glycitin und Daidzin mittels Stufengradienten.

Auf diese Weise konnten mit einer Trennung aus 100 mg der Fraktion 2 von CCC-System 1, (s. Abbildung 54) 86 mg Daidzin sowie 6 mg Glycitin gewonnen werden. Die Identifizierung und strukturelle Aufklärung der einzelnen Isoflavone erfolgte mittels LC-(ESI)-MS-Analysen sowie über NMR. Anhand der Molekülmassen sowie des Fragmentierungsmusters aus der massenspektrometrischen Analyse konnten bei den isolierten Substanzen aus Soja bereits Strukturvorschläge erbracht werden (s. Tabelle 14). Deutlich zu erkennen ist im Falle von Genistin, Daidzin und Glycitin die Abspaltung der Glucose, aufgrund der Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Spektrum, welche eine Differenz von  $m/z = 162$  u aufweist (Abbildung 58). Für die obere Verbindung in dieser Abbildung beträgt das Molekulargewicht des Pseudomoleküls 417 u (positiver Modus,  $[M + H]^+$ ) und weist durch den Verlust eines Fragmentes mit der Masse 162 u auf die Abspaltung einer Hexose hin, wobei das Aglykon die Masse von Daidzein

( $m/z = 254$ ) besitzt. Ähnlich verhält es sich mit dem Isoflavon Glycitin, (Abbildung 58 unten). Dieses weist im Vergleich zu Daidzin an C6 eine zusätzliche Methoxygruppe auf, weshalb das Molekulargewicht um 30 u höher ist. Auch hier ist die Abspaltung einer Hexose-Einheit zu erkennen. Bei beiden Isoflavonen ist in den dargestellten Spektren zusätzlich eine Adduktbildung mit Natrium ( $[M + H]^+ + 22$  u) und Kalium ( $[M + H]^+ + 38$  u) des Moleküls zu erkennen.

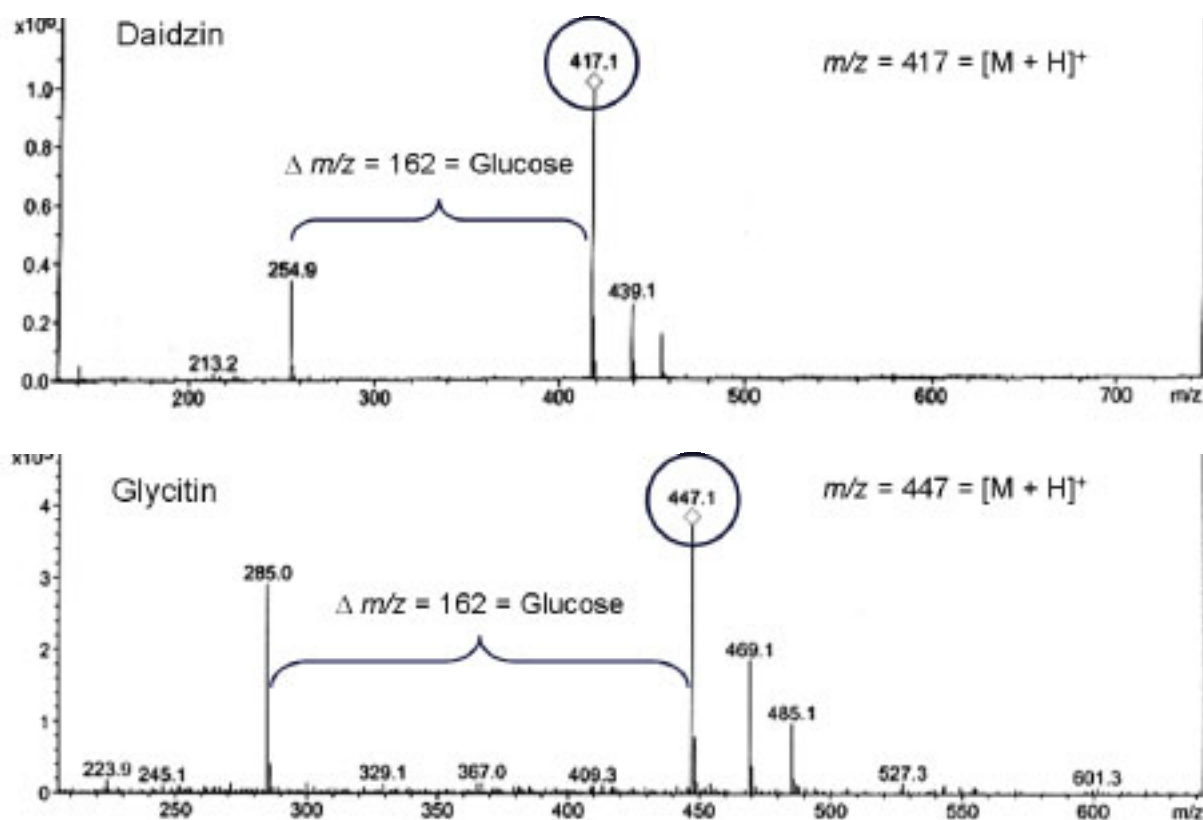


Abbildung 58: LC-(ESI)-MS-Analyse (pos. Modus) der isolierten Isoflavone Daidzin (oben) und Glycitin (unten) aus Soja. Dargestellt sind die Massenspektren der entsprechenden Peaks (Intensität  $\times 10^6$ ).

Bei der CCC-Fraktion 4 sowie bei der Coilfraktion ergibt sich jeweils eine typische Differenz vom Molekülion  $[M + H]^+$  zum Basepeak im MS<sup>2</sup>-Modus, die 204 Masseneinheiten entspricht. Dieses deutet eindeutig auf eine Hexoseeinheit hin, welche mit Essigsäure verestert vorliegt (es handelt sich dabei um eine Acetyl-glucose), woher die Abspaltung von  $m/z = 204 = 162 + 42$  (= Glucose + Acetyl) herrührt. Die Majorfragmente in den jeweiligen Tochterionenspektren beziehen sich immer auf das jeweilige substituierte Isoflavongerüst. So wird z.B. im Falle des Genistins bei der LC-(ESI)-MS-Analyse im positiven Ionisationsmodus ein Pseudomolekülion bei  $m/z = 433$   $[M + H]^+$  erhalten und eine Fragmentierung zu  $m/z = 271$   $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$  im MS<sup>2</sup>-Modus, was dem Molekülion des Isoflavons Genistein (Aglykon-Form) entspricht.

Tabelle 14: Massenspektrometrische Analyse der HSCCC-Fractionen aus Soja.

| CCC-Fraktion                    | $[M + H]^+ \ m/z$ | MS/MS von<br>$[M + H]^+ \ m/z$ | $\Delta \ m/z$ | Isoflavon             |
|---------------------------------|-------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------|
| 3 (Abbildung 54)                | 433               | 271                            | 162            | Genistin              |
| 4 (Abbildung 54)                | 459               | 255                            | 204            | 6''-O-Acetyl-daidzin  |
| Coilrückstand<br>(Abbildung 54) | 475               | 271                            | 204            | 6''-O-Acetyl-genistin |
| 1 (Abbildung 57)                | 447               | 285                            | 162            | Glycitin              |
| 2 (Abbildung 57)                | 417               | 255                            | 162            | Daidzin               |

Die eindeutige Identifizierung aller isolierten Isoflavone aus Soja erfolgte mittels NMR-Experimenten, deren Daten vollständig unter Kapitel 4.3 angegeben werden. An dieser Stelle soll nur kurz auf Besonderheiten in den NMR-Spektren der isolierten Isoflavone eingegangen werden. Als Beispiel wird hierfür das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Daidzin in der folgenden Abbildung 59 dargestellt.

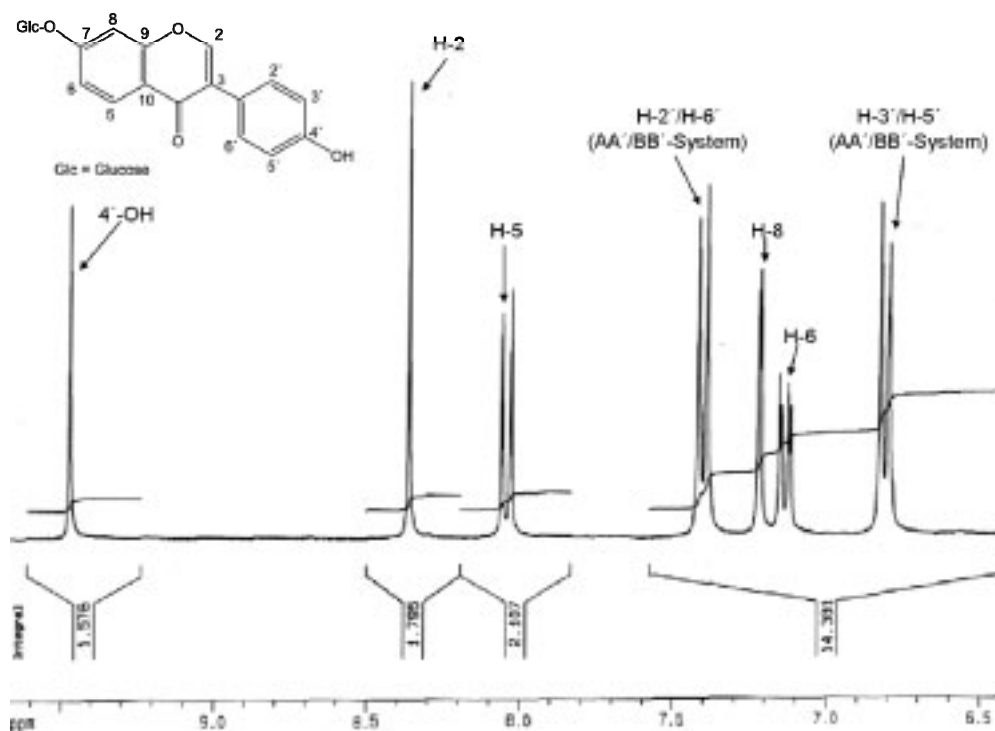


Abbildung 59:  $^1\text{H}$ -NMR von Daidzin (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) im aromatischen Bereich. Nicht dargestellt ist der spektrale Bereich, in dem die Signale der  $\beta$ -Glucose (3.12-5.35 ppm) liegen.

Deutlich zu erkennen ist in Abbildung 59 das AA'/BB'-System der unsubstituierten Protonen des B-Ringes, die sich in zwei Multipletts im Bereich von 6.81 und 7.40 ppm darstellen. Anhand dieser beiden Signale lässt sich der para-disubstituierte phenolische Ring mit zwei unterschiedlichen Substituenten (am C4' die Hydroxylgruppe und am C1' der restliche Chromanring) gut erkennen. Es herrscht eine gewisse Spiegelbildisomerie innerhalb dieses Ringes, wobei jedoch die Protonen 3'/5' und 2'/6' nicht äquivalent sind. Die Zusammengehörigkeit dieser beiden Signale wird ebenfalls durch den resultierenden Dacheffekt ausgedrückt, welcher einen Effekt höherer Ordnung darstellt. Dabei liegen die chemischen Verschiebungen (gemessen in Hz) zweier Protonen A und B nicht sehr viel weiter auseinander als  $J_{AB}$  und es treten bei den Kopplungsmultipletts Abweichungen von den idealen Linienintensitäten auf. Dabei sind die Linien, die im Spektrum dem Signal des Kopplungspartners zugewandt sind, mit einer höheren Intensität gekennzeichnet. Für die Isoflavone ist das Signal des H2-Protons ein wichtiges Charakteristikum, da es die Verknüpfung der Chromanstruktur mit dem B-Ring aufzeigt und sich dadurch von den Flavonen unterscheidet. Ein Singulett bei 8.36 ppm lässt eindeutig auf ein Proton in stark elektronegativer Umgebung (d.h. H2) schließen. Das H6-Proton spaltet sich in ein Dublett von Dubletts auf, da es sowohl mit dem H5-Proton als auch mit H8 koppelt (Abbildung 59). Isoflavone sind oftmals schwerlöslich, lassen sich jedoch in polarem Dimethylsulfoxid relativ gut lösen, weshalb dieses in deuterierter Form zur Aufnahme der NMR-Spektren verwendet wird. DMSO verlangsamt den Protonen-Austausch von Hydroxyl-Gruppen (sowie NH-Gruppen) und ist deshalb als Lösungsmittel nützlich, sobald das Kopplungsmuster dieser Gruppen bestimmt werden soll. Auch im obigen Beispiel kommt es zum Austausch der Protonen der 4'-OH-Gruppe (vicinale Kopplung), so dass diese bei 9.47 ppm als Singulett sichtbar ist. Die Signale der OH-Protonen können dabei zum Teil in sehr tiefes Feld (12.90 ppm) verschoben werden, was u.a. der Fall ist bei der Hydroxylgruppe an Position 5 des Isoflavons, wie es zum Beispiel im Spektrum des Genistins zu beobachten ist. Liegt ein an der Position C6'' acetyliertes Isoflavon-Glucosid vor, so sind die drei Protonen der CH<sub>3</sub>-CO-Gruppe als Singulett im Bereich von etwa 2.01 ppm zu erkennen (s. Tabelle 15). Dies kann durch das entsprechende <sup>13</sup>C-NMR verifiziert werden, da dort einerseits die Methoxy-Einheit im aliphatischen Bereich bei ca. 20 ppm detektierbar ist, sowie andererseits die Carbonyl-Einheit in dem für sie typischen Bereich bei ca. 170.1 ppm in Resonanz tritt [Markham et al., 1978].

Tabelle 15:  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von Genistin und 6''-O-Acetyl-genistin im Vergleich (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )

|                     | Genistin       |                     | 6''-O-Acetyl-genistin |                     |
|---------------------|----------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| Position            | $\delta$ (ppm) | Signal, $J$ (Hz)    | $\delta$ (ppm)        | Signal, $J$ (Hz)    |
| 2                   | 8.40           | s                   | 8.40                  | s                   |
| 6                   | 6.46           | d, 2.5              | 6.47                  | d, 2.0              |
| 8                   | 6.71           | d, 2.5              | 6.69                  | d, 2.0              |
| 2'/6'               | 7.39           | m, -                | 7.39                  | m, -                |
| 3'/5'               | 6.82           | m, -                | 6.82                  | m, -                |
| 1''                 | 4.99           | d, 7.0              | 5.01                  | d, 7.0              |
| 2''/3''             | 3.44           | m, -                | 3.13-3.32             | m, -                |
| 4''                 | 3.13-3.22      | m, -                | 3.13-3.32             | m, -                |
| 5''                 | 3.69           | d, 5.5              | 3.69-3.76             | m, -                |
| 6a''                | 3.69           | d, 5.5              | 4.06                  | m, -                |
| 6b''                | 3.72           | d, 5.0              | 4.31                  | m, -                |
| 4'-OH               | 9.55           | s, -                | 9.55                  | s, -                |
| 5-OH                | 12.90          | s <sub>br</sub> , - | 12.90                 | s <sub>br</sub> , - |
| CH <sub>3</sub> -CO | -              | -                   | 2.01                  | s, -                |

Die Hydroxylgruppen der Glucose, welche einen H/D-Austausch vornehmen und deswegen im Spektrum sichtbar sind, werden in dieser Tabelle nicht mit aufgeführt.

Problematisch bei der Isolierung von Isoflavonen aus Soja ist deren schlechte Löslichkeit, weshalb die für eine CCC-Trennung verwendete Probenmenge bislang nicht beliebig maximiert werden kann. Nach den HSCCC-Trennungen lagen die Isoflavone in den entsprechenden Reagenzgläsern in reiner und hochkonzentrierter Form vor. Deshalb bildeten sich in diesen Reagenzgläsern teilweise innerhalb kurzer Zeit Kristalle aus, welche sehr schwer löslich sind. Abbildung 60 zeigt ein solches Reagenzglas nach einer HSCCC-Trennung, wobei es sich um das Isoflavon Glycitin handelt, welches in weißen, fadenartigen Kristallen ausfällt.



Abbildung 60: Kristallbildung des Isoflavons Glycitin nach der HSCCC-Trennung.

### 3.2.3 Isolierung von Isoflavonen aus Rotklee (*Trifolium pratense* L.)

Zur Isolierung von Isoflavonen aus Rotklee wurde zunächst ähnlich wie bei der Isolierung aus Soja vorgegangen. Dabei wurde zuerst ein Extrakt hergestellt, in dem die betreffenden Isoflavone angereichert vorliegen. Rotklee weist eine Reihe von Isoflavonen auf, welche unterschiedliche Polaritäten besitzen (vgl. 1.3.3). Daher wurden mit diesem Extrakt verschiedene Trennungen mittels HSCCC vorgenommen. Darüber hinaus konnte über eine vorgeschaltete Säulenchromatographie an Polyamid-Material dieser Extrakt weiter aufgetrennt werden, wobei die enthaltenen Minorkomponenten in bestimmten Fraktionen angereichert vorliegen. Diese können ebenfalls für weitere Trennung mittels HSCCC verwendet werden (s.u.).

#### 3.2.3.1 Extraktion und Anreicherung

Für die Isolierung der Isoflavone wurde ein Rohextrakt aus Rotklee von der Firma Pfannenschmidt (Hamburg) erworben, wobei es sich um einen ethanolisch-wässrigen Extrakt handelt, welcher eine grün-braune Farbe aufweist (vgl. 4.1.2). Eine Aufreinigung dieses Rohextraktes erfolgte säulenchromatographisch mit Hilfe von XAD-7-Adsorberharz (Amberlite®). Dabei adsorbieren phenolische Verbindungen sowie deren Glykoside an dem

XAD-Material, während andere Komponenten des Rohextraktes (wie z.B. Proteine) durch einen folgenden Elutionsschritt mit destilliertem Wasser entfernt werden können. Mit Methanol konnten die phenolischen Bestandteile (im vorliegenden Fall Isoflavone) vom XAD-7-Material eluiert werden. Das erhaltene Eluat wurde *in vacuo* abdestilliert und der Rückstand gefriergetrocknet. Der auf diese Weise erhaltene Extrakt wurde zur Trennung mittels HSCCC eingesetzt. Die Vorgehensweise wird in Abbildung 61 verdeutlicht, wobei teilweise Reinsubstanzen erhalten wurden, während andere Fraktionen einer weiterführenden Aufreinigung bedurften (s.u.). Die verschiedenen Trennungen werden in den folgenden Unterkapiteln aufgeführt.



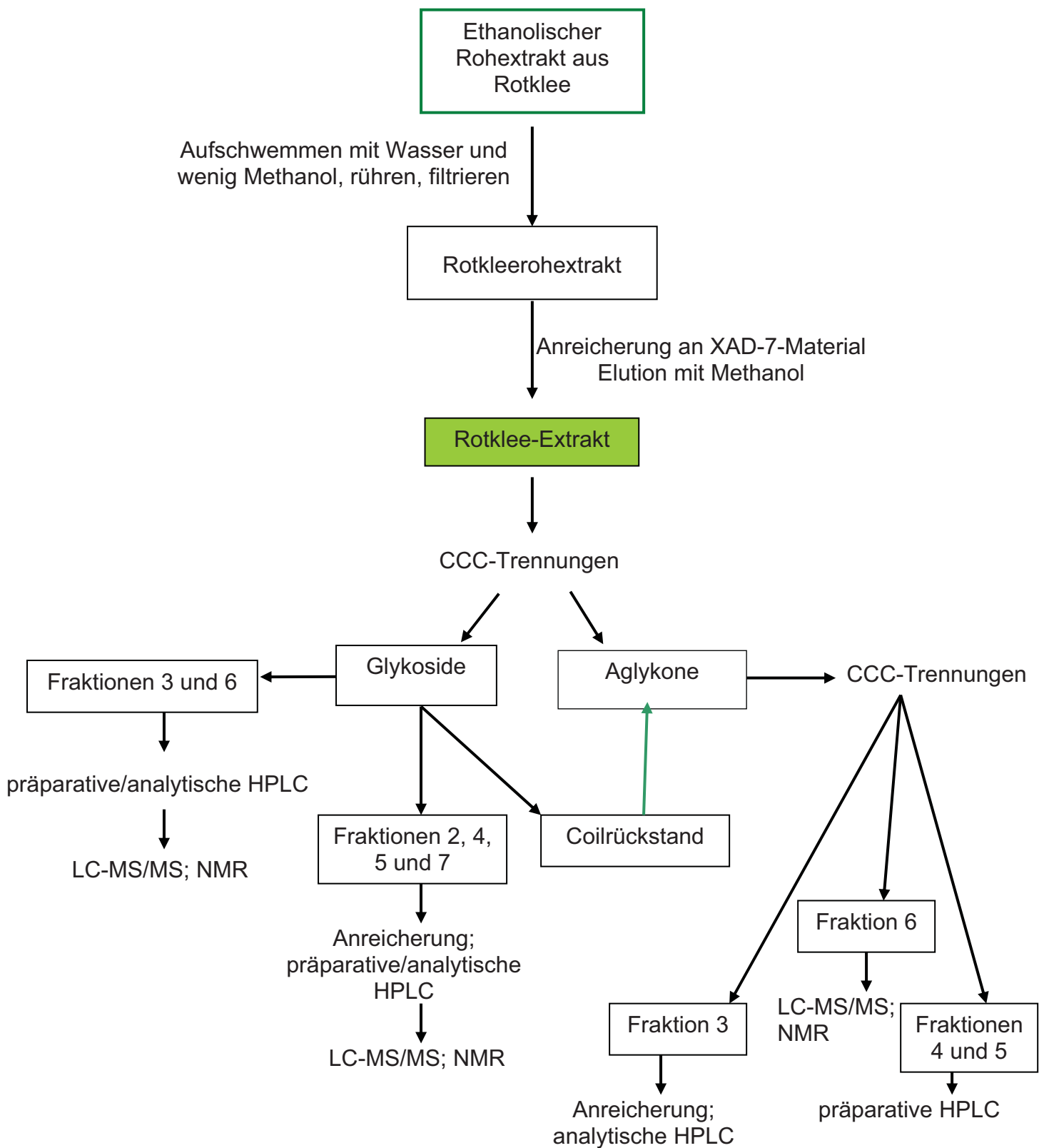


Abbildung 61: Übersicht über die Isolierung von Isoflavonen aus Rotklee.

### 3.2.3.2 HSCCC-Trennung eines Rotkleeextraktes

Für die Isolierung von Isoflavonen aus Rotklee wurden verschiedene Fließmittelsysteme benutzt, wobei für deren Auswahl entscheidend ist, ob die Isoflavone in glykosidisch gebundener Form oder als Aglykon isoliert werden sollten.

Als Fließmittelsystem zur Trennung der glykosidisch gebundenen Isoflavone aus Rotklee (s. Abbildung 62) wurde ein Gemisch aus *tert.*-Butylmethylether/Acetonitril/Wasser im Verhältnis 6/3/8 (V/V/V) verwendet. Gearbeitet wurde im Head-to-Tail-Modus, wobei die leichtere Phase als stationäre Phase fungierte. Die Flussrate betrug bei dieser Trennung 2,8 mL/min und die Umdrehungsgeschwindigkeit der Coils des Countercurrent Chromatographen 600 U/min. Die Trennung wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 254$  nm aufgezeichnet.

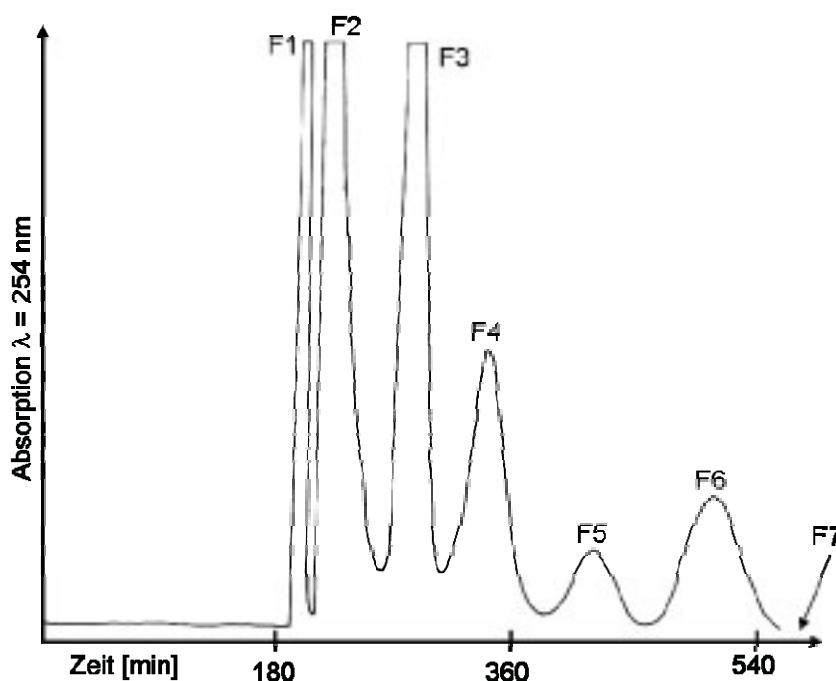


Abbildung 62: HSCCC-Trennung der glykosidisch gebundenen Isoflavone aus Rotklee.

Bei der Trennung der glykosidisch gebundenen Isoflavone aus Rotklee (*Trifolium pratense* L.) wurden sieben Fraktionen erhalten (Abbildung 62). Auf dem Coil verbleibt überdies ein weiterer Rückstand, welcher größtenteils Isoflavon-Aglykone enthält. (Darauf wird später erneut drauf eingegangen.) Nach Entfernung der organischen Lösungsmittel und anschließender Lyophilisation wurden die Fraktionen mittels HPLC-DAD sowie LC-(ESI)-MS<sup>n</sup> analysiert und gegebenenfalls weiterführend über präparative HPLC aufgereinigt.

Die Hauptfraktion dieser Trennung (vgl. Abbildung 62) ist Fraktion 3. Laut den massenspektrometrischen Daten weist die Hauptkomponente (Gehalt liegt bei ungefähr 85%) dieser Fraktion eine Masse von  $m/z = 431$   $[M + H]^+$  auf und wird zu  $m/z = 269$   $[M + H -$

Anhydroglucose]<sup>+</sup> fragmentiert, was der Massendifferenz eines abgespaltenen Monosaccharids (z.B. Glucose) entspricht. Das Massenfragment mit  $m/z = 269$  u entspricht dem Pseudomolekülion von Formononetin, eines der Hauptisoflavone aus Rotklee. Die Daten dieser MS-Analyse deuten auf das Isoflavon Ononin (Formononetin-7-O- $\beta$ -D-glucosid) hin, was nach einer Aufreinigung über semipräparative HPLC und folgenden NMR-Experimenten bestätigt werden kann. Die für das Isoflavon-Grundgerüst typischen Signale werden dabei alle erhalten, wobei insbesondere das Singulett von H2 zu erwähnen ist (<sup>1</sup>H:  $\delta = 8.41$  ppm), sowie das Dublett von H6 (<sup>1</sup>H:  $\delta = 7.14$  ppm;  $J = 9.0$  Hz) und H5 (<sup>1</sup>H:  $\delta = 8.05$  ppm;  $J = 9.0$  Hz), wodurch wertvolle Informationen über das Substitutionsmuster erhalten werden. Folglich ist am C5 des A-Ringes ein Wasserstoffatom substituiert und darüber hinaus zeigt der A-Ring das typische Aufspaltungsmuster eines para-disubstituierten Isoflavons. Das Dublett des anomeren H1''-Protons der Glucose ist hochfeldig nach 5.09 ppm verschoben, was grundsätzlich darauf hindeutet, dass die Glucose an einen elektronegativen Partner (hier: Isoflavon) gebunden ist, wobei die Bindung unter Wasserabspaltung am C1''-Atom der Glucose erfolgte. Die Kopplungskonstante dieses Protons ist mit 7.5 Hz typisch für eine  $\beta$ -Konfiguration des anomeren C-Atoms. Die übrigen Glucose-Resonanzen treten zwischen 3.12 und 3.72 ppm in ihren typischen Aufspaltungsmustern auf.

Als weitere Majorfraktion bei dieser Trennung wurde das Isoflavon Sissotrin (Biochanin A-7-O- $\beta$ -D-glucosid) in fast reiner Form (97%ig) in Fraktion 6 erhalten. Fraktion 2 besteht aus einem Gemisch von verschiedenen Minorkomponenten, wie malonylierten Isoflavonen sowie einigen Glykosiden. Sie stellt ein sehr komplexes Gemisch dar und wird im Anschluss (s.u.) weiter über eine Festphasenextraktion an Sephadex aufgetrennt. Hauptsächlich ist in Fraktion 4 das Irilon-4'-O- $\beta$ -D-glucosid enthalten, welches über semipräparative HPLC weiter aufgereinigt wird. Ein Konstitutionsisomer des Sissotrins ist in Fraktion 5 angereichert. Dabei handelt es sich um das Isoflavon Trifosid (Prunetin-4'-O- $\beta$ -D-glucosid). Als Minorfraktion kann die 7. Fraktion (s. Abbildung 62) betrachtet werden, da diese mengenmäßig eine unbedeutende Rolle spielt. Dabei handelt es sich um ein weiteres glucosidisch gebundenes Konjugat des Formononetins, wobei die veresterte Glucose an der 6''-Position einen Acetylrest (<sup>1</sup>H:  $\delta = 2.10$  ppm; <sup>13</sup>C:  $\delta = 20.5$  ppm für das C-Atom der Methylgruppe und 170.1 ppm für  $\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{C}}\text{O}$ ) aufweist (Formononetin-7-O- $\beta$ -D-glucosid-6''-O-acetat). Das Ergebnis der NMR-Analyse bezüglich dieser Fraktion wurde durch die massenspektrometrische Analyse untermauert, da im MS/MS-Spektrum das Pseudomolekülion mit der Masse  $m/z = 473 = [\text{M} + \text{H}]^+$  zu dem Molekülion  $m/z = 269$  ( $[\text{M} + \text{H} - \text{Anhydroacetylglucose}]^+$ ) fragmentiert. Eine Übersicht über die strukturelle

Zusammensetzung der isolierten glucosidisch gebundenen Isoflavone aus Rotklee gibt Abbildung 63.

| Isoflavon       | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>      | R <sub>4</sub> |
|-----------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|
| Ononin          | Me             | H              | H                   | Glc            |
| Sissotrin       | Me             | OH             | H                   | Glc            |
| Trifosid        | Glc            | OH             | H                   | Me             |
| Irilon-glucosid | Glc            | OH             | -OCH <sub>2</sub> - |                |
| Acetyl-Ononin   | Me             | H              | H                   | Glc-Ace        |

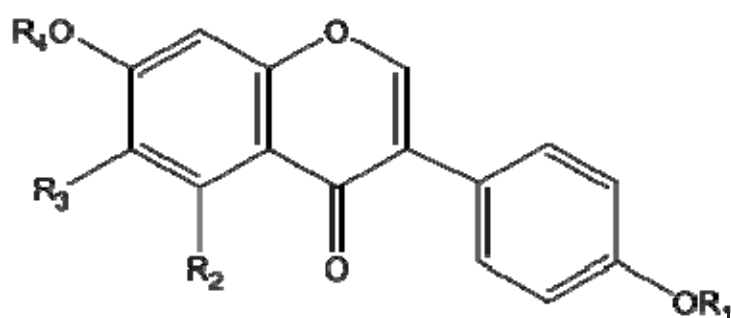


Abbildung 63: Übersicht über die aus Rotklee isolierten glucosidisch gebundenen Isoflavone.

Die Identifizierung zweier der glucosidisch gebundenen Majorisoflavone konnte nur anhand von 2D-NMR-Analysen erfolgen, da die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Spektren keinen Schluss auf die tatsächliche Substitution des Isoflavon-Grundkörpers zulassen (Tabelle 16). Die Datenlage in der Literatur ist überdies widersprüchlich, da teilweise identische Daten für die beiden Konstitutionsisomere Sissotrin und Trifosid angegeben werden. Sie unterscheiden sich jeweils in der Stellung der Glucose und der Methoxy-Gruppe, die an der Position 7 und 4' substituiert sind. Bei beiden Isoflavonen ist die Substitution jeweils genau entgegengesetzt getauscht [Kattaev et al., 1972; Lewis et al., 1998].

Tabelle 16: Vergleich der erhaltenen NMR-Daten der Konstitutionsisomere Sissotrin und Trifosid.

| Position            | Sissotrin                                  |                                  | Trifosid                                   |                                  |
|---------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
|                     | $^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm); ( $J$ (Hz)) | $^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm) | $^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm); ( $J$ (Hz)) | $^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm) |
| 2                   | 8.45: s                                    | 154.7                            | 8.47: s                                    | 154.5                            |
| 3                   | -                                          | 122.6                            | -                                          | 123.9                            |
| 4                   | -                                          | 180.3                            | -                                          | 180.2                            |
| 5                   | -                                          | 161.6                            | -                                          | 165.3                            |
| 6                   | 6.46: (d, 2.0)                             | 99.6                             | 6.43: s                                    | 98.1                             |
| 7                   | -                                          | 163.0                            | -                                          | 161.7                            |
| 8                   | 6.71: (d, 2.0)                             | 94.5                             | 6.64: s                                    | 92.4                             |
| 9                   | -                                          | 157.1                            | -                                          | 155.1                            |
| 10                  | -                                          | 106.0                            | -                                          | 105.4                            |
| 1'                  | -                                          | 122.2                            | -                                          | 122.1                            |
| 2'/6'               | 7.52; m                                    | 130.1                            | 7.51; m                                    | 129.9/130.1                      |
| 3'/5'               | 7.0; m                                     | 113.0                            | 7.08; m                                    | 115.8/116.3                      |
| 4'                  | -                                          | 159.2                            | -                                          | 157.4                            |
| 1''                 | 4.99: (d, 5.0)                             | 99.9                             | 5.02: (d, 5.5)                             | 100.3                            |
| 2''                 | 3.43; m                                    | 73.0                             | 3.43; m                                    | 73.2                             |
| 3''                 |                                            | 76.4                             |                                            | 76.6                             |
| 4''                 | 3.13-3.24; m                               | 69.6                             | 3.13-3.24; m                               | 69.7                             |
| 5''                 | 3.69; m                                    | 77.1                             | 3.69; m                                    | 77.0                             |
| 6a''                | 3.72; m                                    | 60.6                             | 3.77, m                                    | 60.7                             |
| 6b''                | 3.49; m                                    |                                  | 3.49; m                                    |                                  |
| 4'-OCH <sub>3</sub> | -                                          | -                                | -                                          | -                                |
| 7-OCH <sub>3</sub>  | 3.79: s                                    | 55.1                             | 3.85: s                                    | 56.0                             |
| 5-OH                | 12.81; s <sub>br</sub>                     | -                                | 12.84; s                                   | -                                |

Die Hydroxylgruppen der Glucose, welche einen H/D-Austausch aufgrund des Lösungsmittels DMSO vornehmen und daher im Spektrum sichtbar sind, sind in dieser Tabelle nicht dargestellt.

Anhand von  $^{2,3}J$  C-H Long-Range Korrelationen kann erkannt werden, um welches der beiden Konstitutionsisomere es sich handelt. Dabei werden die Korrelationen sichtbar,

welche sich über die Entfernung von 2 oder 3 Bindungen erstrecken. Die Konformation der Glucose wird in dem jeweiligen Molekül sichtbar. Im Falle des Sissotrins wird die Bindung an C7 dadurch bestätigt, dass im HMBC-Spektrum eine deutliche Korrelation zwischen dem anomeren H1'' ( $\delta = 4.99$  ppm) und dem C7 ( $\delta = 163.0$  ppm) zu erkennen ist (s. Abbildung 64 in Zusammenhang mit Abbildung 65). Im Gegensatz dazu ist bei den HMBC-Experimenten des Trifosids eine Korrelation des anomeren H-Atoms mit dem C4'-Atom zu erkennen ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ : 5.02/157.4 ppm).

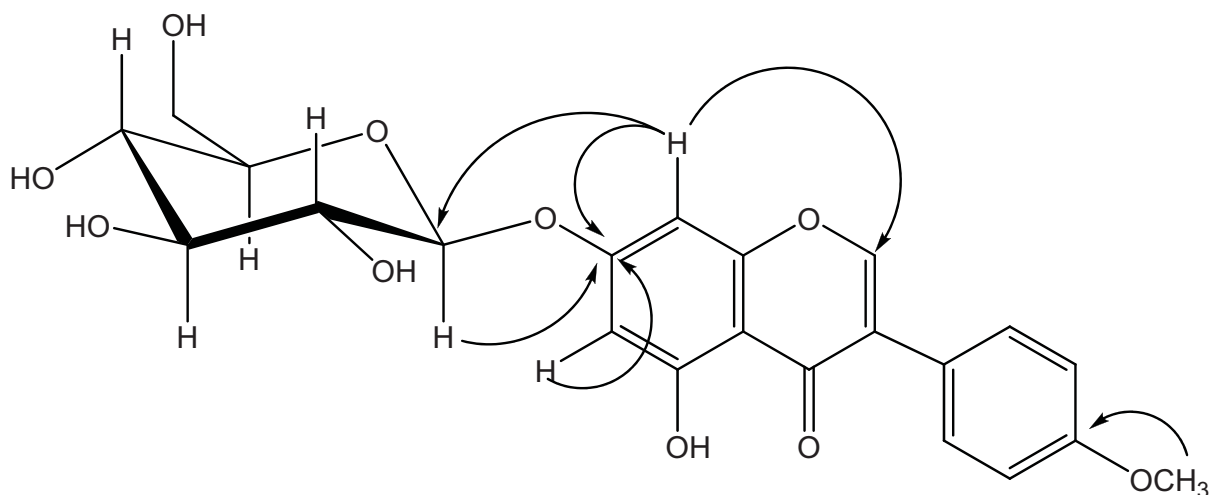


Abbildung 64: Relevante  $^2,3J$  C-H Long-Range Kopplungen (HMBC) von Sissotrin, zur Abklärung der Bindungsstelle der Glucose.

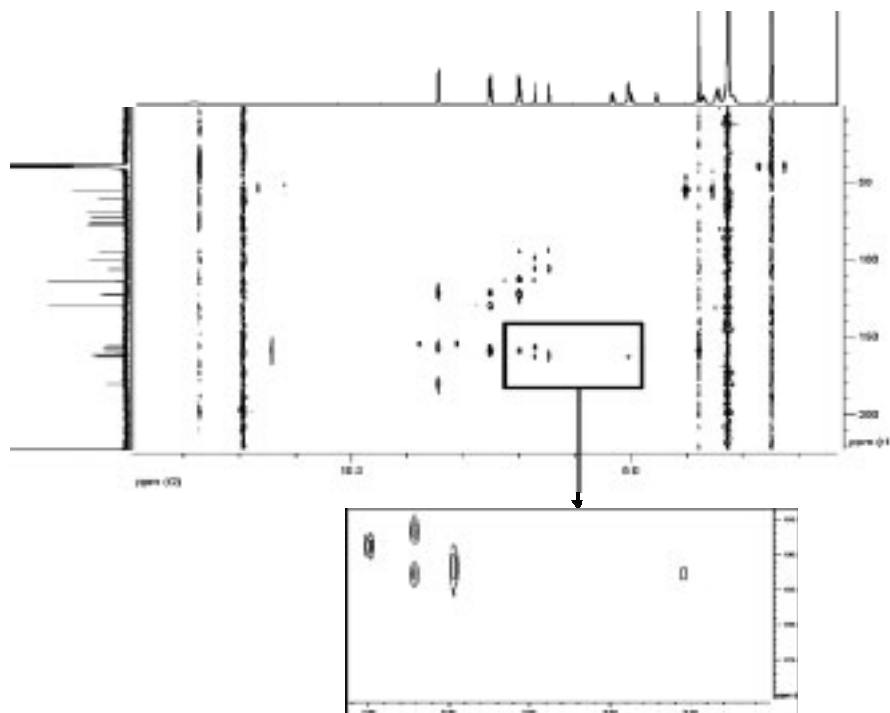


Abbildung 65: Heteronukleare Fernkorrelation des HMBC-Experiments von Sissotrin: Darstellung der zur Deutung der glucosidischen Bindung wichtigen Korrelationspunkte.

Das isolierte und charakterisierte Isoflavon Ononin aus Fraktion 3 ist teilweise durch das Isoflavon Rothindin verunreinigt, welches mit drei Hydroxylgruppen substituiert sowie einer Glucose verestert ist. Von diesem Isoflavon liegen bislang nur die massenspektrometrischen Daten vor, daher sollte die Struktur mittels NMR-Spektroskopie bestätigt werden.

Aufgrund ihrer geringen Polarität eluierten die Aglykone bei der Verwendung des oben beschriebenen Fließmittelsystems nicht und reichert sich zusammen mit unpolaren phenolischen Verbindungen auf dem Coil an. Nach Entfernung der verbliebenen Lösungsmittel *in vacuo* und anschließender Gefriertrocknung kann das entstandene Lyophilisat zur weiteren Trennung der Aglykone verwendet werden. Wird der Rohextrakt als solcher bei der HSCCC eingesetzt, so werden die gleichen Fraktionen erhalten, wobei jedoch größere Mengen injiziert werden müssen. Bei den weiter aufzureinigenden Fraktionen treten, verglichen mit dem getrockneten Coilrückstand der Trennung der glykosidisch gebundenen Isoflavone aus Rotklee, teilweise größere Verunreinigungen auf. Außerdem kann es durch die weiteren Inhalts- und Begleitstoffe zu Beeinträchtigungen bei der Trennung kommen, wobei gegebenenfalls die Trennschärfe abnimmt. Durch eine Extraktion des Rohextraktes mit Ethylacetat erfolgt ebenfalls eine Anreicherung der phenolischen Bestandteile in der organischen Phase. Bei einer Trennung unter Verwendung eines auf diese Weise hergestellten Extraktes werden die gleichen Ergebnisse erzielt wie bei der Verwendung des XAD-7-Extraktes. Eine Abtrennung des im Klee vorhandenen Chlorophylls mit Pentan oder Heptan erwies sich als nicht vorteilhaft, da auch nach mehrmaligem Auszug weiterhin Chlorophylle in der Probe enthalten sind und es durch diese weitere Aufarbeitung zu Verlusten an Probenmaterial kommen kann. Ebenso wurde nicht verifiziert, ob es durch diese Behandlung möglicherweise zu einer Verringerung des Isoflavon-Gehaltes wie z.B. der unpolaren Aglykone in dem Extrakt kommen kann.

Für die Anreicherung und Isolierung von Isoflavon-Aglykonen aus dem Coil-Rückstand oder aus dem XAD-7-Extrakt war die Verwendung eines Fließmittels mit einer deutlich geringeren Polarität erforderlich. Dies kann durch eine Erhöhung des Anteils an TBME im Gemisch erfolgen, jedoch wurde bei den nachfolgenden Trennungen auf ein komplett anderes Fließmittelgemisch zurückgegriffen, welches individuell an die Polaritäten der zu trennenden Isoflavone angepasst wurde. Das binäre Gemisch aus Hexan/EtOAc/Methanol/H<sub>2</sub>O im Verhältnis 6/5/6/5 (V/V/V/V) war für die Trennung der Aglykone aus Rotklee gut geeignet (s. Abbildung 66). Dabei betrug der Fluss der mobilen Phase 3,0 mL/min und die Umdrehungsgeschwindigkeit des Coils 800 U/min. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm [Stürtz et al., 2006].

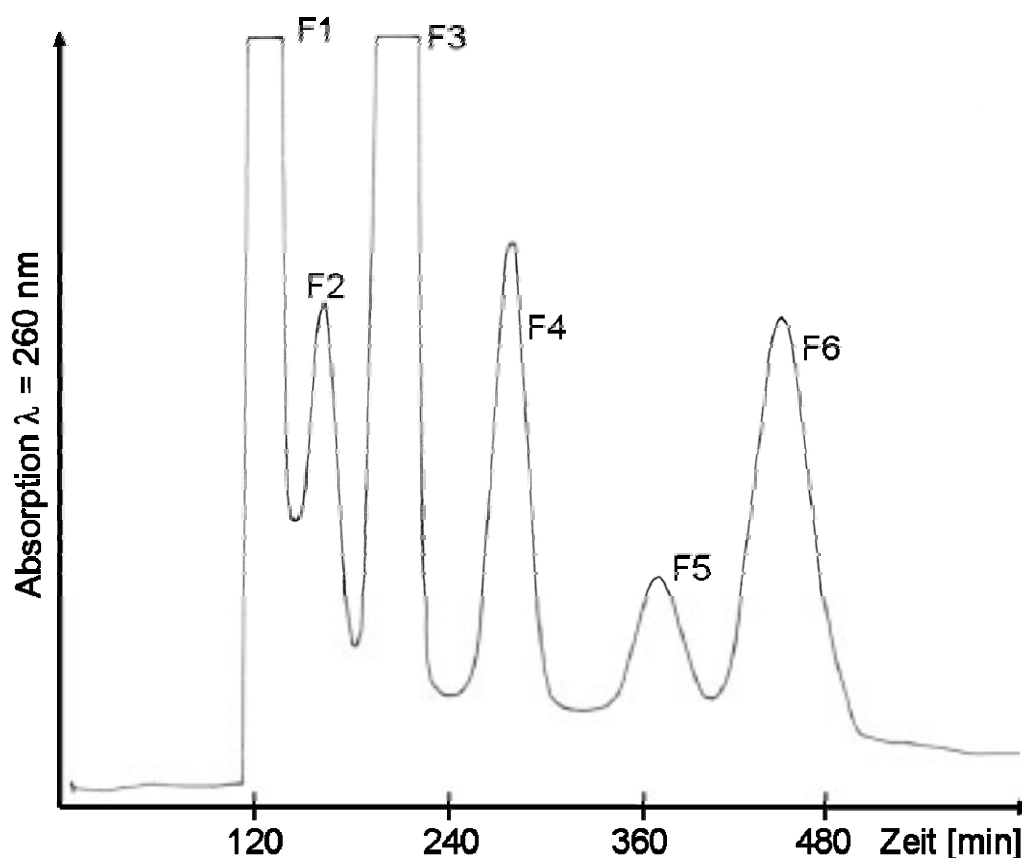


Abbildung 66: HSCCC-Lauf der Trennung von Isoflavon-Aglykonen aus Rotklee.

Bei der Trennung der Isoflavon-Aglykone aus Rotklee wurden sechs Fraktionen erhalten (vgl. Abbildung 66). Diese wurden alle mittels HPLC-DAD sowie LC-(ESI)-MS<sup>n</sup> untersucht. In einigen Fraktionen lagen Reinsubstanzen vor, deren Identität direkt mittels NMR-Experimenten bestimmt werden konnte. Das Isoflavon Biochanin A wird bei dieser Trennung als reine Komponente in Fraktion 6 erhalten (97%ig). Die Fraktion 3 besteht aus dem Majorisoflavin des Rotklee, dem Formononetin. Es wurde mit einer Reinheit von 90±5% erhalten, welche mit der jeweiligen Einwaage und dem für die Trennung verwendeten Extrakt variiert. Eine weitere Aufreinigung des Formononetins erfolgte mit Hilfe der analytischen HPLC, da sich auf anderem Wege (z.B. präparative HPLC oder Säulenchromatographie) die Verunreinigungen nicht abtrennen liessen. Die Majorkomponenten aus den anderen Fraktionen wurden mittels semipräparativer HPLC isoliert, wonach sich die strukturelle Charakterisierung anschließt. Als Majorkomponente in Fraktion 4 ist das Isoflavon Irilon enthalten, wobei eine der Verunreinigungen ein weiteres Isoflavon mit einer Methylenedioxygruppe darstellt – das Pseudobaptigenin. Das semipräparative HPLC-Chromatogramm dieser Trennung ist in Abbildung 67 dargestellt.



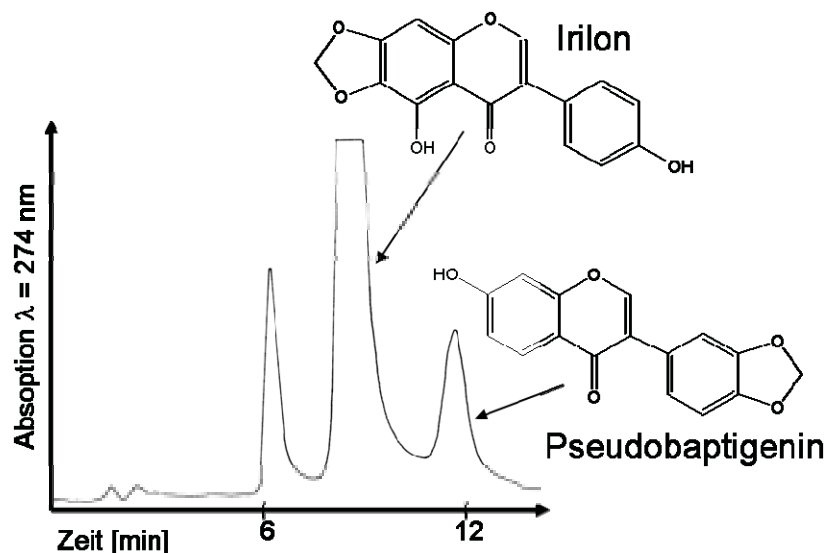


Abbildung 67: Aufreinigung der Fraktion 4 der HSCCC-Trennung der Isoflavon-Aglykone aus Rotklee mittels semipräparativer HPLC.

Ein Konstitutionsisomer von Biochanin A ist in Fraktion 5 als Hauptkomponente enthalten, wobei es sich um das Isoflavon Prunetin handelt, bei dem die Methoxygruppe im Molekül am C7-Atom des A-Ringes sitzt. Zwei der funktionellen Gruppen (Methoxy- und Hydroxyl-) sind bei diesen beiden Isoflavonen jeweils genau entgegengesetzt positioniert. Eine wertvolle Information über die Substitution in dem jeweils vorliegenden Molekül konnte durch eine massenspektrometrische Analyse erfolgen. Ein MS/MS-Fragmentierungsweg für Isoflavone wird vorgeschlagen, wobei sich der C-Ring in einer Retro-Diels-Alder (RDA) Reaktion öffnet. Die Reaktion kann als Umkehrung der Diels-Alder-Reaktion angesehen werden, bei der es sich um eine (2 + 4)- Cycloaddition handelt. Dabei entsteht ein so genanntes Retro-Diels-Alder Fragment-Ion [Wu et al., 2002]. Mit den Massendaten dieses Fragment-Ions sowie dem zweiten Teil des fragmentierten Isoflavons können Rückschlüsse auf die jeweilige Substitution erfolgen (vgl. Abbildung 68).

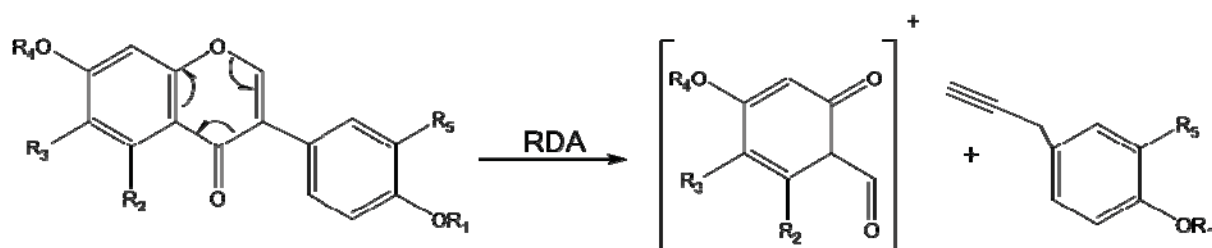


Abbildung 68: Massenspektrometrischer Fragmentierungsweg von Isoflavonen (Retro-Diels-Alder).

Im Falle des Pseudomoleküls mit  $m/z = 285$   $[M + H]^+$  von Prunetin ergibt sich aus der MS<sup>2</sup>-Analyse ein Massenfragment mit einer Masse von  $m/z = 167$  (s. Abbildung 69). Dieses lässt auf eine Substitution mit einer Methoxygruppe am C7 des Moleküls schließen, welche

das Isoflavon Prunetin aufweist. Das Isoflavon Biochanin A zeigt ein anderes RDA-Fragment-Ion, welches die Masse  $m/z = 152$  besitzt, wobei das Fragment des B-Ringes zu  $m/z = 132$  fragmentiert. In diesem Fall ist die Methoxygruppe am C4' des B-Ringes lokalisiert und die Hydroxylgruppe des Moleküls befindet sich am C7 des A-Ringes. Diese massenspektrometrischen Daten geben gute Hinweise auf das Substitutionsmuster im Molekül – die eindeutige Identifizierung und Charakterisierung sollte jedoch über 2D-NMR-Analysen erfolgen, wobei aufgrund der C-H-Korrelationen eine konkrete Zuordnung der funktionellen Gruppen möglich ist. Das verwendete ESI-MS ionisiert schonend, so dass die RDA-Fragmente nicht grundsätzlich bei der LC-MS-Analyse der einzelnen Fraktionen gebildet werden, sondern jeweils in Abhängigkeit von den gewählten Ionisierungsbedingungen. Bei reinen Fraktionen kann dieses unter Direktaufgabe („Spritzenproben“) und Erhöhung der ansonsten verwendeten Spannung erfolgen.



Abbildung 69: Massenspektrometrische Fragmentierung der Fraktion 5 aus der HSCCC-Trennung der Rotklee-Aglykone.

Bei der Trennung der Isoflavon-Aglykone aus Rotklee liegen in den ersten beiden Fraktionen (Fraktionen 1 und 2; vgl. Abbildung 66) komplexe Gemische von Isoflavonen vor, wobei kein Isoflavon signifikant überwiegt. So werden in Fraktion 1 bei der massenspektrometrischen Analyse insbesondere Massenfragmente detektiert, welche auf das Vorhandensein der Isoflavone Pratensein, Afrormosin und Genistein hinweisen. In Fraktion 2 wurde durch einen Vergleich der MS-Daten und der Retentionszeit eindeutig Daidzein identifiziert. Außerdem sind einige Verbindungen mit der gleichen Masse ( $m/z = 285$  u) detektierbar (s. Abbildung 70). Diese Masse deutet auf verschiedene in Rotklee enthaltene Isoflavone hin. Dabei kann es sich um die Konstitutionsisomere Calycosin, Texasin, Glycitein, Prunetin oder Biochanin A handeln. Das Isoflavon Texasin (6,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon) ist ähnlich wie Formononetin ein Precursor bei der Bildung von Afrormosin [Hakim und Dewick, 1980; Al-Ani et al., 1980].

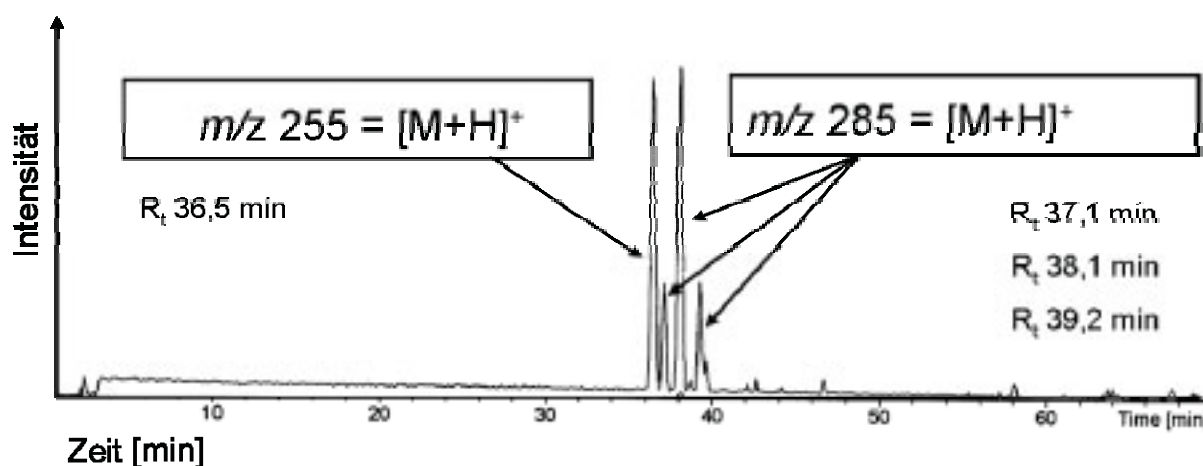


Abbildung 70: Total-Ionen-Chromatogramm der Fraktion 2 aus der HSCCC-Trennung der Isoflavon-Aglykone aus Rotklee.

Es war nicht möglich, diese Fraktion über eine HSCCC-Trennung weiter aufzureinigen, was sicherlich an den ähnlichen Polaritäten und Eigenschaften dieser Verbindungen liegt. Gleichwohl liegen in dieser Fraktion die verschiedenen Isoflavone in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Dies erwies sich bei der Wahl eines geeigneten Fließmittelsystems als schwierig, da es oftmals zu Verschleppungen der höher konzentrierten Verbindung in die Fraktion der Minorkomponenten kommt. Mittels präparativer HPLC konnte Fraktion 2 jedoch weiter aufgetrennt werden, um die entsprechenden Reinsubstanzen zu erhalten. Dabei können die Isoflavone Calycosin und Glycitein in reiner Form erhalten und charakterisiert werden.

Bei der Trennung der glucosidisch gebundenen Isoflavone waren zwei Fraktionen sehr komplex zusammengesetzt und benötigten eine weitere Aufreinigung, um reine Verbindungen zu erhalten. Fraktion 2 aus der HSCCC-Trennung der Glykoside des Rotklee (s. Abbildung 62) besteht ebenfalls aus einem Gemisch unterschiedlicher Isoflavone, welche alle glykosidisch gebunden vorliegen. Bei der massenspektrometrischen Analyse dieser Fraktion kann festgestellt werden, dass diese Verbindungen oftmals mit Malonsäure verestert sind. Da diese labilen Verbindungen nur teilweise als Referenzmaterialien käuflich zu erwerben sind, wurde mit der oben beschriebenen Fraktion 2 eine weitere Trennung durchgeführt, um auf diesem Wege authentische Referenzen zu erhalten. Dazu wurde das zuvor verwendete Fließmittelsystem modifiziert, weil die Beschaffenheit der Fraktion 2 eine Erhöhung der Polarität des verwendeten Fließmittelsystems erforderlich machte. Für die im Folgenden dargestellte Trennung wurde das binäre Fließmittelsystem *tert.*-Butylmethylether/*n*-Butanol/Acetonitril/Wasser (6,15/4/5/5; V/V/V/V) verwendet. Die leichte Phase stellte hierbei die stationäre Phase dar, welche jedoch nach 150 min durch eine zweite mobile Phase, bestehend aus Wasser/Acetonitril (im Verhältnis 8,5/1,5; V/V), ersetzt

wurde. Dadurch verringerte sich die Elutionszeit der Zielverbindungen. Die Flussrate betrug bei dieser Trennung 2,5 mL/min, die Umdrehungsgeschwindigkeit des Coils ca. 600 U/min und die Detektionswellenlänge  $\lambda = 268$  nm (diese wurde zuvor mittels HPLC-DAD als geeignet ermittelt). Erhalten wurden zwei Majorfraktionen sowie eine Minorfraktion, die erst am Ende der Trennung eluiert (s. Abbildung 71). Bei dieser Fraktion handelte es sich um das Glucosid des Isoflavons Afrormosin. Dies kann bereits anhand der massenspektrometrischen Daten, aufgrund der Fragmentierung des Pseudomoleküls mit dem Molekulargewicht von  $m/z = 461 = [M + H]^+$  zu dem entsprechenden Aglykon mit dem Masse/Ladungsverhältnis von  $m/z = 299$  bestätigt werden. Dieses Isoflavon eluiert bei einer Retentionszeit von 36,1 min. Diese Retentionszeit wird mit der von Irilon-glucosid verglichen, welches das gleiche Molekulargewicht aufweist, jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt ( $R_t = 42,6$  min) von der HPLC-Säule eluiert. Das heißt, es handelt sich bei dem Isoflavon aus dieser Fraktion nicht um das Irilon-glucosid, sondern um Afrormosin-7-O-D-glucosid, welches das gleiche Molekulargewicht besitzt. Die erste Majorfraktion dieser Trennung weist – typisch für die sogenannte Durchbruchfraktion einer HSCCC-Trennung – ein immer noch komplexes Gemisch an Verbindungen auf, welches gegebenenfalls weiter aufgetrennt werden kann. Auch in der zweiten Fraktion liegt keine Reinsubstanz vor, denn nach der Lyophilisation konnten dort keine malonylierten Verbindungen detektiert werden. In dieser Fraktion wurde hauptsächlich das Malonat des Formononetin-glucosides erwartet – eine Annahme, die sich auf die LC-MS-Analyse stützt. Stattdessen wurde das Glucosid (Ononin) erhalten. Vermutlich wurde die Malonsäure-Einheit während der Aufarbeitung (Trennung, Abdestillieren der Lösungsmittel, Gefriertrocknung) von der Glucose abgespalten.

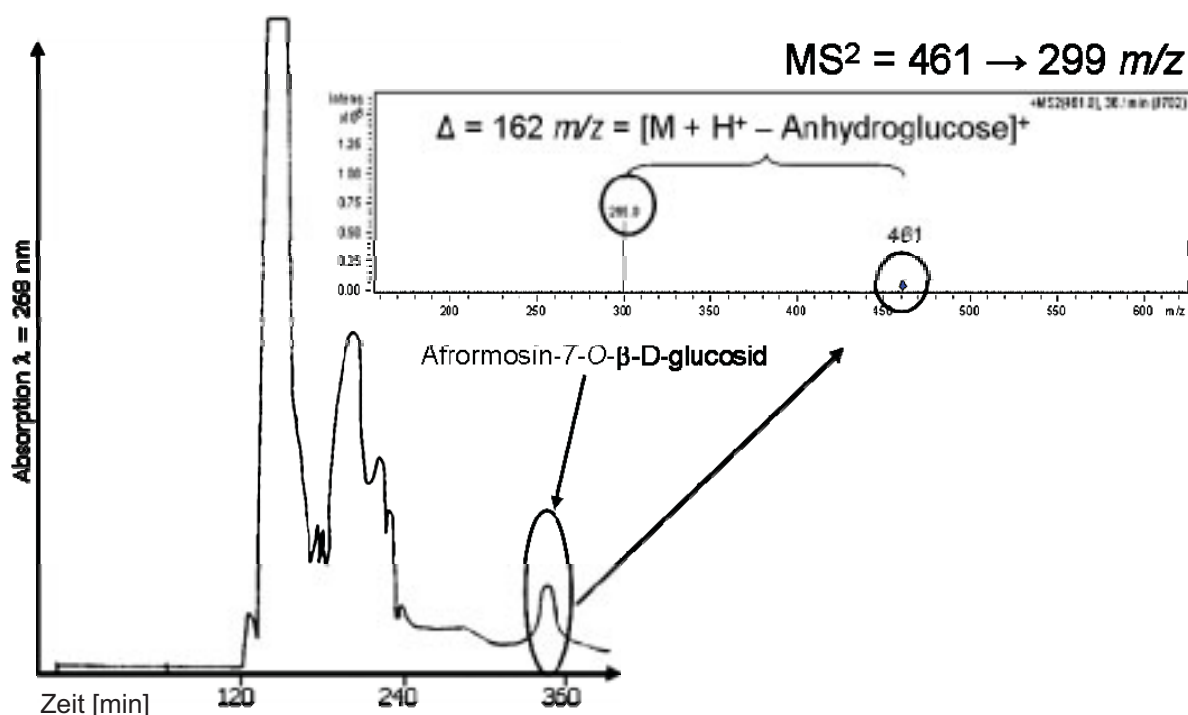


Abbildung 71: HSCCC-Trennung der Fraktion 2, welche aus der Trennung der Isoflavon-Glykoside aus Rotklee (vgl. Abbildung 62) erhalten wird.

Diese Trennung zeigt, dass es mittels HSCCC prinzipiell möglich ist, durch die Wahl eines geeigneten Fließmittelsystems einzelne Fraktionen weiter aufzutrennen, um gegebenenfalls Reinsubstanzen zu erhalten. Direkt nach der Trennung wurden in Fraktion 2 malonylierte Verbindungen detektiert, bei denen jedoch während der weiteren Behandlung (Abdestillieren der organischen Lösungsmittel, Gefriertrocknung etc.) die Malonsäureeinheit abgespalten wurde. Dieses HSCCC-System bietet jedoch einen guten Ausgangspunkt für eine Optimierung dieser Trennung.

### 3.2.3.3 Fraktionierung von Rotklee über Polyamid und anschließende HSCCC-Trennung

Der verwendete Extrakt aus Rotklee weist eine komplexe Zusammensetzung auf. Aufgrund dessen kann eine Vorfraktionierung vor einer präparativen Isolierung mittels HSCCC dienlich sein. Dadurch können insbesondere die Minorkomponenten oder bestimmte Isoflavone angereichert werden, so dass eine nachfolgende Isolierung höhere Ausbeuten verspricht. Zur Isolierung und Anreicherung von phenolischen Naturstoffen ist eine Chromatographie an Polyamid besonders geeignet [O'Neill et al., 1986]. Das verwendete Elutionsmittel kann dabei während der Trennung schrittweise variiert und z.B. alkalisiert werden, wodurch unter Umständen die Trennleistung erhöht wird [Lakenbrink, 2000]. Polyamide sind

Makromoleküle, bei denen die einzelnen Monomere durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Die Amidbindungen in den Polyamiden sind sehr polar, da sie eine Carbonylgruppe enthalten, woraus starke zwischenmolekulare Anziehungskräfte resultieren [Watzl und Leitzmann, 1999; Vollhardt, 1990]. Polyamid bindet spezifisch Phenole, Dicarbonsäuren und aromatische Carbonsäuren über Wasserstoffbrückenbindungen, welche zwischen den phenolischen Hydroxylgruppen und den Amidbindungen entstehen. Eine Adsorption an Polyamid wird durch die entsprechende Verbindung und durch ihre Anzahl an Hydroxylgruppen am Aromaten – insbesondere in meta- und para-Stellung – erhöht. (Resorcin wird so z.B. länger zurückgehalten als Phenol.) Polyamid ist in den meisten polaren Lösungsmitteln schwerlöslich aber quellfähig, was von den Quervernetzungen zwischen den einzelnen Makromolekülen herrührt. Eine Desorption der adsorbierenden Verbindungen kann mit Hilfe eines Lösungsmittels erfolgen, welches ebenfalls gut Wasserstoffbrückenbindungen eingehen kann, wie u.a. Methanol. Die Retention der Verbindung an dem Polyamidmaterial ist von der Fähigkeit des verwendeten Lösungsmittels abhängig, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Das Lösungsmittel tritt diesbezüglich in Konkurrenz zu der am Polyamid adsorbierenden Verbindung. Die Desorptionsfähigkeit des verwendeten Lösungsmittels nimmt in folgender Reihenfolge zu: Wasser < Methanol < Aceton < verd. Natronlauge < Formamid < Dimethylformamid, wobei das letztgenannte Lösungsmittel den stärksten Wasserstoffbrückenakzeptor in dieser Gruppe darstellt [Degenhardt et al., 2001; Vollhardt, 1990].

Der ethanolische Rotklee-Extrakt wurde in Wasser aufgeschwemmt und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Der lyophilisierte Rückstand der organischen Phase wurde für die Chromatographie an Polyamid verwendet. Dazu wurde der Ethylacetat-Extrakt in wenig DMSO/H<sub>2</sub>O (1/1; V/V) aufgenommen und auf die vorkonditionierte Polyamid-Säule gegeben. Danach wurde mit 1 L dest. Wasser gewaschen, um eventuelle Störsubstanzen abzutrennen. Die Elution erfolgte stufenweise mit wässrigem Methanol, wobei der Anteil an Methanol bei jedem Elutionsschritt um 10% erhöht und mit 10%igem Methanol begonnen wurde. Nach der Elution mit 100%igem Methanol erfolgte eine Elution mit Methanol/Aceton (1/1; V/V) und anschließend mit reinem Aceton. Auf diese Weise konnten 12 verschiedene Fraktionen erhalten werden, wobei jeweils mit 300 mL eluiert wurde. Eine diskrete Bandenbildung war bereits an der Polyamidsäule zu erkennen. Das Lösungsmittel dieser Fraktionen wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand gefriergetrocknet. Die lyophilisierten Fraktionen wurden mittels HPLC-DAD sowie LC-(ESI)-MS analysiert, um die Fraktionierung aufzuzeigen. Die ersten beiden Fraktionen enthielten sehr wenige phenolische Bestandteile, ab der dritten Fraktion eluierten deutlich mehr Verbindungen. In Abbildung 72 ist ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme einiger Fraktionen abgebildet.

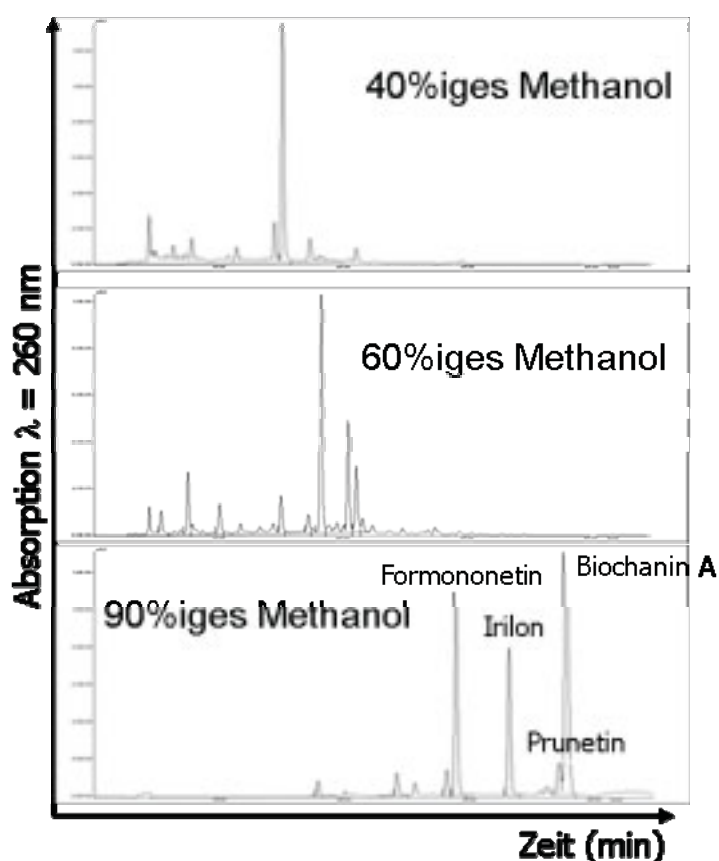


Abbildung 72: HPLC-Chromatogramme von Fraktionen aus der Polyamid-Aufreinigung.

