



universität  
wien

# **DIPLOMARBEIT**

**Titel der Diplomarbeit**

**„Quantifizierung von Isoflavonen  
in Soja- und Rotklee-Präparaten  
mittels narrow bore HPLC“**

**Verfasserin**

**Katharina Weinfurter**

**Angestrebter akademischer Grad**

**Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)**

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuerin / Betreuer: ao. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei allen, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Vorab danke ich Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch, dem Vorstand des Departments für Pharmakognosie, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Besonders bedanken möchte ich mich bei ao.Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn für die außergewöhnlich gute Betreuung und Unterstützung bei sämtlichen Problemstellungen und Fragen, sowie für das sehr angenehme Arbeitsklima.

Weiters danke ich Dr. DI. Stanimira Krasteva, die mir während der praktischen Arbeit am Institut mit Rat und Tat zur Seite stand und stets Zeit fand, offene Fragen zu besprechen und gerätetechnische Probleme zu lösen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich bei all meinen Hochs und Tiefs immer begleitet haben und mich liebevoll unterstützt haben. Für die Geduld während des gesamten Studiums möchte ich mich auch bei meinem Freund bedanken.

## **Kurzfassung**

Das Ziel dieser Diplomarbeit war die Analyse von Isoflavonen in Soja- und Rotklee-Präparaten mittels HPLC an einer narrow bore Säule.

Damit sollte sich die Analysezeit verkürzen, Lösungsmittel gespart werden und eine schnelle und präzise Analyse erreicht werden.

Als stationäre Phase wurde eine ACE C<sub>18</sub> AR Säule verwendet (150mm x 2,1mm, 3µm Partikelgröße). Die mobile Phase setzte sich aus Wasser, das mit Essigsäure auf den pH-Wert 2,8 eingestellt wurde (Eluent A), und Acetonitril mit 6ml Essigsäure/l (Eluent B) zusammen.

Es wurden verschiedene Gradienten an einer Mischung von 8 Standardsubstanzen (Daidzin, Glycitin, Genistin, Daidzein, Genistein, Glycitein, Formononetin und Biochanin A) erprobt. Daraus ergab sich folgender optimaler Gradientenlauf: 0-7 Minuten isokratisch mit einer Konzentration von 15% B, innerhalb der nächsten 20 Minuten erfolgte eine Steigerung auf 75% B.

Zur Validierung der Methode wurde die Reproduzierbarkeit bestimmt. Aus den Analysen wurden die „intra-day“ als auch die „inter-day“ Reproduzierbarkeit berechnet. Die Ergebnisse zeigten relativ geringe Abweichungen und somit war insgesamt die Reproduzierbarkeit äußerst zufrieden stellend. Weiters wurde eine Bestimmung der Wiederfindungsraten der einzelnen Analyten mittels Dotierung zur Überprüfung der quantitativen Erfassung der Isoflavone durchgeführt. Die Abweichungen bewegten sich in einem engen Bereich um 100%, sodass Verluste an Isoflavonen während der Aufarbeitung der Droge und der Analyse ausgeschlossen werden konnten. Mit Hilfe der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen konnte eine hohe Empfindlichkeit des Systems gezeigt werden.

Mit der entwickelten und optimierten HPLC-Methode können die Soja- und Rotkleeisoflavone in Pflanzenmatrix, aber auch in verschiedenen Handelspräparaten mittels des internen Standards Rutin quantifiziert werden. Im Vergleich zu anderen HPLC-Methoden konnte die Analysenzeit verkürzt werden und eine Ersparnis an Lösungsmittel von über 70% erreicht werden.

## Abstract

The aim of this thesis was the analysis and determination of isoflavones in soy and red clover by means of reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC) on a narrow bore stationary phase to shorten time of analysis and solvent consumption for a fast and precise determination.

The chromatographic separation of the compounds was achieved with a ACE C18 AR column (3 $\mu$ m, 150mm x 2,1mm). Gradient elution was performed with water (eluent A) and acetonitrile (eluent B), at a flow rate of 0,35ml/min. Acetic acid was used as a modifier for both eluents.

With a mixture of 8 standards (daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein, formononetin and biochanin A) different gradients were tested to obtain the best separation of the isoflavones. As a result the ideal gradient was from 0-7 minutes isocratic elution with 15% B, in the following 20 minutes the concentration of eluent B was increased to 75% B. For validation purposes the reproducibility of the method was examined. The „intra-day“ and „inter-day“ reproducibility was determined and the result was very satisfying, due to marginal differences. Furthermore, the limits of quantification and detection showed a very high sensitivity of the system. The recovery of the analytes was determined by dotation experiments resulting in approximate 100%. Thus, the loss of analytes during extraction and HPLC-analysis was excluded. The limits of detection and quantification showed the high sensitivity of the system.

This new method allows an excellent separation of the isoflavones of soy and red clover in plant material and in food supplements by internal standardisation with rutin.

The time of analyses was shortened and the amounts of sample and of solvent could be reduced for about 70%.

## Abkürzungen

Ac-Din.....	Acetyldaidzin
Ac-Gin.....	Acetylgenistin
Ac-Glyin.....	Acetylglycitin
Ac.....	Acetyl
De.....	Daidzein
Din.....	Daidzin
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
EL.....	Eichlösung
EW.....	Einwaage
Ex.....	Extrakt
G.....	Genistein
Gin.....	Genistin
Gly.....	Glycitein
Glyin.....	Glycitin
HPLC.....	Hochleistungsflüssigchromatographie
Is.....	Isoflavon
IST.....	interner Standard
Kps.....	Kapsel
Konz.....	Konzentration
KF.....	Korrekturfaktor
MeOH.....	Methanol
MG.....	Molekulargewicht
mg.....	Milligramm
MW.....	Mittelwert
St.....	Standard
Stabw.....	Standardabweichung
VK.....	Variationskoeffizient
µl.....	Mikroliter

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Material und Methoden .....	7
2.1	Probenmaterial.....	7
2.2	Extraktion .....	8
2.3	HPLC-Bedingungen .....	9
3	Ergebnisse .....	10
3.1	Optimierung der HPLC-Methode.....	10
3.2	Eichung.....	18
3.3	Reproduzierbarkeit .....	27
3.4	Quantitative Analyse verschiedener Proben.....	32
3.4.1	Analyse von Soyamehl.....	33
3.4.2	Analyse von Soyaextrakt > 40% Isoflavone .....	36
3.4.3	Analyse von Rotklee-Extrakt WBC3601 .....	38
3.4.4	Isoflavongehalte in Nahrungsergänzungsmitteln aus Soja und/oder Rotklee .....	40
3.4.4.1	Mega Femin Kapseln .....	40
3.4.4.2	Natur-Nahrung Isoflavon-Kapseln.....	42
3.4.4.3	Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees .....	44
3.4.4.4	Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees.....	46
3.4.4.5	Sanvita Sarapis Soja Kapseln.....	48
3.4.5	Zusammenfassung der Analysen .....	50
3.5	Wiederfindungsraten der untersuchten Isoflavone .....	54
3.5.1	Wiederfindungsrate von Daidzin .....	55
3.5.2	Wiederfindungsrate von Glycitin.....	56
3.5.3	Wiederfindungsrate von Genistin .....	57
3.5.4	Wiederfindungsrate von Daidzein .....	58
3.5.5	Wiederfindungsrate von Glycitein .....	59
3.5.6	Wiederfindungsrate von Genistein.....	60
3.5.7	Wiederfindungsrate von Formononetin .....	61

3.5.8	Wiederfindungsrate von Biochanin A.....	62
3.6	Bestimmungs- und Nachweisgrenze .....	63
4	Zusammenfassung.....	64
	Abbildungsverzeichnis.....	67
	Tabellenverzeichnis.....	69
	Literaturverzeichnis.....	71
	Lebenslauf.....	73



# 1 Einleitung

Phenylpropanoide stellen eine sehr große Gruppe von sekundären Pflanzenmetaboliten dar, die im Vergleich zu anderen Pflanzenstoffen sehr gut charakterisiert sind.

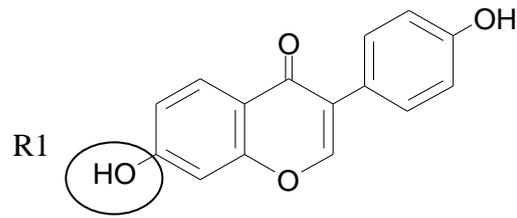
Die Gruppe der Isoflavonoide gehört zu den Phenylpropanoiden und ist hauptsächlich in der Familie der Fabaceen verbreitet. Ihr Grundgerüst leitet sich von dem der Flavone ab und besteht aus einem Chroman-Grundskelett [1]. Isoflavonoide sind insofern bedeutend, da sie einen wichtigen Bestandteil der menschlichen Ernährung darstellen, der mit positiven Gesundheitseffekten in Verbindung gebracht wird [2].

Rotklee und Soja stellen wichtige Isoflavonquellen dar und stehen seit ca. 20 Jahren im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Dies ist auf die Bedeutung von Soja als Bestandteil menschlicher Nahrung – vor allem im asiatischen Raum – zurückzuführen. Rotklee hingegen wird ausschließlich in Form von Extrakten als Nahrungsergänzungsmittel verwendet.

Die Isoflavone in Sojabohnen und Sojaprodukten basieren auf drei Geninen, nämlich Genistein, Daidzein und Glycitein. Da diese Isoflavone auch in der  $\beta$ -glucosidischen, sowie der acetylglucosidischen und der malonylglucosidischen Form existieren, ergeben sich insgesamt 12 Isomere. In der  $\beta$ -glucosidischen Form werden sie Daidzin, Genistin und Glycitin bezeichnet, in der acetylglucosidischen Form 6''-O-Acetyldaidzin, 6''-O-Acetylglycitin und 6''-O-Acetylgenistin. In der malonylglucosidischen Form liegen sie als 6''-O-Malonyldaidzin, 6''-O-Malonylglycitin und 6''-O-Malonylgenistin vor [3]. In der Sojabohne sind 99% 7-O-Monoglucoside enthalten [4], großteils an Proteine gebunden. Erst durch die hydrolytische Wirkung der  $\beta$ -Glucosidasen werden die Aglycone zum Beispiel während des Quellens der Sojabohne und der Fermentation freigesetzt [5].

**Abbildung 1:** Struktur von Daidzein und davon abgeleiteten Glucosiden

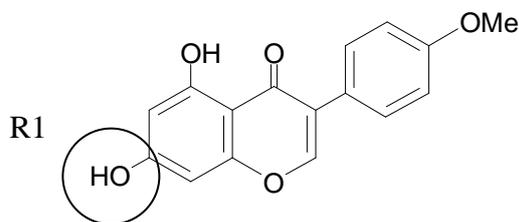
---



	R1	MG
Daidzein	OH	254
Daidzin	O-glucosid	416
Acetyldaidzin	O-acetylglucosid	458
Malonyldaidzin	O-malonylglucosid	502

**Abbildung 2:** Struktur von Genistein und davon abgeleiteten Glucosiden

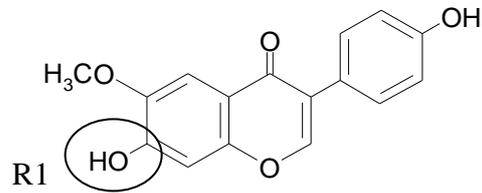
---



	R1	MG
Genistein	OH	270
Genistin	O-glucosid	432
Acetylgenistin	O-acetylglucosid	474
Malonylgenistin	O-malonylglucosid	518

**Abbildung 3:** Struktur von Glycitein und davon abgeleiteten Glucosiden

---



	R1	MG
Glycitein	OH	284
Glycitin	O-glucosid	446
Acetylglycitin	O-acetylglucosid	488
Malonylglycitin	O-malonylglucosid	532

In der Sojapflanze stellen Genistein und Daidzein und deren Glucoside die Hauptkomponenten dar.

Die chemische Struktur dieser Substanzen weist eine räumliche Ähnlichkeit mit 17 $\beta$ -Östradiol auf. Dadurch können sie eine Wirkung am Östrogenrezeptor entfalten. Sie zeigen sowohl am alpha- (ER- $\alpha$ ) als auch am beta (ER- $\beta$ )-Östrogenrezeptor eine Aktivität und weisen auch Affinität zum Progesteronrezeptor und Androgenrezeptor auf. Allerdings ist die Aktivierung des Östrogenrezeptors deutlich geringer im Vergleich zur Aktivierung durch 17 $\beta$ -Östradiol, und zwar um den Faktor 100 bis 10.000 [6].

Isoflavonoide können als Agonisten oder Antagonisten des Östrogenrezeptors auftreten und folglich östrogene oder antiöstrogene Wirkung ausüben. Das hängt von der Verteilung von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  in den verschiedenen Geweben sowie von der Konzentration endogener Östrogene ab. Die Affinität der Isoflavonoide zum  $\beta$ -Rezeptor ist deutlich größer als zum  $\alpha$ -Rezeptor, darum spricht man auch von pflanzlichen selektiven Östrogenrezeptormodulatoren, den Phyto-SERMS [7].

Der ER- $\alpha$  ist vor allem in den Zellen von Brustdrüse, Uterus und Leber zu finden, während der ER- $\beta$  in den Knochen, Gehirn, Blutgefäßen, Lunge und Urogenitaltrakt vorherrscht.

Dadurch wirken die Phytoöstrogene gewebespezifisch unterschiedlich. Aufgrund von in-vitro Untersuchungen kann man davon ausgehen, dass Isoflavone bei postmenopausalen Frauen, die unter einem niedrigen Östrogenspiegel leiden, als Östrogenagonisten wirken. Bei prämenopausalen Frauen mit hohen Östrogenkonzentrationen kommt die östrogenantagonistische Wirkung zur Geltung, da die Isoflavone mit dem Östradiol um die Bindungsstelle konkurrieren und diese dann kompetitiv hemmen [8].

Deshalb wird das Potential von Isoflavonen, menopausale Östrogenmangelerscheinungen wie Osteoporose, klimakterische Beschwerden und kardiovaskuläre Krankheiten zu vermindern, intensiv diskutiert. Weiters wird auch aufgrund der antioxidativen Eigenschaften eine präventive Wirkung bei Erkrankungen wie Arthritis und hormonabhängigen Karzinomen, wie Brustkarzinom und Prostatakarzinom angenommen [9].

Durch die Vielzahl der Studien hat sich die Nachfrage für Nahrungsergänzungsmittel, die reich an Isoflavonen sind, stark erhöht.

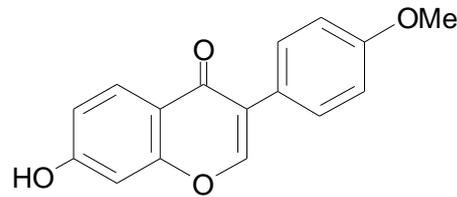
Als billige Quelle zur Produktion von solchen Präparaten hat sich besonders in Europa in den letzten 15 Jahren Rotklee etabliert.

Rotklee gehört auch zur Familie der Fabaceen und ist eine zweijährige Pflanze, die ein wichtiges Futtermittel für Tiere darstellt [10].

Rotklee enthält neben sehr geringen Mengen an Genistein und Daidzein, den Hauptisoflavonen in Soja, hohe Konzentrationen der methylierten Isoflavone Formononetin und Biochanin A. Diese liegen in der Pflanze als Glykoside vor. Nach enzymatischer Hydrolyse sind sie in Präparaten überwiegend als Genine zu finden. Diese Verbindungen werden zu Daidzein und Genistein metabolisiert. Obwohl Unterschiede in der Zusammensetzung der Isoflavone zwischen Soja und Rotklee bestehen, erfolgt die Absorption im menschlichen Körper nach der Phase 1 Metabolisierung völlig gleich. Deshalb werden Rotkleepräparate als Nahrungsergänzungsmittel vorwiegend gegen menopausale Beschwerden, wie Hitzewallungen, Nachtschweiss oder nervöse Verstimmung beworben [2].

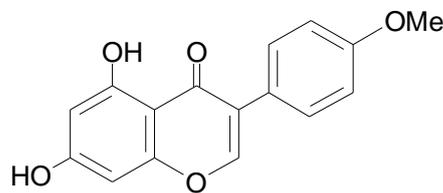
**Abbildung 4:** Struktur von Formononetin

---



**Abbildung 5:** Struktur von Biochanin A

---



Für die Gehaltsbestimmung der Isoflavone in Soja und Rotklee erwies sich vor allem die HPLC als sehr gut geeignet [11].

Die am häufigsten verwendete Methode zur Probenaufbereitung mit Methanol ist die Extraktion ohne weitere Aufreinigung des Pflanzenmaterials. Die Auftrennung und Analyse erfolgt mittels Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. Es gibt auch einige Methoden, die die Isoflavone nach der Spaltung von Isoflavon-Proteinkonjugaten in Soja durch saure, basische oder enzymatische Hydrolyse bestimmen. Diese Aufarbeitungsmethoden sind allerdings relativ aufwändig und beanspruchen sehr viel Zeit [12].

Für die Detektion von Isoflavonen werden meistens UV [13,14], UV-DAD [15,16], CEAD [17] (coulometrische Detektion) oder MS als Detektoren [15] verwendet.

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war, eine geeignete Analyse von Isoflavonen in Soja und Rotklee mittels HPLC zu entwickeln, die eine Trennung an einer narrow-bore stationären Phase ermöglicht und somit die Analysenzeit verkürzt und den Lösungsmittelverbrauch einschränkt. Die Quantifizierung sollte mittels interner

Standardisierung durchgeführt werden und es sollte eine möglichst rasche und präzise HPLC-Methode entwickelt und validiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probenmaterial

Bei dem verwendeten Drogenmaterial handelte es sich um:

- **Soyamehl** „Soyaflavone“, Firma Soja Austria, Wien
- **Rotklee-Extrakt WBC3601**, Firma Melbrosin GmbH, Wien
- **Soyaextrakt** „Extrakt Soyisoflavone >40%“, (Ch.Nr.030901) Firma Melbrosin GmbH, Wien
- **Soja-Rotklee-Präparate**, die als Nahrungsergänzungsmittel in österreichischen Apotheken vertrieben werden:
  - Mega Femin Kapseln, Bachmann Springs GmbH, Salzburg, Sojabohnenextrakt 37,5mg/Kapsel und Rotkleeextrakt 37mg/Kapsel
  - Isoflavon Kapseln aus Rotklee und Soja, Natur-Nahrung Vertriebs GmbH, Wien, 45mg Totalisoflavone/Kapsel
  - Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees, Apomedica, Graz, aus Rotklee und Soja
  - Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees, Apomedica, Graz, aus Rotklee und Soja
  - Sanvita Sarapis Soja Kapseln, Sanamed GmbH, Wien, Sojabohnen-Extrakt , und Rotklee-Extrakt 25mg Totalisoflavone/Kapsel

## 2.2 Extraktion

30mg pulverisiertes Extrakt wurde in einen 3ml Messkolben eingewogen und mit einer Mischung aus DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1) versetzt. Es wurde bei Raumtemperatur 20min lang am Ultraschallbad extrahiert. Abschließend wurde die Probe abzentrifugiert und im Verhältnis 1:5 (Probe:Lösungsmittelgemisch) verdünnt. Zur HPLC-Analyse wurden 3µl in die Apparatur eingespritzt.

Für die Analyse wurde das Sojamehl zuerst entfettet:

10g Probe wurden mit 30ml Petrolether versetzt und 15min. am Ultraschallbad extrahiert. Anschließend zentrifugierte man die Probe ab. Der Rückstand wurde weitere 3mal mit 30ml Petrolether extrahiert und abzentrifugiert. Das entfettete Mehl wurde an der Luft getrocknet.