In der obigen Abbildung sind die HPLC-Chromatogramme der 4., 6. und 9. Fraktion (Elution entsprechend mit 40%igem, 60%igem und 90%igem Methanol) der Vorfraktionierung über Polyamid dargestellt. Dabei wird die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  dargestellt. Deutlich zu erkennen ist hierbei, dass die Verbindungen der verschiedenen Fraktionen mit zunehmendem Methanolanteil des Elutionsmittels später von der RP-18-Säule eluieren. In der Fraktion 4 (Abbildung 72 oben) liegen einige glucosidisch gebundene Isoflavone vor, wie u.a. das Ononin, jedoch ebenso unbekannte Verbindungen. Die Hauptverbindung dieser Fraktion weist in der LC-MS-Analyse ein Molekölion mit  $m/z = 349$  u auf, was mit keinem bis dato identifizierten Isoflavon konform geht. In Fraktion 6 liegt als Majorisoflavin das Glucosid des Irilons vor (Abbildung 72 Mitte). Die bereits mittels HSCCC isolierten Verbindungen Formononetin, Biochanin A, Prunetin und Irilon liegen alle in konzentrierter Form in Fraktion 9 vor. Ebenso werden diese Isoflavone in Fraktion 10 angereichert (ohne Abbildung), die darüber hinaus wenige Minor Komponenten enthält. Die Vorfraktionierung des Rotklee-Extraktes kann folglich zur Aufkonzentrierung und Anreicherung bestimmter Verbindungen in den einzelnen Fraktionen verwendet werden. Auf diese Weise können Minorverbindungen zugänglich gemacht werden, welche u.a. für biologische Evaluierungen verwendet werden können.

Die Fraktion, die mit 100%igem Methanol eluiert, wurde für eine HSCCC-Trennung verwendet, da diese sich für die Isolierung weiterer relevanter Isoflavone gut eignet. Als Fließmittelsystem für diese Trennung wurde das binäre Gemisch aus Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (6/4/5/5; V/V/V/V) eingesetzt. Die leichte Phase stellte hierbei die stationäre Phase dar, die Flussrate betrug dabei 3,2 mL/min und die Umdrehungsgeschwindigkeit des Coils ca. 800 U/min. Die Trennung wurde beobachtet durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm. Der eingewogene Extrakt wurde vor der Trennung in 1-2 mL DMSO angelöst und im Ultraschallbad vollständig gelöst, bevor membranfiltriert wurde. Mittels einer 20 mL Probenschleife wurde die Probelösung direkt nach dem Starten der Rotation der Coils injiziert. Die Trennung der Polyamid-Fraktion 10 ist in Abbildung 73 aufgeführt.

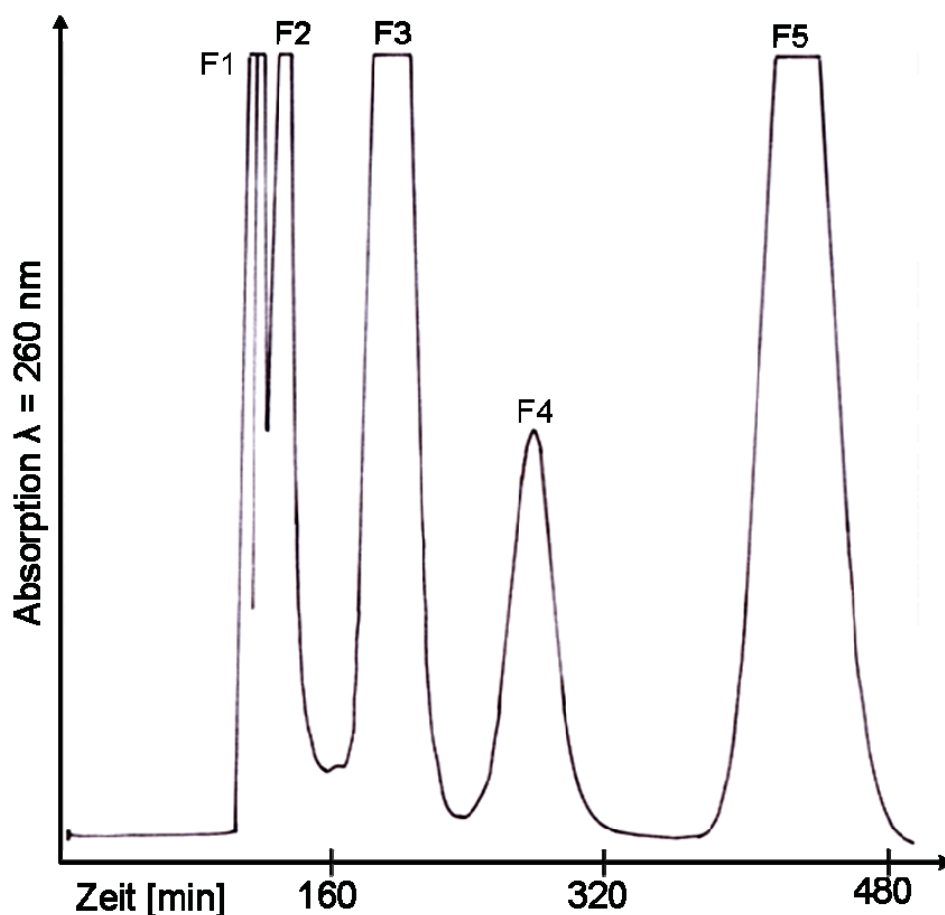


Abbildung 73: HSCCC-Trennung der Polyamid-Fraktion 10 aus Rotklee.

Bei dieser Trennung konnten 5 Fraktionen erhalten werden. In der Majorfraktion dieser Trennung (F5) liegen die beiden Isoflavone Biochanin A und Irilon vor. In Fraktion 4 ist Pseudobaptigenin angereichert, ein toxikologisch relevantes Isoflavon, welches eine Methylendioxystruktur aufweist und kommerziell nicht erhältlich ist. Die beiden Isoflavone Pratensein und Formononetin sind in Fraktion 3 enthalten. Die beiden ersten Fraktionen



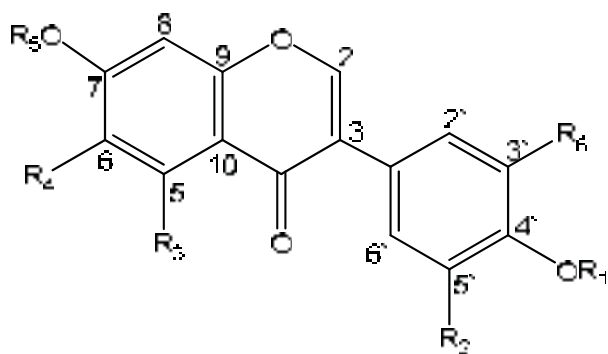
dieses HSCCC-Laufes sind komplexer zusammengesetzt, wobei in Fraktion 2 hauptsächlich Daidzein vorliegt.

Folgende Isoflavone konnten aus Rotklee isoliert werden:

Tabelle 17: Isolierte Isoflavone aus Rotklee.

| Isoflavon       | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub>       | R <sub>5</sub>  | R <sub>6</sub>                    |
|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Biochanin A     | CH <sub>3</sub> | H              | OH             | H                    | H               | H                                 |
| Calycosin       | CH <sub>3</sub> | H              | H              | H                    | H               | OH                                |
| Formononetin    | CH <sub>3</sub> | H              | H              | H                    | H               | H                                 |
| Daidzein        | H               | H              | H              | H                    | H               | H                                 |
| Acetyl-Ononin   | CH <sub>3</sub> | H              | H              | H                    | Glc-Ace         | H                                 |
| Irilon          | H               | H              | OH             | O-CH <sub>2</sub> -O |                 | H                                 |
| Irilon-glucosid | Glc             | H              | OH             | O-CH <sub>2</sub> -O |                 | H                                 |
| Ononin          | CH <sub>3</sub> | H              | OH             | H                    | Glc             | H                                 |
| Pratensein      | CH <sub>3</sub> | H              | OH             | H                    | H               | OH                                |
| Prunetin        | H               | H              | OH             | H                    | CH <sub>3</sub> | H                                 |
| Pseudobapteenin | -R <sub>6</sub> | H              | H              | H                    | OH              | -OCH <sub>2</sub> -R <sub>1</sub> |
| Sissotrin       | CH <sub>3</sub> | H              | OH             | H                    | Glc             | H                                 |
| Trifosid        | Glc             | H              | OH             | H                    | CH <sub>3</sub> | H                                 |

Glc = Glucose; Ace = Acetyl-



### 3.2.4 Isolierung von Isoflavonen aus Iris (*Iris germanica* L.)

*Iris germanica* L. enthält sowohl eine Reihe unterschiedlich substituierter Isoflavone als auch Flavone (s. Kapitel 1.4). Neben Rotklee ist die Iris eine sehr wichtige Quelle für das Isoflavon Irilon, über welches bislang nur wenige biologische Studien, wie z.B. über dessen Metabolisierung, zur Verfügung stehen. Angesichts der Tatsache, dass Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Rotklee verstärkt auf den Markt gebracht werden, erscheint es notwendig, mehr über dessen Inhaltsstoffe zu erfahren. Anhand der evaluierten Daten können daraufhin Verzehrsempfehlungen unterbreitet werden. Strukturell gesehen ist Irilon insofern interessant, da es eine Methylenedioxy-Gruppe aufweist [Deavours et al., 2006]. Eine Reihe von pharmakologisch relevanten Substanzen, zu denen u.a. Piperin oder Safrol gehören, weisen ebenfalls diese funktionelle Gruppe auf, [Nahrstedt, 1977; Tolleson et al., 2002; Heinonen et al., 2004; Ueng et al., 2005; Booth et al., 2006c]. Murray et al. [2000] untersuchten die Interaktion der Methylenedioxygruppen mit den Cytochrom P450-Enzymen [Marcus et al., 1987]. Bislang konnte noch nicht vollständig geklärt werden, weshalb diese funktionelle Gruppe für verschiedene hemmende Effekte bei *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen verantwortlich ist [Nakajima et al., 1999]. Deshalb erscheint es wichtig, weitaus mehr Informationen über mögliche biologische Wirkungen von Irilon zu erfahren. Für solche Untersuchungen wird Referenzmaterial in großer Reinheit benötigt, weshalb dieses Isoflavon aus den Rhizomen der Iris isoliert werden soll. Unter Verwendung der Countercurrent Chromatography ist dieses möglich (s.u.).

#### 3.2.4.1 Extraktion und Anreicherung

Die getrockneten Rhizome der *Iris germanica* (s. Abbildung 74) wurden mit einer Mühle grob zerkleinert und zweimal mit Hexan entfettet. Anschließend erfolgte eine feine Mahlung der entfetteten Wurzelbestandteile in einer handelsüblichen Küchenmaschine, um daraus einen Rohextrakt herzustellen. Dazu wurde mit Methanol/Wasser im Verhältnis 70/30 (V/V) extrahiert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* erfolgte die Lyophilisation. Eine weitere Aufreinigung sowie Aufkonzentrierung dieses Rohextraktes erfolgte durch Festphasenextraktion an XAD-7-Adsorberharz. Der getrocknete Rohextrakt (19 g) wurde dazu in Wasser aufgenommen (1200 mL; unter Zugabe von 2 mL DMSO), filtriert und über eine XAD-7-Säule aufgereinigt. Die Elution der phenolischen Bestandteile erfolgte mit Methanol. Der lyophilisierte XAD-7 Extrakt wurde zur Trennung der glykosidisch gebundenen Isoflavone aus Iris mittels High-Speed Countercurrent Chromatography eingesetzt.



Abbildung 74: Getrocknete Rhizome von *Iris germanica* L., (Foto: Stürtz, 2007).

Für die Isolierung von Isoflavonen aus *Iris germanica* L., welche als Aglykone vorliegen, wurde aufgrund der Komplexität des hergestellten XAD-7-Extraktes (s. 3.1.2.4) ein anderer Extrakt hergestellt, in dem fast ausschließlich Aglykone vorliegen. Dazu wurde (in Anlehnung an das *Homöopathische Arzneibuch* (HAB 2006)) zunächst mittels Perkolation ein ethanolischer Extrakt aus dem getrockneten Rhizom hergestellt. In diesem Extrakt dominierten zunächst die glykosidisch gebundenen Isoflavone, weshalb eine Säurehydrolyse in Anlehnung an Schwartz und Sontag [2005] erfolgte. Dazu wurden 25 mL ethanolischer Extrakt (69%ig) mit 10 mL Ethanol, 35 mL Wasser und 20 mL Salzsäure (12,4 M) versetzt und für drei Stunden unter Rückfluss gerührt [DAB, 2005; Schwarz und Sontag, 2005; Preinerstorfer und Sontag., 2004; Müllner und Sontag, 1999]. Eine weitere Aufreinigung erfolgte durch flüssig/flüssig Extraktion mit Ethylacetat bei pH 9-10 und anschließender Gefriertrocknung.

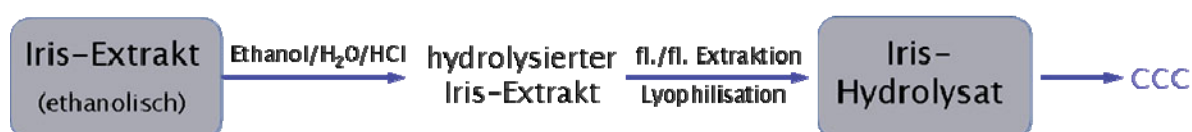


Abbildung 75: Fließschema zur Herstellung eines Iris-Hydrolysates. Dieses Hydrolysat wird für die Isolierung von Isoflavon-Aglykonen aus *Iris germanica* verwendet.

Die in der Literatur bis dato beschriebenen optimalen Bedingungen für diese Hydrolyse sind widersprüchlich und hauptsächlich adaptiert für die Herstellung von Soja-Extrakten [Li et al., 2002; Zhang et al., 2002]. Deshalb wurden diese Bedingungen weiter optimiert, wozu die Methode von Preinerstorfer und Sontag [2004] als Grundlage diente. Die entsprechende Säurekonzentration und Reaktionszeit wurden soweit verändert, dass die maximale Konzentration an Aglykonen entstanden ist. Eine höhere Säurekonzentration führte lediglich

zu einem partiellen Abbau der Isoflavone. Bei kürzeren Reaktionszeiten und geringerer Säurekonzentration konnten die glykosidisch gebundenen Isoflavone nicht vollständig hydrolysiert werden. Die hydrolytische Spaltung der Aglykone ist nach der oben beschriebenen Verfahrensweise quantitativ erfolgt, was in Abbildung 76 sichtbar ist. In diesem Extrakt sind insbesondere die beiden Isoflavone Iridin und Iridon enthalten.

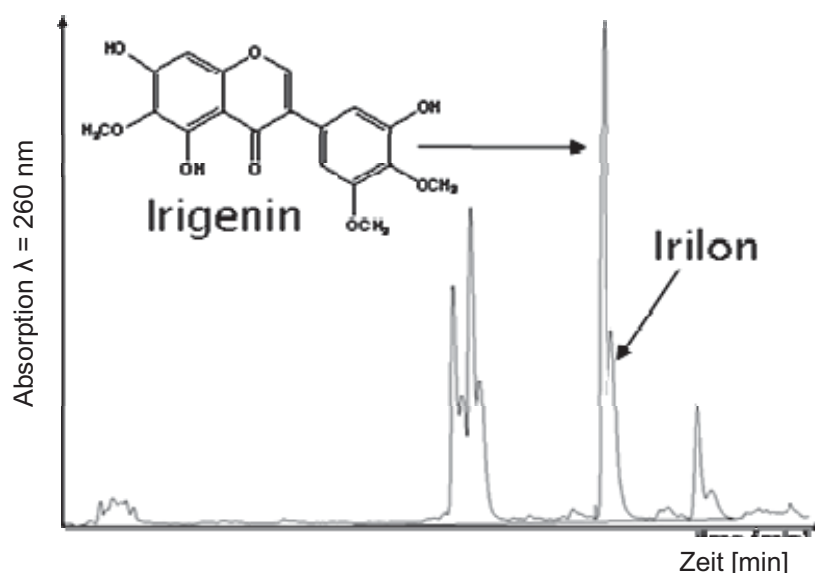


Abbildung 76: HPLC-Chromatogramm des Iris-Hydrolysates bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$ .

Die beiden hergestellten Extrakte aus der Iris (XAD-7 und Iris-Hydrolysat) wurden entsprechend für die Isolierung von Isoflavonen verwendet. Dabei wurden teilweise Reinsubstanzen erhalten. Andere Fraktionen erfordern eine weiterführende Aufreinigung. Eine Übersicht wird in Abbildung 77 gegeben.

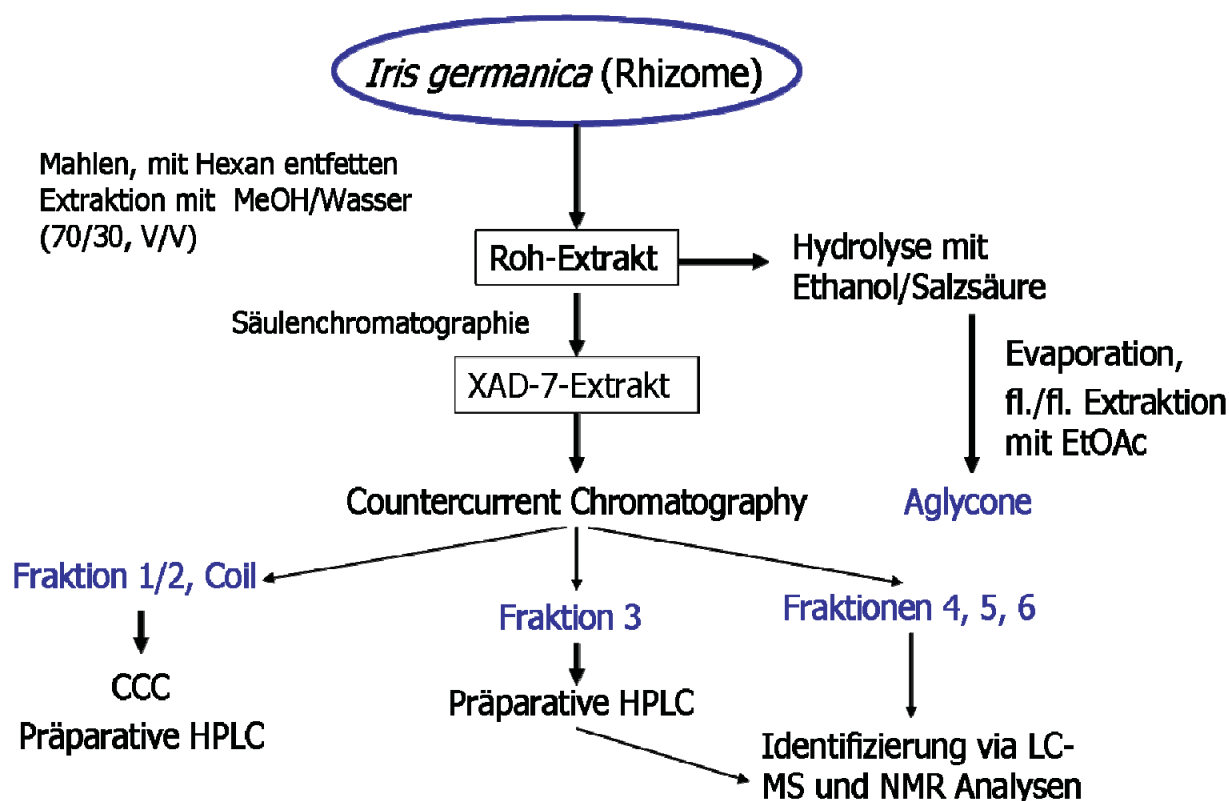


Abbildung 77: Fließschema zur Herstellung von Extrakten aus *Iris germanica* zur Isolierung und Fraktionierung von Isoflavonen mittels HSCCC.

Das hergestellte Iris-Hydrolysat wurde dabei für die Isolierung der Isoflavon-Aglykone verwendet, wobei insbesondere eine Zielverbindung – das Irilon – in reiner Form isoliert werden sollte.

#### 3.2.4.2 Isolierung von Isoflavonen aus Iris mittels Countercurrent Chromatography

In dem hergestellten XAD-7-Extrakt aus *Iris germanica* (s. 3.2.4.1) liegen hauptsächlich glykosidisch und diglykosidisch gebundene Isoflavone vor, welche mittels HSCCC aufgetrennt und möglichst in Reinform isoliert werden sollten. Als Fließmittelsystem für die Trennung dieser Majorisoflavone aus Iris diente das binäre Gemisch aus *tert.*-Butylmethylether/*n*-Butanol/Acetonitril/Wasser (2,5/0,5/2/5; V/V/V/V). Die leichte Phase stellte hierbei die stationäre Phase dar, die Flussrate betrug dabei 3,2 mL/min und die Umdrehungsgeschwindigkeit des Coils ca. 800 U/min. Der eingewogene Extrakt wurde vor der Trennung in 1-2 mL DMSO angelöst und im Ultraschallbad unter Zugabe äquivalenter Mengen der stationären und mobilen Phase vollständig gelöst, bevor er membranfiltriert wurde. Mittels einer 20 mL Probenschleife wurde die Probelösung in das System direkt nach dem Starten der Rotation der Coils injiziert. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm, welche näherungsweise dem Maximum vieler Isoflavone entspricht. Insgesamt

wurden bei dieser Trennung sechs Fraktionen sowie ein Coil-Rückstand erhalten (s. Abbildung 78), wovon die Fraktionen 4-6 in hoher Reinheit vorliegen ( $\geq 92\%$ ; mittels analytischer HPLC bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm). Die Fraktion 4 besteht aus Iridin, dem glucosidisch gebundenen Irogenin (7-O- $\beta$ -D-Glucosid von 5,7,3'-Trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyisoflavon). Reines Irilon-glucosid (Glucosid von 5,4'-Dihydroxy-6,7-methylendioxyisoflavon) wird in Fraktion 5 erhalten. Das Isoflavon Irisolidon-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosid wird in Fraktion 6 in Reinform erhalten, wobei sich die Strukturaufklärung hauptsächlich auf die massenspektrometrischen Daten sowie das  $^1\text{H}$ -NMR stützt. Die dritte Fraktion dieser HSCCC-Trennung erforderte eine weitere Aufreinigung über präparative HPLC, da sie durch wenige Minorverbindungen verunreinigt ist. Die Majorkomponente dieser Fraktion (88%) besteht aus einem Glucosid des Nigricins (5-Methoxy-6,7-methylendioxyisoflavon-4'-O- $\beta$ -D-glucosid), einem weiteren Isoflavon mit einer Methylendioxygruppe, welches in Reinform nach präparativer HPLC erhalten wird. Eine der Minorkomponenten aus dieser Fraktion 3 ist Nigricanin-glucosid (5,3'-Dimethoxy-6,7-methylendioxyisoflavon-4'-O- $\beta$ -D-glucosid). Die weiteren Isoflavone in dieser Fraktion liegen jeweils in sehr geringer Konzentration vor und konnten nicht in reiner Form isoliert werden.

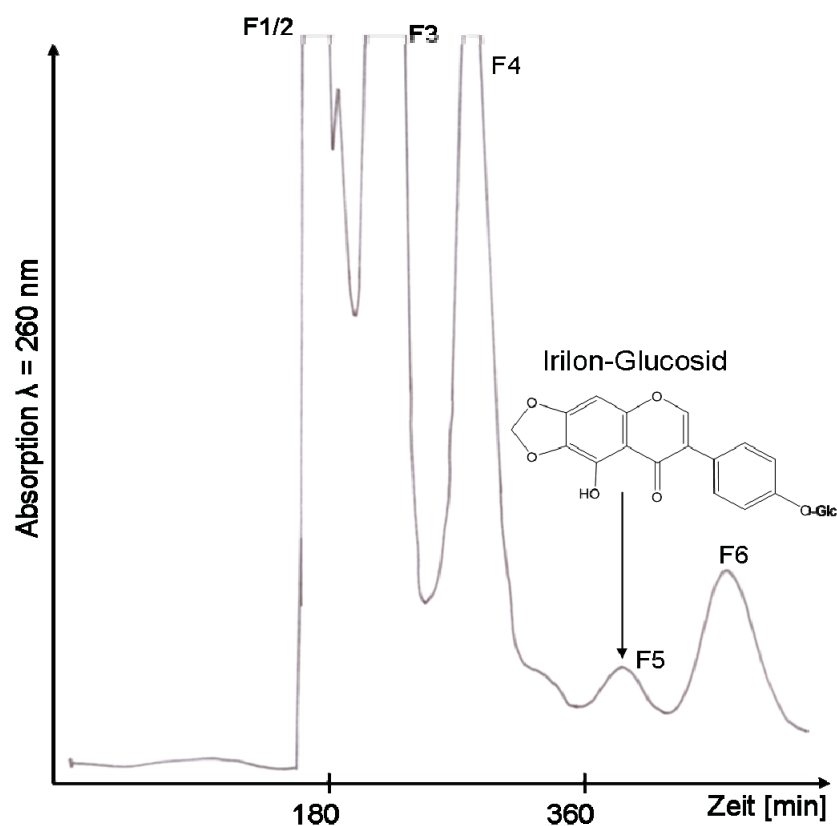


Abbildung 78: Chromatogramm der HSCCC-Trennung von glykosidisch gebundenen Isoflavonen aus *Iris germanica* L.

Der Coil-Rückstand sowie die beiden ersten eluierten Fraktionen (F1/2) bestehen aus mehreren, strukturell sehr ähnlichen Isoflavonen, weshalb eine weitere Fraktionierung mittels HSCCC oder gegebenenfalls präparativer HPLC sinnvoll ist. Für die Applikation einer weiteren HSCCC-Trennung sollte mit einem wesentlich polarerem Fließmittelsystem gearbeitet werden. Die LC-(ESI)-MS-Analyse der Fraktion 1/2 ließ auf ein Vorhandensein von Diglykosiden schließen und zeigt eine komplexe Zusammensetzung auf; teilweise handelte es sich dabei um polymere Bestandteile. Die Majorkomponente dieser Fraktion ist jedoch das Diglucosid von Nigricin, das mittels präparativer HPLC isoliert werden kann. Das Lösungsmittel des auf dem Coil verbliebenen Rückstands wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand anschließend gefriergetrocknet. Der lyophilisierte Rückstand wurde mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> untersucht, und weist verschiedene Isoflavone in unterschiedlichen Konzentrationen auf. Einige dieser Isoflavone wurden mittels präparativer HPLC isoliert, wobei es sich um die Verbindungen Nigricanin und Iriflogenin handelt.

Die Strukturaufklärung der isolierten Isoflavone erfolgte anhand von ESI-MS-, <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten sowie gegebenenfalls mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten. Mittels zweidimensionaler NMR-Techniken (HSQC und HMBC) konnten alle C-H-Konnektivitäten der isolierten Verbindungen eindeutig zugeordnet werden. Dies soll im Folgenden am Beispiel von Fraktion 5 (Irilon-glucosid) erläutert werden. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigt ein scharfes Singulett bei  $\delta = 8.50$  ppm auf, welches das Proton H2 beschreibt, das typisch ist für Isoflavone. Dies wird durch HSQC-Experimente bestätigt, mit denen die <sup>1</sup>J-H-C-Zuordnung erfolgt und sich die Substitution des Isoflavon-Grundgerüsts gut zuordnen lässt. Eine Korrelation der Signale  $\delta_H/\delta_C$ : 8.50/154.7 ppm ist eindeutig zu erkennen. Verschiedene ortho-koppelnde Protonen sind bei einer Verschiebung von  $\delta = 7.10$  and 7.51 ppm vorhanden, welche typisch für das AA'/BB'-System der Isoflavone sind, wobei in diesem Fall der B-Ring lediglich an der 4'-Position substituiert ist. Ein scharfes Singulett bei einer Verschiebung von  $\delta = 6.19$  ppm mit der geminalen Kopplung zu  $\delta_H/\delta_C$ : 6.19/102.9 ppm im HSQC-Experiment rührt eindeutig von den Protonen der Methyendioxygruppe her. Die Position dieser funktionellen Gruppe wird weiter durch HMBC-Experimente bestätigt. Damit werden die heteronuklearen Fernkorrelationen zwischen den Protonen und den in der Umgebung befindlichen Kohlenstoffatomen aufgezeigt. Das HMBC-Spektrum zeigt zwei Korrelationspunkte der Methyendioxygruppe mit den Kohlenstoffatomen bei  $\delta = 129.4$  (C6) und 153.7 (C7) ppm, womit die Position der Methyendioxygruppe eindeutig bewiesen ist. Ein weiteres Singulett zeigt in den 2D-Experimenten die Identität des Protons H8 im A-Ring an (<sup>13</sup>C NMR:  $\delta = 89.7$  ppm), was wiederum eine Bestätigung für die Positionierung der Methyendioxygruppe an Position 6 und 7 ist. Ein Proton im Tieffeld bei einer Verschiebung von  $\delta = 12.85$  ppm stammt von der Hydroxyl-Gruppe an der Position 5, mit dem Korrelationspunkt  $\delta_H/\delta_C$ : 12.85/180.4 ppm im HSQC-Spektrum. Eine Fernkopplung

beginnend am anomeren H-1''-Proton der Glucose mit dem C-4'-Kohlenstoffatom des Isoflavon-Grundkörpers ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ : 4.91/157.0 ppm) zeigt eindeutig die Verknüpfung der Glucose-Einheit mit dem Isoflavon-Körper an der C4'-Position.

Für die Isolierung der Isoflavon-Aglykone wurde der hergestellte hydrolysierte Iris-Extrakt verwendet. Als Fließmittelsystem diente das binäre Gemisch aus Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser im Verhältnis (6,15/3,85/5/5; V/V/V/V), wobei die obere Phase als stationäre Phase fungierte. Die mobile Phase wurde bei dieser Trennung mit einem Fluss von 3,4 mL/min eingebracht, die Rotationsgeschwindigkeit des Coils betrug 1000 U/min und die Trennung wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm aufgezeichnet. Bei dieser Trennung konnten 5 Fraktionen erhalten werden (s. Abbildung 79).

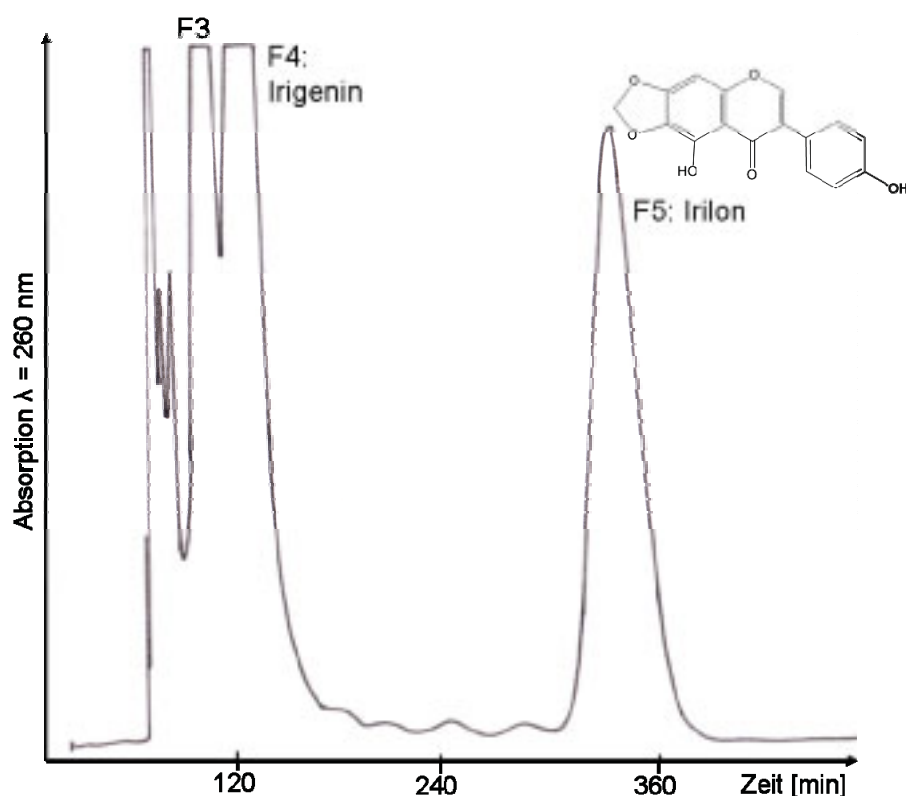


Abbildung 79: HSCCC-Trennung des hydrolysierten Extraktes von *Iris germanica* zur Isolierung der Aglykone.

In Fraktion 5 wird dabei Irilon (5,4'-Dihydroxy-6,7-methylenedioxyisoflavon) in reiner Form erhalten. Aus den anderen Fraktionen dieser CCC-Trennung konnten über präparative HPLC weitere Isoflavone isoliert werden, wie z.B. das Iridenin aus Fraktion 4. Die Identifizierung der einzelnen Isoflavone erfolgte mittels LC-MS- sowie NMR-Analysen. Ein Vergleich mit den Daten aus der Literatur kann die Identität von Iridenin bestätigen [Ali, 1983; Akashi et al., 2005]. Fraktion 3 enthält dabei zu 60% ein methyliertes Derivat des Irilons, das Isoflavon Nigricin (4'-Hydroxy-5-methoxy-6,7-methylenedioxyisoflavon), dessen Strukturaufklärung



mittels der Korrelationen aus den 2D-NMR-Experimenten erfolgte. Die für dieses Isoflavon zu erwartenden Konnektivitäten bei den Fernkorrelationen im HMBC-Experiment sind in Abbildung 80 dargestellt.

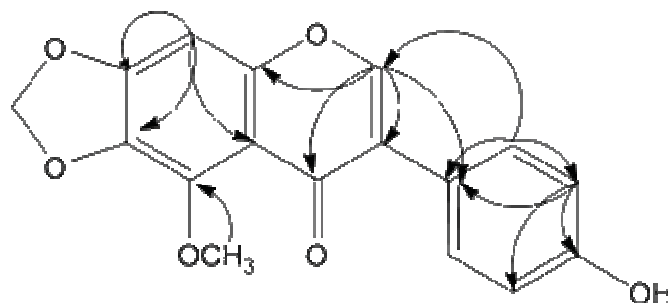


Abbildung 80: HMBC-Korrelationen von Nigricin.

Die Identität dieses Isoflavons wird u.a. durch das Vorhandensein eines Singulett bei einer Verschiebung von  $\delta = 8.21$  ppm im  $^1\text{H}$ -NMR bestätigt, welches eines der charakteristischen Signale der Isoflavone ist. Dabei stellt dieses Signal das H2 dar, womit die Verknüpfung des B-Ringes eindeutig bewiesen ist. Das Vorkommen der für dieses Molekül wichtigen Methylendioxygruppe wird einerseits durch das scharfe Singulett bei  $\delta = 6.19$  ppm, sowie andererseits durch die Kopplung von  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ : 6.19/102.5 ppm bei der HSQC-Analyse abgesichert. Die Position wird durch die Signale der beiden Kohlenstoffatome C6 und C7 im A-Ring abgesichert sowie durch das Singulett des H8 bei einer Verschiebung von  $\delta = 8.21$  ppm und die dazu korrelierenden Signale. Mit den entsprechenden HMBC-Experimenten wird aufgezeigt, dass die Methoxygruppe am C5 sitzt, wobei sie im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bei  $\delta = 3.92$  ppm deutlich zu erkennen ist. Die charakteristischen Aufspaltungsmuster der vier aromatischen Protonen am B-Ring im Molekül sehen typisch aus für ein para-disubstituiertes Isoflavon und spalten auf in ein Quartett von Dubletts (H3'/H5' und H4'/H6'), wobei durch das HMBC-Spektrum die Oxygenierung untermauert wird. Die chemische Verschiebung der Hydroxylgruppe als ein Singulett bei  $\delta = 9.56$  ppm im  $^1\text{H}$ -NMR ist durchaus typisch für die Substitution mit einer solchen funktionellen Gruppe am C4' des B-Ringes eines Isoflavons und wird durch die Korrelation im HSQC-Experiment bestätigt.

In Fraktion 4 ist bei dieser Trennung das Isoflavon Irigenin mit einer Reinheit von 99,6% enthalten. Das Isoflavon Irilon kann aus Fraktion 5 in einer Reinheit von 98,5% direkt nach einer Trennung gewonnen werden. Bei diesen beiden Fraktionen (F4 und F5) war eine weitere Aufreinigung folglich nicht mehr notwendig. Mit einer HSCCC-Trennung konnten auf diese Weise 23 mg reines Irilon (98,5%) gewonnen werden, wozu 210 mg des hydrolysierten Extraktes eingesetzt werden mussten. Das für diese Trennung applizierte binäre Lösungsmittelsystem weist eine hohe Retention auf, wobei eine überdurchschnittliche Menge

an stationärer Phase auf dem Coil verbleibt. Dies ermöglichte eine Trennung im „continuous flow mode“. Dies bedeutet, dass eine erneute Injektion der verwendeten Probe in das System erfolgen konnte, ohne einen vorherigen Austausch des zweiphasigen Fließmittelsystems vornehmen zu müssen. Es konnte folglich sofort mit einer weiteren Trennung der Isoflavone aus dem hydrolysierten Extrakt fortgefahren werden. Dies bringt einige Vorteile mit sich, wie u.a. eine Zeit- und Kostenersparnis aufgrund der geringeren Menge an benötigten Fließmitteln für die Isolierung einer definierten Menge eines Isoflavons und dem Wegfall der erneuten Vorkonditionierung des Systems. Mindestens zwei aufeinander folgende Injektionen mit der Probe können vorgenommen werden, ohne die stationäre Phase zu wechseln. Nach 210 min erfolgte daher die zweite Injektion der gelösten Probe unter Beibehaltung der Rotation der Coils (s. Abbildung 81). Die Identität der isolierten Verbindungen wurde jeweils abgesichert durch HPLC-DAD-Analysen, LC-(ESI)-MS sowie NMR-Analysen. Die Kontrolle der Reinheit erfolgte durch eine HPLC-Analyse, wobei bei der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm detektiert wird.

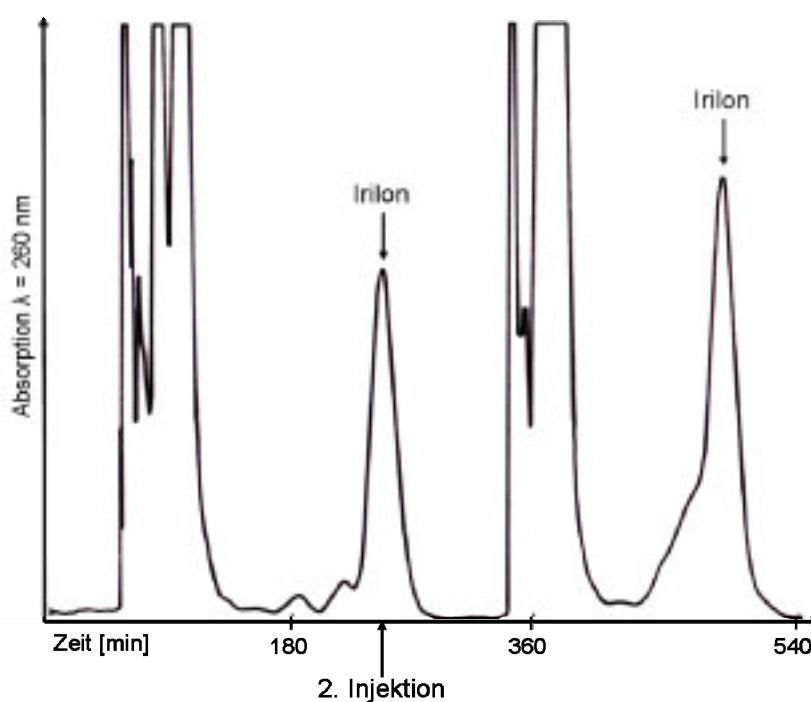


Abbildung 81: HSCCC-Chromatogramm des hydrolysierten Iris-Extraktes im „continuous-flow-Modus“. Eine zweite Injektion der Probe erfolgt nach einer Zeit von 210 min.

In folgender Tabelle wird eine Übersicht über die Struktur der aus Iris isolierten Isoflavone gegeben.

Tabelle 18: Übersicht über die aus *Iris germanica* L. isolierten Isoflavone (vgl. Abbildung 82).

| Isoflavon           | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub>       | R <sub>5</sub> | R <sub>6</sub>   |
|---------------------|-----------------|------------------|------------------|----------------------|----------------|------------------|
| Iridin              | CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OH               | CH <sub>3</sub>      | O-Glc          | OH               |
| Iriflogenin         | H               | H                | OH               | O-CH <sub>2</sub> -O |                | OCH <sub>3</sub> |
| Irigenin            | CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OH               | OCH <sub>3</sub>     | OH             | OH               |
| Irigenin-glucosid   | CH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OH               | OCH <sub>3</sub>     | O-Glc          | OH               |
| Irilon              | H               | H                | OH               | O-CH <sub>2</sub> -O |                | H                |
| Irilon-glucosid     | Glc             | H                | OH               | O-CH <sub>2</sub> -O |                | H                |
| Nigricanin          | H               | H                | OCH <sub>3</sub> | O-CH <sub>2</sub> -O |                | OCH <sub>3</sub> |
| Nigricanin-glucosid | Glc             | H                | OCH <sub>3</sub> | O-CH <sub>2</sub> -O |                | OCH <sub>3</sub> |
| Nigricin            | H               | H                | OCH <sub>3</sub> | O-CH <sub>2</sub> -O |                | H                |
| Nigricin-diglucosid | Glc-Glc         | H                | OCH <sub>3</sub> | O-CH <sub>2</sub> -O |                | H                |
| Nigricin-glucosid   | Glc             | H                | OCH <sub>3</sub> | O-CH <sub>2</sub> -O |                | H                |
| Irisolidon-glucosid | CH <sub>3</sub> | H                | OH               | OCH <sub>3</sub>     | O-Glc          | H                |

Glc = Glucose

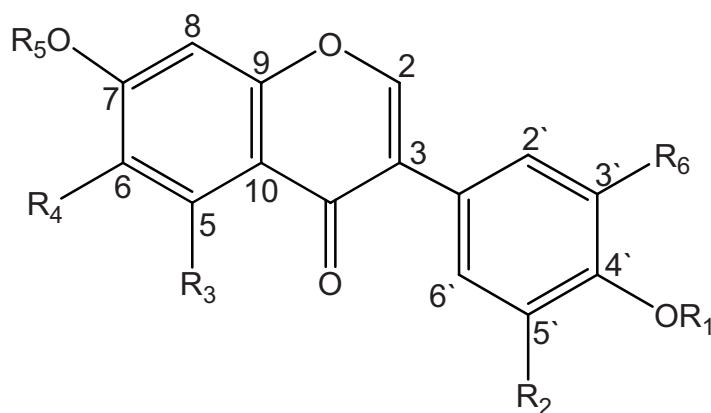


Abbildung 82: Grundstruktur eines Isoflavons mit den entsprechenden Substitutionsmöglichkeiten.

### 3.3 Isolierung weiterer Phytoestrogene

Ein Ziel der Untersuchungen war u.a. die präparative Isolierung von Isoflavonen/Phytoestrogenen, um ausreichend Referenzmaterialien für Untersuchungen über deren Metabolisierung und biologische Aktivität zu gewinnen. Als ein gutes Beispiel ist hier Irilon aus *Iris germanica* zu nennen, über dessen Metabolismus und Bioverfügbarkeit bislang nur sehr wenig bekannt ist. Ebenso können mit den isolierten und charakterisierten Reinsubstanzen Methoden zur Quantifizierung dieser Isoflavone entwickelt werden. Deshalb werden weitere HSCCC-Trennungen von Isoflavonen sowie Stilbenen in diesem Kapitel kurz erläutert.

#### 3.3.1 Analyse der Rhizomen von Kudzu (*Pueraria lobata*) und Isolierung eines Isoflavon-C-Glucosides mittels HSCCC

Verschiedene Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Kudzu sind derzeit auf dem Markt, die u.a. zur Raucherentwöhnung angeboten werden (vgl. Kapitel 1.5). In der Traditionellen Chinesischen Volksmedizin werden Präparate aus den Rhizomen dieser Pflanze bereits seit Jahrhunderten zur Linderung verschiedener Beschwerden verwendet. Neuerdings wird das Potential von Kudzu zur Linderung der Entzugserscheinungen bei der Entwöhnung von z.B. Alkohol untersucht [Overstreet et al., 2003]. Aufgrunddessen ist es von Interesse, die in der Wurzel enthaltenen Inhaltsstoffe zu identifizieren, um mit den isolierten Reinverbindungen verschiedene biologische Testungen durchzuführen. In Kudzu (*Pueraria lobata*) sind zahlreiche Isoflavone enthalten, wobei insbesondere Daidzin in größerer Konzentration vorliegt. Verschiedene Isoflavone konnten in Kudzu bislang identifiziert werden, wozu u.a. Biochanin A, Formononetin, Genistein, 3-Methoxydaidzin und 6''-O-D-Xylosylpuerarin gehören [Ma et al., 2005; Lin und Giusti, 2005]. Das C-glucosidisch gebundene Isoflavon Puerarin (7,4'-Dihydroxy-isoflavon-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosid) ist ebenfalls in Kudzu enthalten [Harborne, 1994]. Neben dem Vorkommen in Kudzu gelang es, Puerarin sowie Puerarin-6''-O- $\beta$ -apiofuranosid in *Pueraria mirifica* (Kwao Krua) nachzuweisen. Diese Pflanze ist eine weitere, neuere Art der Gattung *Pueraria*, welche in der thailändischen Volksmedizin seit vielen Jahrhunderten zur Steigerung der Libido verwendet wird [Ingham et al., 1986]. Daten zur Bioverfügbarkeit, möglichen toxischen Wirkung oder zur Metabolisierung dieses Isoflavons sind noch nicht vollständig vorhanden. Prasain et al. [2004] deuteten in ihrer Studie darauf hin, dass Puerarin ohne Hydrolyse absorbiert wird. Im Tierversuch mit Ratten lag lediglich ein minimaler Anteil als oxidative Metabolite vor. Einige Hinweise gibt es überdies, dass Puerarin die Blut-Gehirn-Schranke passieren kann [Prasain et al., 2004]. Deshalb wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Rhizomen der Kudzu-Pflanze dieses Isoflavon isoliert und charakterisiert, damit es als Referenzmaterial zur Verfügung steht. Cao

et al. [1999] entwickelten bereits eine semipräparative Methode zur Isolierung von Puerarin aus Kudzu mittels HSCCC. Mit dem für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Pflanzenmaterial konnte diese Trennung nicht durchgeführt werden, da es zu keiner Entmischung der beiden Phasen des Fließmittelsystems kam.

Die getrockneten und geschnittenen Rhizome der Kudzu-Pflanze wurden zur Probenvorbereitung mit einer haushaltsüblichen Küchenmaschine zerkleinert. Anschließend erfolgte eine Entfettung mit Hexan, um störende lipophile Bestandteile abzutrennen. Der getrocknete Rückstand wurde unter Rühren mit Methanol über mehrere Stunden extrahiert. Dieser Rohextrakt wurde massenspektrometrisch untersucht. Er enthält verschiedene Isoflavone, die aufgrund der Retentionszeiten und Massen der Pseudomoleküle u.a. auf das Vorhandensein von Daidzin sowie Malonyldaidzin hindeuten (s. Abbildung 83). Aus diesem Rohextrakt wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand mit viel Wasser aufgeschwemmt und über eine XAD-7-Säule aufgereinigt. Mit Methanol wurden die phenolischen Bestandteile von der Säule eluiert und lyophilisiert. Der gefriergetrocknete Extrakt wurde zur Trennung mittels HSCCC verwendet.

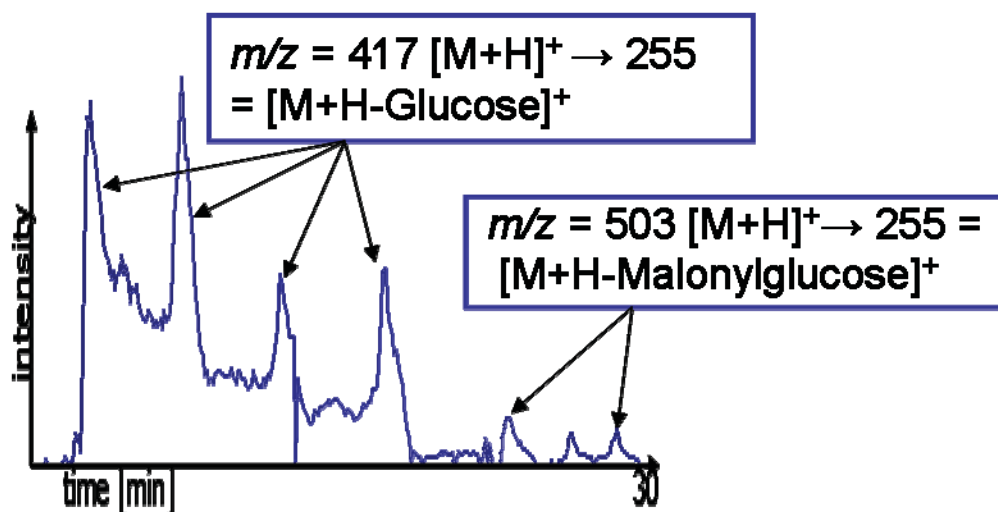


Abbildung 83: Totalionenstrom des Rohextraktes von Kudzu.

Das Gemisch aus *tert.*-Butylmethylether/Acetonitril/Wasser im Verhältnis 8/5/11 (V/V/V) erwies sich für die Trennung der Isoflavone aus Kudzu als geeignet. Dabei betrug der Fluss der mobilen Phase 3,0 mL/min und die Umdrehungsgeschwindigkeit des Coils 800 U/min. Die Trennung wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm aufgezeichnet. Das HSCCC-Chromatogramm ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 84).

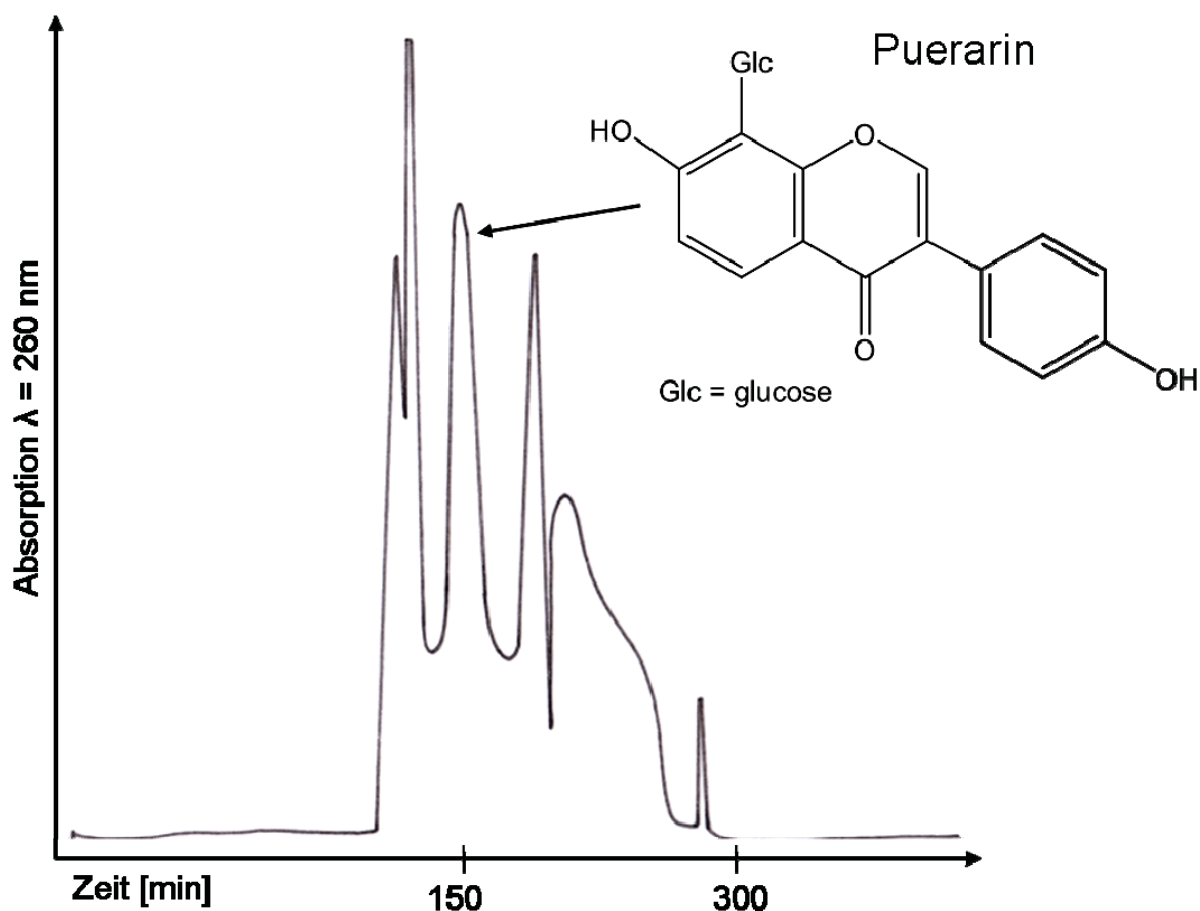


Abbildung 84: HSCCC-Chromatogramm der Trennung eines Isoflavon-Extraktes aus den Rhizomen von Kudzu.

Bei dieser Trennung können verschiedene Fraktionen erhalten werden, wobei das Isoflavon Puerarin in der zweiten Fraktion angereichert ist und aus dieser mittels präparativer HPLC isoliert werden kann (s. Abbildung 84). Die strukturelle Identifizierung und Charakterisierung erfolgt über 2D-NMR-Experimente, um die Konformation der Glucose im Molekül zu beweisen. Anhand der massenspektrometrischen Daten wird vermutet, dass es sich bei dem isolierten Isoflavon um ein C-Glucosid handelt, da es im  $\text{MS}^2$  der LC-(ESI)-MS-Analyse nicht vom Pseudomolekülion mit der Masse  $m/z = 417 = [\text{M} + \text{H}]^+$  zu  $m/z = 255 = [\text{M} + \text{H} - \text{Anhydroglucose}]^+$  fragmentiert. Diese Fragmentierung ist für ein Isomer des Puerarins, das Daidzin bekannt, wobei die glucosidische Bindung am C7 im Molekül vorhanden ist. Dieses wird im Vergleich beider Fragmentierungsreaktionen deutlich (s. Abbildung 85).

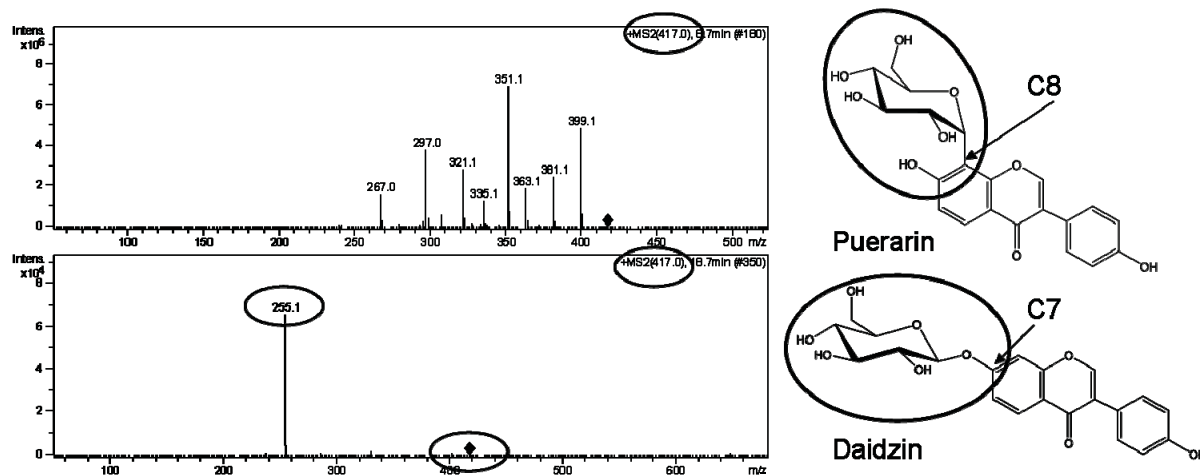


Abbildung 85: Massenspektrometrische Analyse (MS/MS-Spektrum) der beiden Isoflavone Puerarin und Daidzin.

Im Gegensatz zu den O-Glucosiden wird bei den C-Glucosiden bei der MS-Analyse kein Aglykon-Rest gebildet, sondern es bilden sich zwei für die C-glucosidische Bindung typische Fragmente bei  $m/z = [M + H - 120]^+$  und  $m/z = [M + H - 150]^+$ , wobei das vorherrschende Fragment für eine 8-C-glucosidische Bindung das Fragment mit der Masse  $[M + H - 120]^+$  ist [Domon und Castello, 1988; Markham, 1982]. Bei dem aus Kudzu isolierten Puerarin sind im MS<sup>2</sup>-Spektrum der LC-MS<sup>2</sup>-Analyse die Fragmente mit der Masse von  $m/z = 297$  ( $= [M + H - 120]^+$ ) sowie  $m/z = 267$  ( $= [M + H - 150]^+$ ) deutlich zu erkennen (s. Abbildung 85). Die strukturellen Unterschiede beider Moleküle bewirken die verschiedenen Wege der Fragmentierung. Die MS<sup>n</sup>-Spektren sind aufgrund einer Dehydratisierung der Pseudomolekulationen und der Fragmentierung der Glucose verschieden. Im Falle des C-glucosidisch gebundenen Puerarins können C6- und C8-Isomere entstehen [Lin et al., 2005]. Die Struktur von Puerarin wird mittels NMR-Experimenten bestätigt. Im <sup>1</sup>H-NMR wird die C-Verknüpfung des Zuckers besonders im Vergleich mit den Daten von Daidzin deutlich. So ist im Falle des Puerarins das Dublett vom H8 bei der Verschiebung von 6.87 ppm nicht mehr ersichtlich. Darüber hinaus wird bei Daidzin eine meta-Kopplung vom H6 erhalten ( $^4J_{\text{meta}} = 0.9 - 3.0 \text{ Hz}$ ), welche beim Spektrum des Puerarins konsequenter Weise fehlt. Verdeutlicht werden kann dieses anhand des direkten Vergleichs der Spektren dieser Isoflavone (s. Tabelle 19). Die Verknüpfung der Glucose direkt an das C8 des A-Ringes im Molekül wird ebenfalls durch 2D-NMR-Analysen bestätigt. Das Signal für das anomere H-Atom der Glucose (H1'') ist im Falle des Puerarins nicht so weit ins tiefe Feld verschoben ( $\delta = 4.85 \text{ ppm}$ ).

Tabelle 19: Vergleich der NMR-Daten von Daidzin mit Puerarin.

| Position | Daidzin                                    |                                  | Puerarin                                   |                                  |
|----------|--------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
|          | $^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm); ( $J$ (Hz)) | $^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm) | $^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm); ( $J$ (Hz)) | $^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm) |
| 2        | 8.36                                       | 153.1                            | 9.31                                       | 152.5                            |
| 3        | -                                          | 123.6                            | -                                          | 126.1                            |
| 4        | -                                          | 174.6                            | -                                          | 174.8                            |
| 5        | 8.04; (d, 9.0)                             | 126.8                            | 7.93; (d, 8.8)                             | 123.0                            |
| 6        | 7.14; (dd, 9.0 und 2.0)                    | 115.5                            | 6.98                                       | 116.8                            |
| 7        | -                                          | 161.3                            | (OH)                                       | 160.9                            |
| 8        | 7.22; (d, 2.0)                             | 103.4                            | -                                          | 112.6                            |
| 9        | -                                          | 157.2                            | -                                          | 157.0                            |
| 10       | -                                          | 118.4                            | -                                          | 122.5                            |
| 1'       | -                                          | 122.2                            | -                                          | 123.0                            |
| 2'/6'    | 7.40                                       | 129.9                            | 7.39                                       | 129.9                            |
| 3'/5'    | 6.81                                       | 114.9                            | 6.79                                       | 114.9                            |
| 4'       | 9.47 (OH)                                  | 156.9                            | 9.46                                       | 157.0                            |
| 1''      | 5.08                                       | 100.0                            | 4.85; (d, 7.2)                             | 73.4                             |
| 2''      |                                            | 73.0                             |                                            | 70.8                             |
| 3''      | 3.12-3.31                                  | 76.4                             | 3.12-3.31                                  | 78.7                             |
| 4''      |                                            | 69.6                             |                                            | 70.0                             |
| 5''      | 3.42-3.47                                  | 77.1                             | 3.28-3.43                                  | 81.7                             |
| 6a''     |                                            | 60.6                             |                                            | 61.3                             |
| 6b''     | 3.72                                       |                                  | 3.70                                       |                                  |



In Fraktion 4 der HSCCC-Trennung (s. Abbildung 84) des Kudzu-Extraktes liegt ein Gemisch aus verschiedenen Isoflavonen vor, unter denen Daidzin, Genistin und Ononin identifiziert werden können. Ebenfalls kann durch die massenspektrometrische Analyse ein malonyliertes Isoflavon bei einer Retentionszeit von 23,8 min detektiert werden. Im MS<sup>2</sup>-Spektrum lässt sich gut die Abspaltung einer Malonylglucose erkennen ( $\Delta 248 = m/z = 162 + 86$ ) (Abbildung 86).

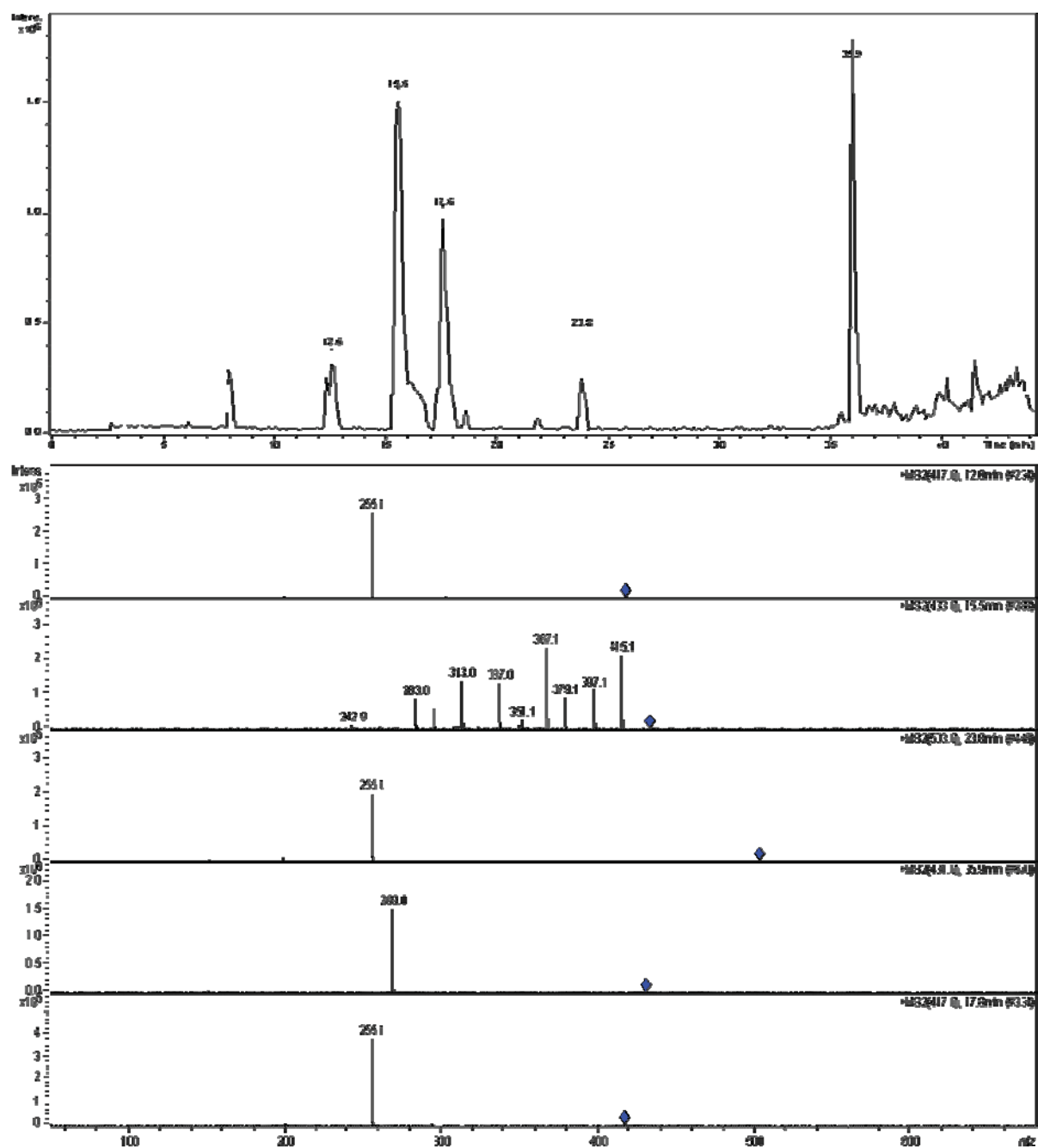


Abbildung 86: LC-MS/MS-Analyse der Fraktion 4 der HSCCC-Trennung des Kudzu. Oben dargestellt ist der Totalionenstrom, darunter die einzelnen Massenspektren der Verbindungen in der Reihenfolge entsprechend ihrer Elution.

In der ersten Fraktion der HSCCC-Trennung von Kudzu (s. Abbildung 84) eluiert das Isoflavon Daidzin direkt nach dem Phasendurchbruch der mobilen Phase. Dieses konnte anhand der massenspektrometrischen Daten ermittelt werden, da ein Vergleich mit dem isolierten Standard aus Soja vorgenommen werden kann.

### 3.3.2 Isolierung von Resveratrol aus Weintraubentrester

Das Stilben Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) geriet aufgrund seiner vielfältigen biologischen Eigenschaften (vgl. 1.1.2) zunehmend in das Interesse der Forschung. Diese Verbindung ist nicht nur wichtig als Phytoalexin, sondern auch für die menschliche Ernährung („Französisches Paradoxon“). Bislang sind die Bioverfügbarkeit und die Metabolisierung von Resveratrol nach der Aufnahme im menschlichen Körper nur unzureichend untersucht. Deshalb wird dieses Phytoestrogen ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit isoliert. Eine Forschungsgruppe aus Griechenland befasst sich überdies mit der biotechnologischen Modifizierung von Hefezellkulturen (*Saccharomyces cerevisiae*) mit dem Ziel, dieses Stilben in größeren Mengen mit Hilfe der gentechnisch modifizierten Hefezellen produzieren zu können [Ververidis et al., 2007a; Ververidis et al., 2007b].

Ein käuflich zu erwerbender Weintraubenschalen-Extrakt wurde zweifach hintereinander mit Hexan entfettet, um mögliche an den Weintraubenschalen anhaftende Fette sowie die lipophilen Bestandteile zu entfernen. Der verbleibende Rückstand wurde mit Methanol unter ständigem Rühren extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Methanols aus der Extraktionslösung wurde der Rückstand mit Wasser verdünnt und über XAD-7-Material aufgereinigt. Der lyophilisierte Extrakt wurde zur Trennung mittels HSCCC eingesetzt, wobei das binäre Fließmittelsystem Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser im Verhältnis 2,75/5/2,75/5 (V/V/V/V) verwendet wurde. Die mobile Phase wurde mit einem Fluss von 2,7 mL/min in das System gepumpt, wobei die Detektion bei der Wellenlänge von  $\lambda = 320$  nm erfolgt und die Coils mit einer Geschwindigkeit von 900 U/min rotierten. Die Trennung erfolgte im Head-to-tail-Modus, wobei die organische Phase als stationäre Phase diente. Eine vollständige HSCCC-Trennung des Weintraubenschalen-Extraktes benötigte unter diesen Bedingungen zehn Stunden (vgl. Abbildung 87). Das Stilben Resveratrol konnte in Reinform erhalten werden (aus 125 mg Extrakt wurden 11 mg reines Resveratrol erhalten). Dies wird mittels LC-(ESI)-MS-Analysen sowie NMR-Experimenten verifiziert.