## 2.3 HPLC-Bedingungen

<u>System:</u>	SHIMADZU
<u>Pumpe:</u>	LC-20AD
<u>Detektor:</u>	SPD M20A diode array detector, Wavelength: 220-500nm
<u>Column oven:</u>	CTO-20AC
<u>Auto injector:</u>	SIL-20AC
<u>Stationäre Phase:</u>	ACE C18 AR, 150mm x 2,1mm x 3 $\mu$ m (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, UK)
<u>Mobile Phase:</u>	Eluent A: H <sub>2</sub> O mit CH <sub>3</sub> COOH auf pH 2,8 eingestellt Eluent B: Acetonitril (AcCN) mit CH <sub>3</sub> COOH (6ml/L)

**Tabelle 1:** Gradientenprofil

---

Time	Eluent A	Eluent B
0	85	15
7	85	15
27	25	75
27,1	0	100
37	0	100
37,1	85	15
44	85	15

<u>Purge:</u>	10 Minuten mit 100% B
<u>Equilibrierung:</u>	7 Minuten mit 15% B
<u>Flussrate:</u>	0,35ml/min
<u>Injektionsvolumen:</u>	3 $\mu$ l
<u>Temperatur:</u>	25°C
<u>Detektion:</u>	254nm
<u>Interner Standard:</u>	Rutin

## 3 Ergebnisse

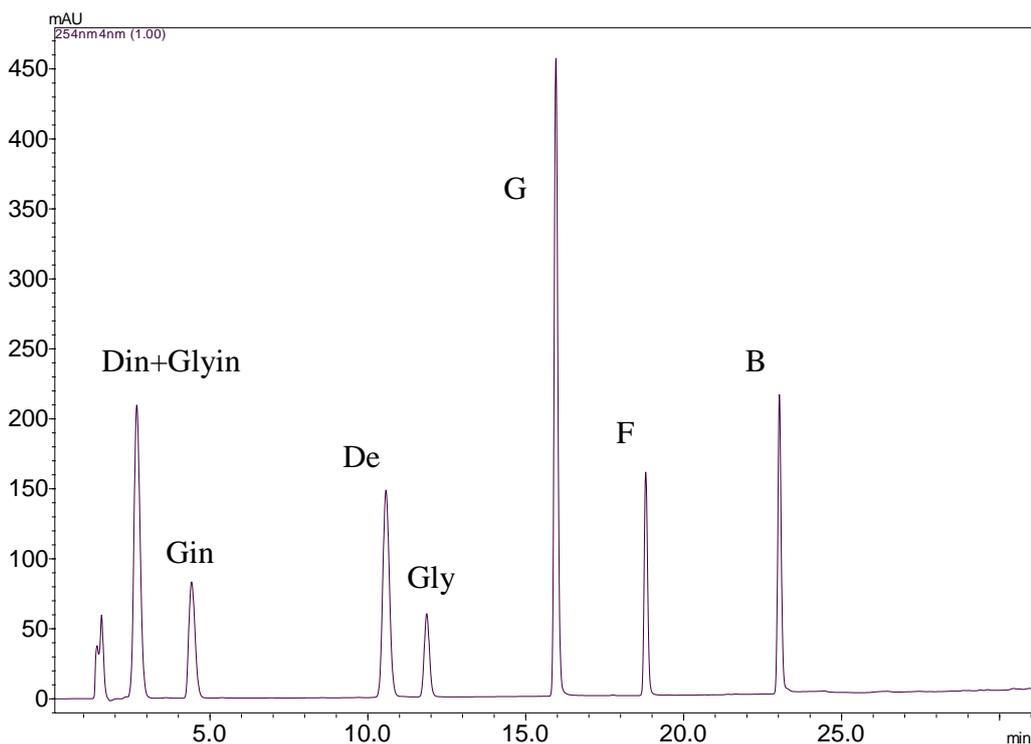
### 3.1 Optimierung der HPLC-Methode

Ausgehend von einem System das mit einer Hypersil BDS-RP-C18 5 $\mu$ m, 4x250mm Säule gearbeitet hatte [18], wurde versucht eine geeignete Methode auf einer narrow-bore Säule zu entwickeln, um die Isoflavone in Soja und Rotklee gut zu trennen.

Das Ziel war, die Methode so zu adaptieren, dass alle Isoflavonkomponenten in Soja und Rotklee erfasst wurden und präzise zu quantifizieren waren. Als stationäre Phase wurde eine ACE C<sub>18</sub> AR Säule (150mm x 2,1mm x 3 $\mu$ m) verwendet. Die mobile Phase setzt sich aus Eluent A (Wasser mit Essigsäure auf pH 2,8 eingestellt) und Eluent B (Acetonitril mit Essigsäure (6ml/L)) zusammen.

Flussrate und Gradientenprofil wurden an die narrow-bore Säule angepasst und die Trennung für eine Mischung von 8 Standardsubstanzen (Daidzin, Glycitin, Genistin, Daidzein, Glycitein, Genistein, Formononetin und Biochanin A) überprüft. Daraus ergab sich folgender Gradientenverlauf: 0-5 Minuten 20% Eluent B, innerhalb der nächsten 15 Minuten Steigerung auf 50% B und eine weitere Steigerung auf 83% B innerhalb von 10 Minuten. Die Analyse wurde mit einer Flussrate von 0,35ml/min durchgeführt.

**Abbildung 6:** HPLC einer Mischung von 8 Standards (Bedingungen siehe Seite 9)

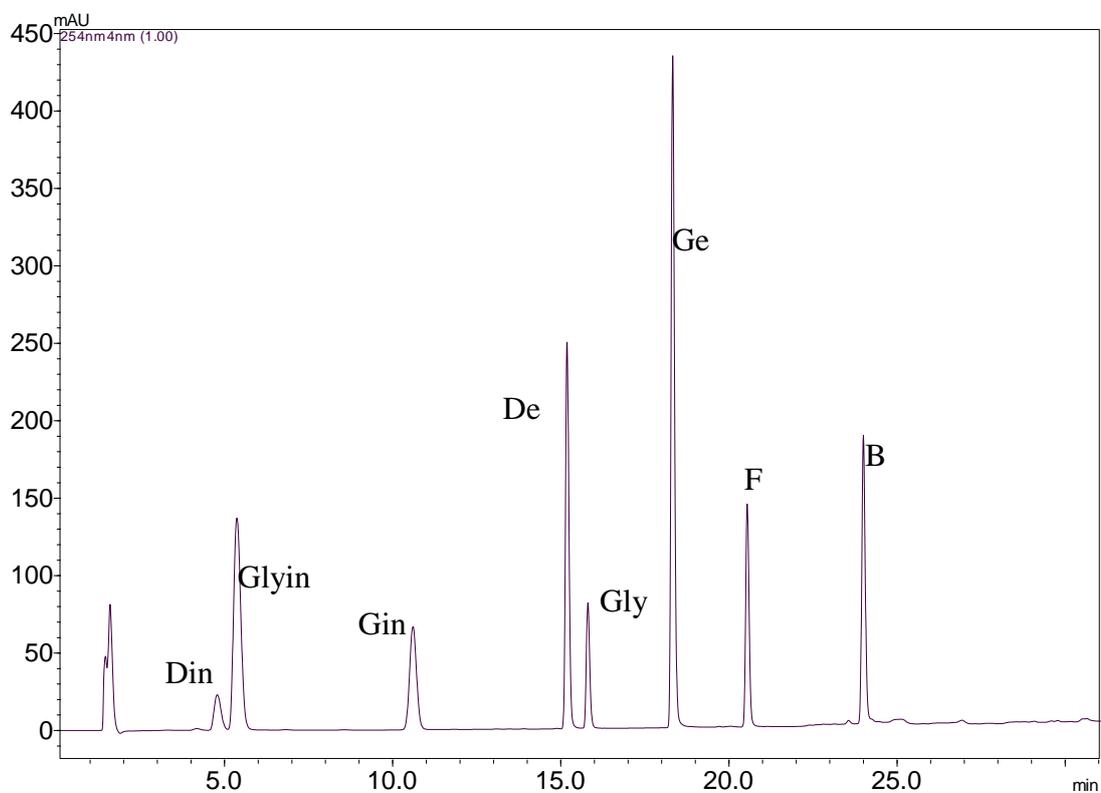


Da mit diesen Gradienten keine Trennung von Daidzin und Glycitin erreicht werden konnte, wurde eine niedrigere Anfangskonzentration von Eluent B erprobt. Mit der Veränderung der Startkonzentration von B von 20% auf 15% konnte eine Auftrennung von Daidzin und Glycitin erzielt werden.

**Abbildung 7: HPLC einer Mischung von 8 Standards (Bedingungen siehe Seite 9)**

---

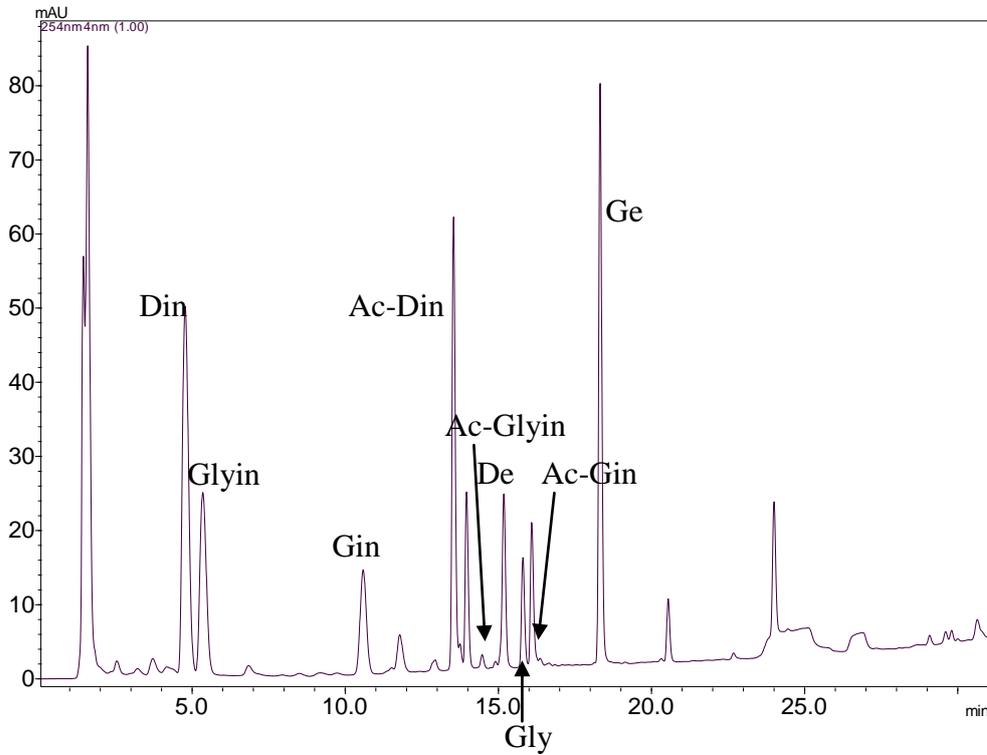
Gradient: 0-5 15% B, innerhalb der nächsten 15 Minuten Steigerung auf 50% B und in 10 Minuten auf 83% B



Da die Peaks der Isoflavone gut getrennt waren und keine Überlagerungen auftraten, wurden das Sojamehl und das Rotklee-Extrakt zur Analyse herangezogen (Abbildungen 8 u. 9, siehe Seite 12)

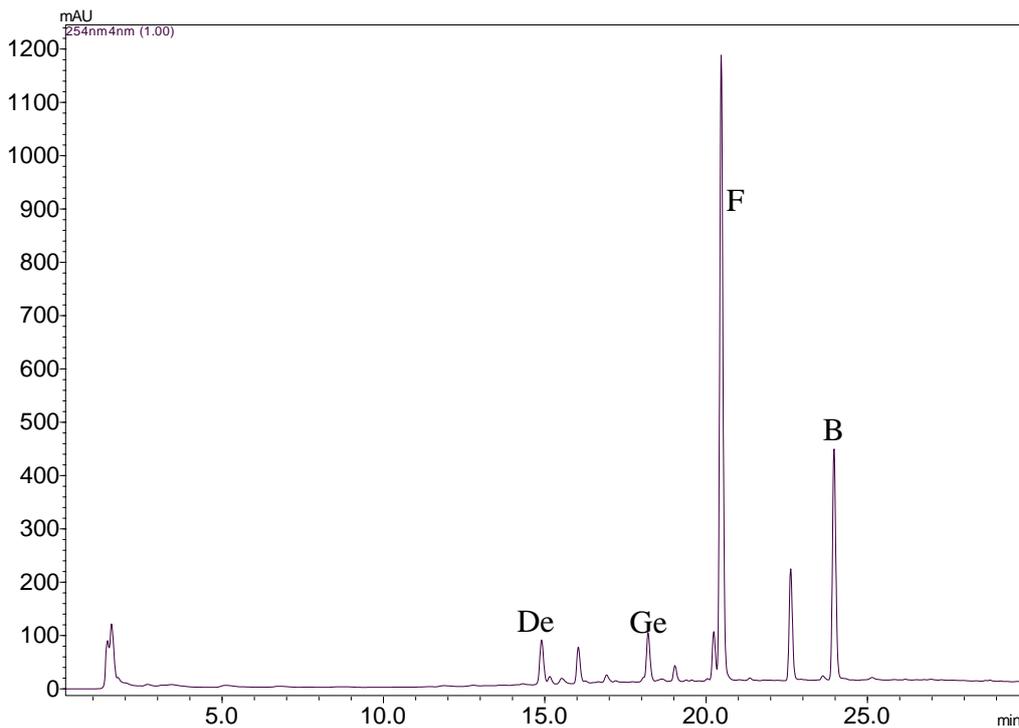
**Abbildung 8:** HPLC des Sojamehls (Bedingungen siehe Seite 9)

Gradient: 0-5 Minuten 15% B, innerhalb der nächsten 15 Minuten Steigerung auf 50% B und in 10 Minuten eine weitere Steigerung auf 83% B



**Abbildung 9:** HPLC des Rotklee-Extrakts (Bedingungen siehe Seite 9)

Gradient: 0-5 15% B, innerhalb der nächsten 15 Minuten Steigerung auf 50% B und in 10 Minuten auf 83% B

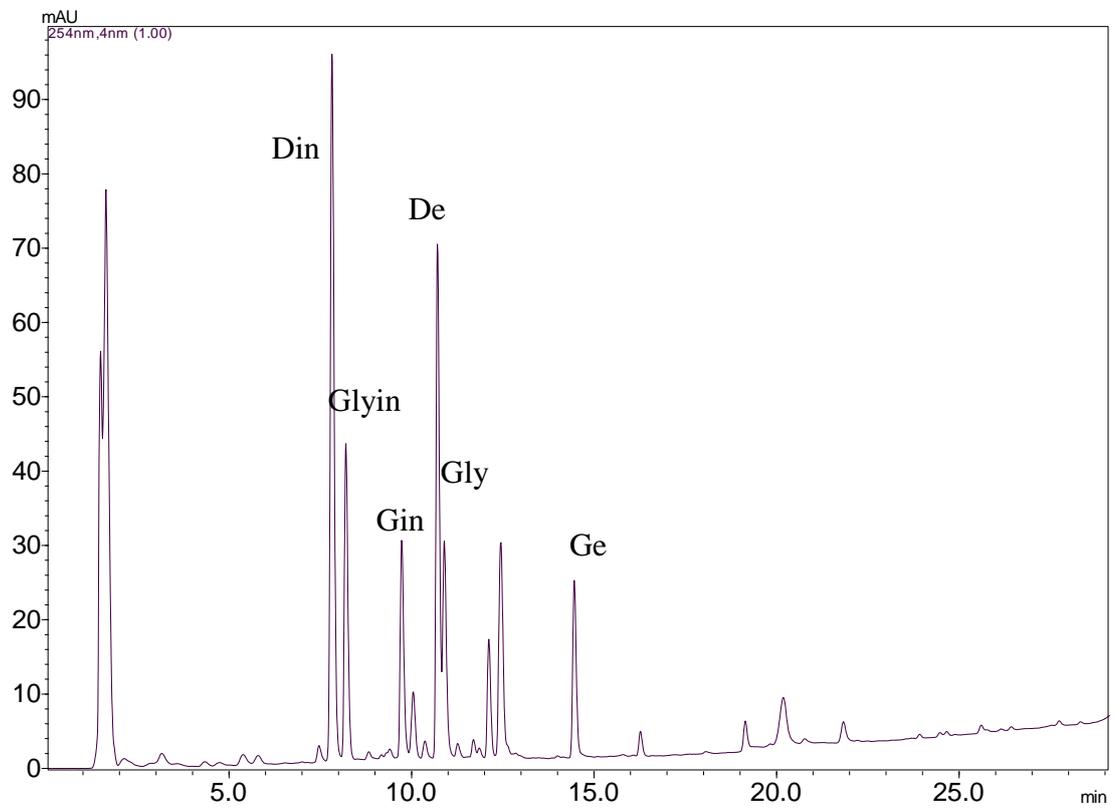


Um die Isoflavone in Soja, die zwischen 13 und 17 Minuten eluierten, besser zu trennen und die Analysendauer trotzdem zu verkürzen, wurde die Analyse mit einer Konzentration von 10% B begonnen und dann ohne isokratischen Schritt innerhalb von 25 Minuten auf 80% B gesteigert.

**Abbildung 10:** HPLC des Sojamehls (Bedingungen siehe Seite 9)

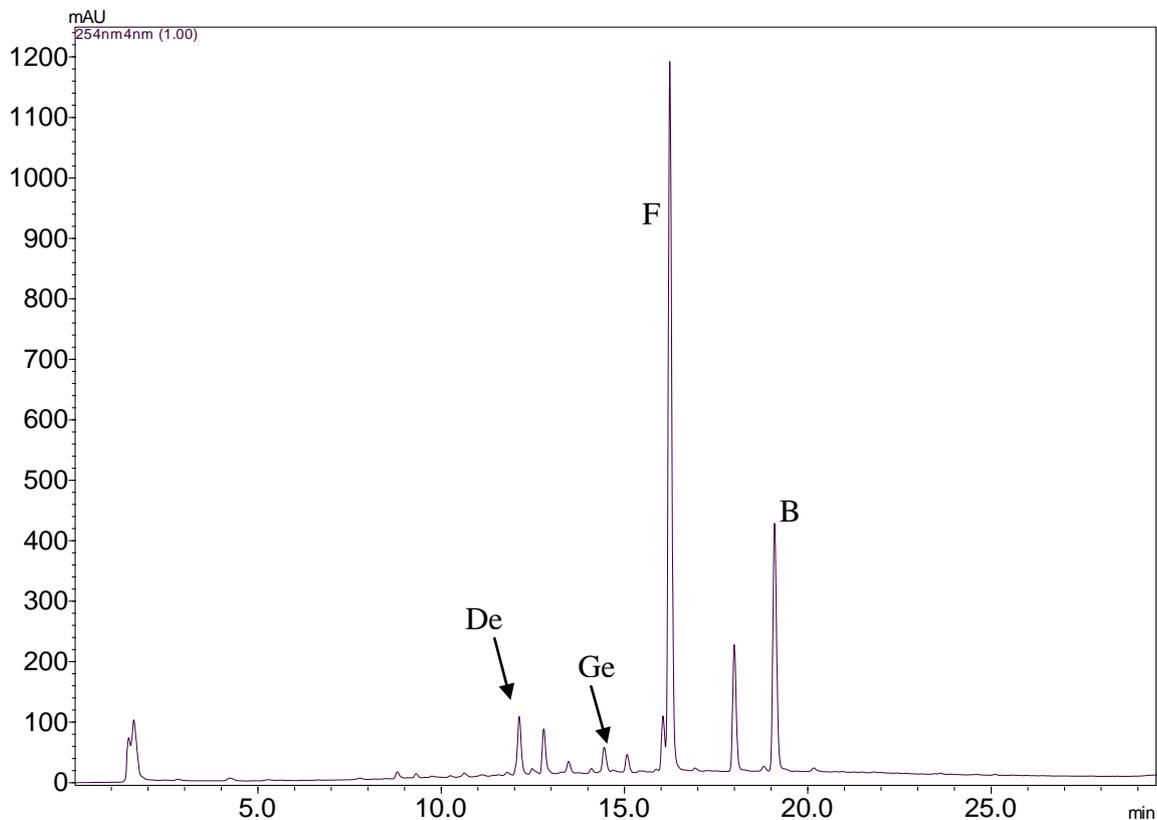
---

Gradient: Beginn mit 10% B, innerhalb von 25 Minuten Steigerung auf 80% B



**Abbildung 11:** HPLC des Rotklee-Extrakts (Bedingungen siehe Seite 9)

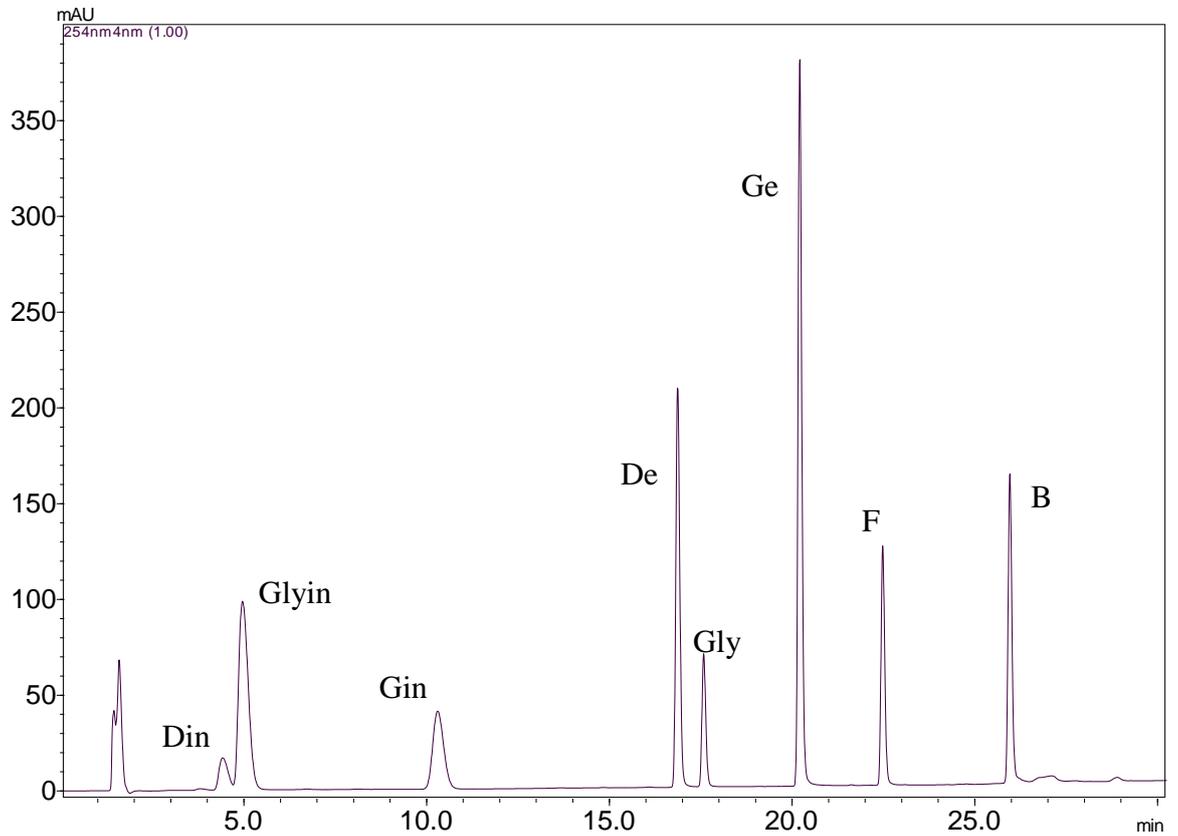
Gradient: Beginn mit 10% B, innerhalb von 25 Minuten Steigerung auf 80% B



Der verwendete Gradient brachte nicht den gewünschten Erfolg, da die Peaks im Chromatogramm zwar früher eluiert wurden, aber teilweise überlagerten. Da bei 5 minütiger isokratischer Elution mit 15% B alle Isoflavonkomponenten außer Formononetin und Biochanin A vor 20 Minuten eluierten, wurde der zweite Teil des Gradienten um 5 Minuten verkürzt. Damit sollte die gesamte Analysenzeit verkürzt werden. Der isokratische Schritt zu Beginn wurde um 2 Minuten verlängert, um die Trennung von Daidzin und Glycitin zu optimieren.

**Abbildung 12:** HPLC einer Mischung von 8 Standards (Bedingungen siehe Seite 9)

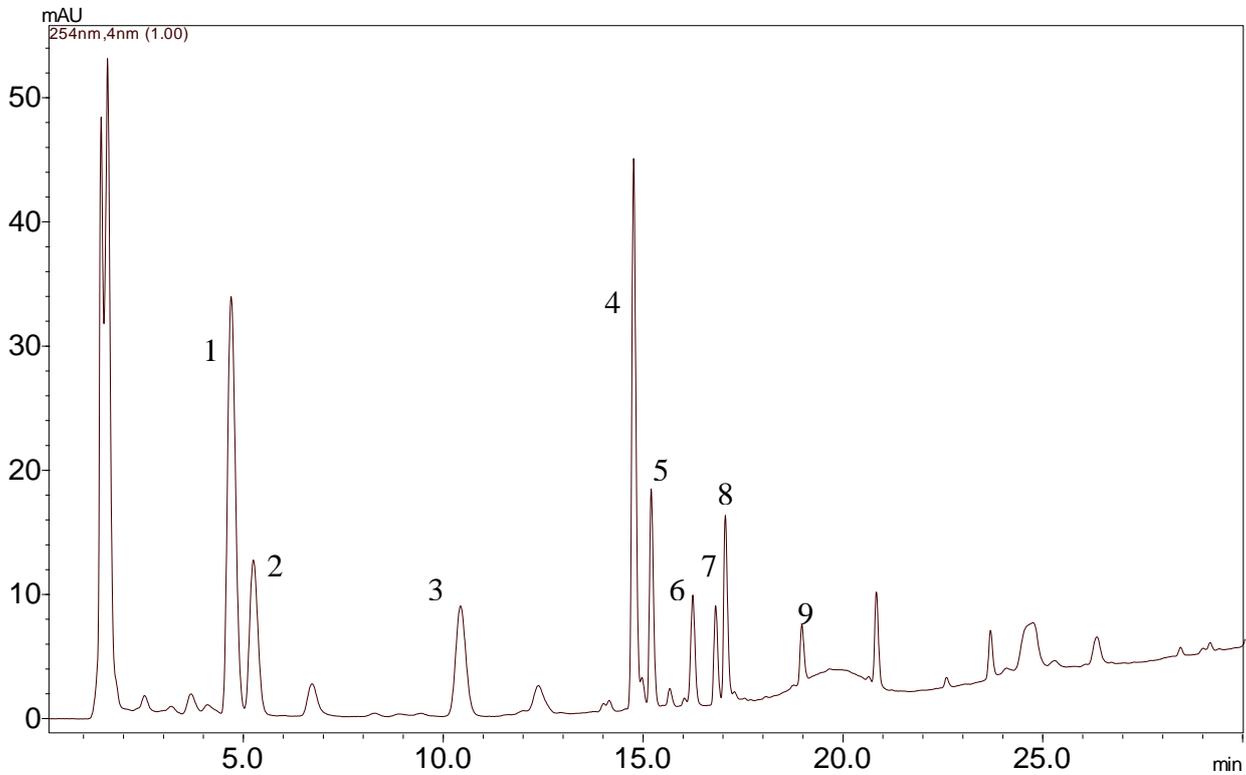
Gradient: 0-7 mit 15% B, innerhalb von 15 Minuten Steigerung auf 50% B und in 5 Minuten auf 66,5% B



Durch den verlängerten isokratischen Schritt konnte eine bessere Trennung von Daidzin und Glycitin erreicht werden. Durch einen steileren Gradientenlauf versuchte man, die Elution der anderen Isoflavone zu beschleunigen.

**Abbildung 13:** HPLC des Sojamehls (Bedingungen siehe Seite 9)

Gradient: 0-7 Minuten mit 15% B, innerhalb von 20 Minuten Steigerung auf 75% B



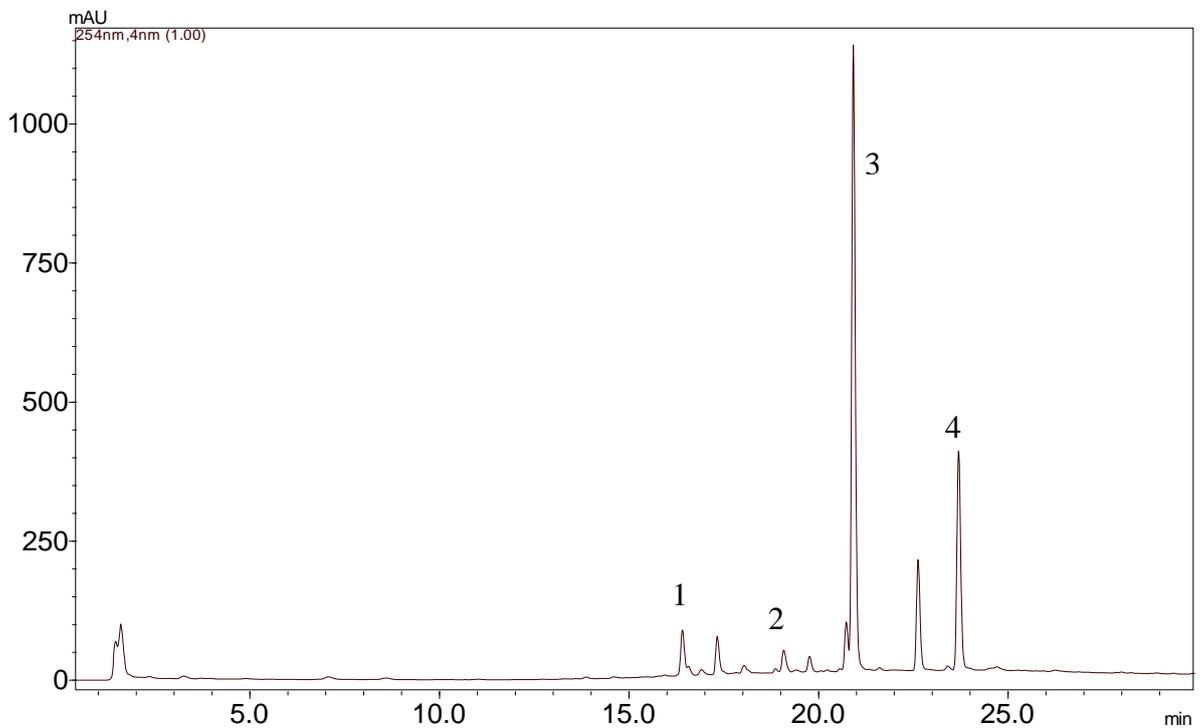
- |                |                |
|----------------|----------------|
| 1: Daidzin     | 6: Daidzein    |
| 2: Glycitin    | 7: Glycitein   |
| 3: Genistin    | 8: Ac-Genistin |
| 4: Ac-Daidzin  | 9: Genistein   |
| 5: Ac-Glycitin |                |

Auch die Isoflavone im Rotklee konnten mit dieser entwickelten Methode gut erfasst werden.

**Abbildung 14:** HPLC des Rotklee-Extrakts (Bedingungen siehe Seite 9)

---

Gradient: 0-7 Minuten mit 15% B, innerhalb von 20 Minuten Steigerung auf 75% B



1: Daidzein

2: Genistein

3: Formononetin

4: Biochanin A

Diese Methode stellte sich als optimal Methode für die Trennung der Isoflavone in Soja und Rotklee heraus. Für alle Komponenten konnte eine zufrieden stellende Auflösung erreicht werden.

Für die Quantifizierung mittels internen Standards sollte statt 4-Methoxyflavanon eine andere Substanz verwendet werden, da sich 4-Methoxyflavanon bei längerer Lagerung über mehrere Monate als instabil erwies.

Als interner Standard wurde Rutin gewählt, da dieses keine Überlagerung mit anderen Isoflavonen zeigte und die Analysenzeit nicht verlängerte.

Mit dem adaptierten System auf der kürzeren Säule konnte eine Lösungsmittelersparnis von 77,6% erzielt werden.

## 3.2 Eichung

Für die Eichung des Systems wurden 6 Eichlösungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Isoflavonkomponenten hergestellt. Die Eichung erfolgte mit dem internen Standard Rutin.

Die Standardkorrekturfaktoren wurden für Daidzin, Glycitin, Genistin, Daidzein, Glycitein, Genistein, Formononetin und Biochanin A ermittelt. Die Korrekturfaktoren für die Acetylglucoside konnten mit Hilfe des jeweiligen Molekulargewichts aus jenen der Glucoside berechnet werden. In gleicher Weise könnten die Korrekturfaktoren der Malonylglucoside berechnet werden. Da in den untersuchten Proben Malonylglucoside nicht detektiert wurden, unterblieb die Berechnung im Rahmen dieser Arbeit.

Mit den jeweiligen Standardkorrekturfaktoren konnte somit eine Gehaltsbestimmung der Isoflavone in den Soja- und Rotkleepräparaten durchgeführt werden.

Es wurden folgende Stammlösungen hergestellt:

Daidzein: 0,505mg in 1ml DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1)

Glycitein: 0,515mg in 1ml DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1)

Genistein: 0,500mg in 1ml DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1)

Biochanin A: 0,510mg in 1ml DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1)

Formononetin: 0,511mg in 1ml DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1)

Daidzin: 1,06mg in 1ml DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1)

Glycitin: 1,07mg in 1ml DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1)

Genistin: 1,01mg in 1ml DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1)

Standard Rutin: 1,03mg in 1ml DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1)

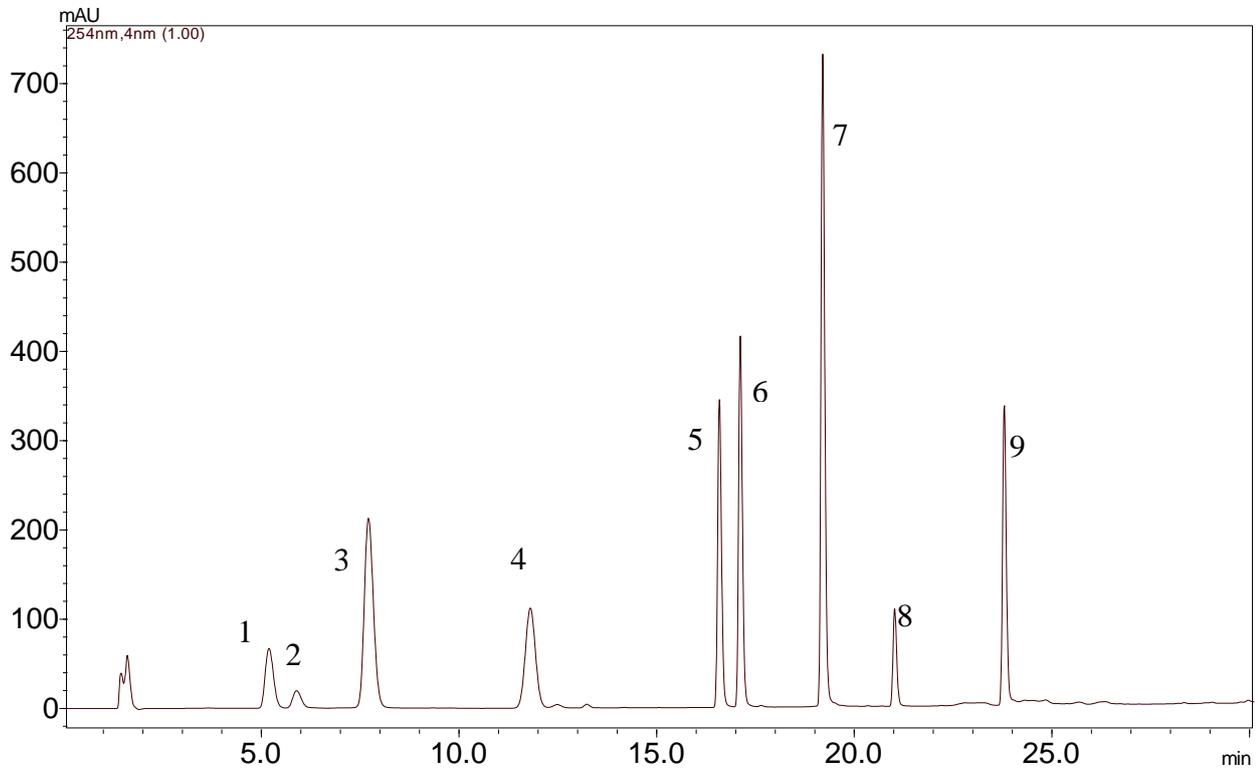
Zur Errechnung der Korrekturfaktoren wurden 6 Eichlösungen folgendermaßen gemischt (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der Eichlösungen in  $\mu\text{l}$  Stammlösung

	EL 1	EL 2	EL 3	EL 4	EL 5	EL 6
Daidzin	25	50	75	100	125	150
Glycitin	75	100	50	150	25	125
Genistin	50	75	100	125	150	25
Daidzein	100	125	150	25	50	75
Glycitein	125	150	25	75	100	50
Genistein	150	50	75	100	25	125
Formononetin	25	75	50	125	150	100
Biochanin A	75	150	125	25	100	50
Rutin	200	200	200	200	200	200
DMSO/H <sub>2</sub> O	175	25	150	75	75	100
Gesamt	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Von jeder Eichlösung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und zur Analyse mittels HPLC jeweils  $3\mu\text{l}$  verwendet.

**Abbildung 15:** HPLC der Eichlösung 1 (Bedingungen siehe Seite 9)



- |             |                 |
|-------------|-----------------|
| 1: Daidzin  | 6: Glycitein    |
| 2: Glycitin | 7: Genistein    |
| 3: Rutin    | 8: Formononetin |
| 4: Genistin | 9: Biochanin A  |
| 5: Daidzein |                 |

Die Peakflächen der einzelnen Isoflavone wurden bestimmt und die Korrekturfaktoren anhand folgender Formel berechnet:

$$KF = \frac{EW_{Is} * Peakfläche_{St}}{EW_{St} * Peakfläche_{Is}}$$

Abkürzungen:

KF..... .Korrekturfaktor

EW<sub>Is</sub>.....Einwaage des Isoflavons in mg

EW<sub>St</sub>.....Einwaage des Standards in mg

**Tabelle 3:** Korrekturfaktoren der Isoflavone

	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	Formononetin	BioA
EL1	0,456	0,500	0,411	0,351	0,377	0,251	0,291	0,281
EL1a	0,454	0,497	0,400	0,353	0,380	0,253	0,291	0,279
EL2	0,473	0,491	0,413	0,354	0,382	0,259	0,295	0,282
EL2a	0,478	0,504	0,412	0,357	0,386	0,259	0,296	0,284
EL3	0,477	0,508	0,410	0,362	0,378	0,258	0,293	0,278
EL3a	0,475	0,514	0,407	0,361	0,377	0,255	0,291	0,276
EL4	0,463	0,499	0,384	0,350	-	0,250	0,295	0,255
EL4a	0,463	0,499	0,383	0,356	-	0,250	0,293	0,260
EL5	0,469	0,490	0,393	0,359	0,380	0,259	0,291	0,274
EL5a	0,468	0,496	0,391	0,354	0,376	0,255	0,289	0,271
EL6	0,475	-	0,368*	0,366	0,383	0,253	0,291	0,279
EL6a	0,478	0,506	0,372*	0,368	0,386	0,255	0,293	0,281
<b>MW</b>	<b>0,469</b>	<b>0,500</b>	<b>0,400</b>	<b>0,358</b>	<b>0,380</b>	<b>0,255</b>	<b>0,292</b>	<b>0,275</b>
<b>Stabw</b>	<b>0,008</b>	<b>0,007</b>	<b>0,012</b>	<b>0,006</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>	<b>0,009</b>
<b>VK</b>	<b>1,796</b>	<b>1,445</b>	<b>2,944</b>	<b>1,619</b>	<b>0,985</b>	<b>1,386</b>	<b>0,713</b>	<b>3,267</b>

\* die Werte wurden nicht in die Berechnung einbezogen. Die relativ hohe Abweichung ist dadurch erklärbar, dass diese Eichlösung die niedrigste Konzentration von Genistin enthielt, die an der Grenze des linearen Bereichs lag.