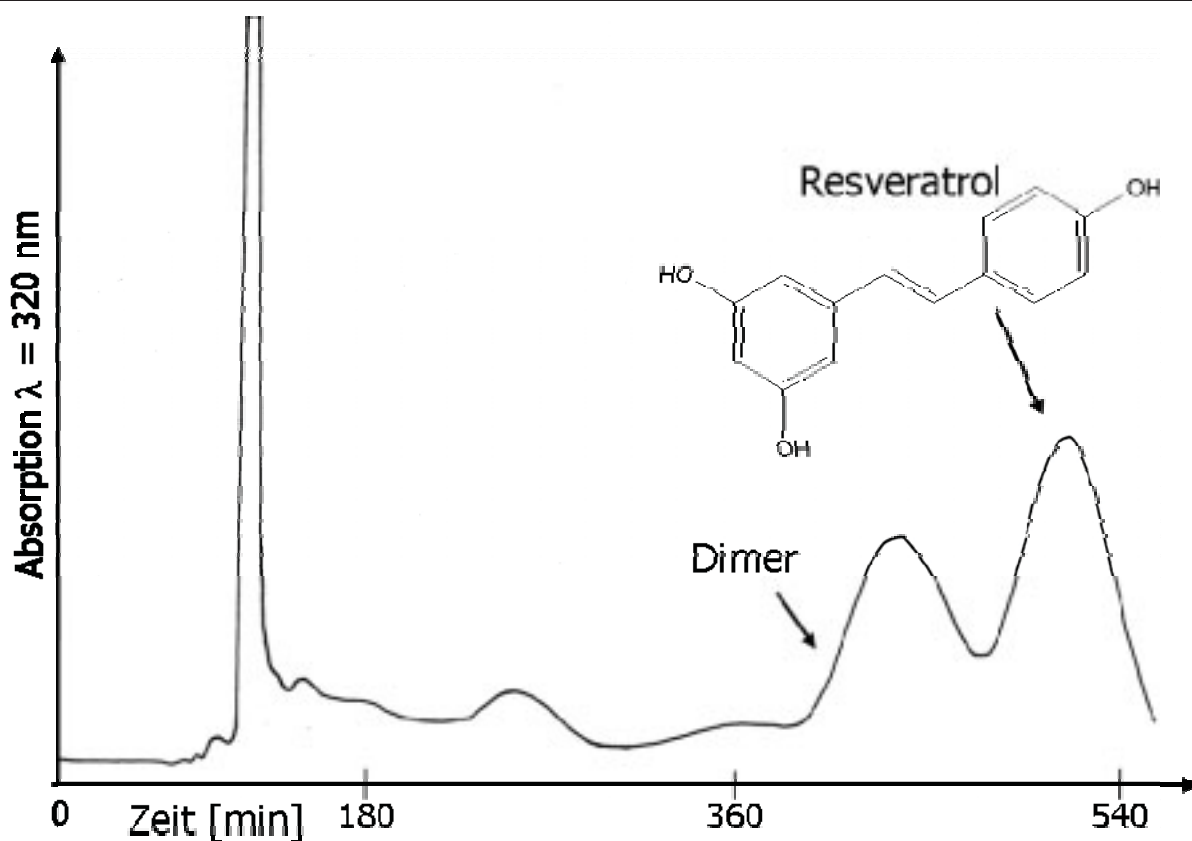


Abbildung 87: HSCCC-Chromatogramm des Weintraubenschalen-Extraktes zur Isolierung von Resveratrol.

Insgesamt werden bei dieser Trennung zwei Fraktionen erhalten. In der ersten Fraktion ist ein Dimer des Resveratrols angereichert, welches mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt wird. Die strukturelle Aufklärung dieses Dimers erfolgte mittels 2D-NMR-Experimenten, welche die Zusatzinformationen zur Molekülmasse sowie dem  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Spektrum geben. Vermutlich handelt es sich um Pallidol, dessen Stereoisomerie jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.

Bei dieser Trennung war es jedoch von Bedeutung, wie viel Extrakt für die Trennung verwendet wird. Bei einer Menge von 400 mg verbreitern sich die Fraktionen so sehr, dass es zu keiner Basislinientrennung kommt (vgl. Abbildung 88). Die Fraktionen können jedoch geschnitten werden und durch einfache und schnelle DC-Versuche die Grenzlinie zwischen dem Dimer und Resveratrol ermittelt werden (s. Abbildung 88). Dabei wird auf Kieselgel entwickelt und die Spots auf der DC-Platte unter UV-Licht detektiert. In dem hier aufgeführten Beispiel kann nach etwa 400 Minuten Trennzeit reines Resveratrol erhalten werden, was in folgender Grafik markiert ist.

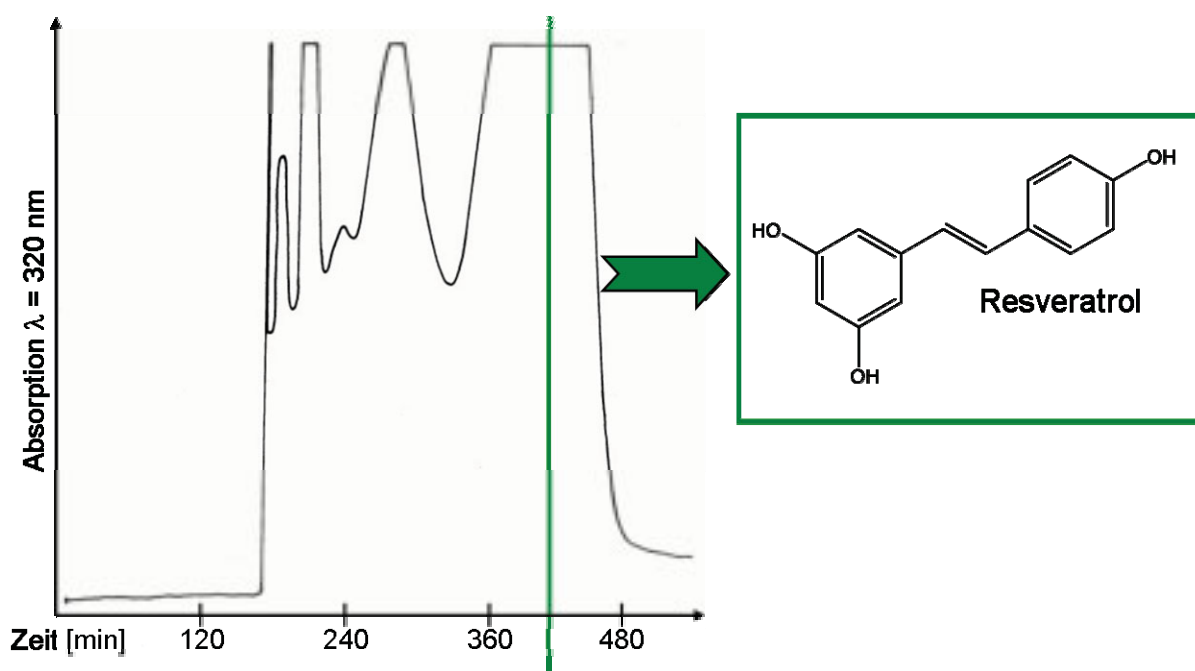


Abbildung 88: Isolierung von Resveratrol aus Weintraubenschalen bei Aufgabe von 400 mg Extrakt.

### 3.3.3 Isolierung des Coumestans Coumestrol aus Alfalfa-Sprossen

Für die Isolierung von Coumestrol aus frischen Alfalfa-Sprossen wurde zunächst aus diesen ein geeigneter Extrakt hergestellt, welcher die entsprechenden phenolischen Bestandteile in angereicherter Form enthält. Dazu wurden die Sprossen zunächst zerkleinert und entfettet, bevor mit einer methanolischen Lösung extrahiert wurden. Eine Aufreinigung und Konzentrierung des Extraktes erfolgte mittels XAD-7-Adsorberharz. Der lyophilisierte Extrakt diente als Probenmaterial für die HSCCC-Isolierung, wobei die Aufgabemenge lediglich zwischen 70 und 150 mg lag. Bei höheren Injektionsmengen kann es zu einem sogenannten „Carry-Over-Effekt“ kommen, wobei das Zweiphasensystem nicht mehr stabil bleibt. Als Fließmittelsystem für diese Isolierung von Coumestrol aus Alfalfa-Sprossen (s. Abbildung 89) wurde ein Gemisch aus Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser im Verhältnis 3,95/5/3,9/5 (V/V/V/V) verwendet. Gearbeitet wurde im Head-to-Tail-Modus, wobei die leichtere Phase als stationäre Phase fungierte. Die Flussrate betrug bei dieser Trennung 3,2 mL/min und die Umdrehungsgeschwindigkeit der Coils des Countercurrent Chromatographen 700 U/min. Die Trennung wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm verfolgt.

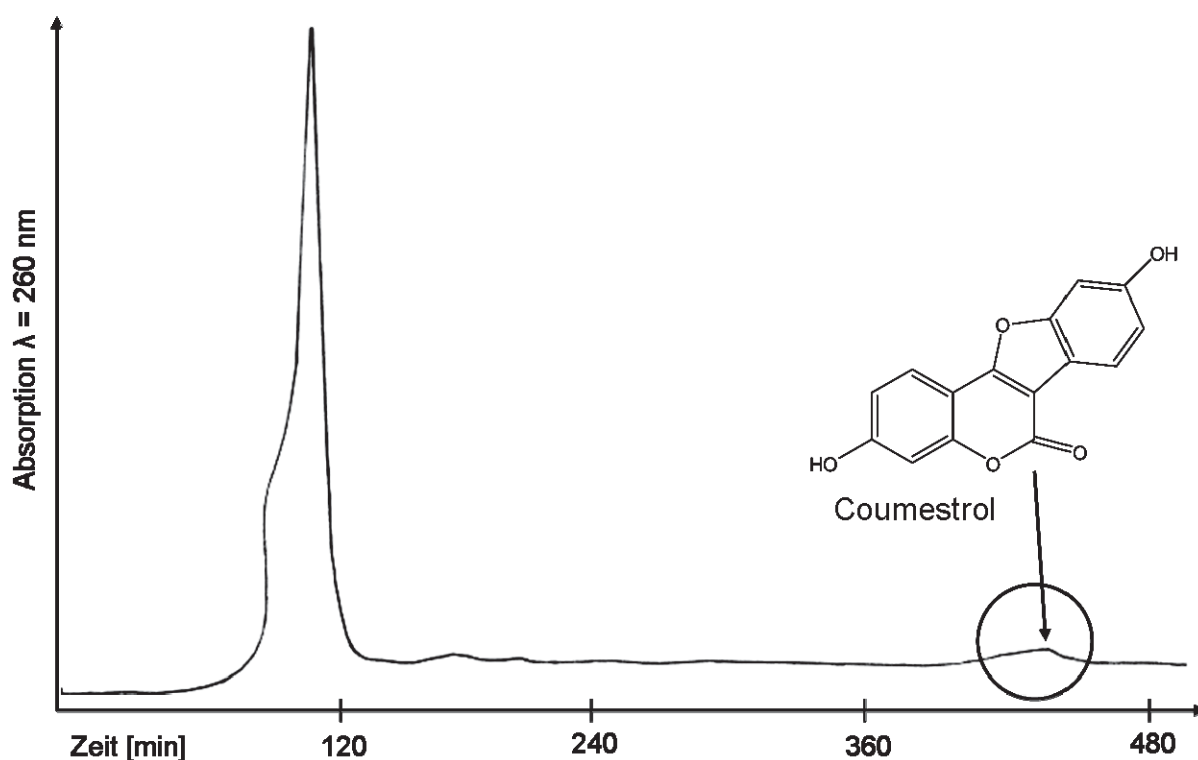


Abbildung 89: HSCCC-Trennung von Coumestrol aus Alfalfa-Sprossen.

Die oben dargestellte Trennung lieferte das Coumestan Coumestrol in Reinform. Da die Aufzeichnung fehlerhaft verlief, ist die beobachtete UV-Absorption nur schwach. Mittels LC-(ESI)-MS und NMR-Analysen wurde die Identität dieses Phytoestrogens bestätigt. Allerdings konnte nur ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum aufgenommen werden, zur vollständigen Absicherung wäre die Aufnahme eines  $^{13}\text{C}$ -Spektrums hilfreich. Jedoch lieferte der Vergleich der Retentionszeiten des Isoflavones Formononetin mit dem isolierten Coumestrol einen wertvollen Hinweis auf dessen Identität. Im Verlauf der Trennung können in der Zeitspanne von etwa 170 – 200 min weitere Substanzen detektiert werden, wobei es sich allerdings gemäß massenspektrometrischen Daten nicht um Reinsubstanzen handelte.

### 3.4 Quantifizierungsmethoden

In diesem Kapitel sollen die entwickelten Methoden beschrieben werden, mit denen der Gehalt an Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) mit Zusatz von Soja (3.4.1) und Rotklee (3.4.2) quantifiziert werden kann. Als Vergleichsstandards dienen die unter Kapitel 3.2 isolierten Reinsubstanzen. Die jeweilige pflanzliche Zusammensetzung von Soja und Rotklee unterscheidet sich stark voneinander (vgl. Kapitel 1.2.2 und 1.3.2). Außerdem liegt eine starke Variation des individuellen Spektrums der Isoflavone beider Pflanzen vor, weshalb für die Bestimmung des jeweiligen Gehaltes in den entsprechenden Nahrungsergänzungsmitteln die Methode optimiert werden musste.

#### 3.4.1 Quantifizierung von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Soja-Extrakten

Im Handel erhältliche Nahrungsergänzungsmittel auf Sojabasis werden überwiegend mit einem Gehalt von 15–100 mg Isoflavonen pro Tagesdosis beworben. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, eine geeignete Analysenmethode zu entwickeln und eine Quantifizierung der Hauptisoflavone in verschiedenen Produkten vorzunehmen, um die aufgeführten Herstellerangaben überprüfen zu können.

Bei den bis dato bestehenden Untersuchungsmethoden wurde der Gehalt an Isoflavonen in Form der Aglykone bestimmt, wobei deutliche Differenzen zwischen den ermittelten Werten und den Herstellerangaben auf dem Etikett zu verzeichnen waren. Um einen aufwändigen Hydrolyseschritt zu umgehen, werden im Rahmen dieser Untersuchung die glykosidisch gebundenen Isoflavone verwendet, d.h. die Konjugationsform, in der Isoflavone natürlich (genuin) in Soja vorkommen [Wiseman et al., 2002]. Bei vorherigen Arbeiten wurde eine Hydrolyse (z.B. basisch) der Isoflavone vorgenommen, so dass diese als Aglykone vorlagen und quantifiziert werden konnten [Nurmi et al., 2002; Da Costa César et al., 2006; Delmonte et al., 2006]. Dieses zieht jedoch weitere Aufarbeitungsschritte nach sich, was zu quantitativen Verlusten von Isoflavonen führen kann und arbeits- und kostenintensiver ist.

Deshalb wurde zur Quantifizierung der in dieser Arbeit untersuchten Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Soja-Extrakten eine analytische HPLC-Methode mit DAD-Detektion entwickelt. Der Gehalt der Hauptisoflavone wurde dabei mittels externen Kalibrierfunktionen bestimmt, wozu die unter Kapitel 3.2.2 isolierten Isoflavone verwendet wurden [Degenhardt und Winterhalter, 2001; Stürtz et al., 2006]. Eine Differenzierung des

Isoflavon-Spektrums der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel erfolgte mittels Massenspektrometrie an einem Esquire-LC-MS/MS-Gerät mit Elektronenspray-Ionisation der Firma BRUKER Daltonik GmbH aus Bremen.

#### 3.4.1.1 Probenaufarbeitung

Nahrungsergänzungsmittel auf Sojabasis weisen unterschiedliche Matrices auf. Häufige Darreichungsformen sind Kapseln, in denen der Soja-Extrakt in einer öligen Suspension (z.B. Leinöl) vorliegt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit einiger Isoflavone (unter anderem Glycitin) ist es wichtig, eine geeignete Extraktionsmethode zu entwickeln, bei der die Isoflavone möglichst vollständig aus der Matrix herausgelöst werden. Diese Extraktion sollte möglichst einfach und schnell durchführbar sein. Ebenso muss gewährleistet sein, dass die labileren Isoflavone (z.B. die acetylierten Konjugate) in der Extraktionslösung stabil sind, so dass es zu keinem quantitativen Verlust an Isoflavonen kommen kann.

Zur Probenvorbereitung wurden die Kapseln/Tabletten zunächst in Trockeneis oder flüssigem Stickstoff eingefroren, zügig mit Hilfe einer Rasierklinge oder einem Skalpell zerkleinert und quantitativ in einen Messkolben überführt. Unter Zugabe von 1-2 mL DMSO erfolgte eine Anlösung des Kapselinhalts, bevor mit der Extraktionslösung Methanol/Wasser im Verhältnis 1/1 (V/V) aufgefüllt wurde. Die Extraktion erfolgte unter Behandlung mit Ultraschall. Dabei war darauf zu achten, dass die Temperatur im Ultraschallbad nicht zu stark ansteigt, weshalb gegebenenfalls Eis dazugegeben wurde. Die Extraktionsdauer betrug 25 min, wobei die einzelnen Kolben während dieser Zeit mehrmals zusätzlich kräftig geschüttelt wurden, um der Bildung eines klebrigen Sediments vorzubeugen. Aufgrund des hohen Proteingehaltes erfolgte eine Klärung mit Carrez-Lösung, um eine klare Lösung zu erhalten. Da einige Kapseln einen sehr hohen Gehalt an nativem Öl enthalten (> 10%), wurden die Lösungen vor der Injektion in die HPLC mit Hexan ausgeschüttelt und anschließend membranfiltriert (siehe Abbildung 90).

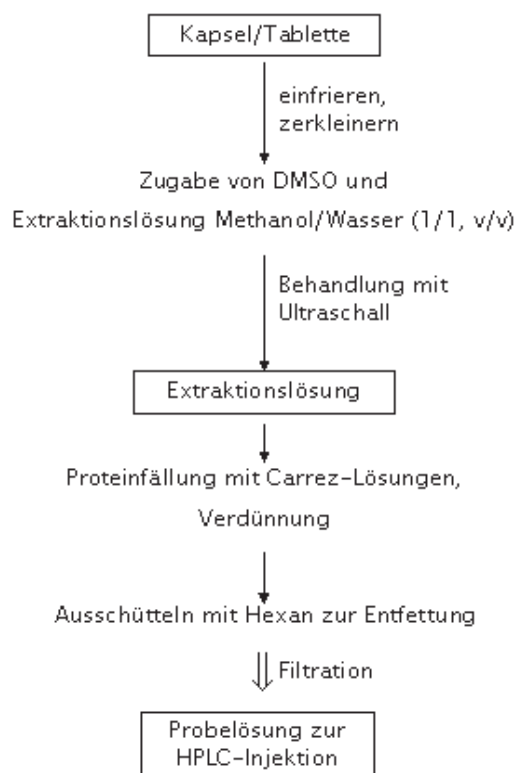


Abbildung 90: Fließschema zur Aufarbeitung von Nahrungsergänzungsmitteln mit Soja-Zusatz.

Von den in Soja enthaltenen Isoflavonen Genistin, Daidzin, Glycitin, 6''-O-Acetyl-genistin und 6''-O-Acetyl-daidzin wurden Stammlösungen hergestellt. Dazu wurde der jeweilige Standard genau in einen Messkolben eingewogen, unter Zugabe von wenigen Tropfen (2-3) DMSO angelöst, und mit der Extraktionslösung Methanol/Wasser im Verhältnis 1/1 (V/V) aufgefüllt. Ein vollständiges Lösen wurde unter Behandlung mit Ultraschall erreicht. Aus diesen Stammlösungen wurden verschiedene Verdünnungen je nach zu erwartendem Gehalt in den untersuchten Nahrungsergänzungsmittel angefertigt, um daraus externe Kalibrierfunktionen zu erstellen. Im Experimentellen Teil unter Kapitel 4.2.15 wird die Durchführung näher erläutert.

#### 3.4.1.2 HPLC-Analysen und Identifizierung

Die zur Untersuchung zur Verfügung gestellten Proben an Nahrungsergänzungsmitteln wurden mit Hilfe der entwickelten HPLC-DAD-Methode (HPLC-System 1, s. Kapitel 4.2.1.1 und 4.2.4) analysiert. Mit diesem System können die Isoflavone aus einem Soja-Extrakt gut voneinander getrennt werden. Die nach 3.4.1.1 aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittel lassen sich ebenfalls mit dieser Methode gut untersuchen. Etwaige Störsubstanzen aus der Probenmatrix wurden abgetrennt und beeinflussen nicht die chromatographische



Untersuchung. Dies wird in einem Vergleich der DAD-Chromatogramme eines Soja-Extraktes mit einer aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittel-Probe deutlich (Abbildung 91).

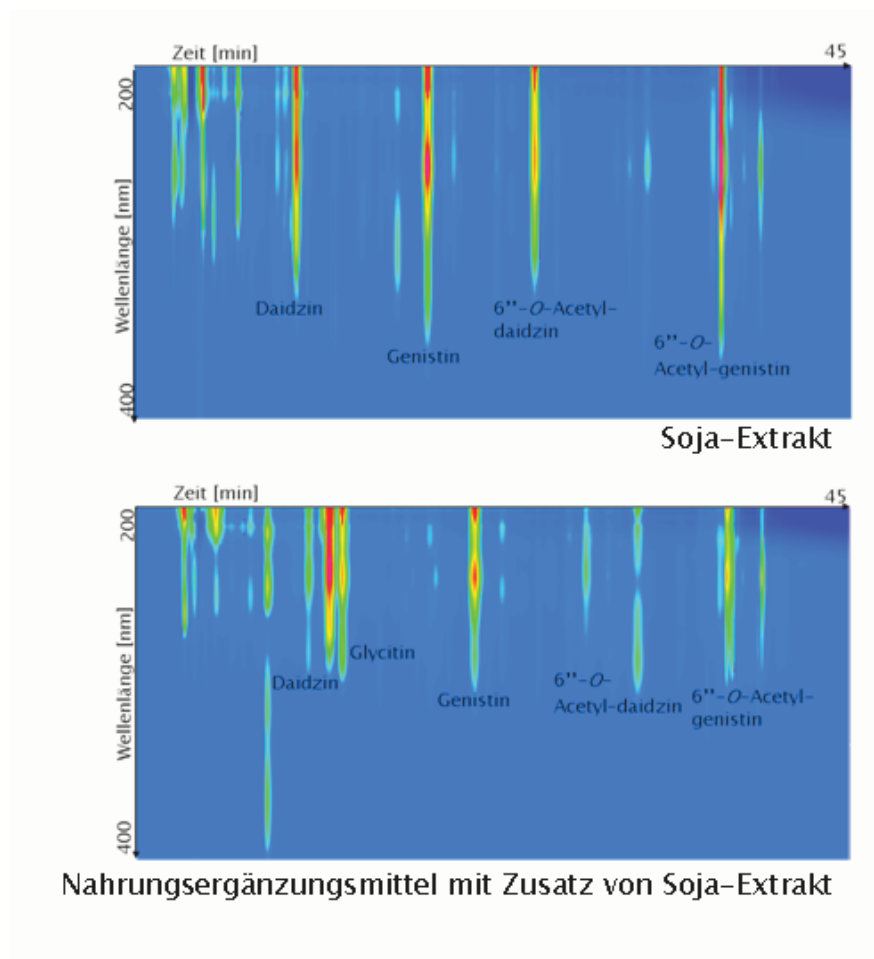


Abbildung 91: HPLC-DAD-Chromatogramm eines Soja-Extraktes (oben) und eines aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittels mit Zusatz von Soja-Extrakt (unten). Der hier dargestellte Wellenlängenbereich des DADs beträgt 200 bis 400 nm.

Deutlich erkennbar ist bei dem Vergleich der beiden HPLC-Chromatogramme eines Soja-Extraktes und eines Nahrungsergänzungsmittels (mit Zusatz von Soja) die unterschiedliche prozentuale Zusammensetzung der einzelnen Isoflavone. Der Soja-Extrakt weist eindeutig Genistin als das quantitativ dominierende Isoflavon auf, was in Einklang steht mit den Daten aus der Literatur [Naim et al., 1973]. Hingegen überwiegt in dem hier dargestellten Nahrungsergänzungsmittel (s. Abbildung 91 unten) das Isoflavon Daidzin. Wenige weitere Substanzen sind in dem Chromatogramm des Nahrungsergänzungsmittels zu erkennen, so befindet sich z.B. vor dem Daidzin-Peak eine Substanz, welche in einem höheren Absorptionswellenlängenbereich bei ca. 380 nm eine weitere maximale Absorptionswellenlänge ( $\lambda_{\max}$ ) aufweist. Einige Peaks sind aufgrund von Lösungsmittel- und Matrixeinflüssen in ihrer Retentionszeit leicht verschoben. Deshalb wurde die Identität der

einzelnen Isoflavone aus den Nahrungsergänzungsmitteln mittels LC-(ESI)-MS<sup>n</sup> bestätigt. Eine Überprüfung der Zusammensetzung der Proben und damit einhergehend der vorhandenen Isoflavone ist deshalb wichtig, um eventuelle Matrixeinflüsse mit zu berücksichtigen, bei denen es zu einer Verschiebung der Retentionszeiten kommen kann. Ebenso konnten mittels dieser Untersuchung auch eventuell störende Substanzen detektiert werden, die möglicherweise unterhalb der Peaks der Isoflavone liegen. Dieses sollte nach Möglichkeit ausgeschlossen werden, um bei der folgenden Quantifizierung keine Fehler einzutragen. Der Total-Ionenstrom eines aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittels ist in Abbildung 92 dargestellt. Durch die massenspektrometrische Analyse mittels ESI-MS<sup>n</sup> können den einzelnen Peaks exakt die entsprechenden Isoflavone zugeordnet werden (s. Tabelle 20).

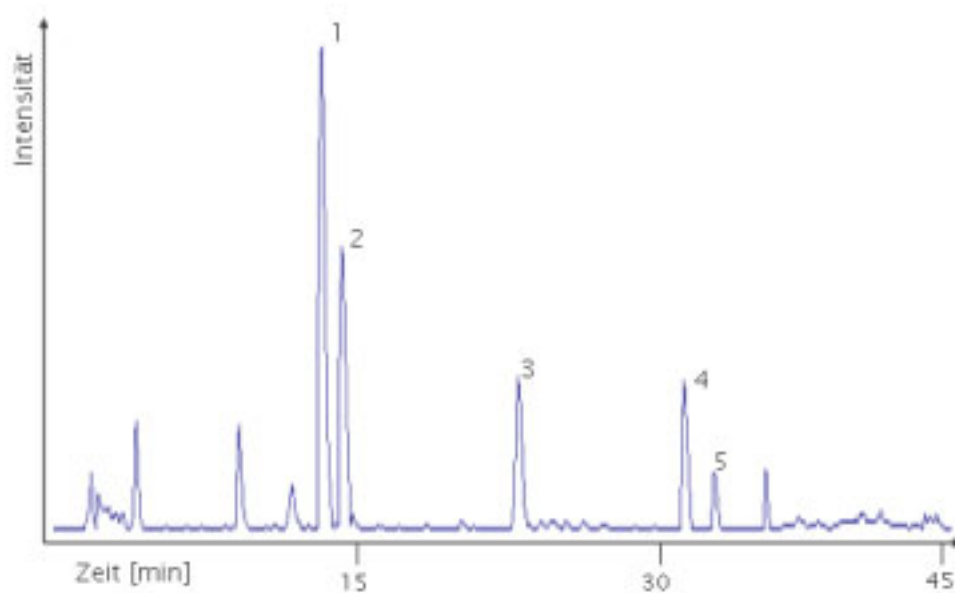


Abbildung 92: Total-Ionen-Chromatogramm (TIC) eines aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittels mit Zusatz von Soja-Extrakt. Die Identifizierung der Peaks wird in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Identifizierung der Isoflavone eines untersuchten Nahrungsergänzungsmittels (vgl. Abbildung 92).

| Peak- Nr.            | 1       | 2        | 3        | 4                    | 5                     |
|----------------------|---------|----------|----------|----------------------|-----------------------|
| Retentionszeit [min] | 13,9    | 14,8     | 23,4     | 31,6                 | 33,0                  |
| $[M + H]^+ (m/z)$    | 417     | 447      | 433      | 459                  | 489                   |
| Fragmente ( $m/z$ )  | 255     | 285      | 271      | 255                  | 271                   |
| Identifizierung:     | Daidzin | Glycitin | Genistin | 6''-O-Acetyl-daidzin | 6''-O-Acetyl-genistin |

Die Darreichungsformen der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel waren Tabletten auf Calciumcarbonat-Basis und Kapseln, welche pflanzliche Öle sowie Glycerin enthalten. Als Zutaten für die Tabletten auf Calciumcarbonat-Basis sind beispielsweise Reisstärke als Füllstoff, Gummi arabicum als Festigungsmittel, Siliciumoxid als Trennmittel, Citrate, Citronensäure, die Vitamine B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>1</sub> und D<sub>3</sub>, Folsäure, Biotin, Gelatine, Sorbate, Talkum, Sojaöl, Stearate, Maltodextrin, als Farbstoffe Eisenoxid oder Titanoxid, gehärtete pflanzliche Fette und Sojakonzentrat zu nennen. Bei den Präparaten in Kapselform (s. Abbildung 93) werden neben Soja-Extrakten und den oben aufgeführten Vitaminen zusätzlich u.a. Lecithine, pflanzliche Öle wie Kürbiskern-, Kokos- oder Leinöl, Leinsamenpulver, Sorbit, Glycerin, Wachse, Tocopherole und Ascorbinsäure als Zutaten auf der Verpackung aufgeführt.



Abbildung 93: Beispiele von Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Soja-Extrakt in Kapselform (aufgeschnittene Kapseln). Foto: Stürtz, 2006.

### 3.4.1.3 Ermittlung eines geeigneten Extraktionsmittels und der optimalen Extraktionsdauer

In der Gruppe der Isoflavone gibt es sowohl sehr lipophile (Beispiel: Malonyl-Genistin), als auch mittelpolare Vertreter, worauf bei der Auswahl des jeweiligen Extraktions- oder Lösungsmittels geachtet werden sollte. Für die Extraktion von Isoflavonen aus Nahrungsergänzungsmitteln wurden zunächst einige Tests mit den isolierten Reinsubstanzen bezüglich deren Löslichkeit durchgeführt, um so das optimale Extraktionsmittel zu finden. Die meisten Isoflavon-Glykoside sind sehr schwer löslich in den gängigen Lösungsmitteln wie Wasser, Methanol oder Ethanol, wobei dieses insbesondere für Glycitin zutrifft. Ein vollständiges Lösen ab einer bestimmten Konzentration ist meist nur unter Verwendung von reinem DMSO (Dimethylsulfoxid) zu erreichen. Bei DMSO handelt es sich um ein aprotisches, dipolares Lösungsmittel [Römpp, 2006]. Der Gebrauch dieses Lösungsmittels ist zwar generell nicht gefährlich, jedoch kann es gut durch Membranen und damit auch durch die menschliche Haut dringen. Die in DMSO gelösten Substanzen gelangen auf diese Weise gleichermaßen perkutan in den Organismus, womit potentiell toxische Komponenten aufgenommen werden. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von DMSO besteht in der schlechten Flüchtigkeit, d.h. für die Wiedergewinnung der in ihm gelösten Substanzen muss zumeist eine Festphasenextraktion durchgeführt werden. Ein Abdestillieren am Rotationsverdampfer ist aufgrund des hohen Siedepunktes von 189°C [Römpp, 2006] kaum möglich. Die durchgeführten Voruntersuchungen zeigten, dass sich die entsprechenden Isoflavone jeweils bis zu einer bestimmten Konzentration in Methanol und Ethanol lösen, bzw. in wässrigen Lösungen dieser beiden Alkohole.

Aufgrunddessen wurden verschieden konzentrierte wässrige Methanol- und Ethanol-Lösungen zu derselben Probe eines Nahrungsergänzungsmittels gegeben, wobei der jeweilige Alkoholgehalt zwischen 40 und 80% liegt. Hierzu wurde ein Nahrungsergänzungsmittel in Tablettenform verwendet, welches in vorherigen Untersuchungen nur äußerst geringe Schwankungen der Isoflavon-Gehalte einzelner Tabletten innerhalb einer Blisterpackung aufwies. Es erfolgt eine Extraktion im Ultraschallbad unter identischen Bedingungen für alle alkoholisch-wässrigen Lösungen. Zur weiteren Vorbereitung der Proben wurde, wie unter Kapitel 3.4.1.1 beschrieben, verfahren. Die Analyse erfolgte mittels HPLC unter den bereits genannten chromatographischen Bedingungen, wobei sich deutliche Unterschiede innerhalb der detektierbaren Mengen der beiden Hauptisoflavone des Sojas (Genistin und Daidzin) zeigten (s. Abbildung 94). Diese Variation des Extraktionsmittels zur Ermittlung der optimalen Zusammensetzung für die quantitative Extraktion der betreffenden Isoflavone aus den Nahrungsergänzungsmitteln wurde mit Tabletten auf Calciumcarbonat-Basis sowie mit ölhaltigen Hartkapseln

durchgeführt. Dabei lieferten beide Darreichungsformen ähnliche Ergebnisse, so dass in beiden Fällen das gleiche Extraktionsmittel verwendet wurde.

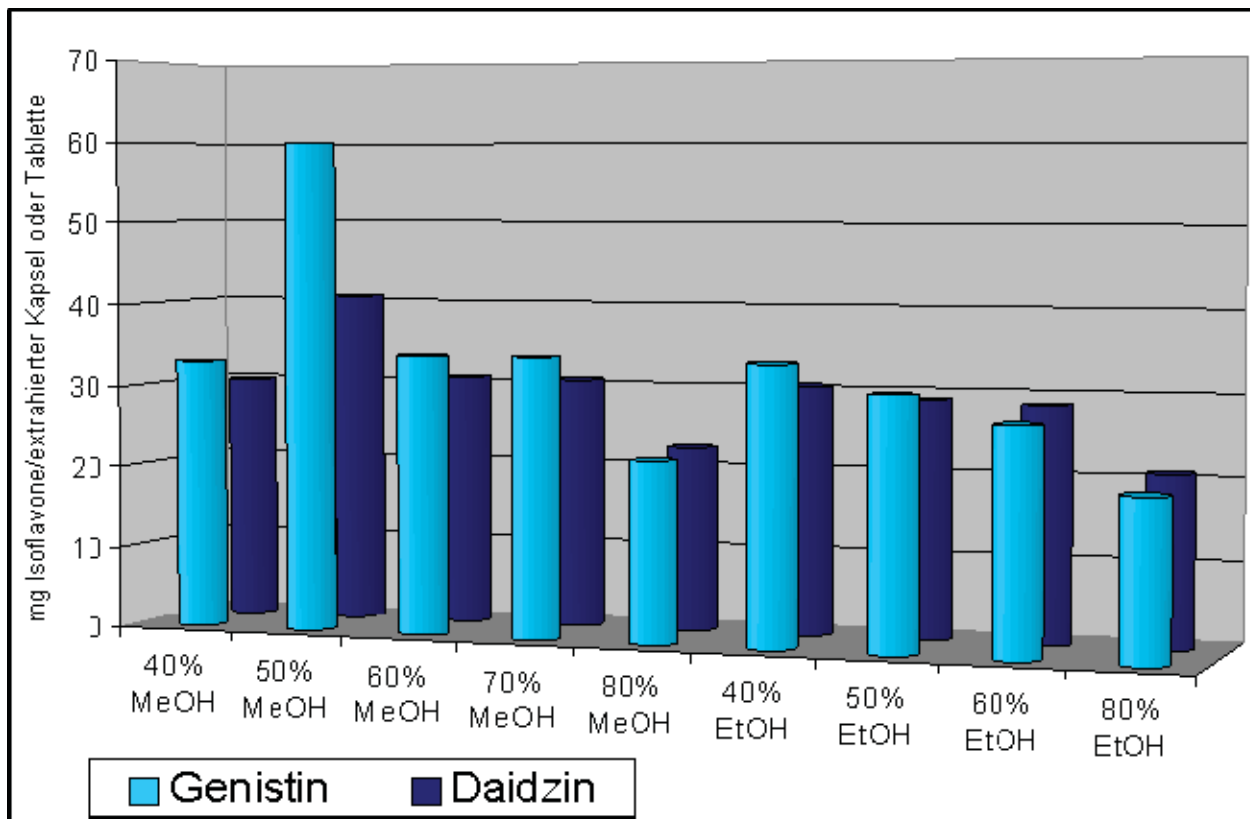


Abbildung 94: Variation des Extraktionsmittels (wässrige Lösungen von Methanol und Ethanol) für die Extraktion der Isoflavone Genistin und Daidzin aus einem Nahrungsergänzungsmittel.

Die ermittelten Gehalte an Isoflavonen im Rahmen dieses Extraktionsversuchs sind tabellarisch im Anhang unter Kapitel 7 für die einzelnen Extraktionsmittel aufgeführt.

Durch die Variation des jeweilig verwendeten Extraktionsmittels zur Aufarbeitung von Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Soja-Extrakt konnte die optimale Zusammensetzung ermittelt werden. Unter Verwendung von 50% wässrigem Methanol als Extraktionsmittel war die Menge an extrahierten Isoflavonen quantitativ am höchsten (vgl. Abbildung 94), weshalb diese methanolische Lösung zur weiteren Probenaufarbeitung verwendet wurde.

Eine Verringerung oder Erhöhung des Methanol-Anteils auf 40 bzw. 60% führte zu einer deutlich geringeren extrahierbaren Menge an Genistin und Daidzin. Bei einem Vergleich der Ergebnisse für die Extraktion mit 60%igem und 70%igem Methanol ist kaum ein Unterschied feststellbar. Die Verwendung von Ethanol statt Methanol als Extraktionsmittel führte nicht zu gesteigerten Mengen an Isoflavonen in der jeweiligen Lösung. Es wird deutlich: Je unpolarer

das alkoholische Gemisch wird, desto mehr verringert sich die extrahierbare Menge an Isoflavonen. Bei einer Erhöhung des Ethanolanteils um je 10% nimmt die ermittelte Menge an Isoflavonen kontinuierlich ab. So nimmt z.B. der Gehalt von Genistin von ca. 34 mg/Kapsel bei der Verwendung von 40%igem Ethanol auf einen Wert von ungefähr 20 mg/Kapsel bei der Extraktion in 80%igem Ethanol ab. Interessant sind hierbei die beiden Werte für die 40%ige methanolische sowie ethanolische Lösung, da mit beiden sehr ähnliche Mengen der beiden Isoflavone Genistin und Daidzin aus der Probenmatrix isoliert werden konnten.

Um ein vollständiges Lösen der Isoflavone aus den komplexen Matrices zu gewährleisten, wurde deshalb zuerst mit 1 mL DMSO angelöst, bevor das Extraktionsmittel zugegeben wurde. Ebenso sollte auf eine ausreichende Menge an Extraktionsmittel geachtet werden, da es ansonsten zu Verklumpungen des Nahrungsergänzungsmittels am Boden des Messkolbens kommen kann.

Zur Bestimmung der optimalen Extraktionsdauer wurden von einem Nahrungsergänzungsmittel mehrere Kapseln der gleichen Charge eingefroren. Die Kapseln wurden aufgeschnitten, die Inhalte vereinigt und homogenisiert. Aus dieser Mischung wurde eine äquivalente Menge in mehrere Messkolben eingewogen, wenig DMSO zum Anlösen dazugegeben und mit dem Extraktionsmittel (50%iges Methanol) aufgefüllt. Die Messkolben wurden 10 bis 80 Minuten im Ultraschallbad bei einer definierten Temperatur (25°C) behandelt. Dabei wurden sie gelegentlich kurz aufgeschüttelt, um ein „Verklumpen“ des Kapselinhaltes zu verhindern. Die Kolben wurden nach der entsprechenden Zeitspanne (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 und 80 min) entnommen. Zumeist dauerte es 10 Minuten, ehe sich der ölige und „klebrige“ Kapselinhalt des NEMs mit dem Extraktionsmittel vermischte. Die extrahierten Mengen der einzelnen Isoflavone stiegen von 10 min bis zur Extraktionsdauer von 20 min steil an. In dem Bereich von 20-40 min war lediglich eine geringe Änderung der Gehalte feststellbar. Nach 50 min nahm der Anteil der acetylierten Isoflavone ab. Die Konzentrationen der Majorisoflavone Daidzin, Genistin und Glycitin veränderten sich in der Zeitspanne von 20-80 min nur minimal. In Abbildung 95 wird in einem Beispiel die Variation der Extraktionsdauer dem jeweiligen resultierenden Gehalt an Majorisoflavonen gegenübergestellt. Dabei wurde ein Präparat auf Kapselbasis untersucht, welches wie unter 3.4.1.1 bearbeitet wurde. Die Variation der Extraktionsdauer wird hierbei in einem Bereich von 10 bis 60 min dargestellt, wobei die quantifizierte Menge der Majorisoflavone (Daidzin, Glycitin und Genistin) sowie die Summe der  $\beta$ -glucosidisch gebundenen Isoflavone angegeben werden. Lediglich geringe Schwankungen in den jeweiligen Mengen in mg/Kapsel lassen sich erkennen, welche sich auch aufgrund der Verwendung von verschiedenen Kapseln einer Blisterverpackung ergeben können. Generell lässt sich

feststellen, dass es bei längerer Extraktionsdauer (> 30 min) zu keiner signifikanten Verbesserung der Extraktion kommt. Aufgrund der Instabilität der acetylierten Isoflavon-Glucoside sowie aus labortechnisch pragmatischen Gründen ist eine geringere Extraktionsdauer daher in Betracht zu ziehen, die für die entwickelte Methode auf 25 min festgelegt wird.

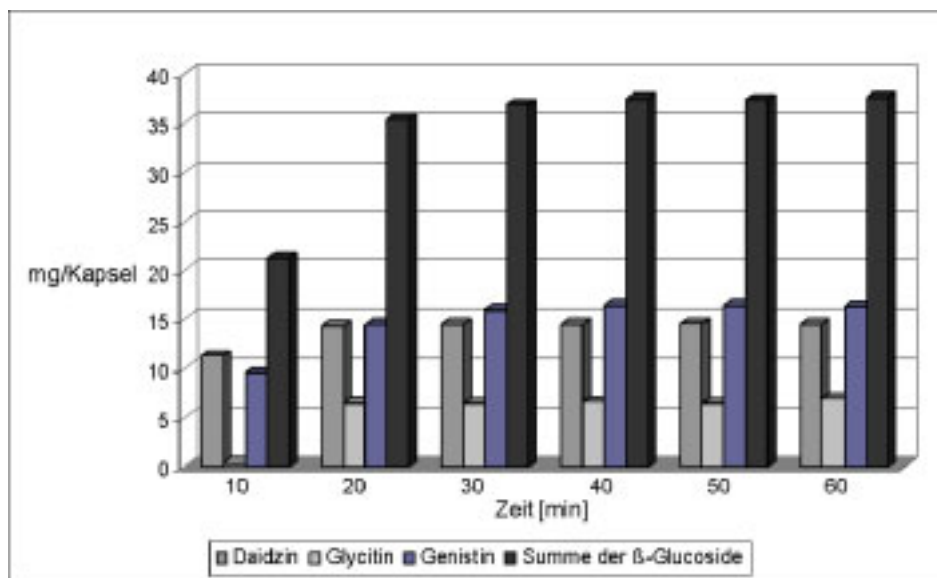
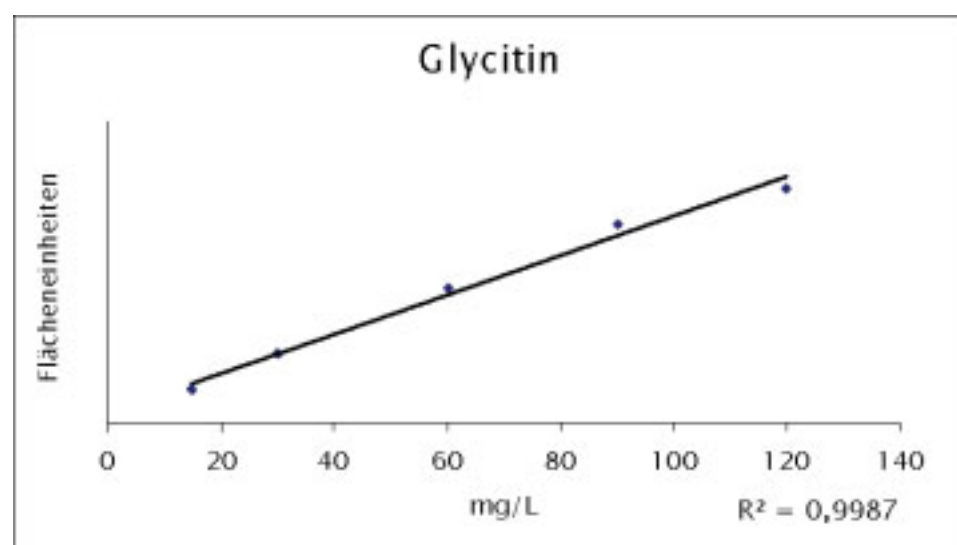
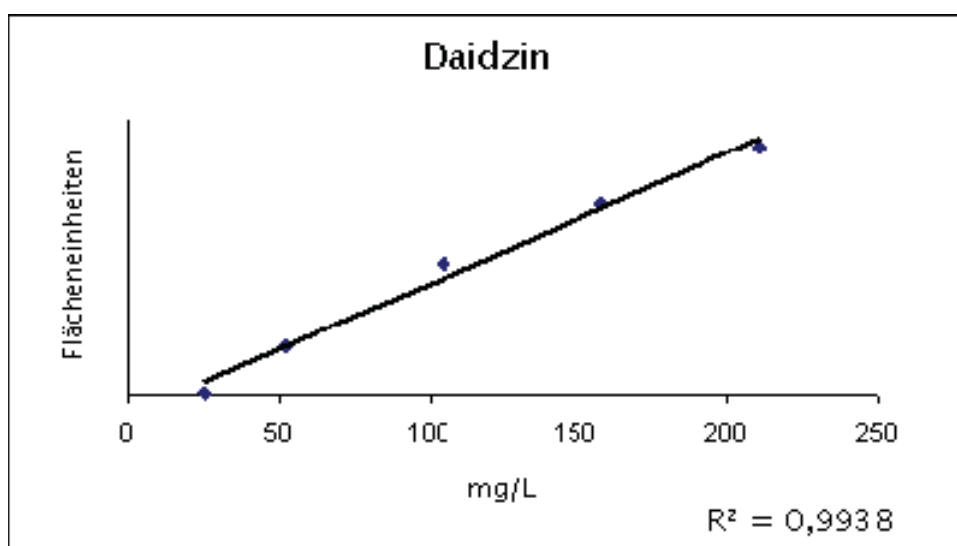
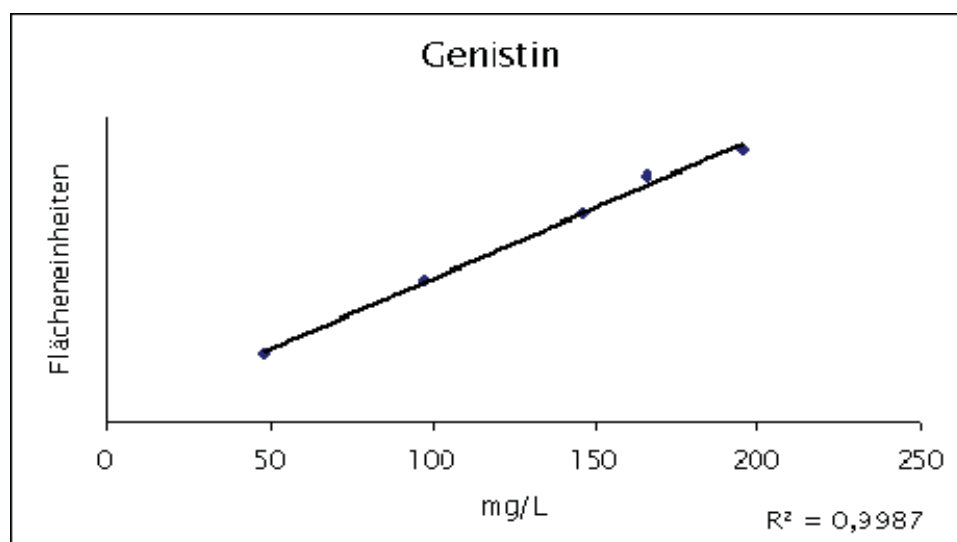


Abbildung 95: Einfluss der Extraktionsdauer eines Nahrungsergänzungsmittels auf Soja-Basis in Bezug auf den extrahierbaren Anteil an Majorisoflavonen (Temperatur = 25°C).

#### 3.4.1.4 Kalibrierreihen

Zur Berechnung der Gehalte an Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln wurden von den jeweiligen Isoflavonen externe Kalibrierfunktionen erstellt. Dazu wurden die unter Kapitel 3.2.2 isolierten Standards (GEN, DAI, GLY, AC-GEN, AC-DAI) jeweils exakt in einen Messkolben auf einer analytischen Waage eingewogen. Die Standards wurden mit 1 mL DMSO angelöst und mit dem Extraktionslösungsmittel Methanol/Wasser im Verhältnis 1:1 (V/V) aufgefüllt und für ca. 10 min im Ultraschallbad bis zur vollständigen Lösung behandelt. Aus diesen Stammlösungen wurden die jeweiligen Verdünnungen hergestellt, wobei immer mit dem Extraktionsmittel verdünnt wurde. Die Konzentrationsbereiche der einzelnen Isoflavone richteten sich dabei nach den zu erwartenden Mengen in NEMs. Für GEN lag der Konzentrationsbereich bei 48,7-194,8 mg/L, für DAI bei 26,25-210 mg/L, für GLY bei 6-120 mg/L, für ACE-GEN bei 2-47 mg/L und für ACE-DAI bei 32,36-129,5 mg/L. Die Kalibrierreihen zeigten dabei eine gute Linearität mit Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,9987-0,973$  (s. Abbildung 96). Die entsprechenden Verdünnungen wurden jeweils frisch hergestellt und die Stammlösungen tiefgekühlt unter Lichtausschluss aufbewahrt.





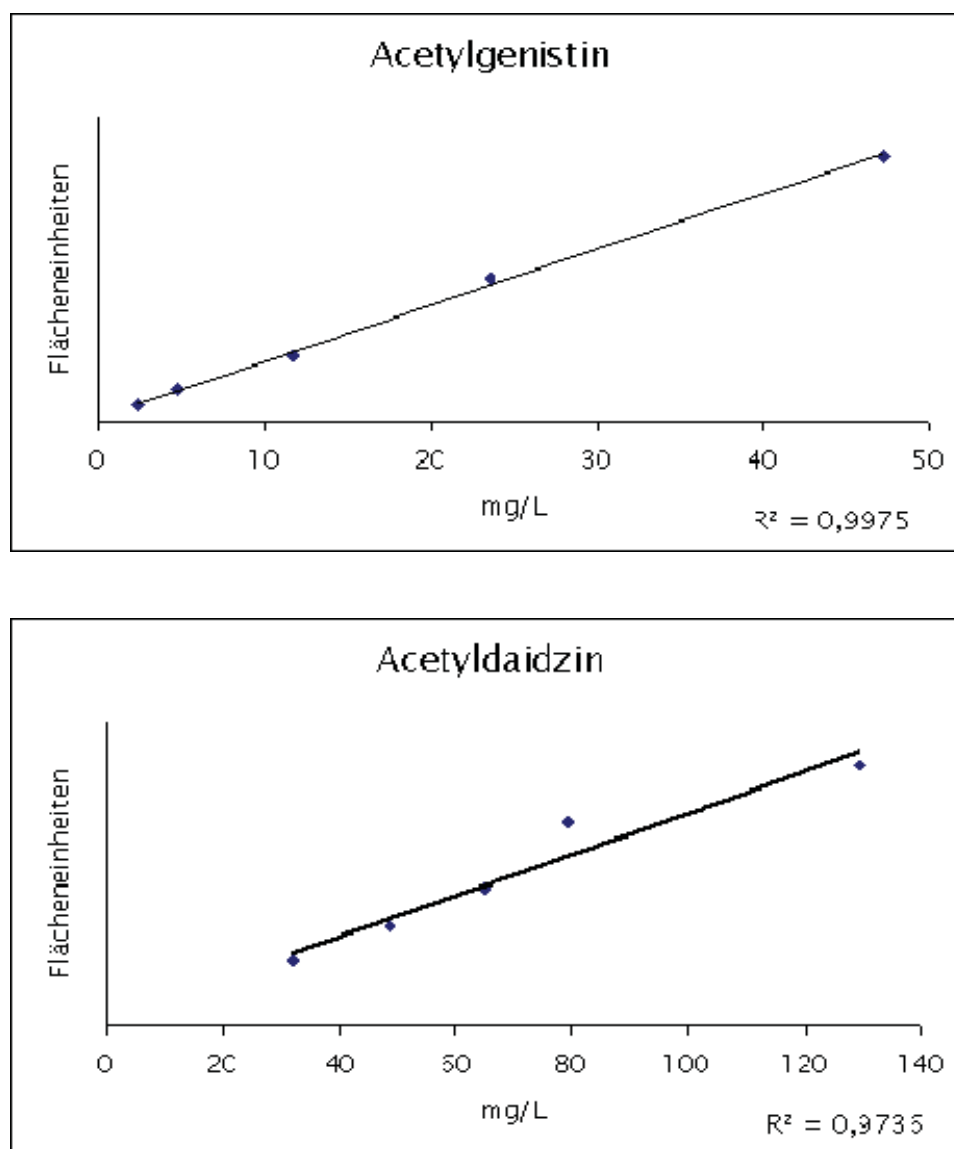


Abbildung 96: Lineare Kalibrierfunktionen der isolierten Isoflavone Genistin, Daidzin, Glycitin, 6''-O-Acetyl-genistin und 6''-O-Acetyl-daidzin aus Soja.

#### 3.4.1.5 Isoflavon-Gehalte der untersuchten Proben

In elf verschiedenen Nahrungsergänzungsmitteln mit Soja-Zusatz wurde der Gehalt von Isoflavonen mittels HPLC über externe Kalibrierfunktionen bestimmt. Die Identifizierung der unterschiedlichen Isoflavone erfolgte mittels des Vergleichs der relativen Retentionszeiten und darüber hinaus anhand von massenspektrometrischen Untersuchungen.

Die prozentuale Zusammensetzung der einzelnen Produkte in Bezug auf die verschiedenen Isoflavone variiert stark im Vergleich zu den hergestellten Soja-Extrakten. Deshalb wurden teilweise verschiedene Verdünnungen der einzelnen Probelösungen hergestellt, um im linearen Bereich der Kalibrierfunktionen zu liegen. In Tabelle 21 sind die einzelnen Gehalte

der verschiedenen Isoflavone in einer Kapsel/Tablette aufgeführt. Im Anhang unter Kapitel 7 befindet sich darüber hinaus eine Tabelle mit der Angabe der Gehalte der verschiedenen Isoflavonen in g/100 g Nahrungsergänzungsmittel. Den untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln wurden Nummern (I-XI) zugeordnet.

Tabelle 21: Individuelle Isoflavon-Gehalte der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Soja-Extrakt.

| Produkt-<br>Nummer | Gehalt<br>Daidzin<br>[mg/Kapsel] | Gehalt<br>Glycitin<br>[mg/Kapsel] | Gehalt<br>Genistin<br>[mg/Kapsel] | Gehalt 6''-O-<br>Acetyl-daidzin<br>[mg/Kapsel] | Gehalt 6''-O-<br>Acetyl-genistin<br>[mg/Kapsel] |
|--------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| I*                 | 26,79                            | 9,63                              | 35,13                             | 1,99                                           | 1,93                                            |
| II                 | 13,59                            | 6,41                              | 10,55                             | 2,00                                           | 1,13                                            |
| III                | 12,07                            | 7,19                              | 7,99                              | 0,18                                           | 0,33                                            |
| IV*                | 38,05                            | 13,31                             | 28,47                             | n.b.                                           | 1,10                                            |
| V*                 | 43,80                            | 18,80                             | 34,06                             | n.b.                                           | 0,52                                            |
| VI                 | 7,38                             | 2,00                              | 6,99                              | 0,75                                           | 3,94                                            |
| VII                | 19,98                            | 21,89                             | 3,72                              | 0,38                                           | 0,72                                            |
| VIII               | 14,38                            | 6,77                              | 9,50                              | 0,82                                           | 0,16                                            |
| IX                 | 53,27                            | 52,58                             | 5,49                              | 2,61                                           | 0,38                                            |
| X                  | 23,61                            | 12,99                             | 13,34                             | n.b.                                           | n.b.                                            |
| XI                 | 22,38                            | 8,54                              | 21,26                             | 0,56                                           | 0,15                                            |

n.b. = nicht berechenbar; Wert liegt unterhalb des kalibrierten Konzentrationsbereiches; \*Präparat in Tablettenform, andernfalls als Kapsel

Bei allen untersuchten Nahrungsergänzungsmittel-Proben mit Zusatz von Soja-Extrakt waren als Majorbestandteile die glucosidisch gebundenen Isoflavone (Daidzin, Genistin und Glycitin) zu identifizieren. Dabei dominierten Daidzin und Genistin. Die acetylierten Isoflavone machten mengenmäßig lediglich einen geringen Anteil am Gesamtgehalt aus. Bei keinem der zur Verfügung stehenden Nahrungsergänzungsmittel sind malonylierte Isoflavone enthalten. Dieses lässt sich wahrscheinlich auf die Verarbeitung des verwendeten Sojaextraktes zurückführen. Durch unterschiedliche Extraktionsverfahren sowie Extraktionsmittel kann eine Variation in der Isoflavon-Zusammensetzung erfolgen. So erfolgt bei thermischer Behandlung des Sojas eine Decarboxylierung der an der Glucose gebundenen Malonsäure, so dass lediglich acetylierte oder glucosidisch gebundene Isoflavone vorliegen. Gleichwohl hat das verwendete Pflanzenmaterial einen großen Einfluss auf das extrahierbare Spektrum der Isoflavone (s.u.). Die individuelle Zusammensetzung der unterschiedlichen Proben variierte in der hier vorgestellten Untersuchung stark. Diesbezüglich ist u.a. keine einheitliche Relation zwischen den Hauptisoflavonen Genistin und Daidzin zu ziehen. So ist z.B. in Produkt I die typische Zusammensetzung eines Soja-Extraktes zu erkennen, wie es durch die Analyse der verschiedenen Extrakte und den Daten aus der Literatur bei den meisten Proben zu erwarten gewesen wäre [Delmonte et al., 2006]. Genistin überwiegt mengenmäßig bei dieser Probe, Daidzin weist den zweithöchsten Gehalt auf. Bei Probe IV hingegen wird ein deutlich höherer Gehalt an Daidzin als an Genistin ermittelt. Ebenso enthalten einige Produkte einen sehr hohen Anteil an Glycitin, der bei Probe VII sogar höher als der von Genistin ist. Dies ist aufgrund der Analyse der unterschiedlichen Soja-Extrakte so nicht zu erwarten gewesen. Um die Verhältnisse der individuellen Zusammensetzung einiger Proben besser vergleichen zu können, werden die berechneten Gehalte einiger Nahrungsergänzungsmittel in folgender Grafik (Abbildung 97) dargestellt.

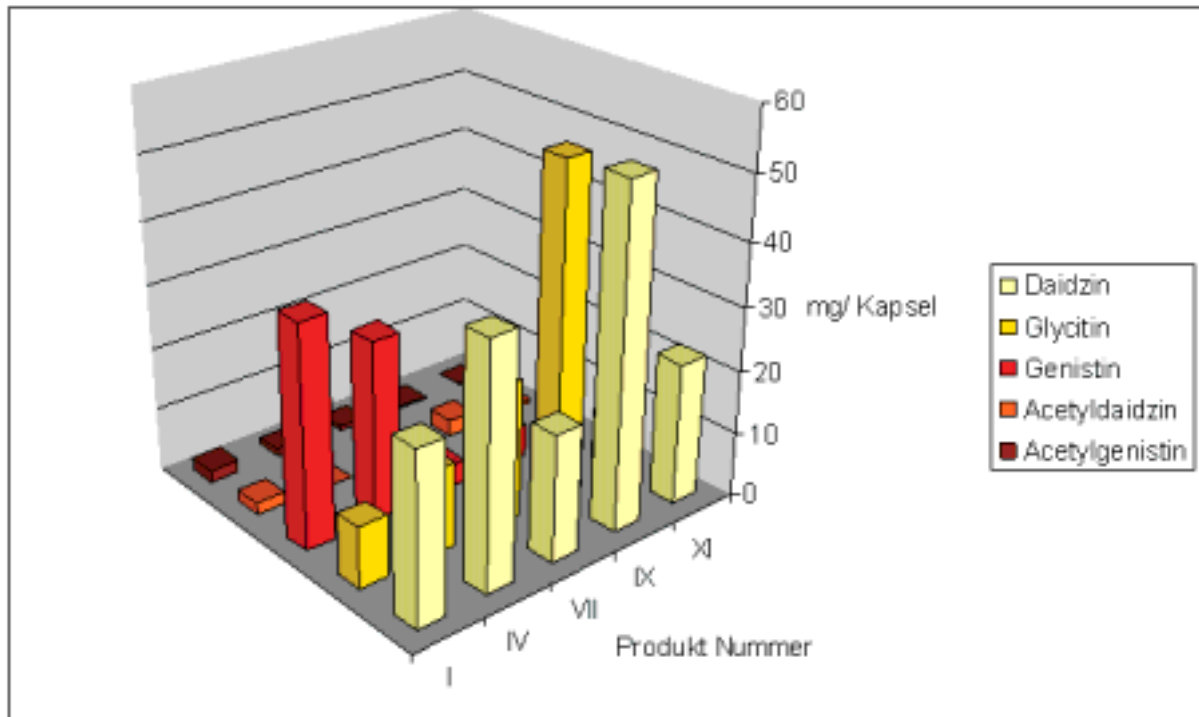


Abbildung 97: Varianz der individuellen Isoflavon-Zusammensetzung ausgesuchter Nahrungsergänzungsmittel.

Zumeist nur in Spuren detektierbar in den untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln ist das Isoflavon 6''-O-Acetyl-glycitin. Dies verhält sich ähnlich wie in den aus Soja hergestellten Extrakten. Ebenfalls sind in den untersuchten Produkten nur sehr geringe Mengen der Aglykone Daidzein und Glycitein enthalten. Dieses geht konform mit den hergestellten Extrakten aus Sojamehl.

Zur Überprüfung der von den Herstellern auf den Verpackungen angegebenen Gehalte an Isoflavonen wurden die ermittelten Gesamtgehalte sowie die der Hauptisoflavone mit denen der Hersteller verglichen (s. Tabelle 22). Dabei berechnete sich der Gehalt an Hauptisoflavonen aus der Summe der jeweiligen Gehalte an Daidzin, Genistin und Glycitin. Die acetylierten Isoflavon-Konjugate machen nur einen geringen Anteil am Gesamtgehalt aus und werden hierbei nicht berücksichtigt.

Tabelle 22: Isoflavon-Gehalte der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel im Vergleich mit den Angaben des Herstellers auf der Verpackung.

| Produkt Nummer | Gehalt Isoflavone insgesamt [mg/Kapsel] <sup>1</sup> | Gehalt Hauptisoflavone [mg/Kapsel] <sup>2</sup> | Herstellerangabe [mg/Kapsel] |
|----------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------|
| I*             | 75,48                                                | 71,55                                           | 50,00                        |
| II             | 33,68                                                | 30,55                                           | 20,00                        |
| III            | 27,76                                                | 27,25                                           | 20,00                        |
| IV*            | 80,93                                                | 79,83                                           | 50,00                        |
| V*             | 97,18                                                | 96,66                                           | 100,00                       |
| VI             | 21,06                                                | 16,37                                           | 25,00                        |
| VII            | 46,69                                                | 45,59                                           | 17,50                        |
| VIII           | 31,63                                                | 30,65                                           | 20,00                        |
| IX             | 114,33                                               | 111,34                                          | 50,00                        |
| X              | 49,94                                                | 49,94                                           | 50,00                        |
| XI             | 52,93                                                | 52,18                                           | 50,00                        |

\*Präparat in Tablettenform, anderfalls als Kapsel; <sup>1</sup>Summe der  $\beta$ -Glucoside und Acetyl-Glucoside;

<sup>2</sup>Summe der  $\beta$ -Glucoside

Wie aus der Tabelle hervorgeht, lässt sich kein einheitlicher Trend bezüglich der Genauigkeit der Herstellerangaben im Hinblick auf den Gehalt an Isoflavonen feststellen. Bei einigen Proben, wie z.B. Probe V oder X, stimmten die ermittelten Gehalte mit den deklarierten sehr gut überein. In Tabelle 22 ist ein Produkt (VI) enthalten, bei dem der totale Gehalt an Isoflavonen nur knapp unter der vom Hersteller ausgelobten Menge liegt, jedoch befindet sich dieser noch innerhalb eines möglichen Toleranzbereiches von  $\pm 20\%$ . Auffällig ist, dass in einigen der untersuchten Proben, wie z.B. Produkte Nummer IX, I und VII, eine signifikant größere Menge an Isoflavonen bestimmt wurde, als auf der Verpackung angegeben ist. Besonders hervorstechend ist hierbei Probe IX, bei welcher der ermittelte Gehalt an

Isoflavonen mehr als doppelt so hoch ist als der auf der Verpackung aufgeführte. Um die Varianz innerhalb der untersuchten Produkte besser zu verdeutlichen, sind die Ergebnisse aus Tabelle 22 in folgender Graphik (Abbildung 98) dargestellt. Hierbei sind ebenfalls die unterschiedlichen Darreichungsmengen seitens der Hersteller (17,5 mg–100 mg) graphisch aufgetragen.

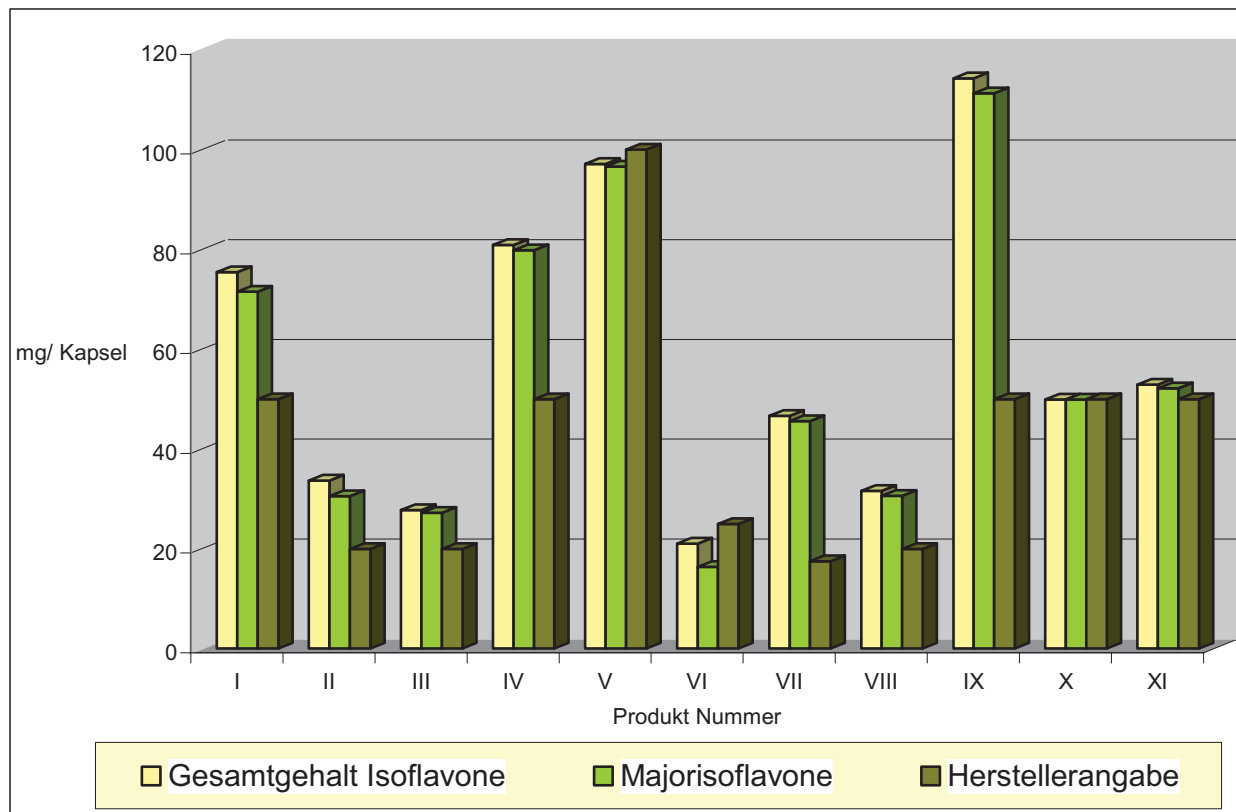


Abbildung 98: Darstellung des Gesamtgehaltes an Isoflavonen, des Gehaltes an Majorisoflavonen sowie der jeweiligen Herstellerangabe der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Soja-Extrakt.

Eine nahezu identische Menge an Gesamtisoflavonen und Majorisoflavonen ist bei den Proben Nummern IV, V, X, XI zu verzeichnen. Bei ihnen liegen die acetyl-glucosidisch gebundenen Isoflavone in nur sehr geringen Konzentrationen vor. Einige wenige Proben weisen einen hohen Gehalt an den acetylierten Isoflavonen auf, dies macht sich bei einem Vergleich mit den Angaben seitens des Herstellers bemerkbar. Wird beispielsweise bei der Probe VI nur der berechnete Gehalt für die Majorisoflavone in Betracht gezogen, dann stimmt die Deklaration mit diesem ermittelten Wert nicht überein. Hingegen liegt der Gesamtgehalt an Isoflavonen nur knapp unter der entsprechenden Deklaration.

Bei allen untersuchten Proben werden auf der Verpackung oder dem beigelegtem Informationsblatt (ähnlich einer Verpackungsbeilage bei Arzneimitteln) keine Angaben

bezüglich der individuellen Zusammensetzung an Isoflavonen gemacht. Von den Herstellern wird nur der jeweilige Gesamtgehalt angegeben.

Die vorliegenden Produkte enthalten ebenfalls keine Angaben darüber, ob sich der deklarierte Gehalt auf die Aglykone oder die konjugierten Formen der Isoflavone bezieht. Es wird lediglich eine Angabe wie z.B. „50 mg Soja-Isoflavone aus 125 mg Soja-Konzentrat“ aufgeführt. Für eine genauere Beurteilung der Deklaration muss deshalb bedacht werden, dass sich die Herstellerangaben womöglich auf die Aglykone beziehen. Die Aglykone sind als relativ preiswerte Standards käuflich zu erwerben. Einige der glucosidisch gebundenen Isoflavone sind mittlerweile zwar auch teilweise erhältlich, jedoch immer noch sehr teuer. Isoflavone in acetylierter Form sind in der Regel nicht auf dem Markt erhältlich. Bislang gibt es für die Quantifizierung von Isoflavonen u.a. eine Methode, bei der die Isoflavon-Aglykone bestimmt werden. Dabei müssen die vorliegenden Isoflavone zunächst hydrolysiert werden, um sie in die nicht-konjugierte Form zu überführen. Zur Bestimmung von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln hatte Nurmi et al. [2002] diese Methode entwickelt, bei der die Kapseln enzymatisch hydrolysiert und anschließend eine Extraktion der Aglykone mit Diethylether vorgenommen wurde. Aufgrund der Überlegung, die Hersteller könnten sich lediglich auf den Gehalt an Aglykonen beziehen, werden zur weiteren Beurteilung die ermittelten Gehalte in diese nicht-konjugierte Form umgerechnet, und als „berechneter gesamter Isoflavon-Gehalt als Aglykone“ angegeben. Dabei werden bei dieser Berechnung nicht die acetylierten Isoflavone berücksichtigt, da diese nur einen sehr geringen Anteil am Gesamtgehalt der Isoflavone ausmachen. In Tabelle 23 werden deshalb die berechneten Gehalte als Isoflavon-Aglykone aufgeführt. Die jeweiligen Mengen an Isoflavonen verringern sich dabei erwartungsgemäß gegenüber den gluco-konjugierten Formen.