- keine auswertbaren Werte

Aufgrund der ermittelten Korrekturfaktoren der 7-O-Glucoside konnten die Korrekturfaktoren für die Acetylglucoside berechnet werden (Tabelle 4)

$$KF = \frac{(MG \text{ Ac-Glucosid} * KF \text{ 7-O-}\beta\text{-Glucoside})}{MG \text{ 7-O-}\beta\text{-Glucoside}}$$

Molekulargewicht:

Daidzin	416 g/mol
Glycitin	446 g/mol
Genistin	432 g/mol
Acetyl-Daidzin	458 g/mol
Acetyl-Glycitin	488 g/mol
Acetyl-Genistin	474 g/mol

**Tabelle 4:** Korrekturfaktoren der Acetylglucoside

---

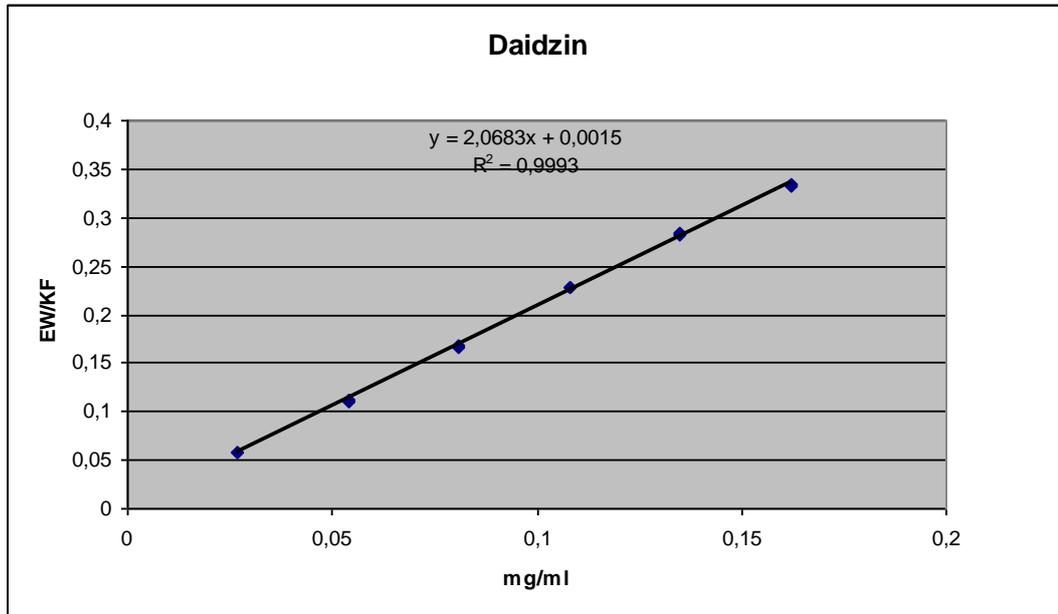
Acetyldaidzin	0,516
Acetylglycitin	0,557
Acetylgenistin	0,433

Zur Erstellung der Eichgeraden wurde auf der x-Achse die Einwaage des Isoflavons in mg/ml aufgetragen und die y-Werte ergaben sich aus folgender Formel:

$$y = \frac{EWSt * Peakfl\ddot{a}cheIs}{Peakfl\ddot{a}cheSt}$$

Die Eichgeraden für die acht Isoflavone sind in den Abbildungen 16-23, Seite 23-26 dargestellt.

**Abbildung 16:** Eichgerade Daidzin



**Abbildung 17:** Eichgerade Glycitin

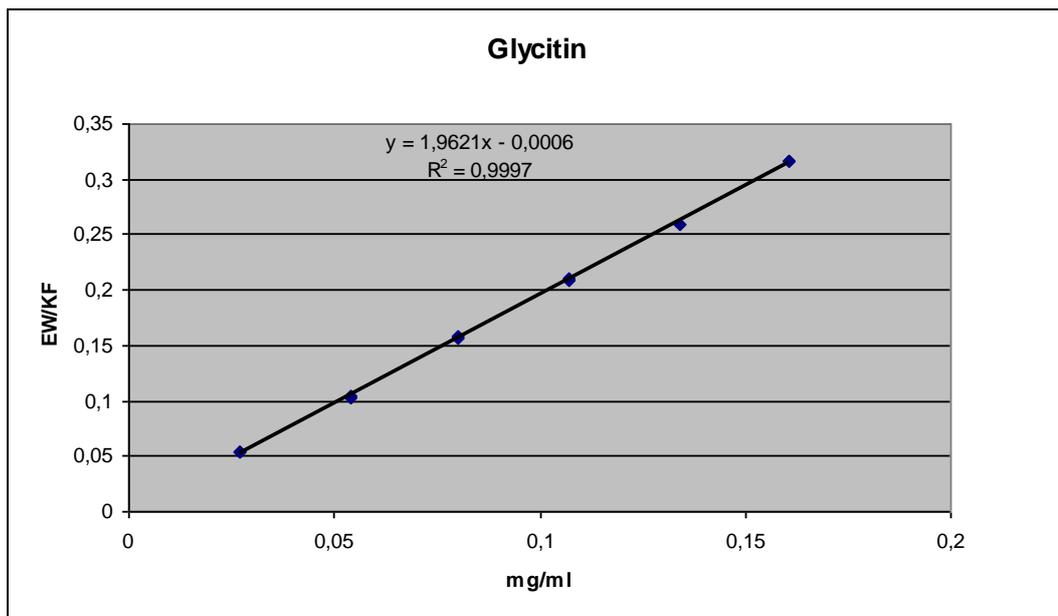


Abbildung 18: Eichgerade Genistin

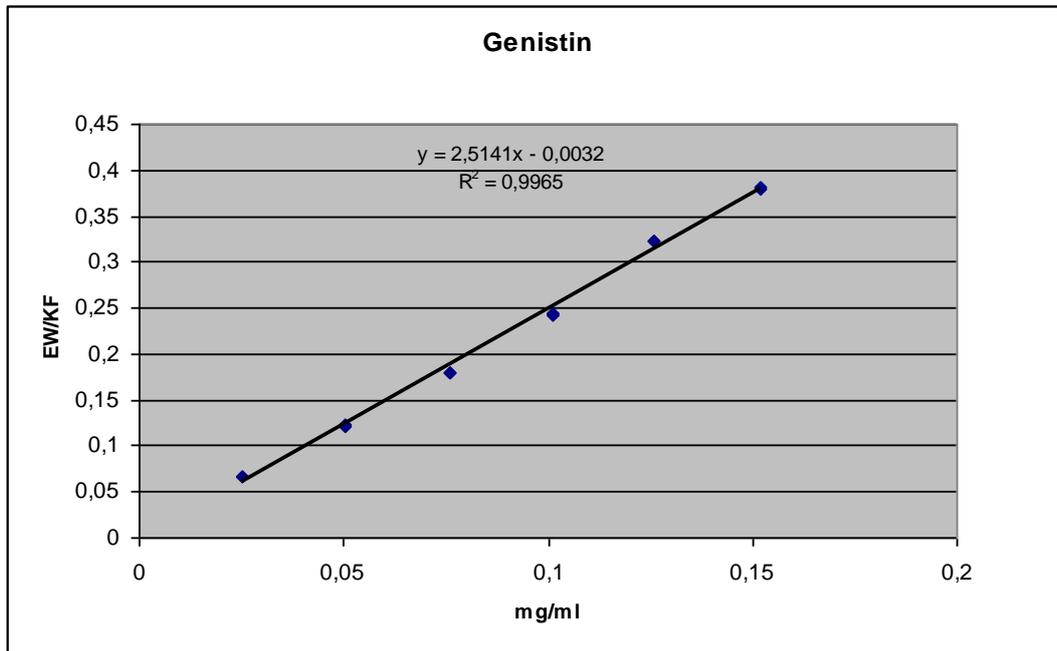
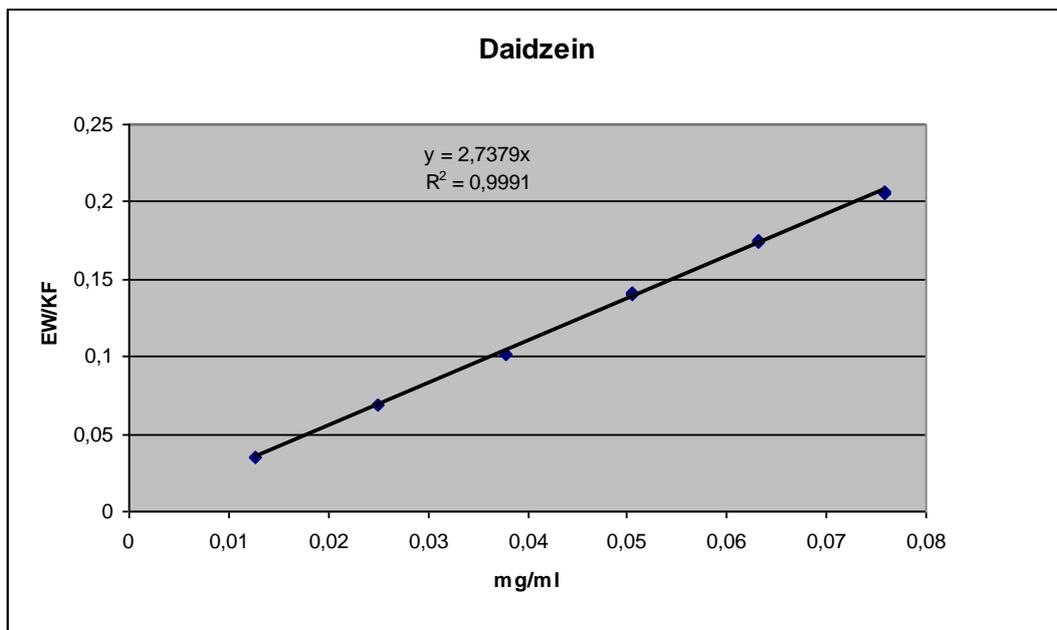
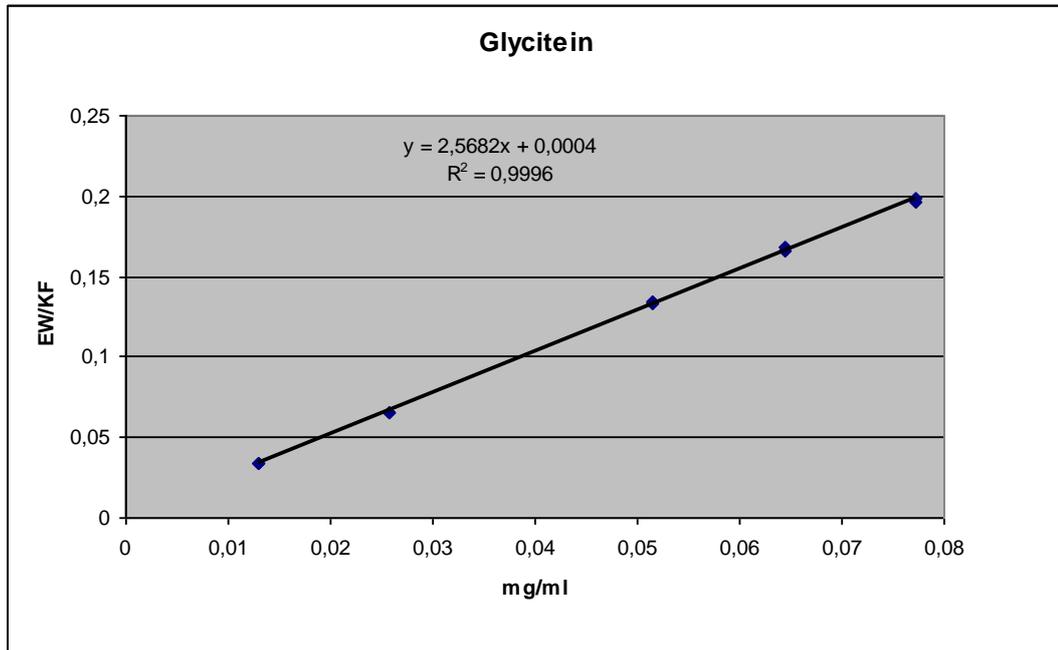


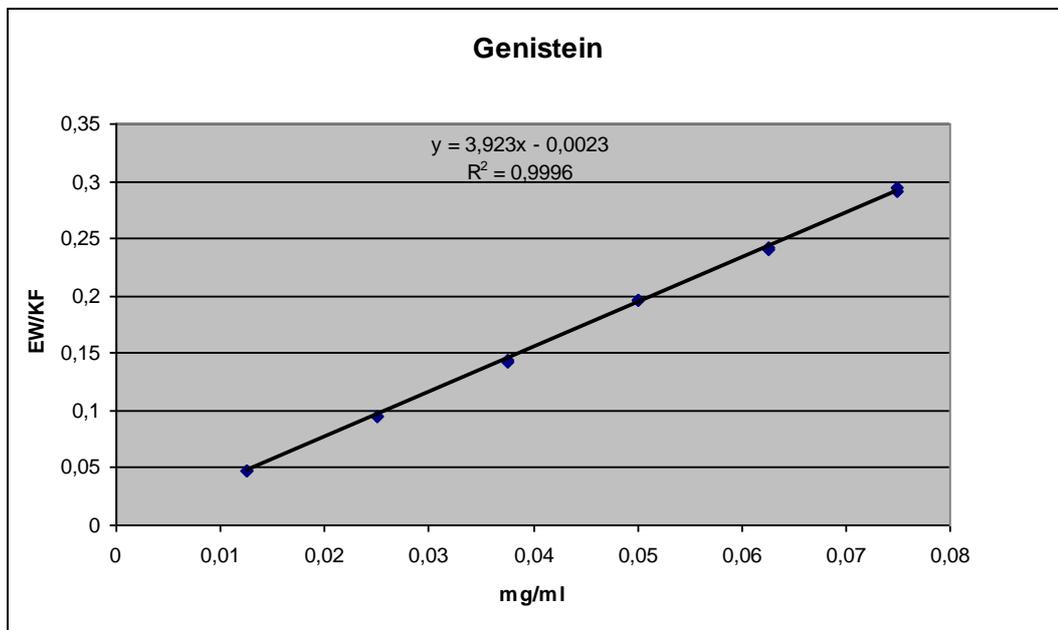
Abbildung 19: Eichgerade Daidzein



**Abbildung 20:** Eichgerade Glycitein

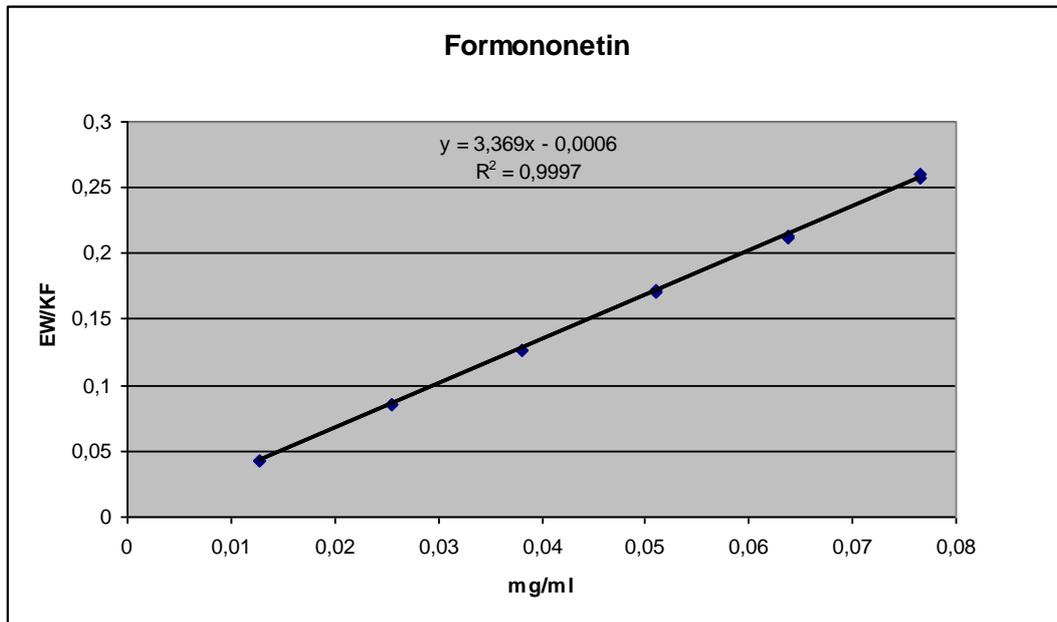


**Abbildung 21:** Eichgerade Genistein



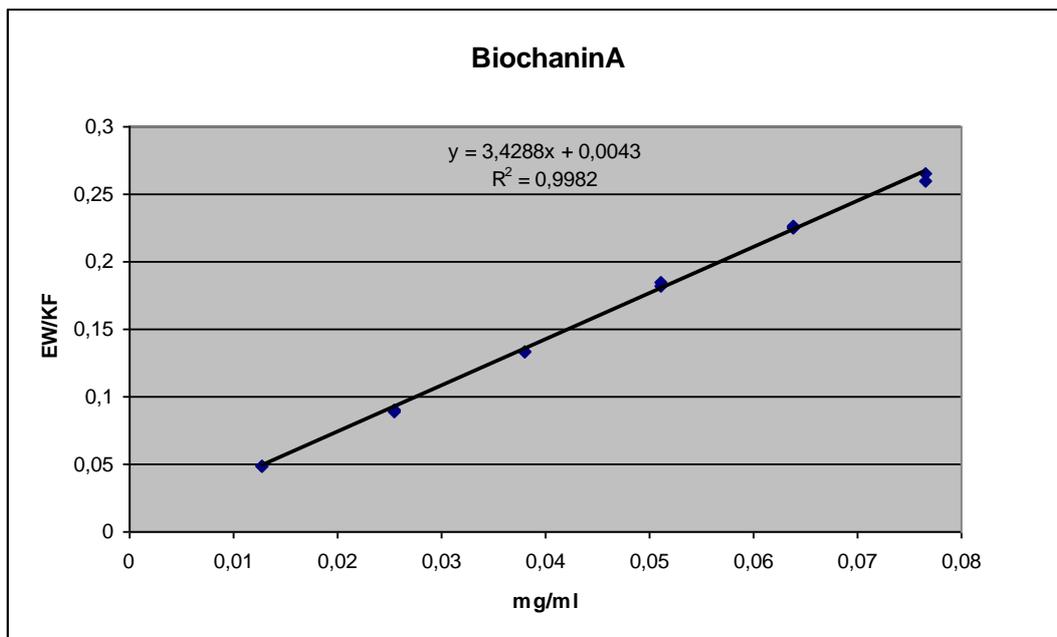
**Abbildung 22:** Eichgerade Formononetin

---



**Abbildung 23:** Eichgerade Biochanin A

---



Die erstellten Eichgeraden verliefen alle linear und annähernd durch den Nullpunkt. Deswegen konnten sie zur Quantifizierung der Isoflavone herangezogen werden.

### 3.3 Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden jeweils 4 Extraktionen der zur Verfügung stehenden Handelspräparate Sanvita Sarapis Soja Kapseln, 25mg Gesamtisoflavone/Kapsel, und Dr. Böhm Isoflavon forte Dragees, 90mg Gesamtisoflavone, durchgeführt und die Isoflavongehalte anschließend mit der entwickelten HPLC-Methode analysiert.

Dr. Böhm Isoflavon forte 90mg Dragees wurden vorsichtig von der Zuckerhülle befreit. Das Dragee wurde homogen verrieben. Vom Nahrungsergänzungsmittel Sanvita Sarapis Soja Kapseln konnte der Kapselinhalt entnommen werden. Für jede Analyse wurde eine neue Kapsel bzw. Dragee eingesetzt.

Es wurden jeweils 30mg des Probenmaterials in einen 3ml Messkolben eingewogen. Nach kräftigem Schütteln wurde 20 Minuten am Ultraschallbad extrahiert und danach 10 Minuten abzentrifugiert. Es wurde verdünnt und mittels HPLC wurden 3µl analysiert (Bedingungen siehe Seite 9).

Zur Berechnung der „intra-day“ Reproduzierbarkeit wurden die Proben 1a-4a (Sanvita Sarapis Soja Kapseln) sowie 1b-4b (Dr. Böhm Isoflavon forte Dragees) jeweils am selben Tag analysiert („intra-day“). Es wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet (siehe Tabelle 5 und 6, Seite 28 und 29).

Zur Berechnung wurde folgende Formel herangezogen:

$$\% \text{ Isoflavon} = \frac{\text{EW}_{\text{St}} * \text{Peakfläche}_{\text{Is}} * 100 * \text{KF}}{\text{EW}_{\text{Ex}} * \text{Peakfläche}_{\text{St}}}$$

**Tabelle 5:** Einzel- und Gesamtisoflavongehalt von Sanvita Sarapis Soja Kapseln bei Mehrfachbestimmung an einem Tag ("intra-day")

<b>Substanz</b>	<b>1a</b>	<b>2a</b>	<b>3a</b>	<b>4a</b>	<b>MW</b>	<b>Stabw</b>	<b>VK</b>
Din	0,504	0,526	0,524	0,488	<b>0,511</b>	<b>0,018</b>	<b>3,524</b>
Glyin	0,225	0,229	0,235	0,214	<b>0,226</b>	<b>0,009</b>	<b>3,918</b>
Gin	0,162	0,162	0,159	0,150	<b>0,158</b>	<b>0,006</b>	<b>3,589</b>
Ac-Din	0,049	0,047	0,045	0,044	<b>0,046</b>	<b>0,002</b>	<b>4,794</b>
Ac-Glyin	0,020	0,020	0,020	0,019	<b>0,020</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>2,532</b>
De	3,070	3,151	3,031	2,948	<b>3,050</b>	<b>0,084</b>	<b>2,767</b>
Gly	0,021	0,024	0,023	0,021	<b>0,022</b>	<b>0,002</b>	<b>6,742</b>
Ac-Gin	0,020	0,021	0,021	0,021	<b>0,021</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>2,410</b>
Ge	0,511	0,534	0,500	0,492	<b>0,509</b>	<b>0,018</b>	<b>3,583</b>
Form	1,620	1,646	1,547	1,473	<b>1,572</b>	<b>0,078</b>	<b>4,957</b>
Bio A	0,076	0,076	0,072	0,068	<b>0,073</b>	<b>0,004</b>	<b>5,246</b>
Gesamt- isoflavone	6,278	6,472	6,177	5,918	<b>6,211</b>	<b>0,231</b>	<b>3,714</b>

**Tabelle 6:** Einzel- und Gesamtisoflavongehalt Dr. Böhm Isoflavon forte Dragees bei Mehrfachbestimmung an einem Tag („intra-day“)

<b>Substanz</b>	<b>1b</b>	<b>2b</b>	<b>3b</b>	<b>4b</b>	<b>MW</b>	<b>Stabw</b>	<b>VK</b>
Din	2,193	2,263	2,351	2,338	<b>2,286</b>	<b>0,073</b>	<b>3,205</b>
Glyin	0,730	0,758	0,752	0,746	<b>0,747</b>	<b>0,012</b>	<b>1,613</b>
Gin	0,682	0,701	0,741	0,735	<b>0,715</b>	<b>0,028</b>	<b>3,925</b>
Ac-Din	0,236	0,243	0,262	0,260	<b>0,250</b>	<b>0,013</b>	<b>5,100</b>
Ac-Glyin	0,090	0,091	0,098	0,097	<b>0,094</b>	<b>0,004</b>	<b>4,343</b>
De	4,061	4,190	4,412	4,371	<b>4,259</b>	<b>0,163</b>	<b>3,833</b>
Gly	0,204	0,213	0,221	0,224	<b>0,216</b>	<b>0,009</b>	<b>4,159</b>
Ac-Gin	0,183	0,193	0,201	0,199	<b>0,194</b>	<b>0,008</b>	<b>4,166</b>
Ge	0,903	0,924	0,975	0,968	<b>0,943</b>	<b>0,035</b>	<b>3,680</b>
Form	5,453	5,586	5,872	5,851	<b>5,691</b>	<b>0,205</b>	<b>3,602</b>
Bio A	0,895	0,934	0,980	0,970	<b>0,945</b>	<b>0,039</b>	<b>4,086</b>
Gesamt- isoflavone	15,560	16,096	16,865	16,760	<b>16,320</b>	<b>0,611</b>	<b>3,741</b>

Die Proben 1c-4c (Sanvita Sarapis Soja Kapseln) und 1d-4d (Dr. Böhm Isoflavon forte Dragees) wurden an aufeinanderfolgenden Tagen analysiert und daraus resultierte die „inter-day“ Reproduzierbarkeit (siehe Tabelle 7 und 8, Seite 30 und 31)

**Tabelle 7:** Einzel- und Gesamtisoflavongehalt Sanvita Sarapis Soja Kapseln bei Mehrfachbestimmung an verschiedenen Tagen („inter-day“)

<b>Substanz</b>	<b>1c</b>	<b>2c</b>	<b>3c</b>	<b>4c</b>	<b>MW</b>	<b>Stabw</b>	<b>VK</b>
Din	0,526	0,524	0,498	0,516	<b>0,516</b>	<b>0,013</b>	<b>2,472</b>
Glyin	0,229	0,235	0,223	0,231	<b>0,230</b>	<b>0,005</b>	<b>2,179</b>
Gin	0,162	0,159	0,172	0,166	<b>0,165</b>	<b>0,006</b>	<b>3,411</b>
Ac-Din	0,047	0,045	0,045	0,044	<b>0,045</b>	<b>0,001</b>	<b>2,781</b>
Ac-Glyin	0,020	0,020	0,019	0,017	<b>0,019</b>	<b>0,001</b>	<b>7,443</b>
De	3,151	3,031	3,006	3,172	<b>3,090</b>	<b>0,084</b>	<b>2,706</b>
Gly	0,024	0,023	0,023	0,022	<b>0,023</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>3,550</b>
Ac-Gin	0,021	0,021	0,020	0,021	<b>0,021</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>2,410</b>
Ge	0,534	0,500	0,493	0,525	<b>0,513</b>	<b>0,020</b>	<b>3,823</b>
Form	1,646	1,547	1,492	1,598	<b>1,571</b>	<b>0,066</b>	<b>4,218</b>
Bio A	0,076	0,072	0,069	0,078	<b>0,074</b>	<b>0,004</b>	<b>5,466</b>
Gesamt- isoflavone	6,472	6,177	6,062	6,397	<b>6,277</b>	<b>0,190</b>	<b>3,032</b>

**Tabelle 8:** Einzel- und Gesamtisoflavongehalt Dr. Böhm Isoflavon forte Dragees bei Mehrfachbestimmung an verschiedenen Tagen („inter-day“)

<b>Substanz</b>	<b>1d</b>	<b>2d</b>	<b>3d</b>	<b>4d</b>	<b>MW</b>	<b>Stabw</b>	<b>VK</b>
Din	2,193	2,263	2,244	2,217	<b>2,229</b>	<b>0,031</b>	<b>1,376</b>
Glyin	0,730	0,758	0,770	0,748	<b>0,752</b>	<b>0,017</b>	<b>2,252</b>
Gin	0,682	0,701	0,756	0,751	<b>0,723</b>	<b>0,037</b>	<b>5,077</b>
Ac-Din	0,236	0,243	0,230	0,234	<b>0,236</b>	<b>0,005</b>	<b>2,307</b>
Ac-Glyin	0,090	0,091	0,091	0,093	<b>0,091</b>	<b>0,001</b>	<b>1,379</b>
De	4,061	4,190	4,158	4,121	<b>4,133</b>	<b>0,055</b>	<b>1,340</b>
Gly	0,204	0,213	0,205	0,196	<b>0,205</b>	<b>0,007</b>	<b>3,400</b>
Ac-Gin	0,183	0,193	0,171	0,160	<b>0,177</b>	<b>0,014</b>	<b>8,112</b>
Ge	0,903	0,924	0,933	0,910	<b>0,918</b>	<b>0,014</b>	<b>1,474</b>
Form	5,453	5,586	5,528	5,440	<b>5,502</b>	<b>0,068</b>	<b>1,241</b>
Bio A	0,895	0,934	0,922	0,907	<b>0,915</b>	<b>0,017</b>	<b>1,865</b>
Gesamt- isoflavone	15,560	16,096	16,000	15,800	<b>15,864</b>	<b>0,237</b>	<b>1,495</b>

Insgesamt war die Reproduzierbarkeit für biologisches Material äußerst zufriedenstellend. Das konnte anhand der ermittelten Variationskoeffizienten gezeigt werden.

### 3.4 Quantitative Analyse verschiedener Proben

Mit der validierten Methode konnte die Quantifizierung der Isoflavone in verschiedenen Proben durchgeführt werden. Zur Analyse wurden ein speziell aufbereitetes Soyamehl, ein Isoflavon-reiches Soyaextrakt >40% Isoflavone und ein Rotklee-Extrakt sowie verschiedene Präparate, die als Nahrungsergänzungsmittel in Apotheken in Österreich erhältlich sind, verwendet (siehe Kapitel „Material und Methoden“ Seite 7) und auf ihren Isoflavongehalt untersucht.

Alle Präparate sowie das Soyamehl und die Extrakte wurden nach der gleichen Extraktionsvorschrift behandelt, jeweils eine Doppelbestimmung wurde durchgeführt. Bei Dragees wurde die Zuckerhülle entfernt und danach wurden Dragees, Tabletten bzw. Kapseln homogenisiert.

Zur Probenvorbereitung nahm man 30mg Probe in 3ml DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1) auf. Es wurde 20 Minuten am Ultraschallbad extrahiert. Anschließend zentrifugierte man die Probe ab und verdünnte 100µl Probe mit 400µl DMSO/H<sub>2</sub>O (3+1). Zu 250µl Probe wurden 50µl interner Standard Rutin (1mg/ml) zugegeben. Zur HPLC-Analyse gelangten 3µl der Analysenlösung.

### 3.4.1 Analyse von Soyamehl

Als Probe diente ein speziell aufbereitetes Sojamehl der Fa. Soya Austria (Wien). Es handelte sich hier um ein reines Sojapräparat, in welchem die Isoflavone Daidzin, Glycitin, Genistin, Ac-Daidzin, Ac-Glycitin, Daidzein, Glycitein, Ac-Genistin und Genistein quantifiziert wurden. Zum Soyamehl lag ein Analysenzertifikat, in dem der Einzel- und Gesamtisoflavongehalt genau deklariert war, vor (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Analysenzertifikat des verwendeten Soyamehls (Isoflavonmenge in ppm)

---

Daidzin	5170
6-O-Mal-Daidzin	996
6-O-Ac-Daidzin	4240
Daidzein	279
<b>Gesamt</b>	<b>10700</b>
Glycitin	2630
6-O-Mal-Glycitin	406
6-O-Ac-Glycitin	1760
Glycitein	156
<b>Gesamt</b>	<b>4950</b>
Genistin	1190
6-O-Mal-Genistin	224
6-O-Ac-Genistin	1070
Genistein	92
<b>Gesamt</b>	<b>2570</b>
<b>Total Isoflavone</b>	<b>18200</b>

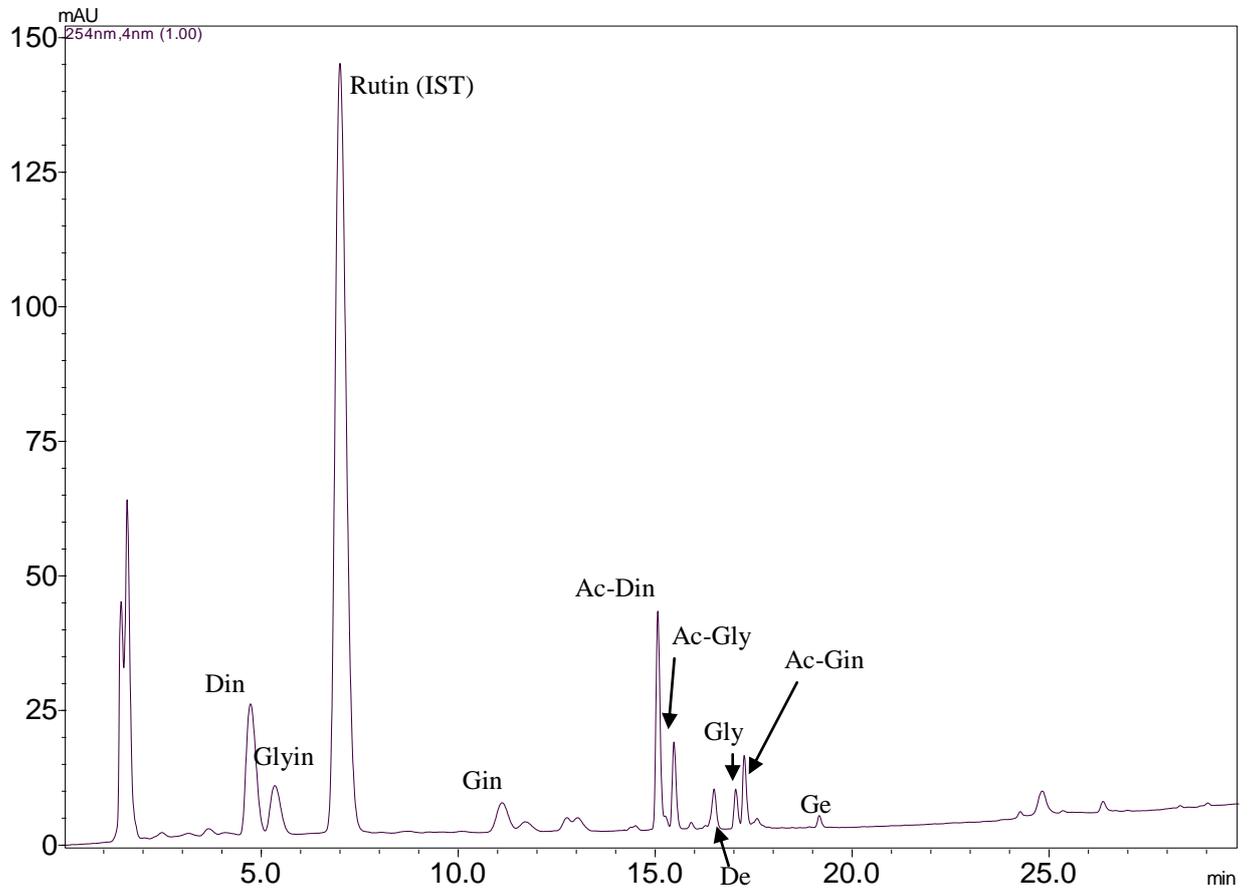
In der folgenden Tabelle sind sowohl der ermittelte Gehalt der einzelnen Isoflavonkomponenten als auch der Gesamtgehalt im Extrakt in % angegeben, die mit Hilfe der neu entwickelten Methode erfasst wurden.

**Tabelle 10:** Einzel- und Gesamtisoflavongehat des Soyamehls „Soyaflavone“

<b>Isoflavon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Mittelwert</b>
Daidzin	0,616	0,627	0,622
Glycitin	0,264	0,271	0,268
Genistin	0,145	0,143	0,144
Ac-Daidzin	0,482	0,491	0,487
Ac-Glycitin	0,210	0,207	0,209
Daidzein	0,069	0,071	0,070
Glycitein	0,060	0,061	0,061
Ac-Genistin	0,135	0,133	0,134
Genistein	0,012	0,012	0,012
<b>Gesamtgehalt %</b>	<b>1,993</b>	<b>2,016</b>	<b>2,007</b>

Daidzin, Glycitin und Acetyldaidzin stellten die Hauptkomponenten dar. Im Vergleich mit dem Analysenzertifikat, in dem auch Daidzin, Glycitin und Acetyldaidzin in den höchsten Konzentrationen vorlagen, konnte eine Übereinstimmung festgestellt werden. Mit der neu entwickelten Methode konnte ein etwas höherer Gesamtgehalt von 2,007% ermittelt werden. Die etwas höheren Konzentrationen von Daidzin, Genistin und Daidzein sowie Glycitein dürften auf die längere Lagerung des Soyamehls zurückzuführen sein. Dadurch kam es offensichtlich zu einer Spaltung der relativ labilen Malonyl-glucoside, die in unseren Analysen nicht nachgewiesen werden konnten, zu den Glucosiden bzw. Geninen.

**Abbildung 24:** HPLC- Chromatogramm des Soyamehls, „Soyaflavone“, Fa. Soya Austria Wien (Bedingungen siehe Seite 9)



### 3.4.2 Analyse von Soyaextrakt > 40% Isoflavone

Neben dem angereicherten Sojamehl wurde auch ein Sojaextrakt mit einem deklarierten Isoflavongehalt von mehr als 40% untersucht.

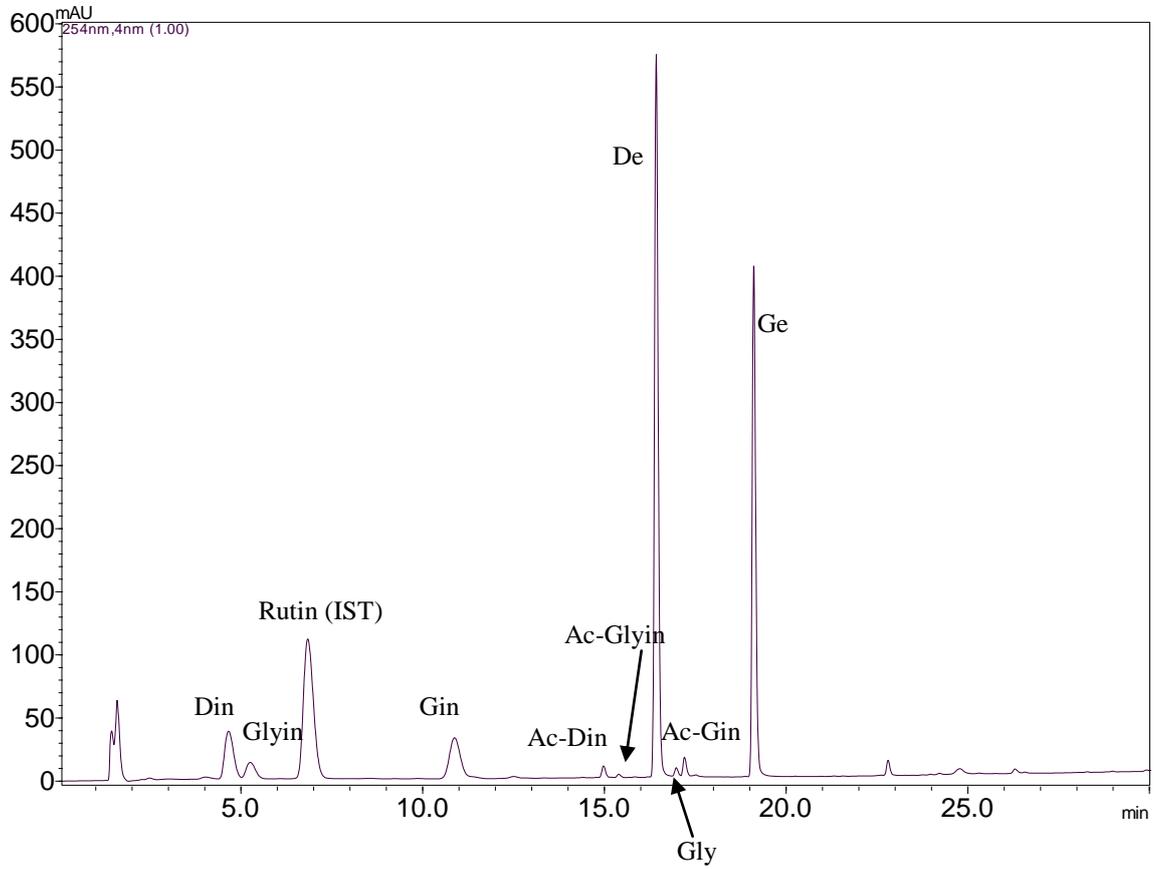
Mit der entwickelten Methode konnte sowohl der Gehalt der einzelnen Isoflavonkomponenten als auch der Gesamtgehalt im Extrakt in % ermittelt werden (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Einzel- und Gesamti Isoflavongehalte des Soyaextrakts >40% Isoflavone

<b>Isoflavon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Mittelwert</b>
Daidzin	4,395	4,210	4,303
Glycitin	1,744	1,677	1,711
Genistin	3,995	3,811	3,903
Ac-Daidzin	0,511	0,491	0,501
Ac-Glycitin	0,152	0,143	0,148
Daidzein	21,215	20,052	20,634
Glycitein	0,287	0,273	0,280
Ac-Genistin	0,688	0,655	0,672
Genistein	10,275	7,956	9,116
<b>Gesamtgehalt%</b>	<b>43,262</b>	<b>39,269</b>	<b>41,268</b>

Laut Deklaration enthält der Soyaextrakt („Extrakt Soyisoflavone >40%“, Ch.Nr. 030901) mehr als 40% Isoflavonkomponenten. Mit dem ermittelten Wert von 41,268% konnte eine sehr gute Übereinstimmung mit der Deklaration festgestellt werden. Auffallend in diesem Extrakt war der hohe Anteil an Daidzein und Genistein.

**Abbildung 25:** HPLC-Chromatogramm des Soyaextrakts >40% Isoflavone  
(Bedingungen siehe Seite 9)



### 3.4.3 Analyse von Rotklee-Extrakt WBC3601

An einem Rotklee-Extrakt sollte die Eignung der Methode für die Quantifizierung von Isoflavonen in Rotklee und daraus hergestellten Präparaten überprüft werden. Für das Extrakt war ein Gesamtisoflavongehalt von 7,625% deklariert. In Tabelle 12 sind die deklarierten Gehalte der einzelnen Isoflavonkomponenten angeführt.

**Tabelle 12:** Deklarierter Isoflavongehalt des Rotklee-Extraktes (n=16)

---

<b>Isoflavon</b>	<b>%</b>
Daidzein	0,398
Genistein	0,148
Formononetin	5,321
Biochanin A	1,756
<b>Gesamtgehalt %</b>	<b>7,625</b>

Mit der entwickelten HPLC-Methode (Bedingungen siehe Seite 9) wurden sowohl der Gehalt der einzelnen Isoflavonkomponenten als auch der Gesamtgehalt im Extrakt in % ermittelt.