Tabelle 23: Gehalte an Isoflavonen berechnet als „Aglykone“ in den untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln.

| Produkt Nummer | Berechneter Gehalt Daidzein [mg/Kapsel] | Berechneter Gehalt Glycitein [mg/Kapsel] | Berechneter Gehalt Genistein [mg/Kapsel] | Berechneter gesamter Isoflavon-Gehalt als Aglykone [mg/Kapsel] |
|----------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| I              | 17,58                                   | 4,08                                     | 23,06                                    | 44,72                                                          |
| II             | 9,41                                    | 4,08                                     | 7,23                                     | 20,72                                                          |
| III            | 7,47                                    | 4,58                                     | 5,18                                     | 17,23                                                          |
| IV             | 23,23                                   | 8,48                                     | 18,42                                    | 50,13                                                          |
| V              | 26,74                                   | 11,97                                    | 21,58                                    | 60,29                                                          |
| VI             | 4,92                                    | 1,27                                     | 6,61                                     | 12,80                                                          |
| VII            | 10,05                                   | 7,67                                     | 2,36                                     | 20,08                                                          |
| VIII           | 9,23                                    | 4,31                                     | 6,03                                     | 19,57                                                          |
| IX             | 33,97                                   | 32,10                                    | 3,65                                     | 69,72                                                          |
| X              | 14,42                                   | 8,27                                     | 8,34                                     | 31,03                                                          |
| XI             | 13,98                                   | 5,44                                     | 13,37                                    | 32,79                                                          |

Werden die berechneten Isoflavongehalte als Aglykone mit den ermittelten Werten für die glucokonjugierten Isoflavone verglichen, so ergibt sich im Vergleich zu Tabelle 22 ein anderes Bild. Optisch dargestellt ist dies in Abbildung 99, wobei diesen Daten ebenfalls die Herstellerangaben bezüglich des Isoflavon-Gehaltes in einer Kapsel oder Tablette gegenübergestellt werden.



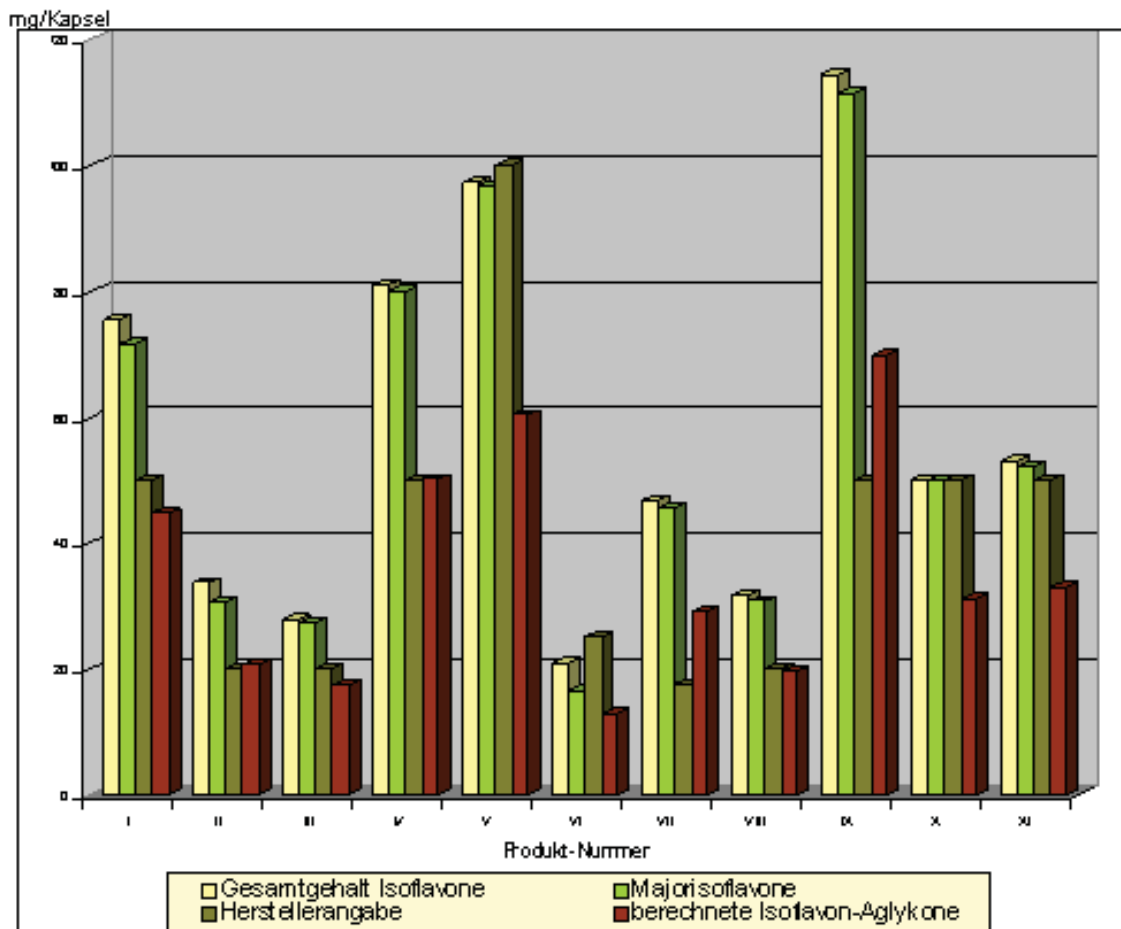


Abbildung 99: Gehalte von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln (angegeben als Glykoside bzw. als Aglykone pro Kapsel )und Vergleich mit den Angaben der Hersteller.

Die tabellarischen Werte, die dieser Grafik zu Grunde liegen, werden im Anhang (unter Kapitel 7) aufgeführt.

Anhand dieser Darstellung (Abbildung 99) wird für einige Produkte deutlich, dass bei Angabe als Aglykone die Werte näher an der deklarierten Menge liegen als die als Glykoside bestimmten Gehalte. Besonders deutlich wird dies bei der Betrachtung der Proben Nummern IV und VIII, bei denen der jeweilige berechnete Gehalt an Isoflavonen als Aglykone sehr gut mit den Angaben seitens der Hersteller übereinstimmt. So stimmt der berechnete Gehalt für die Probe Nummer IV mit 50,13 mg/Kapsel mit dem deklarierten Wert von 50,00 mg/Kapsel hervorragend überein. Ebenso verhält es sich bei Probe VIII, die laut Hersteller 20,00 mg Isoflavone pro Kapsel enthalten soll. Die geht mit dem berechneten Wert für die Aglykon-Form konform, keineswegs jedoch mit den bestimmten Gehalten für die glucokonjugierten Formen. Isoflavone in der glucosidisch gebundenen Form sind in dieser Probe zu ca. 31 mg enthalten. Dieser Wert ist um mehr als die Hälfte höher als der deklarierte. Wenn die Hersteller dieser beiden Produkte den Gehalt an Isoflavonen allerdings als Aglykone

bestimmt haben – was anhand der Angaben auf der Verpackung nicht ersichtlich ist – dann wären diese Angaben korrekt. Bei anderen Proben (u.a. Nummern I oder VII) liegen die berechneten Werte in dem Bereich der Herstellerangaben auf der Verpackung, oder könnten sich noch in einem weit gefassten Toleranzbereich befinden. Weitere Produkte weisen aber eine immer noch viel zu hohe Konzentration an Isoflavonen auf, selbst wenn diese als Aglykone berechnet werden (vgl. 4.2.15.1d). Im Falle des Nahrungsergänzungsmittels IX sollten laut Deklaration 50 mg Isoflavone pro Kapsel enthalten sein. In der genuinen Form, d.h. als Isoflavonglucoside, konnten ca. 111 mg nachgewiesen werden, welche sich umgerechnet in die nicht-konjugierte Form auf 70 mg Isoflavon-Aglykone reduzieren lassen. Zwei Proben zeigen einen Gesamtgehalt an Isoflavonen auf, der den Angaben auf der Verpackung in etwa entspricht und bei denen folglich der berechnete Wert für die entsprechenden Aglykone deutlich zu niedrig ist [Stürtz et al., 2008].

Diese Erkenntnisse bergen eine neue Problematik hinsichtlich der „Sicherheit von Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Soja-Extrakten“, die im folgenden Kapitel 3.4.1.6 näher diskutiert wird.

#### 3.4.1.6 Diskussion der quantitativen Bestimmung der Isoflavongehalte in Nahrungsergänzungsmitteln

Keines der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel enthielt substituierte Isoflavone des „Malonylglucosid-Typs“. Dies wird durch die LC-MS-Analysen verifiziert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die verwendeten Soja-Extrakte vermutlich einer Hitze- und/oder Säurebehandlung während der Verarbeitung unterzogen wurden [Mathias et al., 2006]. Wie in Kapitel 1.2.2 näher erläutert wurde, enthält Soja neben den Isoflavon-Aglykonen sehr wohl Isoflavone in ihren unterschiedlichen Konjugationsformen (d.h. glucosidisch sowie malonyl- und acetylglucosidisch gebundene Isoflavone). Isoflavone verfügen über eine vergleichsweise hohe Bioverfügbarkeit. Dabei haben die begleitende Lebensmittelmatrix sowie die vorliegende Konjugationsform einen Einfluss [De Pascual-Teresa et al., 2006; Rüfer et al., 2008]. Im Falle des Isoflavons Daidzein konnte gezeigt werden, dass die glucosidische Form (Daidzin) eine dreifach höhere Bioverfügbarkeit aufweist, als das Aglykon [Rüfer et al., 2008].

Die Variation innerhalb der Isoflavon-Zusammensetzung kann auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein. So können Anbaubedingungen, die Bodenbearbeitung und die Variation des Isoflavon-Gehaltes innerhalb der unterschiedlichen Soja-Sorten eine bedeutende Rolle spielen [Tsai et al., 2007]. Der Erntezeitpunkt hat wahrscheinlich gleichermaßen einen Einfluss auf das Verhältnis von Aglykonen zu den glykosidisch

gebundenen Isoflavonen. Riberio et al. [2007] konnten zeigen, dass bei frühen Reifegraden der Anteil an Aglykonen in den Sojabohnen deutlich überwiegt. Darüber hinaus trägt der Verarbeitungsprozess der Sojabohnen zu Veränderungen der Isoflavon-Zusammensetzung bei [Mathias et al., 2006]. Zu nennen sind insbesondere verschiedenartige Fermentationsprozesse und Extraktions-Technologien [Wang et al., 1994b; Coward et al., 1993]. Eine Untersuchung von Chua et al. [2004] über Soja-Präparate, die im Staat Washington (USA) vertrieben wurden, stellt ebenso Angaben bezüglich der Isoflavon-Gehalte in dort frei zu erwerbenden Nahrungsergänzungsmitteln in Frage. Demnach stimmen teilweise die Angaben des Gesamt-Gehaltes an Isoflavonen innerhalb eines Produktes von verschiedenen Produktionschargen, jedoch ändere sich deren individuelle Zusammensetzung stark. Dieses kann zu einem unterschiedlichen pharmakologischen Wirkungsprofil führen (s. Kapitel 1.1.4 und 1.1.5).

Im Hinblick auf eine Beurteilung der Nahrungsergänzungsmittel bezüglich des Täuschungsschutzes erscheint es deshalb sinnvoll, die Gehalte als Aglykone sowie als Glykoside bestimmen und berechnen zu können. Damit ist es möglich, eine detaillierte Aussage treffen zu können. Günstig wäre eine zukünftige Kennzeichnung seitens des Herstellers, auf welche konjugierte Form sich die Angaben über den Gehalt der Isoflavone beziehen. Daraufhin wüsste der Käufer, worauf sich die Mengenangaben beziehen und kann die unterschiedlichen Präparate leichter miteinander vergleichen.

Bislang gibt es innerhalb der Europäischen Union keine übereinstimmende Rechtslage bezüglich Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Soja-Extrakten [Cheftel, 2005]. Dies führte zu einer Koexistenz von Produkten, welche das gleiche Pflanzenmaterial beinhalten, jedoch als Pharmazeutika oder Nahrungsergänzungsmittel vertrieben werden [Gulati und Berry Ottaway, 2006].

Bei einem der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel konnten mittels LC-ESI-MS<sup>n</sup> die Isoflavone Daidzin und Genistin nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Der Hauptanteil an Isoflavonen in diesem Produkt liegt in Form der Aglykone Daidzein und Genistein vor, nur Spuren von Daidzin sind enthalten (s. Abbildung 100). Dies deutet auf eine Hitze- oder Säurebehandlung des Produktes oder des verwendeten Soja-Extraktes hin (s.o.).

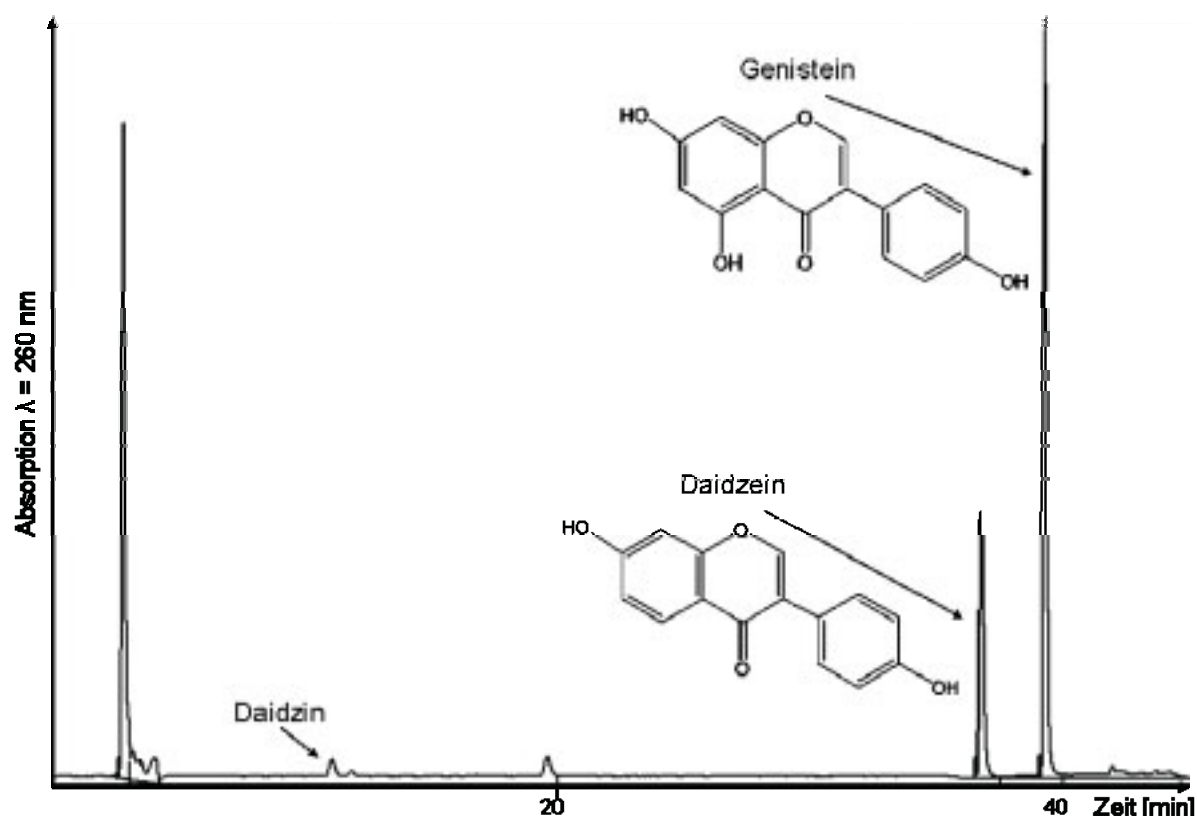


Abbildung 100: HPLC-Chromatogramm eines Nahrungsergänzungsmittels mit Zusatz von Soja-Extrakt, bei welchem der Anteil an Isoflavon-Aglykonen deutlich überwiegt. Die Aufarbeitung erfolgt wie unter Kapitel 3.4.1.1 beschrieben; die Detektion erfolgt bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$

### 3.4.1.7 Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Soja und Leinsamen

Einem Nahrungsergänzungsmittel wird laut Verzeichnis der Zutaten neben dem Soja-Extrakt auch Leinsamenpulver beigemischt. Die Probe Nummer IX wird mit der Aussage „enthält wertvolle Lignane; weibliche Hormone aus der Natur“ beworben. In diesem Produkt sollen laut Herstellerangaben neben wertvollem Leinöl auch 150 mg Leinsamen-Pulver enthalten sein. In diesem Fall wäre eine weiterführende Analyse, d.h. Bestimmung des Lignan-Gehaltes sinnvoll, da Lignane estrogene Wirksamkeit besitzen und ebenfalls zu den Phytoestrogenen zählen (s. Kapitel 1.1.2).

Die in zwei Unterarten und vielen Varietäten vorkommende Leinpflanze (Flachs; lateinisch. *Linum usitatissimum* L.) wird weltweit kultiviert und gehört zu den *Linaceae*. Die einzelnen Samen des Leins sind klein, flach, länglich und eiförmig. In ihrer Farbe variieren sie von braun bis goldgelb. Die Samen befinden sich in hellbraunen Kapseln, den „Früchten“ des Leins. In jeder Kapsel befinden sich jeweils nur ca. 10 dieser Samen. Sie enthalten 30-45% fettes Öl (Leinöl), 20% Eiweiß, 5,5-14% Wasser und bis zu 8% Pflanzenschleim sowie eine

Reihe weiterer Bestandteile. Um das Majorlignan Secoisolariciresinol-diglucosid (SDG) in den entsprechenden Nahrungsergänzungsmitteln nachweisen oder quantifizieren zu können, ist eine spezielle Aufreinigung erforderlich. Das Lignan SDG liegt im Leinsamen nicht in freier Form, sondern als komplexes Polymer vor. Dabei ist es mit Hydroxymethylglutarat verestert [Ford et al., 2001]. Erst nach einem Hydrolyseschritt kann das SDG aus dieser polymeren Form freigesetzt werden. Geeignet ist hierfür eine Hydrolyse des Probenmaterials im wässrigen, alkalischen Milieu (1 N Natronlauge). Zur Probenvorbereitung wurde der Inhalt von mehreren Kapseln des Nahrungsergänzungsmittels vereinigt und mit Methanol/Wasser im Verhältnis 70/30 (V/V) extrahiert. Nach Filtration wurde das Methanol aus dem Filtrat unter reduziertem Druck abdestilliert und die wässrige Phase mit 1 N Natronlauge hydrolysiert. Darauf erfolgte eine Neutralisation mit HCl (2N). Die erhaltene Lösung wurde an einer XAD-2-Säule aufgearbeitet und im Folgenden mittels HPLC-(ESI)-MS analysiert (HPLC-System V). Die Referenzverbindung Secoisolariciresinol-Diglucosid [Degenhardt et al., 2002] liefert folgende massenspektrometrische Daten: ESI-MS (neg. Modus): Pseudomolekülion bei  $m/z = 685 = [M - H]^-$ ; MS/MS von  $m/z = 685$  bei  $m/z = 523 = [M - H - \text{Anhydroglucose}]^-$  und  $m/z = 361 = [M - H - \text{Anhydroglucose} - \text{Anhydroglucose}]^-$ ;  $C_{23}H_{46}O_{16}$ . Bei der Analyse der aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittelprobe wurde kein SDG nachgewiesen, jedoch das Aglykon Secoisolariciresinol in Spuren. Dies wird anhand des Totalionenstroms in Abbildung 101 und des Massenspektrums bei der Retentionszeit von 22,0 min deutlich.

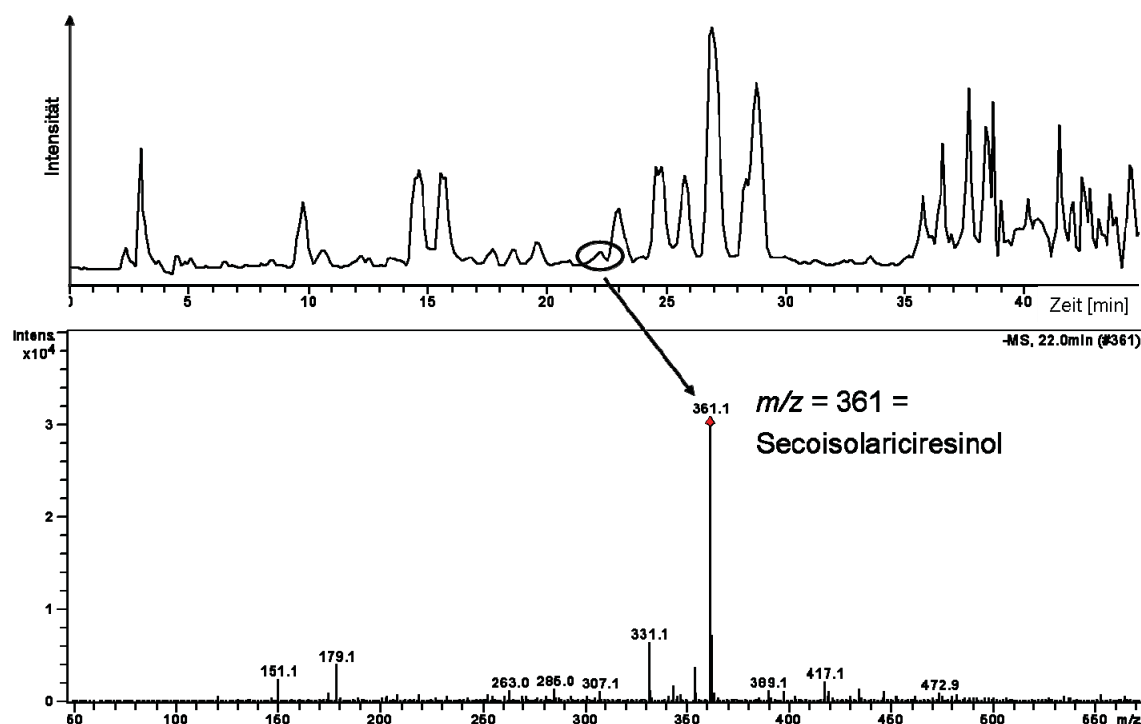


Abbildung 101: Massenspektrometrische Analyse eines Nahrungsergänzungsmittels auf Soja-Basis mit Zusatz von Leinsamen-Extrakt.

### 3.4.2 Quantifizierung von Isoflavonen aus Nahrungsergänzungsmitteln mit Rotklee-Zusatz

Eine Reihe von Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Rotklee-Extrakten ist seit einigen Jahren ebenfalls verstärkt auf dem Markt frei verkäuflich zu erwerben. Bei diesen Produkten liegt die empfohlene tägliche Aufnahmemenge von Isoflavonen zwischen 40 und 50 mg. Im Rotklee liegen die Isoflavone hauptsächlich als Aglykone vor. Bislang gibt es noch keine etablierte analytische Methode, mit welcher der Gehalt an Isoflavonen in diesen Nahrungsergänzungsmitteln bestimmt werden kann. In vorliegender Arbeit wurde daher eine HPLC-Methode mit DAD-Detektion entwickelt. Als Vergleichsstandards sowie für die externe Kalibrierung wurden die aus Rotklee isolierten Isoflavone Formononetin, Biochanin A und Irilon verwendet (s. Kapitel 3.2.3).

#### 3.4.2.1 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung für Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Rotklee-Extrakt erfolgt analog der bereits beschriebenen Methode für Präparate mit Soja-Zusatz (vgl. Kapitel 3.4.1.1). Allerdings war im Falle der Rotklee-Präparate das verwendete Extraktionsmittel Ethanol/Wasser im Verhältnis 1/1 (V/V). Außerdem betrug die Extraktionsdauer bei diesen Präparaten 30 min. Die Tabletten und Kapseln der Nahrungsergänzungsmittel mit Rotklee-

Zusatz enthalten eine mit den Soja-Präparaten vergleichbare Matrix, so sind in den Kapseln ebenfalls verschiedenartige pflanzliche Öle enthalten. In folgender Abbildung wird die Probenaufarbeitung der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel verdeutlicht (Abbildung 102).

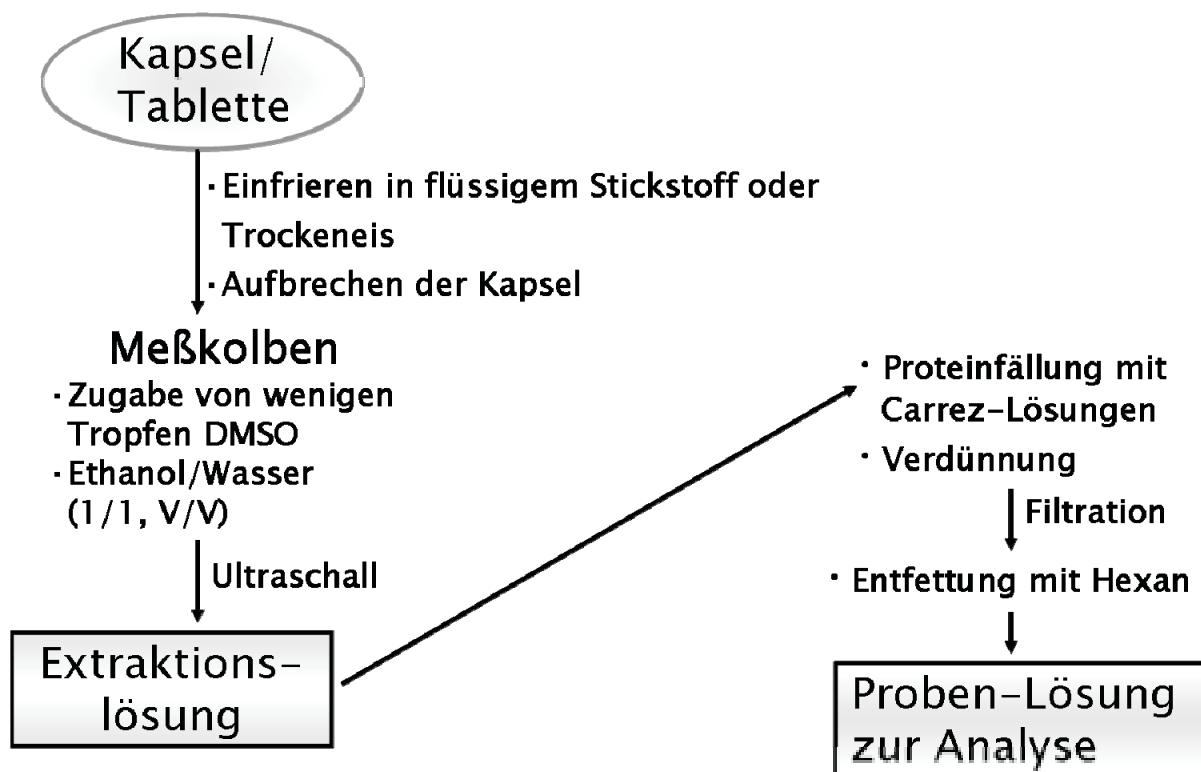


Abbildung 102: Fließschema zur Aufarbeitung von Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Rotklee-Extrakt.

#### 3.4.2.2 HPLC- und massenspektrometrische Analysen

Die nach 3.4.2.1 aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Rotklee-Extrakt wurden mit dem entwickelten HPLC-System II analysiert (s. Kapitel 4.2.4). Die im Rotklee enthaltenen unterschiedlichen Isoflavone wurden damit gut voneinander getrennt (vgl. Abbildung 103).

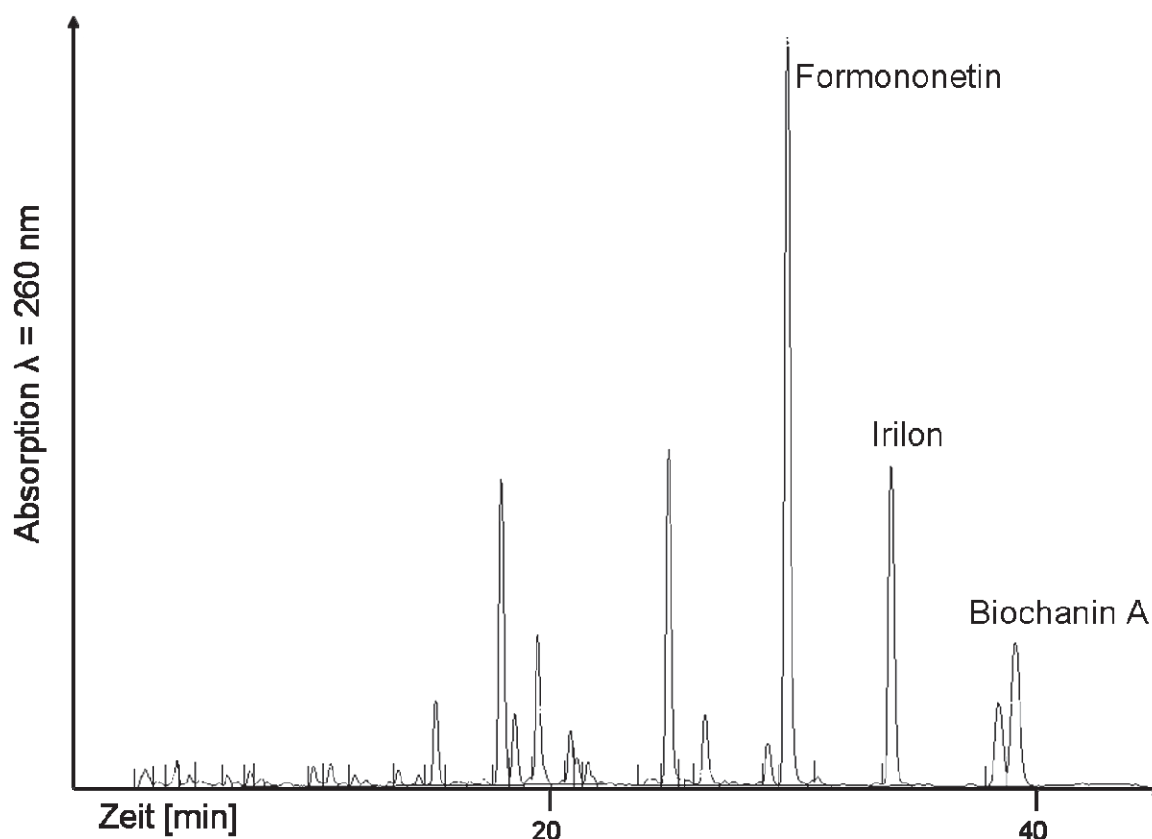


Abbildung 103: HPLC-Chromatogramm eines Nahrungsergänzungsmittels mit Zusatz von Rotklee-Extrakt.

Die Majorisoflavone des Rotklees, d.h. Formononetin, Biochanin A und Irilon wurden gut voneinander abgetrennt. In dem vorliegenden Beispiel ist der Gehalt an Irilon, im Vergleich zu den anderen Proben, relativ hoch. Die Identität der einzelnen Isoflavone wurde aufgrund der entsprechenden Retentionszeiten der isolierten Referenzverbindungen sowie anhand von massenspektrometrischen Analysen bestätigt. Für die LC-(ESI)-MS-Analyse wurde ein 70 minütiger Gradient (s. 4.2.4; HPLC-System VI) verwendet, um die Peaks im ersten Teil des Chromatogramms besser voneinander zu trennen.

#### 3.4.2.3 Ermittlung der geeigneten Extraktionsbedingungen

Den Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Rotklee-Extrakt werden eine Reihe weiterer Substanzen beigelegt, wie u.a. Sojaöl, Gelatine, Kokosöl, Glycerin, Vitamin D (D- $\alpha$ -Tocopherol), Lecithin, Cellulose, Triglyceride, Eisenoxid, Laktose, Talkum, Titandioxid, Vitamin K, Siliziumdioxid, Reisstärke, Sorbit und Hydroxymethylcellulose. Um ein geeignetes Extraktionsmittel zu ermitteln, wurden deshalb verschiedene methanolisch/wässrige und ethanolisch/wässrige Lösungen getestet. In Abbildung 104 werden die Ergebnisse der durchgeführten Analysen (analog Kapitel 3.4.1.3) mit den verschiedenen alkoholischen



Lösungen graphisch aufgeführt. Im Experimentellen Teil dieser Arbeit wird die entsprechende Durchführung näher erläutert (s. Kapitel 4.2.15.2).

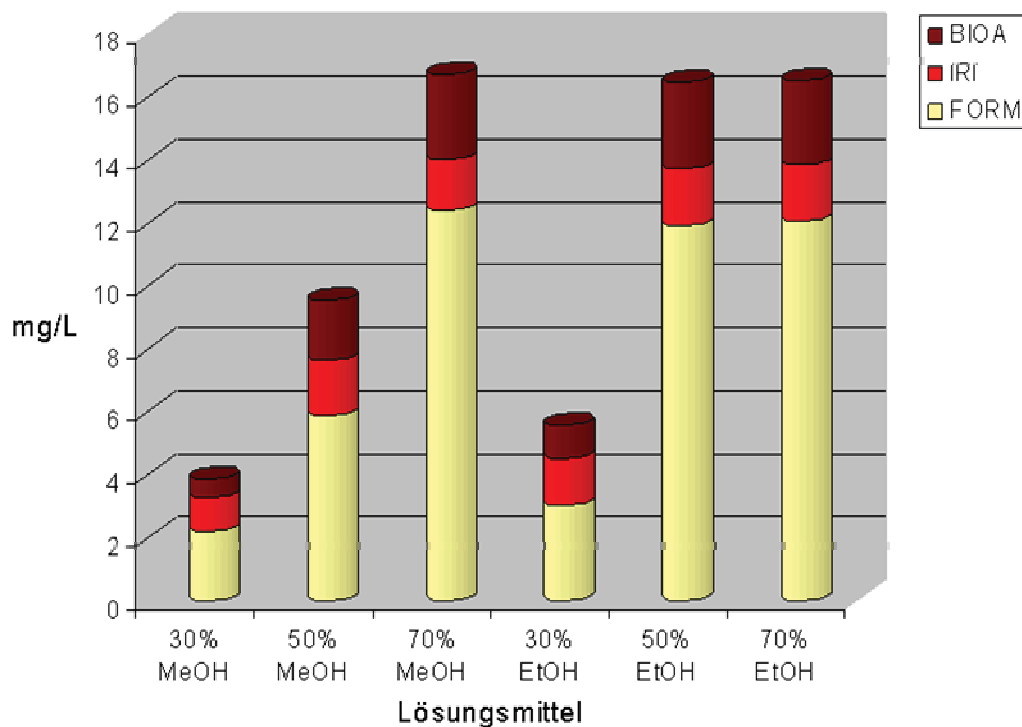


Abbildung 104: Variation des Extraktionsmittels für die Bestimmung der Isoflavone Formononetin, Irilon und Biochanin A aus Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Rotklee-Extrakt.

Aus der Grafik wird deutlich ersichtlich, dass die Extraktion von Isoflavonen aus Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Rotklee-Extrakt mit wässrig-alkoholischen Lösungen möglich ist. Dabei werden die drei Majorisoflavone aus dem Rotklee, d.h. Formononetin (FORM), Irilon (IRI) und Biochanin A (BIOA), quantifiziert. Der höchste Gehalt wurde dabei unter Verwendung des Lösungsmittels Ethanol/Wasser im Verhältnis 1/1; V/V (50%iges Ethanol) erhalten, weshalb diese Mischung für die Probenaufarbeitung bei der Quantifizierung verwendet wurde. Ebenso werden sehr hohe Gehalte der drei Isoflavone unter Verwendung von 70%igem Methanol sowie 70%igem Ethanol erhalten, die nahezu identisch sind mit denen aus der Extraktion mit 50%igem Ethanol.

Ebenso wurde die optimale Extraktionsdauer ermittelt, wobei hierbei analog zu den Nahrungsergänzungsmitteln aus Soja (s. Kapitel 3.4.1.3) vorgegangen wurde. Im Anhang unter Kapitel 7 sind die Werte zur Ermittlung der optimalen Extraktionsdauer unter \* = in Tablettenform

Tabelle 35 aufgeführt. Die Extraktionszeit von 30 min hatte sich dabei als geeignet herausgestellt.

#### 3.4.2.4 Kalibrierreihen

Für die Quantifizierung wurden externe Kalibrierfunktionen der drei Majorisoflavone des Rotklees erstellt. Dazu wurden die isolierten Standardmaterialien (s. Kapitel 3.2.3) verwendet. Nach genauer Einwaage in Messkolben wurden die Standards mit 1 mL DMSO angelöst, bevor sie mit Ethanol/Wasser (1/1, V/V) aufgefüllt wurden. Ein vollständiges Lösen erfolgte durch Behandlung im Ultraschallbad. Diese Lösungen sind die Stammlösungen, aus denen folgend weitere Verdünnungen hergestellt wurden, wobei immer Ethanol/Wasser (1/1, V/V) verwendet wurde. Die resultierenden Konzentrationsbereiche lagen für Formononetin bei 54-216 mg/L, für Biochanin A zwischen 25-128 mg/L und für Irilon bei 13-254 mg/L. Dabei zeigten alle Kalibrierreihen eine gute Linearität mit Determinationskoeffizienten (vgl. 4.2.15) von 0,9978-0,9831. Die Kalibrierfunktionen sind in Abbildung 105 aufgeführt, wobei die jeweiligen Korrelationskoeffizienten R angegeben werden. Die entsprechenden Verdünnungen aus den Stammlösungen wurden jeweils frisch hergestellt, wobei die Stammlösungen tiefgekühlt unter Lichtausschluss aufbewahrt wurden.

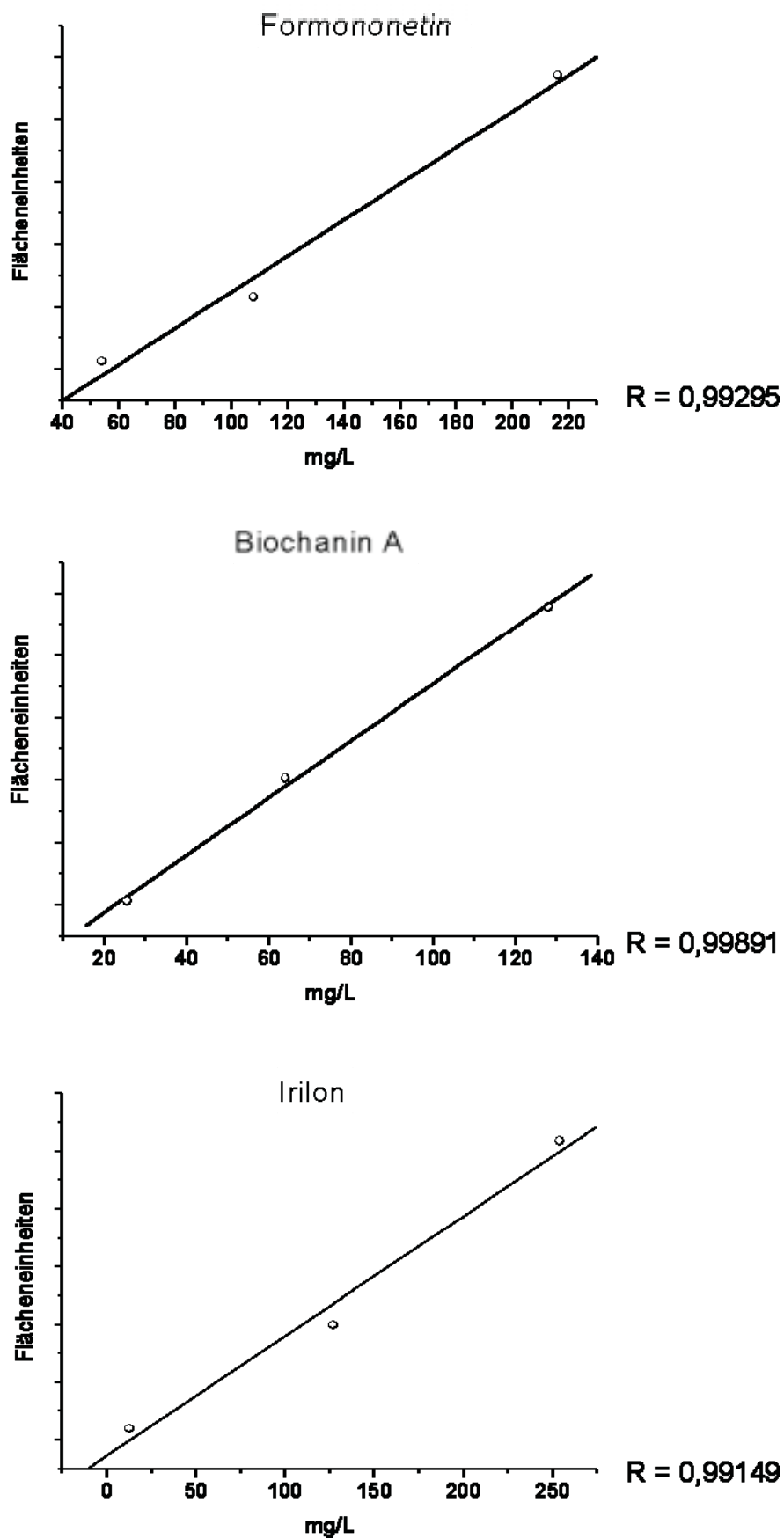


Abbildung 105: Lineare Kalibrierfunktionen der isolierten Isoflavone Formononetin, Biochanin A und Irilon aus Rotklee.

### 3.4.2.5 Isoflavon-Gehalte in Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Rotklee-Extrakt

In vorliegender Arbeit wurden sieben verschiedene Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Rotklee-Extrakt untersucht und mittels HPLC-DAD der Gehalt an Isoflavonen bestimmt. Die Identifizierung der in den Nahrungsergänzungsmitteln enthaltenen Isoflavone erfolgte anhand der Retentionszeiten im Vergleich mit den Referenzmaterialien sowie mittels LC-(ESI)-MS-Analysen. In Tabelle 24 sind die Gehalte der Majorisoflavone in den untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln in mg/Kapsel oder Tablette aufgeführt. Die Hersteller beziehen sich mit ihren Angaben jeweils auf den Gesamtgehalt an Isoflavonen pro Kapsel/Tablette oder Verzehrseinheit.

Tabelle 24: Individuelle Isoflavon-Gehalt der einzelnen untersuchten Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Rotklee-Extrakt.

| Produkt-<br>Nummer | Gehalt Formononetin<br>[mg/Kapsel] | Gehalt Biochanin A<br>[mg/Kapsel] | Gehalt Irilon<br>[mg/Kapsel] |
|--------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| I                  | 19,78                              | 26,42                             | 2,92                         |
| II*                | 23,35                              | 6,47                              | 4,99                         |
| III                | 24,21                              | 4,68                              | 5,03                         |
| IV*                | 27,65                              | 4,78                              | 3,52                         |
| V                  | 17,34                              | 4,88                              | 4,57                         |
| VI*                | 19,07                              | 5,08                              | 6,37                         |
| VII*               | 26,09                              | 15,36                             | 7,74                         |

Die Gehalte in der obigen Tabelle sind der Einfachheit halber jeweils in mg/Kapsel angegeben, wobei es sich bei den markierten Proben (\*) allerdings um Tabletten handelt.

Bei den meisten der aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittel dominieren die beiden Isoflavone Formononetin und Biochanin A. Irilon kommt bei einer Reihe der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel nur in geringen Mengen vor, wie z.B. in Probe IV. Die individuelle Zusammensetzung der Isoflavone in den untersuchten NEMs entspricht größtenteils der

eines Rotklee-Extraktes, bei welchem ebenfalls entsprechende natürliche Schwankungen zu verzeichnen sind (vgl. Kapitel 3.5).

Die Angaben der Hersteller bezüglich der Gehalte an Isoflavonen in einer Kapsel oder Tablette des entsprechenden Nahrungsergänzungsmittels können mit der aufgestellten Methode überprüft werden. Deshalb werden die berechneten Gesamtgehalte der Majorisoflavone (FORM, BIO und IRI) den Herstellerangaben sowie der individuellen Zusammensetzung der Proben graphisch gegenüber gestellt (s. Abbildung 106). Im Anhang ist die dazugehörige Tabelle über die „ermittelten Gehalte an Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Rotklee-Extrakt im Vergleich mit den Angaben des Herstellers“ aufgeführt.

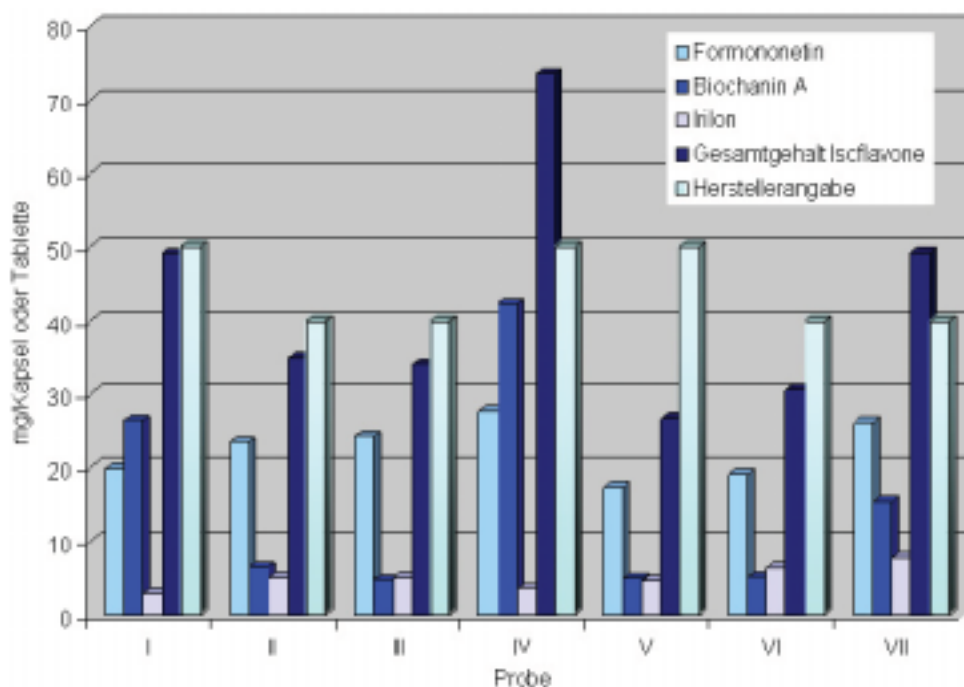


Abbildung 106: Isoflavon-Gehalte der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel mit Rotklee-Extrakt im Vergleich mit den Angaben der Hersteller.

Nur bei wenigen der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel lag der ermittelte Wert der Majorisoflavone in dem Bereich der Herstellerangaben, wie z.B. bei Probe I. Die ermittelten Gehalte an Gesamt-Isoflavonen von einigen anderen Proben (z.B. Nr. II und III) lagen knapp unterhalb den Angaben der Hersteller auf den Verpackungen, jedoch liegen sie aufgrund der Fehlertoleranz noch innerhalb eines akzeptablen Bereiches. Deutlich unterhalb der vom Hersteller ausgelobten Menge an Isoflavonen in einer Kapsel liegt jedoch Probe Nummer V, welche nur wenig mehr als die Hälfte des angegebenen Isoflavon-Gehaltes aufweist. Innerhalb der untersuchten Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Rotklee-Extrakt gab es hingegen ein Produkt, welches einen deutlich höheren Gehalt an Isoflavonen aufweist als

deklariert (Probe IV). Dieses Präparat enthielt zusätzlich zu dem Rotklee-Extrakt ebenfalls Soja-Extrakt, welches ebenfalls 50 mg Isoflavone enthalten soll. Der ermittelte Wert für den Gesamtgehalt an Isoflavonen lag ebenfalls bei Probe VII über dem vom Herstellern auf der Verpackung aufgeführten, mit ca. 20% Abweichung. Aus der Grafik ist ersichtlich, dass es keinen einheitlichen Trend bezüglich der ermittelten Gehalte an Isoflavonen innerhalb der untersuchten Produkte gibt.

#### 3.4.2.6 Diskussion der Ergebnisse

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierung von Isoflavonen aus Nahrungsergänzungsmitteln mit Rotklee-Extrakt wurden die im Rotklee vorhandenen Majorisoflavone FORM, BIOA und IRI bestimmt. Diese erwiesen sich ebenfalls als Majorkomponenten in den untersuchten Proben. Da bei der Bestimmung alle Minorkomponenten vernachlässigt wurden, kann dies zu etwas geringen Gehalten bei der Bestimmung von Isoflavonen führen. Dies dürfte bei solchen Proben von Relevanz sein, bei denen der bestimmte Gehalt nah an dem vom Hersteller deklarierten Wert liegt, wie z.B. den Proben II und III. Unter Berücksichtigung der Minorkomponenten könnten diese näher an den Herstellerangaben liegen. Es werden von den Herstellern keine Angaben darüber gemacht, wie die individuelle Zusammensetzung an Isoflavonen innerhalb einer Kapsel oder in dem verwendeten Rotklee-Extrakt ist. Dieses wäre jedoch nutzdienlich im Hinblick auf eine ernährungsphysiologische Beurteilung dieser Präparate. Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Rotklee unterscheiden sich deutlich in ihrer qualitativen sowie quantitativen Zusammensetzung von denen mit Zusatz von Soja-Extrakt. Isoflavone liegen in Nahrungsergänzungsmitteln mit Rotklee-Extrakt in der Aglykon-Form vor [Setchell, 2001], obwohl sie überwiegend glykosidisch gebunden in der Pflanze vorkommen [Toebe et al., 2005]. Bislang fehlen fundierte wissenschaftliche Untersuchungen über den Metabolismus oder die Bioverfügbarkeit von Isoflavonen aus dem Rotklee. Diese weisen häufig im Vergleich mit den Isoflavonen aus Soja zusätzliche Methoxygruppen auf, woraus sich ein anderes Wirkpotential ergeben kann. Zum überwiegenden Teil werden die Isoflavone Formononetin und Biochanin A zu Daidzein und Genistein demethyliert, jedoch treten ebenfalls eine Vielzahl von hydroxylierten Derivaten und Reaktionsprodukten der Primärmetabolite sowie der Ausgangsverbindungen auf [Heinonen et al., 2004]. Der Metabolismus von anderen im Rotklee vorkommenden Isoflavonen, wie z.B. Irilon, Prunetin oder Pseudobaptigenin, wurde bislang noch nicht ausreichend untersucht, so dass die Datenlage lückenhaft ist. In Hinblick auf eine Verzehrsempfehlung ist es erforderlich, dass das toxische Potential dieser Verbindungen, der Minorkomponenten und sämtlicher Metaboliten besser eingeschätzt werden kann, als dies bis dato der Fall ist.

### 3.5 Analytik von Rotklee und weiterer Kleesorten

Eine Reihe von Untersuchungen hat ergeben, dass sich die Isoflavon-Zusammensetzung innerhalb der Rotklee-Pflanze während ihrer Wachstumsphase stark verändert [Tsao et al., 2006]. Ebenfalls wurde über einen Zusammenhang zwischen den Gehalten an Majorisoflavonen und estrogenen Aktivitäten diskutiert [Booth et al., 2006a]. Dabei werden die saisonalen Schwankungen der Isoflavon-Gehalte herausgestellt, die innerhalb der verschiedenen Pflanzenteile (Blätter, Stängel, Wurzel, Blüte) variieren [Lin et al., 2000; Vetter, 1995; Tsao et al., 2006]. Deshalb wurde im Botanischen Garten Braunschweig ein Feld mit Rotklee angepflanzt. Auf diese Weise konnte die gesamte Wachstumsphase des Rotklees vom Saatkorn bis zur ausgewachsenen Pflanze analytisch begleitet werden. Die Abbildung 107 gibt einen kleinen Einblick in die Wachstumsphasen von Mai bis Ende September, wobei die Wuchshöhe ca. 1 Meter betrug und die Wurzeln des Rotklees zu diesem Zeitpunkt bereits tief in der Erde verankert waren.



Abbildung 107: Rotklee in verschiedenen Wachstumsphasen.

Während der gesamten Wachstumsphase des Rotklees wurden ganze Rotklee-Pflanzen geerntet und Blüten, Stängel, Blätter und Wurzeln voneinander getrennt und jeweils einzeln qualitativ analysiert. Die zerkleinerten Pflanzenteile wurden dazu mit 50%igem Methanol extrahiert (20 minütiges Rühren) und vor der Analyse filtriert. Ebenfalls wurden Extraktionen mit ethanolischen Lösungen, Aceton sowie Tris-Puffer (Tris: Aminohydroxymethylpropandiol) durchgeführt, was die Effizienz der Extraktion jedoch nicht merklich steigerte. Die Analyse der verschiedenen Extraktionslösungen erfolgte mittels HPLC-DAD sowie LC-(ESI)-MS. Deutlich zu erkennen war dabei die Variation innerhalb der verschiedenen Pflanzenteile (s. Abbildung 108).

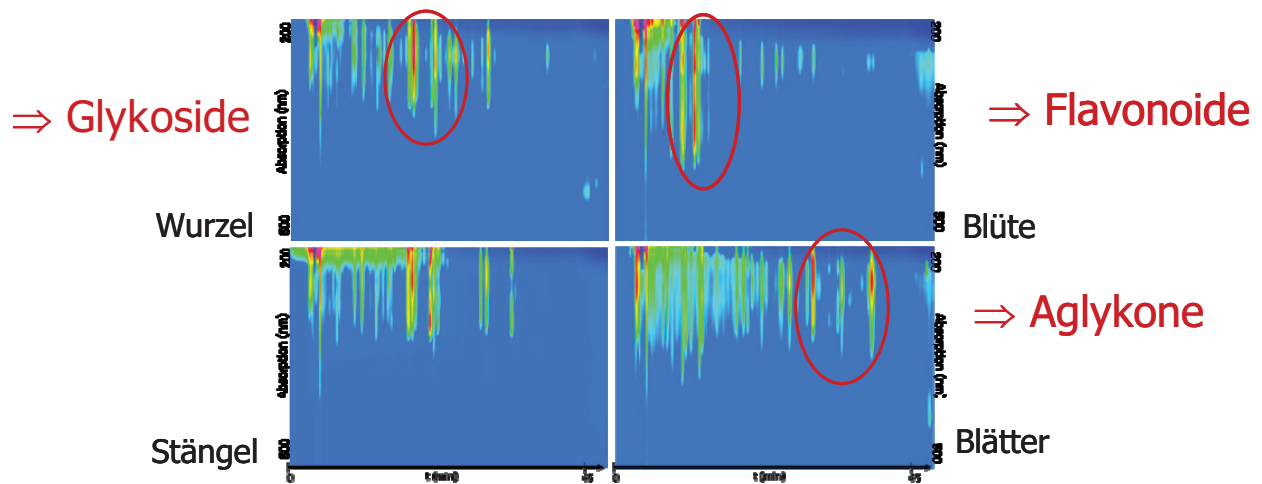


Abbildung 108: HPLC-Chromatogramme eines Screenings der verschiedenen Bestandteile der Rotklee-Pflanze.

Wie in der Abbildung deutlich zu erkennen ist, beinhalten die verschiedenen Pflanzenteile der Rotklee-Pflanze unterschiedliche Verbindungen. In den Blättern sind überwiegend die meisten Isoflavon-Aglykone enthalten, d.h. Formononetin und Biochanin A überwiegen. Hingegen können in der Wurzel hauptsächlich Glykoside detektiert werden. Die Blüte weist eine komplexe Zusammensetzung auf, wobei die massenspektrometrische Analyse auf eine Reihe verschiedener Flavonoide hinweist. Ebenso konnten in der Blüte vereinzelt malonylierte Verbindungen nachgewiesen werden.

Innerhalb dieses Screenings konnte die Veränderung des Isoflavon-Spektrums gut beobachtet werden. Dies wird am Beispiel von den untersuchten Blättern deutlich gemacht (s. Abbildung 109).

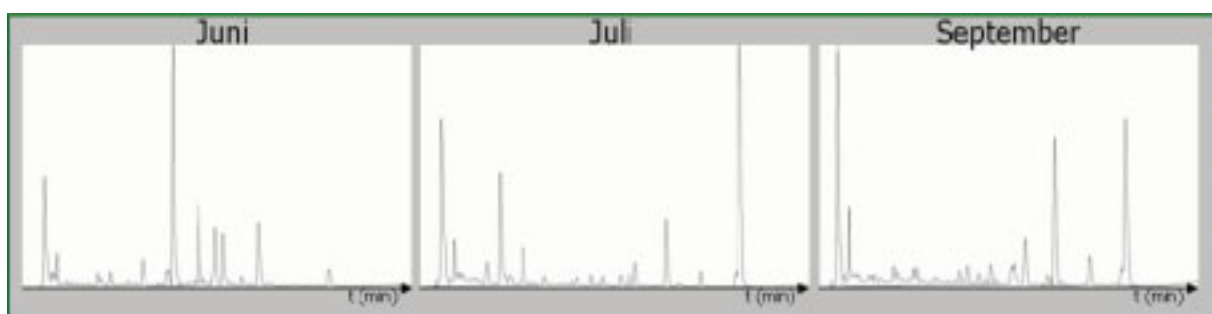


Abbildung 109: Screening der Blätter von Rotklee. Dargestellt sind die HPLC-Chromatogramme bei einer Detektionswellenlänge von  $\lambda = 260$  nm.

Im Juli überwiegt das Isoflavon Biochanin A in den Blättern der Rotklee-Pflanze. Im Juni ist es jedoch in deutlich geringeren Mengen enthalten. Ebenso ändert sich das Profil der Isoflavon-Zusammensetzung, da in den ersten Monaten (Mai und Juni) wesentlich mehr glucosidische Verbindungen vorliegen. Im September (vgl. Abbildung 109 rechts) können



fast nur noch Aglykone detektiert werden. Dieser Versuch unterlag den natürlichen klimatischen Bedingungen und wurde durch die Beschaffenheit des Bodens, den Niederschlag und die Intensität der Sonneneinstrahlung beeinflusst. Diesbezüglich hat eine Untersuchung von Swinny et al. [2005] ergeben, dass sich die Bildung von Isoflavonen deutlich erhöht, sobald eine gezielte UV-B-Bestrahlung stattfindet.

Meagher et al. [2006] untersuchten die Entwicklung des Proanthocyanidin-Gehaltes sowie dessen saisonale Schwankungen in verschiedenen Rotklee-Arten. Nicht nur der Gehalt an Isoflavonen innerhalb der unterschiedlichen Wachstumsphasen, sondern auch die individuelle Isoflavon-Zusammensetzung kann stark innerhalb der verschiedenen Klee-Sorte variieren. De Rijke et al. [2001] haben aufgrund dessen eine Reihe unterschiedlicher Kleesorten untersucht und lieferten interessante Ergebnisse. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Screening der phenolischen Zusammensetzung mittels HPLC-DAD sowie LC-(ESI)-MS erstellt. Folgende Kleespezies wurden im Botanischen Garten Braunschweig angebaut und in einer frühen Wachstumsphase untersucht: *Trifolium pratense*, *Trifolium incarnatum ssp. incarnatum*, *Trifolium campestre*, *Trifolium rubens*, *Trifolium repens*, *Trifolium medium*, *Trifolium resupinatum*, *Trifolium alpestre*, *Trifolium dubium*, *Trifolium alpinum*, *Trifolium badium*, *Trifolium pannonicum*, *Trifolium ochroleucum*, *Trifolium arvense*, *Trifolium striatum* und *Trifolium fragiferum*. Alle Klee-Sorten wurden gleichzeitig unter identischen Bedingungen angepflanzt. Die analytische Untersuchung ergab, dass bei einigen Proben der Anteil an Flavonen überwiegt, welche ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von ca. 340 nm aufweisen. Dieses lässt sich anhand der DAD-Chromatogramme gut erkennen. Andere Spezies enthalten Isoflavone in der Aglykon-Form, wo hingegen ein Teil des untersuchten Materials auch glykosidisch gebundene Verbindungen aufweist. Beispielhaft wird dieses in Abbildung 110 gezeigt.

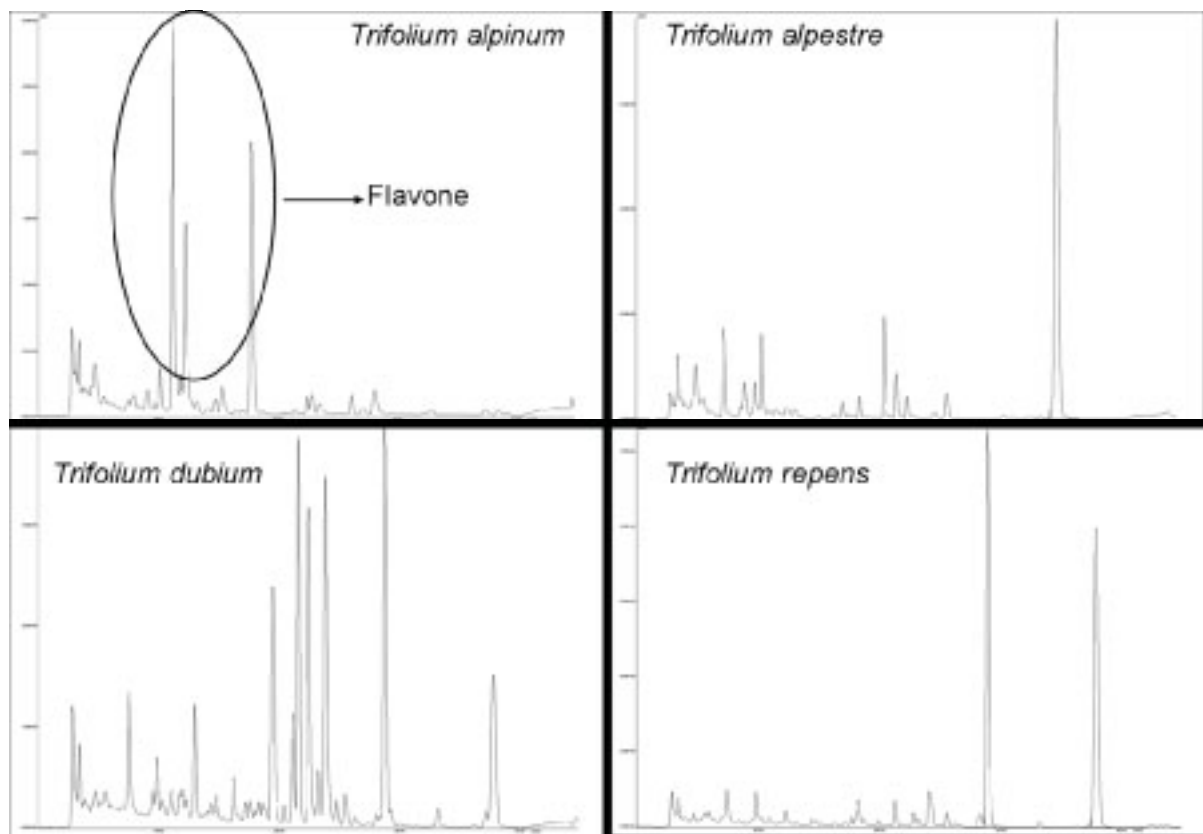


Abbildung 110: HPLC-Chromatogramme diverser Klee-Spezies. Dargestellt bei der Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm.

Innerhalb des Screenings der unterschiedlichen Kleesorten erwies sich der Rotklee (*Trifolium pratense*) eindeutig als ein sehr gutes Pflanzenmaterial für die Gewinnung von Isoflavonen.

Durch diese Analyse konnte gezeigt werden, dass neben den Extraktionsbedingungen auch der Zeitpunkt der Ernte sowie die verwendeten Pflanzenteile den Gehalt an Isoflavonen beeinflussen.

### 3.6 Biologische Testungen

In diesem Kapitel werden zwei verschiedene biologische Tests aufgeführt, wobei es sich einerseits um den Brine Shrimp-Assay handelt und andererseits um den TEAC-Test. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Pflanzenmaterialien (hauptsächlich Soja, Rotklee und Iris) enthalten eine Reihe von bioaktiven Verbindungen, wobei die Isoflavone den Majoranteil ausmachen. Bislang fehlen größtenteils detaillierte Untersuchungen über die verschiedenen biologischen Aktivitäten sowie die Bioverfügbarkeit oder den Metabolismus. Aufgrund dessen

wird in diesem Kapitel ein kleiner Einblick in diese Tests gegeben, wozu einerseits die toxische Wirkung gehört, aber auch die „positive“, d.h. antioxidative Eigenschaft.

### 3.6.1 Test auf Zytotoxizität

Eine Screening-Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität von Naturstoffen oder Pflanzenextrakten ist der „Brine Shrimp-Assay“. Unter dem Begriff „Zytotoxizität“ (auch Cytotoxizität) wird die Fähigkeit einiger chemischer Substanzen verstanden, Gewebezellen zu schädigen [medfuehrer online, 2008]. Für einige Isoflavone wurde bereits ein zytotoxisches Potential nachgewiesen, wie u.a. für Genistein [Kulling et al., 1999; Kulling et al., 2002; Klein und King, 2007]. Mit Hilfe des o.g. Bioassays („Brine Shrimp-Assay“) kann ein Screening zur Erkennung einer potentiellen zytotoxischen Wirkung vorgenommen werden. Dabei handelt es sich um einen Toxizitätstest gegenüber der Salzwassergarnele *Artemia salina* LEACH (Salinenkrebse; englisch: brine shrimp). Dieser Test wurde von Meyer et al. [1982] etabliert und eignet sich zur Untersuchung von Naturstoffen oder pflanzlichen Rohextrakten. Ebenso ist dieser Test im Rahmen einer „bioassay guided fractionation“ gut einzusetzen [McLaughlin et al., 1998]. Ein potentieller Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität und einer anti-Tumor-Aktivität soll bestehen [Anderson et al., 1991]. Dieser *in vitro*-Bioassay ist leicht durchführbar, kostengünstig und ohne großen technischen Aufwand möglich [Kerster und Schaeffer, 1983]. Durch *in vivo*-Tests oder spezifische Untersuchungen z.B. über den Wirkmechanismus sollte der Brine Shrimp-Assay jedoch abgesichert werden [Houghton et al., 2007]. Angewendet wurde der Brine Shrimp-Test für verschiedene Extrakte von Pflanzen, marinen Pflanzen und Tieren sowie Cyanoverbindungen [Ojala et al., 1999; Carballo et al., 2002; de Almeida Alves et al., 2000; Couladis et al., 2002; Harwig und Scott, 1971]. Ebenso fand dieser Test bereits Anwendung in bei der Analytik von Pestizidrückständen oder Mykotoxinen [Barahona und Sánchez-Fortún, 1999]. Dieser Bioassay gibt allerdings keinen Hinweis auf eine selektive Zytotoxizität, und es können darüber hinaus keine Korrelationen zu einer tatsächlichen Krebszellen-Zytotoxizität gezogen werden [Carballo et al., 2002].

Der Testorganismus „*Artemia salina*“ (Salinenkrebse; s. Abbildung 111) gehört zur Gattung der Krebstiere (*Crustacea*) aus der Familie Artemiidae in der Ordnung der Kiemenfüßer (*Anostraca*). Als so genannte „Urzeitkrebse“ existierten die Salinenkrebse bereits vor 100 Millionen Jahren. Heutzutage kommen die Salinenkrebse hauptsächlich in Binnengewässern mit hohem Salzgehalt vor, wie z.B. im Großen Salzsee von Utah. Besonders beliebt sind sie in der Aquaristik als nahrhaftes Fischfutter. Die Nauplien schlüpfen nach ca. 48 Stunden aus Zysten (im Vergleich mit Eiern mehrzellig), wobei diese eine Größe von etwa 0,5 mm aufweisen. Salinenkrebse gehören zu den rückenschwimmenden Krebsen und wenden ihre

Körperunterseite dem Licht zu [Heemcke, 2003 (online); <http://artemia.ws24.cc>, 2008; Croghan, 1958]. Salinenkrebse fühlen sich in unterschiedlichen Medien und Umgebungen wohl, jedoch sind diese primitiven Krebse insbesondere in Gewässern mit sehr hoher Salzkonzentration zu finden [Copeland, 1967; Peters, 1976].



Abbildung 111: Nauplien des Salinenkrebsses (*Artemia salina*; Brine Shrimp).

Als Vergleichsstandard wird für diesen Bioassay das toxische Lignan Podophyllotoxin (Podophyllinsäurelacton) verwendet [Solis et al., 1993]. Dabei handelt es sich um ein Lignan des Aryltetralin-Typs (s. Abbildung 112), welches aus den Rhizomen der Pflanze *Podophyllum emodi* oder *hexandrum* (amerikanischer Maiapfel) gewonnen wird. In der Pflanze liegt es zumeist glykosidisch gebunden vor. In der traditionellen Volksmedizin wurden Extrakte aus den Podophyllum-Wurzeln lange Zeit zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen verwendet, u.a. als Laxantien. Heutzutage ist es nur zur topikalen Behandlung von Warzen zugelassen. Das Podophyllotoxin ist ein Mitosegift und hemmt die Topoisomerase II. Darüber hinaus ist es zytotoxisch, reizend für die Haut und die Schleimhäute. Zeitweise wurde es als Anti-Tumorreagenz (Cytostatika) verwendet, ebenso wie dessen Glykoside Etoposid und Teniposid [Roth et al., 1994; Steglich et al., 1997; Borsche und Niemann, 1932; Römpf, 2008 (online)].

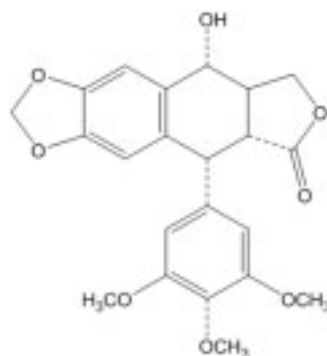


Abbildung 112: Strukturformel von Podophyllotoxin.

Die genaue Versuchsdurchführung des Brine Shrimp-Assays wird unter Kapitel 4.2.17.1 aufgeführt. Die Ergebnisse des Brine Shrimp-Assays für die getesteten Pflanzenextrakte sind in Abbildung 113 graphisch dargestellt. Die Mortalität (Absterberaten in Prozent) der Shrimps innerhalb der einzelnen Pflanzenextrakte bei drei unterschiedlichen Konzentrationen werden aufgeführt. Dabei handelt es sich jeweils um eine Fünffachbestimmung, wobei immer ein Blindwert mitgeführt wurde. Der Vergleich zum toxischen Standard Podophyllotoxin ist in der Grafik (Abbildung 113) nicht mit aufgeführt. Diesbezüglich resultierten (im Mittel) Absterberaten von 62% (Konzentration 10 µg/mL), 75% (Konzentration 100 µg/mL) und 85% (Konzentration 500 µg/mL).

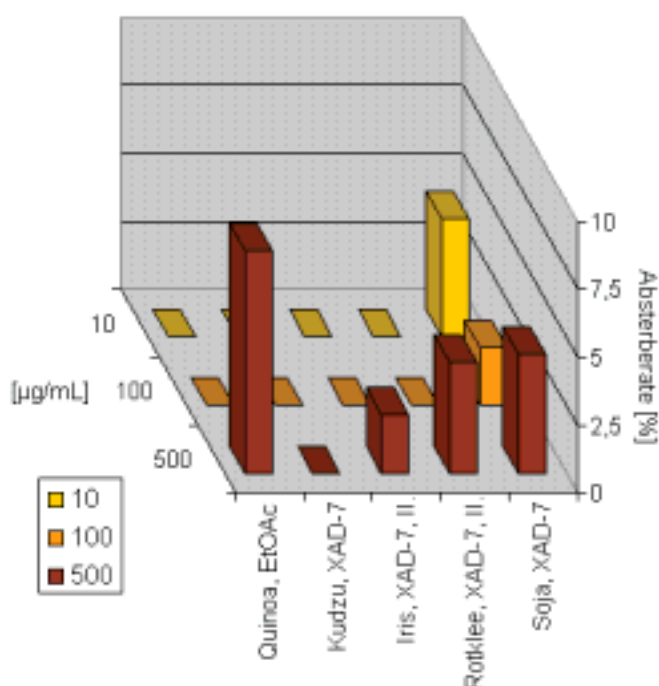


Abbildung 113: Ergebnisse des Brine Shrimp-Assays für pflanzliche Extrakte.

Die zytotoxische Aktivität, berechnet als prozentuale Absterberate, im Vergleich zur Bezugssubstanz Podophyllotoxin kann aus der Abbildung 113 sowie aus Tabelle 29 (exp. Teil) entnommen werden. Dabei wurden einige Pflanzenextrakte, wie der XAD-7-Extrakt von Rotklee oder Iris, zweifach getestet. Bei diesen beiden Extrakten konnte bei der ersten Bestimmung (I.) jeweils eine schwache Zytotoxizität beobachtet werden, weshalb ein weiterer Brine Shrimp-Assay durchgeführt wurde (II.), um das erhaltene Ergebnis zu überprüfen. Die Lösungen in den Probengläschen mit der Konzentration von 500 µg/mL waren teilweise stark gefärbt, wie im Fall des Soja XAD-7-Extraktes dunkelgelb oder gelbgrün bei dem Extrakt aus der Iris. Bei allen Probelösungen des Rotkleeextraktes war eine grünliche Verfärbung deutlich zu erkennen, welche mit zunehmender Konzentration der

entsprechenden Lösungen in den Probengläschen immer dunkler wurde. Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass der Extrakt von Kudzu keine zytotoxische Aktivität aufweist (Mortalität von 0%), ähnlich wie die XAD-7-Extrakte von Soja, Rotklee (II.) und Iris (II.). Die Absterberaten der drei letztgenannten lagen auch bei der höchsten getesteten Konzentration unter 4,4%. Die Mortalitätsraten des schonend aufgearbeiteten Sojas (bei dem malonylierte Isoflavone enthalten sind), sind nur leicht erhöht, liegen jedoch immer noch unter 5,0% und liegen in dem Bereich vom XAD-7-Extrakt (nicht in Abbildung 113 aufgeführt). Die Malonsäureeinheit macht die Verbindungen etwas polarer, woraufhin sich diese leichte Erhöhung der zytotoxischen Aktivität ergeben kann, da es möglicherweise zu einer verbesserten Aufnahme dieser Verbindungen durch die Shrimps kommen kann. Für den Extrakt aus der Iris wurde bei der wiederholten Testung nur eine sehr geringfügige zytotoxische Aktivität (Absterberate von 2,17%) erhalten. Dieses Ergebnis kann durch Daten aus der Literatur bestätigt werden. In einer Studie von Orhan et al. [2003] wiesen verschiedene Extrakte von *Iris germanica* Rhizomen eine Phytotoxizität gegenüber *Lemna aequinoctialis* Welv. (eine Art der Wasserlinsengewächse) auf, stellten sich jedoch als inaktiv im Brine Shrimp-Bioassay heraus. Ein Extrakt der Körner der Quinoa wurde ebenfalls mittels dieses Bioassays untersucht. Die Quinoa (*Chenopodium quinoa*) gehört zur Familie der Fuchsschwanzgewächse (Amaranthaceae) und erlangt als „Pseudogetreide“ immer größere Beliebtheit. Dieses Extrakt wies nur eine minimale Zytotoxizität auf. García et al. [1997] untersuchten diverse Extrakte von Chenopodiacean mit *Artemia salina* und stellten keine toxische Aktivität fest.

In den Extrakten liegen jeweils komplexe Mischungen der in der Pflanze vorkommenden Isoflavone vor. Zur Absicherung der obigen Ergebnisse wurden daher die zuvor mittels HSCCC isolierten Reinverbindungen mit diesem Test untersucht. Der Brine Shrimp-Assay wurde mit den aus Soja isolierten Isoflavonen Genistin, Daidzin und Glycitin, sowie den aus Rotklee isolierten Formononetin, Biochanin A und Irilon durchgeführt. Die getesteten Konzentrationen lagen dabei überwiegend bei 10 µg/mL, 100 µg/mL und 500 µg/mL. Bei den beiden Isoflavonen Biochanin A und Irilon wurden jedoch eine geringere Konzentration getestet (10 µg/mL, 100 µg/mL und 250 µg/mL). Diese beiden Verbindungen lagen nur in begrenzter Menge vor, weshalb für diesen Test eine geringere Konzentration gewählt wurde. Darüber hinaus sind viele Isoflavone schwerlöslich. Deshalb könnten zu hohe Konzentrationen eines Isoflavons auf den Antibiotika-Testplättchen dazu führen, dass nicht die gesamte Menge dieses Isoflavons sich ablöst und in die Testlösung eingebracht wird. Die Ergebnisse dieses Bioassays werden in folgender Grafik (Abbildung 114) veranschaulicht.

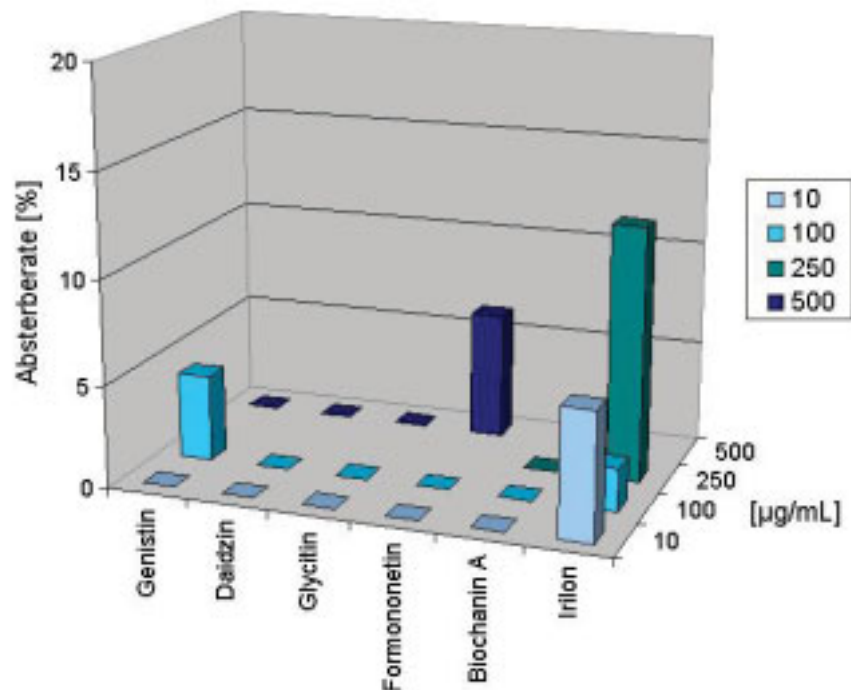


Abbildung 114: Ergebnisse des Brine Shrimp-Assays für die untersuchten Reinsubstanzen

Die Nauplien im Brine Shrimp-Bioassay für die getesteten Reinsubstanzen reagieren teilweise anders bzw. entgegengesetzt als erwartet. Das toxische Potential des Isoflavons Genistein wurde bereits mehrfach beschrieben (vgl. Kapitel 1.1.5.8). Zumindest für dieses Isoflavon wurde eine zytotoxische Aktivität erwartet, wobei in diesem durchgeführten Bioassay jedoch die glucosidisch gebundene Form (Genistin) eingesetzt wurde, da es die in Soja vorkommende genuine Form ist. Dieses Isoflavon besitzt im Vergleich zu den anderen Isoflavonen aus Soja eine Hydroxylgruppe in der 5-Position im Molekül, weshalb eine höhere Polarität innerhalb dieser Verbindung vorliegt. Für Genistin konnte in diesem Bioassay keine Zytotoxizität ermittelt werden, die entsprechenden Absterberaten lagen in jeder der drei getesteten Konzentrationen unter 5%.

Die Isoflavone Genistin, Daidzin, Glycitin und Formononetin zeigten keine zytotoxische Aktivität. Im Fall der Versuchsreihe des Isoflavons Irlon konnte eine sehr geringe Toxizität (Mortalitätsrate von 8,3% bei der Konzentration von 250 µg/mL) festgestellt werden. Die verwendete Substanz lag mit einer Reinheit von 92% vor, woraus sich ebenfalls die Aktivität aus den weiteren in dieser Fraktion enthaltenen Verbindungen ergeben kann. Generell konnte mit dem verwendeten Brine Shrimp-Assay keine wirkliche Toxizität eines der verwendeten Isoflavone nachgewiesen werden. Hingegen ergaben die Untersuchungen von Sun et al. [1988], dass auch Isoflavone in dem Brine Shrimp-Assay eine toxische Wirkung aufweisen können. Der mitgeführte Vergleichsstandard in diesem Assay, das



Podophyllotoxin, lieferte z.B. folgende Absterberaten: 54% (Konzentration 10 µg/mL), 94% (Konzentration 100 µg/mL) und 98% (Konzentration 500 µg/mL).

Eine gewisse Problematik bei diesem Brine Shrimp-Assay birgt die schlechte Löslichkeit der Isoflavone. Deshalb wurde nach dem Auszählen der Shrimps aus den verwendeten Probegläschen Meerwasser entnommen und dünnschichtchromatographisch auf das Vorhandensein des entsprechenden Isoflavons geprüft. Für eine realistische Konzentrationsbestimmung müssten diesbezüglich die einzelnen Lösungen aus diesen Gläsern über Festphasenkartuschen aufgereinigt werden, um das Meersalz für eine anschließende HPLC-Analyse zu entfernen. Mit Hilfe einer solchen Aufarbeitung kann sichergestellt werden, ob sich die auf den Antibiotika-Testplättchen befindliche Menge an Isoflavonen tatsächlich vollständig abgelöst hat.

Die Ergebnisse des Brine Shrimp-Assays für die Reinsubstanzen werden in Tabelle 30 (s. exp. Teil) aufgeführt. Normalerweise werden Werte über die Toxizität als LD<sub>50</sub>-Werte angegeben, welche sich aus der konzentrationsabhängigen Kennlinie ergeben. Dabei handelt es sich bei einem LD<sub>50</sub>-Wert um einen Begriff aus der Toxikologie, der ein Maß für die Giftigkeit eines Stoffes festlegt. Dabei wird unter diesem Wert die mittlere letale (tödliche) Dosis verstanden, bei der 50% aller Versuchstiere bei Gabe einer bestimmten Substanzmenge sterben [Umweltlexikon online, 2008]. Für vorliegende Arbeit werden die LD<sub>50</sub>-Werte jedoch nicht mit angegeben, da die getesteten pflanzlichen Extrakte und Reinverbindungen nahezu keine zytotoxischen Wirkungen aufweisen.

### 3.6.2 Bestimmung des antioxidativen Potentials von Isoflavonen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der TEAC-Test zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von einigen Pflanzenextrakten und isolierten Isoflavonen benutzt. Ursprünglich basierte dieser Test auf einer Vorschrift nach Miller et al. [1993]. Danach wird ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) als Peroxidasesubstrat mittels Metmyoglobin und Wasserstoffperoxid zum Radikalkation ABTS<sup>•+</sup> umgesetzt. Die Zeit wird nach der Zugabe des Wasserstoffperoxids gestoppt und nach exakt 6 min die Extinktion der entstandenen Grünfärbung photometrisch bestimmt. Dabei wird eine Wellenlänge von  $\lambda = 734 \text{ nm}$  verwendet. Sobald antioxidative Substanzen in der Lösung enthalten sind, verschiebt sich die Zeit, innerhalb derer sich das ABTS<sup>•+</sup>-Radikalkation bildet (Lagphase). Außerdem fangen diese Substanzen die gebildeten Radikale ebenso ab. Folglich ist die Grünfärbung in der Reaktionslösung nach einer Zeitspanne von 6 min je schwächer, desto höher die Konzentration an Antioxidantien in der Lösung ist. Die Ergebnisse dieser Messung bzw. die antioxidative Aktivität wird in Trolox-Äquivalenten angegeben. Das als Bezugsgröße



ausgewählte Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) kann als wasserlösliches Vitamin E Derivat angesehen werden. Diese Methode ist im vorliegenden Fall, indem eher schwerlösliche Isoflavone gemessen werden, nur in einem sehr geringen Konzentrationsbereich anwendbar. Ein geeignetes Testsystem für diese Proben muss zumindest ein alkoholisches (ethanolisches) Lösungsmittel aufweisen, um auch die lipophileren Isoflavone zu lösen, was mit einer wässrigen Matrix nicht möglich ist. Deshalb wurde zur Bestimmung des antioxidativen Potentials auf die variierte (modifizierte) Methode nach Re et al. [1999] zurückgegriffen. Dabei wird das ABTS<sup>•+</sup>-Radikalkation bereits vor Beginn der eigentlichen Messung erzeugt, wobei Kaliumsulfat verwendet wird. Die nach dieser „Vorreaktion“ entstandene blau-grüne Lösung mit ABTS<sup>•+</sup>-Radikalen wird direkt zu der Probelösung gegeben. In Anlehnung an die Original-Methode wird hierbei auch nach einer Reaktionszeit von exakt 6 min die verbleibende Färbung photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 734$  bestimmt. Je stärker die Entfärbung der blau-grünen Lösung mit ABTS<sup>•+</sup>-Radikalen ist, desto stärker sind die in der Probelösung enthaltenen Antioxidantien.

In vorliegender Arbeit wurden die Extrakte von Soja, Rotklee, Iris und Schwarzem Soja getestet. Die antioxidative Aktivität war bei Soja und Iris in der getesteten Konzentration nicht nachweisbar und der Extrakt des Rotklees wies ebenfalls nur eine sehr geringe Aktivität auf. Die Aktivität des Schwarzen Sojas war wesentlich höher, was vermutlich durch das enthaltene Anthocyan bewirkt wird. Die Reinsubstanzen Genistin, Daidzin, Glycitin, Formononetin, Irlon und Biochanin A wurden ebenfalls mit diesem Testsystem untersucht. Es konnten dabei keine nennenswerten antioxidativen Aktivitäten festgestellt werden, obwohl die Konzentration der Testsubstanz deutlich erhöht wurde. Einige Untersuchungen [Rüfer und Kulling, 2006b; Arora et al., 1998; Lee et al., 2005] haben jedoch ein leichtes antioxidatives Potential der Isoflavone bestätigt.

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Material, Geräte und Chemikalien

#### 4.1.1 Chemikalien

|                                    |               |                                              |
|------------------------------------|---------------|----------------------------------------------|
| Acetonitril                        | HPLC          | Arcos, New Jersey (USA) und Sigma, Steinheim |
| Acetonitril                        | reinst        |                                              |
| Amberlite® XAD-7                   |               | Merck, Darmstadt                             |
| Ameisensäure                       | p.a., 98-100% | Roth, Karlsruhe                              |
| Anisaldehyd                        |               | Merck, Darmstadt                             |
| <i>n</i> -Butanol                  | p.a.          | Riedel-deHaën, Seelze und Fisher Scientific  |
| Chloroform                         | p.a.          | Roth, Karlsruhe                              |
| DMSO                               | puriss.       | Fluka, Sigma-Aldrich, Buchs (Schweiz)        |
| DMSO                               | deutertiert   | Aldrich, Milwaukee (USA)                     |
| Essigsäure                         | 99-100%       | Riedel-deHaën, Seelze                        |
| Ethanol                            | HPLC          | Fisher Scientific, Loughborough (UK)         |
| Ethanol                            | p.a.          | Riedel-deHaën, Seelze                        |
| Ethylacetat                        | p.a.          | Arcos Organics, Geel (Belgien)               |
| <i>n</i> -Hexan                    | p.a.          | Riedel-deHaën, Seelze                        |
| <i>iso</i> -Propanol               | p.a.          | Fisher Scientific, Loughborough (UK)         |
| Kaliumhexacyanoferrat(II)-3-hydrat | p.a.          | Riedel-deHaën, Seelze                        |
| Kaliumpersulfat                    | p.a.          | Riedel-deHaën, Seelze                        |
| Methanol                           |               | technisch (dest.)                            |

|                                       |                |                                                                                       |
|---------------------------------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Methanol                              | HPLC           | Arcos Organics, Geel (Belgien) und Seelze und<br>Fisher Scientific, Loughborough (UK) |
| Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>       | min. 99,8%     | Merck, Darmstadt                                                                      |
| Natriumchlorid                        | reinst         | Roth, Karlsruhe                                                                       |
| Natriumsulfat                         | wasserfrei     | Riedel-deHaën, Seelze                                                                 |
| Polyamid                              | SC-6           | Macherey-Nagel, Düren                                                                 |
| Sephadex LH-20                        | 25-10 µm Poren | Sigma, Steinheim                                                                      |
| <i>tert.</i> -Butylmethylether (TBME) |                | technisch (dest.)                                                                     |
| Trifluoressigsäure (TFA)              | purum, ≥ 98%   | Fluka Chemika, Buchs (Schweiz)                                                        |
| Wasser                                |                | doppelt ionisiert (Nanopure®)                                                         |
| Wasser                                | HPLC           |                                                                                       |
| Zinksulfat-Heptahydrat                | p.a.           | Merck, Darmstadt                                                                      |

Das verwendete Wasser wurde mit Hilfe eines Nanopure®-Systems (Nanopure®, Barnstead) gereinigt; ansonsten wurde destillierte Qualität benutzt. Die Fassware wurde zumeist zur Trennung der isolierten Verbindungen mittels HSCCC verwendet, wie z.B. Methanol. Dieses wurde vor Gebrauch über eine Vigreuxkolonne destilliert.

#### 4.1.2 Pflanzenmaterial

Sojamehl (Firma Hensel; neuform Reformhausprodukte); gekauft 2003

Sojaflocken (Firma Hensel; neuform Reformhausprodukte); gekauft 2003

Sojaflocken schonende Aufarbeitung (Frauenhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung 80PDI)

Schwarzer Soja „Hokkaido“ (Arche Naturkost, Hilden); gekauft 2007

Rotklee, ethanolischer Extrakt (Pfannenschmidt, Hamburg); gekauft 2005

Rotklee, frische Proben (Botanischer Garten, Braunschweig); geerntet 2007

Iris Rhizome, getrocknet (Apotheke, Braunschweig); gekauft 2006

Iris, frische Probe (Botanischer Garten, Braunschweig); geerntet 2006

Kudzu, Rhizome, getrocknet und gewürfelt (Galcke, Gittelde); gekauft 2007

Weintraubenschalentrester (Breko, Bremen)

Alfalfa-Sprossen (Erlenhof, abgepackt für REWE-Handelsgruppe GmbH); gekauft 2006

#### 4.1.3 Probenmaterial (Nahrungsergänzungsmittel und Cremes)

Die untersuchten Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Soja- oder Rotklee-Extrakt sind in Apotheken, Drogerien, Reformhäusern oder Supermärkten frei verkäuflich erhältlich. Dabei handelt es sich einerseits um Präparate in Kapselform, denen verschiedene Öle mit beigegeben wurden, welche zur Nahrungsergänzung in verschiedenster Form dienen sollen. (So wird bsp. Nachtkerzenöl einigen Kapseln mit beigemengt, welches mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthält und für den Stoffwechsel der Haut eine Rolle spielen soll.) Diesbezüglich sind insbesondere folgende Bestandteile als Inhaltsstoffe zu nennen: Biotin, Nachtkerzenöl, Tocopherole, Vitamine (v.a. K und B-Vitamine), Folate, Pantothersäure, Calciumascorbat, Magnesiumcarbonat, Palmkernöl, Leinöl und Sojaöl.

Der im Verzeichnis der Zutaten angegebene Gehalt an Isoflavonen der untersuchten Präparate hat eine Varianz von 17,5-100 mg Isoflavone pro Kapsel oder Tablette. Bei den Produkten mit Zusatz von Rotklee sind laut Angabe auf der Verpackung jeweils 40-50 mg Isoflavone enthalten, wobei ein Produkt (IV) zusätzlich 50 mg Soja-Isoflavone enthalten soll.

Entsprechend der Nährstoffkennzeichnungsverordnung sind die Angaben über die Spurenelemente, Vitamine und wertgebende Bestandteile (z.B. Isoflavone) aufgeführt.

#### 4.1.4 Sonstige Materialien

|               |                                                                          |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Faltenfilter: | Ø 250 mm und Ø 150 mm, Schleicher und Schuell, Dassel                    |
| Membranfilter | Einmalfilter Chromafil Pet-45/25, Art.-Nr. 729020; Macherey-Nagel, Düren |
| Mühle:        | Retsch-Mühle Typ SM1 Nr. 314108 A, 380 V                                 |
| Seesand:      | Merck, Darmstadt                                                         |
| Ultraschall:  | Bandelin Sonorex TK 52 und RK 100                                        |
| Ultra-Turrax: | Model T 25, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen                    |

---

|               |                                                                                        |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| UV-Kabinett:  | Desaga Sarstedt-Gruppe HP UVVIS ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ; high-pressure Hg-Lampe) |
| Zerkleinerer: | Mulinette, Moulinex, Radolfzell                                                        |

## 4.2 Methoden und Geräte

### 4.2.1 Analytische Methoden

#### 4.2.1.1 HPLC

|                   |                                                         |
|-------------------|---------------------------------------------------------|
| Pumpe:            | PU-980 Intelligent HPLC Pump (Jasco, Gross-Umstadt)     |
| Degasser:         | DG-980-50-3-line Degasser (Jasco, Gross-Umstadt)        |
| Gradientenformer: | LG-980-02 Ternary Gradient Unit (Jasco, Gross-Umstadt)  |
| Injektor:         | Rheodyne 7725, 20 $\mu\text{L}$ (Techlab, Erkerode)     |
| Detektor:         | MD-1510 Multiwavelength Detector (Jasco, Gross-Umstadt) |
| Software:         | Borwin-PDA, Version 1.50 (Jasco, Gross-Umstadt)         |

### 4.2.2 Massenspektrometrie

|                                      |                                                                                              |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| MS-Gerät:                            | Bruker Esquire-LC-MS/MS Ion Trap mit Elektrospray-Ionisierung (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) |
| Pumpe:                               | Hewlett Packard Series 1100, G1328A Binary Pump                                              |
| Injektor:                            | Rheodyne 7125 injection valve (Rheodyne, Bensheim)                                           |
| Injektionsvolumen:                   | 20 $\mu\text{L}$ (Techlab, Erkerode)                                                         |
| Detektor:                            | Lichrograph L-4000 UV-Detector (Merk Hitachi, Tokyo, Japan)                                  |
| Schreiber:                           | C-R 6A Chromatopac (Shimadzu, Düsseldorf)                                                    |
| Software:                            | ChemStation Version A.006.01, Esquire Control Software                                       |
| Spritzenpumpe:                       | Cole Parmer <sup>®</sup> , 74900 series, Cole-Parmer Instrument Company                      |
| Flussrate:                           | 120 $\mu\text{L/h}$                                                                          |
| HPLC-ESI-MS <sup>n</sup> -Parameter: | Ionisierungsmodus: ESI positiv (oder negativ)                                                |
|                                      | Kapillarspannung: -1500 V                                                                    |

Fragmentorspannung: -500 V;

capillary exit offset: 70 V

skimmer 1: 25 V, skimmer 2: 10 V

Trockengastemperatur: 310°C

Trocknungsgasfluss: 9 L/min

Zerstäuberdruck: 40 psi

#### 4.2.3 Analytische Säulen

Isoflavon- und Anthocyan-Analytik: Luna 5 µm, C18, 250 x 4,6 mm, 100 Å mit Vorsäule  
(Phenomenex®, Aschaffenburg)

Analytik Lignane: Lichrosphere 250 x 4 mm, C18 (Merck, Darmstadt)

#### 4.2.4 Verwendete Fließmittelsysteme und Gradienten

##### System I (Soja)

Fließmittel A: 0,1%ige Ameisensäure

Fließmittel B: Acetonitril

Fluss: 0,8 mL/min

Gradient: 0 min 15% B, 30 min 24% B, 40 min 90% B, 45 min 15% B

##### System II (Rotklee)

Fließmittel A: 0,1%ige Ameisensäure

Fließmittel B: Acetonitril

Fluss: 0,8 mL/min

Gradient: 0 min 20% B, 30 min 45% B, 35 min 48% B, 40 min 90% B, 45 min  
20% B

##### System III (Stilbene)

Fließmittel A: 0,1%ige Ameisensäure

Fließmittel B: Acetonitril

Fluss: 0,6 mL/min

Gradient: 0 min 20% B, 25 min 27% B, 40 min 48% B, 50 min 50% B, 60 min 55% B, 65 min 80% B, 70 min 20% B

#### System IV (Anthocyane)

Fließmittel A: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, 87/3/10, V/V/V

Fließmittel B: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure, 40/50/10, V/V/V

Fluss: 0,5 mL/min

Gradient: 0 min 6% B, 20 min 20% B, 35 min 40% B, 40 min 60% B, 45 min 90% B, 55 min 6% B

#### System V (Lignane)

Fließmittel A: 0,2%ige Essigsäure

Fließmittel B: Methanol

Fluss: 0,6 mL/min

Gradient: 0 min 10% B, 17 min 22% B, 20 min 50% B, 25 min 50% B, 30 min 10% B

#### System VI (Rotklee, LC-MS)

Fließmittel A: 0,1%ige Ameisensäure

Fließmittel B: Acetonitril

Fluss: 0,8 mL/min

Gradient: 0 min 15% B, 25 min 24% B, 40 min 45% B, 50 min 50% B, 65 min 90% B, 70 min 15% B

#### 4.2.5 NMR

Spektrometer 1: Bruker AMX 300 (Bruker, Biospin, Rheinstetten)

---

|                           |                                                                                               |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Messfrequenz 1:           | 300.0 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 75.5 MHz ( $^{13}\text{C}$ )                                   |
| Temperatur 1:             | 300 K                                                                                         |
| Auswertesoftware:         | WIN-NMR Software, Version 6.1.0.0                                                             |
| Spektrometer 2:           | Bruker AV II 600 (Bruker, Biospin, Rheinstetten)                                              |
| Messfrequenz 2:           | 600.1 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150.9 MHz ( $^{13}\text{C}$ )                                  |
| Auswertesoftware:         | MestRe-C, Version 3.9.8.0                                                                     |
| Spektrometer 3:           | Bruker DRX 400 (Bruker, Biospin, Rheinstetten)                                                |
| Messfrequenz 3:           | 400.1 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 100.6 MHz ( $^{13}\text{C}$ )                                  |
| Auswertesoftware:         | MestRe-C, Version 3.9.8.0                                                                     |
| Lösungsmittel Isoflavone: | DMSO (perdeutert); Kalibrierung: $\delta$ $^1\text{H}$ : 2,49 ppm; $^{13}\text{C}$ : 39,5 ppm |

#### 4.2.6 Photometer

Gerät: Shimazu UV-2101 PC UV/VIS, Scanning Spectrophotometer

Software: UV-2101PC

Wellenlänge: 190-600 nm

#### 4.2.7 Präparative Methoden

##### 4.2.7.1 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Chromatograph: High speed model CCC-1000, Pharma Tech Research Corp.  
(Baltimore, Maryland, USA)

Coilvolumen: Triplecoil, Gesamtvolumen ca. 850 mL; ID 2,6 mm

Pumpe: Biotronik HPLC Pump BT 3020

Injektor: Rheodyne 5041 4-Wegeventil (Techlab, Erkerode)

Injektionsvolumen: 25, 30, 50, oder 60 mL

Detektor: Knauer variable wavelength detector, (UV) K-2501

Fraktionensammler: Pharmacia LKB Super Frac fraction collector

Eine Übersicht über die durchgeführten HSCCC-Trennungen befindet sich im Anhang (Kapitel 7). Alle HSCCC-Trennungen werden im Head-to-Tail Modus durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen werden anhand des aufgezeichneten UV-Chromatogramms der



Trennung gebildet und die entsprechenden Reagenzgläser vereinigt. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck abgezogen und der Rückstand mit Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Nach Beendigung der Trennung wird der verbleibende Rückstand auf dem Coil unter Stickstoffstrom entleert.

#### 4.2.7.2 Semipräparative und präparative HPLC

##### Anlage 1:

Pumpe: Knauer HPLC Pump 64  
Injektor: Rheodyne 7125; 200, 300, 500 µL  
Detektor: Knauer Variable Wavelength Monitor  
Schreiber: LKB Bromma 2210 2 Channel Recorder  
Software: Knauer HPLC Software 2.0

##### Anlage 2:

Pumpe: Knauer Wellchrom HPLC Pump K-1001  
Degasser: Knauer Wellchrom 4 Channel Degasser K-5004  
Gradientenformer: Knauer Solvent organizer K-1500; Knauer Dynamic Mixing Chamber  
Injektor: Knauer, 200 bzw. 500 µL  
Detektor: Knauer Wellchrom UV Detector K 2600  
Software: Knauer Eurochrom 2000

##### verwendete Säulen:

Luna C18(2), 5 µm, 100 Å, 250 x 10.0 mm mit Vorsäule (Phenomenex®, Aschaffenburg)  
Luna C18(2), 5 µm, 100 Å, 250 x 15.0 mm mit Vorsäule (50 x 10 mm), (Phenomenex®, Aschaffenburg)

##### Isokratische Trennungen:

Verwendetes Fließmittel: 0,1%ige Ameisensäure **A** mit Acetonitril **B** (Zusammensetzung je nach Polarität und Zusammensetzung der zu trennenden Fraktion)

Als Beispiel wird an dieser Stelle die Trennung von Irilon aufgeführt: MeCN/0,1%ige Ameisensäure (56/44, V/V); Fluss 6 mL/min.

Gradientenelution:

Semipräparative Isolierung von Rotklee-Isoflavonen\*: Anfangsgradient: %A: 0 min 55%, 10 min 52%, 12 min 50%, 14 min 55% mit Flussraten von 6,0 bis 8,5 mL/min.

Semipräparative Isolierung von Iris-Isoflavonen\*: Anfangsgradient: %A: 0 min 65%, 5 min 60%, 12 min 60%, 22 min 52% mit Flussraten von 7,0 bis 8,5 mL/min.

Semipräparative Isolierung von Puerarin\*: Gradient: 0 min 27% B, 3 min 27% B, 8 min 30% B, 12 min 38% B, 18 min 50% B; Fluss: 7,0 mL/min

\*Diese Gradienten werden jeweils je nach Beschaffenheit der zu trennenden Probe variiert.

#### 4.2.8 Extraktionen

Soja:

Es werden 200 g Sojamehl bzw. Sojaflocken eingewogen. Die Flocken werden mit einer handelsüblichen Küchenmaschine (Mulinette) zerkleinert. Das Mahlgut wird mit 600 mL Hexan für ½ h gerührt. Nach Absetzen der feinen Bestandteile wird der dunkelgelbe Überstand vorsichtig abdekantiert und zweimal erneut auf diese Weise entfettet. Nachdem das dritte Mal die lipophilen Bestandteile (u.a. Sojaöl) abgetrennt werden, erfolgt eine Filtration, wobei der getrocknete Filtrerrückstand zur weiteren Extraktion verwendet wird. Dazu wird dieser mit 800 mL Methanol/Wasser (75/25, V/V) für mindestens 6 h unter Rühren extrahiert. Nach der Filtration der auf diese Weise gewonnenen Extraktionslösung wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abdestilliert und lyophilisiert. Auf diese Weise werden 26,8 g Soja-Rohextrakt erhalten, welcher über XAD-7-Material weiter aufkonzentriert wird.

Eine weitere Möglichkeit zur Extraktherstellung von Soja ist die Flüssig-Flüssigextraktion mit Ethylacetat (s.u.).

Rotklee:

Für die Herstellung eines an Isoflavonen angereicherten und konzentrierten Rotklee-Extraktes wird der käuflich zu erwerbende ethanolische Rotklee-Extrakt (ca. 300 g) mit 10 mL DMSO sowie 100 mL Methanol versetzt und 1500 mL Wasser aufgeschwemmt. Diese Suspension wird zunächst für ca. 1 h gerührt, womit ein möglichst vollständiges Lösen der phenolischen Bestandteile erreicht werden soll. Nach Filtration wird dieser Extrakt auf die

XAD-7-Säule verbracht und mit 2500 mL Wasser gewaschen. Die Elution erfolgt mit 2 L Methanol. Das grün-bräunliche Eluat wird *in vacuo* abdestilliert, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Iris:

Zur vollständigen Entfernung von lipophilen Bestandteilen werden die getrockneten, gemahlenen Rhizome der Iris dreifach mit Hexan gerührt. Das Hexan wird jeweils verworfen und aus den getrockneten Rhizomen zunächst ein Rohextrakt hergestellt. Dazu werden 250 g der Rhizome mit 1 L Methanol/Wasser (70/30, V/V) versetzt und über Nacht gerührt. Die entstandene Suspension wird filtriert und das Filtrat unter reduziertem Druck konzentriert. Daraus werden ca. 19 g Rohextrakt erhalten, welche mit 2 mL DMSO versetzt und in 1200 mL Wasser aufgeschwemmt werden. Nach kurzer Behandlung im Ultraschall wird dieser Rohextrakt filtriert und das Filtrat auf eine XAD-7-Säule verbracht. Nach einem Spülschritt mit 2,5 L Wasser wird mit 1500 mL Methanol eluiert. Das dunkelgelbe Eluat wird unter reduziertem Druck konzentriert und gefriergetrocknet.

Kudzu:

Die getrockneten und geschnittenen Rhizome der Kudzu-Pflanze (165 g) werden mit einer Mulinette zerkleinert und zweimal mit je 300 mL Hexan gerührt. Das Hexan wird abfiltriert und verworfen. Der getrocknete Filterrückstand wird mit 700 mL Methanol aufgenommen und für 5 h gerührt. Aus dem Filtrat wird das Methanol unter reduziertem Druck abdestilliert und der Rückstand mit 1000 mL Wasser aufgenommen und auf die XAD-7-Säule gegeben. Um gelöste Zucker, Proteine o.ä. zu entfernen erfolgt eine Aufreinigung, indem mit 2 L Wasser gewaschen wird. Am XAD-7-Material adsorbierende Substanzen werden mit 1200 mL Methanol eluiert. Das Eluat wird nach Entfernung des Methanols lyophilisiert und zur Isolierung von Puerarin mittels HSCCC verwendet.

Alfalfa-Sprossen (Luzerne):

Die frischen Alfalfa-Sprossen werden eingewogen (140 Gramm pro Ansatz) und in einem handelsüblichen Mixer zerkleinert und homogenisiert. Die entstandene wässrige Masse wird zweimal mit je 200 mL Hexan entfettet, wozu in einem Scheidetrichter mehrfach fraktioniert wird. Nach vollständiger Entfernung des Hexans erfolgt die Extraktion. Dazu wird der Ansatz mit 250 mL eines Gemisches aus Methanol/Wasser im Verhältnis 3/1, V/V für zwei Stunden unter ständigem Rühren extrahiert. Das Gemisch wird filtriert und das Methanol aus dem Filtrat *in vacuo* entfernt. Der erhaltene Rückstand wird mit Wasser aufgeschwemmt und auf eine kleine XAD-7-Säule gegeben. Danach wird mit mindestens ½ L Wasser gewaschen, bevor die Elution mit reinem Methanol erfolgt. Dazu werden ca. 300 mL Methanol verwendet,

welche mit Hilfe des Rotationsverdampfers eingeeengt werden. Der Rückstand wird mit Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Aus 140 mg frischen Alfalfaspossen können auf diese Weise 70 mg eines hellgelben Extraktes hergestellt werden.

#### Extraktion mit Ethylacetat:

Bei dieser Art der Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie wird der Extrakt in Ethylacetat gelöst und soviel Wasser (dest.) hinzugefügt, dass in etwa das Verhältnis von 3/1 (EtOAc/H<sub>2</sub>O, V/V) vorliegt und mehrfach kräftig geschüttelt. Zur vollständigen Trennung der beiden Phasen wird 1 mL einer konzentrierten Kochsalzlösung hinzu gegeben. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel (EtOAc) unter Vakuum eingeeengt und lyophilisiert. Ein Teil des Rückstandes wird sofort analytisch untersucht.

#### 4.2.9 Amberlite® XAD-7-Festphasenextraktion

|                 |                                                                             |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Säule:          | Glas, 70 cm mit Ø 5 cm – Füllhöhe ca. 52 cm; oder Ø 3 cm mit 20 cm Füllhöhe |
| Trennmedium:    | Amberlite® XAD-7                                                            |
| Elutionsmittel: | Methanol                                                                    |

Das XAD-7-Adsorptionsmaterial wird in Methanol/Wasser (1/1, V/V) aufgeschwemmt und die Glassäule damit befüllt. Gewaschen wird mit 3 L dest. Wasser bevor die Probe aufgegeben wird. Nach Aufgabe der Probe wird mit 2-3 L dest. Wasser gewaschen um Zucker, Proteine u.ä. zu entfernen. Die Elution erfolgt mit Methanol und der erhaltene Extrakt wird unter reduziertem Druck eingeeengt und gefriergetrocknet.

#### 4.2.10 Amberlite® XAD-2-Festphasenextraktion

|                 |                              |
|-----------------|------------------------------|
| Säule:          | Glas, Füllhöhe 25 cm, Ø 3 cm |
| Trennmedium:    | Amberlite® XAD-2             |
| Elutionsmittel: | Methanol                     |

#### 4.2.11 Polyamid-Festphasenextraktion

Polyamid SC-6 wird in Methanol aufgeschwemmt und quellen gelassen, bevor es luftblasenfrei in eine Glassäule (36 x 4,5 cm) gefüllt wird. Nach dem Absetzen des Materials wird die Säule mit dest. Wasser gespült. Der entsprechende Extrakt (Rotklee oder Iris) wird

mit wenigen (3-5) mL DMSO versetzt und in 10%igem Methanol gelöst. Nach Filtration wird der gelöste Extrakt auf die Festphase aus Polyamid gegeben. Die Elution erfolgt stufenweise mit wässrigem Methanol, um eine grobe Fraktionierung des Extraktes zu erhalten. Dabei wird mit 10%igem Methanol begonnen und schrittweise (um je 10%) der Methanolanteil erhöht. Nach der zehnten Fraktionierung (mit 100%igem Methanol) erfolgt die Elution mit Methanol/Aceton (1/1, V/V) sowie reinem Aceton. Die erhaltenen 12 Fraktionen werden einzeln gesammelt, das Methanol *in vacuo* entfernt und gefriergetrocknet. Bereits in der Säule bilden sich teilweise diskrete Zonen aus, welche grün-bräunlich oder gelb-bräunlich gefärbt sind (je nach verwendetem Extrakt).

#### 4.2.12 Gelchromatographie

|                        |                                       |
|------------------------|---------------------------------------|
| Säule:                 | 60 cm x 1 cm                          |
| Trennmedium:           | Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich, USA    |
| Elutionsmittel:        | Methanol                              |
| Detektor:              | Pharmacia LKB Bromma 2238 UVICORD SII |
| Detektionswellenlänge: | 276 nm                                |
| Fraktionensammler:     | Pharmacia LKB Bromma 211 Superfrac    |

Das Trennmedium („Sephadex“) wird über Nacht aufgeschlämmt und luftblasenfrei in die Glassäule gegeben. Fraktion 2 der Trennung der glykosidisch gebundenen Isoflavone aus Rotklee wird in wenig Methanol gelöst und auf die oberste Schicht der Säule gegeben (die gerade noch so mit Methanol bedeckt ist). Die Elution erfolgt mit Methanol, wobei die Tropfgeschwindigkeit 1 Tropfen/s beträgt. Die Trennung wird mittels des UV-Detektors und des Schreibers aufgezeichnet. Ebenso wird mit dem Extrakt der *Iris germanica* verfahren.

#### 4.2.13 Dünnschichtchromatographie

|                   |                                                                                                                                    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Platten:          | Kieselgel DC-Alufolien 60 F 254 (Merck)                                                                                            |
|                   | RP-18 HF 254 (Merck)                                                                                                               |
| Fließmittel (FM): | 1.) 1. Oberphase von Ethylacetat/n-Propanol/Wasser, 4/3/5, V/V/V<br>nach kurzer Aktivierung bei 65°C im Trockenschrank zusätzlich: |
|                   | 2. Oberphase von Ethylacetat/Ameisensäure/Wasser, 10/1/9, V/V/V                                                                    |
|                   | 2.) Diethylether/Ethylacetat, 1/1, V/V                                                                                             |
|                   | 3.) Chloroform/Methanol/Ameisensäure, 75/25/1, V/V/V                                                                               |
|                   | 4.) Chloroform/Methanol/Ameisensäure, 20/50/1, V/V/V                                                                               |

## 5.) n-Butanol/Essigsäure/Wasser, 4/2/5, V/V/V

Detektionsreagenz (DR):

- 1) 1. Naturstoffreagenz A (1%ige methanolische Lösung),  
2. PEG 4000 (5%ige ethanolische Lösung)
- 2) Eisen(III)-Chlorid-Lösung<sup>1</sup> (0,01 M; 0,024 g auf 10 mL EtOH)
- 3) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz<sup>1</sup> (frisch bereitete Lösung von 0,5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig unter Zusatz von 1 mL konz. Schwefelsäure). Nach Besprühen der DC-Platte auf 100-105°C erhitzt, bis bunt gefärbte Substanzflecken sichtbar werden.

<sup>1</sup> nach [Stahl, 1967]

Hauptsächlich wurden für folgende Pflanzenextrakte/Verbindungen nachstehende DC-Systeme verwendet: Soja (Kieselgel; FM: 1; DR: UV, 1), Rotklee (Kieselgel; FM: 2, 3; DR: UV, 1, 2 // RP-18; FM: 4; DR: UV, 1), Iris (Kieselgel; FM: 5; DR: UV, 1, 3), und Weintraubentrester/Stilbene (Kieselgel; FM: 3; DR: UV).

## 4.2.14 Bestimmung eines geeigneten Fließmittelsystems für die HSCCC

Für die Trennung und Isolierung der verschiedenen Verbindungen muss jeweils ein geeignetes Fließmittelsystem für die HSCCC gefunden werden. Deshalb werden Verteilungsversuche mit den unterschiedlichen Fließmittelsystemen durchgeführt und die Verteilungskoeffizienten der entsprechenden Verbindungen in den unterschiedlichen Fließmittelsystemen berechnet. Dazu werden einige Milligramm der Probe in ein Rollrandglas gegeben und mit je 2 mL der jeweils gesättigten leichten und schweren Phase des Fließmittelsystems versetzt. Die benötigte Zeit bis zur Ausbildung der vollständigen Phasentrennung wird gemessen. Von beiden Phasen wird jeweils ein Aliquot (z.B. 1 mL) entnommen und getrennt unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt. Nach der Aufnahme in einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. 50%iges Methanol) werden beide Lösungen mittels HPLC-DAD oder DC untersucht und der Verteilungskoeffizient aus den resultierenden Flächeneinheiten für die zu isolierende Verbindung berechnet (vgl. Kapitel 3.2.1). Diesbezüglich liegt der optimale Verteilungskoeffizient einer Verbindung für eine erfolgreiche Trennung mittels HSCCC zwischen ca. 0,5 und 1. Das Fließmittelsystem wird dahingehend verändert, dass der Verteilungskoeffizient der entsprechenden Verbindungen in diesem optimalen Bereich liegt. Dabei sollte die benötigte Zeit bis zur vollständigen Phasentrennung nicht mehr als 30 s betragen [Ito, 2005].

#### 4.2.15 Quantitative Bestimmungen

##### 4.2.15.1 Methodik und Probenaufarbeitung für Nahrungsergänzungsmittel mit Soja-Zusatz

Die Angabe in diesem Unterkapitel beziehen sich auf die quantitative Bestimmung von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln, welche in Kapitel 3.4.1 dargestellt wird.

###### a) Lösungen

- Extraktionslösung: 50%iges Methanol (aus Methanol und Nanopure®)
- 0,1%ige Ameisensäure
- Carrez-Lösung I: 15 g Kaliumhexacyanoferrat(II)-3-hydrat (Riedel-deHaën) gelöst in 100 mL Nanopure®
- Carrez-Lösung II: 30 g Zinksulfat-Heptahydrat (Merck) gelöst in 100 mL Nanopure®
- Kalibrierlösungen: Folgende Isoflavone werden genau auf einer Analysenwaage eingewogen, um daraus die Stammlösungen für die entsprechenden Kalibrierreihen herzustellen: Daidzin, Genistin, Glycitin, 6''-O-Acetyl-daidzin sowie 6''-O-Acetyl-genistin.

###### b) Probenaufarbeitung

Die Kapseln werden eingewogen, in Trockeneis oder flüssigem Stickstoff kurz Schock gefroren, mit einem Skalpell aufgeschnitten und der Inhalt quantitativ in einen 100 mL oder respektive in einen 50 mL Messkolben überführt. Tabletten werden ebenfalls kurz angefroren und mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert und quantitativ in einen 100 mL Messkolben überführt. Der Mörser wird anschließend mit der Extraktionslösung (50%iges Methanol) mehrfach ausgespült und die restlichen Tablettenbestandteile ebenfalls in den Messkolben geschwemmt. Unter Zugabe von 1-2 mL DMSO erfolgt durch kurzes, kräftiges Schütteln ein Anlösen der Isoflavone. Die Messkolben werden bis ca. zur Hälfte – unter Umspülen des Kolbenhalses – mit der Extraktionslösung aufgefüllt und gelinde geschüttelt. Danach werden die Kolben in ein, zuvor auf 25°C temperiertes, Ultraschallbad für 25 min verbracht. Dabei ist einem Ansteigen der Temperatur durch die entstehende Wärmeeinwirkung (Ultraschall) entgegenzuwirken, indem gegebenenfalls mit Eiswasser gekühlt wird. Gelegentlich werden die Kolben kurz geschwenkt, um ein „Verklumpen“ (oder eine Sedimentbildung) von Matrixbestandteilen an den Gefäßwänden und -böden zu vermeiden. Nach der Behandlung im Ultraschallbad erfolgt eine Klärung mit Carrez-Lösungen, wobei Proteine und andere Störstoffe aus den zu untersuchenden Extraktionslösungen ausgefällt werden. Dafür wird

zunächst je 1 mL Carrez-Lösung I in die Messkolben gegeben, kurz gewartet, und anschließend je 1 mL Carrez-Lösung II zugeführt. Nach kurzer Einwirkzeit werden die Kolben geschwenkt und mit Extraktionslösung bis zur Marke aufgefüllt. Nach kräftiger Durchmischung wird durch einen Faltenfilter filtriert und das Filtrat der ölhaltigen Proben (in der Regel sämtliche Kapseln, vereinzelt Tabletten) mit Hexan in einem kleinen Scheidetrichter ausgeschüttelt, um die vollständige Entfernung von hydrophoben Bestandteilen (gelöste Fettsäuren u.Ä.) zu erzielen. Die Hexan-Phasen werden dabei verworfen und die methanolisch-wässrige Phase membranfiltriert und analysiert. Gegebenfalls müssen Verdünnungen (je nach dem erhaltenen Isoflavon-Gehalt) hergestellt werden, wobei mit der Extraktionslösung aufgefüllt wird.

#### c) Analyse

Die Analyse der aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittel erfolgt mit dem HPLC-System I, wobei eine Detektionswellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  verwendet wurde. Die Peakzuordnung und externe Kalibrierung erfolgt mit den unter Kapitel 3.2.2 isolierten Verbindungen.

#### d) Berechnung

Die Berechnung der Isoflavon-Gehalte in den untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln erfolgt mit Hilfe der aufgestellten externen Kalibrierfunktionen der Major-Isoflavone (lineare Regression) unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsfaktoren. Die verschiedenen Nahrungsergänzungsmittel werden mehrfach (3-8fach) aufgearbeitet (siehe b) und die einzelnen Lösungen in der Regel dreifach injiziert und der Mittelwert gebildet. Diese Angabe bezieht sich auf den Gehalt in einer Kapsel oder Tablette. Für die Angabe in mg/100 g Tablette/Kapsel wird auf die Einwaage der Kapsel/Tablette bezogen und auf 100 g umgerechnet.

Für die Umrechnung des Gehaltes von Isoflavonen aus Nahrungsergänzungsmitteln in die Form der Alykone werden folgende Berechnungsfaktoren mit einbezogen: Genistein (0,6259), Daidzein (0,6115), Glycitein (0,6376).

#### e) Validierung

Unter dem Begriff „Validierung“ versteht man in der analytischen Chemie den Nachweis für die Eignung einer bestimmten Methode bei ihrer Verwendung unter bestimmten Anforderungen (z.B. eine instrumentelle Analyse mittels HPLC). Die Validierung umfasst dabei eine Reihe von Kennzahlen, statistischen Kenngrößen und Nachweisen. Dazu gehören u.a. Linearität, Robustheit, Präzision, Selektivität sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Eine Validierung erbringt den Nachweis, dass die besonderen



Anforderungen an ein Analyseverfahren für einen speziell beabsichtigten Gebrauch erfüllt worden sind [Steck, 2006].

#### e-1) Linearität und Arbeitsbereich

Unter dem Begriff Linearität wird in der analytischen Chemie die Fähigkeit einer Methode verstanden, innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs Messergebnisse zu generieren, die eine Proportionalität zu der Konzentration eines Analyten in der Probe aufweist. Zwei beliebige physikalische Variable  $x$  und  $y$  sind durch eine lineare Beziehung miteinander verknüpft. In Falle der Kalibrierfunktionen der Isoflavone aus Soja besteht demzufolge eine lineare Korrelation zwischen einer Messgröße (Konzentration des Isoflavons) und dem Messsignal (Absorptionssignal des UV-Detektors der HPLC). Rechnerisch und graphisch wird daraus eine Ausgleichsgerade (lineare Regression) ermittelt (s.u. Kalibrierfunktion 1. Ordnung). Bei der graphischen Auftragung kann eine lineare Regression als ein Anpassen einer Gerade nach der „Methode der kleinsten Quadrate“ verstanden werden [Taylor, 1988].

$$Y = Bx + A$$

dabei sind folgende Kenngrößen interessant:

- Der Achsenabschnitt  $A$  gibt an, welches Mess-Signal erhalten wird, wenn die Konzentration des Analyten gleich Null ist.
- Die Steigung  $B$  kann als ein Maß für die Empfindlichkeit der Analysenmethode verstanden werden. Je größer die Steigung, desto größer ist auch die Änderung des jeweiligen Messsignals pro Änderung der Messgröße.

Der Korrelationskoeffizient  $R$  ist ein wichtiges Kriterium für die Linearität. Er ist dabei gewissermaßen ein Gütegrad für den linearen Zusammenhang zwischen den beiden Variablen (hier: Konzentration des Analyten und Messsignal). Beide Variablen müssen dabei näherungsweise normalverteilt sein. Der Korrelationskoeffizient kann lediglich Werte zwischen  $-1$  und  $1$  annehmen, wobei eine ideale Korrelation durch den Koeffizienten  $R = \pm 1,0000$  charakterisiert wird. Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) nennt man Bestimmtheitsmaß (Determinationskoeffizient). Er gibt in erster Näherung an, wie viel % der Varianz durch die untersuchte Beziehung erklärt werden [Kromidas, 1999].

Die Linearität ist für die entwickelte Methode zur Quantifizierung von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Soja-Extrakt bewiesen. An aufeinander folgenden Tagen aufgestellte Kalibrierfunktionen waren statistisch sehr ähnlich. Die

Konzentrationsbereiche sowie die einzelnen linearen Kalibrierfunktionen sind in Tabelle 25 angegeben.

Tabelle 25: Kenndaten zur Linearität der Kalibrierreihen der Soja-Isoflavone.

|                              | GEN          | DAI          | GLY          | AC-GEN       | AC-DAI       |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| $\approx R_t$ [min]          | 11,81        | 12,62        | 19,34        | 26,91        | 37,23        |
| Kalibrierung                 | $y = A + Bx$ | $y = A + Bx$ | $y = A + Bx$ | $y = A + Bx$ | $y = A + Bx$ |
| A [w.Eh.]                    | -70252       | -74308       | 109635       | 33781        | 131653       |
| B [w.Eh.]                    | 140735       | 70560        | 34517        | 156549       | 47463        |
| Konzentrationsbereich [mg/L] | 48,7-194,8   | 26,25-210,0  | 6,0-120,0    | 2,0-47,0     | 32,36-129,5  |
| R                            | 0,9993       | 0,9969       | 0,9993       | 0,9987       | 0,9867       |
| R <sup>2</sup>               | 0,9987       | 0,9938       | 0,9987       | 0,9975       | 0,9736       |

[w.Eh.] = willkürliche Einheit

Die graphische Darstellung der Regressionsgeraden für die oben aufgeführten Isoflavone aus Soja ist unter Kapitel 3.4.1.4 dargestellt.

Die Reststandardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade. Sie wird aus der Standardabweichung und den Differenzen von Messwerten und den dazugehörigen Werten der errechneten Kalibriergeraden ermittelt.

Die Linearität ist auch abhängig von der Robustheit der Methode. Unter dem Begriff „Robustheit“ einer analytischen Methode wird ihre qualitative Fähigkeit beschrieben, durch kleine, aber bewusste Veränderungen der Methodenparameter, unbeeinflusst zu bleiben. Dies führt zu einer Aussage über die Verlässlichkeit während der normalen Anwendung, wobei als variierende Bedingungen bsp. der Anwender oder kleine Methodenparameter zu verstehen sind.

## e-2) Messungenauigkeit und Wiederholbarkeit

Die Standardabweichung beschreibt die Streuung der Werte einer Zufallsvariable um einen Mittelwert. Rechnerisch wird sie definiert als die positive Quadratwurzel der Varianz<sup>4</sup> (Gleichung s.u.) und drückt die Leistungsfähigkeit des Verfahrens aus. Zur Charakterisierung der Zuverlässigkeit der Messwerte ist die Standardabweichung  $s$  (mittlere quadratische Größe) eine gute Größenangabe [Blumenthal et al., 2006].

$$s = \sqrt{s^2}$$

Für die Berechnung der Standardabweichung muss von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden. Zur Überprüfung dessen eignet sich der Schnelltest nach David [Kromidas, 1999]. Normalverteilt sind demnach Werte, welche sich aus dem Quotient aus Spannweite  $R$  und Standardabweichung  $s$  innerhalb der von David vorgegebenen Grenzwerte befinden (s. Gleichung unten). Dabei wird als vorgegebene Wahrscheinlichkeit 99% angenommen. Die Grenzwerte sind dem Tabellenwerk von David zu entnehmen [Kromidas, 1999].

$$PG_D : \frac{\text{GrößterWert} - \text{KleinsterWert}}{s} = \frac{R}{s}$$

Der Variationskoeffizient ist eine wichtige Kenngröße in der mathematischen Statistik. Er ist definiert als die relative Standardabweichung, d.h. die Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert der Zufallsvariablen  $X$  und wird in Prozent angegeben (Gleichung unten). Der Variationskoeffizient kann als Maß für die Präzision einer Methode angesehen werden. Unter dem Begriff „Präzision“ (vormals „Wiederholgenauigkeit“) wird der Grad der Übereinstimmung von Messwerten untereinander verstanden. Als Maßstab für eine Angabe über die Präzision einer Methode (also die Streuung von Messwerten) wird die Standardabweichung  $s$  angesehen. Nach DIN 55350, Teil 13 ist die Präzision als „qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der gegenseitigen Annäherung voneinander unabhängiger Ermittlungsergebnisse bei mehrfacher Anwendung eines festgelegten Ermittlungsverfahrens unter vorgegebenen Bedingungen“ definiert. Je präziser die Methode ist, umso geringer ist die Standardabweichung bei Mehrfachbestimmungen und umso kleiner ist der lineare Arbeitsbereich [Kromidas, 1999].

<sup>4</sup> Varianz = Summe der quadrierten Abweichungen der Beobachtungswerte von ihrem arithmetischen Mittelwert dividiert durch die um 1 verminderte Anzahl an Beobachtungswerten.

$$V_K = \frac{s}{|\bar{x}|}$$

Für die ermittelte Quantifizierungsmethode von Isoflavonen aus Nahrungsergänzungsmitteln mit Soja wird die Wiederholbarkeit (inter-day precision) bestimmt. An aufeinander folgenden Tagen werden identische Proben mit demselben Verfahren, an identischem Material untersucht und deren Gehalte an Isoflavonen berechnet. Die resultierende Standardabweichung liegt unter einem Wert von 5%, womit die Wiederholbarkeit („Wiederholpräzision“ -  $RSD_r$ ) gewährleistet ist. Berechnet wird dabei die relative Standardabweichung innerhalb der Tage  $RSD_r$  (s. Gleichung unten).

$$RSD_r[\%] = \frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{x}} * 100$$

Ebenso wird die Vergleichbarkeit („Vergleichspräzision“) dieser Methode bestimmt, indem die Analyse derselben Probe mit derselben Methode in unterschiedlichen Laboratorien [Entscheidung 2002/657/EG] durchgeführt wird. Dadurch kann die Verlässlichkeit der Ergebnisse der betreffenden Methode überprüft werden. Dies ist durch die Zusammenarbeit mit dem Untersuchungsamt in München möglich, wobei die voneinander unabhängig ermittelten Isoflavon-Gehalte in den unterschiedlichen Nahrungsergänzungsmitteln mit Soja-Zusatz miteinander verglichen werden können. Die Vergleichsvarianz wird häufig auch Reproduzierbarkeit genannt und kann nur anhand von QC-Proben der verschiedenen Labors (z.B. Ringuntersuchungen) bestimmt, jedoch nicht konkret berechnet werden.

Die statistische Streuung der Einzelwerte unterliegt oft einer Normalverteilung - welche sich mittels einer Gaußkurve ausdrücken lässt - (s. Gleichung unten und Gleichung für die Standardabweichung). Aufgrund von Fehlern bei der Erstellung einer Kalibrierung (z.B. Anzahl der Proben oder Empfindlichkeit des Verfahrens) kommt das Fehlerfortpflanzungsgesetz zum Tragen. Dadurch kann ein Prognoseintervall (95% Konfidenzintervall) aufgestellt werden, in dem mit statistischer Sicherheit die „wahre Kalibrierkurve“ liegen wird [Taylor, 1988]. Für die in dieser Arbeit durchgeführte Quantifizierung wird dieses Intervall jedoch vernachlässigt, zumal die Kalibrierfunktionen eine gute Linearität zeigten.

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Die Differenz, welche im Falle von Doppelbestimmungen zwischen den Einzelwerten akzeptiert werden kann, wird durch die Wiederholgrenze  $r$  bestimmt (Gleichung unten)

[Kromidas, 1999, S. 73]. Oftmals wird ein Signifikanzniveau<sup>5</sup> von 95% angenommen. Das bedeutet, dass 95% aller ermittelten Messwerte innerhalb der Messungenauigkeit liegen, worüber sich der Vertrauensbereich definierten lässt.

$$Q = \frac{x_1 - \bar{x}}{s}$$

Zur Überprüfung von Ausreißern kann der Grubbs-Test angewendet werden [Ermer und Miller, 2005]. Hierbei wird geprüft, ob ein Wert mit einer starken Abweichung ein Ausreißer ist. Dieser berechnete Wert (vgl. Gleichung oben) kann mit der „Grubbs-Tabelle“ verglichen werden und gilt als Ausreißer, sobald die berechnete Größe größer ist als der Wert in der Tabelle. Dabei wird von einem Signifikanzniveau von 99% ausgegangen. Die folgende Tabelle 26 liefert eine Übersicht über eine Probe, welche sechsmal aufgearbeitet, und daraus die relevanten Parameter berechnet wurden.

Tabelle 26: Grubbs-Tabelle zur Quantifizierung von Soja-Isoflavonen.

|    | Gesamt | GEN   | DAI   | GLY   | AC-GEN | AC-DAI |
|----|--------|-------|-------|-------|--------|--------|
| E1 | 0,445  | 0,615 | 0,527 | 0,311 | 0,227  | 0,466  |
| E2 | 0,595  | 0,418 | 0,783 | 0,532 | 0,781  | 0,515  |
| E3 | 0,321  | 0,137 | 0,426 | 0,278 | 0,352  | 0,801  |
| E4 | 0,225  | 0,523 | 0,084 | 0,299 | 0,698  | 0,589  |
| E5 | 0,482  | 0,587 | 0,352 | 0,738 | 0,421  | 0,874  |
| E6 | 0,251  | 0,329 | 0,810 | 0,641 | 0,311  | 0,365  |

Die Werte liegen alle unterhalb des P-Wertes von 1,944 und gelten damit nicht als Ausreißer.

Die Richtigkeit (vormals „Treffgenauigkeit“) ist die Abweichung vom wahren Wert durch systematische Fehler<sup>6</sup>. Darunter wird das Maß der Übereinstimmung zwischen den

<sup>5</sup> Damit wird die relative Sicherheit für eine statistische Entscheidung bezeichnet.

<sup>6</sup> Unter einem systematischen Fehler versteht man die konstante Differenz zwischen dem richtigen und aus der Messung erhaltenen Mittelwert.

ermittelten Werten und einem als richtig angesehenen Wert (wahrer Wert) verstanden. Ein quantitatives Maß für die Richtigkeit ist die systematische Ergebnisabweichung. Das Ausmaß wird in der Regel in Form eines systematischen Fehlers (Bias) ausgedrückt [Peters et al., 1998].

$$Bias[\%] = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} * 100\%$$

Die Ermittlung der Richtigkeit erfolgt durch eine Doppelbestimmung von 5 unabhängigen Verdünnungen der entsprechenden Probelösung des jeweiligen Isoflavons. Es erfolgte die Berechnung mittels linearer Regression mit einem externen Standard. Zur Berechnung werden die Mittelwerte der Gehaltswerte herangezogen.

Die hergestellten Stammlösungen der Standards wurden gekühlt bei -18°C unter Lichtausschluss in dem Zeitraum von Juli 2005 bis April 2006 aufbewahrt. Die Konzentrationen der einzelnen Lösungen wurden von Zeit zu Zeit überprüft. Die Stammlösungen aus Soja sind unter diesen Bedingungen haltbar (Tabelle 27). Dies gilt jedoch nur bedingt für konzentrierte Lösungen aus acetylierten Isoflavonen.

Tabelle 27: Lagerversuch der Stammlösungen

|            | Daidzin (FE) | Genistin (FE) | Glycitin (FE) | 6''-O-Acetyl-daidzin (FE) |
|------------|--------------|---------------|---------------|---------------------------|
| April 2006 | 15786258     | 27896540      | 5103758       | 6389109                   |
| Juli 2005  | 14893192     | 26820038      | 4591035       | 6287565                   |
| Quotient   | 1,05         | 1,04          | 1,11          | 1,01                      |

FE = Flächeneinheiten

Der Begriff „Selektivität“ einer Methode beschreibt die Fähigkeit, mehrere verschiedenartige Komponenten nebeneinander zu erfassen und zu identifizieren, ohne dass eine Interferenz dieser Komponenten untereinander auftritt. Eine selektive Methode liefert richtige Ergebnisse für alle interessanten Komponenten.

Für die entwickelte Methode zur „Quantifizierung von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Soja-Extrakten“ ist die Selektivität gegeben. Die einzelnen Peaks der HPLC-Bestimmungen eines Nahrungsergänzungsmittels werden auf

ihre Reinheit hin überprüft, indem die UV-Spuren der Dioden-Array-Detektion vermessen werden. Es zeigen sich keine Co-Elutionen, Verunreinigungen oder Zersetzungsprodukte bei der Betrachtung der einzelnen Peaks (Abbildung 92). Die Profile („Fingerprints“) des Nahrungsergänzungsmittels werden dabei mit denen der einzelnen Standards verglichen.

#### e-3) Wiederfindung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die absolute Wiederfindung (Wiederfindungsrate) ist definiert als kompletter Transfer des Analyten von der Matrix in die zu vermessene Probelösung. Durch die EU-Entscheidung 2002/657/EG wird der Begriff „Wiederfindung“ als der Prozentsatz der wahren Konzentration eines Stoffes, der beim Analyseverfahren wiedergefunden wird, bezeichnet („W“). Er lässt sich auf folgende Weise berechnen:

$$W = \frac{\bar{x}}{x_R} * 100\%.$$

Ein idealer Wert für die Wiederfindung ist 100%.

Um die Funktionalität der entwickelten HPLC-Methode zu überprüfen und die Wiederfindung zu ermitteln, wird ein Aufstockungsexperiment („spiken“) mit einer aufgearbeiteten Probe eines Nahrungsergänzungsmittels mit Zusatz von Soja-Extrakt, durchgeführt. Dabei wird der Gehalt eines in der Probe enthaltenen Isoflavons durch Zugabe des entsprechenden Standards erhöht („aufgestockt“). Damit soll die Löslichkeit aus der komplexen Matrix gewährleistet und überprüft werden. Auf diese Weise werden die beiden Isoflavone Daidzin und Genistin in genau definierten Mengen zu den entsprechenden Proben gegeben und die Wiederfindung berechnet. Ein für eine Wiederfindung geeigneter Standard sollte möglichst ähnliche Eigenschaften wie die zu quantifizierenden Isoflavone besitzen und mit dem unter Kapitel 3.4.2 beschriebenen chromatographischen System gut zu analysieren sein. Unter Verwendung des Isoflavons Ononin aus Rotklee als internen Standard ist dieses gewährleistet. Es handelt sich dabei um ein Glykosid, welches von der Soja-Pflanze nicht gebildet wird. Unter Verwendung der beschriebenen HPLC-Bedingungen hat Ononin eine Retentionszeit von ca. 32 Minuten – dies ist ein Bereich, in dem keine Elution eines Soja-Isoflavons zu erwarten ist (s. Abbildung 115).

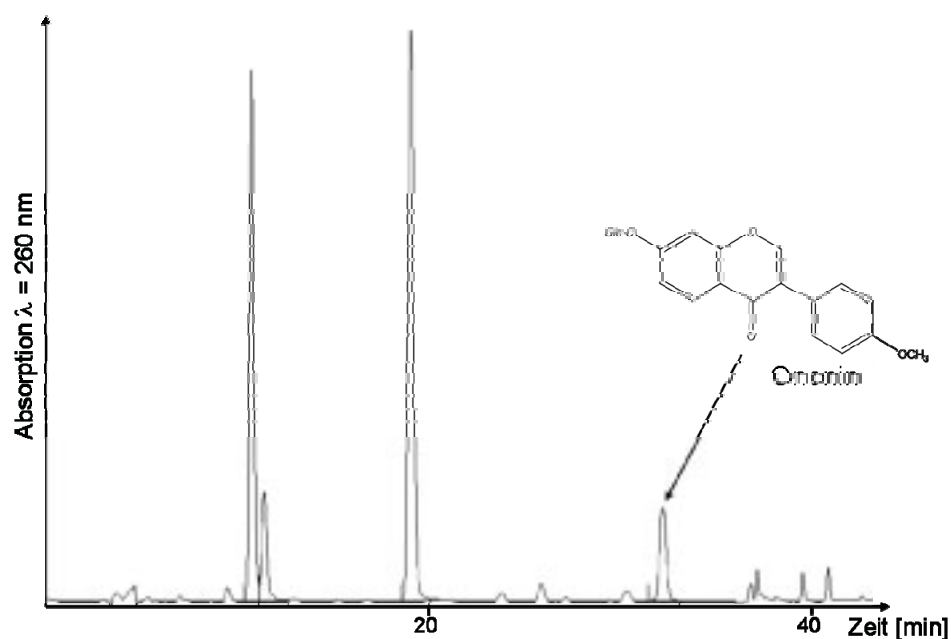


Abbildung 115: HPLC-Chromatogramm der Wiederfindung mit Ononin

Dabei wird die Probe mitsamt dem internen Standard wie unter Kapitel 3.4.1.1 beschrieben aufgearbeitet und mittels HPLC vermessen. Die Berechnung erfolgt anhand einer Einpunktkalibrierung mit Ononin, welches in definierter Konzentration im Extraktionsmittel Methanol/Wasser (1/1, V/V) gelöst wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Wiederfindung  $100 \pm 5\%$  beträgt. Davon ausgehend kann die Aussage getroffen werden, dass während der Aufarbeitung des Nahrungsergänzungsmittels keine größeren Verluste des Analyten auftreten und sich die Extraktionsmethode als geeignet darstellt.

Da das Isoflavon Ononin nicht im Handel erhältlich ist, wird nach einer anderen Verbindung gesucht, mit der eine Wiederfindung vorgenommen werden kann oder die als interne Standardverbindung zu den Nahrungsergänzungsmitteln bei der Aufarbeitung gegeben werden kann. Kommerziell erhältlich und strukturell ähnlich sind die pHB-Ester. Sie dürfen nicht zur Konservierung von Nahrungsergänzungsmitteln in Tabletten- oder Kapselform verwendet werden, weshalb eine Verwendung als interner Standard möglich ist. Eine geeignete Retentionszeit weist para-Hydroxybenzoesäuremethylester mit  $R_t = 29,8 \text{ min}$  auf. Dieser Ester wurde einerseits als feste Probe in die Messkolben vor der Aufarbeitung der Nahrungsergänzungsmittel-Proben eingewogen, andererseits der Extraktionslösung als ein bestimmtes Volumen einer Lösung genau definierter Konzentration zugegeben. Die Wiederfindung bei Zugabe des gelösten pHB-Esters liegt bei 96%. Unter Zugabe als festen Standard erfolgt eine größere Abweichung nach oben und unten, was an der jeweiligen Matrix liegen kann.



Die Nachweisgrenze ist der niedrigste Messwert, aus dem mit definierter statistischer Sicherheit auf die Anwesenheit des Analyten geschlossen werden kann. Dieser niedrigste Messwert gilt als nachgewiesen, wenn das Signal des Analyten sich signifikant vom Leerwert unterscheidet. Besitzt eine Probe genau diesen Gehalt des Analyten, so ist es in 50% aller Fälle wahrscheinlich, dass der konkrete Messwert kleiner ist als die Nachweisgrenze. Die Nachweisgrenze sowie die Bestimmungsgrenze werden in der DIN 32645 definiert.

Die Bestimmungsgrenze („Grenze der Quantifizierung“) ist die kleinste Konzentration eines Analyten, die quantitativ mit einer festgelegten Präzision bestimmt werden kann. Erst oberhalb der Bestimmungsgrenze werden quantitative Analysenergebnisse angegeben. Die Bestimmungsgrenze entspricht grob genähert der dreifachen Nachweisgrenze und hat eine höhere Genauigkeit als die Nachweisgrenze.

Es erfolgt eine graphische Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die verwendeten Standards aus Soja. Dazu wird eine Lösung des jeweiligen Standards stark verdünnt und über das Signal/Rauschverhältnis (S/N) von 3:1 die Nachweisgrenze bestimmt. Für die Bestimmungsgrenze wird von einem Verhältnis von 9:1 ausgegangen, wobei in vielen DIN-Vorschriften auf 10:1 verwiesen wird.

Für die Isoflavone aus Soja sind die entsprechenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Soja-Isoflavone

|                    | Daidzin    | Genistin   | Glycitin   | 6''-O-Acetyl-daidzin |
|--------------------|------------|------------|------------|----------------------|
| Nachweisgrenze     | 161,3 µg/L | 179,2 µg/L | 539,5 µg/L | 618,9 µg/L           |
| Bestimmungsgrenze* | 1,61 mg/L  | 1,79 mg/L  | 5,39 mg/L  | 6,19 mg/L            |

\*10fache Nachweisgrenze, nach DIN 32645

#### 4.2.15.2 Methodik und Probenaufarbeitung für Nahrungsergänzungsmittel mit Rotklee-Extrakt

##### a) Lösungen

- Extraktionslösung: 50%iges Ethanol (aus Ethanol und Nanopure®)
- 0,1%ige Ameisensäure

- Carrez-Lösung I: 15 g Kaliumhexacyanoferrat(II)-3-hydrat (Riedel-deHaën) gelöst in 100 mL Nanopure®
- Carrez-Lösung II: 30 g Zinksulfat-Heptahydrat (Merck) gelöst in 100 mL Nanopure®
- Kalibrierlösungen: Folgende Isoflavone werden genau auf einer Analysenwaage eingewogen, um daraus die Stammlösungen für die entsprechenden Kalibrierreihen herzustellen: Formononetin, Biochanin A und Irlon.

#### b) Extraktionsmittel und –dauer

Zur Bestimmung des optimalen Extraktionsmittels sowie eines geeigneten Zeitraumes für die Extraktion werden 5 Tabletten eines Nahrungsergänzungsmittels mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert und homogenisiert. Je 0,5 g davon werden in einen 50 mL Messkolben eingewogen und mit 1 mL DMSO versetzt, bevor der Kolben mit der jeweiligen Extraktionslösung (wässriges Methanol oder wässriges Ethanol) etwa zu  $\frac{3}{4}$  aufgefüllt wird. Die Kolben werden in ein Ultraschallbad verbracht, welches eine konstante Temperatur von 25°C aufweisen sollte (Kühlung erforderlich). Nach der Dauer von 30 min werden die Kolben aus dem Ultraschallbad entnommen und unter leichtem Schwenken je 1 mL Carrez-I- und Carrez-II-Lösung hinzugefügt. Nach kurzer Standzeit werden die Kolben mit den jeweils entsprechenden Extraktionslösungen bis zur Marke aufgefüllt und kräftig geschüttelt. Die Suspensionen werden filtriert und das klare Filtrat mit Hexan entfettet. Die auf diese Weise hergestellten Extraktionslösungen werden bis zu ihrer HPLC-Analyse kühl gelagert. Bei der Ermittlung der optimalen Extraktionsdauer wird genauso verfahren. Jedoch wird hierbei als Extraktionsmittel ausschließlich 50%iges Ethanol verwendet und die Verweilzeiten im Ultraschallbad von über einen Zeitraum 10-60 min variiert.

#### c) Probenaufarbeitung

Die Kapseln werden eingewogen, in Trockeneis oder flüssigem Stickstoff kurz Schock gefroren, mit einem Skalpell aufgeschnitten und der Inhalt quantitativ in einen 100 mL oder respektive in einen 50 mL Messkolben überführt. Tabletten werden ebenfalls kurz angefroren und mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert und quantitativ in einen 100 mL Messkolben überführt. Der Mörser wird anschließend mit der Extraktionslösung (50%iges Ethanol) mehrfach ausgespült und die restlichen Tablettenbestandteile ebenfalls in den Messkolben geschwemmt. Unter Zugabe von 1-2 mL DMSO erfolgt durch kurzes, kräftiges Schütteln ein Anlösen der Isoflavone. Die Messkolben werden bis ca. zur Hälfte – unter Umspülen des Kolbenhalses – mit der Extraktionslösung aufgefüllt und gelinde geschüttelt. Danach werden die Kolben in ein, zuvor auf 25°C temperiertes, Ultraschallbad für 30 min verbracht. Dabei ist einem Ansteigen der Temperatur durch die entstehende Wärmeeinwirkung (Ultraschall)

entgegenzuwirken, indem gegebenenfalls mit Eiswasser gekühlt wird. Gelegentlich werden die Kolben kurz geschwenkt, um ein „Verklumpen“ (oder eine Sedimentbildung) von Matrixbestandteilen an den Gefäßwänden und -böden zu vermeiden. Nach der Behandlung im Ultraschallbad erfolgt eine Klärung mit Carrez-Lösungen, wobei Proteine und andere Störstoffe aus den zu untersuchenden Extraktionslösungen ausgefällt werden. Dafür wird zunächst je 1 mL Carrez-Lösung I in die Messkolben gegeben, kurz gewartet, und anschließend je 1 mL Carrez-Lösung II zugeführt. Nach kurzer Einwirkzeit werden die Kolben geschwenkt und mit Extraktionslösung bis zur Marke aufgefüllt. Nach kräftiger Durchmischung wird durch einen Faltenfilter filtriert und das Filtrat der ölhaltigen Proben (in der Regel sämtliche Kapseln, vereinzelt Tabletten) mit Hexan in einem kleinen Scheidetrichter ausgeschüttelt, um die vollständige Entfernung von hydrophoben Bestandteilen (gelöste Fettsäuren u.Ä.) zu erzielen. Die Hexan-Phasen werden dabei verworfen und die methanolisch-wässrige Phase membranfiltriert und analysiert. Gegebenfalls müssen Verdünnungen (je nach dem erhaltenen Isoflavon-Gehalt) hergestellt werden, wobei mit der Extraktionslösung aufgefüllt wird.

#### d) Analyse

Die Analyse der aufgearbeiteten Nahrungsergänzungsmittel mit Rotklee-Extrakt erfolgt mittels HPLC-System II, wobei eine Detektionswellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  verwendet wurde. Die Peakzuordnung und externe Kalibrierung erfolgt mit den unter Kapitel 3.2.2 isolierten Verbindungen. Darüber hinaus wird die Identität der einzelnen Peaks im jeweils untersuchten NEM mit Hilfe von LC-MS<sup>n</sup>-Analysen bestätigt (HPLC-System VI).

#### e) Berechnung

Die Berechnung der Isoflavon-Gehalte in den untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln erfolgt mit Hilfe der aufgestellten externen Kalibrierfunktionen der Major-Isoflavone (lineare Regression) unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsfaktoren. Dazu werden Kalibrierfunktionen von Formononetin, Biochanin A und Irilon aufgestellt. Die verschiedenen Nahrungsergänzungsmittel werden mehrfach (3-5fach) aufgearbeitet und die einzelnen Lösungen dreimal injiziert und aus den berechneten Werten der Mittelwert gebildet. Diese Angabe bezieht sich auf den Gehalt in einer Kapsel oder Tablette.

#### 4.2.16 Screening von Trifolium-Proben und verschiedener Klee-Arten

Das entsprechende Pflanzenmaterial wird nach der Ernte direkt gekühlt gelagert. Nach der Zugabe von 50%igem Ethanol wird es grob zerkleinert, bevor mit dem Ultraturrax® fein gestückelt wird. Unter Verwendung des 50%igem Ethanols konnte in Vorversuchen das

vielfältigste Spektrum an Isoflavonen aus Rotklee (*Trifolium pratense*) gewonnen werden. Anschließend wird für 30 min gerührt, bevor der jeweilige Pflanzenextrakt filtriert und analysiert wird.

#### 4.2.17 Biologische Evaluierungen

##### 4.2.17.1 Zytotoxizität

###### a) Materialien und Chemikalien

- *Artemia salina* (Brine Shrimp) Eier: Artemia - Salinenkrebseier zur Aufzucht von Lebendfutter für Zierfische (Zoo-Lehnig, Braunschweig)
- Meersalz für künstliches Meerwasser (Zoo-Lehnig, Braunschweig)
- Wasser (HPLC-Qualität)
- Trockenhefe (Dr. Oetker)
- Antibiotika-Testplättchen (Schleicher & Schüll, Ø 9 mm)
- Aquariumpumpe (Lapis Membranpumpe, Hi-Tech 1500, 100 L/h, 0,15 bar)
- Wasserbad (temperiert)
- Referenztoxin: Podophyllotoxin (Fluka, Reinheit  $\geq 98\%$ )

###### b) Aufzucht und Ausbrüten der Salinenkrebs-Eier

Es werden 80 mL künstliches Meerwasser (3,2%ig) hergestellt, wozu 2,56 g Meersalz in 80 mL HPLC-Wasser gelöst werden. Zu dieser Lösung werden 50 mg der Eier von *Artemia salina* eingewogen und bei 23°C in einem Wasserbad unter Beleuchtung temperiert. Durch schwaches Einblasen von Luft mittels einer Aquariumpumpe werden die Eier in Bewegung gehalten. Die Brutzeit der Eier beträgt unter diesen Bedingungen 24-48 Stunden, nach welcher die Nauplien schlüpfen. Mit Hilfe einer Pasteurpipette werden nach der Schlupfzeit von 36 h jeweils 10 Nauplien in ein Probegläschen (runde Gläschen mit einem Durchmesser von 1,2 cm und einer Höhe von 4,3 cm) eingezählt. Die Probegläschen werden zuvor mit 3 mL einer frisch hergestellten 3,2%igen Meersalz-Wasser-Lösung befüllt. In jedes Probegläschen werden zusätzlich 3 Tropfen einer Hefelösung pipettiert, welche durch Lösen von 3 mg Trockenhefe in 5 mL 3,2%iger Meersalz-Wasser-Lösung hergestellt wurde. Die Hefelösung dient als Nahrung für die Nauplien.

### c) Vorbereitung der Test-und Vergleichsubstanzen

Mit dem Brine Shrimp-Assay werden eine Reihe von pflanzlichen Rohextrakten (Soja, Rotklee, Iris und Quinoa), sowie Reinsubstanzen (Genistin, Daidzin, Glycitin, Biochanin A, Formononetin, Irilon) getestet. Dazu werden 11 mg (bei dem halben Konzentrationsansatz entsprechend 5,5 mg) der zu untersuchenden Substanz oder des Extraktes exakt eingewogen und in 1100  $\mu\text{L}$  eines geeigneten Lösungsmittels (Methanol/DMSO (1/1, V/V), Methanol/Aceton (1/1, V/V), DMSO/Aceton (1/1, V/V) und Methanol/Aceton/DMSO (7/2/1, V/V/V) gelöst (Lösung **A**, mit der Konzentration von 1 mg/100  $\mu\text{L}$ ). Daraus wird die Verdünnung **B** hergestellt, indem 100  $\mu\text{L}$  Lösung **A** entnommen werden und mit 900  $\mu\text{L}$  des Lösungsmittels verdünnt werden (Lösung **B** mit der Konzentration von 0,1 mg/100  $\mu\text{L}$ ). Hinsichtlich der statistischen Genauigkeit wird mit allen zu untersuchenden Substanzen/Extrakten eine Fünffachbestimmung in drei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Dazu werden auf je 5 Antibiotika-Testplättchen 30  $\mu\text{L}$  Lösung **B**, 30  $\mu\text{L}$  Lösung **A** und 150  $\mu\text{L}$  Lösung **A** aufgegeben. (Im Falle des geringeren Konzentrationsansatzes für die beiden Reinsubstanzen Biochanin A und Irilon werden folgende Konzentrationen aufgetragen: 10  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , sowie 250  $\mu\text{g/mL}$ ). Dabei müssen die Antibiotika-Testplättchen nach jedem Auftragen getrocknet werden. Nach kompletter Aufgabe der zu testenden Substanzen werden diese Plättchen zwischen 12 und 24 h getrocknet (s. Abbildung 116).



Abbildung 116: Getrocknete Antibiotika-Testplättchen für den Brine Shrimp-Assay.

### d) Durchführung

Die getrockneten Antibiotika-Testplättchen (mit den jeweils darauf anhaftenden Testsubstanzen) werden in jeweils ein vorbereitetes Probengläschen (mit dem darin befindlichen Meerwasser, den Nauplien und der Hefelösung) mit Hilfe einer Pipette überführt. Bezogen auf die jeweils vorgelegten 3 mL Meersalzwasser-Lösung in jedem Probengläschen werden die Konzentrationen von 10  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  und 500  $\mu\text{g/mL}$  der jeweiligen Substanzen in den entsprechenden Probengläschen erhalten. Als externer Standard wird in denselben Konzentrationen das Lignan Podophyllotoxin in gleicher Weise mitgeführt, wobei

das jeweilige Lösungsmittel der Probe verwendet wird. Als Blindwert für diesen Test werden Antibiotika-Testplättchen mit dem entsprechenden Lösungsmittel getränkt und ebenfalls nach dem Trocknen in die dafür vorgesehenen Probegläschen gegeben. Alle Probegläschen eines Testansatzes werden unter künstlicher Beleuchtung bei 23°C für 24 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden die noch lebenden oder die abgestorbenen Brine Shrimps Nauplien in jedem Probegläschen ausgezählt.

#### e) Auswertung

Zur Auswertung des Brine Shrimp-Assays werden die prozentualen Absterberaten berechnet. Dazu wird jeweils von der Zahl der im Test abgestorbenen Brine Shrimps die Menge der natürlich abgestorbenen Nauplien im Blindwert subtrahiert und dividiert durch die Summe der lebenden im Leerwert und mit dem Faktor 100 multipliziert.

$$Absterberate = \frac{S_{abgestorbeneShrimps} - B_{abgestorbeneShrimps}}{B_{lebendeShrimps}} * 100$$

#### f) Ergebnisse

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse der durchgeführten Brine Shrimp-Assays wird unter Kapitel 3.6.1 aufgeführt. Tabellarisch sind diese Ergebnisse im Folgenden dargestellt. Dabei ist darauf zu achten, dass jeweils ein Mittelwert aus den zu einer Testreihe gehörenden Werten gebildet wird.

## - pflanzliche Rohextrakte:

Tabelle 29: Ergebnisse der Rohextrakte zur Prüfung der Zytotoxizität im Brine Shrimp Bioassay.

| Extrakt                            | Absterberate nach 24 h [in %] |           |           |
|------------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|
|                                    | 10 µg/mL                      | 100 µg/mL | 500 µg/mL |
| Soja XAD-7 <sup>1</sup>            | 4,35                          | 2,08      | 4,35      |
| Rotklee XAD-7, II. <sup>4</sup>    | 0                             | 0         | 4,08      |
| Iris XAD-7, II. <sup>3</sup>       | 0                             | 0         | 2,17      |
| Kudzu, XAD-7 <sup>3</sup>          | 0                             | 0         | 0         |
| Quinoa, EtOAc-Extrakt <sup>2</sup> | 0                             | 0         | 8,16      |

<sup>1</sup> Lösungsmittel: DMSO/MeOH 1/1 (V/V); <sup>2</sup> Lösungsmittel: DMSO/Aceton 1/1 (V/V); <sup>3</sup> Lösungsmittel: MeOH; <sup>4</sup> Lösungsmittel: MeOH/Aceton/DMSO 7/2/1 (V/V/V)

## - Reinsubstanzen:

Tabelle 30: Ergebnisse der Reinsubstanzen zur Prüfung der Zytotoxizität im Brine Shrimp Bioassay

| Reinsubstanz              | Absterberate nach 24 h [%] |           |           |           |
|---------------------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                           | 10 µg/mL                   | 100 µg/mL | 250 µg/mL | 500 µg/mL |
| Genistin <sup>1</sup>     | 0                          | 4,17      | -         | 0         |
| Daidzin <sup>1</sup>      | 0                          | 0         | -         | 0         |
| Glycitin <sup>1</sup>     | 0                          | 0         | -         | 0         |
| Formononetin <sup>2</sup> | 0                          | 0         | -         | 6,12      |
| Biochanin A <sup>2</sup>  | 0                          | 0         | -         | -         |
| Irilon <sup>2</sup>       | 6,12                       | 2,08      | 8,33      | -         |

<sup>1</sup> Lösungsmittel: DMSO/Aceton 1/1 (V/V); <sup>2</sup> Lösungsmittel: DMSO/MeOH 1/1 (V/V); - bedeutet, dass diese Konzentration für die betreffende Substanz nicht getestet wurde.

#### 4.2.17.2 Antioxidatives Potential mittels TEAC-Test

##### a) Lösungen:

- Testlösungen: Von den zu untersuchenden Pflanzenextrakten und Testsubstanzen (isolierte Isoflavone) werden jeweils 1-3 mg genau in einen Messkolben (5 mL) eingewogen. Für die Herstellung von Probelösungen werden die Testsubstanzen in 1/10 des nötigen Volumens mit DMSO angelöst und der Messkolben mit einem geeigneten Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, verdünnte methanolische oder ethanolische Lösungen) bis zur Marke aufgefüllt.
- Trolox<sup>®</sup>-Stammlösung: In einen 5 mL Messkolben werden 12,25 mg Trolox<sup>®</sup> eingewogen und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt.
- Trolox<sup>®</sup>-Kalibrierlösungen: Von der hergestellten Trolox<sup>®</sup>-Stammlösung werden jeweils 250, 500, 750 und 1000 µL in einen 5 mL Messkolben pipettiert und mit Ethanol bis zur Marke aufgefüllt (resultierender Konzentrationsbereich: 0,5 – 2,0 mmol/L Trolox<sup>®</sup>).
- ABTS<sup>•+</sup>-Stammlösung: In einen dunklen Erlenmeyerkolben mit Schliff werden 38,43 mg ABTS und 6,90 mg Kaliumpersulfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) eingewogen und mit 10 mL demineralisiertem Wasser versetzt. Diese Lösung wird mindestens 12 Stunden ruhen gelassen, bevor sie verwendet wird. Innerhalb dieser Zeitspanne kann sich das ABTS<sup>•+</sup>-Radikal bilden.
- ABTS<sup>•+</sup>-Arbeitslösung: Die hergestellte ABTS<sup>•+</sup>-Stammlösung wird mit Ethanol soweit verdünnt, bis eine Extinktion von ca. 0,7 photometrisch zu erkennen ist.

##### b) Durchführung:

Von der ABTS<sup>•+</sup>-Arbeitslösung werden jeweils 1 mL in eine Semiküvette pipettiert und die Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 734 \text{ nm}$  zur Bestimmung des Leerwertes gemessen (Leerwert E1). Dazu wird jeweils 20 µL Ethanol, Trolox<sup>®</sup>-Kalibrierlösung bzw. verdünnte Testlösung gegeben. Nach guter Durchmischung der Probelösungen wird exakt nach 6 min Reaktionszeit die Extinktion (E2) bei  $\lambda = 734 \text{ nm}$  gemessen. Dies erfolgt bei Raumtemperatur.

##### c) Berechnung:

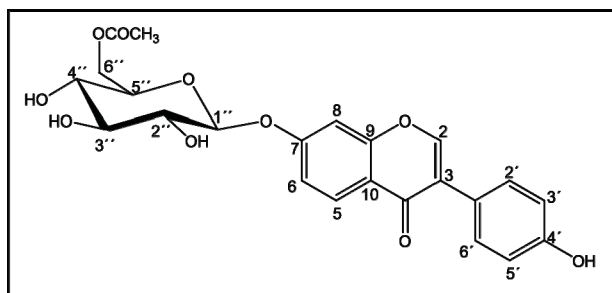
Vom Leerwert E1 wird die Extinktion E2 subtrahiert, um die Differenz beider Extinktionen zu erhalten ( $\Delta E$ ). Die Differenz aus  $\Delta E_{\text{Standard/Probe}}$  und  $\Delta E_{\text{Blindwert}}$  wird ebenfalls gebildet. Die erhaltenen Extinktionsdifferenzen für die Standardlösung werden graphisch gegen die Konzentration aufgetragen. Die durch lineare Regression erhaltene Geradengleichung wird



zur Berechnung der antioxidativen Aktivität der jeweiligen Testsubstanz bzw. des Pflanzenextraktes herangezogen.

### 4.3 Physikalisch-chemische Charakterisierung der isolierten Verbindungen

6''-O-Acetyl-daidzin (Daidzein-7-O-β-D-glucosid-6''-O-acetat)



Herkunft: Soja.

Summenformel:  $C_{23}H_{22}O_{10}$ .

Molekülmasse: 458,42 g/mol.

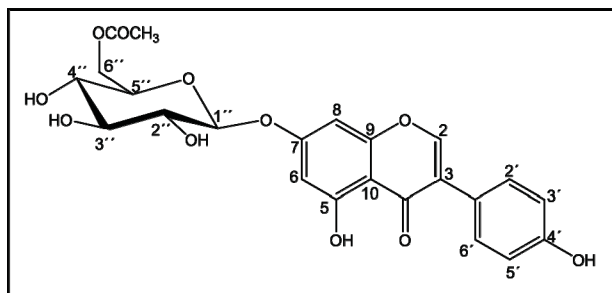
UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\max} = 251 \text{ nm}$ .

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 459 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 255$   $[M + H - \text{Anhydroacetylglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.01 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-CO}$ ); 3.15-3.38 (3H, m,  $\text{H2''/H3''/H4''}$ ); 3.71-3.77 (1H, m,  $\text{H5''}$ ); 4.07 (1H, m,  $\text{H6a''}$ ); 4.34 (1H, m,  $\text{H6b''}$ ); 5.14 (1H, d,  $J = 7.5 \text{ Hz}$ ,  $\text{H1''}$ ); 5.18 (1H, d,  $J = 7.5 \text{ Hz}$ , Zucker-OH); 5.28 (1H, d,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ , Zucker-OH); 5.45 (1H, d,  $J = 4.0 \text{ Hz}$ , Zucker-OH); 6.84 (2H, m,  $\text{H3'/H5'}$ ); 7.13 (1H, dd,  $J_1 = 9.0 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 2.0 \text{ Hz}$ , H6); 7.21 (1H, d,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ , H8); 7.40 (2H, m,  $\text{H2'/H6'}$ ); 8.05 (1H, d,  $J = 9.0 \text{ Hz}$ , H5); 8.36 (1H, s, H2); 9.48 (1H, s,  $4'\text{-OH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 20.5 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ); 63.2 ( $\text{C6''}$ ); 69.7 ( $\text{C4''}$ ); 73.0 ( $\text{C2''}$ ); 73.7 ( $\text{C3''}$ ); 76.2 ( $\text{C5''}$ ); 99.7 ( $\text{C1''}$ ); 103.4 (C8); 114.9 ( $\text{C3'/C5'}$ ); 115.4 (C6); 118.5 (C10); 122.2 ( $\text{C1'}$ ); 123.7 (C3); 126.9 (C5); 129.9 ( $\text{C2'/C6'}$ ); 153.2 (C2); 156.9 ( $\text{C4'}$ ); 157.2 (C9); 161.1 (C7); 170.1 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ); 174.6 (C4).

## 6''-O-Acetyl-genistin (Genistein-7-O-β-D-glucosid-6''-O-acetat)



Herkunft: Soja.

Summenformel:  $C_{23}H_{22}O_{11}$ .

Molekülmasse: 474,42 g/mol.

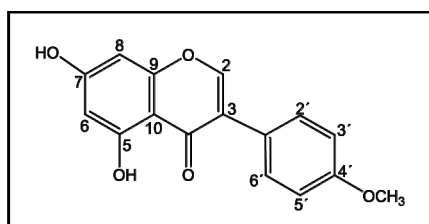
UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\max} = 259$  und 313 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 475 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 271$   $[M + H - \text{Anhydroacetylglucose}]^+$ .

$^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.01 (3H, s,  $\underline{CH_3}$ -CO); 3.13-3.32 (3H, m,  $H_{2''}/H_{3''}/H_{4''}$ ); 3.69-3.76 (1H, m,  $H_{5''}$ ); 4.06 (1H, m,  $H_{6a''}$ ); 4.31 (1H, m,  $H_{6b''}$ ); 5.10 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $H_{1''}$ ); 5.17 (1H, d,  $J = 3.5$  Hz, Zucker-OH); 5.27 (1H, d,  $J = 5.5$  Hz, Zucker-OH); 5.42 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz, Zucker-OH); 6.47 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H6); 6.69 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H8); 6.82 (2H, m,  $H_{3'}/H_{5'}$ ); 7.39 (2H, m,  $H_{2'}/H_{6'}$ ); 8.40 (1H, s, H2); 9.55 (1H, s,  $4'-OH$ ); 12.90 (1H, s<sub>br</sub>,  $5-OH$ ).

$^{13}C$ -NMR (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 20.5 ( $\underline{CH_3}$ -CO); 63.2 ( $C_{6''}$ ); 69.8 ( $C_{4''}$ ); 72.9 ( $C_{2''}$ ); 73.7 ( $C_{3''}$ ); 76.1 ( $C_{5''}$ ); 94.5 (C8); 99.4 (C6); 99.5 ( $C_{1''}$ ); 106.1 (C10); 115.0 ( $C_{3'}/C_{5'}$ ); 120.9 (C3); 122.5 ( $C_{1'}$ ); 130.0 ( $C_{2'}/C_{6'}$ ); 154.5 (C2); 157.1 (C9); 157.4 ( $C_{4'}$ ); 161.6 (C5); 162.7 (C7); 170.1 ( $CH_3$ - $\underline{CO}$ ); 180.4 (C4).

## Biochanin A (5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon)



Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $C_{16}H_{12}O_5$ .

Molekülmasse: 284,27 g/mol.

UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\max} = 261$  nm.

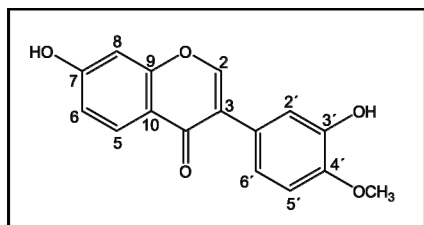
ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 285 = [M + H]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.78 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 6.22 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H6); 6.39 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H8); 6.99 (1H, m, H3'/H5'); 7.49 (2H, m, H2'/H6'); 8.35 (1H, s, H2); 12.89 (1H, s, 5-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.1 (OCH<sub>3</sub>); 93.6 (C8); 98.9 (C6); 104.8 (C10); 113.6 (C3'/C5'); 121.9 (C1'); 122.8 (C3); 130.0 (C2'/C6'); 154.1 (C2); 157.5 (C7); 159.1 (C9); 161.9 (C5); 164.2 (C4'); 180.0 (C4).

Struktur bestätigt durch HMBC-Experimente.

Calycosin (5,3'-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon; 3'-Hydroxyformononetin)



Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $C_{16}H_{12}O_5$ .

Molekülmasse: 284,27 g/mol.

UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max} = 259$  nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 285 = [M + H]^+$ .

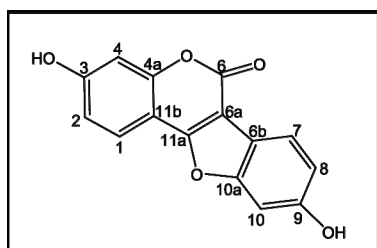
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.79 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 6.21 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H6'); 6.37 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H8); 6.94 (1H, dd,  $J_1 = 9.2$  Hz,  $J_2 = 2.0$  Hz, H6); 6.96 (1H, s<sub>br</sub>, H2'); 6.98 (1H, s<sub>br</sub>\*, H5'); 7.02 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H5); 8.33 (1H, s, H2); 9.08 (1H, s, 3'-OH).

\*nicht vollständig aufgelöstes Dublett.

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.5 ( $\text{OCH}_3$ ); 93.6 (C8); 99.0 (C6); 102.9 (C10); 111.8 (C5'); 116.3 (C6'); 119.7 (C2'); 122.0 (C9); 123.2 (C3); 142.7 (C1'); 145.9 (C3'); 147.6 (C4'); 154.1 (C5); 157.5 (C2); 161.9 (C7); 173.3 (C4).

Struktur bestätigt durch HMBC- und HSQC-Experimente.

Coumestrol (3,9-Dihydroxy-coumestan)



Herkunft: Alfalfa-Sprossen.

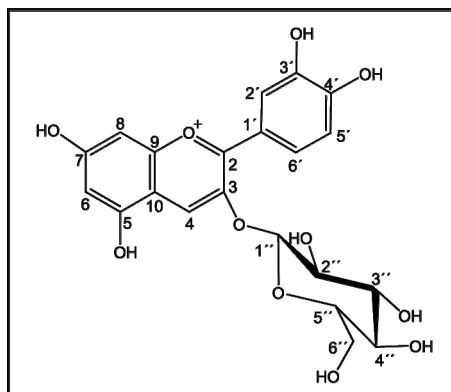
Summenformel:  $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_5$ .

Molekülmasse: 268,23 g/mol.

UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\text{max}} = 268$  und 342 nm.

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 267 = [\text{M} - \text{H}]^-$ .

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.72 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H4); 6.89 (1H, dd,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 1.6$  Hz, H2); 7.24 (1H, d,  $J = 1.0$  Hz, H10); 7.38 (1H, dd,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 1.6$  Hz, H8); 7.86 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H7); 7.88 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H1).

Cyanidin-3-glucosid (Cyanidin-3-O- $\beta$ -D-glucosid)

Herkunft: Schwarzer Soja.

Summenformel:  $C_{21}H_{21}O_{11}$ .

Molekülmasse: 449,39 g/mol.

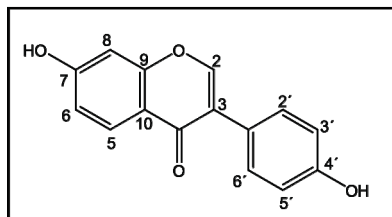
UV (HPLC, System I; IV):  $\lambda_{\max}$  = 529 und 279 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z$  = 449 =  $[M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z$  = 287  $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD/TFA}(d_1)$  19:1):  $\delta$  (ppm) = 3.43 (1H, dd,  $J_1$  = 9.5 Hz,  $J_2$  = 9.0 Hz,  $\text{H4}''$ ); 3.54 (1H, dd,  $J_1$  = 9.0 Hz,  $J_2$  = 9.0 Hz,  $\text{H3}''$ ); 3.55 (1H, ddd,  $J_1$  = 9.5 Hz,  $J_2$  = 6.0 Hz,  $J_3$  = 2.0 Hz,  $\text{H5}''$ ); 3.67 (1H, dd,  $J_1$  = 9.0 Hz,  $J_2$  = 7.5 Hz); 3.71 (1H, dd,  $J_1$  = 12.0 Hz,  $J_2$  = 6.0 Hz,  $\text{H6}''$ ); 3.91 (1H, dd,  $J_1$  = 12.0 Hz,  $J_2$  = 2.0 Hz,  $\text{H6a}''$ ); 5.29 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz,  $\text{H1}''$ ); 6.66 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H8); 6.90 (1H, s, dd,  $J_1$  = 2.0 Hz,  $J_2$  = 0.5 Hz, H6); 7.02 (1H, d,  $J$  = 9.0 Hz,  $\text{H5}'$ ); 8.05 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz,  $\text{H2}'$ ); 8.26 (1H, dd,  $J_1$  = 9.0 Hz,  $J_2$  = 2.0 Hz,  $\text{H6}'$ ); 9.03 (1H, s<sub>br</sub>, H4).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD/TFA}(d_1)$  19:1):  $\delta$  (ppm) = 62.5 ( $\text{C6}''$ ); 71.2 ( $\text{C4}''$ ); 74.9 ( $\text{C2}''$ ); 78.2 ( $\text{C3}''$ ); 78.9 ( $\text{C5}''$ ); 92.3 (C8); 103.5 (C6); 103.9 ( $\text{C1}''$ ); 114.2 (C10); 116.0 ( $\text{C2}'$ ); 117.5 ( $\text{C5}'$ ); 118.5 ( $\text{C1}'$ ); 121.8 ( $\text{C6}'$ ); 137.2 (C4); 145.7 (C3); 147.6 ( $\text{C3}'$ ); 158.2 ( $\text{C4}'$ ); 158.7 (C9); 159.3 (C5); 159.9 (C2); 170.7 (C7).

## Daidzein (7,4'-Dihydroxyisoflavon)



Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $C_{15}H_{10}O_4$ .

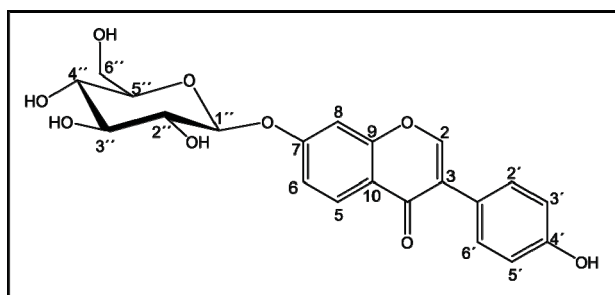
Molekülmasse: 254,24 g/mol.

UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max} = 250$  und 319 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 255 = [M + H]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.80 (2H, m,  $\text{H3'}/\text{H5'}$ ); 6.87 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H8); 6.93 (1H, dd,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 2.0$  Hz, H6); 7.37 (2H, m,  $\text{H2'}/\text{H6'}$ ); 7.95 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H5); 8.29 (1H, s, H2); 9.60 (1H, s, 4'-OH); 10.52 (1H, s, 7-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 102.0 (C8); 114.9 (C3'/C5'); 115.2 (C6); 118.4 (C10); 122.4 (C1'); 123.3 (C3); 127.1 (C5); 129.9 (C2'/C6'); 152.7 (C2); 157.0 (C4'); 157.3 (C9); 168.5 (C7); 174.6 (C4).

Daidzin (Daidzein-7-O- $\beta$ -D-glucosid)

Herkunft: Soja.

Summenformel:  $C_{21}H_{20}O_9$ .

Molekülmasse: 416,38 g/mol.

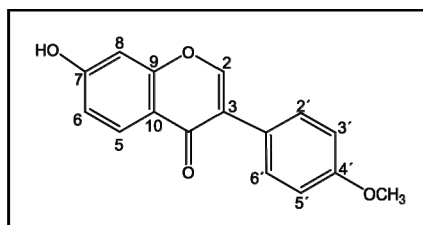
UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\max}$  = 251 und 319 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z$  = 417 =  $[M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z$  = 255  $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.12-3.31 (3H, m,  $\text{H2''}/\text{H3''}/\text{H4''}$ ); 3.42-3.47 (2H, m,  $\text{H5''}/\text{H6a''}$ ); 3.72 (1H, m,  $\text{H6b''}$ ); 4.54 (1H, m, Zucker-OH); 4.99 (1H, d,  $J$  = 5.0 Hz, Zucker-OH); 5.05 (1H, s<sub>br</sub>, Zucker-OH); 5.08 (1H, d,  $J$  = 7.0 Hz,  $\text{H1''}$ ); 5.35 (1H, d,  $J$  = 3.5 Hz, Zucker-OH); 6.81 (2H, m,  $\text{H3'}/\text{H5'}$ ); 7.14 (1H, dd,  $J_1$  = 9.0 Hz,  $J_2$  = 2.0 Hz, H6); 7.22 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H8); 7.40 (2H, m,  $\text{H2'}/\text{H6'}$ ); 8.04 (1H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H5); 8.36 (1H, s, H2); 9.47 (1H, s, 4'-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 60.6 ( $\text{C6''}$ ); 69.6 ( $\text{C4''}$ ); 73.0 ( $\text{C2''}$ ); 76.4 ( $\text{C3''}$ ); 77.1 ( $\text{C5''}$ ); 100.0 ( $\text{C1''}$ ); 103.4 (C8); 114.9 ( $\text{C3'}/\text{C5'}$ ); 115.5 (C6); 118.4 (C10); 122.2 ( $\text{C1'}$ ); 123.6 (C3); 126.8 (C5); 129.9 ( $\text{C2'}/\text{C6'}$ ); 153.1 (C2); 156.9 ( $\text{C4'}$ ); 157.2 (C9); 161.3 (C7); 174.6 (C4).

Formononetin (7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavon)



Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ .

Molekülmasse: 268,27 g/mol.

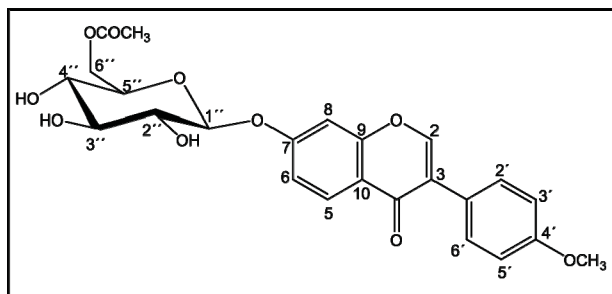
UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max}$  = 247 und 299 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z$  = 269 =  $[M + H]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.78 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 6.85 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H8); 6.92 (1H, dd,  $J_1$  = 9.0 Hz,  $J_2$  = 2.0 Hz, H6); 6.98 (2H, m,  $\text{H3'}/\text{H5'}$ ); 7.49 (2H, m,  $\text{H2'}/\text{H6'}$ ); 7.96 (1H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H5); 8.31 (1H, s, H2); 10.80 (1H, s, 7'-OH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.1 ( $\text{OCH}_3$ ); 102.0 (C8); 113.5 (C3'/C5'); 115.1 (C6); 116.4 (C10); 123.1 (C1'); 124.2 (C3); 127.1 (C5); 129.9 (C2'/C6'); 152.9 (C2); 157.4 (C7); 158.9 (C9); 162.6 (C4'); 174.5 (C4).

### Formononetin-7-O- $\beta$ -D-glucosid-6''-O-acetat



Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ .

Molekülmasse: 472,45 g/mol.

UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\text{max}} = 251 \text{ nm}$ .

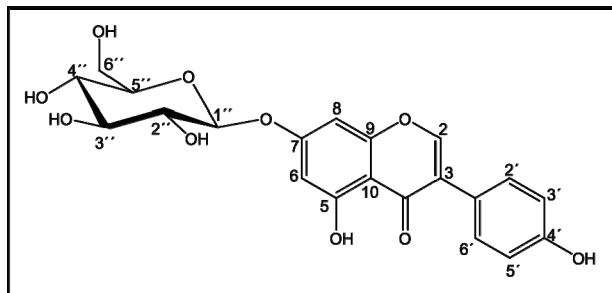
ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 473 = [\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{MS}^2$  bei  $m/z = 269$   $[\text{M} + \text{H} - \text{Anhydroacetylglucose}]^+$ .

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.05 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-CO}$ ); 3.10-3.52 (3H, m,  $\text{H2''/H3''/H4''}$ ); 3.68-3.79 (1H, m,  $\text{H5''}$ ); 3.79 (1H, s,  $4'\text{-OCH}_3$ ); 4.07 (1H, m,  $\text{H6a''}$ ); 4.32 (1H, d,  $J = 9.5 \text{ Hz}$ ,  $\text{H6b''}$ ); 5.13 (1H, d,  $J = 4.8 \text{ Hz}$ ,  $\text{H1''}$ ); 6.03 (1H, s<sub>br</sub>, Zucker-OH); 6.98 (2H, m,  $\text{H3'/H5'}$ ); 7.13 (1H, m, H6); 7.22 (1H, d,  $J = 1.8 \text{ Hz}$ , H8), 7.52 (2H, m,  $\text{H2'/H6'}$ ); 8.04 (1H, d,  $J = 8.5 \text{ Hz}$ , H5); 8.41 (1H, s, H2).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 20.5 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ); 55.1 ( $\text{OCH}_3$ ); 63.3 ( $\text{C6''}$ ); 69.8 ( $\text{C4''}$ ); 73.0 ( $\text{C2''}$ ); 73.8 ( $\text{C3''}$ ); 76.2 ( $\text{C5''}$ ); 99.7 ( $\text{C1''}$ ); 103.4 (C8); 113.6 (C3'/C5'); 115.5 (C6); 118.2 (C10); 123.4 (C1'); 123.9 (C3); 126.9 (C5); 130.0 (C2'/C6'); 153.6 (C2); 157.0 (C9); 158.5 ( $\text{C4'}$ ); 161.2 (C7); 170.1 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ); 175.0 (C4).



Genistin (Genistein-7-O- $\beta$ -D-glucosid; 7-Glucosid von 5,7,4'-Trihydroxyisoflavon)



Herkunft: Soja.

Summenformel:  $C_{21}H_{20}O_{10}$ .

Molekülmasse: 432,38 g/mol.

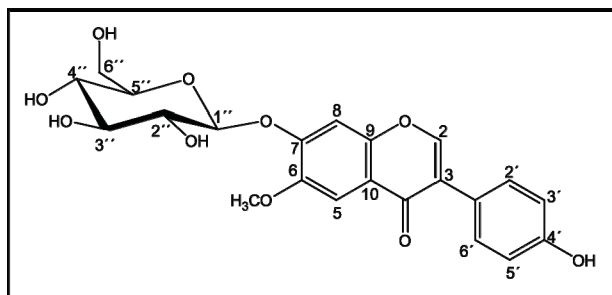
UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\max} = 259$  und 323 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 433 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 271$   $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.13-3.22 (1H, m,  $\text{H4''}$ ), 3.44 (2H, m,  $\text{H2''/H3''}$ ); 3.69 (2H, d,  $J = 5.5$  Hz,  $\text{H5''/H6a''}$ ); 3.72 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz,  $\text{H6b''}$ ); 4.54 (1H, m, Zucker-OH); 4.99 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{H1''}$ ); 5.04 (1H, m, Zucker-OH); 5.06 (1H, m, Zucker-OH); 5.33 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, Zucker-OH); 6.46 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H6); 6.71 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H8); 6.82 (2H, m,  $\text{H3'/H5'}$ ); 7.39 (2H, m,  $\text{H2'/H6'}$ ); 8.40 (1H, s, H2); 9.55 (1H, s,  $\text{4'-OH}$ ); 12.90 (1H, s<sub>br</sub>,  $\text{5-OH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) 60.7 ( $\text{C6''}$ ); 69.6 ( $\text{C4''}$ ); 73.0 ( $\text{C2''}$ ); 76.4 ( $\text{C3''}$ ); 77.2 ( $\text{C5''}$ ); 94.6 (C8); 99.6 (C6); 99.9 ( $\text{C1''}$ ); 106.0 (C10); 114.8/115.2 ( $\text{C3'/C5'}$ ); 120.9 (C3); 122.5 ( $\text{C1'}$ ); 129.9/130.2 ( $\text{C2'/C6'}$ ); 154.7 (C2); 157.2 (C9); 157.4 ( $\text{C4'}$ ); 161.6 (C5); 163.0 (C7); 180.4 (C4).

Glycitin (Glycitein-7-O- $\beta$ -D-glucosid; 7-O-Glucosid von 7,4'-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon)



Herkunft: Soja.

Summenformel:  $C_{22}H_{22}O_{10}$ .

Molekülmasse: 446,41 g/mol.

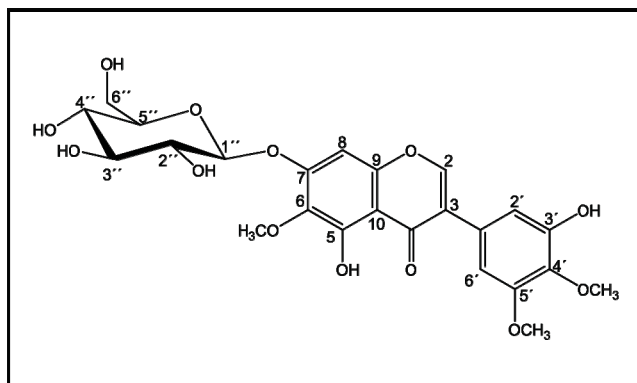
UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\max} = 259$  und 315 nm.

ESI-MS (positiver Modus):  $m/z$  447  $[M + H]^+$ ,  $MS^2$   $m/z$  285  $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.15-3.31 (3H, m,  $\text{H2''}/\text{H3''}/\text{H4''}$ ); 3.43-3.49 (2H, m,  $\text{H5''}/\text{H6a''}$ ); 3.71 (1H, m,  $\text{H6b''}$ ); 3.88 (3H, s,  $6\text{-OCH}_3$ ); 4.53 (1H, m, Zucker-OH), 4.99 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz, Zucker-OH); 5.05 (1H, s<sub>br</sub>, Zucker-OH); 5.16 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{H1''}$ ); 5.30 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz, Zucker-OH); 6.81 (2H, m,  $\text{H3'}/\text{H5'}$ ); 7.31 (1H, s, H8); 7.40 (2H, m,  $\text{H2'}/\text{H6'}$ ); 7.48 (1H, s, H5); 8.35 (1H, s, H2); 9.46 (1H, s,  $4'\text{-OH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.8 ( $\text{OCH}_3$ ); 60.6 ( $\text{C6''}$ ); 69.6 ( $\text{C4''}$ ); 73.0 ( $\text{C2''}$ ); 76.7 ( $\text{C3''}$ ); 77.2 ( $\text{C5''}$ ); 99.7 ( $\text{C1''}$ ); 103.4 (C8); 104.8 (C5); 114.9 ( $\text{C3'}/\text{C5'}$ ); 117.8 (C10); 122.5 ( $\text{C1'}$ ); 123.1 (C3); 129.9 ( $\text{C2'}/\text{C6'}$ ); 147.4 (C6); 151.1 (C9); 151.5 (C7); 152.9 (C2); 157.1 ( $\text{C4'}$ ); 174.3 (C4).

Iridin (5,3'-dihydroxy-6,4',5'-trimethoxyisoflavon-7-O-β-D-glucosid; 7-glucosid von Irogenin)



Herkunft: Iris.

Summenformel:  $C_{24}H_{26}O_{13}$ .

Molekülmasse: 522,46 g/mol.

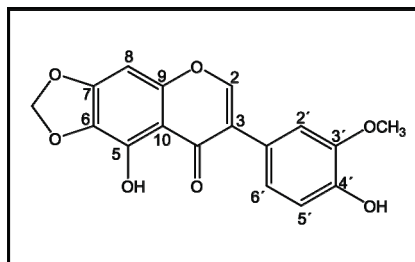
UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\max} = 268 \text{ nm}$ .

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 523 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 361$   $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.17-3.36 (3H, m,  $\text{H2''}/\text{H3''}/\text{H4''}$ ); 3.44-3.49 (2H, m,  $\text{H5''}/\text{H6a''}$ ); 3.70 (3H, s, 6- $\text{OCH}_3$ ); 3.77 (3H, s, 4'- $\text{OCH}_3$ ); 3.79 (3H, s, 5'- $\text{OCH}_3$ ); 3.81 (1H, m,  $\text{H6b''}$ ); 4.54 (1H, s<sub>br</sub>, Zucker-OH); 5.01 (1H, m, Zucker-OH), 5.09 (1H, d,  $J = 7.6 \text{ Hz}$ ,  $\text{H1''}$ ); 5.35 (1H, s<sub>br</sub>, Zucker-OH); 6.68 (1H, d,  $J = 1.8 \text{ Hz}$ ,  $\text{H6'}$ ); 6.73 (1H, d,  $J = 1.8 \text{ Hz}$ ,  $\text{H2'}$ ); 6.89 (1H, s,  $\text{H8}$ ); 8.46 (1H, s,  $\text{H2}$ ); 9.19 (1H, s, 3'-OH); 12.88 (1H, s, 5-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.8 (5'- $\text{OCH}_3$ ); 59.9 (4'- $\text{OCH}_3$ ); 60.2 (6- $\text{OCH}_3$ ); 60.6 ( $\text{C6''}$ ); 69.6 ( $\text{C4''}$ ); 73.1 ( $\text{C2''}$ ); 76.7 ( $\text{C3''}$ ); 77.2 ( $\text{C5''}$ ); 94.0 ( $\text{C8}$ ); 100.1 ( $\text{C1''}$ ); 104.6 ( $\text{C6'}$ ); 106.4 ( $\text{C10}$ ); 110.3 ( $\text{C2'}$ ); 121.9 ( $\text{C3}$ ); 125.8 ( $\text{C1'}$ ); 132.5 ( $\text{C6}$ ); 136.5 ( $\text{C4'}$ ); 150.2 ( $\text{C3'}$ ); 152.3 ( $\text{C5'}$ ); 152.8 ( $\text{C5}$ ); 154.0 ( $\text{C9}$ ); 155.3 ( $\text{C2}$ ); 156.6 ( $\text{C7}$ ); 180.4 ( $\text{C4}$ ).

## Iriflogenin (5,4'-Dihydroxy-3'-methoxy-6,7-methylenedioxyisoflavon)



Herkunft: Iris.

Summenformel:  $C_{17}H_{12}O_7$ .

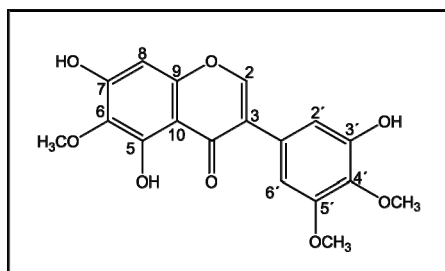
Molekülmasse: 328,27 g/mol.

UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\max} = 273$  nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z$  329  $[M + H]^+$ .

$^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.80 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>); 6.89 (1H, s, OCH<sub>2</sub>O); 7.10 (1H, dd,  $J_1 = 9.5$  Hz,  $J_2 = 1.8$  Hz, H6'); 7.15 (1H, s, H8); 7.19 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, H5'); 7.22 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H2'); 8.51 (1H, s, H2); 12.88 (1H, s, 5-OH).

## Irigenin (5,7,3'-Trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyisoflavon)



Herkunft: Iris.

Summenformel:  $C_{18}H_{16}O_8$ .

Molekülmasse: 360,32 g/mol.

UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\max} = 263$  nm.

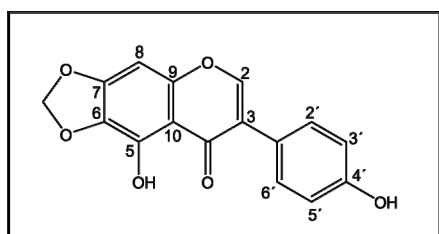
ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 361 = [M + H]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.69 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 3.73 (3H, s, 5'-OCH<sub>3</sub>); 3.78 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); 6.34 (1H, s, H8); 6.64 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H6'); 6.73 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H2'); 8.31 (1H, s, H2); 12.99 (1H, s, 5-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) 55.7 (5'-OCH<sub>3</sub>); 59.5 (4'-OCH<sub>3</sub>); 59.8 (6-OCH<sub>3</sub>); 94.3 (C8); 104.6 (C2'); 110.3 (C6'); 112.0 (C10); 121.4 (C3); 126.3 (C1'); 132.1 (C6); 136.3 (C4'); 150.1 (C3'); 152.7 (C5'); 152.8 (C9); 153.0 (C5); 153.8 (C2); 160.7 (C7); 179.7 (C4).

Struktur bestätigt durch HMBC- und HSQC-Experimente.

Irilon (5,4'-Dihydroxy-6,7-methylenedioxyisoflavin)



Herkunft: Rotklee, Iris.

Summenformel:  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_6$ .

Molekülmasse: 298,25 g/mol.

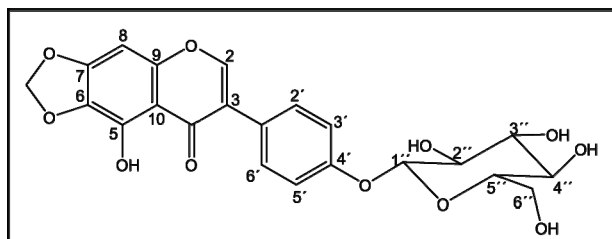
UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\text{max}}$  = 271 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z$  = 299 =  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.17 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O); 6.82 (2H, m, H3'/H5'); 6.85 (1H, s, H8); 7.38 (2H, m, H2'/H6'); 8.40 (1H, s, H2); 9.53 (1H, s, 4'-OH); 12.88 (1H, s, 5-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 89.4 (C8); 102.7 (OCH<sub>2</sub>O); 107.4 (C10); 115.0 (C3'/C5'); 120.8 (C3); 122.1 (C1'); 130.1 (C2'/C6'); 141.3 (C6); 152.9 (C9); 153.9 (C5); 154.3 (C2); 157.4 (C7/C4'); 180.8 (C4).

## Irilonglucosid (Irilon-4'-O-β-D-glucosid)



Herkunft: Rotklee, Iris.

Summenformel:  $C_{22}H_{20}O_{11}$ .

Molekülmasse: 460,39 g/mol.

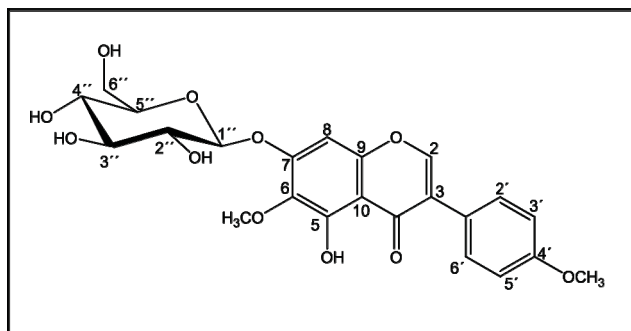
UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max} = 267 \text{ nm}$ .

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 461 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 299 [M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.17 (1H, t,  $J = 9.1 \text{ Hz}$ ,  $\text{H}_{4''}$ ), 3.23-3.26 (1H, m,  $\text{H}_{3''}$ ); 3.29-3.39 (1H, m,  $\text{H}_{5''}$ ); 3.36 (1H, m,  $\text{H}_{2''}$ ); 3.47 (1H, m,  $\text{H}_{6a''}$ ); 3.76 (1H, d,  $J = 12.0 \text{ Hz}$ ,  $\text{H}_{6b''}$ ); 4.59 (1H, m, Zucker-OH); 4.91 (1H, d,  $J = 6.0 \text{ Hz}$ ,  $\text{H}_{1''}$ ); 5.07 (1H, m, Zucker-OH); 5.14 (1H, m, Zucker-OH); 5.37 (1H, m, Zucker-OH); 6.19 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ); 6.92 (1H, s, H8); 7.10 (2H, m,  $\text{H}_{3'}/\text{H}_{5'}$ ); 7.51 (2H, m,  $\text{H}_{2'}/\text{H}_{6'}$ ); 8.50 (1H, s, H2); 12.85 (1H, s<sub>br</sub>, 5-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150.0 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 60.3 ( $\text{C}_{6''}$ ); 69.9 ( $\text{C}_{4''}$ ); 72.9 ( $\text{C}_{3''}$ ); 76.3 ( $\text{C}_{5''}$ ); 76.7 ( $\text{C}_{2''}$ ); 89.7 (C8); 99.9 ( $\text{C}_{1''}$ ); 102.9 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ); 107.1 (C10); 115.7 ( $\text{C}_{3'}/\text{C}_{5'}$ ); 122.4 (C3); 123.6 ( $\text{C}_{1'}$ ); 129.4 (C6); 129.8 ( $\text{C}_{2'}/\text{C}_{6'}$ ); 141.0 (C5); 152.7 (C9); 153.7 (C7); 154.7 (C2); 157.0 ( $\text{C}_{4'}$ ); 180.4 (C4).

Struktur bestätigt durch HMBC- und HSQC-Experimente sowie DEPT 135.

Irisolidon-glucosid (Irisolidon-7-O- $\beta$ -D-glucosid)

Herkunft: Iris.

Summenformel:  $C_{23}H_{24}O_{11}$ .

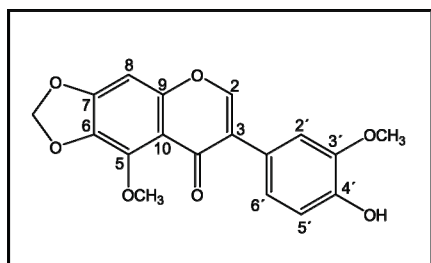
Molekülmasse: 476,44 g/mol.

UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max} = 270$  nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 477 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 315$   $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.16 (1H, m,  $\text{H}_{4''}$ ), 3.28-3.46 (2H, m,  $\text{H}_{2''}/\text{H}_{3''}/\text{H}_{5''}$ ); 3.72 (1H, m,  $\text{H}_{6a''}$ ); 3.76 (3H, s,  $4'-\text{OCH}_3$ ); 3.79 (3H, s,  $6-\text{OCH}_3$ ); 3.81 (1H, m,  $\text{H}_{6b''}$ ); 5.10 (1H, d,  $J = 5.5$  Hz,  $\text{H}_{1''}$ ); 6.89 (1H, s, H8); 7.01 (2H, m,  $\text{H}_{3'}/\text{H}_{5'}$ ); 7.52 (2H, m,  $\text{H}_{2'}/\text{H}_{6'}$ ); 8.50 (1H, s, H2); 12.80 (1H, s,  $5-\text{OH}$ ).

## Nigricanin (4'-Hydroxy-5,3'-dimethoxy-6,7-methylenedioxyisoflavin)



Herkunft: Iris.

Summenformel:  $C_{18}H_{14}O_7$ .

Molekülmasse: 342,30 g/mol.

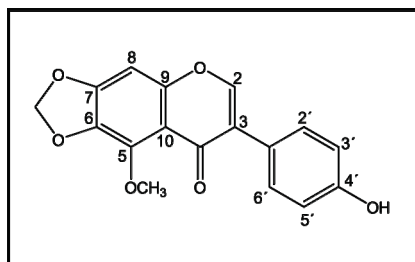
UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max}$  = 267 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z$  = 343 =  $[M + H]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.78 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>); 3.88 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>); 6.16 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O); 6.79 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H5'); 6.97 (1H, s, H8); 7.32 (1H, dd,  $J_1$  = 8.4 Hz,  $J_2$  = 1.8 Hz, H6'); 7.34 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H2'); 8.16 (1H, s, H2); 9.45 (1H, s, 4'-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) 55.4 (3'-OCH<sub>3</sub>); 60.5 (5-OCH<sub>3</sub>); 93.7 (C8); 102.5 (OCH<sub>2</sub>O); 113.2 (C10); 114.7/114.9 (C6'); 122.3 (C1'); 124.2 (C3); 129.6 (C5'); 130.4 (C2'); 135.8 (C6); 140.4 (C5); 150.6 (C3'); 151.1 (C9); 152.4 (C7); 153.9 (C2); 157.0 (C4'); 174.0 (C4).

Nigricin (5-Methoxy-4'-hydroxy-6,7-methylenedioxyisoflavon; Irisolon)



Herkunft: Iris.

Summenformel:  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$ .

Molekülmasse: 312,28 g/mol.

UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max}$  = 267 nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z$  = 313 =  $[M + H]^+$ .

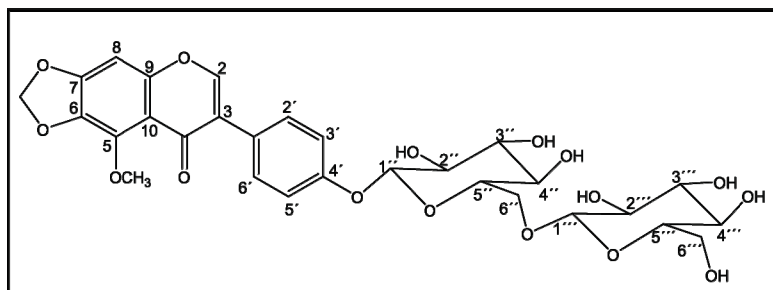
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.90 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>); 6.19 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O); 6.81 (2H, m, H3'/H5'); 7.01 (1H, s, H8); 7.35 (2H, m, H2'/H6'); 8.21 (1H, s, H2); 9.56 (1H, s, 4'-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.0 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 60.7 (5-OCH<sub>3</sub>); 93.6 (C8); 102.5 (OCH<sub>2</sub>O); 113.2 (C10); 114.8 (C3'/C5'); 122.3 (C1'); 124.1 (C3); 130.2 (C2'/C6'); 135.9 (C6); 140.3 (C5); 151.0 (C9); 152.5 (C7); 153.9 (C2); 157.1 (C4'); 173.9 (C4).



Struktur bestätigt durch HMBC- und HSQC-Experimente sowie DEPT 135.

Nigricin-diglucosid (Nigricin-4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1'''' $\rightarrow$ 6'''- $\beta$ -D-glucopyranosid)



Herkunft: Iris.

Summenformel:  $C_{29}H_{32}O_{16}$ .

Molekülmasse: 636,56 g/mol.

UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max} = 266$  nm.

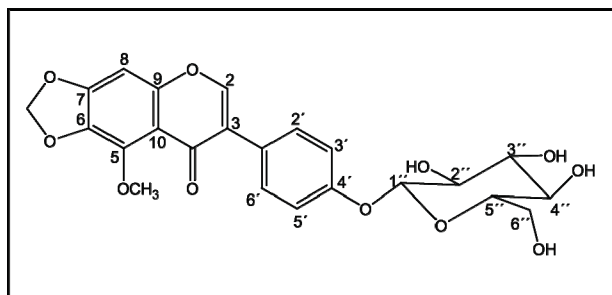
ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 637 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 475$   $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ ,  $MS^3 = m/z = 313$   $[M + H - \text{Di-Anhydroglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.95-3.03 (2H, m,  $\text{H4''}/\text{H4''''}$ ); 3.08-3.35 (4H, m,  $\text{H2''}/\text{H3''}/\text{H2''''}/\text{H3''''}$ ); 3.41 (1H, m,  $\text{H6b''''}$ ); 3.59-3.60 (1H, m,  $\text{H6a''}$ ); 3.64-3.66 (1H, m,  $\text{H6a''''}$ ); 3.77 (2H, m,  $\text{H5''}$ ); 3.90 (3H, s,  $5\text{-OCH}_3$ ); 3.92 (2H, m,  $\text{H5''''}$ ); 4.00 (1H, m,  $\text{H6b''}$ ); 4.21 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, Zucker-OH); 4.23 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, Zucker-OH); 4.39 (1H, d,  $J = 4.1$  Hz,  $\text{H1''''}$ ); 4.50 (1H, m, Zucker-OH); 4.87 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{H1''}$ ); 4.90 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz, Zucker-OH); 4.97 (2H, m, Zucker-OH); 5.20 (1H, m, Zucker-OH); 6.18 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ); 7.03 (1H, s, H8); 7.11 (2H, m,  $\text{H3'}/\text{H5'}$ ); 7.44 (2H, m,  $\text{H2'}/\text{H6'}$ ); 8.24 (1H, s, H2).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150.0 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 60.8 ( $5\text{-OCH}_3$ ); 61.0 ( $\text{C6''''}$ ); 67.1 ( $\text{C6''}$ ); 70.0 ( $\text{C4''}$ ); 73.2 ( $\text{C2''}$ ); 73.6 ( $\text{C4''''}$ ); 75.9 ( $\text{C2''''}$ ); 76.1 ( $\text{C5''''}$ ); 76.4 ( $\text{C3''''}$ ); 76.6 ( $\text{C3''}$ ); 76.8 ( $\text{C5''}$ ); 93.7 (C8); 100.3 ( $\text{C1''}$ ); 102.7 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ); 103.2 ( $\text{C1''''}$ ); 113.2 (C10); 115.9 ( $\text{C3'}/\text{C5'}$ ); 124.0 (C3); 125.3 ( $\text{C1'}$ ); 130.3 ( $\text{C2'}/\text{C6'}$ ); 135.9 (C6); 140.4 (C5); 151.5 (C9); 152.7 (C7); 154.0 (C2); 157.0 ( $\text{C4'}$ ); 173.9 (C4).

Struktur bestätigt durch HMBC- und HSQC-Experimente sowie DEPT 135.

## Nigricin-4'-O-β-D-glucosid



Herkunft: Iris.

Summenformel:  $C_{23}H_{22}O_{11}$ .

Molekülmasse: 474,42 g/mol.

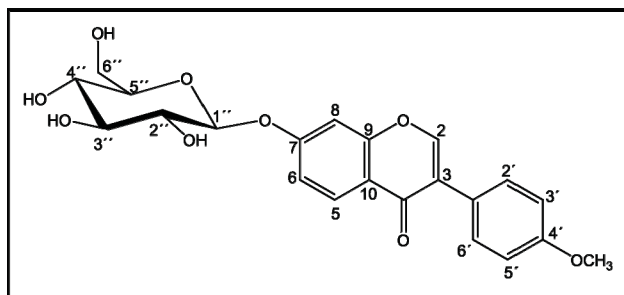
UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max} = 267 \text{ nm}$ .

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 475 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 313$   $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.12-3.29 (3H, m,  $\text{H2''/H3''/H4''}$ ); 3.42-3.52 (1H, m,  $\text{H5''}$ ); 3.64-3.73 (1H, m,  $\text{H6a''}$ ); 3.79 (1H, m,  $\text{H6b''}$ ); 3.90 (3H, s,  $5\text{-OCH}_3$ ); 4.52 (1H, m, Zucker-OH); 4.89 (1H, d,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ , Zucker-OH); 4.97 (1H, s<sub>br</sub>, Zucker-OH); 5.07 (1H, d,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ ,  $\text{H1''}$ ); 5.27 (1H, m, Zucker-OH); 6.18 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ); 7.01 (1H, s, H8); 7.07 (2H, m,  $\text{H3'/H5'}$ ); 7.45 (2H, m,  $\text{H2'/H6'}$ ); 8.25 (1H, s, H2).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 60.6 ( $5\text{-OCH}_3$ ); 60.7 ( $\text{C6''}$ ); 69.6 ( $\text{C4''}$ ); 73.1 ( $\text{C2''}$ ); 76.5 ( $\text{C3''}$ ); 76.9 ( $\text{C5''}$ ); 93.7 (C8); 100.3 ( $\text{C1''}$ ); 102.5 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ); 115.6 (C10); 115.9/116.0 ( $\text{C3'/C5'}$ ); 123.8 (C3); 125.3 ( $\text{C1'}$ ); 129.7 (C6); 130.2/130.3 ( $\text{C2'/C6'}$ ); 135.8 (C5); 151.6 (C9); 152.5 (C7); 153.8 (C2); 157.0 ( $\text{C4'}$ ); 173.8 (C4).

Struktur bestätigt durch HMBC- und HSQC-Experimente und DEPT 135.

Ononin (Formononetin-7-O- $\beta$ -D-glucosid)

Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $C_{22}H_{22}O_9$ .

Molekülmasse: 430,41 g/mol.

UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max} = 260$  nm.

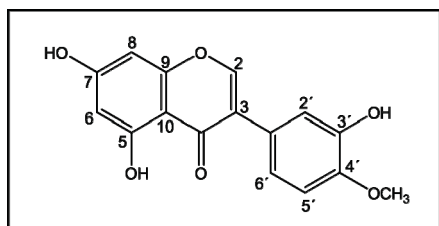
ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 431 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 269$   $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.12-3.31 (3H, m,  $\text{H2''}/\text{H3''}/\text{H4''}$ ); 3.42-3.47 (2H, m,  $\text{H5''}/\text{H6a''}$ ); 3.72 (1H, m,  $\text{H6b''}$ ); 3.79 (1H, s,  $4'\text{-OCH}_3$ ); 4.56 (1H s<sub>br</sub>, Zucker-OH); 5.09 (3H, d,  $J = 11.5$  Hz,  $\text{H1''}/\text{Zucker-OH}/\text{Zucker-OH}$ ); 5.39 (1H, s<sub>br</sub>, Zucker-OH); 6.99 (2H, m,  $\text{H3'}/\text{H5'}$ ); 7.14 (1H, dd,  $J_1 = 9.0$  Hz,  $J_2 = 2.0$  Hz, H6); 7.23 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H8), 7.53 (2H, m,  $\text{H2'}/\text{H6'}$ ); 8.05 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H5); 8.41 (1H, s, H2).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.06 ( $\text{OCH}_3$ ); 60.6 ( $\text{C6''}$ ); 69.6 ( $\text{C4''}$ ); 73.1 ( $\text{C2''}$ ); 76.4 ( $\text{C3''}$ ); 77.2 ( $\text{C5''}$ ); 100.0 ( $\text{C1''}$ ); 103.4 (C8); 113.5 ( $\text{C3'}/\text{C5'}$ ); 115.5 (C6); 118.4 (C10); 123.3 ( $\text{C1'}$ ); 123.9 (C3); 126.8 (C5); 129.9 ( $\text{C2'}/\text{C6'}$ ); 153.5 (C2); 156.9 (C9); 159.0 ( $\text{C4'}$ ); 161.4 (C7); 174.5 (C4).

Struktur bestätigt durch HMBC-Experimente und DEPT 135.

## Pratensein (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavon)



Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $C_{16}H_{12}O_6$ .

Molekülmasse: 300,27 g/mol.

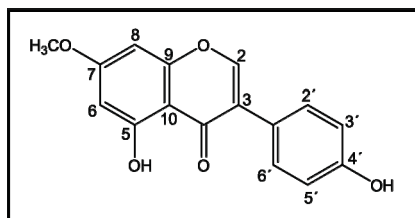
UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max} = 259, 283$  und  $340$  nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 301 = [M + H]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.79 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 6.22 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H6); 6.38 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H8); 6.95 (2H, m, H5'/H6'); 7.02 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H2'); 8.30 (1H, s, H2); 10.82 (1H, s, 3'-OH); 12.90 (1H, s, 5-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.6 (OCH<sub>3</sub>); 93.6 (C8); 98.9 (C6); 104.4 (C10); 112.0 (C5'); 116.4 (C2'); 119.7 (C6'); 122.1 (C1'); 123.3 (C3); 146.1 (C3'); 147.7 (C4'); 154.1 (C2); 157.5 (C9); 161.9 (C7); 164.2 (C5); 180.0 (C4).

## Prunetin (5,4'-Dihydroxy-7-methoxyisoflavon)



Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $C_{16}H_{12}O_5$ .

Molekülmasse: 284,27 g/mol.

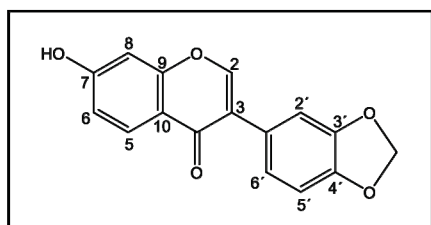
UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max} = 260$  nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 285 = [M + H]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.86 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>); 6.40 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H6); 6.64 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H8); 6.82 (2H, m, H3'/H5'); 7.38 (2H, H2'/H6'); 8.38 (1H, s, H2); 9.58 (1H, s, 4'-OH); 12.93 (1H, s, 5-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 56.0 (OCH<sub>3</sub>); 92.3 (C8); 97.9 (C6); 105.4 (C10); 115.0 (C3'/C5'); 120.9 (C1'); 122.5 (C3); 130.0 (C2'/C6'); 154.2 (C2); 154.2 (C9); 157.4 (C4'); 161.7 (C7); 165.1 (C5); 180.3 (C4).

Pseudobaptigenin ( $\psi$ -Baptigenin; 7-Hydroxy-3',4'-methylenedioxyisoflavin)



Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_5$ .

Molekülmasse: 282,25 g/mol.

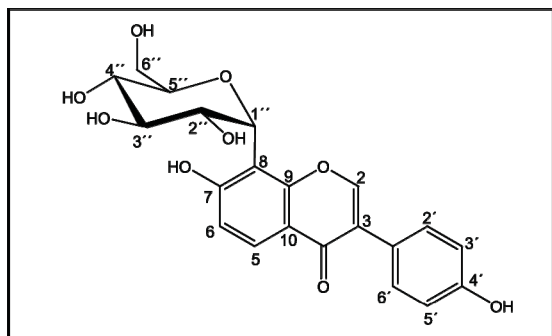
UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\text{max}} = 247$  nm.

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 283 = [M + H]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.04 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O); 6.88 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H8); 6.94 (1H, dd,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz, H6); 6.99 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H5'); 7.05 (1H, dd,  $J_1 = 8.1$  Hz,  $J_2 = 1.7$  Hz, H6'); 7.10 (1H, d,  $J = 1.7$  Hz, H2'); 7.96 (1H, d, 8.8 Hz, H5); 8.35 (1H, s, H2).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 100.9 (OCH<sub>2</sub>O); 102.0 (C8); 107.7 (C5'); 107.9 (C2'); 113.5 (C6); 116.4 (C10); 122.8 (C6'); 123.4 (C3); 125.3 (C5); 127.1 (C1'); 146.2 (C4'); 147.4 (C3'); 153.1 (C2); 157.4 (C9); 158.8 (C7); 174.5 (C4).

(Durch HMBC bewiesen; Verschiebungen sprechen für Substitution der Methylenedioxygruppe am B-Ring.)

Puerarin (7,4'-Dihydroxyisoflavon-8-C- $\beta$ -D-glucosid, Daidzein-8-C-glucosid)

Herkunft: Kudzu.

Summenformel:  $C_{21}H_{20}O_9$ .

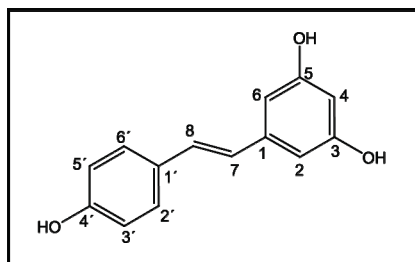
Molekülmasse: 416,38 g/mol.

UV (HPLC, System I):  $\lambda_{\max} = 259 \text{ nm}$ .

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 417 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 297$  und  $267$ .

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.12-3.31 (3H, m,  $\text{H2''}/\text{H3''}/\text{H4''}$ ); 3.28-3.43 (2H, m,  $\text{H5''}/\text{H6''}$ ); 3.70 (1H, m,  $\text{H6''}$ ); 4.00 (2H, m, Zucker-OH); 4.44 (1H, s<sub>br</sub>, Zucker-OH); 4.85 (1H, d,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ ,  $\text{H1''}$ ); 4.89 (1H, m, Zucker-OH); 6.79 (2H, m,  $\text{H3'}/\text{H5'}$ ); 6.98 (1H, m,  $\text{H6}$ ); 7.39 (2H, m,  $\text{H2'}/\text{H6'}$ ); 7.93 (1H, d,  $J = 8.8 \text{ Hz}$ ,  $\text{H5}$ ); 8.31 (1H, s,  $\text{H2}$ ); 9.46 (1H, s,  $4'\text{-OH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 61.3 ( $\text{C6''}$ ); 70.0 ( $\text{C4''}$ ); 70.8 ( $\text{C2''}$ ); 73.4 ( $\text{C1''}$ ); 78.7 ( $\text{C3''}$ ); 81.7 ( $\text{C5''}$ ); 112.6 ( $\text{C8}$ ); 114.9 ( $\text{C3'}/\text{C5'}$ ); 116.8 ( $\text{C6}$ ); 122.5 ( $\text{C10}$ ); 123.0 ( $\text{C1'}/\text{C5}$ ); 126.1 ( $\text{C3}$ ); 129.9 ( $\text{C2'}/\text{C6'}$ ); 152.5 ( $\text{C2}$ ); 157.0 ( $\text{C4'}/\text{C9}$ ); 160.9 ( $\text{C7}$ ); 174.8 ( $\text{C4}$ ).

Resveratrol (*trans*-Resveratrol; *trans*-3,5,4'-Trihydroxystilben)

Herkunft: Weintraubenschalen-Trester.

Summenformel:  $C_{14}H_{12}O_3$ .

Molekülmasse: 228,25 g/mol.

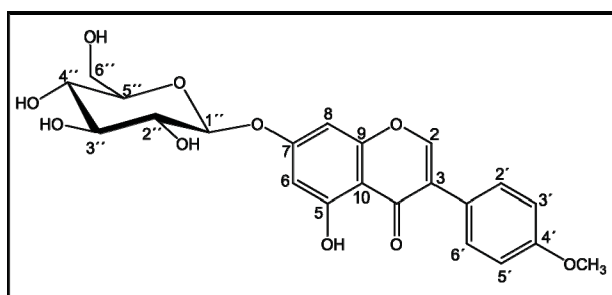
UV (HPLC, System III):  $\lambda_{\max} = 320$  und  $217$  nm.

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekulation  $m/z = 227 = [M - H]^-$ .

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.26 (1H, t,  $J = 2.1$  Hz, H4); 6.55 (2H, d,  $J = 2.1$  Hz, H2/H6); 6.86 (2H, m, H3'/H5'); 6.89 (1H, d,  $J = 16.3$  Hz, H7); 7.05 (1H, d,  $J = 16.3$  Hz, H8); 7.44 (1H, m, H2'/H6').

$^{13}C$ -NMR (75.5 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  (ppm) = 102.7 (C4); 105.8 (C2/C6); 116.5 (C3'/C5'); 127.1 (C7); 128.8 (C2'/C6'); 129.4 (C8); 130.5 (C1'); 141.4 (C1); 158.4 (C4'); 159.7 (C3/C5).

Sissotrin (Biochanin A-7-O- $\beta$ -D-glucosid)



Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $C_{22}H_{22}O_{10}$ .

Molekülmasse: 446,41 g/mol.

UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\max} = 259$  nm.

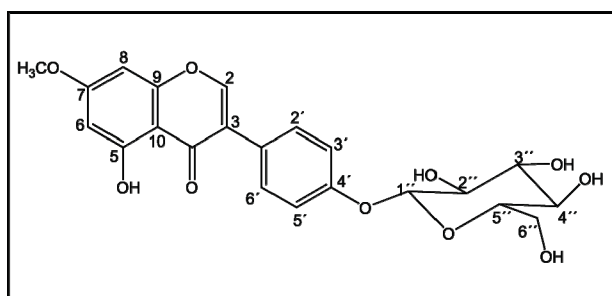
ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekulation  $m/z = 447 = [M + H]^+$ ,  $MS^2$  bei  $m/z = 285$   $[M + H - \text{Anhydroglucose}]^+$ .

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.13-3.24 (1H, m, H4''); 3.43 (2H, m, H2''/H3''); 3.49 (1H, m, H6\_b''); 3.69 (1H, m, H5''); 3.72 (1H, m, H6\_a''); 3.79 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 4.53 (1H, m, Zucker-OH); 4.99 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz, H1''); 5.04 (1H, d,  $J \approx 1.0$  Hz, Zucker-OH); 5.06 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, Zucker-OH); 5.33 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, Zucker-OH); 6.46 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H6); 6.72 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H8); 7.00 (2H, m, H3'/H5'); 7.52 (2H, m, H2'/H6'); 8.45 (1H, s, H2); 12.81 (1H, s<sub>br</sub>, 5-OH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 55.1 ( $\text{OCH}_3$ ); 60.6 ( $\text{C6}''$ ); 69.6 ( $\text{C4}''$ ); 73.0 ( $\text{C2}''$ ); 76.4 ( $\text{C3}''$ ); 77.1 ( $\text{C5}''$ ); 94.5 (C8); 99.6 (C6); 99.9 ( $\text{C1}''$ ); 106.0 (C10); 113.0 ( $\text{C3}'/\text{C5}'$ ); 122.2 ( $\text{C1}'$ ); 122.6 (C3); 130.1 ( $\text{C2}'/\text{C6}'$ ); 154.7 (C2); 157.1 (C10); 159.2 ( $\text{C4}'$ ); 161.6 (C5); 163.0 (C7); 180.3 (C4).

Struktur bestätigt durch HMBC-Experimente und DEPT 135.

Trifosid (Prunetin-4'-O- $\beta$ -D-glucosid)



Herkunft: Rotklee.

Summenformel:  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ .

Molekülmasse: 446,41 g/mol.

UV (HPLC, System II):  $\lambda_{\text{max}} = 261 \text{ nm}$ .

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion  $m/z = 447 = [\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{MS}^2$  bei  $m/z = 285$  [ $\text{M} + \text{H} - \text{Anhydroglucose}$ ] $^+$ .

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.13-3.24 (1H, m,  $\text{H4}''$ ); 3.43 (2H, m,  $\text{H2}''/\text{H3}''$ ); 3.49 (1H, m,  $\text{H6}_b''$ ); 3.69 (1H, m,  $\text{H5}''$ ); 3.77 (1H, m,  $\text{H6}_a''$ ); 3.85 (3H, s, 7- $\text{OCH}_3$ ); 4.53 (1H, m, Zucker-OH); 5.02 (1H, d,  $J = 5.5 \text{ Hz}$ ,  $\text{H1}''$ ); 5.10 (1H, d,  $J = 1.0 \text{ Hz}$ , Zucker-OH); 6.43 (1H, s, H6); 6.64 (1H, s, H8); 7.08 (2H, m,  $\text{H3}'/\text{H5}'$ ); 7.51 (2H, m,  $\text{H2}'/\text{H6}'$ ); 8.47 (1H, s, H2); 12.84 (1H, s<sub>br</sub>, 5-OH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.5 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 56.0 ( $\text{OCH}_3$ ); 60.7 ( $\text{C6}''$ ); 69.7 ( $\text{C4}''$ ); 73.2 ( $\text{C2}''$ ); 76.6 ( $\text{C3}''$ ); 77.0 ( $\text{C5}''$ ); 92.4 (C8); 98.1 (C6); 100.3 ( $\text{C1}''$ ); 105.4 (C10); 115.8/116.3 ( $\text{C3}'/\text{C5}'$ ); 122.1 ( $\text{C1}'$ ); 123.9 (C3); 129.9/130.1 ( $\text{C2}'/\text{C6}'$ ); 154.5 (C2); 155.1 (C9); 157.4 ( $\text{C4}'$ ); 161.7 (C7); 165.3 (C5); 180.2 (C4).

Struktur bestätigt durch HMBC-Experimente.





## 5 Zusammenfassung

Phytoestrogene sind nicht-steroidale Verbindungen, welche eine strukturelle Ähnlichkeit zu menschlichen Estrogenen (v.a. 17- $\beta$ -Estradiol) aufweisen. Zur Gruppe der Phytoestrogene zählen auch die Isoflavone, die in höheren Konzentrationen in Soja und Rotklee enthalten sind. Für Frauen im Klimakterium werden daher seit einigen Jahren Nahrungsergänzungsmittel mit Zusatz von Soja- oder Rotklee-Extrakt angeboten und als „natürliche“ Alternative zur klassischen Hormon-Ersatz-Therapie beworben. Aus Mangel an zur Verfügung stehenden Standardmaterialien ist die Datenlage über die biologischen Aktivitäten der in solchen Präparaten enthaltenen Isoflavone größtenteils lückenhaft, was eine fundierte Risiko/Nutzen-Abschätzung erschwert. Bislang fehlt eine geeignete Methode zur Analyse und Quantifizierung des Isoflavongehaltes solcher Produkte. Die Isoflavon-Zusammensetzung beider Pflanzen ist sehr unterschiedlich und die jeweiligen Gehalte schwanken stark.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Isolierung und Bereitstellung von Isoflavonen und in der Quantifizierung von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Soja- oder Rotklee-Extrakt.

Mittels High-speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) wurden zunächst die Hauptisoflavone aus diesen Pflanzen isoliert. Die strukturelle Identifizierung der isolierten Isoflavone erfolgte mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie. Für die Isolierung der Isoflavone aus Soja (*Glycine max* L.) wurde zunächst aus gemahlenden und getrockneten Sojabohnen ein entfetteter Extrakt hergestellt, welcher weiter über XAD-7-Material aufgereinigt und konzentriert wurde. Dieser Extrakt wurde mittels HSCCC aufgetrennt unter Verwendung des Fließmittelsystems *tert.*-Butylmethylether/Acetonitril/Wasser im Verhältnis 2/2/3, (V/V/V). Als Majorfraktion wurde dabei das Isoflavon Genistin erhalten, welches ebenso wie 6''-O-Acetyl-daidzin in Reinform vorlag. Auf dem Coil reicherte sich das Isoflavon 6''-O-Acetyl-genistin an, welches über präparative HPLC weiter aufgereinigt wurde. In einer Fraktion dieses HSCCC-Laufs lag ein Gemisch der beiden Isoflavone Daidzin und Glycitin vor. Dieses konnte durch eine Rechromatographie über HSCCC aufgetrennt werden. Dazu wurde einerseits ein Gemisch aus *tert.*-Butylmethylether/Acetonitril/n-Butanol/Wasser im Verhältnis 2/2/1/5, (V/V/V/V) und andererseits ein Stufengradient verwendet. Dieser Stufengradient bestand aus dem Fließmittelgemisch *tert.*-Butylmethylether/Acetonitril/n-Butanol/Wasser im Verhältnis 2/1/2/5 (V/V/V/V), welches nach 260 min durch eine andere mobile Phase, bestehend aus TBME abgesättigtem Wasser und Acetonitril (im Verhältnis 10/1, V/V) ersetzt wurde. Unter

Verwendung dieses Stufengradienten wurden die Isoflavone Daidzin und Glycitin in Reinform erhalten. Als besonders geeignet für die Trennung der glykosidisch gebundenen Isoflavone aus Rotklee (*Trifolium pratense* L.) hat sich das Gemisch aus *tert.*-Butylmethylether/Acetonitril/Wasser im Verhältnis 6/3/8 (V/V/V) herausgestellt. Als Hauptkomponente konnte bei dieser HSCCC-Trennung das Isoflavon Ononin (Formononetin-7-O- $\beta$ -D-glucosid) erhalten werden, welches einer weiteren Aufreinigung über präparative HPLC unterzogen wurde. Nahezu in fast reiner Form lag das Isoflavon Sissotrin (Biochanin A-7-O- $\beta$ -D-glucosid) vor. Darüber hinaus wurden die Isoflavone Irilon-4'-O- $\beta$ -D-glucosid sowie Trifosid (Prunetin-4'-O- $\beta$ -D-glucosid) erhalten, die mittels präparativer HPLC von weiteren Bestandteilen abgetrennt wurden. Als Minorkomponente dieser HSCCC-Trennung gelang es, Acetyl-Ononin zu erhalten. Zur Gewinnung der Isoflavon-Aglykone aus Rotklee wurde einerseits der Coilrückstand der HSCCC-Trennung der Glykoside verwendet und andererseits der hergestellte XAD-7-Extrakt. Unter Verwendung des binären Fließmittelsystems Hexan/EtOAc/Methanol/H<sub>2</sub>O im Verhältnis 6/5/6/5 (V/V/V/V) wurden folgende Isoflavon-Aglykone erfolgreich aus Rotklee isoliert: Formononetin, Biochanin A, Irilon, Prunetin und Calycosin. Dabei lagen diese Isoflavone teilweise in Reinform in den erhaltenen Fraktionen vor (Biochanin A) oder mussten ansonsten mittels präparativer (z.B. Irilon) oder analytischer HPLC (Formononetin) aufgereinigt werden. Zusätzlich erfolgte eine Fraktionierung des Rotklee-Extraktes über Polyamid-Material. In den erhaltenen Fraktionen waren die Isoflavone entsprechend ihrer Polaritäten angereichert, wobei teilweise ebenfalls Minorkomponenten enthalten waren. Einige dieser Minorkomponenten konnten nach Rechromatographie unter Verwendung der HSCCC in einzelnen Fraktionen aufkonzentriert erhalten werden, wozu die Isoflavone Pratensein und Daidzein gehörten.

Für die Quantifizierung von Isoflavonen aus Soja und Rotklee in Nahrungsergänzungsmitteln oder in den jeweiligen Extrakten wurde zunächst eine geeignete HPLC-DAD-Methode erstellt. Eine geeignete Probenaufarbeitung für diese Nahrungsergänzungsmittel wurde entwickelt. Dabei wurden externe Kalibrierfunktionen mit den aus den HSCCC-Trennungen erhaltenen Standardmaterialien erstellt, wobei jeweils die Majorisoflavone berücksichtigt wurden. Insbesondere bei den untersuchten Proben mit Zusatz von Soja-Extrakt ergaben sich große Unterschiede hinsichtlich der Isoflavon-Zusammensetzung sowie im Gesamtgehalt. Die Überprüfung der Identität der in den Nahrungsergänzungsmitteln enthaltenen Isoflavonen erfolgte selektiv mittels eigens entwickelter LC-(ESI)-MS-Analysen. Darüber hinaus wurde schwarzer Soja analysiert. Diese Varietät enthält in der Schale das Anthocyan Cyanidin-3-glucosid.

Ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt war die Analytik und Trennung von Isoflavonen aus Rhizomen der Iris-Pflanze (*Iris germanica*). Es stellte sich heraus, dass diese eine gute Quelle für das Isoflavon Irilon sind, welches sich mit Hilfe der HSCCC gut isolieren lässt (s.u.).

Genuin in den Rhizomen enthalten sind die glykosidisch oder diglykosidisch gebundenen Isoflavone. Das Fließmittelsystem *tert.*-Butylmethylether/*n*-Butanol/Acetonitril/Wasser (2,5/0,5/2/5; V/V/V/V) eignet sich für die Isolierung dieser glykosidischen Isoflavone unter Verwendung der Countercurrent Chromatography. In hoher Reinheit wurden bei dieser Trennung die Isoflavone Iridin, Irilon-Glucosid, sowie Irisolidon-7-O- $\beta$ -D-glucosid erhalten. In einigen Fraktionen waren die Isoflavone Nigricin-4'-O- $\beta$ -D-glucosid und Nigricanin-glucosid enthalten, welche mittels präparativer HPLC gewonnen werden konnten. Ein hydrolysiertes Extrakt aus den Rhizomen der *Iris germanica* eignete sich für die präparative Isolierung von Irilon, das somit für weitere biologische Untersuchungen zur Verfügung steht. Das optimierte binäre Fließmittelgemisch zur Anwendung der HSCCC bestand aus Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser im Verhältnis (6,15/3,85/5/5; V/V/V/V) und ermöglichte die Isolierung der Isoflavone Irilon, Nigricin und Irogenin in hoher Reinheit. Erstmals konnte dabei ein „continuous flow mode“ bei der Countercurrent Chromatography angewendet werden, wobei dieses Isoflavon in größeren Mengen erhalten wird, da der hydrolysierte Extrakt mehrfach injiziert wurde.

Des Weiteren ist im Rahmen dieser Arbeit die Isolierung weiterer Phytoestrogene gelungen. So konnten das C-glucosidisch gebundene Isoflavon Puerarin aus Kudzu (*Pueraria lobata*) sowie das Stilben Resveratrol aus einem Weintraubenschalen-Extrakt isoliert werden.

Im Rahmen eines Screenings erfolgte die Untersuchung von Rotklee (*Trifolium pratense* L.) sowie 15 weiteren *Trifolium*-Arten. Dabei variierte die Isoflavon-Zusammensetzung in den einzelnen Pflanzenteilen und wurde ebenfalls durch den Erntezeitpunkt beeinflusst.

Zur Charakterisierung der *in vitro* antioxidativen Kapazität der natürlich vorkommenden Isoflavone aus Soja (Genistin, Daidzin und Glycitin), Rotklee (Formononetin, Biochanin A und Irilon), und deren pflanzlichen Extrakten wurde der TEAC-Test eingesetzt. Bei allen getesteten Isoflavonen war kein oder nur ein sehr geringes antioxidatives Potenzial festzustellen. Lediglich der Extrakt aus der Schwarzen Sojabohne wies eine mittlere antioxidative Wirkung auf. Darüber hinaus wurde eine mögliche cytotoxische Aktivität der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Pflanzenextrakte bzw. der daraus isolierten Reinsubstanzen überprüft. Dabei konnte nur für das Isoflavon Biochanin A eine leichte zytotoxische Aktivität beobachtet werden.

## Summary

The present work describes the preparative isolation of isoflavones from different sources, such as soy (*Glycine max* L.), red clover (*Trifolium pratense* L.) and iris (*Iris germanica*). Additionally we developed a method for the quantitation of isoflavones in nutritional supplements.

Phytoestrogens like isoflavones are considered to have positive effects on the prevention of cancer, cardiovascular diseases and osteoporosis. Furthermore, the potential of isoflavones occurring in soy and red clover to alleviate climacteric complaints, particularly hot flushes and tachycardic attacks have been demonstrated in several studies. Concerning the possible benefits of phytoestrogens for the human health, several companies offer nutritional supplements based on soy and red clover extracts for postmenopausal women. The concentration of isoflavones in these products is highly variable. Moreover, some studies point out a potential risk of consuming high levels of phytoestrogens due to the likely genotoxicity of e.g. genistein. Our intention was the qualitative and quantitative determination of the isoflavone content in these nutritional supplements in order to compare our results with the labeling of the products. Therefore, primarily pure standards from soy and red clover were isolated on a preparative scale by countercurrent chromatography

Toasted soy flour was defatted with hexane, extracted with methanol and cleaned-up by adsorption on XAD-7 resin. The freeze-dried extract was then separated by HSCCC. The applied binary solvent system consisted of methyl-*tert*-butylether (MTBE)/MeCN/H<sub>2</sub>O in a ratio of (2/2/3; v/v/v). Pure genistin and 6''-O-acetyldaidzin were obtained within one CCC run. The isoflavone 6''-O-acetylgenistin was retained in the coil residue and subjected to semipreparative HPLC for final purification. One fraction was still a mixture of the isoflavones daidzin and glycitin. In order to achieve a complete separation of these compounds, the lyophilized fraction was applied to a second HSCCC separation, using a "one-step-gradient solvent system". The used biphasic solvent system was MTBE/*n*-butanol/acetonitrile/ H<sub>2</sub>O (2/1/2/5; v/v/v/v). After 280 min this initial solvent system was replaced with a mixture of MTBE-saturated water and acetonitrile (10/1; v/v). Both isoflavones (daidzin and glycitin) were obtained in a pure form.

Red clover contains numerous flavonoids and isoflavones, which are mainly present in the aglycone form. We were able to isolate isoflavone aglycones and glycosides from an XAD-7 red clover extract, using different biphasic solvent systems. By application of the biphasic solvent system hexane/EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O (6/5/6/5; v/v/v/v) the isoflavones aglycones were successfully isolated. Pure biochanin A was obtained in one fraction. Some fractions of this HSCCC run had to be further purified by preparative HPLC thereupon the pure isoflavones

formononetin, prunetin and irilone were received. The appropriate solvent system for the HSCCC separation of the glycosidically bound isoflavones was MTBE/MeCN/H<sub>2</sub>O (6/3/8; v/v/v). Pure sissotrin (biochanin A-7-O- $\beta$ -D-glucoside) was obtained in one fraction. Furthermore the isoflavones irilone-4'-O- $\beta$ -D-glucoside and trifoside (prunetin-4'-O- $\beta$ -D-glucoside) were concentrated in two other fractions. The minor compound acetyl-ononin was also obtained in a pure form. In addition, a solid phase extraction on polyamide material was performed, resulting in a fractionation of the red clover extract. Some of the obtained fractions comprised other minor isoflavones that can be isolated by using HSCCC rechromatography.

Purified soy and red clover isoflavones can be used to examine the physiological effects of single compounds and to study their metabolism and bioavailability in detail, or for the quantitation of isoflavones in nutritional supplements.

For the analysis of the major isoflavones in soy-based nutritional supplements we used high performance liquid chromatography (HPLC) with photo diode array detection. Stock solutions of the isolated soy isoflavones genistin, daidzin, glycitin, 6''-O-acetyldaidzin and 6''-O-acetylgenistin were prepared to establish external calibration functions. Isoflavones in soy-based nutritional supplements were identified by HPLC-electrospray ionisation multiple mass spectrometry. An appropriate method for the preparation of the samples was developed. Our analyses revealed certain variations in the isoflavone content of soy-based supplements. The total amount of isoflavones per serving unit in some products was higher than declared on the labeling, although only the major isoflavones were taken into account. Likewise a method for the analyses of nutritional supplements based on red clover extracts was established. Those products showed also a variation in the isoflavone content and the individual composition.

Various isoflavones, mainly in their glycosidically or diglycosidically bound forms were detected in iris species, whereas those with a methylenedioxy-group are of particular interest. Dried rhizomes of *Iris germanica* were extracted with methanol/water (70/30, v/v) and cleaned-up by adsorption on XAD-7 material. The lyophilized extract was used for the separation of glycosidically bound isoflavones by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC). By application of methyl-*tert*-butylether (MTBE)/n-butanol/acetonitrile/water (2.5/0.5/2/5; v/v/v/v) as biphasic solvent system, the isoflavones irilone-glucoside, irisolidon-7-O- $\beta$ -D-glucoside and a glycoside of irigenin (5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-trimethoxyisoflavone) were isolated in a pure form. Nigracin-4'-O- $\beta$ -D-glucoside and nigricanin-glucoside had to be further purified to give the pure compounds. A hydrolysis of an ethanolic extract of *Iris germanica* was carried out, to result in an accumulation of isoflavone-aglycones with a methylenedioxy-group. The HSCCC separation of the hydrolyzed extract was performed with

the solvent system hexane/ethyl acetate/methanol/water (6.15/3.85/5/5; v/v/v/v), resulting in pure irilone. Its methylated derivative was enriched in one CCC fraction. Likewise a continuous flow mode HSCCC with two consecutive sample injections without changing the stationary phase was feasible with this extract. Structural elucidation was made by HPLC-electrospray ionisation multiple mass spectrometry and additionally by 1D and 2D nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Rhizomes of the kudzu plant (*Pueraria lobata*) were analyzed and the isoflavone puerarin isolated by application of HSCCC. Dried grape skin powder was defatted with hexane, extracted with methanol and cleaned-up by adsorption on XAD-7 resin. The freeze-dried extract was then separated with HSCCC by application of hexane/ethyl acetate/methanol/water (2.75/5/2.75/5; v/v/v/v) as biphasic solvent system and pure resveratrol was obtained.

Within a screening we analysed the isoflavone composition of different parts of red clover (flower, leaves, stalks and roots) during various harvesting times. Likewise 15 other *Trifolium* species were analysed.

The antioxidant activity (TEAC values) of the used plant extracts and some pure compounds such as genistin, daidzin, glycitin, biochanin A, formononetin and irilone were determined. Only the extract of black soy showed a significant activity. A screening for potential cytotoxicity (Brine Shrimp Assay) yielded only a weak response for the isoflavone biochanin A.

## 6 Literaturverzeichnis

Rechtsvorschriften und Bewertungsgrundlagen (gültige Fassung: Stand 01.02.2008)

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit, ABl. EG Nr. L 31 S. 1.

Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 20. Dezember 2006 über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel, ABl. EG Nr. L 404 v. 30.12.2006, S 9; Berichtigung vom 18. Januar 2007 durch ABl. EG Nr. L 12 S. 3.

Richtlinie 2002/46/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 10. Juni 2002 zur Angleichung von Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Nahrungsergänzungsmittel, ABl. EG Nr. L 183 S. 51.

Entscheidung der Kommission 2002/657/EG vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 92/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysenmethoden und die Auswertung von Ergebnissen, ABl. L 211 v. 17.08.2002, S. 8-36.

Lebensmittel-, Bedarfgegenstände-, und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch - LFGB) i.d.F. der Bekanntmachung v. 24. April 2006, BGBl. I S. 945.

Gesetz zum Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz) in der Fassung vom 11.12.1998, BGBl. I S. 3586, unter Einarbeitung der Änderung Artikel 2 § 3 Abs. 7 des Gesetzes zur Neuordnung des Lebensmittel- und Futtermittelsrechts vom 1. September 2005, BGBl. I S. 2618, 2655.

Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln (Lebensmittel-Kennzeichnungs-Verordnung – LMKV) vom 22.12.1981, BGBl. I S. 1625-1626; neugefasst durch Bek. V. 15.12.1999 I 2464; zuletzt geändert durch Art. 1 V v. 18.12.2007, I 3011.

Verordnung über Nahrungsergänzungsmittel und zur Änderung der Verordnung über vitaminisierte Lebensmittel (Nahrungsergänzungsmittel-Verordnung – NemV) v. 24. Mai 2004, BGBl. I S. 1011.



Verordnung über nährwertbezogene Angaben bei Lebensmitteln und die Nährwertkennzeichnung von Lebensmitteln (Nährwert-Kennzeichnungs-Verordnung – NKV) v. 25. November 1994, BGBl. I S. 3526, zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 22. Februar 2006, BGBl. I S. 444.

Stellungnahme Nr. 031/2007 des BfR vom 29.10.2007, Isolierte Isoflavone sind nicht ohne Risiko (aktualisierte Stellungnahme).

## Literatur

Adams, M.R.; Golden, D.L.; Williams, J.K.; Franke, A.A.; Register, T.C.; Kaplan, J.R. Soy Protein Containing Isoflavones Reduces the Size of Atherosclerotic Plaques without Affecting Coronary Artery Reactivity in Adult Male Monkeys. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2852-2856.

Adams, N.R. Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens. *Aust. Vet. J.* **1990**, *67*, 197-201.

Adlercreutz, C.H.T.; Goldin, B.R.; Gorbach, S.L.; Hockerstedt, K.A.V.; Watanabe, S.; Hamalainen, E.K.; Markkanen, M.H.; Makela, T.H.; Wahala, K.T.; Hase, T.A.; Fotsis, T. Soybean Phytoestrogen Intake and Cancer Risk. *J. Nutr.* **1995**, *125*, S757-S770.

Adlercreutz, H. Phytoestrogens. State of the art. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **1999**, *7*, 201-207.

Adlercreutz, H. Preface: Phytoestrogens. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* **1998a**, *12*, ix.

Adlercreutz, H. 5. Epidemiology of phytoestrogens: Phytoestrogens. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* **1998b**, *12*, 605-623.

Adlercreutz, H.; Mazur, W. Phyto-Oestrogens and Western Diseases. *Ann. Med.* **1997**, *29*, 95-120.

Adlercreutz, H. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 364-373.

Adlercreutz, H. Phytoestrogens and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *83*, 113-118.

Adlercreutz, H.; Hämäläinen, E.; Gorbach, S.; Goldin, B. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. *Lancet* **1992**, *339*, 1233.

Agarwal, V.K.; Thappa, R.K.; Agarwal, S.G.; Dhar, K.L. Phenolic constituents of *Iris milesii* rhizomes. *Phytochemistry* **1984a**, *23*, 1342-1343.

Agarwal, V.K.; Thappa, R.K.; Agarwal, S.G.; Mehra, M.S.; Dhar, K.L. Isoflavones of two *Iris* species. *Phytochemistry* **1984b**, *23*, 2703-2704.

Akashi, T.; Aoki, T.; Ayabe, S.-I. Cloning and Functional Expression of a Cytochrome P450 cDNA Encoding 2-Hydroxyisoflavone Synthase Involved in Biosynthesis of the Isoflavonoid Skeleton in Licorice. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 821-828.

- Akashi, T.; Ishizaki, M.; Aoki, T.; Ayabe, S.I. Isoflavonoid production by adventitious-root cultures of *Iris germanica* (Iridaceae). *Plant Biotechnology (Tokyo)* **2005**, *22*, 207-215.
- Akiyama, T.; Ishida, J.; Nakagawa, S.; Ogawara, H.; Watanabe, S.; Itoh, N.; Shibuya, M.; Fukami, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5592-5595.
- Al-Ani, H.A.M.; Dewick, P.M. Isoflavone biosynthesis in *Onobrychis viciifolia*: Formononetin and texasin as precursors of afrormosin. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2337-2339.
- Al-Khalil, S.; Al-Eisawi, D.; Kato, M.; Iinuma, M. New isoflavones from *Iris nigricans*. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 201-205.
- Al-Khalil, S.; Tosa, H.; Iinuma, M. A xanthone C-glycoside from *Iris nigricans*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 729-731.
- Alexandersen, P.; Toussaint, A.; Christiansen, C.; Devogelaer, J.-P.; Roux, C.; Fechtenbaum, J.; Gennari, C.; Reginster, J.Y. for the Ipriflavone Multicenter European Fracture Study. Ipriflavone in the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis: A Randomized Controlled Trial. *J. Am. Med. Assoc. (JAMA)* **2001**, *285*, 1482-1488.
- Ali, A.A. Three isoflavonoids from *Iris germanica*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2061-2063.
- Allred, C.D.; Allred, K.F.; Ju, Y.H.; Clausen, L.M.; Doerge, D.R.; Schantz, S.L.; Korol, D.L.; Wallig, M.A.; Helferich, W.G. Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 211-218.
- Allred, C.D.; Allred, K.F.; Ju, Y.H.; Virant, S.M.; Helferich, W.G. Soy Diets Containing Varying Amounts of Genistein Stimulate Growth of Estrogen-dependent (MCF-7) Tumors in a Dose-dependent Manner. *Cancer Res.* **2001a**, *61*, 5045-5050.
- Allred, C.D.; Ju, Y.H.; Allred, K.F.; Chang, J.; Helferich, W.G. Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis* **2001b**, *22*, 1667-1673.
- Anderson, J.E.; Goetz, C.M.; McLaughlin, J.L.; Suffness, M. A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. *Phytochem. Anal.* **1991**, *2*, 107-111.
- Anderson, J.J.B.; Chen, X.; Boass, A.; Symons, M.; Kohlmeier, M.; Renner, J.B.; Garner, S.C. Soy Isoflavones: No Effects on Bone Mineral Content and Bone Mineral Density in Healthy, Menstruating Young Adult Women after One Year. *J. Am. Coll. Nutr.* **2002**, *21*, 388-393.
- Anderson, J.J.; Anthony, M.S.; Cline, J.M.; Washburn, S.A.; Garner, S.C. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nutr.* **1999**, *2*, 489-504.
- Araya, J.; Rodrigo, R.; Videla, L.A.; Thielemann, L.; Orellana, M.; Pettinelli, P.; Poniachik, J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci.* **2004**, *106*, 635-643.
- Arifkhodzhaev, Kh.A.; Tukhtasinova, M.M.; Khamidkhodzhaev, S.A. Polysaccharides of iridaceae. III. Amounts of carbohydrates in plants of the genus *Crocus* and *Juno*. *Chem. Nat. Compd.* **1986**, *22*, 472-473.

- Arjmandi, B.H.; Lucas, E.A.; Khalil, D.A.; Devareddy, L.; Smith, B.J.; McDonald, J.; Arquitt, A.B.; Payton, M.E.; Mason, C. One year soy protein supplementation has positive effects on bone formation markers but not bone density in postmenopausal women. *Nutr. J.* **2005**, 4,8.
- Arora, A.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M. Antioxidant Activities of Isoflavones and Their Biological Metabolites in a Liposomal System. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 356, 133-141.
- Atkinson, C.; Warren, R.M.L.; Sala, E.; Dowsett, M.; Dunning, A.M.; Healey, C.S.; Runswick, S.; Day, N.E.; Bingham, S.A. Red clover-derived isoflavones and mammographic breast density: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Breast Cancer Res.* **2004**, 6, R170-R179.
- Atkinson, C.; Frankenfeld, C.L.; Lampe, J.W.. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp. Biol. Med.* **2005**, 230, 155-170.
- Atluru, S.; Atluru, D. Evidence that genistein, a protein-tyrosine kinase inhibitor, inhibits CD28 monoclonal-antibody-stimulated human T cell proliferation. *Transplantation* **1991**, 51, 448-50.
- Atta-ur-Rahman; Nasim, S.; Baig, I.; Ara Jahan, I.; Sener, B.; Orhan, I.; Choudhary, M.I. Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica*. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 1100-1102.
- Ayres, D.C.; Loike, J.D.; Lignans - chemical, biological and clinical properties. Cambridge University press, Cambridge, **1990**.
- Bärtels, A. *Tropenpflanzen: Zier- und Nutzpflanzen*, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 5. überarbeitete Auflage, S. 219, **2002**.
- Bairey Merz, C.N.; Johnson, B.D.; Braunstein, G.D.; Pepine, C.J.; Reis, S.E.; Paul-Labrador, M.; Hale, G.; Sharaf, B.L.; Bittner, V.; Sopko, G.; Kelsey, S.F. for the Women's Ischemia Syndrome Evaluation Study Group. Phytoestrogens and Lipoproteins in Women. *J Clin Endocrinol Metab* **2006**, 91, 2209-2213.
- Baker, L.; Meldrum, K.K.; Wang, M.; Sankula, R.; Vanam, R. ; Raiesdana, A.; Tsai, B.; Hile, K.; Brown, J.W.; Meldrum, D.R. The role of estrogen in cardiovascular disease. *J. Surgic. Res.* **2003**, 115, 325-344.
- Balk, J.L.; Whiteside, D.A.; Naus, G.; DeFerrari, E.; Roberts, J.M. A Pilot Study of the Effects of Phytoestrogen Supplementation on Postmenopausal Endometrium. *J. Soc. Gynecol. Invest.* **2002**, 9, 238-242.
- Bandyukova, V.A.; Kazakov, A.L. Advances in the chemistry of natural isoflavonoids. *Chem. Nat. Compd.* **1978**, 14, 569-586.
- Barahona, M.V.; Sánchez-Fortún, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environ. Pollut.* **1999**, 104, 469-476.
- Barnes, S. 2. Phytoestrogens and breast cancer. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* **1998**, 12, 559-579.
- Barnes, S.; Kirk, M.; Coward, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 2466-2474.
- Beaglehole, R. International trends in coronary heart disease mortality, morbidity, and risk factors. *Epidemiol. Rev.* **1990**, 12, 1-15.

- Beck, V.; Rohr, U.; Jungbauer, A. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005a**, *94*, 499-518.
- Beck, V.; Rohr, U.; Jungbauer, A. *Phytoöstrogene aus Rotklee, Deutsche Apotheker Zeitung* **2005b**, *145* (51/52), 93-95.
- Becker, K.; John, S. *Farbatlas Nutzpflanzen in Mitteleuropa*, Verlag Eugen Ulmer, **2000**.
- Belitz, H.D.; Grosch, W. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. überarbeitete Auflage, Springer Verlag, Berlin, **1992**.
- Bennetts, H.W.; Underwood, E.J.; Shier, F.L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust. Vet. J.* **1946**, *22*, 2-12.
- BfR, Stellungnahme Nr. 023/2007 vom **03.04.2007**: Isolierte Isoflavone sind nicht ohne Risiko.
- BfR, updated BfR Expert Opinion, No. **039/2007**: Isolated isoflavones are not without risk, 1-23.
- Berhow, M.A.; Kong, S.B.; Vermillion, K.E.; Duval, S.M. Complete Quantification of Group A and Group B Soyasaponins in Soybeans. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2035-2044.
- Berhow, M.S.; Vaughn, S.F. Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. In: Inderjit, S., Dakshini, K.M.M., and Foy, C.L. (Hrsgg.) *Principles and Practices in Plant Ecology*. Boca Raton: *CRC Press* **1999**, 423-438.
- Biggs, D.R.; Lane, G.A. Identification of isoflavones calycosin and pseudobaptigenin in *Trifolium pratense*. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1683-1684.
- Bingham, S.A.; Atkinson, C.; Liggins, J.; Bluck, L.; Coward, A. Phyto-Oestrogens: Where Are We Now? *Br. J. Nutr.* **1998**, *79*, 393-406.
- Bloedon, L.T.; Jeffcoat, A.R.; Lopaczynski, W.; Schell, M.J.; Black, T.M.; Dix, K.J.; Thomas, B.F.; Albright, C.; Busby, M.G.; Crowell, J.A.; Zeisel, S.H. Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 1126-1137.
- Blumenthal, G.; Linke, D.; Vieth, S. Grundlegende Probleme der Analytischen Chemie. In: *Chemie: Grundwissen für Ingenieure*, Teubner-Verlag **2006**, 509-514.
- Bonfils, J.-P.; Sauvaire, Y. Localization of iridals in *Iris germanica* rhizomes. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1281-1285.
- Booth, N.L.; Overk, C.R.; Yao, P.; Totura, S.; Deng, Y.; Hedayat, A.S.; Bolton, J.L.; Pauli, G.F.; Farnsworth, N.R. Seasonal Variation of Red Clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) Isoflavones and Estrogenic Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006a**, *54*, 1277-1282.
- Booth, N.L.; Overk, C.R.; Yao, P.; Burdette, J.E.; Nikolic, D.; Chen, S.-N.; Bolton, J.L.; Breemen, R.B.v.; Pauli, G.F.; Farnsworth, N.R. The Chemical and Biologic Profile of a Red Clover (*Trifolium pratense* L.) Phase II Clinical Extract. *J. Altern. Complement. Med.* **2006b**, *12*, 133-139.
- Booth, N.L.; Piersen, C.E.; Banuvar, S.; Geller, S.E.; Shulman, L.P.; Farnsworth, N.R. Clinical studies of red clover (*Trifolium pratense*) dietary supplements in menopause: a literature review. *Menopause* **2006c**, *13*, 251-264.
- Borsche, W.; Niemann, J. Über Podophyllin. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1932**, *494*, 126-142.

- Bouker, K.B.; Hilakivi-Clarke, L. Genistein: Does It Prevent or Promote Breast Cancer? *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108*, 701-708.
- Branca, F. Dietary phyto-oestrogens and bone health. *Proc. Nutr. Soc.* **2007**, *62*, 877-887.
- Brücher, H. *Tropische Nutzpflanzen – Ursprung, Evolution und Domestikation*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, **1977**.
- Busby, M.G.; Jeffcoat, A.R.; Bloedon, L.T.; Koch, M.A.; Black, T.; Dix, K.J.; Heizer, W.D.; Thomas, B.F.; Hill, J.M.; Crowell, J.A.; Zeisel, S.H. Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *75*, 126-136.
- Buttery, R.G.; Kamm, J.A.; Ling, L.C. Volatile components of red clover leaves, flowers, and seed pods: possible insect attractants. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 254-256.
- Button, B.; Patel, N. Phytoestrogens for osteoporosis. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* **2004**, *2*, 341-356.
- Bylund, A.; Zhang, J.-X.; Bergh, A.; Damber, J.-E.; Widmark, A.; Johansson, A.; Adlercreutz, H.; Åman, P.; Shepherd, M.J.; Hallmans, G. Rye Bran and Soy Protein Delay Growth and Increase Apoptosis of Human LNCaP Prostate Adenocarcinoma in Nude Mice. *Prostate* **2000**, *42*, 304-314.
- Cao, X.; Tian, Y.; Zhang, T.; Li, X.; Ito, Y. Separation and purification of isoflavones from *Pueraria lobata* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **1999**, *855*, 709-713.
- Carai, M.A.M.; Agabio, R.; Bombardelli, E.; Bourov, I.; Gessa, G.L.; Lobina, C.; Morazzoni, P.; Pani, M.; Reali, R.; Vacca, G.; Colombo, G. Potential use of medicinal plants in the treatment of alcoholism. *Fitoterapia* **2000**, *71*(Suppl. 1), S38-S42.
- Carballo J.L.; Hernández-Inda, Z.; Pérez, P.; Carcía-Grávalos, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* **2002**, *2*, 17-21.
- Carnovale, E.; Lugaro, E.; Lombardi-Boccia, G. Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. *Cereal Chem.* **1988**, *65*, 114-117.
- Cassidy, A.; Bingham, S.; Setchell, K. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 333-340.
- Cassidy, A.; Faughnan, M. Phyto-Oestrogens Through the Life Cycle. *Proc. Nutr. Soc.* **2000**, *59*, 489-496.
- Cassidy, A.; Griffin, B. Phyto-Oestrogens: a Potential Role in the Prevention of CHD? *Proc. Nutr. Soc.* **1999**, *58*, 193-199.
- Cassidy, A.; Hanley, B.; Lamuela-Raventos, R.M. Isoflavones, Lignans and Stilbenes - Origins, Metabolism and Potential Importance to Human Health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1044-1062.
- Castro, A.F.; Altenberg, G.A. Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 89-93.
- Chan, A.C. Vitamin E and Atherosclerosis. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1593-1596.



- Chang, H.C.; Doerge, D.R. Dietary Genistein Inactivates Rat Thyroid Peroxidase in Vivo without an Apparent Hypothyroid Effect. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**, *168*, 244-252.
- Chang, Y.C.; Nair, M.G. Metabolism of Daidzein and Genistein by Intestinal Bacteria. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1892-1896.
- Cheftel, J.C.; Food and nutrition labelling in the European Union. *Food Chem.* **2005**, *93*, 531-550.
- Chen, L.J.; Zhao, X.; Plummer, S.; Tang, J.; Games, D.E. Quantitative determination and structural characterization of isoflavones in nutrition supplements by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1082*, 60-70.
- Chen, S.-B.; Liu, H.-P.; Tian, R.-T.; Yang, D.-J.; Chen, S.-L.; Xu, H.-X.; Chan, A.S.C.; Xie, P.-S. High-performance thin-layer chromatographic fingerprints of isoflavonoids for distinguishing between *Radix Puerariae Lobate* and *Radix Puerariae Thomsonii*. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1121*, 114-119.
- Cheryan, M. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1980**, *13*, 297-335.
- Chorazy, P.A.; Himelhoch, S.; Hopwood, N.J.; Greger, N.G.; Postellon, D.C. Persistent Hypothyroidism in an Infant Receiving a Soy Formula: Case Report and Review of the Literature. *Pediatrics* **1995**, *96*, 148-150.
- Choudhary, M Iqbal; Naheed, S; Jalil, S; Alam, J M; Atta-ur-Rahman. Effects of ethanolic extract of *Iris germanica* on lipid profile of rats fed on a high-fat diet. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *98*, 217-20.
- Choung, M.-G.; Baek, I.-Y.; Kang, S.-T.; Han, W.-Y.; Shin, D.-C.; Moon, H.-P.; Kang, K.-H. Isolation and Determination of Anthocyanins in Seed Coats of Black Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5848-5851.
- Chua, R.; Anderson, K.; Chen, J.; Hu, M. Quality, Labeling Accuracy, and Cost Comparison of Purified Soy Isoflavonoid Products. *J. Altern. Complement. Med.* **2004**, *10*, 1053-1060.
- Clarke, C.A.; Glaser, S.L.; Uratsu, C.S.; Selby, J.V.; Kushi, L.H.; Herrington, L.J. Recent declines in hormone therapy utilization and breast cancer incidence: clinical and population-based evidence. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, e49-e50.
- Clarke, D.B.; Lloyd, A.S.; Botting, N.P.; Oldfield, M.F.; Needs, P.W.; Wiseman, H. Measurement of intact sulfate and glucuronide phytoestrogen conjugates in human urine using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]isoflavone internal standards. *Anal. Biochem.* **2002**, *309*, 158-172.
- Clement, M.-V.; Hirpara, J.L.; Chawdhury, S.-H.; Pervaiz, S. Chemopreventive Agent Resveratrol, a Natural Product Derived From Grapes, Triggers CD95 Signaling-Dependent Apoptosis in Human Tumor Cells. *Blood* **1998**, *92*, 996-1002.
- Clifford, M.N. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1063-1072.
- Coldham, N.G.; Darby, C.; Hows, M.; King, L.J.; Zhang, A.-Q.; Sauer, M.J. Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism. *Xenobiotica* **2002**, *32*, 45-62.

- Coldham, N.G.; Howells, L.C.; Santi, A.; Montesissa, C.; Langlais, C.; King, L.J.; Macpherson, D.D.; Sauer, M.J. Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by product ion mass fragmentologyn. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *70*, 169-184.
- Conway, W.D. *Countercurrent Chromatography: apparatus, theory, and application*, VCH publishers, Inc.: New York, NY, USA, **1990**.
- Cordle, C.T.; Winship, T.R.; Schaller, J.P.; Thomas, D.J.; Buck, R.H.; Ostrom, K.M.; Jacobs, J.R.; Blatter, M.M.; Cho, S.; Gooch, W.M.3rd; Pickering, L.K. Immune status of infants fed soy-based formulas with or without added nucleotides for 1 year: part 2: immune cell populations. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2002**, *34*, 145-153.
- COT (Committee on Toxicity) of the Food, Consumer Products and the Environment. *Phytoestrogens and Health, Report 2003*. **2003**.
- Copeland, D.E. A study of salt secreting cells in the brine shrimp (*Artemia salina*). *Protoplasma* **1967**, *63*, 363-384.
- Cornelius, P.L.; Taylor, N.L. Phenotypic recurrent selection for intensity of petal color in red clover. *J. Hered.* **1981**, *72*, 275-278.
- Cornwell, T.; Cohick, W.; Raskin, I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 995-1016.
- Couladis M.; Badisa, R.B.; Baziou, P.; Chaudhuri, S.K.; Pilarinou, E.; Verykokidou, E.; Harvala, C. Antioxidant and Cytotoxic Activities of Hypericum sp. on Brine Shrimps and Human Cancer Cell Lines. *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 719-722.
- Coward, L.; Barnes, N.C.; Setchell, K.D.R.; Barnes, S. Genistein, Daidzein, and Their  $\beta$ -Glycoside Conjugates: Antitumor Isoflavones in Soybean Foods From American and Asian Diets. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1961-1967.
- Coward, L.; Smith, M.; Kirk, M.; Barnes, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 1486S-1491.
- Croghan, P.C. The survival of *Artemia salina* (L.) in various media. *J. Exp. Biol.* **1958**, *35*, 213-218.
- DAB (*Deutsches Arzneibuch*) 2005; Deutscher Apotheker Verlag, **2005**.
- Da Costa César, I.; Braga, F.C.; Soares, C.D.V.; de Aguiar Nunan, E.; Pianetti, G.A.; Condessa, F.A.; Barbosa, T.A.F.; Campos, L.M.M. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *J. Chromatogr. B.* **2006**, *836*, 74-78.
- Davis, D.D.; Diaz-Cruz, E.S.; Landini, S.; Kim, Y.-W.; Brueggemeier, R.W. Evaluation of synthetic isoflavones on cell proliferation, estrogen receptor binding affinity, and apoptosis in human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Molecular Biol.* **2008**, *108*, 23-31.
- Davis, D.E.; Funderburk, H.H.Jr. Eradication of Kudzu. *Weeds* **1964**, *12*, 62-63.
- Day, A.J.; DuPont, M.S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes, M.J.C.; Morgan, M.R.A.; Williamson, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. *FEBS Letters* **1998**, *436*, 71-75.

- De Almeida Alves, T.M.; Fonseca Silva, A.; Brandao, M.; Mesquita Grandi, T.S.; de Fátima A Smânia, E.; Smânia Júnior, A.; Leomar Zani, C. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2000**, *95*, 367-373.
- de Laire, G.; Tiemann, F. Iridin, the glucoside of the iris root. *J. Am. Chem. Soc.* **1893**, *15*, 400-411.
- de Pascual-Teresa, S.; Hallund, J.; Talbot, D.; Schroot, J.; Williams, C.M.; Bugel, S.; Cassidy, A. Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, *17*, 257-264.
- de Rijke, E.; Zafra-Gomez, A.; Ariese, F.; Brinkman, U.A.Th.; Gooijer, C. Determination of isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pratense* L. (red clover) extracts: quantification and stability studies. *J. Chromatogr. A* **2001**, *932*, 55-64.
- Deavours, B.E.; Liu, C.-J.; Naoumkina, M.A.; Tang, Y.; Farag, M.A.; Sumner, L.W.; Noel, J.P.; Dixon, R.A. Functional analysis of members of the isoflavone and isoflavone O-methyltransferase enzyme families from the model legume. *Medicago truncatula*. *Plant. Mol. Biol.* **2006**, *62*, 715-733.
- Degenhardt, A.; Winterhalter, P. Isolation and Purification of Isoflavones From Soy Flour by High-Speed Countercurrent Chromatography. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *213*, 277-280.
- Degenhardt, A.; Habben, S.; Winterhalter, P. Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *943*, 299-302.
- Delmonte, P.; Perry, J.; Rader, J.I. Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and kudzu: Extraction followed by basic or acid hydrolysis. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1107*, 59-69.
- Dewell, A.; Hollenbeck, P.L.W.; Hollenbeck, C.B. A Critical Evaluation of the Role of Soy Protein and Isoflavone Supplementation in the Control of Plasma Cholesterol Concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 772-780.
- Dewick, P.M. Pterocarpan biosynthesis: chalcone and isoflavone precursors of demethylhomopterocarpan and maackiain in *Trifolium pratense*. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 979-982.
- Dewick, P.M.; Ward, D. Isoflavone precursors of the pterocarpan phytoalexin maackiain in *Trifolium pratense*. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1751-1754.
- Dhar, K.L.; Kalla, A.K. Isoflavones of *Iris kumaonensis* and *I. germanica*. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 3097-3098.
- Diepenbrock W.; Fischbeck, G.; Heyland, K.-U.; Knauer, N. *Spezieller Pflanzenbau*, 3. neubearbeitete und ergänzte Auflage, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, **1999**.
- Dietrich, H.; Pour Nikfardjam, M.; Patz, C.-D. Bedeutung und Vorkommen von Resveratrol in Rot- und Weißwein. In: *Deutsches Weinbau-Jahrbuch* **1999**, *50*, 221-230.
- Dittrich, K.; Leitzmann, C.; *Bioaktive Substanzen*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1996**.
- Di Virgilio, A.L.; Iwami, K.; Wätjen, W.; Kahl, R.; Degen, G.H. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicol. Lett.* **2004**, *151*, 151-162.



- Divi, R.L.; Chang, H.C.; Doerge, D.R. Anti-Thyroid Isoflavones from Soybean. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *54*, 1087-1096.
- Dixon, R.A.; Paiva N.L. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* **1995**, *7*, 1085-1097.
- Dixon, R.A.; Steele, C.L. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* **1999**, *4*, 394-400.
- Dixon, R.A.; Ferreira, D. Genistein. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 205-211.
- Dixon, R.A. Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 225-261.
- Djuric, Z.; Chen, G.; Doerge, D.R.; Heilbrun, L.K.; Kucuk, O. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Lett.* **2001**, *172*, 1-6.
- Doerge, D.R.; Churchwell, M.I.; Chang, H.C.; Newbold, R.R.; Delclos, K.B. Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod. Toxicol.* **2001**, *15*, 105-110.
- Doerge, D.R.; Chang, H.C. Inactivation of thyroid peroxidase by soy isoflavones, *in vitro* and *in vivo*. *J. Chromatogr. B* **2002**, *777*, 269-279.
- Domon, B.; Castello, C.E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* **1988**, *5*, 397-409.
- Donnelly, D.M.X.; Boland, G.M. Isoflavonoids and Neoflavonoids: Naturally Occuring O-Heterocycles. *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12*, 321-338.
- Dornstauder, E.; Jisa, E.; Unterrieder, I.; Krenn, L.; Kubelka, W.; Jungbauer, A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon<sup>®</sup>) intended for large scale use in hormone replacement therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *78*, 67-75.
- Duncan, A.M.; Merz, B.E.; Xu, X.; Nagel, T.C.; Phipps, W.R.; Kurzer, M.S. Soy Isoflavones Exert Modest Hormonal Effects in Premenopausal Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 192-197.
- Dylan, T.; Ielpi, L.; Stanfield, S.; Kashyap, L.; Douglas, C.; Yanofsky, M.; Nester, E.; Helinski, D.R.; Ditta, G. Rhizobium meliloti Genes Required for Nodule Development are Related to Chromosomal Virulence Genes in Agrobacterium tumefaciens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 4403-4407.
- Ebmeier, C.C.; Anderson, R.J. Human Thyroid Phenol Sulfotransferase Enzymes 1A1 and 1A3: Activities in Normal and Diseased Thyroid Glands, and Inhibition by Thyroid Hormones and Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 5597-5605.
- Edwards, R.; Tiller, S.A.; Parry, A.D. The effect of plant age and nodulation on the isoflavonoid content in red clover (*Trifolium pratense*). *J. Plant Physiol.* **1997**, *150*, 603-610.
- Eldridge, A.; Kwolek, W.F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 394-396.
- Ermer, J. und Miller, J. H. (Hrsgg.) *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2005**.

- Espín, J.C.; García-Conesa, M.T.; Tomás-Barberán, F.A. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2986-3008.
- Fang, J.-L.; Vaca, C.E.; Valsta, L.M.; Mutanen, M. Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 1035-1040.
- Fang, R.; Houghton, P.J.; Luo, C.; Hylands, P.J. Isolation and structure determination of triterpenes from *Iris tectorum*. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1242-1247.
- Farag, S.F.; Backheet, E.Y.; El-Emary, N.A.; Niwa, M. Isoflavonoids and flavone glycosides from rhizomes of *Iris cartholiniae*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1407-1410.
- Farmakalidis, E.; Murphy, P.A. Isolation of 6"-O-acetylgenistin and 6"-O-acetyl daidzin from toasted defatted soyflakes. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 385-389.
- Ferretti, G.; Bacchetti, T.; Menanno, F.; Curatola, G. Effect of genistein against copper-induced lipid peroxidation of human high density lipoproteins (HDL). *Atherosclerosis* **2004**, *172*, 55-61.
- Food and Drug Administration. Food labeling: health claims; soy protein and coronary artery disease. *Fed. Regist.* **1999**, *64*, 57699-57733.
- Ford, J.D.; Huang, K.-S.; Wang, H.-B.; Davin, L.B.; Lewis, N.G. Biosynthetic Pathway to the Cancer Chemopreventive Secoisolariciresinol Diglucoside-Hydroxymethyl Glutaryl Ester-Linked Lignan Oligomers in Flax (*Linum usitatissimum*) Seed. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1388-1397.
- Franke, A.S.; Custer, L.J.; Cerna, C.M.; Narala, K. Rapid HPLC Analysis of Dietary Phytoestrogens from Legumes and from Human Urine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1995**, *208*, 18-26.
- Franke, W. *Nutzpflanzenkunde*, 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Ausgabe von Lieberei, R. und Reisdorff, C., Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2007**.
- Franke, W. *Nutzpflanzenkunde – Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen*, 6. überarbeitete und erweiterte Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, **1997**.
- Frankenfeld, C.L.; Atkinson, C.; Thomas, W.K.; Goode, E.L.; Gonzalez, A.; Jokela, T.; Wahala, K.; Schwartz, S.M.; Li, S.S.; Lampe, J.W. Familial correlations, segregations analysis, and non-genetic correlates of soy isoflavone-metabolizing phenotypes. *Exp. Biol. Med.* **2004**, *229*, 902-913.
- Franzke, C. *Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 3. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, **1996** (Nachdruck 1998).
- Fujiwara, S.; Huang, C.; Ross, P.D.; Yamada, M.; Kodama, K.; Davis, J.W.; Wasnich, R.D. Differences in health characteristics between native Japanese and Japanese-Americans. *J. Cross-Cultural Gerontol.* **1999**, *14*, 273-287.
- Fukushima, D. Fermented vegetable (soybean) protein and related foods of Japan and China. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1979**, *56*, 357-362.
- Galati, G.; O'Brien, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37*, 287-303.
- García R.; Lemus, I.; Rivera, P.; Erazo, S. Biological and chemical study of paico (*Chenopodium chilense*, Chenopodiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *57*, 85-88.

- Gavaler, J.S.; Rosenblum, E.R.; van Thiel, D.H.; Eagon, P.K.; Pohl, C.R.; Campbell, I.M.; Gavaler, J. Biologically Active Phytoestrogens Are Present in Bourbon. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **1987**, *11*, 399-406.
- GEKID (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut) *Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends*, 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken **2006**.
- Gierus, M.; Herrman, A.; Kruse, S.; Kleen, J.; Taube, F. *Veränderung der Rohproteinfraktion A (NPD) verschiedener Futterpflanzen im Vegetationsverlauf*, Mitteilungen der Arbeitsgemeinschaft Grünland und Futterbau, Band 7, 111-114, **2005**.
- Gorham, J. The stilbenoids. *Prog. Phytochem.* **1980**, *6*, 203-252.
- Grace, P.B.; Taylor, J.I.; Low, Y.L.; Luben, R.N.; Mulligan, A.A.; Botting, N.P.; Dowsett, M.; Welch, A.A.; Khaw, K.T.; Wareham, N.J.; Day, N.D.; Bingham, S.E. Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Norfolk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2004**, *13*, 698-708.
- Graham, T.L.; Kim, J.E.; Graham, M.Y. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1990**, *3*, 157-166.
- Grasmeier, H. *Zur Analytik der Isoflavone*, Dissertation München, **1959**.
- Gray, S. Breast cancer and hormone-replacement therapy: the Million Women Study. *Lancet* **2003**, *362*, 1332.
- Grisebach, H.; Barz, W. Biochemie der Flavonoide. *Naturwissenschaften* **1969**, *56*, 538-544.
- Gulati, O.P.; Berry Ottaway, P. Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. *Toxicology* **2006**, *221*, 75-87.
- Guo, T.L.; Zhang, X.L.; Bartolucci, E.; McCay, J.A.; White, K.L.; You, L. Genistein and methoxychlor modulate the activity of natural killer cells and the expression of phenotypic markers by thymocytes and splenocytes in F0 and F1 generations of Sprague-Dawley rats. *Toxicology* **2002**, *172*, 205-215.
- Gutteridge, J.M.C.; Halliwell, B. Iron toxicity and oxygen radicals: Iron Chelating Therapy. *Baillière's Clinical Haematology* **1989**, *2*, 195-256.
- HAB (*Homöopathisches Arzneibuch*) 2006; Deutscher Apotheker Verlag, **2006**.
- Hänsel, R. Sekundäre Pflanzenstoffe in Nahrungsergänzungsmitteln, Kapitel 15. In: Hänsel, R.; Sticher, O. (Hrsgg) *Pharmakognosie und Phytopharmazie*. 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2007**, 385-430.
- Hakim, A.M.A.A.; Dewick, P.M. Isoflavone biosynthesis in *Onobrychis Viciifolia*: formononetin and texasin as precursors of afrormosin. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2337-2339.
- Hakkak, R.; Korourian, S.; Shelnutt, S.R.; Lensing, S.; Ronis, M.J.J.; Badger, T.M. Diets Containing Whey Proteins or Soy Protein Isolate Protect against 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced Mammary Tumors in Female Rats. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2000**, *9*, 113-117.

- Hale, G.E.; Hughes, C.L.; Cline, J.M. Endometrial Cancer: Hormonal Factors, the Perimenopausal "Window of Risk," and Isoflavones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 3-15.
- Hale, G.; Bievre, M.; Hughes, C. Exploring the role of progestins and phytoestrogens in menopause. *Integr. Med.* **2000**, *2*, 133-141.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *280*, 1-8.
- Hanawa, F.; Tahara, S.; Mizutani, J. Isoflavonoids produced by *Iris pseudacorus* leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 157-163.
- Harborne, J.B.; *The Flavonoids, Advances in Research since 1986*, Chapman and Hall, London, **1994**.
- Harwig, J.; Scott, P.M. Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) Larvae as a Screening System for Fungal Toxins. *Appl. Microbiol.* **1971**, *21*, 1011-1016.
- Hebert, J.R.; Hurley, T.G.; Olendzki, B.C.; Tea, J.; Ma, Y.; Hampl, J.S. Nutritional and Socioeconomic Factors in Relation to Prostate Cancer Mortality: a Cross-National Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 1637-1647.
- Hegnauer, R.; J. Grayer-Barkmeijer, R. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: A chemotaxonomic approach. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 3-16.
- Hegnauer, R.; Hegnauer, M. *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Xlb-1, Leguminosae, Teil 2, Birkhäuser Verlag, **1996**.
- Heichel, G.H.; Vance, C.P.; Barnes, D.K.; Henjum, K.I. Dinitrogen Fixation, and N and Dry Matter Distribution During 4 Year Stands of Birdsfoot Trefoil and Red Clover. *Crop. Sci.* **1985**, *25*, 101-105.
- Heinonen, S.; Nurmi, T.; Liukkonen, K.; Poutanen, K.; Wähälä, K.; Deyama, T.; Nishibe, S.; Adlercreutz, H. In Vitro Metabolism of Plant Lignans: New Precursors of Mammalian Lignans Enterolactone and Enterodiol. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3178-3186.
- Heinonen, S.; Wähälä, K.; Adlercreutz, H. Identification of Isoflavone Metabolites Dihydrodaidzein, Dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in Human Urine by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy Using Authentic Reference Compounds. *Anal. Biochem.* **1999**, *274*, 211-219.
- Heinonen, S.M.; Hoikkala, A.; Wähälä, K.; Adlercreutz, H. Metabolism of the Soy Isoflavones Daidzein, Genistein and Glycitein in Human Subjects. Identification of New Metabolites Having an Intact Isoflavonoid Skeleton. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *87*, 285-299.
- Heinonen, S.-M.; Wähälä, K.; Adlercreutz, H. Identification of Urinary Metabolites of the Red Clover Isoflavones Formononetin and Biochanin A in Human Subjects. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6802-6809.
- Heldt H.W.; *Pflanzenbiochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, **1996**, 285-299.
- Henderson, B.E.; Ross, R.K.; Judd, H.L.; Krailo, M.D.; Pike, M.C. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer* **1985**, *56*, 1206-1208.

- Hillebrand, S. *Analytik von Polyphenolen in Buntsäften im Hinblick auf Saftqualität, Farbe und antioxidative Aktivität*, Cuvillier Verlag Göttingen, **2004** (zugleich Dissertation TU Braunschweig).
- Hlasiwetz, H. Über die Wurzel de *Ononis Spinosa*. *Journ. f. prakt. Chemie* **1855**, 65(1), 419-450.
- Hodgson, J.M.; Puddey, I.B.; Croft, K.D.; Mori, T.A.; Rivera, J.; Beilin, L.J. Isoflavonoids do not inhibit in vivo lipid peroxidation in subjects with high-normal blood pressure. *Atherosclerosis* **1999**, 145, 167-172.
- Hoja, B.; Jahreis, G. Leinsamenlignane als potentielle Bestandteile von Functional Foods. *aid Verbraucherdienst* **2000**, 45(11), 634-637.
- Hondelmann, W. *Die Kulturpflanzen der griechisch-römischen Welt – Pflanzliche Ressourcen der Antike*, Gebr. Borntraeger, Berlin Stuttgart, **2002**.
- Horn-Ross, P.L.; Barnes, S.; Lee, M.; Coward, L.; Mandel, J.E.; Koo, J.; John, E.M.; Smith, M. Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes & Control* **2000**, 11, 289-298.
- Houghton, P.J.; Howes, M.-J.; Lee, C.C.; Steventon, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, 110, 391-400.
- Howes, L.G.; Howes, J.B.; Knight, D.C. Isoflavone therapy for menopausal flushes: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas* **2006**, 55, 203-211.
- Hsieh, C.-Y.; Santell, R.C.; Haslam, S.Z.; Helferich, W.G. Estrogenic Effects of Genistein on the Growth of Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer (MCF-7) Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* **1998**, 58, 3833-3838.
- Huang, A.-S.; Hsieh, O.A.L.; Chang, S.S. Characterization of the Nonvolatile Minor Constituents Responsible for the Objectionable Taste of Defatted Soybean Flour. *J. Food Sci.* **1982**, 47, 19-23.
- Humfrey, C.D.N. Phytoestrogens and human health effects: weighing up the current evidence. *Nat Toxins* **1998**, 6, 51-59.
- Hwang, J.; Sevanian, A.; Hodis, H.N.; Ursini, F. Synergistic inhibition of LDL oxidation by phytoestrogens and ascorbic acid. *Free Radic.Biol. Med.* **2000**, 29, 79-89.
- Ingham, J.L.; Markham, K.R.; Dziedzic, S.Z.; Pope, G.S. Puerarin 6"-O- $\beta$ -apiofuranoside, a C-glycosylisoflavone O-glycoside from *Pueraria mirifica*. *Phytochemistry* **1986**, 25, 1772-1775.
- Ito, Y. High-Speed Countercurrent Chromatography. *Crit. Rev. Anal.Chem.* **1986**, 17, 65-143.
- Ito, Y.; Conway, W.D. (Hrsgg) *High-Speed Countercurrent Chromatography*, Wiley-Interscience, New York, **1996**.
- Ito, Y.; Sandlin, J.; Bowers, W. G. High-Speed Preparative Counter-Current Chromatography with a coil planet centrifuge. *J. Chromatogr.* **1982**, 244, 247-258.
- Ito, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1065, 145-168.
- Iwashina, T.; Ootani, S. Flavonoids of the Genus *Iris*; Structures, Distribution and Function (Review). *Ann. Tsukuba Bot. Gard.* **1998**, 17, 147-183.



- Jenkins, D.J.; Kendall, C.W.; Vidgen, E.; Agarwal, S.; Rao, A.V.; Rosenberg, R.S.; Diamandis, E.P.; Novokmet, R.; Mehling, C.C.; Perera, T.; Griffin, L.C.; Cunnane, S.C. Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum lipids, oxidative measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, 69, 395-402.
- Ju, Y.H.; Allred, C.D.; Allred, K.F.; Karko, K.L.; Doerge, D.R.; Helferich, W.G. Physiological Concentrations of Dietary Genistein Dose-Dependently Stimulate Growth of Estrogen-Dependent Human Breast Cancer (MCF-7) Tumors Implanted in Athymic Nude Mice. *J. Nutr.* **2001**, 131, 2957-2962.
- Kami, T. Aromatic constituents of forage crops. 3. Qualitative and quantitative analyses of the essential oils of red and ladino white clovers. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 1194-1197.
- Kattaev, N.; Kharlamov, I.; Akhmedkhodzhaeva, N.; Nikonov, G.; Khalmatov, Kh. Trifoside – An isoflavone from *Trifolium pratense*. *Chem. Nat. Compd.* **1972**, 8, 792-793.
- Keller, E.R.; Hanus, H.; Heyland K.-U. Knollen und Wurzelfrüchte, Körner- und Futterleguminosen. In: Hanus, H. (Hrsg.) *Handbuch des Pflanzenbaues*, Band 3, Eugen Ulmer, **1999**.
- Kerster, H.W.; Schaeffer, D.J. Brine shrimp (*Artemia salina*) nauplii as a teratogen test system. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1983**, 7, 342-349.
- Keung, W.M. *Pueraria*, CRC Press, **2002**.
- Keung, W.M.; Vallee, B.L. Kudzu root: An ancient chinese source of modern antidipsotropic agents. *Phytochemistry* **1998**, 47, 499-506.
- Kiely, M.; Faughan, M.; Wähälä, K.; Brants, H.; Mulligan, A. Phyto-oestrogen levels in foods: the design and construction of the VENUS database. *Br. J. Nutr.* **2003**, 89(Suppl.1), S19-S23.
- Kim, S.H.; Jung, W.S.; An, J.K.; Chung, I.M. Analysis of isoflavone concentration and composition in soybean [*Glycine max* (L.)] seeds between the cropping year and storage for 3 years. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, 220, 207-214.
- Kim, S.-L.; Berhow, M.A.; Kim, J.-T.; Chi, H.-Y.; Lee, S.-J.; Chung, I.-M. Evaluation of Soyasaponin, Isoflavone, Protein, Lipid, and Free Sugar Accumulation in Developing Soybean Seeds. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 10003-10010.
- Kinjo, J.-E.; Kurusawa, J.-I.; Baba, J.; Takeshita, T.; Yamasaki, M.; Nohara, T. Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. III. Isoflavonoids and related compounds in the roots of the voluble stems. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 4846-4850.
- Kitamura, K.; Igita, K.; Kikuchi, A.; Kudou, S.; Okubo, K. Low Isoflavone Content in Some Early Maturing Cultivars, So-called "Summer-type Soybeans" (*Glycine max* (L.) MERILL). *Japan. J. Breed* **1991**, 41, 651-654.
- Klein, C.B.; King, A.A. Genistein genotoxicity: Critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, 224, 1-11.
- Klejdus, B.; Vitamvásová-Sterbová, D.; Kuban, V. Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 450, 81-97.

- Knight, D.C.; Howes, J.B.; Eden J.A.; Howes, L.G. Effects on menopausal symptoms and acceptability of isoflavone-containing soy powder dietary supplementation. *Climacteric* **2001**, *4*, 13-18.
- Knight, D.C.; Eden, J.A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstetrics & Gynecology* **1996**, *87*, 897-904.
- Kojima, K.; Gombosurengyin, P.; Ondogny, P.; Begzsurengyin, D.; Zevgeegyin, O.; Hatano, K.; Ogihara, Y. Flavanones from *Iris tenuifolia*. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 711-714.
- Kolonel, L.N.; Hankin, J.H.; Whittemore, A.S.; Wu, A.H.; Gallagher, R.P.; Wilkens, L.R.; John, E.M.; Howe, G.R.; Dreon, D.M.; West, D.W.; Paffenbarger, R.S.Jr. Vegetables, Fruits, Legumes and Prostate Cancer: A Multiethnic Case-Control Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2000**, *9*, 795-804.
- Kong, J.-M.; Chia, L.-S.; Goh, N.-K.; Chia, T.-F.; Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 923-933.
- Kosslak, R.M.; Bokland, R.; Barkei, J.; Paaren, H.E.; Appelbaum, E.R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA - Biochemistry* **1987**, *84*, 7428-7432.
- Krämer, R.P.; Hindorf, H.; Jha, H.C.; Kallage, J.; Zilliken, F. Antifungal activity of soybean and chickpea isoflavones and their reduced derivatives. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2203-2205.
- Krebs, E.E.; Ensud, K.E.; MacDonald, R.; Wilt, T.J. Phytoestrogens for treatment of menopausal symptoms: a systematic review. *Obstetrics & Gynecology* **2004**, 824-836.
- Krenn, L.; Unterrieder, I.; Rupprechter, R. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **2002**, *777*, 123-128.
- Kromidas, S. *Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **1999**.
- Kudou, S.; Fleury, Y.; Welte, D.; Magnolato, D.; Uchida, T.; Kitamura, K.; Okubo, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 2227-2233.
- Kuiper, G.G.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.-Å. Characteristics and function of the novel estrogen receptors  $\beta$ . In: O'Malley B.W. (Hrsg.) *Hormones and Signaling*, Academic Press, New York **1998**, Vol 1, 89-112.
- Kulling, S.E.; Honig, D.M.; Metzler, M. Oxidative Metabolism of the Soy Isoflavones Daidzein and Genistein in Humans in Vitro and in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3024-3033.
- Kulling, S.E.; Rosenberg, B.; Jacobs, E.; Metzler, M. The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch. Toxicol.* **1999**, *73*, 50-54.
- Kulling, S.E.; Watzl, B. Phytoöstrogene. *Ernährungs-Umschau* **2003**, *50*, 234-239.
- Kulling, S.E.; Lehmann, L.; Metzler, M. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J. Chromatogr. B* **2002**, *777*, 211-218.
- Kumar, N.B.; Cantor, A.; Allen, K.; Riccardi, D.; Besterman-Dahan, K.; Seigne, J.; Helal, M.; Salup, R.; Pow-Sang, J. The specific role of isoflavones in reducing prostate cancer risk. *Prostate* **2004**, *59*, 141-147.

- Kurzer, M.S. Phytoestrogen Supplement Use by Women. *J. Nutr.* **2003**, 133, 1983S-1986.
- Kurzer, M.S.; Xu, X. Dietary phytoestrogens. *Ann. Rev. Nutr.* **1997**, 17, 353-381.
- Laflamme, P.; Khouri, H.; Gulick, P.; Ibrahim, R. Enzymatic prenylation of isoflavones in white lupin. *Phytochemistry* **1993**, 34, 147-151.
- Lakenbrink, C. *Strukturaufklärung und Bestimmung von Proanthocyanidinen und anderen flavonoiden Inhaltsstoffen des Tees*. Clausthal-Zellerfeld: Papierflieger (zugleich Dissertation TU Braunschweig), **2000**.
- Lampe, J.W. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J. Nutr.* **2003**, 133, 956S-964S.
- Langenscheidt, Universal Wörterbuch Griechisch, Langenscheidt Verlag, Berlin, München, Wien, Zürich, New York, 13. Auflage, **2004**.
- Lapčík, O.; Hill, M.; Hampl, R.; Wähälä, K.; Adlercreutz, H. Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids* **1998**, 63, 14-20.
- Lapčík, O.; Honys, D.; Koblowska, R.; Mackova, Z.; Vitkova, M.; Klejdus, B. Isoflavonoids are present in *Arabidopsis thaliana* despite the absence of any homologue to known isoflavonoid synthases. *Plant Physiol. Biochem.* **2006**, 44, 106-114.
- Lapčík, O. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or a rule? *Phytochemistry* **2007**, 68, 2909-2916.
- Lee, C.H.; Yang, L.; Xu, J.Z.; Yeung, S.Y.V.; Huang, Y.; Chen, Z.-Y. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. *Food Chemistry* **2005**, 90, 735-741.
- Lee, M.M.; Gomez, S.L.; Chang, J.S.; Wey, M.; Wang, R.-T.; Hsing, A.W. Soy and Isoflavone Consumption in Relation to Prostate Cancer Risk in China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2003**, 12, 665-668.
- Levy, J.R.; Faber, K.A.; Ayyash, L.; Hughes, C.L. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1995**, 208, 60-66.
- Lewis, P.; Kaltia, S.; Wähälä, K. The phase transfer catalysed synthesis of isoflavone-O-glucosides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*, **1998**, 2481-2484.
- Lian, WY.; Feng, RZ.; Chen, BZ.; Zhou, YP.; Su, XL.; Zhong, Y.; Gu, ZP.; Xu, Q.; Fu, GX. Studies on *Radix Puerariae*. In: Lou ZC.; Qin, B. (Hrsg.) *Species Systematization and Quality Evaluation of Commonly Used Chinese Traditional Drugs, North-China Edition*. Vol.I. Peking Univ. Med. Press; **1995**, 406-16.
- Li, W.; Han, J.; Cui, H. Technology study on acid hydrolysis of soybean isoflavones. *Shipin Kexue (Beijing, China)* **2002**, 23, 73-75.
- Lichtenstein, A.H. Soy Protein, Isoflavones and Cardiovascular Disease Risk. *J. Nutr.* **1998**, 128, 1589-1592.
- Lieberman, S. Are the differences between estradiol and other estrogens, naturally occurring or synthetic, merely semantical? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, 81, 850-851.
- Liggins, J.; Bluck, L.J.C.; Runswick, S.; Atkinson, C.; Coward, W.A.; Bingham, S.A. Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br. J. Nutr.* **2007**, 84, 717-725.



- Liggins, J.; Bluck, L.J.C.; Runswick, S.; Atkinson, C.; Coward, W.A.; Bingham, S.A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *J. Nutr. Biochem.* **2000**, *11*, 326-331.
- Lin, C.-C.; Wu, C.-I.; Sheu, S.-J. Determination of 12 pueraria components by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1785-1795.
- Lin, F.; Giusti, M.M. Effects of Solvent Polarity and Acidity on the Extraktion Efficiency of Isoflavones from Soybeans (*Glycine max*). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3795-3800.
- Lin, L.-Z.; He, X.-G.; Lindenmaier, M.; Yang, J.; Cleary, M.; Qiu, S.-X.; Cordell, G.A. LC-ESI-MS Study of the Flavonoid Glycoside Malonates of Red Clover (*Trifolium pratense*). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 354-365.
- Lins Mesquita, A.A.; De Barros Corrêa, D.; Gottlieb, O.R.; Taveira Magalhães, M. Methods for the structural investigation of xanthenes; Part II. Location of hydroxyl groups by ultraviolet and visible spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **1968**, *42*, 311-323.
- Linseisen, J.; Piller, R.; Hermann, S.; Chang-Claude, J. Dietary Phytoestrogen Intake and Premenopausal Breast Cancer Risk in a German Case-Control Study. *Int. J. Cancer* **2004**, *110*, 284-290.
- Lock, M. Contested meanings of the menopause. *Lancet* **1991**, *337*, 1270-1272.
- Loges, R.; Taube, F.; Korner, A. Ertrag, N-Fixierleistung sowie Ernterückstände verschiedener Rotklee- und Rotklee-grasbestände. In: Köpke, U.; Eisele, J. (Hrsgg.) *Beiträge zur 4. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau*, Köster: Berlin **1997**, 265-271.
- Low, Y.-L.; Taylor, J.I.; Grace, P.B.; Dowsett, M.; Scollen, S.; Dunning, A.M.; Mulligan, A.A.; Welch, A.A.; Luben, R.N.; Khaw, K.-T.; Day, N.E.; Wareham, N.J.; Bingham, S.A. Phytoestrogen Exposure Correlation with Plasma Estradiol in Postmenopausal Women in European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Norfolk May Involve Diet-Gene Interactions. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2005**, *14*, 213-220.
- Ma, Z.; Wu, Q.; Lee, D.Y.W.; Tracy, M.; Lukas, S.E. Determination of puerarin in human plasma by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **2005**, *823*, 108-114.
- Mackova, Z.; Koblovská, R.; Lapčík, O. Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa - An update. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 849-855.
- Mahmood, U.; Kaul, V.K.; Jirovetz, L. Alkylated benzoquinones from *Iris kumaonensis*. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 923-926.
- Mansfeld, R. *Verzeichnis landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen)*, Band 3, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, **1959**.
- Marby, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verlag, Berlin **1970**.
- Marcus, C.B.; Murray, M.; Hetnarski, K.; Wilkinson, C.F. Methylendioxyphenyl Complexes with Microsomal Cytochrome P-450: *In Vivo* Complex Formation in Rat Liver and Midgut Tissues of the Southern Armyworm (*Spodoptera eridania*). *Pestic. Biochem. Physiol.* **1987**, *28*, 140-147.
- Markham, K.R.; *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press New York, USA, **1982**, 90-93.

- Markham, K.R.; Ternai, B.; Stanley, R.; Geiger, H.; Marby, T.J. Carbon-13 C NMR Studies of Flavonoids - III, Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1389-1397.
- Markovits, J.; Linassier, C.; Fossé, P.; Couprie, J.; Pierre, J.; Jacquemin-Sablon, A.; Saucier, J.-M.; Le Pecq, J.-B.; Larsen, A.K. Inhibitory Effects of Tyrosine Kinase Inhibitor Genistein on Mammalian DNA Topoisomerase II. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 5111-5117.
- Marner, F.-J.; Singab, A.N.B.; Al-Azizi, M.M.; El-Emary, N.A.; Schafer, M. Iridal glycosides from *Iris spuria* (Zeal), cultivated in Egypt. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 301-307.
- Marston, A.M.; Hostettmann, K. Counter-current Chromatography as a Preparative Tool – Applications and Perspectives. *J. Chromatogr. A* **1994**, *658*, 315-341.
- Martin, P.; Horwitz, K.; Ryan, D.; McGuire, W. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* **1978**, *103*, 1860-1867.
- Mathias, K.; Ismail, B.; Corvalan, C. M.; Hayes, K. D. Heat and pH effects on the conjugated forms of genistin and daidzin isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7465-7502.
- Mazur, W.; Adlercreutz, H. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Naturally occurring oestrogens in food. *Pure & Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1759-1776.
- Mazur, W.M.; Duke, J.A.; Wähälä, K.; Rasku, S.; Adlercreutz, H. Isoflavonoids and Lignans in Legumes: Nutritional and Health Aspects in Humans. *J. Nutr. Biochem.* **1998**, *9*, 193-200.
- McClain, R.M.; Wolz, E.; Davidovich, A.; Edwards, J.; Bausch, J. Reproductive safety studies with genistein in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1319-1332.
- McClain, R. M.; Wolz, E.; Davidovich, A.; Bausch, J. Genetic toxicity studies with genistein. *Food Chem. Toxicol.* **2006a**, *44*, 42-55.
- McClain, R. M.; Wolz, E.; Davidovich, A.; Pfannkuch, F.; Edwards, J.A.; Bausch, J. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food and Chemical Toxicology* **2006b**, *44*, 56-80.
- McCord, J.M. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin. Biochem.* **1993**, *26*, 351-357.
- McLaughlin, J.L.; Rogers, L.; Anderson, J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf. J.* **1998**, *32*, 513-524.
- Meagher, L.P.; Beecher, G.R. Assessment of Data on the Lignan Content of Foods. *J. Food Comp. Anal.* **2000**, *13*, 935-947.
- Meagher, L.P.; Widdup, K.; Sivakumaran, S.; Lucas, R.; Rumball, W. Floral Trifolium Proanthocyanidins: Polyphenol Formation and Compositional Diversity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5482-5488.
- Mei, J.; Yeung, S. C.; Kung, A. W. C. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86*, 5217-5221.

- Mentor-Marcel, R.; Lamartiniere, C.A.; Eltoum, I.A.; Greenberg, N.M.; Elgavish, A. Dietary Genistein Improves Survival and Reduces Expression of Osteopontin in the Prostate of Transgenic Mice with Prostatic Adenocarcinoma (TRAMP). *J. Nutr.* **2005**, *135*, 989-995.
- Metzler, M.; Kulling, S.E.; Pfeiffer, E.; Jacobs, E. Genotoxicity of estrogens. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **1998**, *206*, 367-373.
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* **1982**, *45*, 31-34.
- Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407-412.
- Milligan, S.R.; Kalita, J.C.; Heyerick, A.; Rong, H.; De Cooman, L.; De Keukeleire, D. Identification of a Potent Phytoestrogen in Hops (*Humulus lupulus* L.) and Beer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 2249-2252.
- Mitchell, J.H.; Gardner, P.T.; McPhail, D.B.; Morrice, P.C.; Collins, A.R.; Duthie, G.G. Antioxidant Efficacy of Phytoestrogens in Chemical and Biological Model Systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *360*, 142-148.
- Moline, J.; Bukharovich, I.F.; Wolff, M.S.; Phillips, R. Dietary flavonoids and hypertension: is there a link? *Medical Hypotheses* **2000**, *55*, 306-309.
- Morabito, N.; Crisafulli, A.; Vergara, C.; Gaudio, A.; Lasco, A.; Frisina, N.; D'Anna, R.; Corrado, F.; Pizzoleo, M.A.; Cincotta, M.; Altavilla, D.; Ientile, R.; Squadrito, F. Effects of Genistein and Hormone-Replacement Therapy on Bone Loss in Early Postmenopausal Women: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *J. Bone Miner. Res.* **2002**, *17*, 1904-1912.
- Moravcová, J.; Kleinová, T.; Loucka, R.; Tyrolová, I.; Kvasnicka, F.; Dusek, M.; Cerovsky, M.; Matucha, P. Coumestrol content of alfalfa following ensilage. *Animal Feed Sci. Technol.* **2004**, *115*, 159-167.
- Morito, K.; Morito, K.; Hirose, T.; Kinjo, J.; Hirakawa, T.; Okawa, M.; Nohara, T.; Ogawa, S.; Inoue, S.; Muramatsu, M.; Masamune, Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 351-356.
- Mousavi, Y.; Adlercreutz, H. Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids* **1993**, *58*, 301-304.
- Müller, E.; Neumann, D.; Nelles, A.; Bräutigam, E. Alkaloid transport and distribution in *Nicotiana* and *Macleaya*. Diversity and unity. *Nova Acta Leopold.* **1976**, Suppl.7, 133-138.
- Murakami, T.; Nishikawa, Y.; Ando, T. Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs. IV. On the constituents of pueraria root. *Chem. Pharm. Bull.* **1960**, *8*, 688-691.
- Murakami, H.; Asakawa, T.; Terao, J.; Matsushita, S. Antioxidative Stability of Tempeh and Liberation of Isoflavones by Fermentation. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 2971-2975.
- Murray, M. Mechanisms of Inhibitory and Regulatory Effects of Methylendioxyphenyl Compounds on Cytochrome P450-Dependent Drug Oxidation. *Curr. Drug Metab.* **2000**, *1*, 67-84.

- Müllner, Claudia and Sontag, G. Determination of some phytoestrogens in soybeans and their processed products with HPLC and coulometric electrode array detection. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 364, 261-265.
- Nadaroğlu, H.; Demir, Y.; Demir, N. Antioxidant and radical scavenging properties of *Iris germanica*. *Pharm. Chem. J.* **2007**, 41, 409-415.
- Nagai, I.A. A genetico-physical study on the formation of anthocyanin and brown pigments in plants. *J. Coll. Agr. Hokkaido Imp. Univ.* **1921**, 8, 1-92.
- Nagata, Y.; Sonoda, T.; Mori, M.; Miyanaga, N.; Okumura, K.; Goto, K.; Naito, S.; Fujimoto, K.; Hirao, Y.; Takahashi, A.; Tsukamoto, T.; Akaza, H. Dietary Isoflavones May Protect against Prostate Cancer in Japanese Men. *J. Nutr.* **2007**, 137, 1974-1979.
- Nahas, E.L.; Neto, J.N.; De Luca, L.; Traiman, P.; Pntes, A.; Dalben, I. Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy. *Maturitas* **2004**, 48, 372-380.
- Nahrstedt, A. Potentiell carcinogene Inhaltsstoffe höherer Pflanzen. *Pharmazie unserer Zeit* **1977**, 6, 150-157.
- Naim, M.; Gestetner, B.; Kirson, I.; Birk, Y.; Bondi, A. A new isoflavone from soya beans. *Phytochemistry* **1973**, 12, 169-170.
- Nakajima, M.; Suzuki, M.; Yamaji, R.; Takashina, H.; Shimada, N.; Yamazaki, H.; Yokoi, T. Isoform selective inhibition and inactivation of human cytochrome P450s by methylenedioxyphenyl compounds. *Xenobiotica* **1999**, 29, 1191-1202.
- Nakamura, Y.; Tsuji, S.; Tonogai, Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. *J. AOAC Int.* **2000**, 83, 635-650.
- Nestel, P.J.; Pomeroy, S.; Kay, S.; Komesaroff, P.; Behrsing, J.; Cameron, J.D.; West, L. Isoflavones from Red Clover Improve Systemic Arterial Compliance But Not Plasma Lipids in Menopausal Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, 84, 895-898.
- Nettleton, J.A.; Greany, K.A.; Thomas, W.; Wangen, K.E.; Adlercreutz, H.; Kurzer, M.S. The Effect of Soy Consumption on the Urinary 2:16-Hydroxyestrone Ratio in Postmenopausal Women Depends on Equol Production Status but Is Not Influenced by Probiotic Consumption. *J. Nutr.* **2005**, 135, 603-608.
- Newbold, R.R.; Banks, E.P.; Bullock, B.; Jefferson, W.N. Uterine Adenocarcinoma in Mice Treated Neonatally with Genistein. *Cancer Res.* **2001**, 61, 4325-4328.
- Nonomura, S.; Kanagawa, H.; Makimoto, A. Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon. (*Polygonum cuspidatum* SIEB et ZUCC). *Yakugaku Zasshi* **1963**, 83, 983-990.
- Nurmi, T.; Mazur, W.; Heinonen, S.; Kokkonen, J.; Adlercreutz, H. Isoflavone content of the soy based supplements. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 28, 1-11.
- Occhiuto, F.; De Pasquale, R.; Guglielmo, G.; Palumbo, D.R.; Zangla, G.; Samperi, S.; Renzo, A.; Circosta, C. Effect of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L.) on experimental osteoporosis. *Phytother. Res.* **2007**, 21, 130-134.
- Ojala, T.; Vuorela P.; Kiviranta, J.; Vuorela, H.; Hiltunen, R. A Bioassay Using *Artemia salina* for Detecting Phototoxicity of Plant Coumarins. *Planta Med.* **1999**, 65, 715-718.

- Oka, F.; Oka, H.; Ito, Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* **1991**, 538, 99-108.
- O'Neill, M.J.; Adesanya, S.A.; Roberts, M.F.; Pantry, I.R. Inducible isoflavonoids from the lima bean, *Phaseolus lunatus*. *Phytochemistry* **1986**, 25, 1315-1322.
- Orhan, I.; Nasim, S.; Sener, B.; Ayanoglu F.; Özgüven, M.; Choudhary, M.I.; Atta-ur-Rahmann Two Isoflavones and Bioactivity Spectrum of the Crude Extracts of *Iris germanica* Rhizomes. *Phytother. Res.* **2003**, 17, 575-577.
- Ottesen, B.; Sorensen, M.B. Women at cardiac risk: is HRT the route to maintaining cardiovascular health?: HRT-Beyond the Menopause: Adding Value to Added Years. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **1997**, 59, S19-S27.
- Ouyang, P.; Michos, E.D.; Karas, R.H. Hormone Replacement Therapy and the Cardiovascular System: Lessons Learned and Unanswered Questions. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2006**, 47, 1741-1753.
- Overstreet, D.H.; Kralic, J.E.; Morrow, A.L.; Ma, Z.Z.; Zhang, Y.W.; Lee, D.Y.W. NPI-031G (puerarin) reduces angiogenic effects of alcohol withdrawal or benzodiazepine inverse or 5-HT<sub>2C</sub> agonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, 75, 619-625.
- Pailer, M.; Franke, F. Über Inhaltstoffe der *Iris germanica* (Schwertlilie). *Monatsh. Chem.* **1973**, 104, 1394-408.
- Papas, A.M. Determinants of antioxidant status in humans. In: Papas, A.M. (Hrsg.) *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*, CRC Press Boca Raton **1999**, 21-36.
- Parthasarathy, S.; Steinberg, D.; Witztum, J.L. The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Annu. Rev. Med.* **1992**, 43, 219-225.
- Peeters, P.H.M.; Keinan-Boker, L.; van der Schouw, Y.T.; Grobbee, D.E. Phytoestrogens and Breast Cancer Risk. *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, 77, 171-183.
- Peng, Y.Y.; Ye, J.N. Determination of isoflavones in red clover by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Fitoterapia* **2006**, 77, 171-178.
- Peters, F.T. Hartung, M.; Herbold, M.; Schmitt, G.; Daldrup, T.; Mußhoff, F. *Aus dem Arbeitskreis Qualitätskontrolle, Anlage zu den Richtlinien der GTCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anhang C: Anforderung an die Durchführung von Analysen. 1. Validierung. Toxichem +Krimtech* **1998**, 65, 18-24.
- Peters, R. Die ontogenetische Entwicklung des Salinenkrebses *Artemia salina* im Unter- und Überdruck. Forschungsbericht; Deutsche Luft- und Raumfahrt. 76, 19. Köln: DFVLR, **1976** (zugl. Bonn, Univ., Diss. 1976).
- Petrakis, N.L.; Barnes, S.; King, E.B.; Lowenstein, J.; Wiencke, J.; Lee, M.M.; Miike, R.; Kirk, M.; Coward, L. Stimulatory Influence of Soy Protein Isolate on Breast Secretion in Pre- and Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1996**, 5, 785-794.
- Piersen, C.E.; Booth, N.L.; Sun, Y.; Liang, W.; Burdette, J.E.; Breemen, R.B.v.; Geller, S.E.; Gu, C.; Banuvar, S.; Shulman, L.P.; Bolton, J.L.; Farnsworth, N.R. Chemical and biological characterization and clinical evaluation of botanical dietary supplements: a phase I red clover extract as a model. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 1361-1374.
- Pieterse, P.J.S.; Andrews, F.N. The Estrogenic Activity of Alfalfa and other Feedstuffs. *J. Anim. Sci.* **1956**, 15, 25-36.



- Polasek, J.; Queiroz, E.F.; Hostettmann, K. On-line identification of phenolic compounds of *Trifolium* species using HPLC-UV-MS and post-column UV-derivatisation. *Phytochem. Anal.* **2007**, *18*, 13-23.
- Pool-Zobel, B.L.; Adlercreutz, H.; Gleis, M.; Liegibel, U.M.; Sittlington, J.; Rowland, I.; Wähälä, K.; Rechkemmer, G. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 1247-1252.
- Pope, G.S.; Wright, H.G. Estrogenic isoflavones in red clover and subterranean clover. *Chem. Ind.* **1954**, 1019-1920.
- Potter, S.M. Overview of Proposed Mechanisms for the Hypocholesterolemic Effects of Soy. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 606S-611S.
- Powles, T. Isoflavones and women's health. *Breast Cancer Res.* **2004**, *6*, 140-142.
- Prasad, K. Reduction of Serum Cholesterol and Hypercholesterolemic Atherosclerosis in Rabbits by Secoisolariciresinol Diglucoside Isolated From Flaxseed. *Circulation* **1999**, *99*, 1355-1362.
- Prasain, J.K.; Jones, K.; Brissie, N.; Moore, R.; Wyss, J.M.; Barnes, S. Identification of Puerarin and Its Metabolites in Rats by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3708-3712.
- Preinerstorfer B.; Sontag, G. Determination of isoflavones in commercial soy products by HPLC and coulometric electrode array detection. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 305-310.
- Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, 260. Auflage, Verlage Walter deGruyter Co., Berlin, **2004**.
- Purev, O.; Purevsuren, C.; Narantuya, S.; Lkhagvasuren, S.; Mizukami, H.; Nagatsu, A. New isoflavones and flavanol from *Iris potaninii*. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1367-1369.
- Qin, M.-J.; Li, R.; Wang, X.; Ye, W.-C. New isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris leptophylla* Lingelsh. *J. Integr. Plant Biol.* **2007**, *49*, 213-217.
- Rahman, A.; Nasim, S.; Baig, I.; Jalil, S.; Orhan, I.; Sener, B.; Choudhary, M.I. Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *86*, 177-180.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231-1237.
- Record, I.R.; Jannes, M.; Dreosti, I.E.; King, R.A. Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 919-922.
- Record, I.R.; Dreosti, I.E.; McInerney, J.K. The antioxidant activity of genistein in vitro. *J. Nutr. Biochem.* **1995**, *6*, 481-485.
- Register, T.C.; Jayo, M.J.; Anthony, M.S. Soy Phytoestrogens Do Not Prevent Bone Loss in Postmenopausal Monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 4362-4370.
- Reynaud, J.; Guilet, D.; Terreux, R.; Lussignol, M.; Walchshofer, N. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 504-515.
- Ribeiro, M.L.L.; Mandarino, J.M.G.; Carrao-Panizzi, M.C.; de Oliveira, M.C.N.; Campo, C.B.H.; Nepomuceno, A.L.; Ida, E.I. Isoflavone content and [beta]-glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *J. Food Comp. Anal.* **2007**, *20*, 19-24.

- Rice, M.M.; LaCroix, A.Z.; Lampe, J.W.; van Belle, G.; Kestin, M.; Sumitani, M.; Graves, A.B.; Larson, E.B. Dietary soy isoflavone intake in older Japanese American women. *Public Health Nutr.* **2007**, *4*, 943-952.
- Riedl, K.M.; Lee, J.H.; Renita, M.; St Martin, S.K.; Schwartz, S.J.; Vodovotz, Y. Isoflavone profiles, phenol content, and antioxidant activity of soybean seeds as influenced by cultivar and growing location in Ohio. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 1197-1206.
- Roche Lexikon Medizin, Urban und Fischer Verlag, 5. Auflage, **2003**.
- Rohr, U. Die Bedeutung des Estrogen-Rezeptors beta. *Deutsche Apotheker-Zeitung* **2006**, *146(45)*, 68-75.
- Rolfe, B.G.; Djordjevic, M.A.; Weinman, J.J.; McIver, J.; Gartner, E.; Chen, H.; Creaser, E.H.; Britt, K.; Lawson, C.G.R.; De Boer, M.H.; McKay, I.A.; Shoobridge, M.V.; De Majnik, J.; Pittock, C.; Broderick, K.; Delbridge, T. Molecular genetic analysis of subterranean clover-microbe interactions. *Soil Biol. Biochem.* **1995**, *27*, 485-490.
- Römpp, Lexikon der Chemie (Hrsg. Falbe/Regnitz). Georg Thieme Verlag, **2006**.
- Roth, L.; Daunderer, M.; Kormann, K.; *Giftpflanzen*, ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co KG, Landsberg, 4. Auflage, **1994**.
- Rott, M.E.; Lawrence, T.S.; Wall, E.M.; Green, M.J. Detection and Quantification of Roundup Ready Soy in Foods by Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5223-5232.
- Rowland, I.; Wisemann, H.; Sanders, T.; Adlercreutz, H.; Bowey, E. Metabolism of estrogens and phyto-estrogens : role of the gut microflora. *Biochem. Soc. Trans.* **1999**, *27*, 304-308.
- Rüfer, C.E.; Bub, A.; Möseneder, J.; Winterhalter, P.; Stürtz, M.; Kulling, S.E. Pharmacokinetics of the soybean isoflavone daidzein in its aglycone and glucoside form: a randomized, double-blind, cross-over study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 1314-1323.
- Rüfer, C.E.; Glatt, H.; Kulling, S.E. Structural Elucidation of Hydroxylated Metabolites of the Isoflavan Equol by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* **2006a**, *34*, 51-60.
- Rüfer, C.E.; Kulling, S.E. Antioxidant Activity of Isoflavones and Their Major Metabolites Using Different in Vitro Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2006b**, *54*, 2926-2931.
- Rüfer, C.E.; Maul, R.; Donauer, E.; Fabian, E.J.; Kulling, S.E. *In vitro* and *in vivo* metabolism of the soy isoflavone glycitein. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 813-823.
- Rupp, H. Determination of the isoflavones daidzein and genistein in soy containing products; Bestimmung der Isoflavone Daidzein und Genistein in sojahaltigen Produkten. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* **2000**, *91*, 199-223.
- Sacks, F.M.; Lichtenstein, A.; Van Horn, L.; Harris, W.; Kris-Etherton, P.; Winston, M. for the AHA Nutrition Committee. Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health: A Summary of a Statement for Professionals From the American Heart Association Nutrition Committee. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 1689-1692.
- Samman, S.; Lyons Wall, P.M.; Chan, G.S.M.; Smith, S.J.; Petocz, P. The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women. *Atherosclerosis* **1999**, *147*, 277-283.

- Scheiber, M.D.; Liu, J.H.; Subbiah, M.T.; Rebar, R.W.; Setchell, K. Dietary inclusion of whole soy foods results in significant reductions in clinical risk factors for osteoporosis and cardiovascular disease in normal postmenopausal women. *Menopause* **2001**, *8*, 384-392.
- Schildknecht, H. Reiz- und Abwehrstoffe höherer Pflanzen - ein chemisches Herbarium. *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 164-183.
- Schmitt, E.; Metzler, M.; Jonas, R.; Dekant, W.; Stopper, H. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2003**, *542*, 43-48.
- Schrader, G.; *Risikoanalyse gebietsfremder Arten im Rahmen europäischer und internationaler phytosanitärer Standards*. In: BMVEL „Angewandte Wissenschaft“, Heft 498; Bedrohung der biologischen Vielfalt durch invasive gebietsfremde Arten, 145, 153f., **2003**.
- Schröder, J. A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions. *Trends in Plant Science* **1997**, *2*, 373-378.
- Schwartz, H.; Sontag, G. Isoflavone Content in Soy- and Red Clover Based Nutritional Supplements. *Proceedings Euro Food Chem XIII (EuCheMS Event No. 321)* **2005**, Vol. 2, 467-470.
- Sequeira, L. Mechanisms of induced resistance in plants. *Ann. Rev. Microbiol.* **1983**, *37*, 51-79.
- Setchell, K.D.R.; Lawson, A.M.; Mitchell, F.L.; Adlercreutz, H.; Kirk, D.N.; Axelson, M. Lignans in man and in animal species. *Nature*, **1980**, *287*, 740-742.
- Setchell, K.D.R. Phytoestrogens: the Biochemistry, Physiology, and Implications for Human Health of Soy Isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 1333S-1346S.
- Setchell, K.D.R.; Brown, N.M.; Lydeking-Olsen, E. The clinical importance of the metabolite equol - a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3577-3584.
- Setchell, K.D.R.; Cole, S.J. Variations in Isoflavone Levels in Soy Foods and Soy Protein Isolates and Issues Related to Isoflavone Databases and Food Labeling. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4146-4155.
- Setchell, K.D.R.; Gosselin, S.J.; Welsh, M.B.; Johnston, J.O.; Balistreri, W.F.; Kramer, L.W.; Dresser, B.L.; Tarr, M.J. Dietary Estrogens - A Probable Cause of Infertility and Liver Disease in Captive Cheetahs. *Gastroenterology* **1987a**, *93*, 225-33.
- Setchell, K.D.R.; Welsh, M.B.; Lim, C.K. High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.* **1987b**, *386*, 315-323.
- Setchell, K.D.R. Soy Isoflavones--Benefits and Risks from Nature's Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *J. Am. Coll. Nutr.* **2001**, *20*, 354S-362S.
- Setchell, K.D.R.; Cassidy, A. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 758-767.
- Shawl, A.S.; Vishwapaul; Zaman, A.; Kalla, A.K. Isoflavones of *Iris spuria*. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2405-2406.
- Shimizu, H.; Ross, R.K.; Bernstein, L.; Pike, M.C.; Henderson, B.E. Serum oestrogen levels in postmenopausal women: comparison of American whites and Japanese in Japan. *Br. J. Cancer* **1990**, *62*, 451-453.



- Shore, L.S.; Kapulnik, Y.; Gurevich, M.; Wininger, S.; Badamy, H.; Shemesh, M. Induction of phytoestrogen production in *Medicago sativa* leaves by irrigation with sewage water. *Environ. Exp. Bot.* **1995**, *35*, 363-369.
- Shriner, R.L.; Hull, C.J. Isoflavones. III. The structure of prunetin and a new synthesis of genistein. *J. Org. Chem.* **1945**, *10*, 288-291.
- Shu, X.O.; Jin, F.; Dai, Q.; Wen, W.; Potter, J.D.; Kushi, L.H.; Ruan, Z.; Gao, Y.-T.; Zheng, W. Soyfood Intake during Adolescence and Subsequent Risk of Breast Cancer among Chinese Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2001**, *10*, 483-488.
- Simons, L.A.; von Konigsmark, M.; Simons, J.; Celermajer, D.S. Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. *Am.J. Cardiol.* **2000**, *85*, 1297-1301.
- Simons, A.L.; Renouf, M.; Hendrich, S.; Murphy, P.A. Metabolism of Glycitein (7,4'-Dihydroxy-6-methoxy-isoflavone) by Human Gut Microflora. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8519-8525.
- Singh, M.; Krikorian, A.D. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 799-800.
- Sirtori, L.R.; Lovati, M.R. Soy Proteins and Cardiovascular Disease. *Curr. Atherosclerosis Rep.* **2001**, *3*, 47-53.
- Sivakumaran, S.; Meagher, L.P.; Foo, L.Y.; Lane, G.A.; Fraser, K.; Rumball, W. Floral Procyanidins of the Forage Legume Red Clover (*Trifolium pratense* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1581-1585.
- Sivesind, E.; Seguin, P. Effects of the Environment, Cultivar, Maturity, and Preservation Method on Red Clover Isoflavone Concentration. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6397-6402.
- SKLM, DFG - Senate Commission on Food Safety (May **2007**) Isoflavones as phytoestrogens in food supplements and dietary foods for special medical purposes <http://www.dfg.de/sklm>.
- Smit, D. Welcher Klee ist gartenwürdig? *Gartenpraxis* **2005**, *31*(11), 8-13.
- Smith, D.; Sund, J.M. Influence of Stage of Growth and Soil Nitrogen on Nitrate Content of Herbage of Alfalfa, Red Clover, Ladino Clover, Trefoil, and Bromegrass. *J. Agric. Food Chem.* **1965**, *13*, 81-84.
- Smith, D.A.; Banks, S.W. Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 979-995.
- Solis, P.N.; Wright, C.W.; Anderson, M.M.; Gupta, M.P.; Phillipson, J.D. A Microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Med.* **1993**, *59*, 250-252.
- Song, T.; Barua, K.; Buseman, G.; Murphy, P. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 1474S-1479S.
- Souci, S.W.; Fachmann, W.; Kraut, H.; *Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwerttabellen*, 1986/87, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1986**.
- Spaink, H.P. The Molecular Basis of Infection and Nodulation by Rhizobia: The Ins and Outs of Sympathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1995**, *33*, 345-368.
- Stahl, E.; *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin, **1967**.

- Steck, W. IUPAC-Empfehlungen, Harmonisierter Leitfaden für die Validierung von Analysemethoden durch Einzellaboratorien. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2019-2034.
- Steglich, W.; Fugmann, B.; Lang-Fugmann, S. (Hrsgg). *Römpf Lexikon Naturstoffe*, 10. völlig neu überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 504f., **1997**.
- Steinberg, D.; Witztum, J.L. Is the Oxidative Modification Hypothesis Relevant to Human Atherosclerosis?: Do the Antioxidant Trials Conducted to Date Refute the Hypothesis? *Circulation* **2002**, *105*, 2107-2111.
- Stephens, F.O. Phytoestrogens and prostate cancer: a possible preventive role. *Med. J. Aust.* **1997**, *167*, 138-140.
- Stewart, B.W.; Kleinhues, P.H. World Cancer Report. *IARC Press, London* **2003**, 181-269.
- Stinzing, F.C.; Hoffmann, M.; Carle, R. Thermal degradation kinetics of isoflavone aglycones from soy and red clover. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 373-377.
- Strauss, L.; Santti, R.; Saarinen, N.; Streng, T.; Joshi, S.; Mäkelä, S. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicol. Lett.* **1998**, *102-103*, 349-354.
- Stürtz, M.; Lander, V.; Schmid, W.; Winterhalter, P. Preparative Isolation of Isoflavones From Soy and Red Clover. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 356-361.
- Stürtz, M.; Lander, V.; Schmid, W.; Winterhalter, P. Quantitative Determination of Isoflavones in Soy Based Nutritional Supplements by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Verbr. Lebensm.* **2008**, *3*, 127-136.
- Sudhir, K.; Jennings, G.L.; Funder, J.W.; Komesaroff, P.A. Estrogen Enhances Basal Nitric Oxide Release in the Forearm Vasculature in Perimenopausal Women. *Hypertension* **1996**, *28*, 330-334.
- Sumner, L.W.; Paiva, N.L.; Dixon, R.A.; Geno, P.W. High-performance Liquid Chromatography/Continuous-flow Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry of Flavonoid Glycosides in Leguminous Plant Extract. *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, *31*, 472-485.
- Sun, N.-J.; Chang, C.-J.; Cassady, J.M. A cytotoxic isoflavone from *Cudrania cochinchinensis*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 951-952.
- Sutherland, I.A. Countercurrent Chromatography. *Laboratory Practice* **1987**, *36*, 37-38, 41-42.
- Swinny, E.E.; Ryan, K.G. Red Clover *Trifolium pratense* L. Phytoestrogens: UV-B Radiation Increases Isoflavone Yield, and Postharvest Drying Methods Change the Glucoside Conjugate Profiles. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8273-8278.
- Tahara, S.; Ibrahim, R.K. Prenylated isoflavonoids-An update. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1073-1094.
- Tahara, S.; Ingham, J.L.; Nakahara, S.; Mizutani, J.; Harborne, J.B. Fungitoxic dihydrofuranoisoflavones and related compounds in white lupin, *Lupinus albus*. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1889-1900.
- Takahashfi, K.; Hoshino, Y.; Suzuki, S.; Hano, Y.; Nomura, T. Iridals from *Iris tectorum* and *Belamcanda chinensis*. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 925-929.
- Takimoto, C.H.; Glover, K.; Huang, X.; Hayes, S.A.; Gallot, L.; Quinn, M.; Jovanovic, B.D.; Shapiro, A.; Hernandez, L.; Goetz, A.; Llorens, V.; Lieberman, R.; Crowell, J.A.; Poisson,

- B.A.; Bergan, R.C. Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis of Unconjugated Soy Isoflavones Administered to Individuals with Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2003**, *12*, 1213-1221.
- Taylor, J.R.; *Fehleranalyse: eine Einführung in die Untersuchung von Unsicherheiten*. VCH, Weinheim, **1988**.
- Tebayashi, S.; Ishihara, A.; Tsuda, M.; Iwamura, H. Induction of clovamide by jasmonic acid in red clover. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 387-392.
- Tempfer, C.B.; Bentz, E.-K.; Leodolter, S.; Tscherne, G.; Reuss, F.; Cross, H.S.; Huber, J.C. Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. *Fertility and Sterility* **2007**, *87*, 1243-1249.
- This, P.; De La Rochefordiere, A.; Clough, K.; Fourquet, A.; Magdelenat, H. Phytoestrogens after breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2001**, *8*, 129-134.
- Thomé, O.W. *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, Gera **1885**.
- Tikkanen, M.J.; Adlercreutz, H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens: Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1-5.
- Todd, J.J.; Vodkin, L.O. Pigmented Soybean (*Glycine max*) Seed Coats Accumulate Proanthocyanidins during Development. *Plant Physiol.* **1993**, *102*, 663-670.
- Toebe, A.H.W.; deBoer, V.; Verkleij, J.A.C.; Lingeman, H.; Ernst, W.H.O. Extraction of Isoflavone Malonylglucosides from *Trifolium pratense* L. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4660-4666.
- Tolleson, W.H.; Doerge, D.R.; Churchwell, M.I.; Marques, M.M.; Roberts, D.W. Metabolism of Biochanin A and Formononetin by Human Liver Microsomes in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4783-4790.
- Tostes, R.C.; Nigro, D.; Fortes, Z.B.; Carvalho, M.H.C. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, *36*, 1143-1158.
- Totta, P.; Acconcia, F.; Virgili F.; Cassidy, A.; Weinberg, P.D.; Rimbach, G.; Marino, M. Dadzein-Sulfate Metabolites Affect Transcriptional and Antiproliferative Activities of Estrogen Receptor- $\beta$  in Cultured Human Cancer Cells. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2687-2693.
- Tsai, H.-S.; Huang, L. J.; Lai, Y.-H.; Chang, J.-C.; Lee, R.-S.; Chiou, R. Y.-Y. Solvent effects on extraction and HPLC analysis of soybean isoflavones and variations of isoflavone compositions as affected by crop season. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7712-7715.
- Tsao, R.; Papadopoulos, Y.; Yang, R.; Young, J.C.; McRae, K. Isoflavone Profiles of Red Clovers and Their Distribution in Different Parts Harvested at Different Growing Stages. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5797-5805.
- Tsukamoto, C.; Shimada, S.; Igita, K.; Kudou, S.; Kokubun, M.; Okubo, K.; Kitamura, K. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds: Changes in Isoflavones, Saponins, and Composition of Fatty Acids at Different Temperatures during Seed Development. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1184-1192.
- Ueng, Y.-F.; Hsieh, C.-H.; Don, M.-J. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by the natural hepatotoxin safflower. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 707-712.

- Unfer, V.; Casini, M.L.; Costabile, L.; Mignosa, M.; Gerli, S.; Di Renzo, G.C. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertility and Sterility* **2004**, *82*, 145-148.
- van de Weijer, P.H.M.; Barentsen, R. Isoflavones from red clover (Promensil(R)) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. *Maturitas* **2002**, *42*, 187-193.
- van der Schouw, Y.T.; Pijpe, A.; Lebrun, C.E.I.; Bots, M.L.; Peeters, P.H.M.; van Staveren, W.A.; Lamberts, S.W.J.; Grobbee, D.E. Higher Usual Dietary Intake of Phytoestrogens Is Associated With Lower Aortic Stiffness in Postmenopausal Women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1316-1322.
- Vega-Lopez, S.; Yeum, K.-J.; Lecker, J.L.; Ausman, L.M.; Johnson, E.J.; Devaraj, S.; Jialal, I.; Lichtenstein, A.H. Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 43-49.
- Veitch, N.C. Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 417-464.
- Verdeal, K.; Brown, R.R.; Richardson, T.; Ryan, D.S. Affinity of phytoestrogens for estradiol-binding proteins and effect of coumestrol on growth of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **1980**, *64*, 285-290.
- Versantvoort, C.H.M.; Broxterman, H.J.; Lankelma, J.; Feller, N.; Pinedo, H.M. Competitive inhibition by genistein and ATP dependence of daunorubicin transport in intact MRP overexpressing human small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1129-1136.
- Ververidis, F.; Trantas, E.; Douglas, C.; Vollmer, G.; Kretzschmar, G.; Panopoulos, N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol. J.* **2007a**, *2*, 1214-1234.
- Ververidis, F.; Trantas, E.; Douglas, C.; Vollmer, G.; Kretzschmar, G.; Panopoulos, N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part II: Reconstruction of multienzyme pathways in plants and microbes. *Biotechnol. J.* **2007b**, *2*, 1235-1249.
- Vetter, J. Isoflavones in Different Parts of Common Trifolium Species. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 106-108.
- Vitali, A.; Giardina, B.; Delle Monache, G.; Rocca, F.; Silvestrini, A.; Tafi, A.; Botta, B. Chalcone dimethylallyltransferase from *Morus nigra* cell cultures. Substrate specificity studies. *FEBS Lett.* **2004**, *557*, 33-38.
- Vlietinck, A.J.; De Bruyne, T.; Apers, S.; Pieters, L.A. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* **1998**, *64*, 97-109.
- Voges, S.R. *Antioxidantien gegen freie Radikale*. Dr. Werner Jopp Verlag, Wiesbaden **1997**.
- Vollhardt, K.P.C.; Butenschön, H.; Elvers, B.; von der Saal, K.; *Organische Chemie*, 4. vollst. überarbeitete u. aktualis. Auflage, Wiley-VCH-Verlag, **1990**.
- Wagner, J.D.; Schwenke, D.C.; Greaves, K.A.; Zhang, L.; Anthony, M.S.; Blair, R.M.; Shadoan, M.K.; Williams, J.K. Soy Protein With Isoflavones, but not an Isoflavone-Rich Supplement,

- Improves Arterial Low-Density Lipoprotein Metabolism and Atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, 23, 2241-2246.
- Wall, L.G.; Favelukes, G. Early recognition in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis: root exudate factor stimulates root adsorption of homologous rhizobia. *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 3492-3499.
- Walla, C. Biodiesel als Chance für den Ölsaatenanbau (Biodiesel - Prospects for oilseed production). In: Darnhofer, I.; Wytrzens, H. K.; Walla, C. (Hrsg.) *Alternative Strategien für die Landwirtschaft*. Facultas (Wien) **2006**, 165-171.
- Walter, E.D. Genistin (an Isoflavone Glucoside) and its Aglucone, Genistein, from Soybeans. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 3273-3276.
- Walz, E. Isoflavon- und Saponin-Glucoside in Soja hispida. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1931**, 489, 118-155.
- Wang, H.; Murphy, P.A. Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. *J. Agric. Food Chem.* **1994a**, 42, 1666-1673.
- Wang, H.; Murphy, P.A. Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location. *J. Agric. Food Chem.* **1994b**, 42, 1674-1677.
- Ward, R.S. Lignans, neolignans and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 75-96.
- Watzl, B.; Leitzmann, B.; *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*, 2. überarb. und erw. Auflage, Hippokrates Verlag, **1999**.
- Whiting, D.A. Natural phenolic compounds 1900-2000: a bird's eye view of a century's chemistry. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 583-606.
- Williams, C.A.; Harborne, J.B.; Goldblatt, P. Correlations between phenolic patterns and tribal classification in the family iridaceae. *Phytochemistry* **1986**, 25, 2135-2154.
- Williams, J.K.; Delansorne, R.; Paris, J. Estrogens, progestins, and coronary artery reactivity in atherosclerotic monkeys. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, 65, 219-224.
- Wiseman, H.; Casey, K.; Clarke, D.B.; Barnes, K.A.; Bowey, E. Isoflavone Aglycon and Glucoconjugate Content of High- and Low-Soy U.K. Foods Used in Nutritional Studies. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 1404-1410.
- Wiseman, H.; O'Reilly, J.D.; Adlercreutz, H.; Mallet, A.I.; Bowey, E.A.; Rowland, I.R.; Sanders, T.A. 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, 395-400.
- Witte, S.W. Ursin, G.; Siemiatycki, J.; Thompson, W.D.; Paganini-Hill, A.; Haile, R.W. Diet and premenopausal bilateral breast cancer: A case-control study. *Breast Cancer Res. Treat.* **1997**, 42, 243-251.
- Wolf, W.J. Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, 18, 969-976.
- Wollenweber, E.; Stevens, J.F.; Klimo, K.; Knauff, J.; Frank, N.; Gerhäuser, C. Cancer chemopreventive *in vitro* activities of isoflavones isolated from *Iris germanica*. *Planta Med.* **2003**, 69, 15-20.



- Wong, S.-M.; Oshima, Y.; Pezzuto, J.M.; Fong, H.S.; Farnsworth, N.R. Plant anticancer agents. XXXIX: Triterpenes from *Iris missouriensis* (Iridaceae). *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 317-320.
- Woo, J.; Ho, S.C.; Sham, A. Longitudinal changes in the Body Mass Index and Body Composition over 3 years and relationship to health outcomes in Hong Kong Chinese age 70 and older. *J. Am. Geriatrics Soc.* **2001**, *49*, 737-746
- Wu, A.H.; Ziegler, R.G.; Nomura, A.M.Y.; West, D.W.; Kolonel, L.N.; Horn-Ross, P.L.; Hoover R.N.; Pike, M.C. Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *Am. Soc. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 1437S-1443S.
- Wu, A.H.; Wan, P.; Hankin, J.; Tseng, C.-C.; Yu, M.C.; Pike, M.C. Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 1491-1496.
- Würdig, G.; Woller, R. (Hrsg.) *Chemie des Weines*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, **1989**.
- Wuttke, W.; Jarry, H.; Westphalen, S.; Christoffel, V.; Seidlová-Wuttke, D. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2002a**, *83*, 133-147.
- Wuttke, W.; Jarry, H.; Westphalen, S.; Christoffel, V.; Garkow, C.; Seidlová-Wuttke, D. Phytoöstrogene - eine Alternative zur Standardhormonersatztherapie? *Gynäkologe* **2002b**, *35*, 1007-1020.
- Wuttke, W.; Jarry, H.; Seidlová-Wuttke, D. Isoflavones--Safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res. Rev.* **2007**, *6*, 150-188.
- Xu, X.; Wang, H.-J.; Murphy, P.A.; Cook, L.; Hendrich, S. Daidzein Is a More Bioavailable Soy milk Isoflavone than Is Genistein in Adult Women. *J. Nutr.* **1994**, *124*, 825-832.
- Xu, X.; Duncan, A.; Merz, B.; Kurzer, M. Effects of soy isoflavones on estrogen and phytoestrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1998**, *7*, 1101-1108.
- Xu, X.; Duncan, A.M.; Wangen, K.E.; Kurzer, M.S. Soy Consumption Alters Endogenous Estrogen Metabolism in Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2000**, *9*, 781-786.
- Yamamoto, H.; Kimata, J.; Senda, M.; Inoue, K. Dimethylallyl diphosphate: Kaempferol 8-dimethylallyl transferase in *Epimedium diphyllum* cell suspension cultures. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 23-28.
- Yamamoto, S.; Sobue, T.; Kabayashi, M.; Sasaki, S.S.T. Soy, Isoflavones, and Breast Cancer Risk in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 906-913.
- Yamashita, Y.; Kawada, S.-Z.; Nakano, H. Induction of mammalian topoisomerase II dependent dna cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 737-744.
- Yang, G.; Shu, X.-O.; Jin, F.; Zhang, X.; Li, H.-L.; Li, Q.; Gao, Y.-T.; Zheng, W. Longitudinal study of soy food intake and blood pressure among middle-aged and elderly Chinese women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 1012-1017.
- Yoshida, K.; Sato, Y.; Kameda, K.; Isobe, M.; Kondo, T. Structural analysis and measurement of anthocyanins from colored seed coats of *Vigna*, *Phaseolus*, and *Glycine* legumes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 589-593.

- Zhan, S.; Ho, S.C. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 397-408.
- Zhang, B.; Song, Y. Study on the optimum condition of acid hydrolysis for soybean isoflavone glycosides. *Shipin Kexue (China)* **2002**, *23*, 75-78.
- Zhang, Y.; Wang, G.-J.; Song, T.T.; Murphy, P.A.; Hendrich, S. Urinary Disposition of the Soybean Isoflavones Daidzein, Genistein and Glycitein Differs among Humans with Moderate Fecal Isoflavone Degradation Activity. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 957-962.
- Zhou, J.-R. Soy and the prevention of lifestyle-related diseases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2004**, *31*, S14-S19.
- Zhou, J.-R.; Gugger, E.T.; Tanaka, T.; Guo, Y.; Blackburn, G.L.; Clinton, S.K. Soybean Phytochemicals Inhibit the Growth of Transplantable Human Prostate Carcinoma and Tumor Angiogenesis in Mice. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1628-1635.
- Zhuo, X.-G.; Melby, M.K.; Watanabe, S. Soy Isoflavone Intake Lowers Serum LDL Cholesterol: A Meta-Analysis of 8 Randomized Controlled Trials in Humans. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 2395-2400.

Online-Verweise (zuletzt besucht im Februar 2008)

<http://www.asa-europe.org>

<http://www.bmelv.de>

<http://www.bll.de>

<http://faostat.fao.org/>

<http://www.medfuehrer.de/>

<http://www.millionwomenstudy.org>

<http://www.roempp.com>

Statistisches Bundesamt, 2007: <http://www.destatis.de>.

Umweltlexikon, online: [http://umweltlexikon-aktuell.de\(...\)](http://umweltlexikon-aktuell.de(...)).

<http://lgl.bayern.de/ipz/gruenland/09212/>.

[http://dr-rnh.rlp.de\[...\]/Leguminosen...](http://dr-rnh.rlp.de[...]/Leguminosen...)

<http://artemia.ws24.cc/>

<http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/55.htm> (Heemcke, 2003: Artemia salina oder der Salinenkrebs)

## 7 Anhang

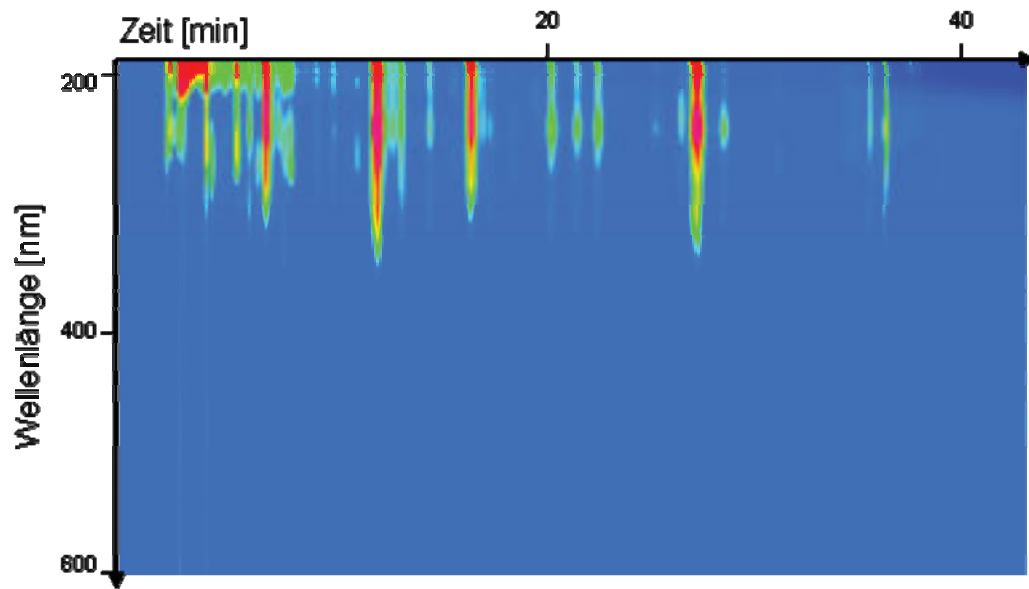


Abbildung 117: Weiteres Beispiel eines HPLC-DAD-Chromatogramms eines Extraktes aus Soja (*Glycine max* L.).



Tabelle 31: Verwendete HSCCC-Systeme

| Probe                     | CCC-System (Fließmittelsystem, Flussrate, Umdrehungsgeschwindigkeit)                                                                                                                         | Isolierte Hauptkomponenten       |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Soja                      | <i>tert.</i> -butylmethylether/Acetonitril/Wasser (2/2/3; V/V/V), 3,2 mL/min, 600 U/min                                                                                                      | Genistin, 6''-O-Acetyl-daidzin   |
| F2 (Daidzin und Glycitin) | <i>tert.</i> -Butylmethylether/Acetonitril/n-Butanol/Wasser (2/2/1/5; V/V/V/V), 2,5 mL/min, 600 U/min                                                                                        | Daidzin, Glycitin                |
| F2 (Daidzin und Glycitin) | <i>tert.</i> -Butylmethylether/Acetonitril/n-Butanol/Wasser (2/1/2/5; V/V/V/V), nach 260 min durch TBME abgesättigtes Wasser und Acetonitril (10/1; V/V) ausgetauscht, 2,5 mL/min, 600 U/min | Daidzin, Glycitin                |
| Rotklee (Glucoside)       | <i>tert.</i> -Butylmethylether/Acetonitril/Wasser (6/3/8; V/V/V), 2,8 mL/min, 600 U/min                                                                                                      | Sissotrin, Ononin                |
| Rotklee (Aglykone)        | Hexan/EtOAc/Methanol/H <sub>2</sub> O (6/5/6/5; V/V/V/V), 3,0 mL/min, 800 U/min                                                                                                              | Biochanin A, Formononetin        |
| Rotklee (Aglykone)        | <i>tert.</i> -Butylmethylether/n-Butanol/Acetonitril/Wasser (6,15/4/5/5; V/V/V/V), nach 150 min durch Wasser/Acetonitril (8,5/1,5; V/V) ersetzt, 2,5 mL/min, 600 U/min                       | Afrormosin                       |
| Rotklee (Aglykone)        | Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (6/4/5/5; V/V/V/V), 3,2 mL/min, 800 U/min                                                                                                                  | Calycosin, Irilon                |
| Iris (Glykoside)          | <i>tert.</i> -Butylmethylether/n-Butanol/Acetonitril/Wasser (2,5/0,5/2/5; V/V/V/V), 3,2 mL/min, 800 U/min                                                                                    | Irilon-glucosid, Iridin-glucosid |
| Iris (Aglykone)           | Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (6,15/3,85/5/5; V/V/V/V), 3,4 mL/min, 1000 U/min                                                                                                           | Irilon, Nigricin                 |
| Kudzu                     | <i>tert.</i> -Butylmethylether/Acetonitril/Wasser (8/5/11; V/V/V), 3,0 mL/min, 800 U/min                                                                                                     | Puerarin                         |
| Weintrauben-trester       | Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (2,75/5/2,75/5; V/V/V/V), 2,7 mL/min, 900 U/min                                                                                                            | Resveratrol                      |
| Alfalfa-Sprossen          | Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (3,95/5/3,9/5; V/V/V/V), 3,2 mL/min, 700 U/min                                                                                                             | Coumestrol                       |

Tabelle 32: Gehalte von Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln auf der Basis von Soja-Extrakt berechnet auf g/100 g Nahrungsergänzungsmittel.

| Produkt | Daidzin<br>[g/100 g] | Glycitin<br>[g/100 g] | Genistin<br>[g/100 g] | 6''-O-Acetyl-<br>daidzin [g/100 g] | 6''-O-Acetyl-<br>genistin [g/100 g] |
|---------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| I       | 1,33                 | 0,48                  | 1,74                  | 0,10                               | 0,09                                |
| II      | 3,49                 | 1,64                  | 2,71                  | 0,51                               | 0,29                                |
| III     | 0,87                 | 0,52                  | 0,58                  | 0,01                               | 0,02                                |
| IV      | 2,35                 | 0,82                  | 1,76                  | -                                  | 0,07                                |
| V       | 3,91                 | 1,68                  | 3,04                  | -                                  | 0,05                                |
| VI      | 0,82                 | 0,22                  | 0,78                  | 0,08                               | 0,44                                |
| VII     | 3,15                 | 2,81                  | 0,55                  | 0,69                               | 0,27                                |
| VIII    | 1,04                 | 0,49                  | 0,69                  | 0,06                               | 0,01                                |
| IX      | 3,36                 | 3,31                  | 0,34                  | 0,16                               | 0,02                                |
| X       | 1,47                 | 0,81                  | 0,83                  | -                                  | -                                   |
| XI      | 3,51                 | 1,34                  | 3,34                  | 0,09                               | 0,02                                |

Tabelle 33: Vergleich der bestimmten Gehalte von Isoflavonen aus Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Soja. Aufgeführt sind die bestimmten Gehalte als Glycoside und demgegenüber die berechneten Gehalte als Aglykone sowie die Angaben seitens des jeweiligen Herstellers pro Kapsel oder Tablette.

| Produkt Nummer | Gehalt Isoflavone insgesamt [mg/Kapsel] | Gehalt Hauptisoflavone [mg/Kapsel] | Herstellerangabe über den Gehalt an Isoflavonen [mg/Kapsel] | Berechneter Gehalt als Aglykone [mg/Kapsel] |
|----------------|-----------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| I              | 75,48                                   | 71,55                              | 50,00                                                       | 44,72                                       |
| II             | 33,68                                   | 30,55                              | 20,00                                                       | 20,72                                       |
| III            | 27,76                                   | 27,25                              | 20,00                                                       | 17,23                                       |
| IV             | 80,93                                   | 79,83                              | 50,00                                                       | 50,13                                       |
| V              | 97,18                                   | 96,66                              | 100,00                                                      | 60,29                                       |
| VI             | 21,06                                   | 16,37                              | 25,00                                                       | 12,81                                       |
| VII            | 46,69                                   | 45,59                              | 17,50                                                       | 29,08                                       |
| VIII           | 31,63                                   | 30,65                              | 20,00                                                       | 19,57                                       |
| IX             | 114,33                                  | 111,34                             | 50,00                                                       | 69,72                                       |
| X              | 49,94                                   | 49,94                              | 50,00                                                       | 31,02                                       |
| XI             | 52,93                                   | 52,18                              | 50,00                                                       | 32,79                                       |

Tabelle 34: Ermittelte Gehalte an Isoflavonen in Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Rotklee-Extrakt im Vergleich mit den Angaben des Herstellers.

| Produkt-<br>Nummer | Gehalt<br>Formononetin<br>[mg/Kapsel] | Gehalt<br>Biochanin A<br>[mg/Kapsel] | Gehalt Irlon<br>[mg/Kapsel] | Gesamtgehalt<br>[mg/Kapsel] | Herstellerangabe<br>über den Gehalt<br>an Isoflavonen<br>[mg/Kapsel] |
|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| I                  | 19,78                                 | 26,42                                | 2,92                        | 49,11                       | 50,00                                                                |
| II*                | 23,35                                 | 6,47                                 | 4,99                        | 34,80                       | 40,00                                                                |
| III                | 24,21                                 | 4,68                                 | 5,03                        | 33,91                       | 40,00                                                                |
| IV*                | 27,65                                 | 42,38                                | 3,52                        | 73,55                       | 50                                                                   |
| V                  | 17,34                                 | 4,88                                 | 4,57                        | 26,79                       | 50                                                                   |
| VI*                | 19,07                                 | 5,08                                 | 6,37                        | 30,52                       | 40                                                                   |
| VII*               | 26,09                                 | 15,36                                | 7,74                        | 49,18                       | 40                                                                   |

\* = in Tablettenform

Tabelle 35: Ermittlung einer geeigneten Extraktionsdauer für die Aufarbeitung von Nahrungsergänzungsmitteln mit Zusatz von Rotklee-Extrakt.

| Extraktionszeit [min] | FORM [mg/L] | IRI [mg/L] | BIOA [mg/L] | Summe [mg/L] |
|-----------------------|-------------|------------|-------------|--------------|
| 10                    | 11,55       | 1,83       | 2,64        | 16,02        |
| 20                    | 11,90       | 1,79       | 2,69        | 16,37        |
| 30                    | 11,89       | 1,84       | 2,74        | 16,47        |
| 40                    | 12,29       | 1,83       | 2,79        | 16,91        |
| 50                    | 12,16       | 1,83       | 2,83        | 16,82        |
| 60                    | 11,72       | 1,79       | 2,69        | 13,87        |

Tabelle 36: Ergebnisse zur Variation des Extraktionsmittels, wobei ein Nahrungsergänzungsmittel auf der Basis von Soja-Extrakt mit verschiedenen Extraktionsmitteln extrahiert wurde und daraufhin die Gehalte an Genistin und Daidzin bestimmt wurden.

| Extraktionsmittel | Genistin [mg/Kapsel] | Daidzin [mg/Kapsel] |
|-------------------|----------------------|---------------------|
| 40% MeOH          | 33,00                | 29,99               |
| 50% MeOH          | 60,10                | 40,67               |
| 60% MeOH          | 34,10                | 30,83               |
| 70% MeOH          | 34,20                | 30,74               |
| 80% MeOH          | 22,00                | 22,55               |
| 40% EtOH          | 33,90                | 30,51               |
| 50% EtOH          | 30,57                | 29,20               |
| 60% EtOH          | 27,21                | 28,80               |
| 80% EtOH          | 19,50                | 20,90               |