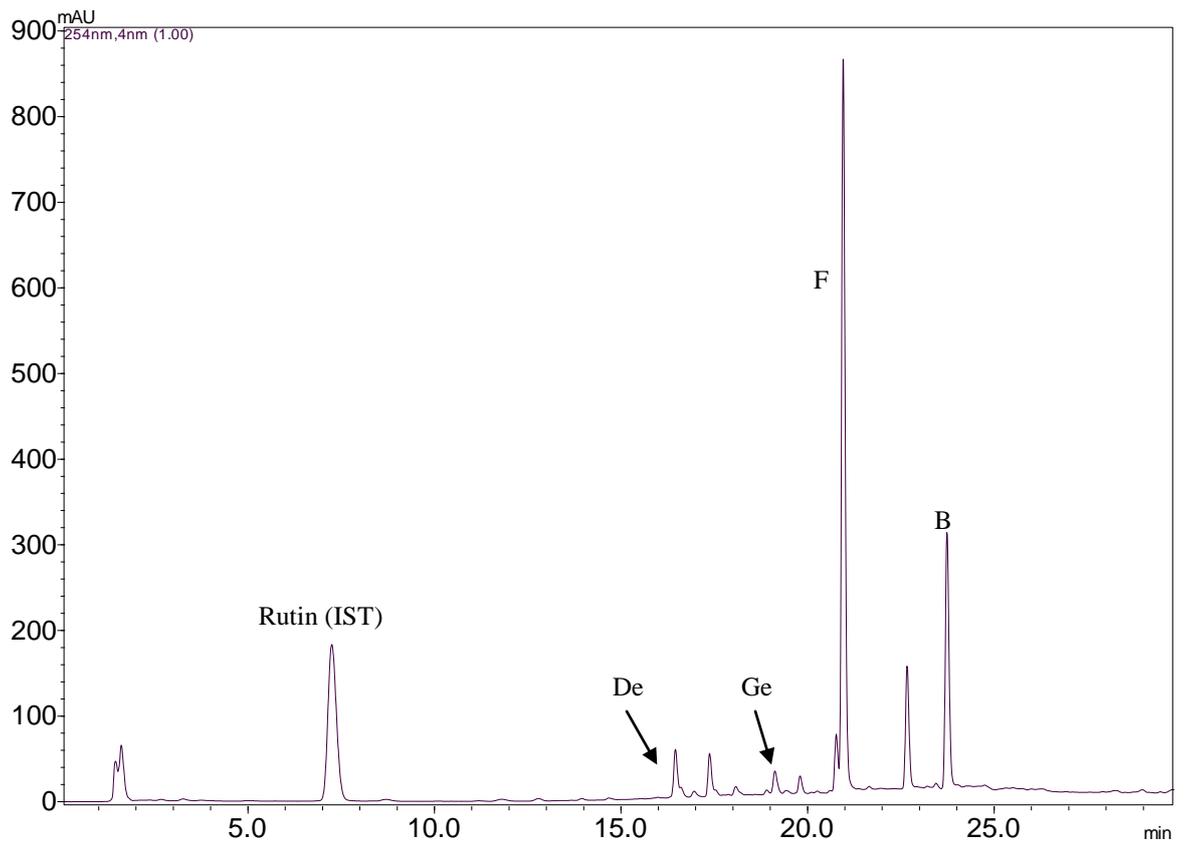
**Tabelle 13:** Einzel- und Gesamtisoflavongehalte des Rotklee-Extrakts WBC3601

---

<b>Isoflavon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Mittelwert</b>
Daidzein	0,436	0,410	0,423
Genistein	0,164	0,158	0,161
Formononetin	5,072	4,830	4,951
Biochanin A	1,762	1,649	1,706
<b>Gesamtgehalt %</b>	<b>7,435</b>	<b>7,046</b>	<b>7,241</b>

Aus der Tabelle 13 ist ersichtlich, dass Formononetin und Biochanin A die Hauptkomponenten des Extraktes waren. Sowohl die Einzel- und Gesamtisoflavongehalte stimmten gut mit der Deklaration überein und damit konnte die Eignung der Methode für die Quantifizierung von Rotkleeisoflavonen bestätigt werden.

**Abbildung 26:** HPLC-Chromatogramm des Rotklee-Extrakts WBC3601 (Bedingungen siehe Seite 9)



### 3.4.4 Isoflavongehalte in Nahrungsergänzungsmitteln aus Soja und/oder Rotklee

#### 3.4.4.1 Mega Femin Kapseln

In diesem Nahrungsergänzungsmittel sind sowohl Rotklee- als auch Sojaiso flavone enthalten, laut Deklaration 37mg/Kapsel Rotkleeextrakt und 37,5mg/Kapsel Sojabohnenextrakt. Mit der entwickelten Methode wurde die Isoflavonkonzentration analysiert.

In der folgenden Tabelle sind sowohl der Gehalt der einzelnen Isoflavonkomponenten als auch der Gesamtgehalt im Extrakt in % angegeben.

**Tabelle 14:** Einzel- und Gesamtisoflavongehalte der Mega Femin Kapseln

<b>Isoflavon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Mittelwert</b>
Daidzin	0,987	1,008	0,998
Glycitin	0,192	0,214	0,203
Genistin	2,794	2,862	2,828
Ac-Daidzin	n.q.	n.q.	n.q.
Ac-Glycitin	n.q.	n.q.	n.q.
Daidzein	0,075	0,078	0,077
Glycitein	0,044	0,043	0,044
Ac-Genistin	0,021	0,020	0,021
Genistein	0,067	0,072	0,070
Formononetin	2,613	2,405	2,509
Biochanin A	1,688	1,658	1,673
<b>Gesamtgehalt %</b>	<b>8,481</b>	<b>8,360</b>	<b>8,423</b>

n.q. (nicht quantifizierbar)

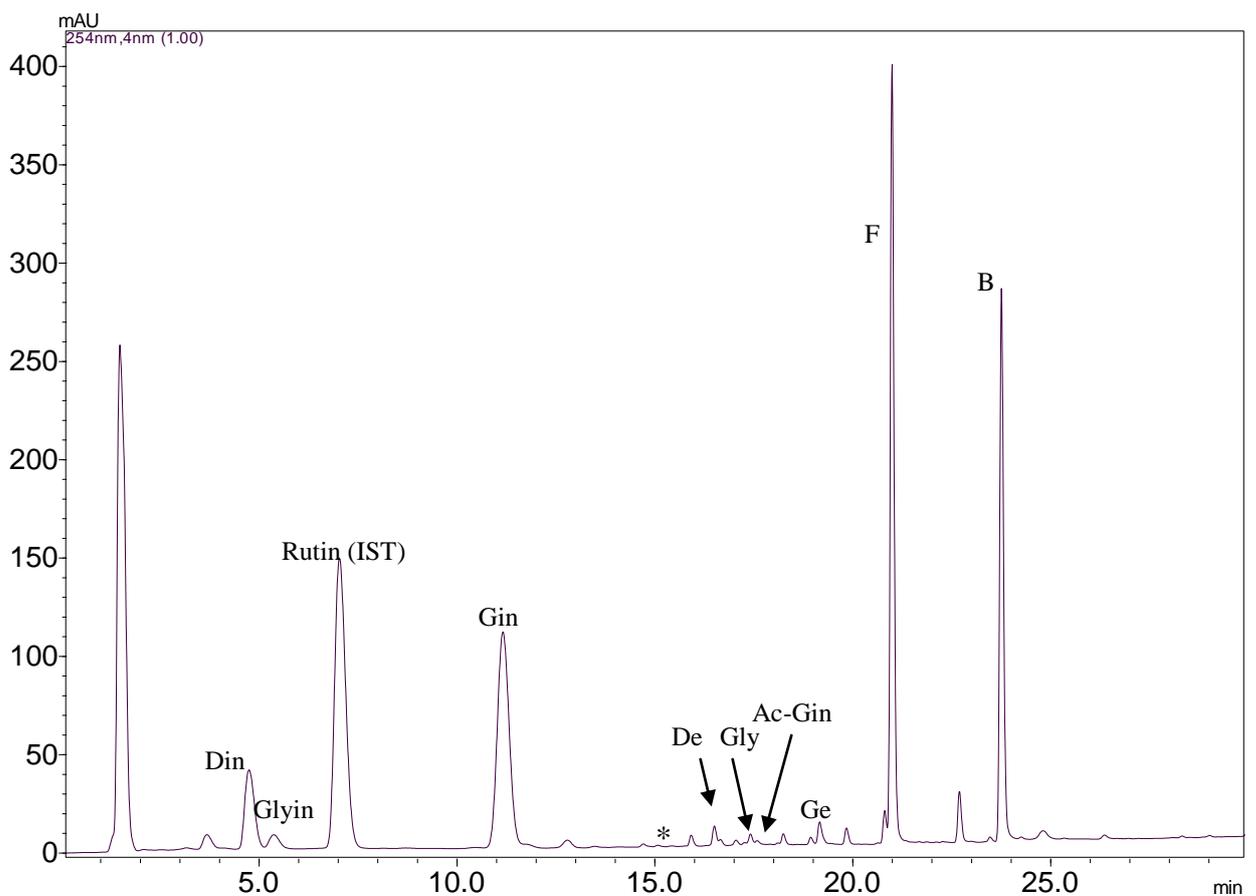
Acetyldaidzin und Acetylglycitin waren in Mega Femin Kapseln aufgrund der geringen Menge nicht quantifizierbar.

Da es sich hier um ein kombiniertes Soja- und Rotkleepräparat handelte, waren neben den Sojaisoflavonen auch die Isoflavone Formononetin und Biochanin A zu finden. Besonders Genistin, Formononetin und Biochanin A lagen in hohen Konzentrationen vor (siehe auch Abbildung 27).

Laut Deklaration enthält das Nahrungergänzungsmittel Mega Femin Kapseln 37mg Rotkleeextrakt und 37,5mg Sojabohnenextrakt pro Kapsel. Diese Angaben geben keine Rückschlüsse über den tatsächlichen totalen Isoflavongehalt des Präparates.

Bei der Analyse mit der entwickelten Methode (Bedingungen siehe Seite 9) konnte ein Isoflavongehalt von 8,423% ermittelt werden. Bezogen auf das ermittelte Kapselgewicht entspricht das circa 26mg Isoflavone pro Kapsel.

**Abbildung 27:** HPLC-Chromatogramm von Mega Femin Kapseln (Bedingungen siehe Seite 9)



\*Ac-Din und Ac-Glyin konnten nicht quantifiziert werden

### 3.4.4.2 Natur-Nahrung Isoflavon-Kapseln

Auch hier handelte es sich um ein Kombinationspräparat aus Rotklee und Soja. Laut Deklaration sind 45mg Totalisoflavone pro Kapsel enthalten.

In Tabelle 15 sind sowohl der Gehalt der einzelnen Isoflavonkomponenten als auch der Gesamtgehalt im Extrakt in % angegeben.

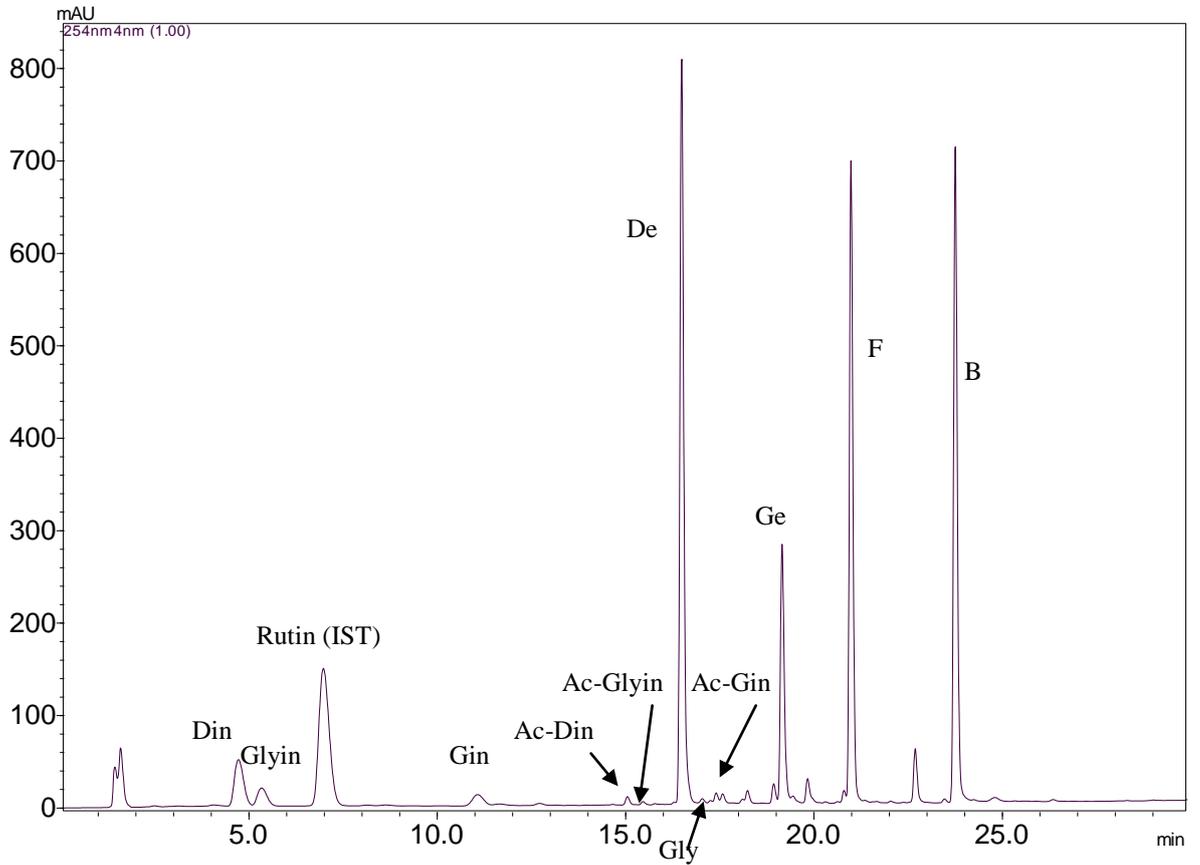
**Tabelle 15:** Einzel- und Gesamtisoflavongehalte von Natur-Nahrung Isoflavon Kapseln

<b>Isoflavon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Mittelwert</b>
Daidzin	1,239	1,305	1,272
Glycitin	0,555	0,587	0,571
Genistin	0,309	0,338	0,324
Ac-Daidzin	0,101	0,113	0,107
Ac-Glycitin	0,045	0,053	0,049
Daidzein	6,437	6,610	6,524
Glycitein	0,088	0,092	0,090
Ac-Genistin	0,096	0,116	0,106
Genistein	1,570	1,667	1,619
Formononetin	4,136	4,318	4,227
Biochanin A	4,147	4,323	4,235
<b>Gesamtgehalt %</b>	<b>18,723</b>	<b>19,516</b>	<b>19,124</b>

Während bei Mega Femin Kapseln Acetyldaidzin und Acetylglycitin nicht zu quantifizieren waren, waren sie in Natur-Nahrung Isoflavon Kapseln in geringen Konzentrationen nachweisbar. Daidzein, Formononetin und Biochanin A lagen in deutlich höheren Konzentrationen vor als die restlichen Isoflavonkomponenten (siehe Abbildung 28, Seite 43).

Die ermittelten 19,12% Gesamtisoflavonkonzentration entsprechen 43,08mg Gesamtisoflavone/Kapsel, welche sehr gut mit den deklarierten 45mg Gesamtisoflavone/Kapsel übereinstimmen. So konnte auch die Effizienz der entwickelten Methode gezeigt werden.

**Abbildung 28:** HPLC-Chromatogramm von Natur-Nahrung, Isoflavon Kapseln  
(Bedingungen siehe Seite 9)



### 3.4.4.3 Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees

In Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees sind 45mg Gesamtisoflavone deklariert.

Mit der entwickelten HPLC-Methode (Bedingungen siehe Seite 9) konnte der Gehalt der einzelnen Isoflavonkomponenten ermittelt werden und der Gesamtgehalt im Extrakt in % berechnet werden.

**Tabelle 16:** Einzel- und Gesamtisoflavongehalte von Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees

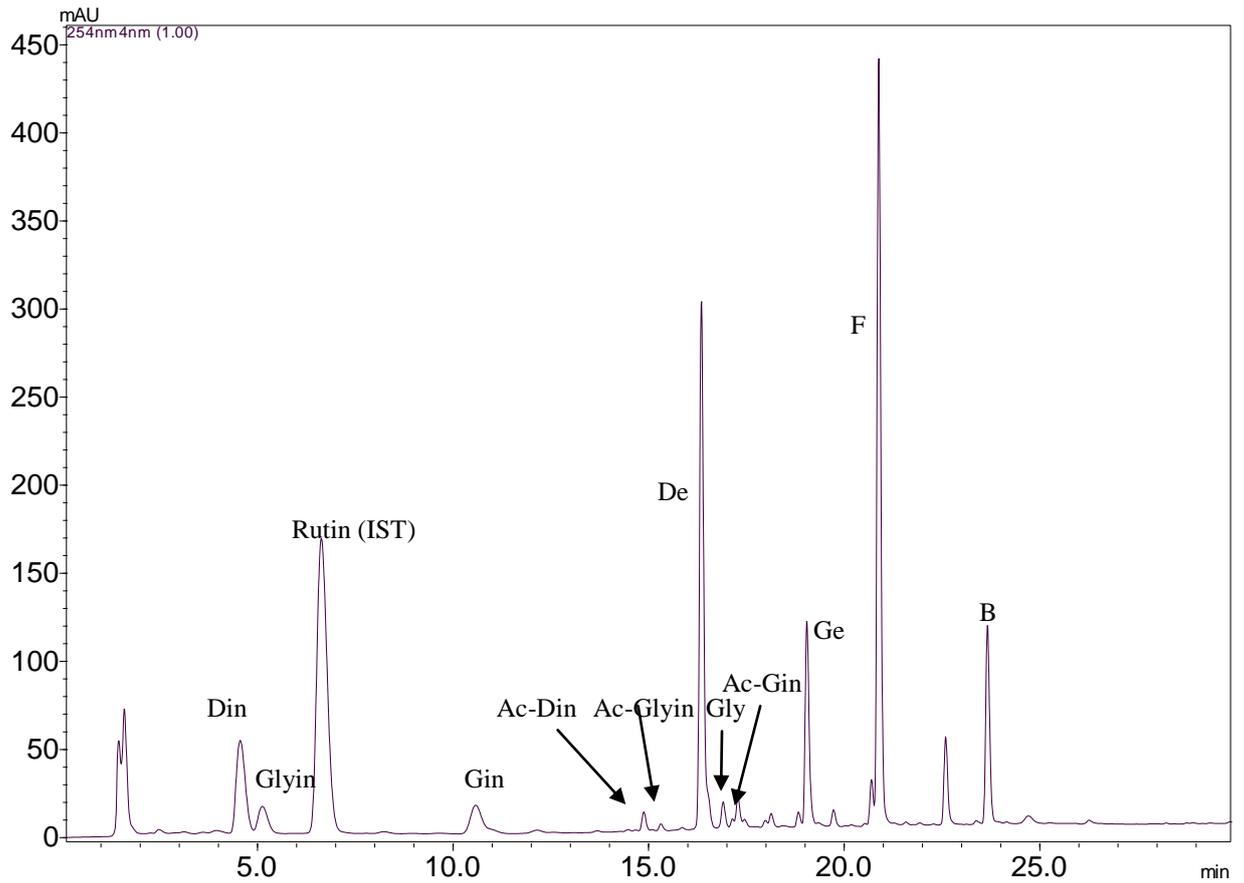
<b>Isoflavon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Mittelwert</b>
Daidzin	1,137	1,073	1,105
Glycitin	0,376	0,353	0,365
Genistin	0,412	0,410	0,411
Ac-Daidzin	0,113	0,107	0,110
Ac-Glycitin	0,046	0,043	0,045
Daidzein	2,296	2,158	2,227
Glycitein	0,109	0,103	0,106
Ac-Genistin	0,143	0,138	0,141
Genistein	0,604	0,562	0,583
Formononetin	2,410	2,264	2,337
Biochanin A	0,622	0,601	0,612
<b>Gesamtgehalt %</b>	<b>8,268</b>	<b>7,812</b>	<b>8,042</b>

Bei Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees handelte es sich wieder um ein kombiniertes Soja- und Rotkleepräparat. Gemeinsam mit Daidzin, Daidzein und Genistein sind Formononetin und Biochanin A die Isoflavonkomponenten, die in höherem Prozentsatz vorliegen als die anderen Isoflavone.

Die ermittelte Gesamtisoflavonkonzentration von 8,042% entsprach 49,92mg Gesamtisoflavone/Dragee. Da der deklarierte Gehalt bei 45mg Gesamtisoflavone/Dragee liegt, war hier eine Abweichung von ca. 10% festzustellen. Dies ist offensichtlich darauf zurückzuführen, dass sich die deklarierten Werte auf die Gene

(Daidzein, Glycitein, Genistein, Formononetin, Biochanin A) beziehen (siehe Kapitel 3.4.5., Tabelle 22 und 23 Seite 53).

**Abbildung 29:** HPLC-Chromatogramm von Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees  
(Bedingungen siehe Seite 9)



#### 3.4.4.4 Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees

Auch hier handelte es sich um ein Kombinationspräparat aus Soja und Rotklee. Der deklarierte Wert liegt bei 90mg Gesamtisoflavone/Dragee.

In folgender Tabelle sind sowohl der Gehalt der einzelnen Isoflavonkomponenten als auch der Gesamtgehalt im Extrakt in % angegeben.

**Tabelle 17:** Einzel- und Gesamtisoflavongehalte von Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees

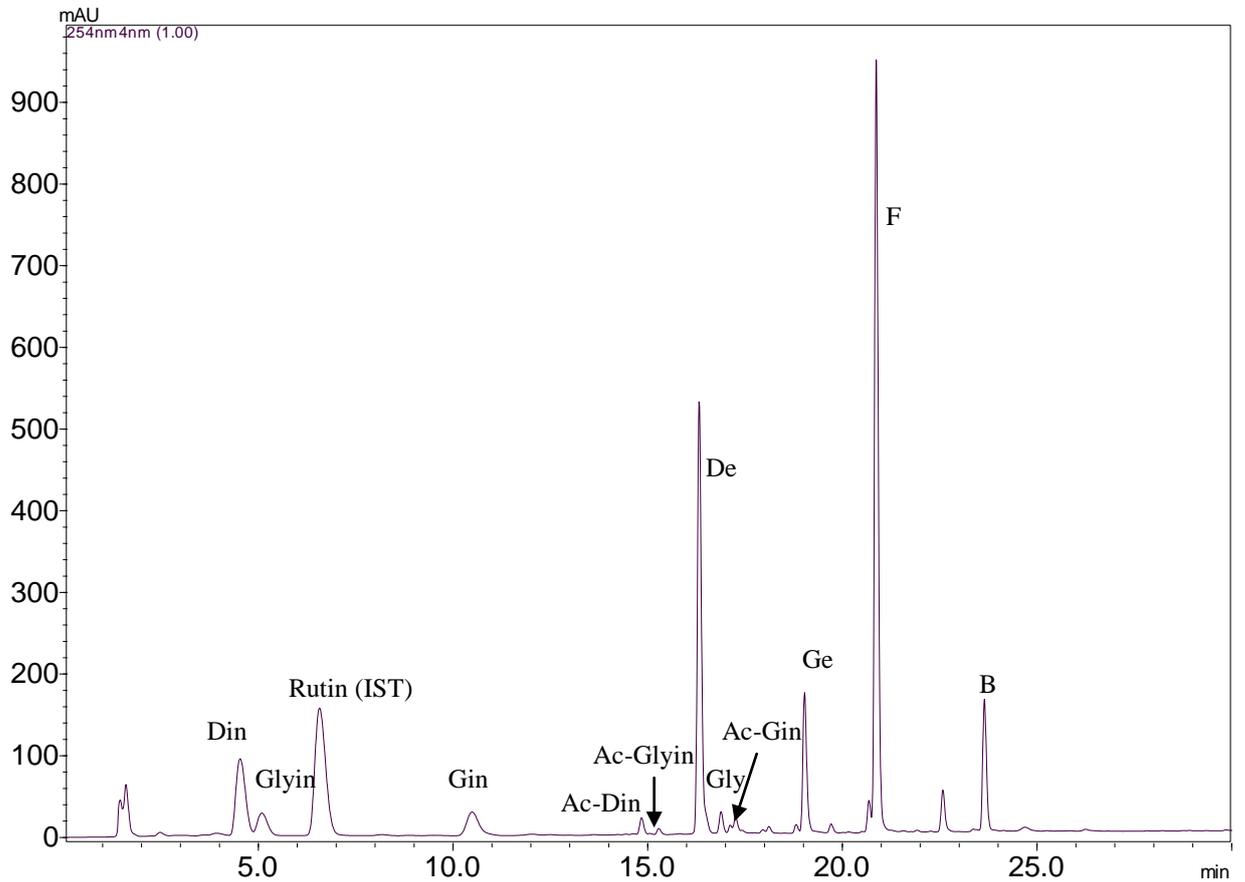
<b>Isoflavon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Mittelwert</b>
Daidzin	2,244	2,217	2,231
Glycitin	0,770	0,748	0,759
Genistin	0,756	0,751	0,754
Ac-Daidzin	0,230	0,234	0,232
Ac-Glycitin	0,091	0,093	0,092
Daidzein	4,158	4,121	4,140
Glycitein	0,205	0,196	0,201
Ac-Genistin	0,171	0,160	0,166
Genistein	0,933	0,910	0,922
Formononetin	5,528	5,440	5,484
Biochanin A	0,922	0,907	0,915
<b>Gesamtgehalt %</b>	<b>16,008</b>	<b>15,777</b>	<b>15,896</b>

Die Isoflavone in Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees zeigten dasselbe Muster mit Daidzin, Daidzein, Genistein, Formononetin und Biochanin A als Hauptkomponenten, wie das nur halb so hoch dosierte Präparat Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragee.

Die ermittelten 15,896% Gesamtisoflavonkonzentration entsprechen 99,34mg Gesamtisoflavone/Dragee. Auch hier war eine Abweichung von den deklarierten 90mg Gesamtisoflavone/Dragee festzustellen, die damit erklärt werden kann, dass sich die

deklarierten Werte auf die Genine Daidzein, Glycitein, Genistin, Formononetin und Biochanin A beziehen.

**Abbildung 30:** HPLC-Chromatogramm von Dr. Böhmer forte Isoflavon 90mg Dragees (Bedingungen siehe Seite 9)



### 3.4.4.5 Sanvita Sarapis Soja Kapseln

In diesem kombinierten Soja- und Rotkleepräparat sind laut Deklaration 25mg Gesamtisoflavone/Kapsel enthalten.

Mit der entwickelten HPLC-Methode (Bedingungen siehe Seite 9) konnte der Gehalt der einzelnen Isoflavonkomponenten ermittelt werden und der Gesamtgehalt im Extrakt in % errechnet werden.

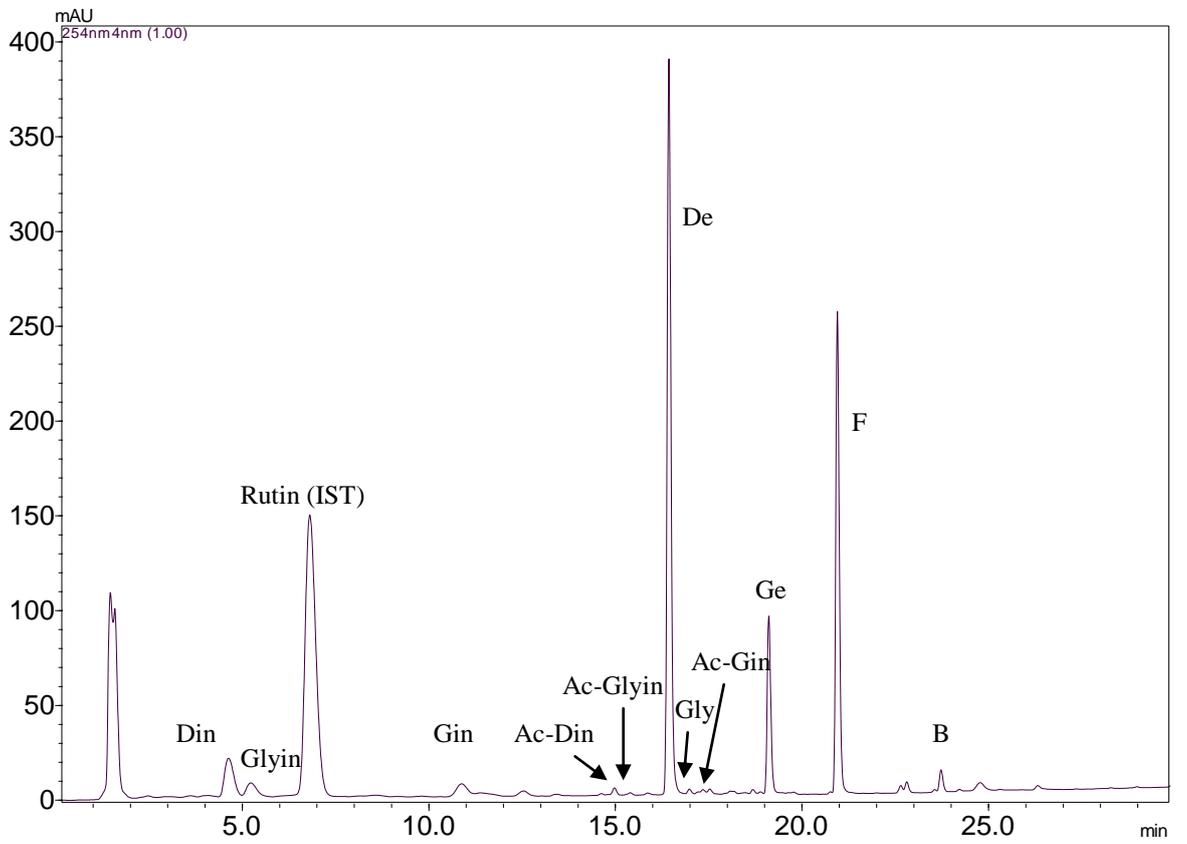
**Tabelle 18:** Einzel- und Gesamtisoflavongehalte von Sanvita Sarapis Soja Kapseln

<b>Isoflavon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Mittelwert</b>
Daidzin	0,498	0,516	0,507
Glycitin	0,223	0,231	0,227
Genistin	0,172	0,166	0,169
Ac-Daidzin	0,045	0,044	0,045
Ac-Glycitin	0,016	0,017	0,017
Daidzein	3,006	3,172	3,090
Glycitein	0,023	0,022	0,023
Ac-Genistin	0,026	0,028	0,027
Genistein	0,493	0,525	0,509
Formononetin	1,492	1,598	1,545
Biochanin A	0,069	0,078	0,074
<b>Gesamtgehalt %</b>	<b>6,062</b>	<b>6,397</b>	<b>6,233</b>

Daidzein und Formononetin waren die Hauptkomponenten in diesem Präparat, während besonders Ac-Daidzin, Ac-Glycitin, Glycitein, Ac-Genistin und Biochanin A hingegen in sehr geringer Konzentration enthalten waren.

Der Gesamtgehalt von 6,233% entspricht 26,70mg Gesamtisoflavone/Kapsel, die mit dem deklarierten Wert von 25mg Gesamtisoflavone/Kapsel übereinstimmen.

**Abbildung 31:** HPLC-Chromatogramm von Sanvita Sarapis Soja Kapseln  
(Bedingungen siehe Seite 9)



### **3.4.5 Zusammenfassung der Analysen**

Mit Hilfe der entwickelten HPLC-Methode konnten die ausgewählten Präparate sehr gut analysiert werden.

Die einzelnen Isoflavonkomponenten Daidzin, Glycitin, Genistin, Acetyldaidzin, Acetylglycitin, Daidzein, Glycitein, Acetylgenistin, Genistein, Formononetin und Biochanin A wurden zufriedenstellend aufgetrennt und die Gehalte jedes einzelnen Isoflavons sowie der Gesamtgehalt konnten bestimmt werden.

Nach der quantitative Analyse, konnten die Ergebnisse mit den deklarierten Werten der Präparate verglichen werden (siehe Tabelle 19, Seite 51).

**Tabelle 19:** Vergleich der analysierten Isoflavonmengen mit den deklarierten Werten der Präparate

<b>Präparat</b>		
<b>Rotklee-Extrakt WBC3601</b>	Deklaration	7,3% Totalisoflavone
	Ergebnis der Analyse	7,2% Totalisoflavone
<b>Soyaextrakt &gt;40% Isoflavone</b>	Deklaration	>40% Totalisoflavone
	Ergebnis der Analyse	41,3% Totalisoflavone
<b>Natur-Nahrung Isoflavon Kapseln</b>	Deklaration	45mg/Kps Totalisoflavone
	Ergebnis der Analyse	43,1mg/Kps Totalisoflavone
<b>Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees</b>	Deklaration	45mg/Dragee Totalisoflavone
	Ergebnis der Analyse	49,9mg/Dragee Totalisoflavone
<b>Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees</b>	Deklaration	90mg/Dragee Totalisoflavone
	Ergebnis der Analyse	99,3mg/Dragee Totalisoflavone
<b>Sanvita Sarapis Soja Kapseln</b>	Deklaration	25mg/Kps Totalisoflavone
	Ergebnis der Analyse	26,7mg/Kps Totalisoflavone

Die Ergebnisse der einzelnen Analysen stimmten mit den angegebenen Werten in den Präparaten weitergehend überein.

Lediglich die Isoflavonmengen von Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees und von Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees lagen um circa 10% über der Deklaration.

Es wurde vermutet, dass sich die deklarierten Werte auf die Genine beziehen.

Daher wurden die ermittelten Glykosidkonzentrationen auf die Mengen des jeweiligen Genins umgerechnet (siehe Tabelle 20 und 21, Seite 52).

**Tabelle 20:** Geningehalte von Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees

---

<b>Isoflavon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Mittelwert</b>
Daidzein	3,053	2,872	2,963
Glycitein	0,375	0,353	0,364
Genistein	0,944	0,898	0,921
Formononetin	2,410	2,264	2,337
Biochanin A	0,622	0,601	0,612
<b>Gesamtgehalt %</b>	<b>7,404</b>	<b>6,988</b>	<b>7,197</b>

**Tabelle 21:** Geningehalte von Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees

---

<b>Isoflavon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Mittelwert</b>
Daidzein	5,656	5,601	5,629
Glycitein	0,748	0,726	0,737
Genistein	1,503	1,470	1,487
Formononetin	5,528	5,440	5,484
Biochanin A	0,922	0,907	0,915
<b>Gesamtgehalt %</b>	<b>14,357</b>	<b>14,144</b>	<b>14,252</b>

**Tabelle 22:** Isoflavonmenge in Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees auf die Genine bezogen

<b>Präparat</b>		
<b>Dr. Böhm</b>	Deklaration	45mg/Dragee Totalisoflavone
	Ergebnis der Analyse	44,7mg/Dragee Totalisoflavone

**Tabelle 23:** Isoflavongehalt von Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees auf die Genine bezogen

<b>Präparat</b>		
<b>Dr. Böhm forte</b>	Deklaration	90mg/Dragee Totalisoflavone
	Ergebnis der Analyse	89,0mg/Dragee Totalisoflavone

Anhand dieser Werte konnte nachgewiesen werden, dass sich die Deklaration der Präparate Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees und Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees auf den Geningehalt bezieht. Die Ergebnisse der Analyse stimmten ebenfalls mit den deklarierten Werten gut überein.

Da die Isoflavongenine die Wirkstoffe in Soja- und Rotkleepräparaten darstellen, lässt diese Deklaration auch genauer auf die aufgenommene Wirkstoffmenge schließen als die Gesamtdeklaration von Glykosiden in Soja- bzw. Soja-Rotkleepräparaten.

### **3.5 Wiederfindungsraten der untersuchten Isoflavone**

Die Bestimmung der Wiederfindungsraten diente dazu, um Verluste an Isoflavonen während der Aufarbeitung der Droge bzw. der Analyse ausschließen zu können. Mittels Dotation wurde die quantitative Erfassung von Daidzin, Glycitin, Genistin, Daidzein, Glycitein, Genistein, Biochanin A und Formononetin überprüft.

Für die Analyse wurden Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees herangezogen. Im Rahmen der Quantifizierung war der Einzelgehalt für jedes Isoflavon in der Droge durch Mehrfachbestimmung bereits ermittelt worden (siehe Kapitel 3.3., Seite 27).

Der Droge wurden vor der Extraktion zwei unterschiedliche Konzentrationen des jeweiligen Isoflavons zugesetzt, und zwar 25% bzw. 50% der enthaltenen Isoflavonmenge.

Die Proben wurden nach dem beschriebenen Extraktionsverfahren (siehe Kapitel 2.2., Seite 8) aufgearbeitet und anschließend mittels HPLC (siehe Kapitel 2.3., Seite 9) analysiert. Für jede Konzentration wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

### 3.5.1 Wiederfindungsrate von Daidzin

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Dotation von Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees mit Daidzin angeführt.

Die ermittelte Daidzinmenge im Probenmaterial betrug 2,286%. Das entsprach 0,689mg/30mg Probe.

**Tabelle 24:** Wiederfindungsrate von Daidzin

<b>Mittlere Daidzinmenge</b>	<b>Dotierte Menge</b>	<b>Ausbeute % n=2</b>	<b>Sollwert %</b>	<b>Wiederfindung, %, n=2</b>
2,286%= 0,689mg/30mg	25% von 0,689mg=0,173mg	2,831 2,866	2,858	99,06 100,28
<b>Mittelwert</b>				<b>99,67</b>
	50% von 0,689mg=0,345mg	3,352 3,371	3,429	97,75 98,31
<b>Mittelwert</b>				<b>98,03</b>
<b>Gesamt MW</b>				<b>98,85</b>

### 3.5.2 Wiederfindungsrate von Glycitin

Die Wiederfindungsrate von Glycitin ist in Tabelle 25 angegeben. Das Probenmaterial enthielt 0,225mg Isoflavone in 30mg, die zur Aufarbeitung herangezogen wurden.

**Tabelle 25:** Wiederfindungsrate von Glycitin

<b>Mittlere Glycitinmenge</b>	<b>Dotierte Menge</b>	<b>Ausbeute % n=2</b>	<b>Sollwert %</b>	<b>Wiederfindung % n=2</b>
0,747%= 0,225mg/30mg	25% von 0,225mg=0,056mg	0,959 0,962	0,934	102,68 103,00
<b>Mittelwert</b>				<b>102,84</b>
	50% von 0,225mg=0,113mg	1,050 1,094	1,121	93,67 97,59
<b>Mittelwert</b>				<b>95,63</b>
<b>Gesamt MW</b>				<b>99,24</b>

### 3.5.3 Wiederfindungsrate von Genistin

Der mittlere Genistinwert betrug 0,715% und umgerechnet auf 30 mg Einwaage, 0,215mg.

**Tabelle 26:** Wiederfindungsrate von Genistin

<b>Mittlere Genistinmenge</b>	<b>Dotierte Menge</b>	<b>Ausbeute % n=2</b>	<b>Sollwert %</b>	<b>Wiederfindung %, n=2</b>
0,715%= 0,215mg/30mg	25% von 0,215mg=0,054mg	0,906 0,907	0,894	101,34 101,45
<b>Mittelwert</b>				<b>101,40</b>
	50% von 0,215mg=0,108mg	1,053 1,029	1,073	98,14 95,90
<b>Mittelwert</b>				<b>97,02</b>
<b>Gesamt MW</b>				<b>99,21</b>

### 3.5.4 Wiederfindungsrate von Daidzein

Der Ausgangswert für Daidzein betrug 4,259% oder 1,28mg bezogen auf die Einwaage von 30mg.

**Tabelle 27:** Wiederfindungsrate von Daidzein

<b>Mittlere Daidzeinmenge</b>	<b>Dotierte Menge</b>	<b>Ausbeute % n=2</b>	<b>Sollwert %</b>	<b>Wiederfindung %, n=2</b>
4,259%= 1,28mg/30mg	25% von 1,28mg=0,32mg	5,353 5,276	5,324	100,54 99,1
<b>Mittelwert</b>				<b>99,82</b>
	50% von 1,28mg=0,64mg	6,556 6,407	6,389	102,61 100,28
<b>Mittelwert</b>				<b>101,45</b>
<b>Gesamt MW</b>				<b>100,64</b>

### 3.5.5 Wiederfindungsrate von Glycitein

Die Glyciteinmenge im Probenmaterial betrug 0,216%, das entsprach 0,065mg/30mg.

**Tabelle 28:** Wiederfindungsrate von Glycitein

<b>Mittlere Glyciteinmenge</b>	<b>Dotierte Menge</b>	<b>Ausbeute % n=2</b>	<b>Sollwert %</b>	<b>Wiederfindung %, n=2</b>
0,216%= 0,065mg/30mg	25% von 0,065mg=0,016mg	0,278 0,274	0,270	102,96 101,48
<b>Mittelwert</b>				<b>102,22</b>
0,216% 0,065mg/30mg	50% von 0,065mg=0,0325	0,337 0,339	0,324	104,01 104,63
<b>Mittelwert</b>				<b>104,32</b>
<b>Gesamt MW</b>				<b>103,27</b>

### 3.5.6 Wiederfindungsrate von Genistein

Das Probenmaterial enthielt 0,943% Genistein, das bezogen auf eine Einwaage von 30mg 0,284mg ergab.

**Tabelle 29:** Wiederfindungsrate von Genistein

<b>Mittlere Genisteinmenge</b>	<b>Dotierte Menge</b>	<b>Ausbeute % n=2</b>	<b>Sollwert %</b>	<b>Wiederfindung %, n=2</b>
0,943%= 0,284mg/30mg	25% von 0,284mg=0,071mg	1,210 1,214	1,179	102,63 102,97
<b>Mittelwert</b>				<b>102,80</b>
0,943%= 0,284mg/30mg	50% von 0,284mg=0,142	1,381 1,408	1,415	97,60 99,51
<b>Mittelwert</b>				<b>98,56</b>
<b>Gesamt MW</b>				<b>100,68</b>

### 3.5.7 Wiederfindungsrate von Formononetin

Der Ausgangswert für Formononetin betrug 5,691% oder 1,715mg bezogen auf eine Einwaage von 30mg.

**Tabelle 30:** Wiederfindungsrate von Formononetin

<b>Mittlere Formononetinmenge</b>	<b>Dotierte Menge</b>	<b>Ausbeute %, n=2</b>	<b>Sollwert %</b>	<b>Wiederfindung %, n=2</b>
5,691%= 1,715mg/30mg	25% von 1,715mg=0,429mg	6,949 7,282	7,114	97,68 102,36
<b>Mittelwert</b>				<b>100,02</b>
5,691%= 1,715mg/30mg	50% von 1,715mg=0,858mg	8,154 8,362	8,537	95,51 97,95
<b>Mittelwert</b>				<b>96,73</b>
<b>Gesamt MW</b>				<b>98,38</b>

### 3.5.8 Wiederfindungsrate von Biochanin A

Die ermittelte Biochanin A-Menge im Probenmaterial lag bei 0,945%, das entsprach 0,285mg in den zur Dotierung verwendeten 30mg Einwaage.

**Tabelle 31:** Wiederfindungsrate von Biochanin A

<b>Mittlere Biochanin A Menge</b>	<b>Dotierte Menge</b>	<b>Ausbeute % n=2</b>	<b>Sollwert %</b>	<b>Wiederfindung % n=2</b>
0,945%= 0,285mg/30mg	25% von 0,285mg=0,071mg	1,177 1,156	1,181	99,66 97,88
<b>Mittelwert</b>				<b>98,77</b>
0,945%= 0,285mg/30mg	50% von 0,285mg=0,143mg	1,413 1,400	1,418	99,65 98,73
<b>Mittelwert</b>				<b>99,19</b>
<b>Gesamt MW</b>				<b>98,98</b>

Die Wiederfindungsraten der acht untersuchten Isoflavone lagen bei durchschnittlich 99,90%. Die Abweichungen bewegten sich in einem engen Bereich um 100%, womit bewiesen wurde, dass es während der Aufarbeitung der Droge nach der beschriebenen Methode zu keinen Verlusten an Isoflavonkomponenten kam und die Methode der Extraktion geeignet war.

Die Acetylglucoside weisen nur geringe strukturelle Unterschiede im Vergleich zu den 7-O-Glucosiden auf. Daher konnte man darauf schließen, dass auch diese Komponenten mit der verwendeten Extraktionsmethode quantitativ erfasst wurden.

### 3.6 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Bestimmungsgrenze oder limit of determination ist die kleinste Konzentration eines Analyten, die quantitativ mit einer festgelegten Präzision bestimmt werden kann. Die Bestimmungsgrenze entspricht einem Signal-Rausch Verhältnis von 1:10.

Die Nachweisgrenze oder limit of detection, ist die Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein eines Analyten. Unter dem Detektionslimit versteht man ein Signal-Rausch Verhältnis von 1:3.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden für die Isoflavone Daidzin, Glycitin, Genistin, Daidzein, Glycitein, Genistein, Formononetin und Biochanin A ermittelt.

Für die Bestimmung wurde Eichlösung 1 verdünnt (Zusammensetzung siehe Tabelle 2, Seite 19) bzw. Verdünnungen der Stammlösungen verwendet.

Es wurden mehrere Verdünnungsstufen mit DMSO/H<sub>2</sub>O erstellt. Die Mischungen wurden soweit verdünnt, bis das jeweilige Limit erreicht war. In Tabelle 32 sind die Werte der Analyse aufgelistet. Es konnte eine hohe Empfindlichkeit des Systems gezeigt werden.

**Tabelle 32:** Bestimmungs- und Nachweisgrenze der Isoflavone

<b>Isoflavon</b>	<b>Bestimmungsgrenze in ng</b>	<b>Nachweisgrenze in ng</b>
Daidzin	0,49	0,12
Glycitin	2,34	0,59
Genistin	1,87	0,47
Daidzein	0,40	0,10
Glycitein	0,40	0,10
Genistein	0,57	0,14
Formononetin	0,65	0,16
Biochanin A	0,16	0,04

## 4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden die Isoflavonoide aus Soja und Rotklee mit Hilfe der Hochflüssigkeitschromatographie analysiert.

Es wurde eine HPLC-Methode an einer narrow bore Phase entwickelt, die zu einer Verringerung der Analysenzeit und des Lösungsmittelverbrauchs führt. Die Quantifizierung der Isoflavone wurde mit Hilfe des internen Standards Rutin durchgeführt.

Durch die Verwendung dieser stationären Phase konnte nicht nur die Analysezeit und der Verbrauch an Lösungsmittel deutlich reduziert, sondern auch die Trennleistung und Empfindlichkeit erhöht werden.

Es wurde eine Extraktionsmethode gewählt, die nicht zu einer Spaltung der 7-O-Glycoside und der 6''-O-Acetyl-Glycoside in Soja führte. Die Aufarbeitung war einfach und schnell durchzuführen. Für die Extraktion wurden 30mg des zu untersuchenden Materials in DMSO/H<sub>2</sub>O aufgenommen und am Ultraschallbad 20 Minuten lang extrahiert. Anschließend wurde abzentrifugiert und ein Aliquot des Überstands mit DMSO/H<sub>2</sub>O verdünnt.

Bisherige Analysenarbeiten waren auf einer 250 mm langen Hypersil BDS Säule durchgeführt worden. Stattdessen wurde hier eine ACE C<sub>18</sub> AR Säule (150 mm x 2,1mm x 3µm) als stationäre Phase eingesetzt. Die mobile Phase setzte sich aus Eluent A (Wasser) und Eluent B (Acetonitril) zusammen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 2,8 eingestellt und auch Acetonitril wurde mit Essigsäure (6ml/L) angesäuert.

Mit einer Mischung von 8 Standards (Daidzin, Glycitin, Genistin, Daidzein, Glycitein, Genistein, Formononetin und Biochanin A) wurden Fließmittelgradienten erprobt. Durch einen isokratischen Schritt zu Beginn der Analyse und Gradientenelution konnte eine gute Trennung der Isoflavone in Soja- und Rotkleepräparaten erzielt werden. Durch Verwenden der narrow bore Säule konnte der Lösungsmittelverbrauch um 77,6% gesenkt werden und die Analysenzeit etwas verkürzt werden.

Die Eichung wurde mit Rutin als internem Standard durchgeführt. Rutin erwies sich deswegen als optimal, da es keine Überlagerung mit anderen Isoflavonen oder Begleitstoffen zeigte und die Analysenzeit nicht verlängerte. Außerdem ist Rutin kostengünstig im Handel zu erhalten. Es wurden Eichlösungen hergestellt, anschließend an die HPLC-Analyse Eichgeraden erstellt und die Korrekturfaktoren für Daidzein, Glycitein, Genistein, Daidzin, Glycitin, Genistin, Formononetin und Biochanin A berechnet. Die Korrekturfaktoren der Acetylglucoside wurden über das Molekulargewicht bestimmt.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Methode wurden die Handelsmuster Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees und Sanvita Sarapis Soja Kapseln einer Mehrfachextraktion unterzogen. Es wurden jeweils 4 Extraktionen der Handelspräparate durchgeführt und die Extrakte mittels HPLC analysiert. Mit den ermittelten Variationskoeffizienten konnte eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit des Systems und der Extraktion gezeigt werden. Um Verluste an Isoflavonen bei der Aufarbeitung der Droge ausschließen zu können, wurden Wiederfindungsraten für Daidzein, Glycitein, Genistein, Daidzin, Glycitin, Genistin, Formononetin und Biochanin A bestimmt. Aus den Resultaten ergab sich eine Wiederfindungsrate von im Mittel 99,9%, was Verluste an Isoflavonen bei der Extraktion oder Analyse ausschließen lässt.

Einige Nahrungsergänzungsmittel mit Soja- und/oder Rotklee-Extrakt, die in österreichischen Apotheken erhältlich sind, wurden einer quantitativen Analyse unterzogen und der Einzel- und Gesamtisoflavongehalt bestimmt. Die Werte entsprachen gut den deklarierten Angaben. Bei den Präparaten Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees und Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees lagen die berechneten Werte circa 10% über der Deklaration. Dies war darauf zurückzuführen, dass sich die Deklaration auf den Geningehalt der Präparate bezog. Bei Berechnung des Geningehaltes zeigten auch diese Konzentrationen eine gute Übereinstimmung mit den deklarierten Werten.

Mit diesen Analysen konnte einerseits die Eignung der entwickelten HPLC-Methode für die Quantifizierung von Nahrungsergänzungsmitteln, die Rotklee- und/oder Sojaextrakte enthalten, gezeigt werden. Andererseits wurde auch nachgewiesen, dass solche Nahrungsergänzungsmittel, die in österreichischen Apotheken verkauft werden, die deklarierten Isoflavonmengen sehr genau einhalten.

Mit den Bestimmungs- und Nachweisgrenzen für die 8 Isoflavone konnte eine hohe Empfindlichkeit des Systems gezeigt werden.

Die Quantifizierung der Isoflavone in Zubereitungen und Präparaten von Soja und Rotklee konnte mit der entwickelten Methode auf einer narrow bore Säule präzise und einfach durchgeführt und damit die Analysezeit und die Kosten gesenkt werden.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Struktur von Daidzein und davon abgeleiteten Glucosiden .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Struktur von Genistein und davon abgeleiteten Glucosiden.....	2
<b>Abbildung 3:</b> Struktur von Glycitein und davon abgeleiteten Glucosiden.....	3
<b>Abbildung 4:</b> Struktur von Formononetin.....	5
<b>Abbildung 5:</b> Struktur von Biochanin A.....	5
<b>Abbildung 6:</b> HPLC einer Mischung von 8 Standards (Bedingungen siehe Seite 9)....	10
<b>Abbildung 7:</b> HPLC einer Mischung von 8 Standards (Bedingungen siehe Seite 9)....	11
<b>Abbildung 8:</b> HPLC des Sojamehls (Bedingungen siehe Seite 9).....	12
<b>Abbildung 9:</b> HPLC des Rotklee-Extrakts (Bedingungen siehe Seite 9) .....	12
<b>Abbildung 10:</b> HPLC des Sojamehls (Bedingungen siehe Seite 9).....	13
<b>Abbildung 11:</b> HPLC des Rotklee-Extrakts (Bedingungen siehe Seite 9) .....	14
<b>Abbildung 12:</b> HPLC einer Mischung von 8 Standards (Bedingungen siehe Seite 9)..	15
<b>Abbildung 13:</b> HPLC des Sojamehls (Bedingungen siehe Seite 9).....	16
<b>Abbildung 14:</b> HPLC des Rotklee-Extrakts (Bedingungen siehe Seite 9) .....	17
<b>Abbildung 15:</b> HPLC der Eichlösung 1 (Bedingungen siehe Seite 9).....	20
<b>Abbildung 16:</b> Eichgerade Daidzin .....	23
<b>Abbildung 17:</b> Eichgerade Glycitin .....	23
<b>Abbildung 18:</b> Eichgerade Genistin.....	24
<b>Abbildung 19:</b> Eichgerade Daidzein.....	24
<b>Abbildung 20:</b> Eichgerade Glycitein .....	25
<b>Abbildung 21:</b> Eichgerade Genistein .....	25
<b>Abbildung 22:</b> Eichgerade Formononetin .....	26
<b>Abbildung 23:</b> Eichgerade Biochanin A.....	26
<b>Abbildung 24:</b> HPLC- Chromatogramm des Soyamehls, „Soyaflavone“, Fa. Soya Austria Wien (Bedingungen siehe Seite 9) .....	35
<b>Abbildung 25:</b> HPLC-Chromatogramm des Soyaextrakts >40% Isoflavone (Bedingungen siehe Seite 9).....	37
<b>Abbildung 26:</b> HPLC-Chromatogramm des Rotklee-Extrakts WBC3601 (Bedingungen siehe Seite 9) .....	39

<b>Abbildung 27:</b> HPLC-Chromatogramm von Mega Femin Kapseln (Bedingungen siehe Seite 9) .....	41
<b>Abbildung 28:</b> HPLC-Chromatogramm von Natur-Nahrung, Isoflavon Kapseln (Bedingungen siehe Seite 9) .....	43
<b>Abbildung 29:</b> HPLC-Chromatogramm von Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees (Bedingungen siehe Seite 9) .....	45
<b>Abbildung 30:</b> HPLC-Chromatogramm von Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees (Bedingungen siehe Seite 9) .....	47
<b>Abbildung 31:</b> HPLC-Chromatogramm von Sanvita Sarapis Soja Kapseln (Bedingungen siehe Seite 9) .....	49

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Gradientenprofil .....	9
<b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzung der Eichlösungen in µl Stammlösung.....	19
<b>Tabelle 3:</b> Korrekturfaktoren der Isoflavone.....	21
<b>Tabelle 4:</b> Korrekturfaktoren der Acetylglucoside.....	22
<b>Tabelle 5:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalt von Sanvita Sarapis Soja Kapseln bei Mehrfachbestimmung an einem Tag ("intra-day") .....	28
<b>Tabelle 6:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalt Dr. Böhm Isoflavon forte Dragees bei Mehrfachbestimmung an einem Tag („intra-day“) .....	29
<b>Tabelle 7:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalt Sanvita Sarapis Soja Kapseln bei Mehrfachbestimmung an verschiedenen Tagen („inter-day“) .....	30
<b>Tabelle 8:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalt Dr. Böhm Isoflavon forte Dragees bei Mehrfachbestimmung an verschiedenen Tagen („inter-day“) .....	31
<b>Tabelle 9:</b> Analysenzertifikat des verwendeten Soyamehls (Isoflavonmenge in ppm) .	33
<b>Tabelle 10:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalt des Soyamehls „Soyaflavone“ .....	34
<b>Tabelle 11:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalte des Soyaextrakts >40% Isoflavone ..	36
<b>Tabelle 12:</b> Deklarierter Isoflavongehalt des Rotklee-Extraktes (n=16) .....	38
<b>Tabelle 13:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalte des Rotklee-Extrakts WBC3601 .....	38
<b>Tabelle 14:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalte der Mega Femin Kapseln .....	40
<b>Tabelle 15:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalte von Natur-Nahrung Isoflavon Kapseln .....	42
<b>Tabelle 16:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalte von Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees.....	44
<b>Tabelle 17:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalte von Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees.....	46
<b>Tabelle 18:</b> Einzel- und Gesamtisoflavongehalte von Sanvita Sarapis Soja Kapseln....	48
<b>Tabelle 19:</b> Vergleich der analysierten Isoflavonmengen mit den deklarierten Werten der Präparate.....	51
<b>Tabelle 20:</b> Geningehalte von Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees .....	52
<b>Tabelle 21:</b> Geningehalte von Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees.....	52

<b>Tabelle 22:</b> Isoflavonmenge in Dr. Böhm Isoflavon 45mg Dragees auf die Genine bezogen .....	53
<b>Tabelle 23:</b> Isoflavongehalt von Dr. Böhm forte Isoflavon 90mg Dragees auf die Genine bezogen.....	53
<b>Tabelle 24:</b> Wiederfindungsrate von Daidzin .....	55
<b>Tabelle 25:</b> Wiederfindungsrate von Glycitin.....	56
<b>Tabelle 26:</b> Wiederfindungsrate von Genistin .....	57
<b>Tabelle 27:</b> Wiederfindungsrate von Daidzein .....	58
<b>Tabelle 28:</b> Wiederfindungsrate von Glycitein .....	59
<b>Tabelle 29:</b> Wiederfindungsrate von Genistein.....	60
<b>Tabelle 30:</b> Wiederfindungsrate von Formononetin .....	61
<b>Tabelle 31:</b> Wiederfindungsrate von Biochanin A.....	62
<b>Tabelle 32:</b> Bestimmungs- und Nachweisgrenze der Isoflavone.....	63

## Literaturverzeichnis

1. Davis S.R.: Phytoestrogens as hormone replacement therapy for postmenopausal symptoms; *Endocrinology Updates* 2000; 8: 83-107
2. Saviranta N.M.M., Anttonen M.J., Wright and Karjalainen R.O.: Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar; *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008; 88: 125-132
3. Murphy P.A., Barua K., Hanck C.C.: Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods; *Journal of Chromatography B* 2002; 777: 129-138
4. Naim M., Gestetner B., Zilkah S., Birk Y., Bondi A.: Soybean Isoflavones. Characterization, Determination, and Antifungal Activity; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1974; 22: 806-810
5. Murakami H., Asakawa T., Terao J., Matsushita S.: Antioxidative Stability of Tempeh and Liberation of Isoflavones by Fermentation; *Agricultural and Biological Chemistry* 1984; 48: 2971-2975
6. Kulling S.E., Watzl B.: Phytoöstrogene; *Ernährungs-Umschau* 2003; 234-239
7. Huber J.C., Metka M.: Zur Datenlage der Phytohormone; *ÖAZ* 2004; 58: 950-953
8. Wolters M., Hahn A.: Sojaisoflavone – ein Therapeutikum gegen menopausale Beschwerden; *Wiener Medizinische Wochenschrift* 2004; 154: 334-341
9. Cornwell T., Cohick W., Roskin I.: Dietary phytoestrogens and Health; *Phytochemistry* 2004; 65: 995-1016
10. Gikas E., Alesta A., Economou G., Karamanos A., Tsarbopoulos A.: Determination of Isoflavones in the Aerial Part of Red Clover by HPLC-Diode Array Detection; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2008; 31: 8, 1182-1183
11. Liggins J., Bluck L.J.C., Coward W.A., Bingham S.A.: Extraction and quantification of daidzein and genistein in food; *Analytical Biochemistry* 1998; 264: 1-7

12. Schwartz H., Sontag G.: Determination of isoflavones in nutritional supplements by HPLC with coulometric electrode array detection; *Monatshefte für Chemie* 2008; 139: 865-872
13. Griffith A.P., Collison M.W.: Determination of isoflavone glucosides and aglycones in soy and powdered soy extract by high-performance liquid chromatography; *Journal of Chromatography A* 2001; 913: 397
14. Wu Q., Wang M., Simon J.E.: Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection; *Journal of Chromatography A* 2003; 1016: 195-209
15. Wang H.-J., Murphy P.A.: Isoflavone content in commercial soybean foods; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994; 42: 1666-1673
16. Krenn L., Pötsch V.: An efficient HPLC method for the quantification of isoflavones in soy extracts and soy dietary supplements in routine quality control; *Pharmazie* 2006; 61: 582-585
17. Penalvo J.L., Nurmi T., Adlercreutz H.: A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products; *Food Chemistry* 2004; 87: 297-305
18. Krenn L., Unterrieder I., Ruprechter R.: Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 2002; 777: 123-128

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Katharina Weinfurter

Adresse: Siegfried Ludwigstraße 4, 3390 Melk

Geburt: 9. Jänner 1987 in Melk

Staatsbürgerschaft: Österreich

Eltern: Maria Weinfurter (geb. Ebner), Mag. Klaus Weinfurter

Familienstand: ledig

## Ausbildung

1993-1997	Volksschule Schäfergasse, Wien
1997-2005	Stiftgymnasium Melk, Niederösterreich
7. Juni 2005	Matura mit ausgezeichnetem Erfolg abgelegt
2005	Studium an der Universität Wien, Studienrichtung Pharmazie
2005-2010	Ferialjob in der Landschaftsapotheke Melk, jeweils 1 Monat
März 2010-Juli 2010	Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie