

**Analytische Charakterisierung von Phytoestrogen-haltigen
Zubereitungen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Juliane Eidenschink

aus Berlin

Oktober 2012

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Maria Kristina Parr

Disputation am: 12.12.2012

Quem quer colher, deve semear.

Abkürzungsverzeichnis	IV
Einleitung	1
1. Vorkommen von Isoflavonen	2
1.1 Einteilung der Phytoestrogene	2
1.2 Biosynthese und Funktion der Isoflavone in der Pflanze	2
2. Verbreitung in Futter- und Lebensmitteln	4
2.1 Bedeutung von Sojabohne und Rotklee	4
2.1.1 Die Sojabohnenpflanze	4
2.1.2 Rotklee	7
3. Bioverfügbarkeit und Metabolismus der Isoflavone	9
4. Physiologische Wirkungen der Isoflavone	12
4.1 Hormonartige und hormonunabhängige Wirkungen	12
4.2 Antioxidative und antiproliferative Eigenschaften	15
4.3 Herz-Kreislauf-Erkrankungen	16
4.4 Menopausale Beschwerden	17
5. Nahrungsergänzungsmittel	20
5.1 Rechtliche Einordnung	20
5.2 Isoflavon-haltige Präparate	22
Zielsetzung der Arbeit	24
Theoretische Grundlagen	25
1. HPLC von Pflanzenextrakten	25
2. HPTLC	28
3. Schwingungs-Spektroskopie	29
3.1 Infrarot-Spektroskopie	32
3.1.1 Physikalische Grundlagen	32
3.1.2 Aufbau und Funktion des FTIR-Spektrometers	34
3.1.3 Die Fourier-Transformation	37
3.2 Raman-Spektroskopie	38
4. Multivariate Kalibration	40
4.1 Quantitative Auswertung mittels IR-Spektroskopie	40
4.2 PLS-Regression	41
4.3 Cluster-Analyse	46
Material & Methoden	47
1. Untersuchte Nahrungsergänzungsmittel	47
1.1 Deklarierte Gehalte an Isoflavonen	47
1.2 Materialien und Geräte	47
1.3 Probenaufarbeitung	48
2. Referenzsubstanzen	48
3. HPLC	49
3.1 Quantifizierung	49

3.2 MS-Untersuchungen.....	51
3.3 Probengewinnung für die FTIR-Untersuchungen.....	52
4. Dünnschichtchromatographische Verfahren.....	53
4.1 Materialien und Geräte.....	53
4.2 Fließmittelentwicklung.....	53
4.3 Probenauftragung.....	55
4.4 Chromatographische Entwicklung.....	57
4.5 Dokumentation.....	57
4.6 Quantitative Auswertung.....	58
4.7 Methodvalidierung.....	58
5. FTIR-ATR-Spektroskopie.....	60
5.1 Geräte und Software.....	60
5.2 Extraktvorbehandlung.....	60
5.3 Modellentwicklung.....	61
5.4 Multivariate Datenanalyse.....	62
5.5 Clusteranalyse.....	62
6. Raman-Spektroskopie.....	62
Ergebnisse.....	63
1. Quantifizierung von Isoflavonpräparaten mittels HPLC.....	63
1.1 Rotklee-Präparate.....	63
1.2 Soja-Präparate.....	68
2. HPLC-MS-Untersuchungen.....	72
2.1 Rotklee-Präparate.....	72
2.2 Soja-Präparate.....	74
3. Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC).....	75
3.1 Rotklee-Präparate.....	75
3.2 Soja-Präparate.....	80
4. FTIR-Spektroskopie.....	85
4.1 Qualitative IR-Untersuchungen.....	85
4.1.1 Rotklee-Präparate.....	85
4.1.2 Soja-Präparate.....	91
4.2 Quantifizierung mithilfe der IR-Spektroskopie.....	98
4.2.1 Rotklee-Präparate.....	98
4.2.2 Soja-Präparate.....	108
5. Clusteranalyse.....	117
6. Raman-Spektroskopie.....	120
6.1 Rotklee-Präparate.....	120
6.2 Soja-Präparate.....	123
Diskussion.....	125
1. Quantitative Bestimmung der Isoflavongehalte über HPLC.....	125
1.1 Rotklee-Präparate.....	125
1.2 Soja-Präparate.....	126

2. HPTLC-Analytik	127
2.1 Rotklee-Präparate	128
2.2 Soja-Präparate	130
3. Qualitative und quantitative IR-Analyse	132
3.1 Rotklee-Präparate	132
3.2 Soja-Präparate	134
4. Clusteranalyse	135
5. Raman-Spektroskopie	136
Zusammenfassung	137
Summary	139
Literaturverzeichnis	141
Publikationsverzeichnis	149
Lebenslauf	151
Danksagung	152
Eidesstattliche Erklärung	153

Abkürzungsverzeichnis

ATR	Attenuated Total Reflection
FDA	Food and Drug Administration
FIR	fernes Infrarot
FT	Fourier Transformation
IR	Infrarot
HPLC	High performance liquid chromatography
HPTLC	High performance thin layer chromatography
LC	liquid chromatography
LFGB	Lebens- und Futtermittelgesetzbuch
M-Abstand	Mahalanobisscher Abstand
MIR	mittleres Infrarot
MS	Massenspektrometrie
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
NemV	Nahrungsergänzungsmittel-Verordnung
NIR	nahes Infrarot
PLS	Partial least square
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation
SEP	Standard error of prediction

Einleitung

Seit einigen Jahren ist in Deutschland ein wachsender Trend zu Lebensmitteln zu verzeichnen, die einen besonderen Nutzen für die Gesundheit versprechen. Begründet ist dies in dem allgemein größeren Interesse eines Teils der Bevölkerung an einer „natürlicheren“ Lebensweise. Bio-Produkte erleben einen Boom, ebenso erhofft man sich durch die Supplementierung mit Vitaminen und pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) vermeintliche Ernährungsdefizite oder sogar Krankheiten zu beheben. So werden in Apotheken, Reformhäusern und Drogerien auch isoflavonhaltige, frei verkäufliche NEM angeboten, die als Bestandteile Rotklee und Soja enthalten. Zielgruppe dafür sind Frauen im Klimakterium, die diese Präparate als pflanzliche Alternative zur Hormonersatztherapie anwenden wollen. Auf der Verpackung werden durchweg positive und nebenwirkungsfreie Effekte auf das Wohlbefinden und altersbedingte Veränderungen propagiert. Als Beweis für die angegebenen Wirkungen wird dabei die isoflavonreiche Ernährungskultur in Asien angesehen, wo bestimmte Erkrankungen wie z.B. hormonabhängige Krebsarten wie Brust- oder Prostatakrebs und durch Estrogenmangel in den Wechseljahren bedingte Erscheinungen wie Hitzewallungen und Osteoporose seltener auftreten als in Europa. Hierfür gibt es jedoch keine validen wissenschaftlichen Belege, teilweise widersprechen sich die Daten (This et al., 2011). So gibt es ebenso Berichte über gesundheitlich negative Effekte wie die Förderung von Brustkrebs bei bereits durchlaufender Erkrankung (Roberts, 2010). In den letzten Jahren sind zur aktuellen Lage der Isoflavonbewertung zahlreiche Übersichtsartikel erschienen (Clement et al., 2011; Shedd-Wise et al. 2011; Taku et al., 2010a; Taku et al., 2010b). Aus diesen wird deutlich, dass es noch erhebliche Defizite bezüglich nachgewiesener Wirkungen und Toxizität sowie Einnahmeempfehlungen für Rotklee- und Soja-haltige Nahrungsergänzungsmittel gibt.

1. Vorkommen von Isoflavonen

1.1 Einteilung der Phytoestrogene

Phytoestrogene werden zur Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe gezählt. Die drei dazugehörigen Strukturklassen, die Isoflavone, Lignane und Coumestane, sind zwar alle Polyphenole, unterscheiden sich jedoch in ihrer chemischen Struktur deutlich voneinander. Die Bezeichnung „Phytoestrogene“ ergibt sich daher, dass sie trotz ihres nicht-steroidalen Aufbaus eine Ähnlichkeit zu den Estrogenen wie z. B. 17 β -Estradiol besitzen (siehe Abbildung 1). Aufgrund dieser Analogie können sie mit den Estrogen-Rezeptoren (α und/oder β) wechselwirken, was physiologische Effekte auslöst. Im Rahmen dieser Arbeit standen die Isoflavone im Fokus der Untersuchungen.

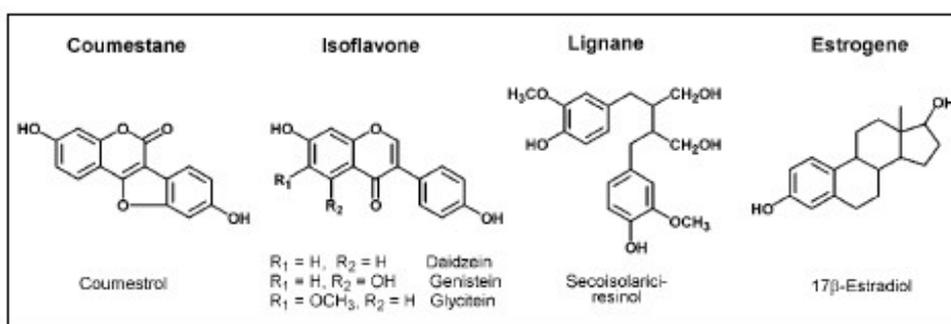


Abb. 1: Zu den Phytoestrogenen gehörige Substanzklassen und Estradiol

1.2 Biosynthese und Funktion der Isoflavone in der Pflanze

Flavonoide kommen ubiquitär im Pflanzenreich vor und somit auch in der menschlichen Nahrung. Ein Großteil der Blütenfarbstoffe gehört zu den Flavonoiden, welche dabei bestäubende Insekten anlocken sollen. Darüber hinaus erfüllen sie vielfältige Aufgaben in den Pflanzen. So führen sie zu einem Schutz vor Fraßfeinden und können aufgrund ihres chemischen Aufbaus die Pflanzen vor den schädlichen Einwirkungen von UV-Strahlen und kurzwelligem Licht bewahren. Sie verfügen darüber hinaus noch über eine antivirale, antibakterielle und antifungale Wirkung. Flavonoide im Speziellen besitzen als gemeinsame Struktur ein Phenylchromangerüst, wobei die Verknüpfung bei Flavonen an Position 2 und bei Isoflavonen an Position 3 des Chromon-Rings vorliegt.

Einleitung

Die Biosynthese der Flavonoide erfolgt über den Shikimisäureweg. Ausgehend von Shikimat entsteht daraus die aromatische Aminosäure Phenylalanin. Es erfolgt eine oxidative Desaminierung zur *trans*-Zimtsäure, welche wiederum zu *para*-Cumarsäure hydroxyliert wird. Das aktivierte hydroxylierte Cumaryl-Coenzym A reagiert schließlich mit drei Molekülen Malonyl-Coenzym A unter Bildung des zweiten aromatischen Ringes zu einem Chalkon. Dieses wird nach Ringschluss in ein Flavanon umgewandelt. Der letzte Schritt der Synthese läuft über eine 1,2-Aryl-Wanderung durch die Isoflavon-Synthase zu den Isoflavonen ab. So entsteht zum Beispiel das Isoflavon Genistein aus dem Flavanon Naringenin (Griesebach und Barz, 1969).

Isoflavone sind vornehmlich in der Familie der Fabaceae, ebenfalls bekannt als Schmetterlingsblütler oder Hülsenfrüchte, zu der auch Rotklee und Soja gehören, zu finden. Dies lässt sich vermutlich damit begründen, dass das für den letzten Schritt der Biosynthese essentielle Enzymsystem, die oben erwähnte Isoflavon-Synthase, nur von wenigen Pflanzenarten gebildet werden kann (Coward et al., 1993). Isoflavone in den Wurzeln von Fabaceae sind in der Lage, mithilfe von symbiotischen Knöllchenbakterien (Rhizobien) Stickstoff aus dem Boden aufzunehmen, diesen zu löslichen, für die Pflanze verwertbaren Ammoniumverbindungen zu reduzieren und für die Bildung von Proteinen zu gebrauchen (Young and Johnston, 1989). Diese Fähigkeit macht man sich bei der sogenannten Gründüngung zur Verbesserung des Bodens im ökologischen Landbau zunutze. Darüber hinaus werden Isoflavone als Folge einer Infektion der Pflanze mit Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilzen synthetisiert, um deren Ausbreitung und Vermehrung zu hemmen. Sie zählen damit zu den Phytoalexinen, einer Gruppe von niedermolekularen, antimikrobiellen Naturstoffen (Ahuja et al., 2012).

2. Verbreitung in Futter- und Lebensmitteln

2.1 Bedeutung von Sojabohne und Rotklee

2.1.1 Die Sojabohnenpflanze

Die Sojapflanze zählt zu den bedeutendsten Kulturpflanzen der Erde mit einer enormen wirtschaftlichen Bedeutung. Seit mehreren tausend Jahren wird sie bereits in China angebaut, gelangte schließlich 1765 durch Samuel Bowen nach Nordamerika, wo sie nach dem 1. Weltkrieg ihre stärkste Anbauausdehnung erfuhr. In Europa wurde sie ab der Mitte des 18. Jahrhunderts kultiviert, erlangte aber nie eine große Bedeutung, da die Erträge aufgrund des vorherrschenden Klimas unzureichend ausfielen.

Von den USA ausgehend dehnte sich der Sojabohnenanbau stetig weiter nach Süden aus, so dass heute Brasilien und Argentinien neben den USA als wichtigste Erzeugerländer gelten. Die ursprünglichen Anbauländer China, Japan und Korea kultivieren hauptsächlich für den Eigenbedarf.

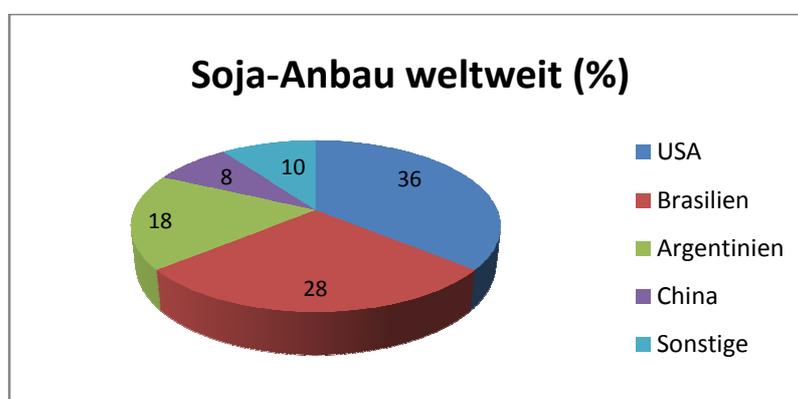


Abb. 2: Hauptanbauländer für Soja (Quelle: Wilson, 2008)

Die Sojabohne wird auf 6% der weltweit landwirtschaftlich genutzten Fläche angepflanzt und gilt als global bedeutendste Ölpflanze, da mehr als die Hälfte des Marktanteils auf dem Weltmarkt auf das aus den Bohnen produzierte Pflanzenöl mit einem volkswirtschaftlichen Wert von 50 Milliarden USD\$ entfällt. Die weltweite Ernte 2008 belief sich auf über 200 Mio. t mit einer gesamten Anbaufläche von über 98 Mio. ha (Wilson, 2008).

Einleitung

Bei der Stammpflanze *Glycine max* (L.) MERR. handelt es sich um eine einjährige Pflanze aus der Familie der Hülsenfrüchte (Fabaceae), die mit rund 20000 Arten eine der größten der Samenpflanzen darstellt. Der Name der Familie ergab sich aufgrund der für sie typischen Fruchtform ihrer Vertreter, der Hülse. Je nach Züchtung und Anbaubedingungen ergeben sich verschiedene Varietäten, die an die entsprechenden Klimabedingungen im Anbaugebiet angepasst sind. So sind deshalb auch die morphologischen Eigenschaften mitunter recht unterschiedlich, am häufigsten sind aufrecht wachsende, strauchige Sorten mit 20-80 Zentimeter Wuchshöhe zu finden, es gibt aber auch Sorten mit bis zu zwei Meter Höhe.



Abb. 3: Soja im Blühzustand und mit reifen Früchten.

(Quelle: links: <http://browse.deviantart.com/?qh=§ion=&q=Soy+before+harvest#/d2vly1d>;

rechts: <http://browse.deviantart.com/photography/?order=9&q=Soy+ice&offset=24#/doe7u3>)

Die dünnen Stängel sind verzweigt und ebenso wie die Blattstiele und Blätter mit feinen, dichten Haaren bedeckt. Die Blätter sind langstielig und bestehen aus drei unpaarig gefiederten, eiförmige Blättchen. Sie werden bereits während der Reifung der Hülsen abgeworfen. Die kleinen, unauffällig weiß oder violett gefärbten Blüten entspringen den Blattachseln in Büscheln. Die Blüte der Fabaceae wird aufgrund ihres Aufbaus aus einer Fahne, zwei Flügeln und dem aus zwei Blütenblättern zusammengewachsenen Schiffchen als Schmetterlingsblüte bezeichnet. Nach der Selbstbefruchtung entwickeln sich aus den Blüten zwei bis zehn Zentimeter große, ebenfalls behaarte Hülsen, die zwei bis fünf rundliche Samen von strohgelber oder schwarzbrauner Farbe enthalten. Charakteristisch für die Sojabohne ist ihre bis zu zwei Meter tief wachsende Pfahlwurzel, deren Seitenwurzeln mit dem sojaspezifischen Knöllchenbakterium *Rhizobium japonicum* besiedelt sind. Dieses lebt mit der Sojapflanze in der bereits erwähnten Symbiose.

Einleitung

Sojabohnen enthalten mit ca. 18% Öl zwar nur halb so viel wie Raps, jedoch steigt die Nachfrage in westlichen Industrienationen jährlich an. Durch ihren hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure, Sojalecithin, Tocopherolen und das bei Pflanzenölen fehlende Cholesterin findet es im Lebensmittelsektor als Salatöl sowie Bestandteil in der Margarineherstellung eine breite Verwendung. Weiterhin geht ein steigender Teil des Sojaöls in die Biodieselproduktion. Der verbleibene Presskuchen wird aufgrund seines hohen Eiweißgehaltes zur Tierfütterung, vor allem von Geflügel, Rindern und Schweinen, genutzt (Hartman et al., 2011).

Mit 30-40% Eiweiß besitzt die Sojabohne soviel wie keine andere Pflanze, darüber hinaus ist die Eiweißqualität vergleichbar mit der von tierischem Eiweiß. Die Proteinzusammensetzung und das Vorhandensein von allen essentiellen Aminosäuren macht sie zu einem effektiven Proteinlieferanten für die menschliche Ernährung. Ebenfalls positiv ist der rund 5% hohe Mineralstoff- und Vitamingehalt sowie 22% an Ballaststoffen. Bei der Verarbeitung von Lebensmitteln weist das Sojaprotein diverse funktionelle Eigenschaften auf wie Gelbildung, Viskositätserhöhung und aufgrund der ebenfalls beinhalteten Saponine Schaumbildung, das Sojalecithin besitzt eine Emulgatorwirkung, so dass diese als Rezepturkomponenten in diversen Produkten wie Fleischerzeugnisse, Backwaren, Getränken und Speiseeis gebraucht werden.

Nur ein Anteil von ungefähr 3% des angebauten Sojas wird zur Produktion von vegetarischen Lebensmitteln wie Tofu, Sojasauce und Sojamilch verwendet. Durch Fermentation mithilfe von Bakterien erhält man Produkte wie das in der japanischen Küche beliebte Miso und Natto. Zudem dienen die grünen Hülsen in asiatischen Ländern auch direkt der menschlichen Ernährung.

Isoflavone lassen sich zwar in nennenswerten Mengen neben Rotklee und Luzerne fast ausschließlich in Soja finden, sind aber durch die breite Verwendung in der Lebensmittelindustrie in einer großen Anzahl an Lebensmitteln nachweisbar. Die drei Hauptvertreter an Isoflavonen Daidzin, Genistin und Glycitin liegen glykosidisch gebunden vor. Im Reifezustand der Bohnen lassen sich vor allem 6''-O-Malonyl-7-O-β-D-Glucoside und 7-O-β-D-Glucoside nachweisen, der Anteil an Aglyka ist verhältnismäßig gering. Bei der Verarbeitung der Sojabohnen unter Hitzeeinfluß wie z.B. beim Rösten entstehen aus den Malonylglucosiden durch Decarboxylierung 6''-O-Acetyl-7-O-β-D-Glucoside (Wiseman et al., 2002). In den fermentierten Produkten hingegen entstehen durch die Einwirkung der bakteriellen Enzyme die Aglyka (Coward et al., 1993).

Zudem konnte in dem Fermentationsprodukt Tempeh eine Umwandlung des 5-Hydroxyisoflavones Genistin zu polyhydroxylierten Reaktionsprodukten mit zusätzlichen OH-Gruppen an Position C-6 oder C-8 beobachtet werden (Klus und Barz, 1998).

Einleitung

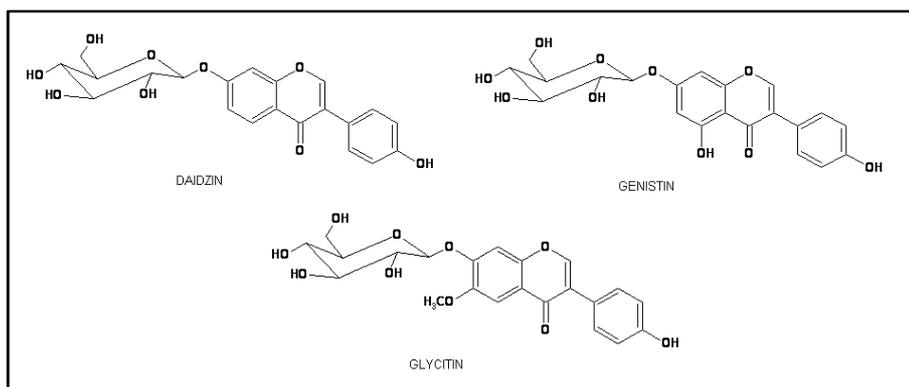


Abb. 4: Strukturformeln der Isoflavone Daidzin, Genistin und Glycitin

2.1.2 Rotklee

Die Gattung *Trifolium* gehört ebenfalls zur Familie der Fabaceae und umfasst rund 240 Arten. Bereits im frühen Christentum wurde Klee laut Überlieferungen in Vorderasien kultiviert. Für den Anbau von Wiesenklee (*Trifolium pratense* L.) in Europa gibt es ab dem 4. Jahrhundert Belege. In den USA wurden im Jahre 1953 15 verschiedene Kleearten kommerziell als Futtermittel angebaut (Hermann, 1953). Heute ist der Klee auf allen Kontinenten außer Australien und der Antarktis natürlich beheimatet. Wegen seines hohen Gehalts an Eiweiß ist er in der Landwirtschaft sowohl in Europa als auch Nordamerika weit verbreitet und besitzt eine große ökonomische Bedeutung. Klee kann dabei als Grünfutter benutzt werden, aber auch nach Silierung, sprich in konservierter Form nach der Vergärung mit Milchsäurebakterien, oder als getrocknetes Kleeheu verfüttert werden.

Weiterhin findet der Wiesen-Klee zur Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit durch seine Fähigkeit, an den Wurzeln Stickstoff zu binden mithilfe von *Rhizobium trifolii*, Verwendung. Dadurch konnte auf Anzuchtwiesen der Verbrauch an stickstoffhaltigem Dünger um zwei Drittel gesenkt werden, was zu einer geringeren Belastung der Gewässer führt (Boller et al., 2010).

In der traditionellen chinesischen Medizin wird *Trifolium pratense* bei Hauterkrankungen und zur Behandlung von Krebsleiden eingesetzt (Duke und Ayensu, 1984).

Einleitung

Der Wiesen-Klee ist eine mehrjährige krautige Pflanze mit einer Wuchshöhe von 15-50 cm. Die aufrecht oder aufsteigend wachsenden Stängel sind kahl bis schwach behaart mit wechselständigen, dreiteiligen Fiederblättern. Der lateinische Name *Trifolium* nimmt darauf Bezug. Die Blätter weisen eine elliptische Form auf mit einem charakteristischen hellen Fleck auf der Oberseite. Es bilden sich vielblütige, kopfige Blütenstände von rosa bis violetter Farbe aus mit einem Durchmesser von 2-3 cm. Nach der Befruchtung der nektarführenden Schmetterlingsblüten durch langrüsslige Insekten entwickeln sich einsamige Hülsen.



Abb. 5: Wiesen-Klee. (Quelle: <http://browse.deviantart.com/photography/nature/?order=9&q=%22red+clover%22&offset=24#/d2bxfbm>)

Die verschiedenen Kleearten sind zwar als wertvolle Futterpflanzen weit verbreitet, es können jedoch in Abhängigkeit von Klima und Wetter sowie der verfütterten Menge vor allem Rinder durch nassen Klee Schaden nehmen. So enthält Klee Thiocyanate, welche phototoxische Reaktionen der Haut auslösen. Weiterhin können Krämpfe, Fruchtbarkeitsstörungen und vermehrt Aborte auftreten, bei Rindern und Schafen besteht zudem die Gefahr von Gasansammlungen im Magen (Tympenie). Diese Erkrankung wird als Trifoliose oder Kleekrankheit bezeichnet. Darüber hinaus stehen die Phytoestrogene, vor allem die Isoflavone, in dem Verdacht, Fruchtbarkeitsstörungen auszulösen, so gab es unter anderem Beobachtungen diesbezüglich bei australischen Schafen (Adams, 1976).

Die beiden Isoflavone Formononetin und Biochanin A stellen die Hauptkomponenten im Rotklee dar. Sie sind die 4'-O-Methyl-derivate von Daidzein und Genistein, die in glycosidischer Form in Soja zu finden sind. Daidzein und Genistein gehören ebenso zu den geringer konzentrierten Verbindungen im Wiesenklee wie Glycitein.

Einleitung

Im Unterschied zu Soja liegen fast alle Isoflavone nach der Aufarbeitung als Aglyka vor, den Großteil unter den Zuckerverbindungen nehmen Ononin und Sissotrin, die 7-O-Glucoside von Formononetin und Biochanin A, ein. Bei der Ernte kommt es durch das Enzym β -Glucosidase zur Spaltung der glykosidischen Bindung und damit zu einer relativ schnellen Bildung der Aglyka (McMurray et al., 1986).

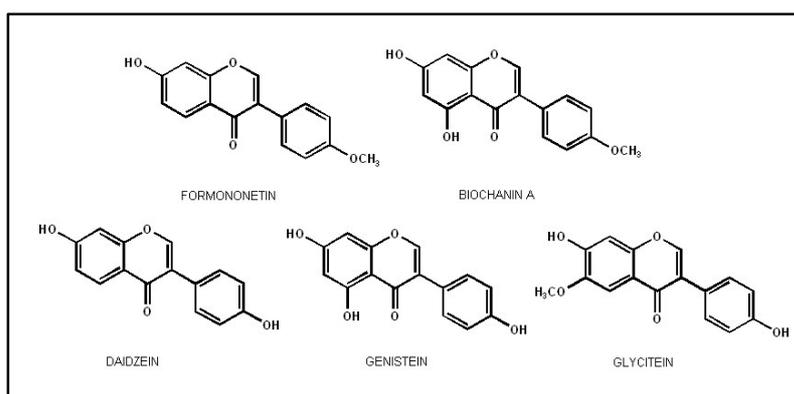


Abb. 6: Wichtigste Vertreter der Isoflavone in Rotklee

3. Bioverfügbarkeit und Metabolismus der Isoflavone

Soja spielt in der asiatischen Ernährung eine bedeutende Rolle. Die tägliche Aufnahme an Isoflavonen unterscheidet sich dabei deutlich je nach Art und Zusammensetzung der eingenommenen Lebensmittel und wird auf ca. 40 mg pro Tag/Kopf geschätzt (Arai et al., 2000). So liegen die Isoflavone in der Sojabohne als Glykoside vor, in den hauptsächlich verzehrten Lebensmitteln wie Tofu oder Miso durch die bakterielle Fermentation als Aglyka (vergleiche 2.1.1). Die Aufnahme in Europa und den USA fällt deutlich geringer aus, sie liegt zum Beispiel in Großbritannien bei 3 mg pro Tag/Kopf (Clarke und Lloyd, 2004) und in den USA bei ca. 1 mg pro Tag/Kopf (Chun et al., 2009). Die Zufuhr kommt vornehmlich durch prozessierte Lebensmittel wie Wurstwaren und Backwerk zustande. Bei vegetarischer Ernährung treten je nach Nahrungsgewohnheiten deutlich höhere aufgenommene Mengen auf, sie liegen im Schnitt bei 16 mg pro Tag/Kopf (Sathyapalan et al., 2011). Bei Fütterung mit Säuglingsnahrung auf Soja-Basis wird etwa eine Menge von 0,7 mg/kg Körpergewicht pro Tag zugeführt. Diese Dosis entspricht in Bezug auf das gesamte Körpergewicht der zehnfachen Menge an Isoflavonen, die bei prämenopausalen Frauen zu einer Verlängerung des Menstruationszyklus führt.

Einleitung

Ebenso liegt sie deutlich über der üblichen Zufuhr von japanischen Erwachsenen (Setchell et al., 1997). Vergleicht man die Werte für sojabasierte Säuglingsmilch und Muttermilch bei traditioneller asiatischer Lebensweise, so fallen zweitens sehr niedrig aus (Setchell, 1998).

Die meisten Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit liegen bisher für Daidzin und Genistin vor, zu Glycitin sowie den Isoflavonen aus Rotklee gibt es bislang nur eine limitierte Datenmenge. Isoflavone allgemein werden recht schnell vom Körper resorbiert, so war nach einmaliger Gabe von Sojaprotein bereits nach 15 Minuten ein Anstieg im Plasma nachweisbar mit einer maximalen Konzentration nach 6-8 Stunden. Nach 24 Stunden war der Plasmaspiegel wieder auf den Ausgangswert gefallen (Rowland et al., 1999).

Die Aufnahmeprozesse differieren zwischen Aglyka und Glucosiden aufgrund der unterschiedlichen Hydrophilie. So konnten Rüfer und Mitarbeiter (2008) in einer randomisierten Humanstudie mit Crossover-Design feststellen, dass die Resorption von Daidzein vom Darm in die Blutbahn durch einen Transport in Chylomikronen zu erfolgen scheint. Die Aufnahme in die Dünndarmzellen geschieht bei den lipophilen Aglyka durch passive Diffusion. Für die Glykoside werden mehrere Resorptionswege diskutiert. Es wurde angenommen, dass sie erst im Dickdarm mithilfe von bakteriellen Hydrolasen gespalten und resorbiert bzw. metabolisiert werden. Inzwischen ist aber bekannt, dass die Abspaltung des Zuckerrestes bereits im Dünndarm durch zelluläre Glucosidasen erfolgen kann (Day et al., 2000). Bei Versuchen an isolierten Rattendärmen zeigte sich, dass Genistin wahrscheinlich, falls es nicht hydrolysiert wurde, entweder über aktive Transporter in die Zellen der Darmmukosa aufgenommen wird oder durch eine intrazelluläre Hydrolyse gespalten als Aglykon vorliegt (Andlauer et al., 2000a und 2000b). Nach ihrer Glucuronidierung oder Sulfatierung gelangen die Isoflavone anschließend in die Pfortader und von dort zur Leber.

Die nichtresorbierten Isoflavone gelangen in den Dickdarm und können dort durch Darmbakterien reduktiv metabolisiert werden. Es entstehen verschiedene Stoffwechselprodukte. So wird Daidzein zu Dihydrodaidzein reduziert, welches unter Spaltung des einen Ringes in *O*-Demethylangolensin oder durch Dehydroxylierung in Equol überführt wird (siehe Abbildung 7). Der Name Equol stammt daher, dass dieser Stoff zum ersten Mal aus dem Urin von Stuten isoliert werden konnte. Die Bildung von Equol unterliegt starken interindividuellen Unterschieden und ist vor allem von der Zusammensetzung der Darmflora abhängig. So sind nur ungefähr ein Drittel der Menschen in der Lage, aus Daidzein Equol zu bilden (Heinonen et al., 2003).

Einleitung

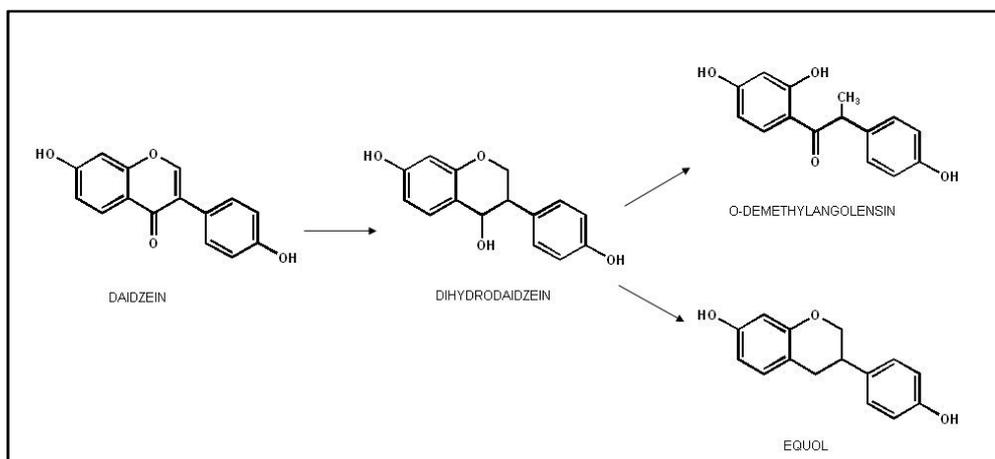


Abb. 7: Metabolische Umwandlung von Daidzein durch Dickdarmbakterien

Der Metabolisierungsweg von Genistein verläuft über die Bildung von Dihydrogenistein zu 6'-Hydroxy-O-demethylangolensin. Daraus wird jedoch kein Equolderivat gebildet, vielmehr wird es weiter abgebaut über 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure zu *para*-Ethylphenol (Abbildung 8).

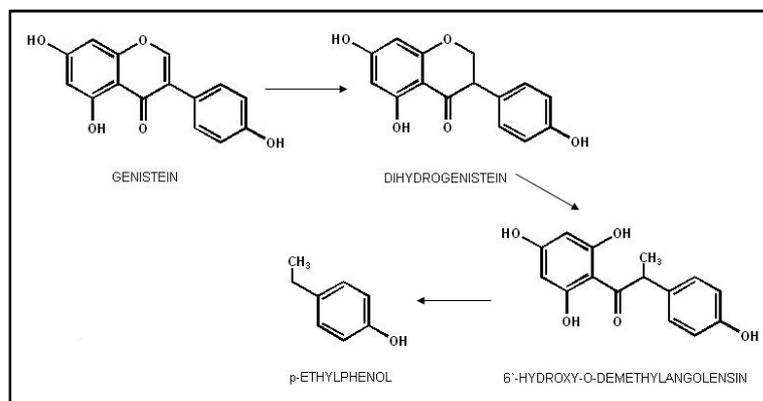


Abb. 8: Abbau von Genistein durch die Mikroflora des Darms

Bei Glycitein scheint zunächst eine Demethylierung zu 6-Hydroxydaidzein zu erfolgen und daraufhin ein analoger Abbau wie beim Daidzein stattzufinden (Heinonen et al., 2003). Diese Metabolite können anschließend ebenfalls absorbiert werden. Sie gelangen in freier Form oder konjugiert über den Pfortaderkreislauf zur Leber, wo sie zum Großteil glucuronidiert oder sulfatiert, teilweise auch hydroxyliert und anschließend methyliert werden, so dass sich eine ganze Reihe an Metaboliten ergeben.

Einleitung

Für Biochanin A und Formononetin konnte an einem humanen Lebermikrosomen-Modell gezeigt werden, dass diese durch Demethylierung in Genistein und Daidzein umgewandelt werden. Weiterhin entstehen noch diverse Hydroxylierungsprodukte (Tolleson et al., 2002).

Die Ausscheidung erfolgt je nach Molekülgröße und Eigenschaften hauptsächlich renal, zu einem kleinen Teil biliär. Die biliäre ausgeschiedenen Metabolite werden durch die Darmflora erneut in die entsprechenden Aglyka gespalten, die wieder absorbiert und metabolisiert werden können, sie unterliegen somit einem enterohepatischen Kreislauf (Atkinson et al., 2005). Ein Teil an Isoflavonen und Metaboliten wird nicht absorbiert und unverändert über die Faeces ausgeschieden.

4. Physiologische Wirkungen der Isoflavone

4.1 Hormonartige und hormonunabhängige Wirkungen

Vor einigen Jahren gab es Untersuchungen, dass sich bei Japanerinnen, die in die USA auswanderten, das Risiko für hormonabhängige Krebsarten nicht signifikant veränderte. Bei der Tochtergeneration jedoch erhöhte sich das Risiko auf die amerikanische Inzidenzrate. Erklärt wurde dies damit, dass die positiven gesundheitlichen Effekte offenbar nicht genetisch bedingt sind, sondern an der Ernährung liegen, welche sich bei den Töchtern bereits an ihr neues Heimatland angepasst hatte (Shimizu, 1991). Diese Beobachtungen weckten ein breites Interesse in der westlichen Welt und führten zu einer enormen Werbung für Präparate auf Soja-Basis auf dem europäischen Markt.

Nach Angaben der deutschen Krebsgesellschaft lag die Häufigkeit von Brustkrebsneuerkrankungen 2008 bei 71.660 Fällen. Damit stellt Brustkrebs bezogen auf alle Krebserkrankungen immernoch die häufigste Krebsart dar. Nur zu ungefähr 8% sind genetische Ursachen wie z.B. eine Mutation des Tumorsuppressorgens BRCA 1 dafür verantwortlich (Hall et al., 1990). Vielmehr spielen neben Alter und Lebensgewohnheiten Sexualhormone wie die Estrogene eine entscheidende Rolle.

Der wichtigste Vertreter, das 17- β -Estradiol, wird in den Ovarien gebildet und regelt unter anderem den weiblichen Zyklus, die Ausbildung der weiblichen Geschlechtsmerkmale und die Hemmung der osteoklastären Knochenresorption. Daher kann ein verminderter Estrogenspiegel zu Osteoporose führen. Andererseits scheint aber mit längerer Wirkung von Estrogen auf das Brustgewebe, das Erkrankungsrisiko für Brustkrebs anzusteigen. Sie sind aber offensichtlich nicht an der Induktion eines Karzinoms beteiligt, wohl aber an der Promotion (Dragan et al., 1991).

Einleitung

Estradiol entfaltet seine Wirkung im Körper über die Interaktion mit Steroidrezeptoren, die zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren zu rechnen sind. Bei einem Kernrezeptor handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der durch die Bindung von Estradiol als Liganden in der Lage ist, an die DNA der entsprechenden Zelle zu binden und dadurch die Transkription von Genen auszulösen oder zu unterdrücken. Die beiden humanen Subtypen ER_{α} und ER_{β} liegen im Cytosol der Zelle vor und wandern nach Ligandenbindung in den Zellkern. Die Verteilung der beiden Rezeptoren fällt im Körper unterschiedlich aus. So findet sich ER_{α} hauptsächlich in Brustgewebe und Uterus, wohingegen ER_{β} in den Eierstöcken, den Hoden und der Prostata sowie im Gastrointestinaltrakt anzutreffen ist. Beide Rezeptortypen werden unterschiedlich reguliert und scheinen verschiedene biologische Aufgaben auszuüben (Gustafsson, 2000).

Die Bindung von Isoflavonen an Estrogenrezeptoren kommt durch ihre strukturelle Ähnlichkeit mit Estradiol zustande (siehe Abbildung 9). So ist der Abstand zwischen den beiden aromatischen OH-Gruppen an C-7 und an C-4' der Isoflavone nahezu identisch mit dem Abstand der beiden Hydroxylgruppen an C-3 und C-17 von 17β -Estradiol (Setchell und Cassidy, 1999). Während aber Estradiol zu beiden Estrogenrezeptor-Subtypen eine große Affinität besitzt, binden die Isoflavone mit einer deutlich geringeren Potenz unterschiedlich stark an ER_{α} und ER_{β} . Da sie dabei sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte auslösen können, werden sie als selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren, kurz SERM, bezeichnet.

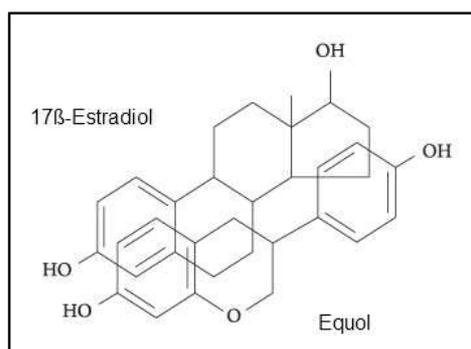


Abb. 9: Strukturähnlichkeit von Estradiol und Isoflavonen am Beispiel von Equol

Genistein bindet 20-fach stärker an ER_{α} als an ER_{β} . Im Vergleich zu 17β -Estradiol beträgt die Bindungsaffinität an ER_{β} 87%. Bei Daidzein liegt die Bindungsaffinität an beiden Subtypen bei unter 1% der von 17β -Estradiol (Kuiper et al., 1998).

Einleitung

Der durch die Dickdarmbakterien erzeugte Metabolit von Daidzein S-Equol besitzt eine vergleichbare Affinität zu ER_{β} wie Genistein, das R-Enantiomer bindet dagegen schwächer und vorrangig an ER_{α} (Muthyala et al., 2004).

Trotz dieser relativ geringen Affinität der Isoflavone zum Estrogenrezeptor im Vergleich zu 17β -Estradiol können sie je nach Art und Konzentration ihre estrogene und antiestrogene Wirkung ausüben, da die physiologische Plasmakonzentration von 17β -Estradiol bei 1/100 bis 1/1000 der der Isoflavone je nach Zykluszeitpunkt liegt (Bingham et al., 1998).

Die Phytoestrogene können weitere Einflüsse auf das Hormonsystem entfalten, die unabhängig von den Estrogenrezeptoren verlaufen. So induzieren sie in der Leber die Synthese von SHBG (Sexhormon-bindendes Globulin), wodurch Estrogene damit vermehrt eine Bindung eingehen. Sie liegen in gebundener Form inaktiviert vor, woraus ein antiestrogener Effekt resultiert (Mousavi und Adlercreutz, 1993). Die Isoflavon-Aglyka können dagegen durch die Bindung an SHBG ihrerseits die Estrogene aus ihrer Plasmaprotein-Bindung verdrängen, so dass sich ihre Konzentration im Blut erhöht (Martin et al., 1995). Durch die Inhibition der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, einem Enzym der Geschlechtshormon-Biosynthese, kommt es ebenfalls indirekt zu einer verminderten Wirkung der Sexualhormone (Deluca et al., 2005). Da diese Effekte allerdings nur in vitro beobachtet werden konnten, stellt sich die Frage nach der klinischen Relevanz, vor allem aufgrund der bisher uneinheitlichen Studienlage am Menschen (Knight und Eden, 1995; Cassidy, 2004; This et al., 2011).

Besonders für Genistein wurden vielfältige hormonunabhängige, physiologische Wirkungen beschrieben. So konnte durch eine Genistein-Gabe bei neonatalen Ratten eine signifikante Reduktion im Brustkrebs-Tumorwachstum, welches vorher chemisch induziert worden war, im erwachsenen Stadium beobachtet werden. Die im Tiermodell zugeführte Menge an Genistein entsprach der üblichen Tagesdosis an Isoflavonen durch Sojaprotein-haltige Nahrungsmittel in asiatischen Ländern. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass durch die frühe Zufuhr von Phytoestrogenen ein Vorteil für das spätere Leben möglich wäre (Lamartiniere et al., 1995). Weiterhin stellt Genistein einen spezifischen Inhibitor von Tyrosin-spezifischen Proteinkinasen (Akiyama et al., 1987) und der DNA Topoisomerasen I und II (Okura et al., 1988) dar. Traganos et al. zeigten 1992, dass Genistein in der Lage ist, in den Zellzyklus von humanen lymphatischen Leukämie MOLT-4 Zellen einzugreifen und deren Wachstum zu hemmen. Als weitere Wirkungen werden antiangiogenetische Aktivitäten beschrieben (Yanagihara et al., 1993) sowie die Hemmung von Cytokinen und Wachstumsfaktoren (Wilcox und Blumenthal, 1995; Kim et al., 1998), was für einen positiven Nutzen von Isoflavonen zur Krebsprävention sprechen würde.

Einleitung

Bei der Untersuchung der Proliferation von MCF-7 Brustkrebszellen zeigte sich, dass diese durch die Behandlung mit dem Blut menopausaler Frauen, die zuvor mit Isoflavonen behandelt wurden, signifikant geringer wuchsen (Imhof et al., 2008). In einer großen Fallkontroll-Studie wurde darüber hinaus beobachtet, dass die Zufuhr von Hülsenfrüchten indirekt proportional zu der Inzidenz von Prostatakrebs zu stehen scheint (Kolonel et al., 2000).

Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die auf keine bzw. sogar negative Wirkungen der Isoflavone hindeuten. So konnte in der EPIC Norfolk Studie kein Zusammenhang zwischen aufgenommener Phytoestrogenmenge und dem Brustkrebsrisiko gefunden werden (Ward und Kuhnle, 2010). In einem experimentellen Tier-Modell traten nach der Gabe von Genistein bei neugeborenen Mäusen bei einem Drittel der Tiere Adenokarzinome auf. Die Autoren schlossen daraus, dass die Anwendung von sojabasierter Säuglingsnahrung beim Menschen noch genauer untersucht werden sollte (Newbold et al., 2001).

4.2 Antioxidative und antiproliferative Eigenschaften

Aufgrund ihrer Struktur sind Isoflavone in der Lage, als „Radikalfänger“ zu fungieren und Metallionen zu komplexieren. Sie stellen damit wichtige Antioxidantien dar, die Lipide vor Oxidation und die DNA vor UV-Schäden schützen. „Freie Radikale“, auch „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) genannt, entstehen bei vielen körpereigenen Reaktionen und dienen unter anderem den neutrophilen Granulozyten als aggressive Waffe gegen Mikroorganismen und Viren. Sie können aber auch Zellschäden verursachen, was unter anderem zur Entstehung von Krebs beitragen kann. Zu den „Free Radical Diseases“ zählen weiterhin Erkrankungen des kardiovaskulären Systems wie Arteriosklerose und Bluthochdruck sowie neurodegenerative Krankheiten (Alzheimer, Parkinson). Zum Schutz vor ihrer Wirkung nutzt der menschliche Körper zahlreiche Enzymsysteme und Abwehrmechanismen, darunter unter anderem die Glutathionperoxidase, Vitamin A und C, Coenzym Q10, Flavonoide und Anthocyane. *In vitro* zeigten sich Isoflavone als potente Inhibitoren der Lipidperoxidation (Jha et al., 1985) und konnten durch UV-Strahlung verursachte DNA-Schädigungen verhindern (Wei et al., 1996).

Durch die Bindung von Metallionen kann unter anderem verhindert werden, dass diese an Apolipoprotein B binden, welches für die Oxidation von LDL nötig ist. Oxidiertes LDL wird als eine Ursache für Arteriosklerose betrachtet, da es von den Makrophagen in den Arterienwänden aufgenommen wird und sich dadurch Schaumzellen bilden.

Einleitung

Inwieweit die einzelnen Isoflavone ihre antioxidative Wirkung entfalten können, wird maßgeblich durch ihren chemischen Aufbau beeinflusst. So ist die antioxidative Kapazität bei Formononetin und Biochanin A aus Rotklee aufgrund ihrer Methoxy-Gruppe erniedrigt, das gleiche gilt für eine Glykosylierung an den Hydroxygruppen. Eine freie Hydroxylgruppe an C-4' hat einen größeren Einfluß auf die antioxidativen Eigenschaften des Moleküls als die am C-7. Die Phase-I-Metabolite der Muttersubstanzen weisen eine vergleichbare Kapazität wie diese auf. Zu bedenken ist darüber hinaus, dass ein großer Teil an Isoflavonen im Körper als Metabolite vorliegt, wodurch sich wiederum ein geringeres antioxidatives Potential ergibt.

Die Studien zu Aussagen hinsichtlich der *in vivo* Wirkung sind auch hier recht widersprüchlich. Djuric et al. fanden 2001 in einer Untersuchung am Menschen heraus, dass durch die Gabe von Soja-haltigen Nahrungsergänzungsmitteln die Menge an 5-OHmdU, ein Marker für oxidativen Stress der DNA, im Blut um 61% gesenkt werden konnte. Weitere Untersuchungen zeigten geringere Konzentrationen an oxidiertem LDL nach Einnahme von Müsliriegeln mit Soja (Tikkanen et al., 1998). Die Gabe eines Genistein-reichen Isoflavonextraktes konnte die Plasmakonzentration von Homocystein bei den Probanden senken. Erhöhte Werte für Homocystein im Blut können einen Schaden der Blutgefäße zur Folge haben und stehen in einem engen Zusammenhang mit altersbedingten Demenzerkrankungen (Chen et al., 2005). Im Gegensatz dazu gab es aber auch zahlreiche Studien, die keinen antioxidativen Nutzen der Isoflavone belegen konnten (Hodgson et al. 1999; Samman et al., 1999; Vega-Lopez et al., 2005).

Damit ergibt sich die Frage, ob die Isoflavone überhaupt ausreichende antioxidative Effekte aufweisen oder ob die *in vivo* Wirkungen vielleicht auf andere Bestandteile wie Enzyme oder Vitamine zurückzuführen sind.

4.3 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Basierend auf dem "World Health Statistics Annual" des National Heart, Lung and Blood Institute aus dem Jahre 2001 lag die Mortalitätsrate verursacht durch koronare Herzkrankheiten in Japan für beide Geschlechter auf dem niedrigsten Wert der Industrieländer. Im Vergleich zu Osteuropa und Skandinavien wies sie nur 1/8 und zu den USA 1/5 der Rate auf. Zusammen mit den Untersuchungen, die eine Senkung des oxidativen Stresses durch Isoflavone zeigten, führte dies zur Schlussfolgerung, dass Isoflavone einen protektiven Effekt bezüglich arteriosklerotisch bedingter Herzerkrankungen haben könnten.

Einleitung

In einer Meta-Analyse von elf randomisierten Studien, die zwischen 1990 und 2006 veröffentlicht wurden, wurde der Effekt der Sojaproteinaufnahme beim Menschen verglichen. Dabei ergab sich, dass Soja-Isoflavone die totale und die LDL-Serumkonzentration an Cholesterol senken, aber keinen Einfluss auf das HDL-Cholesterol und die Triglyceride haben. Außerdem konnte mit Isoflavonen angereichertes Sojaprotein die Blutfettwerte signifikant reduzieren. Die Verbesserung der LDL-Cholesterolwerte war bei Menschen mit Hypercholesterolämie größer als bei denjenigen mit normalen Werten (Taku et al., 2007). Bereits im Oktober 1999 wurde von der FDA aufgrund vorhergehender Untersuchungen ein „Soy Health Claim“ zugelassen, der Nahrungsmittelherstellern erlaubt, Sojaprotein als Teil der täglichen Ernährung mit einer vorbeugenden Wirkung bei KHK zu bewerben.

In einer weiteren Übersichtsarbeit wurde genauer untersucht, inwiefern die beobachteten positiven Einflüsse der Sojaeinnahme auf das Sojaprotein oder die Isoflavone zurückzuführen sind. Es konnte lediglich eine geringe, aber signifikante Reduktion des LDL-Plasmaspiegels erreicht werden, wobei die dafür nötige Menge von 50 g Sojaprotein pro Tag mit der halben üblichen Tagesdosis an Proteinen sehr hoch war. Die anderen Blutfettwerte blieben unbeeinflusst. Die Isoflavone selbst zeigten keinen signifikanten Effekt. Deshalb sahen die Autoren auch keinen Erfolg aufgrund der Isoflavone und nur einen geringen Anteil des Sojaproteins daran, sondern die Schutzwirkung eher in dem hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Ballaststoffen und Vitaminen begründet (Sacks et al., 2006).

4.4 Menopausale Beschwerden

Mit der Menopause endet ausgelöst durch die nachlassende Estrogenproduktion der Eierstöcke die Fruchtbarkeit der Frau. Das Durchschnittsalter dafür liegt in Deutschland momentan bei 52 Jahren. Da die Menopause physiologisch stattfindet, ist sie in der Regel nicht behandlungsbedürftig. Allerdings kommt es besonders zu Beginn dieser Phase zu Hitzewallungen, Haarausfall, Schlafstörungen und Stimmungsschwankungen. Im weiteren Verlauf steigt aufgrund der abnehmenden Knochendichte die Osteoporosegefahr an. Hierzulande sind mehr als 25% der postmenopausalen Frauen von dieser Krankheit betroffen. Weiterhin geht der Abfall der endogenen Estrogenkonzentration mit atrophischen Veränderungen des Endometriums und mit Schleimhauttrockenheit im Genitalbereich einher. Bei stärkeren Beschwerden kann deshalb eine medikamentöse Therapie erforderlich sein, Mittel der Wahl war dabei lange Zeit die Hormonersatztherapie (HET).

Einleitung

Allerdings zeigen die jüngeren Ergebnisse der Women's Health Initiative (WHI) Studie und der Million Women Studie, dass die HET für die meisten Frauen keine große Verbesserung ihrer Lebensqualität bewirkt. Lediglich in der Altersgruppe der 50 bis 54-Jährigen konnten Hitzewallungen und nächtliches Schwitzen reduziert werden. Im gleichen Zug stieg aber auch das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen leicht an und das Thrombose- und Brustkrebsrisiko war erhöht. So musste der Teil der WHI-Studie, in dem die Frauen mit einer Estrogen-Gestagen-Kombination behandelt wurden, nach 5 Jahren abgebrochen werden, da verstärkt Mamma-karzinome, Schlaganfälle und Lungenembolien auftraten. Mit längerer Anwendungszeit nahmen diese Risiken zu. Nach derzeitiger Annahme erkrankt jede hundertste Frau, die mehr als fünf Jahre lang Hormone anwendet, an einer dieser Nebenwirkungen, weshalb das BfArM die medikamentöse Hormonersatztherapie nur noch bei starken Wechseljahres-beschwerden empfiehlt.

Einsatz findet dabei zu Beginn der Menopause nur Gestagen, da durch den beginnenden Progesteronmangel Blutungs- und Zyklusstörungen auftreten. Später kommt zwar der Großteil der Beschwerden durch den Estrogenmangel zustande, es wird aber eine Kombination von Estrogenen und Gestagenen verordnet, da die Gestagene Wucherungen der Gebärmutter Schleimhaut entgegenwirken. Dies ist wichtig, da sich daraus ein Gebärmutterkrebs entwickeln kann.

Die Hormone können als einmal tägliche Tablettengabe oder als alle vier Wochen injizierte Hormonspritze verabreicht werden, wobei der Arzt bei den Tabletten die Möglichkeit hat, die Dosis kurzfristig anzupassen. Weiterhin stehen Pflaster (transdermale therapeutische Systeme) zur Verfügung, die deutlich schonender für den Körper sind, da nur ein Bruchteil der Dosis nötig ist für eine vergleichbare Wirkung wie bei den Tabletten. Bei vornehmlich lokalen Beschwerden wie Entzündungen der Scheide, Juckreiz, Brennen oder Beschwerden beim Wasserlassen werden estrogenhaltige Vaginaltabletten, -cremes oder -zäpfchen in die Scheide eingeführt. Das Estrogen fördert die Durchblutung der Schleimhaut, wodurch Trockenheit und andere Beschwerden reduziert werden. Durch eine intaktere Schleimhaut verringert sich zudem die Infektionsrate im vaginalen Bereich. Da das Estrogen in diesem Fall aber nur örtlich wirksam ist, hat es bei anderen Wechseljahresbeschwerden wie Stimmungsschwankungen und Hitzewallungen keinen Einfluß.

Aufgrund der Sorge vor möglichen schwerwiegenden Nebenwirkungen der HET rückten pflanzliche Alternativen ins Interesse. Dabei lag der Fokus u.a. auf Pflanzen mit Isoflavonen, die als Phytoestrogene mit den Estrogenrezeptoren wechselwirken können. Inzwischen gibt es auch einige klinische Untersuchungen, die sich mit dem Einsatz von Soja und Rotklee befassen.

Einleitung

So wurde in einer randomisierten, doppelverblindeten, Placebo-kontrollierten Studie an 30 Frauen nach zwölf Wochen eine Reduktion von Hitzewallungen um 44% erreicht. Die Frauen der Verumgruppe erhielten dabei 80 mg Isoflavone pro Tag in Form eines standardisierten Extraktes aus Rotklee (Promensil®) (Van de Weijer und Barentsen, 2002). In einer ähnliche Studie wurden postmenopausalen Frauen 60 mg Soja-Isoflavone in Kapselform täglich verabreicht, was nach 6 Monaten zur deutlichen Verminderung des Kupperman Menopausal Index zur Bewertung der Wechseljahresbeschwerden führte. Im Blut der behandelten Frauen waren erhöhte Estradiolspiegel nachweisbar (Nahas et al., 2004). In einer Vergleichsarbeit zu 30 klinischen Studien mit Isoflavonen bei Wechseljahres-beschwerden konnte jedoch keine Signifikanz der Wirkung festgestellt werden. Bemängelt wurde die schlechte methodische Qualität und die zu geringe Teilnehmerinnenanzahl bei dem Großteil der Studien. Zudem war ein starker Placeboeffekt zu beobachten mit Werten zwischen 1% und 59%, da die Verbesserung der Beschwerden ein subjektives Empfinden darstellt und schwierig messbar ist. Wurden die Isoflavone zwei Jahre lang angewendet, war darüber hinaus keine estrogene Stimulation des Endometriums zu sehen (Lethaby et al., 2007).

Aussagen zur Prävention der Osteoporose durch die Zufuhr von Isoflavonen sind schwierig, da es viele *in vitro* Untersuchungen gibt und anhand der durchgeführten Humanstudien wiederum keine Aussagen zur Langzeitwirkung getroffen werden können. So konnte Genistein an Osteoklasten aus Rattenknochen suppressive Effekte auslösen, die für eine Ca^{2+} -vermittelte Apoptose sprachen (Gao und Yamaguchi, 1999). *In vivo* zeigte es bei der Anwendung an 90 postmenopausalen Frauen nach sechs Monaten eine signifikante Erhöhung der Knochendichte von Oberschenkelhals und Lendenwirbelsäule (Morabito et al., 2002). In zwei randomisierten Crossover-Studien konnte nach dreimonatiger Gabe von Sojaproteinisolat ein geringer, aber nicht signifikanter Effekt auf die Marker zur Bestimmung der Knochendichte beobachtet werden (Wangen et al., 2000). Eine andere Studie konnte keine Änderung der Marker für die Knochenneubildung nachweisen, jedoch eine Erniedrigung des Knochenumbaus durch verringerte Werte der urinären Kollagen Typ 1 quervernetzten N-Telopeptide (NTX) (Nikander et al., 2004).

Insgesamt sind die gemessenen Wirkungen allerdings für eine fundierte Beurteilung nicht ausreichend. Die eingesetzten Isoflavone variierten in Art, Menge und Darreichungsform deutlich je nach Studie, ebenso die Untersuchungsmethoden zur Wirksamkeitsbestimmung. So wurde die Knochendichte an verschiedenen Stellen des Körpers gemessen, es wurden unterschiedliche Marker zur Charakterisierung der Osteoporose genutzt. Aus diesen Gründe ist eine einheitliche Bewertung kaum durchführbar.

Einleitung

Außerdem fehlen bislang Langzeitstudien hinsichtlich einer Osteoporoseprävention sowie möglicher unerwünschter Nebenwirkungen, weshalb es momentan verfrüht ist, von einer Schutzwirkung der Isoflavone zu sprechen. Dafür sind weitere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv und längeren Untersuchungszeiträumen notwendig.

5. Nahrungsergänzungsmittel

5.1 Rechtliche Einordnung

Isoflavonhaltige Zubereitungen sind in Form von Nahrungsergänzungsmitteln auf dem deutschen Markt erhältlich. Bei einem NEM handelt es sich nach § 1 der Nahrungsergänzungsmittel-Verordnung (NemV) um ein Lebensmittel, das

- 1.) dazu bestimmt ist, die allgemeine Ernährung zu ergänzen,
- 2.) ein Konzentrat von Nährstoffen oder sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung allein oder in Zusammensetzung darstellt und
- 3.) in dosierter Form, insbesondere in Form von Kapseln, Pastillen, Pillen und anderen ähnlichen Darreichungsformen, Pulverbeuteln, Flüssigampullen, Flaschen mit Tropfeinsätzen und ähnlichen Darreichungsformen von Flüssigkeiten und Pulvern zur Aufnahme in abgemessenen kleinen Mengen, in den Verkehr gebracht wird.

Die Verwendung von „sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung“ ist im Gegensatz zu den „Nährstoffen“ (ausschließlich Vitamine, Nährstoffe und Spurenelemente laut Anhang 1) nicht exakt definiert. Aufgrund dessen werden die Isoflavone in NEM als sonstige Stoffe angesehen, die eine physiologische Wirkung ausüben. Weiterhin sind in der NemV Anforderungen an die Verpackung, die Kennzeichnung sowie die Anzeigepflicht beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit definiert. So muss ein Nahrungsergänzungsmittel in einer Fertigpackung in Verkehr gebracht werden. Die Namen und Kategorien der kennzeichnenden Nährstoffe und sonstigen Stoffe müssen angegeben werden. Darüber hinaus ist die tägliche Verzehrempfehlung zu deklarieren mit dem Hinweis „Die angegebene empfohlene tägliche Verzehrmenge darf nicht überschritten werden.“ Diesem wird bei isoflavonhaltigen Präparaten meist damit Rechnung getragen, dass der Gesamtgehalt an Isoflavonen, teilweise sogar nur die Menge an enthaltenem Extrakt, benannt wird. Selten kommt es zu genaueren Angaben bezüglich Substitutionsgrad und Vorliegen als Glykosid oder Aglykon, was für die Bewertung der physiologischen Wirkung Voraussetzung wäre.

Einleitung

Grundlage der NemV bildete die Umwandlung der EU-Richtlinie 2002/46/EG in nationales Recht. Aufgrund ihrer Zuordnung zu den Lebensmitteln gelten im Übrigen in Deutschland die Regelungen des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) für eine rechtliche Beurteilung. Hier sind alle zusätzlichen Bestandteile hinsichtlich ihrer Zulässigkeit als Lebensmittelbestandteil aufgeführt.

Die Verordnung EG Nr. 1924/2006 („Health-Claims-Verordnung“) legt statthafte Werbeaussagen und –versprechungen fest. Demnach sind krankheitsbezogene Aussagen und Indikationen, wie für alle Lebensmittel, nicht zulässig. Diese Rechtsvorschrift wurde nötig, da sich Nahrungsergänzungsmittel mitunter in einer Grauzone zwischen Lebensmittel und Arzneimittel bewegen. So sind z.B. auf dem US-amerikanischen Markt Produkte erhältlich, die nach deutschem Recht ein Arzneimittel darstellen würden. Sie werden beworben als Erzeugnisse, die angewendet werden, um „entweder die menschlichen physiologischen Funktionen durch eine pharmakologische, immunologische oder metabolische Wirkung wiederherzustellen, zu korrigieren oder zu beeinflussen oder eine medizinische Diagnose zu erstellen“ (2001/83/EG). Aufgrund dieser Deklaration müssten die Zubereitungen als Arzneimittel zugelassen werden, was u.a. einen Wirksamkeitsnachweis verlangen würde. Diese Untersuchungen fehlen aber für Isoflavone bislang in einem großen Rahmen unter definierten Bedingungen, zudem würden auf die Hersteller erhebliche Kosten zukommen, so dass die Vermarktung ihrer Präparate als Nahrungsergänzungsmittel ein bequemer Weg ist.

5.2 Isoflavon-haltige Präparate

Zahlreiche Nahrungsergänzungsmittel mit Phytoestrogenen, insbesondere mit Isoflavonen, werden für Frauen in der Menopause angeboten. Größtenteils handelt es sich dabei um Extrakte aus Soja (*Glycine max* (Merr.) L.) oder Rotklee (*Trifolium pratense* L.) mitunter auch um eine Kombination beider. Daneben gibt es noch einige Präparate aus den Bohnen und den Wurzeln von Kudzu (*Pueraria montana* (Lour.) Merr.), ebenfalls eine Pflanze aus der Familie der Fabaceae, die vor allem in Asien ihre Verbreitung findet, wo sie ein Grundnahrungsmittel darstellt. Die auf dieser Grundlage erwerblichen NEM werden damit beworben, dass sie zur Raucherentwöhnung und zu einer Verbesserung des Konzentrationsvermögens bei Stress dienen können, da die enthaltenen Isoflavone über eine Blockade der Nikotin-Rezeptoren ihre Wirkung entfalten sollen. Diese Präparate spielen aber eher eine untergeordnete Rolle, die größte wirtschaftliche Bedeutung besitzen die bereits erwähnten mit Soja und Rotklee als Bestandteile.

Da isoflavonhaltige Nahrungsergänzungsmittel in Apotheken, Drogerien sowie in Supermärkten frei verkäuflich zu erwerben sind, wird eine gesundheitliche Unbedenklichkeit suggeriert, weil bei der Selbstmedikation keine fachliche Beratung nötig zu sein scheint. Gestützt wird das Ganze durch entsprechende Aussagen auf der Umverpackung wie „natürlich“, „sanft“, „fördert das Wohlbefinden“ und „besser durch die Wechseljahre“. Weiterhin werden gesundheitsbezogene Effekte beworben, wonach die Produkte „Frauen mit Wechseljahresbeschwerden (z.B. Hitzewallungen) empfohlen“ werden, „einen regulierenden Einfluss auf den Stoffwechsel der Frau ausüben“ und „altersbedingte Veränderungen seltener auftreten“ sollen.

Die Herstellung der NEM erfolgt bislang nach keinen standardisierten Verfahren, vielmehr entscheidet jeder Hersteller individuell über Kultivierungsort, Erntebedingungen und Aufarbeitung sowie Extraktionsmittel. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass sich die verschiedenen Präparate hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, ihrer Matrices und damit ihrer Wirkung unterscheiden. So könnten die in Soja enthaltenen Saponine ebenfalls mitextrahiert werden, was durch ihre Eigenschaften als Resorptionsvermittler zu einer anderen biologischen Aktivität der Isoflavone führen kann. Darüber hinaus sind den Nahrungsergänzungsmitteln häufig weitere Stoffe zugesetzt wie Vitamine und Mineralstoffe, mitunter auch Sojaöl, die ebenfalls dazu führen, dass keine Vergleichbarkeit gegeben ist. Bezüglich des Gehaltes geben die Hersteller wie bereits erwähnt in den meisten Fällen nur die Gesamtmenge an Isoflavonen an, selten gibt es genauere Spezifikationen hinsichtlich der einzelnen, wirksamen Bestandteile oder dem vorliegenden Konjugationsgrad.

Rechtlich ist zwar festgelegt, dass eine „empfohlene tägliche Verzehrmenge“ vom Hersteller eines NEM anzugeben ist, aber da es zu diesem Punkt noch keine allgemeinen

Einleitung

Empfehlungen gibt, variieren die Angaben der Produzenten deutlich. Für Soja wird sich an den üblichen, durchschnittlichen Tagesmengen, die durch die traditionelle Ernährung aufgenommen werden, orientiert. Obwohl zur Toxizität von Isoflavonen noch zu wenig Studien durchgeführt wurden, gibt es bislang keine gesetzlichen Höchstmengen für deren Gehalt in Nahrungsergänzungsmitteln. Schwierig gestaltet sich dabei vor allem, dass für die Einstufung noch wissenschaftlich fundierte Beurteilungskriterien fehlen. Einige dieser Studien weisen aber auf nachteilige Effekte durch hochdosierte Mengen an Isoflavonen hin (Fitzpatrick, 2003; Wuttke et al., 2007), weshalb eine eindeutige Regelung im Interesse des Gesundheitsschutzes notwendig wäre. Vorschläge zur Bewertung des gesundheitlichen Nutzens und der Unbedenklichkeit lieferte 2007 das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) mit der Stellungnahme „Isolierte Isoflavone sind nicht ohne Risiko“. Endergebnis dieses Gutachtens ist, „dass die angenommenen positiven Wirkungen von isolierten Isoflavonen auf Wechseljahresbeschwerden nach derzeitigem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse als nicht ausreichend gesichert anzusehen sind“ und „dass Isoflavone, wenn sie in isolierter oder angereicherter Form und hoher Dosierung gegeben werden, die Funktion der Schilddrüse beeinträchtigen und das Brustdrüsengewebe verändern können“. Weiterhin fehlen nach Ansicht des BfR notwendige Langzeitstudien, um eine verlässliche Höchstdosis festzulegen. Die Anwendung von NEM von Frauen in der Menopause wird als nicht risikolos wegen des ohnehin erhöhten Brustkrebsrisikos angesehen.

Zielsetzung der Arbeit

Rotklee- und Soja-haltigen Zubereitungen werden eine Reihe von gesundheitsfördernden Wirkungen nachgesagt, weshalb sie in Deutschland in Apotheken und Drogerien frei erhältlich sind. Die darin enthaltenen Isoflavone verfügen über eine schwache Aktivität am Estrogenrezeptor und werden daher auch als Phytoestrogene bezeichnet.

Da die Präparate als Nahrungsergänzungsmittel angeboten werden, ist keine genaue Deklaration bezüglich der Inhaltsstoffe gesetzlich vorgeschrieben, was deren Vergleichbarkeit untereinander stark einschränkt. Aus diesem Grund war es ein wichtiges Ziel dieser Arbeit, verschiedene dieser Zubereitungen qualitativ und quantitativ über HPLC zu untersuchen. Die daraus ermittelten Werte sollten als Referenzen dienen, um weitere Methoden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Analyse der Nahrungsergänzungsmittel zu testen.

Zu diesem Zweck sollte die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) als modernes Verfahren angewendet werden. Dazu musste ein jeweils geeignetes Fließmittel entwickelt werden, wodurch eine ausreichende Trennung und die damit verbundene reproduzierbare Quantifizierung gewährleistet werden konnten. Diese Methoden sollten dann genauso wie die erarbeiteten HPLC-Techniken validiert werden, um sie für spätere, noch nicht untersuchte Rotklee- und Soja-Präparate nutzen zu können.

Weiterhin war beabsichtigt, die Möglichkeiten der FT-Infrarotspektroskopie zur Untersuchung von Pflanzenextrakten genauer zu charakterisieren. Es sollten Kenntnisse bezüglich der chemischen Zusammensetzung der einzelnen Zubereitungen gewonnen werden und ob es möglich wäre, die Isoflavone darin ohne weitere Auftrennung zu identifizieren. Der nächste Aspekt dieser Arbeit bestand darin, über multivariate Kalibration mittels PLS-Regression die Hauptisoflavone in den Extrakten quantifizieren zu können, um ein schnelles Meßverfahren als Alternative zur HPLC zu etablieren.

Schließlich sollte mit den über FTIR erzeugten Spektren eine Clusteranalyse durchgeführt werden, um zu sehen, ob sich die Präparate anhand ihrer IR-Muster unterscheiden ließen.

Den letzten Punkt stellte die Analyse der Proben über Raman-Spektroskopie dar, wobei deren Eignung als ergänzendes Analyseverfahren zur Infrarot-Spektroskopie überprüft werden sollte.

Theoretische Grundlagen

1. HPLC von Pflanzenextrakten

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ist zur Trennung von Substanzgemischen eines der am weitesten verbreiteten chromatographischen Verfahren. Dies ist unter anderem begründet in der hohen Selektivität durch die mögliche Variation der mobilen und stationären Phasen bezüglich Polarität, pH-Wert, Partikelgröße und Porenvolumen. Da die HPLC mit verschiedensten Detektoren gekoppelt werden kann, lässt sich damit nahezu jede Substanz nach erfolgreicher Trennung detektieren und bei ausreichender Menge quantifizieren.

Man unterscheidet je nach Polarität der stationären Phase zwischen Normalphasen (NP) und Umkehrphasen (Reverse Phase, RP), wobei bei der Normalphasen-Chromatographie oft hochporöses Kieselgel (SiO_2) oder Aluminiumoxid (Al_2O_3) mit einer großen spezifischen Oberfläche verwendet werden. Für weitere Modifikationen können funktionelle Gruppen wie NO_2 - oder NH_3 -Gruppen eingeführt werden. Das zugrundeliegende Trennprinzip beruht auf unterschiedlich starken Adsorptionsvorgängen der Analyten an der stationären Phase. Unpolare Lösungsmittel wie aliphatische Kohlenwasserstoffe werden dabei als mobile Phase eingesetzt. Die RP-Chromatographie arbeitet mit chemisch modifizierten Füllmaterialien auf Kieselgelbasis. Dazu wird durch Reaktion mit Alkyldimethylchlorsilanen eine apolare C-18 oder seltener C-8 Alkylkette an das Kieselgel gebunden, wodurch sich die Polarität der mobilen Phase umkehrt. Als mobile Phase werden polare Lösungsmittel wie Acetonitril, Methanol und Wasser verwendet. Die Trennung der Analyten erfolgt hier durch unterschiedliche Verteilungsprozesse zwischen stationärer und mobiler Phase auf der Grundlage verschiedener Hydrophobizität. Übliche analytische HPLC-Säulen weisen eine Länge zwischen 5 und 30 cm und einen Säuleninnendurchmesser von 2- 4 mm auf. Aus ihrer Länge und dem geringen Partikeldurchmesser des Füllmaterials resultiert eine große Trennstufenzahl und damit eine hohe Trennleistung, woraus sich wiederum eine gute Auflösung ergibt. Da sie Drücke von bis zu 200 bar aushalten können müssen, werden die Säulen üblicherweise aus Stahl gefertigt, der dann mit der stationären Phase befüllt wird.

Theoretische Grundlagen

Um komplexe Substanzmischungen wie Pflanzenextrakte in angemessener Zeit trennen zu können, nutzt man üblicherweise die zeitlich programmierte Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase (Lösungsmittelgradient), wobei sich hauptsächlich die Polarität des Fließmittels verändert.

Bei der Analytik von Flavonoiden ist der Einsatz von Reverse-Phase-Säulen üblich, da sie die besten Trennungen liefern und die Untersuchungssubstanzen gelöst in polaren Lösungsmitteln appliziert werden können. Zur Detektion verwendet man gebräuchlicherweise bedingt durch die aromatischen Strukturen der Flavonoide den Ultraviolett-Diodenarray-Detektor, kurz UV-DAD. Er misst die Lichtabsorption der Probe im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich mithilfe einzelner Photodioden, was es erlaubt, verschiedene Wellenlängen gleichzeitig zu erfassen. Es ist daher möglich, neben der Retentionszeit das UV/VIS-Spektrum eines Peaks zur Identifizierung einer Verbindung anzeigen zu lassen.

Zusätzliche Informationen bezüglich des Molekulargewichts und möglicher Teilstrukturen eines Moleküls liefert die Kopplung von HPLC mit einem Massenspektrometer. Aufgrund ihrer Selektivität können in vielen Fällen sogar chromatographisch schlecht getrennte Stoffe massenspektrometrisch bestimmt werden, die sich sonst aufgrund ähnlicher Polarität und gleichen UV-Absorptionsverhaltens nicht als zwei Komponenten identifizieren lassen. Die hohe Empfindlichkeit erlaubt darüber hinaus die Analyse kleinster Substanzmengen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein ESI-TOF Massenspektrometer verwendet. Zur Ionisierung mit „Electrospray Ionization“ (ESI) wird das HPLC-Eluat durch eine unter Spannung stehende Kapillare in ein elektrisches Feld gedrückt, was zur Zerstäubung der Probelösung führt. Ein feiner Nebel aus geladenen Teilchen bildet sich aus, wobei die Mikrotröpfchen aufgrund der angelegten Spannung eine positive Überschussladung tragen. Eine beheizbare Transferkapillare sorgt für eine fortschreitende Verdampfung des Lösungsmittels und eine kontinuierliche Verkleinerung des Tröpfchenradius, wodurch sich die Feldstärke solange erhöht, bis als Folge der elektrostatischen Abstoßung gleichartiger konzentrierter Ladungen der Tropfen platzt (Coulomb-Explosion) und in der Gasphase desolvatisierte Ionen zurückbleiben. Am Ende werden die Ionen über ein Vorvakuum durch eine Art konische Linse (Skimmer) in den Hochvakuumraum des Massenanalysators geleitet.

Theoretische Grundlagen

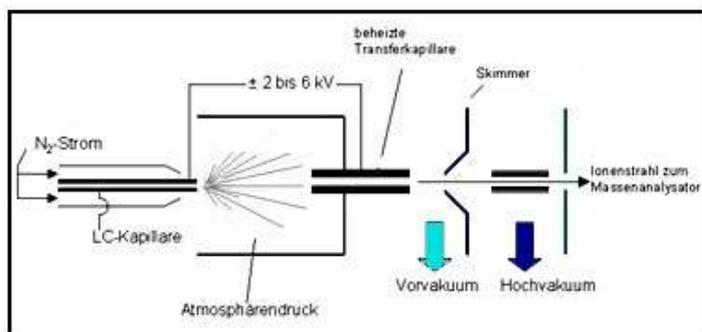


Abb. 10: Schematische Darstellung der ESI-Technik
(Quelle: <http://www.oc.uni-koeln.de/ms-oc/esi.htm>)

Das Verfahren eignet sich besonders für polare Verbindungen und erzeugt wegen der „sanften“ Ionisierung fast ausschließlich Quasimolekülionen und nur wenige Fragmente.

Der nachgeschaltete Flugzeitanalysator (Time-of-Flight, TOF) beschleunigt die erzeugten Ionen in einem elektrischen Feld, so dass sie auf den Detektor treffen. Das für die Flugstrecke benötigte Zeitintervall wird gemessen. Daraus lässt sich nach folgender Formel die Masse/Ladung bestimmen:

$$\frac{m}{z} = \frac{2U \times t^2}{s^2}$$

m= Ionenmasse
z= Anzahl der Ladungen
U= Beschleunigungsspannung
t= Flugzeit
s= Flugstrecke

Durch Präzisionsmassenbestimmung lässt sich die zum Molekül dazugehörige Bruttoformel aus dem hochauflösenden ESI-Massenspektrum ermitteln. Bei bekannter Summenformel kann das Vorhandensein einer Komponente nach chromatograpischer Auftrennung bestätigt und hinsichtlich Verunreinigungen untersucht werden.

2. HPTLC

Die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (high performance thin layer chromatography) stellt eine Weiterentwicklung der klassischen Dünnschichtchromatographie dar. Beide Verfahren gehören zu den planarchromatographischen Trenntechniken und beruhen ebenso wie die HPLC auf der Auftrennung von Substanzen durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit der stationären und der mobilen Phase.

Als stationäre Phase dienen meist Kieselgel-, seltener Reversed Phase-Platten. Dabei besitzen HPTLC-Platten einige Vorteile gegenüber DC-Platten wie eine kleinere Korngröße von 5-6 μm , eine homogenere Oberflächenschicht sowie eine engere Korngrößenverteilung. Dadurch wird die chromatographische Leistung verbessert, Trennzeit und Trennstrecke sind im Vergleich zur DC verringert. Daraus ergibt sich, dass kleine Platten benutzt werden können, was wiederum kleine Trennkammern möglich macht. Das bedeutet als Konsequenz, dass eine geringere Menge an Lösungsmittel nötig ist, wodurch weniger Fließmittelabfälle zur Entsorgung entstehen. Die Auflösung wird aufgrund der geringeren Trennstufenhöhe ebenfalls optimiert.

Durch den Einsatz von HPTLC-Platten ist neben der qualitativen Analyse wie R_f -Wert-Bestimmung (Lage der Probe im Verhältnis zur Fließmittelfront) auch eine quantitative Auswertung möglich. Dazu werden die Proben mit einem Auftragegerät strichförmig auf die Platte gesprüht, um eine bessere Genauigkeit im Vergleich zur manuellen Applikation zu erreichen. Anschließend wird die stationäre Phase mit einem geeigneten Fließmittel unter Nutzung von Kapillarkräften eluiert. Nach der Elution vermisst man sie densitometrisch mit einem DC-Scanner und durch Auftragung von Referenzen bekannter Konzentration gegen die gemessene Absorption kann eine Kalibriergerade erstellt werden.

Die Auswahl einer geeigneten mobilen Phase erfolgt durch „trial and error“ mithilfe von Erfahrungswerten und Intuition des Analytikers oder durch Modifikation bereits existenter Fließmittel bei ähnlichen Trennproblemen. Als Grundlage für die Komponentenauswahl des Fließmittels dient die elutrope Reihe, die die verschiedenen Lösungsmittel nach ihrer Elutionskraft (Lösungsmittelstärke) sortiert. Zu berücksichtigen ist, dass sich die Lösungsmittelstärke der Solventien nicht linear oder additiv verhält. Ergebnis der Suche sollte ein aus wenigen Komponenten zusammengesetztes Fließmittel sein. Dabei ist es vorteilhaft, dass das Auswechseln von Fließmittelkomponenten relativ unproblematisch für das chromatographische System ist. Die wichtigsten Eigenschaften eines optimalen Fließmittels sind ausreichende Fließmittelstärke und Selektivität. Durch die Fließmittelstärke wird der R_f -Wert einer Substanz beeinflusst. Eine gute Selektivität macht die Auftrennung von Substanzen vergleichbarer Polarität möglich.

Theoretische Grundlagen

Einen entscheidenden Einfluß auf die chromatographische Trennung hat die Wahl des Entwicklungskammertyps. Man unterscheidet die aufsteigende Entwicklung in einer Normalkammer und die horizontale Entwicklung in einer Horizontal-Entwicklungskammer, wobei die letztere deutlich weniger Lösungsmittel benötigt und aufgrund des fehlenden Eluierens entgegen der Gravitation zu einer Zeitersparnis führt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, sollte immer mit einer Kammersättigung gearbeitet werden, da dadurch die Zusammensetzung der Gasphase vergleichbar ist.

Die Dünnschichtchromatographie allgemein hat einige Vorteile im Vergleich zu anderen chromatographischen Analysemethoden. Sie ist einfach in der Anwendung, erfordert keine aufwendige und kostenintensive Instrumentierung, ermöglicht die Analyse einer größeren Probenanzahl parallel auf einer Platte und ist aufgrund ihrer Flexibilität hinsichtlich mobiler und stationärer Phase sowie der verschiedenen Detektionsmöglichkeiten (Fluoreszenzanregung und -löschung, Behandlung mit mehr oder weniger spezifischen Sprühreagenzien) für eine weite Palette an biologischen und chemischen Proben einsetzbar.

3. Schwingungs-Spektroskopie

Die Schwingungs-Spektroskopie untersucht Schwingungen von Atomen in Molekülen. Die wichtigsten angewandten Methoden sind die Infrarot- und die Raman-Spektroskopie. Beide Verfahren dienen der Identifizierung und Strukturaufklärung von chemischen Verbindungen. Sie sind darüber hinaus für die Analyse von Multikomponenten-Gemischen geeignet, weil alle Moleküle einer Probe zum Spektrum beitragen. Da es sich um zerstörungsfreie Verfahren handelt, ist sogar eine Untersuchung lebender biologischer Systeme möglich.

Wie bereits erwähnt bilden Molekülschwingungen die Grundlage für die Schwingungs-Spektroskopie. Sie treten auf, da die Atome in Molekülen nicht starr, sondern elastisch miteinander verbunden sind, vergleichbar mit Federn in der Mechanik. Ein harmonischer Oszillator liegt vor, wenn zwei Körper unterschiedlicher Masse miteinander elastisch verbunden sind und eine Anregung dieser Verbindung zu einem Auseinanderziehen der beiden Körper führt.

Theoretische Grundlagen

Dafür gilt das Hookesche Gesetz:

$$F = D * \Delta l$$

Federkraft F

Federkonstante D

Längenänderung Δl

Die Federkonstante ist ein Maß für die Härte der Feder im mechanischen Modell, im Molekül ist sie ein Maß für die Bindungsstärke zwischen den Atomen. Bei der Betrachtung von Molekülen schwingen jedoch mehrere Atome gegeneinander, wobei die Schwingungsfrequenz umso höher ist, je stärker die Bindung zwischen den Atomen ist und je kleiner die schwingenden Atommassen sind. Berücksichtigt wird ebenfalls die Quantentheorie für die Molekülbetrachtung, da die Energie- und Strahlungsabsorption in Quanten erfolgt. Aufgrund der mangelnden Erklärbarkeit der Dissoziation von Molekülen bei Einstrahlung ausreichend hoher Energie ist die Anwendung des harmonischen Oszillators für ein Molekül nicht komplett realisierbar. Das Modell des anharmonischen Oszillators eignet sich daher besser, da dessen Potentialkurve einen asymmetrischen Verlauf besitzt und die einzelnen Schwingungsniveaus bei größerer Quantenzahl enger zusammenrücken, bis es schließlich zur Dissoziation der Bindung führen würde (Abbildung 11).

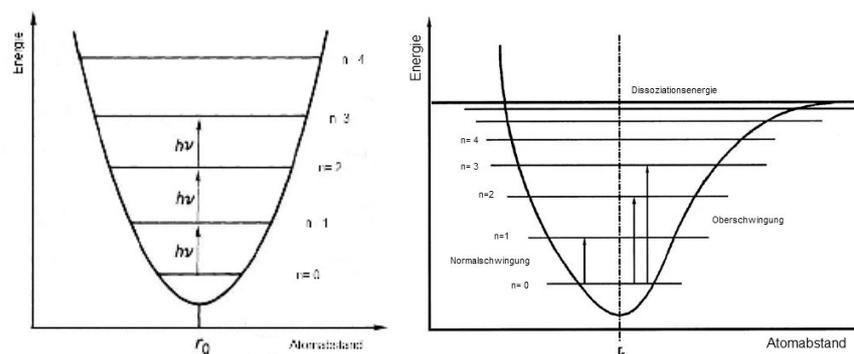


Abb. 11: Modell des harmonischen (links) und anharmonischen Oszillators (rechts)

Die Auswahlregel des harmonischen Oszillators, bei dem nur Übergänge in das nächsthöhere oder –niedrigere Niveau möglich sind, wird beim anharmonischen Oszillator erweitert, so dass auch größere Sprünge erfolgen können. Dies ist der Grund für das Auftreten von Oberschwingungen.

Theoretische Grundlagen

Die Schwingungen um ihre Bindungen von Molekülen können durch elektromagnetische Strahlung hervorgerufen werden. Die Anzahl der möglichen Schwingungen ergibt sich als $3N-6$ für gewinkelte Moleküle und als $3N-5$ für lineare Moleküle wegen der fehlenden Rotationsschwingung um die eigene Achse, wobei sich die Zahl 3 aus den drei Raumachsen ergibt und N für die Anzahl der Atome steht. Es lassen sich im Prinzip zwei Arten von Schwingungen unterscheiden: Valenz- und Deformationsschwingungen. Bei Valenzschwingungen handelt es sich um Schwingungen entlang der Bindungslängen zweier Atome, was in Streckung und Stauchung resultiert. Dahingegen ändern sich bei der Deformationsschwingung die Winkel zwischen den Atomen. Die nachfolgende Abbildung 12 zeigt am Beispiel eines dreiatomigen Moleküls die Schwingungsmöglichkeiten.

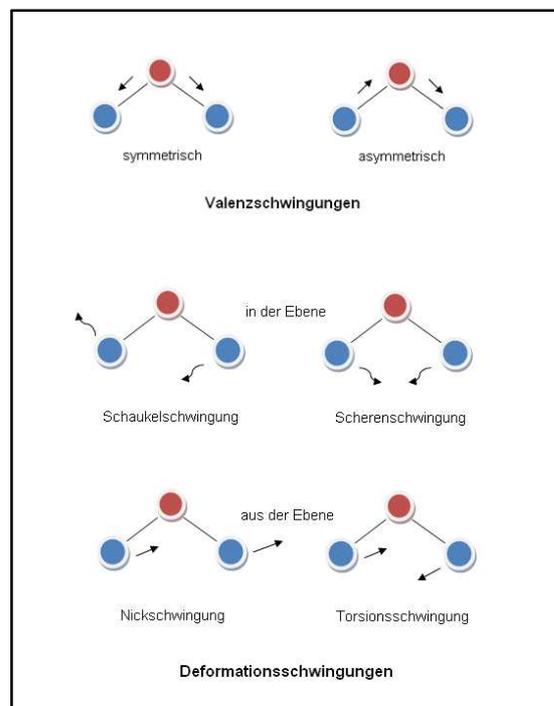


Abb. 12: Mögliche Molekülschwingungen eines dreiatomigen Moleküls

Theoretische Grundlagen

3.1 Infrarot-Spektroskopie

3.1.1 Physikalische Grundlagen

Elektromagnetische Strahlung lässt sich entsprechend ihrer Energie klassifizieren, da sie nur in bestimmten Mengen photonische Energie abgeben kann. Diese Energiemenge ist proportional zur Schwingungsfrequenz ν der Welle und indirekt proportional zur Wellenlänge λ . Definieren lässt sich die Energie mithilfe der Einsteinschen Gleichung als:

$$E = h \cdot \nu$$

Das Plancksche Wirkungsquantum $h = 6.626 \cdot 10^{-34}$ Js ergibt sich in dieser Gleichung als Proportionalitätsfaktor, da bei physikalischen Vorgängen nur Vielfaches dieses Wertes möglich sind.

Die Energie elektromagnetischer Strahlung lässt sich auch über den reziproken Wert der Wellenlänge λ , die Wellenzahl $\bar{\nu}$, ausdrücken. Die Wellenzahl wird hauptsächlich zur Charakterisierung von Strahlung im Infrarotbereich verwendet. Sie beschreibt die Anzahl elektromagnetischer Wellen in einer Strecke von einem Zentimeter.

Trifft Energie auf Moleküle, kommt es je nach Frequenz der eingestrahlten Energie zu unterschiedlichen Wechselwirkungen. Darauf begründet ergibt sich die Einteilung elektromagnetischer Strahlung nach dem Resultat der Anregungsprozesse, welches sie durch Interaktion mit Materie verursacht.

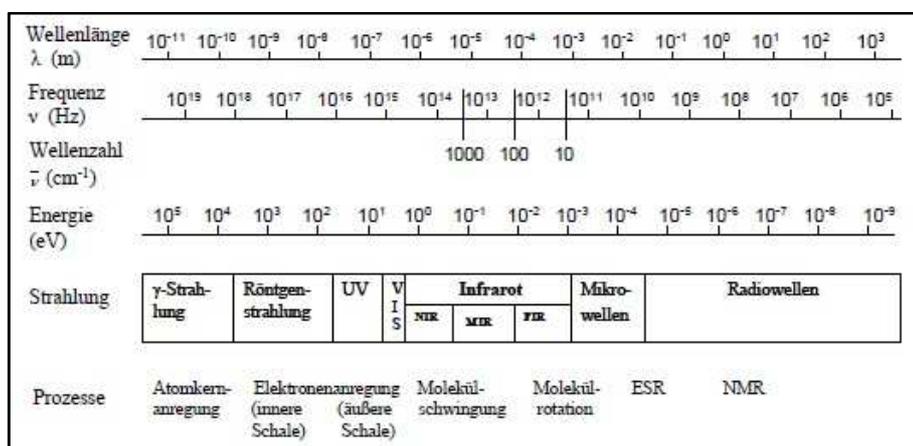


Abb. 13: Bereiche der elektromagnetischen Strahlung nach Stuart (1996)

Theoretische Grundlagen

Wie aus der Abbildung 13 ersichtlich kommt es infolge der Einstrahlung von elektromagnetischer Energie zur Atomkern- und Elektronenanregung, Molekülschwingungen und –rotation sowie im hochwelligen Bereich zu Elektronen- und Kernspinresonanzen.

Der Spektralbereich der infraroten Strahlung liegt in einem Wellenlängenbereich von ca. 700 nm bis 830 μm , in Wellenzahlen ausgedrückt 14200 bis 12 cm^{-1} . Dieser große Bereich kann wiederum in drei Teilbereiche untergliedert werden und zwar in den nahen (NIR) von 700 bis 2500 nm (14200- 4000 cm^{-1}), den mittleren (MIR) von 2,5 bis 25 μm (4000- 400 cm^{-1}) und den fernen Infrarot-Bereich (FIR) von 25 bis 830 μm (400- 12 cm^{-1}). Durch das Einstrahlen von Licht dieser Wellenlängenbereiche auf Moleküle werden deren Bindungen zu Schwingungen und Rotationen angeregt, deren Frequenz von den schwingenden Massen und der Bindungsstärke abhängt. FIR-Strahlung führt nur zur Rotation leichter Moleküle, da sie energiearm ist. Im NIR und MIR werden aufgrund der höheren Strahlungsenergie die Bindungen der Moleküle zu Schwingungen angeregt. Da ein Schwingungszustand mehrere Rotationszustände besitzt, wird der Übergang eines Moleküls aus dem Grundzustand in den angeregten Schwingungszustand in einem Bandenspektrum und nicht in einem Linienspektrum aufgezeichnet. Die Form des Bandenspektrums ergibt sich aus der Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Rotationsübergänge.

Voraussetzung für die IR-Aktivität von Molekülen ist, dass die elektrischen Ladungen im Molekül entweder unsymmetrisch verteilt sind oder die Ladungsverteilung durch die Schwingungsbewegung der Atome unsymmetrisch wird. Die Strahlungsenergie kann also nur dann mit einem Molekül in Wechselwirkung treten, wenn sich sein Dipolmoment ändert (Auswahlregel des elektrischen Dipolmoments). Eine Änderung des Dipolmoments tritt dann auf, wenn sich die Richtung (Beugeschwingung) oder der Betrag (Streckschwingung) des Dipols durch die Schwingung verändert. Demzufolge können aus verschiedenen Elementen zusammengesetzte Verbindungen immer mit Infrarot-Strahlung in Wechselwirkung treten. Selbst wenn sie nicht von vornherein ein Dipolmoment aufweisen, können trotzdem Schwingungen erzeugt werden, die zu einer unsymmetrischen Verschiebung des Ladungsschwerpunktes innerhalb des Moleküls führen. Bei Verbindungen mit Symmetriezentren sind alle Schwingungen, die symmetrisch zum Zentrum erfolgen IR-inaktiv und die, die asymmetrisch verlaufen, IR-aktiv.

Theoretische Grundlagen

Da die Position des Absorptionspeaks durch Kopplungen verändert werden kann, gibt es für bestimmte funktionelle Gruppen keinen eindeutigen Wert, sondern einen Bereich. Bei Anregung zu Schwingungen durch Infrarot-Strahlung sind diese nicht unabhängig voneinander, weil die Bindungen nicht isoliert voneinander sind. Zum Beispiel ist bei einer Carbonsäure die C-O-Streckschwingung mit der Beugeschwingung der O-H-Bindung aufgrund der Massenträgheit des Wasserstoffatoms gekoppelt, wodurch sich der Bindungswinkel von C-O-H ändert. Wenn ein Carbonsäurederivat vorliegt, kann sich die Lage der C-O-Streckschwingung aufgrund der unterschiedlichen Massenträgheit des Derivates verschieben, außerdem treten mesomere und induktive Effekte auf. Bei Carbonylgruppen ist diese Auswirkung am stärksten zu beobachten, es kommt zu einer Verschiebung der Bandenlage für die Carbonylabsorption durch Nachbargruppen. Liegt ein Elektronenschieber vor, kommt es zu einer Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen, bei einem Elektronenzieher zu höheren Wellenzahlen.

Für die Strukturaufklärung von Molekülen wird vor allem der mittlere IR-Bereich von 4000 bis 400cm^{-1} verwendet, da dort funktionelle Gruppen bei Anregung durch IR-Strahlung charakteristische Schwingungen zeigen, denen Absorptionsbanden in definierten Bereichen des Spektrums entsprechen. Für die Schwingung ist die Art der funktionelle Gruppe mit ggf. einer Beeinflussung durch Nachbargruppen verantwortlich, dies ermöglicht eine schnelle Zuordnung des Stoffes zu dessen Verbindungsklasse. Bei genauerem Betrachten der Lage und Intensität der Banden sind weitere ganzheitliche Aussagen möglich und durch den Spektrenvergleich mit Referenzsubstanzen ist eine Identifizierung der kompletten Substanz durchführbar.

3.1.2 Aufbau und Funktion des FTIR-Spektrometers

Der Astronom Friedrich Wilhelm Herschel entdeckte im Jahre 1800 bei Versuchen mit einem Glasprisma die Infrarot-Strahlung am roten Ende des sichtbaren Spektrums. Bereits 1890 entwickelte Albert Abraham Michelson das nach ihm benannte Interferometer und schuf damit die Grundlage für die heute verwendeten Fourier-Transformations-Spektrometer.

Ein Michelson-Interferometer ist so aufgebaut, dass von der Strahlungsquelle ein Lichtstrahl ausgesendet und auf einen Strahlungsteiler gelenkt wird. Als IR-Strahlungsquelle dient ein Siliziumcarbidstab, der spektral kontinuierliches Licht erzeugt. Dieser Strahl wird anschließend moduliert, das heißt, der Strahl wird in zwei Teilstrahlen aufgespalten. Möglich ist dies aufgrund der Halbdurchlässigkeit des Teilers, da er die eine Hälfte des Infrarot-Lichts auf einen festen Spiegel reflektiert und die andere Hälfte auf einen beweglichen Spiegel durchstrahlen lässt.

Theoretische Grundlagen

Beide Strahlen werden zu dem Strahlungsteiler zurückreflektiert, treffen sich dort wieder und interferieren auf dem Detektor. Bei dieser Rekombination der Lichtstrahlen entstehen auf dem Detektor Interferenzringe, da das Licht meist leicht divergent aus der Strahlungsquelle scheint. Durch die Verschiebung des beweglichen Spiegels kann dieses Interferenzmuster verändert werden, was am Detektor als Änderung der Infrarot-Energie registriert wird.

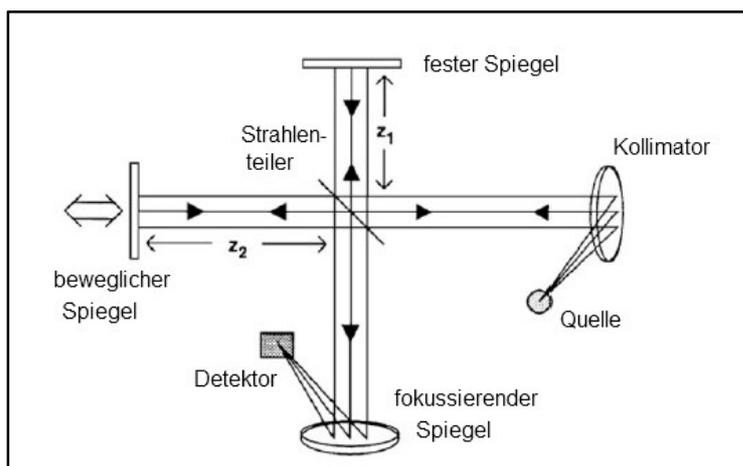


Abb. 14: Michelson-Interferometer

(Quelle: www.analytik.ethz.ch/praktika/phys_anal/IR/IR_skript.pdf)

Um die genaue Position des beweglichen Spiegels zu berechnen, wird zusätzlich ein He-Ne-Laserstrahl in den Strahlengang eingespiegelt, der in paralleler Richtung zur IR-Strahlung verläuft. Das durch den Laserstrahl entstehende Interferogramm wird separat detektiert und kann aufgrund der großen Exaktheit und Konstanz der Wellenlänge des Lasers zur genauen Bestimmung der Spiegelstellung und damit zur Kalibrierung des Gerätes verwendet werden. Setzt man nun eine Probe in den Strahlengang des Lichts, kommt es durch die Anregung von Molekülschwingungen zur Absorption von Licht. Dies wird als Schwächung des eingestrahnten IR-Lichts in Form von frequenzabhängigen Absorptionsbanden im Spektrum dargestellt.

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein FTIR-Spektrometer mit einer ATR-Einheit verwendet. Diese Probentechnik erlaubt die Untersuchung von undurchsichtigen Stoffen und auch von flüssigen Proben, was durch die Reflexionsmessung anstatt der herkömmlichen Durchstrahlung ermöglicht wird. Die abgeschwächte Totalreflexion (ATR= Attenuated Total Reflection) bedient sich des Prinzips der inneren Reflexion, das bedeutet, dass die Messung an der Phasengrenze zwischen einem Dielektrikum und der Probe stattfindet. Bei einem Dielektrikum handelt es sich um eine nichtleitende, nichtmetallische Substanz, deren Ladungsträger in der Regel nicht frei beweglich sind. Der ATR-Kristall besteht in diesem Fall aus einem Diamanten, der durch eine Zinkselenid-Schicht fixiert ist.

Theoretische Grundlagen

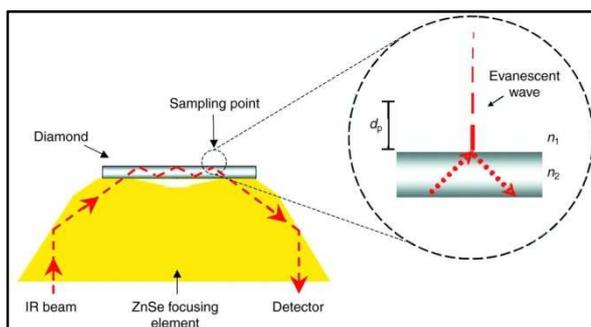


Abb. 15: Prinzip der ATR-Messung

(Quelle: <http://jeb.biologists.org/content/211/18/2901.figures-only>)

An der Grenzfläche zweier optisch verschieden dichter Medien kommt es zum physikalischen Effekt der Totalreflexion. Tritt Licht durch ein Medium mit einem relativ hohen Brechungsindex (ATR-Kristall) unter einem größeren als dem kritischen Einfallswinkel (Grenzwinkel der Totalreflexion) auf die Grenzfläche zu einem Medium mit einem kleineren Brechungsindex (Probe), wird die Strahlung an dieser Grenzfläche fast vollständig reflektiert. Der IR-Strahl dringt dabei etwas in das angrenzende Medium ein, wobei die Eindringtiefe von mehreren Faktoren wie der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts, den Brechungsindizes von ATR-Kristall und Probe sowie dem Einfallswinkel abhängig ist. Der Vorgang der Reflexion wiederholt sich und bei jeder teilweisen Absorption der Strahlung durch die Probe kommt es zur Beeinflussung der Intensität des reflektierten Strahls. Es entsteht ein Reflexionsspektrum, dass mit dem entsprechenden Transmissionsspektrum hinsichtlich der Wellenzahlen übereinstimmt, jedoch unterschiedliche Intensitäten der Banden aufweist. Dies erklärt sich aus der Abhängigkeit der Eindringtiefe von der Wellenlänge der Strahlung.

Um dennoch eine Vergleichbarkeit von ATR- und Transmissionsspektren zu erreichen, bedient sich die Spektroskopiesoftware mathematischer Verfahren, der sogenannten ATR-Korrektur. Diese nutzt den Einfallswinkel, die Brechzahlen des ATR-Kristalls und der Probe zur Korrektur. Als Voraussetzung für die Anwendung der ATR-Technik muss ein optimaler Kontakt zwischen Kristall und Probe gewährleistet sein, der gegebenenfalls durch eine Anpressvorrichtung erzeugt wird.

3.1.3 Die Fourier-Transformation

Die Fourier-Transformation stellt eine Integraltransformation dar, die kontinuierliche aperiodische Signale in ein kontinuierliches Spektrum überführt. Das Interferogramm (die sogenannte Zeitdomäne) wird in das eigentliche Infrarot-Spektrum (die sogenannte Frequenzdomäne) umgerechnet. Aus dem vom Detektor aufgenommenen Signal können mithilfe der Fourier-Transformation die Frequenzen der eingehenden Wellen bestimmt werden, wodurch die Erstellung eines Spektrums möglich ist. Die FTIR-Spektroskopie bietet gegenüber den früher üblichen dispersiven Infrarot-Spektrometern einige Vorteile, weshalb heute die IR-Spektroskopie ausschließlich mit Fourier-Transformationsgeräten durchgeführt wird.

Durch den Wegfall von Spalten zur Einengung des Lichtstrahls steht bei der FTIR-Spektroskopie eine höhere Messintensität zur Verfügung. Daraus resultiert ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis (Jacquinot-Vorteil). Darüber hinaus wird der gesamte Frequenzbereich der Lichtquelle eingestrahlt und am Detektor erfasst, wodurch sich eine enorme Zeitersparnis ergibt, da nicht jede Frequenz einzeln erregt und detektiert werden muss. Gleichzeitig wird das Detektorrauschen vermindert (Multiplexvorteil). Aufgrund des He-Ne-Lasers kann die Position des beweglichen Spiegels und damit die Frequenz der detektierten IR-Strahlung sehr genau und reproduzierbar bestimmt werden, da der Laserstrahl exakt definiert und mit einer hohen Konstanz der Wellenlänge emittiert wird (Connes-Vorteil).

In Verbindung mit der ATR-Einheit, die nur eine minimale Probenvorbereitung erfordert, und unterstützt von modernen Computern stellt die FTIR-Spektroskopie ein zuverlässiges und schnelles Meßverfahren dar. Sie wird u.a. verwendet zur Qualitätskontrolle von Rohstoffen, für chemotaxonomische Untersuchungen von Pflanzen und zur Quantifizierung von bestimmten Inhaltsstoffen in Lebensmitteln.

So wurden Honig (Tewari und Irudayaraj, 2004), Fruchtsäfte hinsichtlich wichtiger Qualitätsparameter wie Säure- und Alkoholgehalt und Zuckerkomposition (Huang et al., 2007) und fette Öle bezüglich ihrer Zusammensetzung (Yang et al., 2005) untersucht. Die Möglichkeit, mittels FT-MIR-Spektroskopie Bakterien zu identifizieren und charakterisieren, entwickelte Naumann bereits 1984. Mikroorganismen zeigen hochspezifische MIR Eigenschaften, die einzigartig für die unterschiedlichen Stämme sind. Die Bestimmung der Sporenkonzentrationen in biologischen Proben in Verbindung mit multivariater Kalibration zeigte das Potential der FT-MIR-Spektroskopie zur quantitativen Analyse (Subramanian et al., 2006).

3.2 Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie macht sich den Raman-Effekt zunutze, der im Jahre 1928 von dem indischen Physiker Sir Chandrasekhara Venkata Raman veröffentlicht wurde. Er entdeckte, dass bei der Bestrahlung von Molekülen mit monochromatischem Licht das eingestrahlte Licht gestreut wird. Bei der Zerlegung des Streulichts zeigt sich neben der intensiven Rayleigh-Strahlung der Lichtquelle noch ein kleiner Teil an Streustrahlung, der gegenüber dem Erregerlicht eine Frequenzverschiebung aufweist. Diese Strahlung bezeichnet man als Raman-Streustrahlung. Trifft ein Lichtquant auf ein Molekül, ist ein elastischer Stoß am wahrscheinlichsten. Die Energie und damit die Frequenz des Photons ändert sich nicht (Rayleigh-Streuung). Ein kleiner Teil der Photonen wird unelastisch gestreut, hierbei wird Schwingungsenergie zwischen dem Molekül und dem Lichtquant ausgetauscht, es kommt zur Raman-Streuung. Zwei Prozesse lassen sich dabei unterscheiden: Bei der Aufnahme von Energie des eingestrahlten Lichts können Moleküle in einen angeregten Schwingungszustand übergehen. Daraus resultiert eine Streustrahlung bei kleineren Frequenzen (größerer Wellenlänge), die Stokes-Linien. Befindet sich ein Molekül hingegen bereits im angeregten Zustand, kann es die Schwingungsenergie an die Erregungsstrahlung abgeben und fällt selbst wieder in den Schwingungsgrundzustand zurück. Diese Anti-Stokes-Strahlung liegt aufgrund der größeren Frequenz bei kleineren Wellenlängen als die Rayleigh-Strahlung.

Da sich bei Raumtemperatur nur eine geringe Anzahl an Molekülen im angeregten Schwingungszustand befindet, sind die Intensitäten der Anti-Stokes-Linien nur gering.

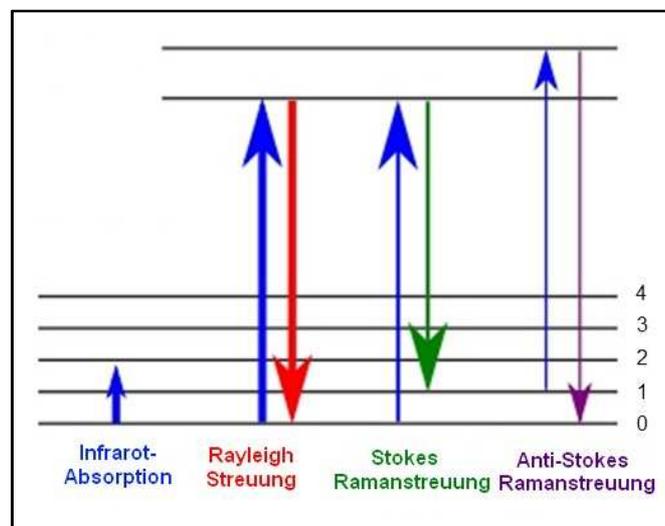


Abb. 16: Energieniveaudiagramm mit verschiedenen Strahlungsarten nach Moxfyre (2009)

Theoretische Grundlagen

Aus diesem Grund nutzt man zur Analytik vorwiegend die Stokes-Verschiebung. Einfluß auf die Intensität der Raman-Streuung nehmen die Intensität und die Wellenlänge des Lasers sowie die Konzentration und Streuungseigenschaften der Probe.

Nach dem Alternativverbot kann die Normalschwingung eines Moleküls mit Inversionszentrum entweder nur IR- oder Raman-aktiv sein. Bei IR-aktiven Schwingungen absorbieren Moleküle Licht, wenn sich ihr Dipolmoment ändert, was bei einer symmetrischen Schwingung nicht stattfindet, d.h. sie ist verboten. Im Gegensatz dazu muss bei Raman-aktiven Schwingungen die Polarisierung während der Schwingung moduliert sein. Hier sind antisymmetrische Schwingungen nicht zu beobachten.

Die Raman-Spektroskopie wird heute als Ergänzung zur IR-Spektroskopie in steigendem Maße eingesetzt. Aufgrund der gegensätzlichen Auswahlregeln ergeben sich für die Probe durch die Kombination von beiden mehr Informationen. Vorteilhaft bei der Raman-Spektroskopie ist, dass Aussagen über wässrige Systeme möglich sind, die IR-Spektroskopie ist aufgrund der breiten, überlagernden Banden von Wasser dafür nicht geeignet. Andererseits kann die Raman-Spektroskopie nur bei wenig absorbierenden, nicht fluoreszierenden Proben eingesetzt werden. Da die im IR-Spektrum auftretenden Ober- und Kombinationsschwingungen für die Raman-Spektroskopie zu schwach sind, sieht das Raman-Spektrum deutlich übersichtlicher aus.

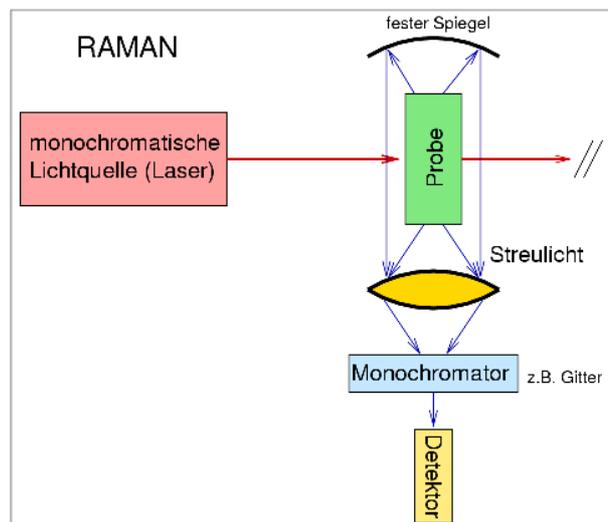


Abb. 17: Aufbau eines Raman-Spektrometers
(Quelle: http://ruby.chemie.uni-freiburg.de/Vorlesung/methoden_I_7.xhtml)

Das Raman-Spektrometer ist so aufgebaut, dass die zu untersuchende Probe mit einem Laser bestrahlt wird. Die Stokes-Strahlung wird detektiert, wobei die Frequenzunterschiede im Vergleich zum eingestrahlt Licht den für die Probe charakteristischen Energiezuständen von Rotations- und Schwingungsvorgängen entsprechen.

Ein Nachteil der Raman-Spektroskopie ist die geringe Empfindlichkeit, da nur ein äußerst kleiner Teil der Photonen des Lasers zu Ramanphotonen umgewandelt wird, so dass relativ hohe Konzentrationen an Molekülen oder eine hohe Laserintensität benötigt wird, um ein ausreichendes Signal zu detektieren. Bei einer zu großen Laserintensität ergibt sich aber das Problem des zu starken Aufheizens der Probe, so dass sie verbrannt wird und keine Messung mehr möglich ist.

4. Multivariate Kalibration

4.1 Quantitative Auswertung mittels IR-Spektroskopie

Neben der qualitativen Analytik kann die FT-IR-Spektroskopie auch zur Quantifizierung genutzt werden. Dafür wird das zur Identitätsprüfung übliche Transmissionsspektrum in das entsprechende Absorptionsspektrum überführt, so dass das Lambert-Beersche Gesetz angewendet werden kann. Die Absorption errechnet sich aus dem dekadischen Logarithmus der reziproken Transmission. Die Konzentration c eines Stoffes lässt sich bestimmen, da sie proportional zur Extinktion E ist.

$$E = \varepsilon * d * c$$

Der molare Extinktionskoeffizient ε stellt einen substanzspezifischen Proportionalitätsfaktor dar, der experimentell bestimmt wird und von einer bestimmten Wellenzahl abhängig ist. Bei der univariaten Kalibration wird lediglich eine spektrale Information wie z.B. eine einzelne Peakhöhe mit dem Gehalt einer Probe korreliert. Die Analyse einer unbekanntes Probe gelingt nun, indem man das Spektrum dieser aufnimmt und den Extinktionswert im Peakmaximum bestimmt. Dies führt aber nur bei Einkomponentensystemen zu befriedigenden Ergebnisse, da sich bei einer Mischung IR-aktiver Moleküle die Banden überlagern können, so dass keine Auswertung über die Peakhöhe möglich ist. Das ist vor allem bei biologischem Material der Fall, dessen spektrale Matrix aus einer Vielzahl von Komponenten besteht. Eine Möglichkeit, Bestandteile dieser Proben trotzdem quantifizieren zu können, ist die Verwendung multivariater Kalibrationsmethoden wie der Partial Least Squares (PLS)-Regression.

4.2 PLS-Regression

Die PLS-Regression (Partial Least Square – partielle kleinste Fehlerquadrate) ist ein multivariates Analyseverfahren, das eine quantitative Auswertung von IR-Spektren trotz Bandenüberlappung möglich macht. Diese Methode verknüpft eine Vielzahl von spektralen Informationen mit den entsprechenden Referenzwerten der Probe und erlaubt somit die Analyse von Stoffen in einer komplexen Matrix, zum Beispiel die Analyse von spektralen Daten von biologischem Material.

Durch die Verwendung einer größeren Menge an spektralen Informationen (gesamte spektrale Struktur) können geringste Unterschiede in den jeweiligen Substanzspektren erkannt und ggf. statistische Schwankungen ausgeglichen werden. Weiterhin erfolgen eine Trennung von Information und Nicht-Information (Entfernen des Rauschens), eine Datenmodellierung (Regression), das Erkennen von Ausreißern, Auswahl von Variablen (Merkmale/Eigenschaften) und schließlich die Vorhersage von unbekanntem Proben.

Zur Durchführung einer PLS-Regression müssen die Informationen der Substanzspektren mit den entsprechenden Konzentrationswerten verglichen werden. Veränderungen im Spektrum werden mit den Änderungen der Konzentration verknüpft. Zu diesem Zweck wird eine größere Menge an Kalibrierungsproben vermessen. Mathematisch dargestellt werden beide Datensätze zunächst in eine Datenpunktmatrix überführt und in ihre Eigenvektoren zerlegt. Diese Eigenvektoren werden Faktoren oder Hauptkomponenten genannt. Sie werden bei der Konzentrationsvorhersage anstelle der ursprünglichen Spektren verwendet, da sie alle relevanten spektralen Informationen über die untersuchten Proben enthalten.

Die Zerlegung hat den Vorteil, dass die analytisch wichtigen Informationen sehr großer Datenmengen (große Anzahl spektraler Datenpunkte) in Form dieser Faktoren komprimiert werden. Anstatt z.B. 100 Einzelergebnisse zu interpretieren, sind es nur zehn Hauptkomponenten für die Berechnung.

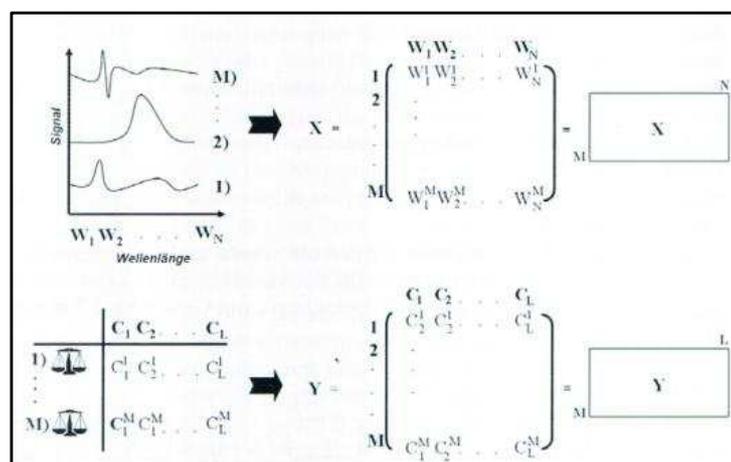


Abb. 18: Aufbau der Datenmatrix nach Conzen (2007)

Theoretische Grundlagen

In dem Beispiel von Abbildung 18 werden zunächst M Kalibrierproben vermessen. Anschließend werden alle N Wellenzahlen der ermittelten Spektren zeilenweise in eine (M, N) -Matrix überführt. Diese Matrix entspricht der spektralen Datenmatrix X . Analog werden alle L Komponentenwerte in eine (M, L) -Konzentrationsdaten-Matrix geschrieben.

Die Eigenvektoren werden nach sinkendem Eigenwert sortiert, wobei der erste Faktor die Hauptveränderung in der jeweils betrachteten Datenstruktur charakterisiert. Er hat demnach den größten Einfluß auf das Modell. Mit steigender Faktorenzahl werden immer weniger Veränderungen in den Spektren erklärt, so dass sich als Konsequenz daraus folgendes ergibt: Die niedrigen Faktoren beschreiben die wichtigen Veränderungen der Spektren, während bei höheren Faktoren der störende Einfluß des spektralen Rauschens repräsentiert wird.

So ist die Auswahl der optimalen Anzahl an Faktoren bedeutend für die Qualität eines PLS-Modells. Bei einer zu kleinen Anzahl werden die spektralen Strukturen nicht ausreichend erklärt, wodurch eine schlechte Reproduktion der spektralen Daten erzielt wird. Man spricht in diesem Fall von „Underfitting“. Eine zu große Anzahl an Faktoren führt dagegen zum „Overfitting“, da Anteile des spektralen Rauschens einen immer größer werdenden Einfluß auf die Regression nehmen. Die Faktorisierung trennt mathematisch die spektralen Informationen von den Konzentrationswerten in voneinander unabhängige Einheiten aus Loadings- und Scoresvektor. Die Loadingsvektoren entsprechen den Faktoren und der Scorevektor entspricht dem Einfluss, den eine Probe auf die Hauptkomponenten hat. Durch diese getrennte Darstellung ist es möglich, die analytisch relevanten Signale von den irrelevanten oder störenden Signalen zu trennen.

Die Kalibrationsfunktion beschränkt sich auf die relevanten, Signale, d.h. auf diejenigen Strukturen, bei denen eine Korrelation zwischen Spektraldaten- und Konzentrationsmatrix besteht, was eine Analyse von überlappenden Banden oder Signalen ermöglicht.

Der Informationsgehalt eines auf diese Art kalibrierten Datensatzes ist deutlich größer als bei einer univariaten Kalibration. Weiterhin ist es möglich, während der Analyse Ausreißer zu erkennen, die einen störenden Einfluß auf die Regression haben und deshalb aus dem Kalibrierungssatz entfernt werden sollten.

Für diese Untersuchung wurde die Methode PLS1 angewendet. Bei diesem Verfahren werden jeweils unter Anwendung der Quant+-Software nur die Konzentrationsdaten eines Analyten betrachtet. Eine zweite Form der Regression ist der PLS2-Algorithmus, in dem der Zusammenhang zwischen mehreren Eigenschaften und deren Spektren (PLS für mehrere Eigenschaften) untersucht wird. Bei der Modellentwicklung für die Quantifizierung der Nahrungsergänzungsmittel wurde ausschließlich die PLS1-Vorhersage verwendet, da diese Methode im Allgemeinen bessere Analyseergebnisse liefert.

Theoretische Grundlagen

Ob eine erstellte Methode ein brauchbares Analysenergebnis für die unbekanntes Proben liefert und ob die verwendeten Referenzspektren für die Kalibration geeignet sind, muss anhand einer Validierung geprüft werden. Zwei Arten der Validierung sind dabei möglich: die interne (Kreuzvalidierung) und die externe Validierung (Test-Set-Validierung), wobei die erste bei der Untersuchung der NEM Anwendung fand, da nur eine begrenzte Anzahl an Untersuchungsproben vorhanden war.

Im Falle der internen Validierung wird nacheinander je eine Probe aus dem Kalibrierungssatz entfernt und ein Modell zur Vorhersage der herausgenommenen Probe erstellt. Hinterher wird der vorhergesagte Gehalt mit dem tatsächlichen verglichen, um die Güte des chemometrischen Modells zu überprüfen. Die Herausnahme einzelner Kalibrierungsproben sichert die Unabhängigkeit des Datensatzes, was äußerst wichtig ist, um verlässliche Aussagen über neue unbekannte Proben zu machen.

Diese Methode besteht aus folgenden Teilaspekten: Festlegung und Herausnahme einer beliebigen Probe aus dem Probensatz, anschließende Modellberechnung mithilfe der verbleibenden Proben, Analyse der Validierungsprobe anhand der erstellten Kalibrierungsfunktion, Rückführung der Validierungsprobe und anschließende Entnahme einer weiteren Probe. Der geschilderte Prozess wird für jede Probe des Datensatzes wiederholt, bis alle Proben des Kalibrationsdatensatzes einmal analysiert sind. Für die Methodenentwicklung und für die anschließende Methodenbewertung wird demzufolge mit zwei separaten Datensätzen gearbeitet. Auf der Grundlage des Kalibrierungssatzes wird das Modell entwickelt und mit dem unabhängigen Testdatensatz überprüft.

Zur Bewertung des Modells werden die Varianz (spektrale kumulative Varianz), der Standard-Vorhersagefehler (SEP-Standard Error of Prediction) und der Rang bzw. die Zahl der Faktoren (No. of LV's-Number of latent variables) herangezogen.

Die Varianz, genauer die spektrale kumulative Varianz, drückt die insgesamt beschriebene Variabilität der Spektren des Kalibrationssatzes aus, die in der ausgewählten Anzahl Faktoren enthalten ist. Diese Faktoren werden aus dem PLS-Algorithmus abgeleitet und bilden zusammen ein abstraktes Spektrum der Merkmale. Sie entsprechen den latenten Variablen. Die Varianz beschreibt prinzipiell die Eigenschaften des Modells und deren Variabilität. Bei Anstieg der Varianz steigt auch die Anzahl der Faktoren an, allerdings wird mit steigender Faktorenzahl immer weniger neue Varianz erklärt. Sie sollte somit einen Wert gegen 100% anstreben. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Varianz in diesem Fall ein Maß für die Korrelation der Referenzwerte und der durch Faktorzerlegung rekonstruierten Werte ist. Der Wert der Varianz wird mit dem Bestimmungskoeffizient R^2 gleichgesetzt.

Theoretische Grundlagen

$$R^2 = \left[1 - \frac{\sum (Res_i)^2}{\sum (Y_i - Y_m)^2} \right] \times 100$$

Res_i – Residuenwert (Restwert) der Probe i

Y_i – Konzentrationswert der Probe i

Y_m – mittlerer Konzentrationswert

Der Standard-Vorhersagefehler (Standard Error of Prediction oder kurz SEP) ist ein weiterer Parameter zur Modellbewertung, der im Rahmen der Methodvalidierung ermittelt wird. Er ist der über alle Proben gemittelte Fehler zwischen den angegebenen und aus dem Modell berechneten Eigenschaftswerten (Standardabweichung der Prognose). Die Qualität einer Kalibrierung wird anhand der Genauigkeit definiert, mit der neue, unbekannte Proben analysiert werden. Daher ist der SEP ein quantitatives Maß für die Richtigkeit der Methode, mit welcher während der internen Validierung die einzelnen Proben vorhergesagt wurden. Der SEP entspricht dem RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation) bei der Kreuzvalidierung. Dieser Wert kann ebenfalls für die Auswahl des optimalen Rangs verwendet werden.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (Y_i^{Ref} - Y_i^{MIR})^2}$$

M - Anzahl der Proben

Y_i^{Ref} - Konzentrationswert der Probe, ermittelt durch eine Referenzmethode

Y_i^{MIR} - vorhergesagter Konzentrationswert der Probe i

Der gewählte Rang ist ausschlaggebend für die Qualität der späteren Analyse. Wie bereits erwähnt müssen „Underfitting“ und „Overfitting“ beachtet werden. Je höher der Rang ist, desto weniger robust ist das Modell. Andererseits kann eine größere Anzahl an Faktoren die Varianz in den Spektren der Proben besser erklären und sorgt deshalb für genauere Ergebnisse. Es gibt für jedes Modell eine optimale Anzahl an Faktoren, die einen kleinstmöglichen Analysenfehler gewährleisten. Bei einem optimalen Rang besitzt der Standardvorhersagefehler ein Minimum und die Varianz ein Maximum. Bei einer weiteren Erhöhung des Rangs ergeben sich keine signifikanten Unterschiede mehr in Bezug auf den Vorhersagefehler und auf die Varianz.

Theoretische Grundlagen

Die genannten Parameter können von Ausreißern beeinflusst werden, was zu einer Verschlechterung des Modells führen würde. Bei der Kreuzvalidierung werden Ausreißer leicht identifiziert. Um diese ggf. anschließend zu entfernen, wird zuerst eine qualitative Betrachtung des IR-Spektrums durchgeführt und danach der Mahalanobische Abstand verglichen. Die Mahalanobisdistanz entspricht der Differenz des gemessenen Spektrums zum Mittelwert aller rekonstruierten Spektren des Kalibrationssatzes. Bei der Modellentwicklung wird für jede Stichprobe dieser Abstand berechnet, der als Vergleich für die Ausreißerererkennung dient. Die zu identifizierende Probe wird als unbekannte Probe durch das Modell vorhergesagt, der Mahalanobische Abstand wird dabei automatisch ermittelt. Anschließend erfolgt der Vergleich beider. Je größer die Differenz des untersuchten Spektrums zu dem mithilfe des Modells berechneten Mittelwertspektrum der Kalibrationsproben ist, umso mehr wächst der Wert der Mahalanobisdistanz an. Während der PLS-Regression werden für alle Spektren die M-Distanzen berechnet.

Daraus wird anschließend die maximal zulässige Distanz festgelegt. Bei der Herausnahme einer nicht passenden Probe erfolgt eine erneute Modellbildung samt Kreuzvalidierung, um den Datensatz zu optimieren. Es sollte aber auf jeden Fall kritisch geprüft werden, ob das Probenspektrum durch Verunreinigung oder Zersetzung der Probe von den anderen Spektren unterscheidet, denn wenn es sich nicht um eine fehlerhafte Messung handelt, ist das Einbeziehen dieser Werte in den Datensatz notwendig für die Entwicklung eines robusten Modells.

Bei der Analyse neuer Proben ergeben sich somit zwei relevante Informationen: Zum Einen wird der Analysenwert der Probe ermittelt und zum Anderen wird der Wert einer entsprechenden Ausreißerererkennung unterzogen.

4.3 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse fasst Spektren aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Gruppen (Cluster) zusammen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es möglich ist, die Spektren der Rotklee-Nahrungsergänzungsmittel getrennt von denen der Soja-Präparate zu clustern. Zu diesem Zweck werden im Zuge der Analyse zuerst die spektralen Distanzen zwischen den Spektren von der Software berechnet. Der Algorithmus, der für die Gruppenbildung verwendet wird, entscheidet in welcher Art und Weise die Datenpunkte zu Clustern zusammengefasst werden, in diesem Fall der Wards Algorithmus. Das Prinzip des Ward-Verfahrens besteht darin, diejenigen Objekte zu Gruppen zu vereinigen, die die Streuung innerhalb der Gruppe so wenig wie möglich erhöhen. Somit entstehen Cluster mit einer großen Homogenität. Zwischen den Clustern wird dagegen die Heterogenität maximiert.

Dazu wird der *Euklidische Abstand* zwischen zwei Spektren berechnet:

$$D_{\text{euklid}}(a, b) = \sqrt{\sum_j (a(j) - b(j))^2}$$

Die spektrale Distanz D ergibt sich aus den Ordinatenwerten $a(j)$ und $b(j)$ zweier Spektren a und b . Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wurzel aus der Summe der quadrierten Datenpunktdifferenzen die Eukliddistanz darstellt.

Die ähnlichsten Spektren, sprich die mit der kleinsten spektralen Distanz, werden in ein Cluster zusammengefasst. Dann wird die Distanz zwischen dem gebildeten Cluster und den übrigen Spektren gebildet. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis nur noch ein großes Cluster übrigbleibt. Schließlich werden die Gruppierungen graphisch in Form eines Dendrogramms dargestellt.

Material & Methoden

1. Untersuchte Nahrungsergänzungsmittel

1.1 Deklarierte Gehalte an Isoflavonen

Alle sieben Präparate wurden in einer deutschen Apotheke gekauft. Zwei der Zubereitungen enthielten einen Rotklee-Extrakt, Menoflavin® (Chargennummer: 101207C, melbrosin GmbH, Deutschland) und Rotklee Kapseln (Chargennummer: L8240/2, Avitale GmbH, Deutschland). Die vier Soja-Extrakt enthaltenden Produkte waren Alsifemin® (Chargennummer: 8EN5, Alsitan GmbH, Deutschland), Femi-Flavin® (Chargennummer: 016020, Astrid Twardy GmbH, Österreich), Phyto Soya® 17.5 mg und Phyto Soya® 35 mg (Chargennummer: T06773A bzw. T24221A, Weber& Weber GmbH& Co. KG, Deutschland). Das Nahrungsergänzungsmittel Soja 60 C (Chargennummer: L8349/4, Avitale GmbH, Deutschland) enthielt sowohl einen Rotklee- als auch einen Soja-Extrakt.

Die Angaben zum Gehalt an Isoflavonen bezogen sich fast ausschließlich auf die Gesamtmenge. Lediglich bei Phyto Soja® 17.5 mg und 35 mg war die tatsächliche Aglykonmenge und der Anteil davon an Daidzein angegeben.

Aufgrund dieser Tatsache sollte anhand der ausgewählten NEM untersucht werden, inwieweit die Deklaration des Isoflavongehaltes durch die Hersteller belegbar ist und welche Zusammensetzung an einzelnen Isoflavonen die Zubereitungen aufweisen.

1.2 Materialien und Geräte:

Dimethylsulfoxid p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol (HPLC-Qualität)	VWR, Darmstadt
Feinwaage CP 224S-OCE	Sartorius, Göttingen
Ultraschallbad Sonorex RK 100 H	Bandelin Electronic, Berlin
Minishaker MS 1	IKA-Werke, Staufen

Material & Methoden

1.3 Probenaufarbeitung

Sechs Präparate waren als Hartkapseln formuliert, Femi-Flavon® als Weichkapsel. Zur Extraktion der Hartkapseln wurden jeweils 10 Kapseln geöffnet und der Inhalt in einem Mörser homogenisiert. Zur abschließenden Berechnung des Gehaltes an Isoflavonen pro Kapsel wurde das Durchschnittsgewicht pro Kapselinhalt bestimmt. Anschließend wurden 100 mg bzw. 200 mg des Inhaltes genau abgewogen und in einen Erlenmeyerkolben überführt. Die Einwaage richtete sich dabei nach dem erwarteten Gehalt an Isoflavonen pro Kapsel.

Das Pulver der Rotklee-haltigen Kapselinhalte wurde mit 1 ml DMSO und 24 ml 50 %-igem Ethanol versetzt und die enthaltenden Isoflavone bei 60 °C für 20 min im Ultraschallbad gelöst. Nach dem Abkühlen wurde der Extrakt in einen 25-ml Maßkolben filtriert und gegebenenfalls mit Ethanol (50 %) aufgefüllt. Diese Lösung wurde direkt weiterverwendet oder bei 5 °C gelagert.

Die Soja-haltigen festen Füllungen wurden mit 1 ml DMSO und 24 ml Methanol (80 %) versetzt und bei 60 °C für 20 min im Ultraschallbad extrahiert. Die fetthaltige Weichkapsel wurde zur weiteren Bearbeitung bei -60 °C eingefroren, mit einem Skalpell angeritzt und der gefrorene Inhalt als Ganzes entfernt. Für die anschließende Isolierung der Isoflavone wurden 100 mg davon in einen Erlenmeyerkolben genau eingewogen und analog zu den anderen Soja-NEM aufgearbeitet.

2. Referenzsubstanzen

Zur Herstellung der Standardlösungen wurden folgende Reinsubstanzen gekauft:

Biochanin A	LKT Laboratories, Inc., USA
Daidzein	LKT Laboratories, Inc., USA
Daidzin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth
Formononetin	Carl Roth, Karlsruhe
Genistein	Sigma, Steinheim
Genistin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth
Glycitein	PhytoLab, Vestenbergsgreuth
Glycitin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth

Material & Methoden

Biochanin A, Daidzein, Formononetin, Genistein und Glycitein wurden jeweils in 50 %-igem Ethanol gelöst, so dass sich eine Endkonzentration von ~ 1 mg/ml ergab. Für die drei Glykoside Daidzin, Genistin und Glycitin diente Methanol (80 %) als Lösungsmittel. Die Stammlösungen wurden bei -15 °C unter Lichtausschluss gelagert und bei Bedarf auf die gewünschte Endkonzentration mit dem entsprechenden Lösungsmittel verdünnt.

3. HPLC

3.1 Quantifizierung

Rotklee-haltige Präparate

HPLC- Instrumentierung	HP 1090 Series II Mainframe, Binary Solvent Delivery System #031, Autosampler #048, Diode Array Detector (DAD) #83 HPLC ChemStation Software (Hewlett Packard, Böblingen)	
Stationäre Phase	Vorsäule: Vertex-Säule 5*4 mm für Eurospher 100-5 C18 Trennsäule: Eurospher 100-5 C18, 250*4 mm (Bruker, Ettlingen)	
Mobile Phase	A: Acetonitril B: Aqua bidest.	
Gradient	t (min)	%A
	0	35
	11	48
	20	48
	22	35
Flußrate	0,7 ml/min	
Aufgabevolumen	10 µl	
Detektion	UV (260 nm)	

Material & Methoden

Soja-haltige Präparate

HPLC- Instrumentierung	HP 1090 Series II Mainframe, Binary Solvent Delivery System #031, Autosampler #048, Diode Array Detector (DAD) #83 HPLC ChemStation Software (Hewlett Packard, Böblingen)	
Stationäre Phase	Vorsäule: Vertex-Säule 5*4 mm für Eurospher 100-5 C8 Trennsäule: Eurospher 100-5 C8, 250*4 mm (Bruker, Ettlingen)	
Mobile Phase	A: Acetonitril B: Aqua bidest.	
Gradient	t (min)	%A
	0	20
	13,5	28
	18	40
	20	20
Flußrate	0,6 ml/min	
Aufgabevolumen	10 µl	
Detektion	UV (260 nm)	

Bestimmungsgrenze, Nachweisgrenze:

Die Berechnung erfolgte mithilfe der Steigung der jeweiligen Kalibriergeraden und der Ermittlung der Standardabweichung in der Nähe der Nachweisgrenze durch Chromatographierung stark verdünnter Standardlösungen.

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s}{m}$$

Die Berechnung der Nachweisgrenze ergab sich mithilfe folgender Formel:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot s}{m}$$

s Standardabweichung in der Nähe der Nachweisgrenze

m Steigung der Kalibriergeraden

Material & Methoden

3.2 MS-Untersuchungen

Die Probe wurde mit einem Agilent 6210 ESI-TOF Massenspektrometer, Agilent Technologies, USA, vermessen. Die Flussrate betrug 4 µl/min, die Sprayspannung 4 kV. Das Desolvatisierungsgas wurde auf 15 psi (1 bar) gesetzt. Alle anderen Parameter wurden für eine maximale Abundanz des jeweiligen $[M+H]^+$ optimiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der MassHunter Workstation Software.

Rotklee-haltige Präparate

HPLC-Instrumentierung	Accurate-Mass TOF LC/MS Agilent Serie 1100 (USA)	
Stationäre Phase	Vorsäule: Vertex-Säule 5*4 mm für Eurospher 100-5 C18 Trennsäule: Eurospher 100-5 C18, 250*4 mm (Bruker, Ettlingen)	
Mobile Phase	A: Acetonitril B: Aqua bidest.	
Gradient	t (min)	%A
	0	35
	11	48
	20	48
	22	35
Flußrate	0,7 ml/min	
Aufgabevolumen	10 µl	
Detektion	Time-of-flight-Detektor	

Soja-haltige Präparate

HPLC-Instrumentierung	Accurate-Mass TOF LC/MS Agilent Serie 1100 (USA)	
Stationäre Phase	Vorsäule: Vertex-Säule 5*4 mm für Eurospher 100-5 C8 Trennsäule: Eurospher 100-5 C8, 250*4 mm (Bruker, Ettlingen)	
Mobile Phase	A: Acetonitril B: Aqua bidest.	
Gradient	t (min)	%A
	0	20
	13,5	28
	18	40
	20	20
Flußrate	0,6 ml/min	
Aufgabevolumen	10 µl	
Detektion	Time-of-flight-Detektor	

Material & Methoden

3.3 Probengewinnung für die FTIR-Untersuchungen

Rotklee-haltige Präparate

HPLC- Instrumentierung	Wellchrom Solvent Organizer K-1500, HPLC Pump K-1001, Lamp K-2701 DAD K-2700, Clarity Chrom Software (Knauer, Berlin)	
Stationäre Phase	Vorsäule: Vertex-Säule 5*4 mm für Eurospher 100-5 C18 Trennsäule: Eurospher 100-5 C18, 250*4 mm (Bruker, Ettlingen)	
Mobile Phase	A: Acetonitril B: Aqua bidest.	
Gradient	t (min)	%A
	0	55
	10	55
	25	70
	30	55
Flußrate	0,7 ml/min	
Aufgabevolumen	200 µl	
Detektion	UV (260 nm)	

Soja-haltige Präparate

HPLC- Instrumentierung	Wellchrom Solvent Organizer K-1500, HPLC Pump K-1001, Lamp K-2701 DAD K-2700, Clarity Chrom Software (Knauer, Berlin)	
Stationäre Phase	Vorsäule: Vertex-Säule 5*4 mm für Eurospher 100-5 C18 Trennsäule: Eurospher 100-5 C18, 250*4 mm (Bruker, Ettlingen)	
Mobile Phase	A: Acetonitril (50%) B: Aqua bidest.	
Gradient	t (min)	%A
	0	20
	25	50
	30	90
	32	20
	37	20
Flußrate	1,2 ml/min	
Aufgabevolumen	200 µl	
Detektion	UV (260 nm)	

4. Dünnschichtchromatographische Verfahren

4.1 Materialien und Geräte

Dichlormethan	KMF Laborchemie, Lohmar
Essigsäure wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylacetat	VWR, Darmstadt
Methanol	Fischer Scientific, Schwerte
HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 20 x 10 cm, Nr. 1.05642.0001, Charge HX933255	Merck, Darmstadt
Auftragegerät Linomat IV	Camag, Schweiz
Horizontal-Entwicklungskammer für Plattenformat 20 x 10 cm	Camag, Schweiz
CabUVIS Analysenlampe mit DigiDoc-Aufsatz	DESAGA, Wiesloch
TLC-Scanner mit TLC Scanner Version 1.0 Software	J&M, Essingen
Auswertungssoftware Spectralys 1.82	J&M, Essingen

4.2 Fließmittelentwicklung

Zur Findung des optimalen Fließmittels wurde das Optimierungsschema der Firma CAMAG verwendet. Es basiert auf der Selektivität von Lösungsmitteln nach Snyder (1978), wobei drei Kategorien an Lösungsmitteln unterschieden werden: Protonenakzeptoren, Protonendonatoren und Dipole. Diese sind in einem Dreieckskoordinatensystem aufgetragen und ergeben aufgrund von Überschneidungen in den Eigenschaften acht Selektivitätsgruppen.

Material & Methoden

Klasse	Beispiele
I	<i>n</i> -Butylether, Isopropylether
II	2-Propanol, Ethanol, Methanol
III	Pyridin, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid
IV	Formamid, Eisessig
V	1,2-Dichlorethan, Methylenechlorid
VI	Acetonitril, Ethylacetat, Methylethylketon
VII	Nitrobenzol, Toluol
VIII	Chloroform, Nitromethan

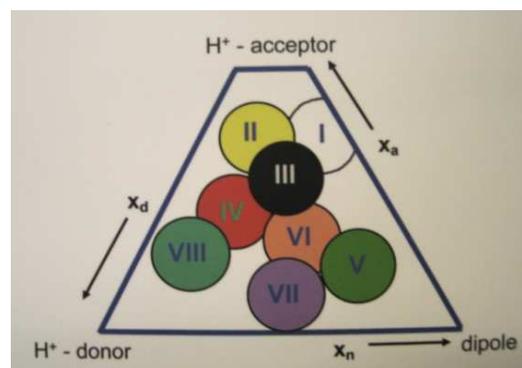


Abb. 20: Selektivitätsdreieck nach Snyder (1993)

Abb. 19: Selektivitätsklassen nach Snyder

In der ersten Stufe werden die reinen Lösungsmittel aus den acht Selektivitätsgruppen zur Elution verwendet. Anschließend werden diejenigen ausgewählt, die die beste Auftrennung der Analyten zeigen. Die Fließmittel mit einem R_f -Wert $< 0,2$ werden mit kleinen Mengen an Modifiern (Wasser, Methanol, Diethylamin, Ameisensäure) versetzt, um R_f -Werte zwischen 0,2 und 0,8 zu erhalten. Die dritte Stufe kombiniert die Fließmittel aus Stufe 2, die die besten Ergebnisse geliefert haben, in unterschiedlichen Proportionen zueinander. In der letzten Stufe werden die optimalen Fließmittelkombinationen feinabgestimmt, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

Rotklee-haltige Präparate

Für die Rotklee-NEM erwies sich eine Mischung von Dichlormethan: Eisessig: Ethylacetat (12: 2:1, Vol%) als optimale mobile Phase.

Soja-haltige Präparate

Die Soja-Isoflavone konnten am besten mit Ethylacetat: Eisessig (6: 4, Vol%) als Fließmittel getrennt werden.

Material & Methoden

4.3 Probenauftragung

Die HPTLC-Platten wurden in einer Flachbodenkammer mit reinem Methanol vorgereinigt, indem sie einmal bis zum oberen Plattenrand eluiert wurden. Die Platten wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Lösungen der Proben und der Standardsubstanzen wurden mit dem Linomat IV Auftragegerät in 8 mm breiten Banden auf der Startlinie aufgetragen. Der Abstand zum seitlichen Plattenrand betrug 11 mm und zum unteren Plattenrand 15 mm. Zwischen den Banden wurde ein Abstand von 2 mm gelassen. Die Auftragegeschwindigkeit betrug 1 µl/ 15 s. Jeder Extrakt wurde dreifach aufgetragen in fünf verschiedenen Konzentrationen, um den erwarteten Konzentrationsbereich abzudecken.

Rotklee-haltige Präparate

Menoflavon (Volumen in µl):

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Formononetin (0,3mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Biochanin A (0,347mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Extrakt (100mg/ 25ml)			5						5						5			

Rotkleekapseln (Volumen in µl):

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Daidzein (0,140mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Glycitein (0,032mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Formononetin (0,3mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Biochanin A (0,12mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Extrakt (100mg/ 25ml)			5						5						5			

Soja 60 C (Volumen in µl):

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Daidzein (0,08mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Genistein (0,029mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Formononetin (0,278mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Biochanin A (0,066mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Extrakt (200mg/ 25ml)			5						5						5			

Material & Methoden

Soja-haltige Präparate

Alsifemin (Volumen in µl):

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Daidzin (0,40 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Glycitin (0,20 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Genistin (0,054 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Extrakt (100mg/25 ml)			5						5						5			

Femiflavin (Volumen in µl):

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Daidzin (0,20 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Glycitin (0,05 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Genistin (0,27 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Extrakt (100mg/ 25ml)			3						3						3			

Phyto Soya 17,5 mg (Volumen in µl):

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Daidzin (0,20 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Glycitin (0,05 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Genistin (0,054 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Extrakt (200mg/ 25ml)			3						3						3			

Phyto Soya 35 mg (Volumen in µl):

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Daidzin (0,20 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Glycitin (0,10 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Genistin (0,054 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Extrakt (100mg/ 25ml)			3						3						3			

Soja 60 C (Volumen in µl):

Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Daidzin (0,10 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Glycitin (0,02 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Genistin (0,135 mg/ ml)	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5	1	2		3	4	5
Extrakt (100mg/ 25ml)			3						3						3			

4.4 Chromatographische Entwicklung

Nach dem Auftragen der Untersuchungs- und Referenzlösungen wurden die Platten für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das jeweilige Fließmittel wurde frisch hergestellt, der Boden der Horizontal-Entwicklungskammer zur Konditionierung mit einem Teil des Fließmittels bedeckt und die Platte mit der Kieselgelseite nach unten in der Kammer horizontal positioniert. Da die Chromatographie nur von einer Seite erfolgen sollte, wurde ein Fließmittelreservoir mit der mobilen Phase befüllt und die Platte für 15 min konditioniert. Daraufhin wurde durch Umlegen des Glasstreifens der Entwicklungsvorgang gestartet (Abbildung 21).



Abb. 21: Aufbau der Horizontal-Entwicklungskammer der Firma CAMAG

Die Entwicklung erfolgte über eine Distanz von 80 mm und dauerte jeweils 15 min für die Rotklee-NEM und 25 min für die Soja-NEM. Im Anschluß wurde das Fließmittel bei Raumtemperatur vollständig abgedampft, so dass die HPTLC-Platten zum Scannen vorbereitet waren.

4.5 Dokumentation

Die Platte wurde im CabUVIS Dokumentationsgerät bei 254 und 366 nm betrachtet und mithilfe einer Kamera dokumentiert. Am oberen linken Rand wurden der Präparatename sowie das Datum zur Identifizierung mit einem Bleistift vermerkt.

4.6 Quantitative Auswertung

Die entwickelten Platten wurden densitometrisch ausgewertet. Dafür wurde der TLC-Scanner von J&M mit der TLC Scanner Version 1.0 Software verwendet. Der Scanner wurde programmiert, die einzelnen Bahnen von der Startlinie bis zur Fließmittelfront zu vermessen. Dies erfolgte im Absorptionsmodus über einen Bereich von 200-400 nm. Anhand der 3D-Darstellung der Bahnen konnte bereits das Substanzen-Verteilungsmuster begutachtet werden. Die R_f -Werte und die UV-Spektren der einzelnen Isoflavone wurden bestimmt. Die quantitative Auswertung wurde mithilfe der Spectralys 1.82 Software durchgeführt, indem die Flächen der einzelnen Substanzpeaks bei 260 nm durch Integration ermittelt wurden. Der Gehalt der Standardlösungen wurde gegen die Flächen aufgetragen und dadurch Kalibrierungskurven erstellt.

4.7 Methodvalidierung

Selektivität:

Zur Ermittlung der Selektivität wurden Probe- und Analysenlösung (Gemisch der Referenzen) parallel auf einer HPTLC-Platte chromatographiert. Die Banden wurden dann anhand ihres R_f -Wertes, ihres optischen Verhaltens bei UV 254 und 366 nm sowie anhand des UV-Spektrums identifiziert.

Messbereich, Linearität:

In einem Vorversuch wurde die aufzutragende Menge an Probelösung ermittelt. Dabei sollte das Auftragevolumen ausreichend sein, um die gewünschten Inhaltstoffe quantifizieren zu können, jedoch nicht größer als nötig, um Analysenzeit zu sparen und ein mögliches Tailing auf der Platte bei Überladung zu verhindern. Die Kalibrierlösungen werden so gewählt, dass der zu erwartende, zuvor über HPLC bestimmte, Gehalt ungefähr auf der Mitte der Kalibriergeraden zu finden ist. Es werden 6 äquidistante Konzentrationen der Kalibrierlösungen aufgetragen und mit der Untersuchungslösung vermessen.

Material & Methoden

Wiederholpräzision:

Je Drogenprobe werden 6 Untersuchungslösungen hergestellt und mit jeweils 5 Levels an Kalibrierungslösungen dreifach auf eine Platte aufgetragen.

Die Durchschnittsgehalte werden ermittelt und innerhalb der Platte sowie zwischen den Platten verglichen. Die Wiederholpräzision ist akzeptierbar, wenn der Varianzkoeffizient $V_k \leq 15\%$ ist.

Robustheit:

Stabilität der Analyten während der Chromatographie:

1 μl Probelösung wird punktförmig an dem linken unteren Plattenrand aufgetragen und einmal im verwendeten Fließmittel entwickelt, nach Trocknen wird die Platte um 90° gedreht und in frischem Fließmittel ein zweites Mal entwickelt. Das Ergebnis wird photographisch bei 366nm und 254 nm dokumentiert. Die Probe ist stabil während der Chromatographie, wenn alle Zonen auf der Winkelhalbierenden liegen.

Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte:

Es ergibt sich folgendes Auftrageschema für die Proben (Volumen jeweils 5 μl):

- 1.) Probe, aufgetragen 3 Stunden vor der Chromatographie (mit Alufolie vor Licht geschützt)
- 2.) frische Probe, aufgetragen kurz vor der Chromatographie
- 3.) frische Probe, aufgetragen kurz vor der Chromatographie
- 4.) Probe, aufgetragen 3 Stunden nach der Extraktion

Die Probe ist mindestens 3 Stunden in Lösung und 3 Stunden auf der Platte stabil, wenn sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Bandenintensität, Farbe und der R_f -Werte ergeben. Die Banden werden optisch und mithilfe des Densitogramms verglichen.

Richtigkeit:

Die Richtigkeit wurde durch Vergleich mit der HPLC-Methode als unabhängiges, validiertes Prüfverfahren nachgewiesen (Methodenvergleich). Zur Überprüfung wurde die Wiederfindung bestimmt.

Nachweisgrenze:

Es wurden die Konzentrationen an einzelnen Isoflavonen bestimmt, bei denen sie gerade noch zuverlässig nachweisbar sind, sprich wo das Signal-Rausch-Verhältnis 1:3 war. Dazu wurden die einzelnen Stammlösungen stark verdünnt, auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und vermessen.

Bestimmungsgrenze:

Die Bestimmungsgrenze wurde als kleinste quantitativ ermittelbare Konzentration der Analyten berechnet, entsprechend einem Signal-Rausch-Verhältnis von 1:10.

5. FTIR-ATR-Spektroskopie

5.1 Geräte und Software

Savant SPD111V Speedvac Concentrator	Thermo Scientific, Schwerte
FTIR-Spektrometer Spectrum 100 mit Diamant/ZnSe ATR, Spectrum for Windows Software und Spectrum Quant+- Software	Perkin-Elmer, Rodgau- Jügesheim
Opus IR Software	Bruker Optik, Ettlingen

5.2 Extraktvorbehandlung

Aus den NEM wurden Extrakte hergestellt wie unter Punkt 1.2 beschrieben. 500 µl je Extrakt wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Das Extraktionsmittel musste entfernt werden, da die Konzentration der Isoflavone in dem unbehandelten Extrakt zu gering war und das gemessene IR-Spektrum störende Absorptionsbanden im Bereich von 3500- 3000 cm^{-1} und 1700- 1000 cm^{-1} aufwies. Diese Banden würden wichtige Bereiche der Isoflavone im IR-Spektrum überlagern. Deshalb wurde das Extraktionsmittel bei 45 °C im SpeedVac Concentrator evaporiert. Die resultierenden Trockenextrakte konnten mit einem Spatel auf den Diamanten der ATR-Einheit aufgetragen und vermessen werden.

Material & Methoden

Um einen Kalibrationsbereich zu erzeugen, wurden den Extrakten definierte Mengen der Standards zugesetzt, anschließend wurden diese gespikten Lösungen ebenfalls im Vakuum einrotiert und spektrometrisch vermessen. Da auch der untere Bereich der Kalibrierung abgedeckt werden sollte, wurden die Extrakte jeweils in die HPLC eingespritzt (siehe 3.3). Die einzelnen Läufe wurden aufgefangen, wobei jeweils ein Inhaltsstoff dabei ausgelassen wurde, um einen Extrakt ohne das entsprechende Isoflavon zu erzeugen. Diese Lösung wurde entweder sofort einrotiert oder mit definierten Mengen an Standard gespikt und dann evaporiert. Für die Soja-NEM musste der Extrakt im Verhältnis 1:1 mit Reinstwasser gemischt werden vor der Injektion, da er zu konzentriert war. Um eine auswertbare Menge der Probe zu gewinnen, musste der HPLC-Lauf mit anschließender Einrotierung zur Trockne (Hochvakuum bei 60 °C) an dem SpeedVac Concentrator für Rotklee jeweils dreimal und für Soja jeweils fünfmal absolviert werden. Es ergaben sich so pro Nahrungsergänzungsmittel 67 Proben, also 201 Proben für die Rotklee- und 335 Proben für die Soja-Präparate.

5.3 Modellentwicklung

Vor der weiteren Bearbeitung der IR-Spektren wurde in der Spectrum for Windows Software eine interaktive Basislinienkorrektur durchgeführt. Dieser Prozess dient dazu, Spektren zu korrigieren, ohne Bandenintensitäten zu verfälschen. Basislinienabschnitte der Spektren werden erkannt und Daten von Peaks übersprungen, um eine geglättete Annäherung an die Basislinie zu erzeugen, welche daraufhin vom Originalspektrum subtrahiert wird.

Für die qualitative Analyse wurden außerdem zusätzlich jeweils die erste und die zweite Ableitung der Spektren gebildet. Durch die erste Ableitung erlangen Signale mit steilem Anstieg eine höhere Bedeutung als flachere Strukturen und lassen sich damit besser auswerten. Bei der zweiten Ableitung lassen sich auch „flachere“ Strukturen auswerten, allerdings gewinnt auch das spektrale Rauschen an Einfluß und kann dadurch die Spektrenqualität wieder verschlechtern.

Da besonders in der Reflexionsspektroskopie Variationen durch wellenlängenabhängige Lichtstreuung beobachtet werden können, bedient man sich einer Streuungskorrektur, Standard Normal Variate (SNV) genannt. Die Streuung aller Referenzproben wird dabei abgeschätzt und die mittlere Streuung daraus berechnet. Alle Proben werden schließlich auf dieselbe, nämlich die mittlere, Streuung normiert.

Durch Kombination verschiedener Datenvorbehandlungen und Wellenzahlenbereiche konnten nun Modelle erstellt und validiert werden.

5.4 Multivariate Datenanalyse

Die Quantifizierung der Isoflavone erfolgte mithilfe der Quant+-Software. Dazu wurden die Spektren der Proben eingelesen und eine PLS-Regression durchgeführt. Die Spektrenvorbereitung für die multivariate Analyse beinhaltete die Auswahl eines spektralen Wertebereiches und von der Analyse ausgeschlossene Bereiche (Blanks), eine Versatzkorrektur, die Bildung der 1. und 2. Ableitung mithilfe der Savitzky-Golay-Funktion über ein 9-Meßpunkte Intervall und eine Streuungskorrektur (SNV= Standard Normal Variate), um multiplikative Interferenzen durch Lichtstreuung und Partikelgröße zu umgehen.

5.5 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse wurde mit der Opus-Software realisiert. Der gesamte Spektralbereich wurde zum Clustern eingelesen. Die spektralen Distanzen wurden über den quadrierten Euklidischen Abstand ermittelt und die Dendrogramme unter Verwendung des Wards Algorithmus erstellt.

6. Raman-Spektroskopie

Die Ramanmessungen wurden an einem FT-Raman Spectrometer der Firma Bruker Optik GmbH, Ettlingen, mit motorisiertem Probentisch und Videosteuerung durchgeführt. Zur Anregung diente ein NIR-Laser (Nd:YAG 1064 nm Anregungswellenlänge, 1000 mW), das Gerät war weiterhin ausgestattet mit einem mit Flüssigstickstoff gekühlten Detektor (ID418-TF, DET GE Raman), RamanScope mit 10fach, 40fach und 100fach Objektiv und der Software OPUS 6.5. Die Messungen erfolgten bei einer Laserenergie von 10- 200 mW je nach Beschaffenheit der Probe. Für jede Analyse wurden 36 Scans/Spektrum aufgenommen über einen Wellenlängenbereich von 100- 4000 cm^{-1} .

Ergebnisse

1. Quantifizierung von Isoflavonpräparaten mittels HPLC

1.1 Rotklee-Präparate

Von den drei untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln auf der Basis von Rotklee wurden ethanolische Extrakte hergestellt wie unter Material & Methoden 1.3 beschrieben. Diese wurden anschließend mittels HPLC mit DAD auf die enthaltenen Isoflavone hin untersucht. Zur HPLC-Untersuchung von Rotklee mit gibt es bereits verschiedene Publikationen (He et al., 1996; Krenn et al., 2002; Ramos et al., 2008). Die dabei entwickelten Methoden sind jedoch größtenteils recht zeitaufwendig mit 40- 60 min je nach Methode, so dass es ein Ziel war, eine Optimierung der Analysenzeit zu erreichen.

Bei der Detektion mit einem Diodenarraydetektor kann das gesamte UV-Spektrum eines Peaks aufgenommen werden. Isoflavone zeigen üblicherweise zwei Maxima im ultravioletten Bereich, wobei das eine deutlich schwächer ausfällt, mitunter nur als Schulter auftritt. Daidzein und Formononetin besitzen das gleiche UV-Spektrum mit zwei Maxima bei 250 und 305 nm. Als einziger struktureller Unterschied liegt bei Formononetin an Position 4' eine Methoxy- statt einer Hydroxygruppe wie bei Daidzein vor. Auch Biochanin A und Genistein weisen ein gleiches UV-Spektrum aus dem gleichen Grund wie bei Daidzein und Formononetin auf. Durch die Möglichkeit einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe an C-5 und der Ketogruppe an C-4 verschieben sich die Maxima zu 260 und 330(sh) nm. Glycitein hat bei 272 und 320 nm je ein Maximum.

Ergebnisse

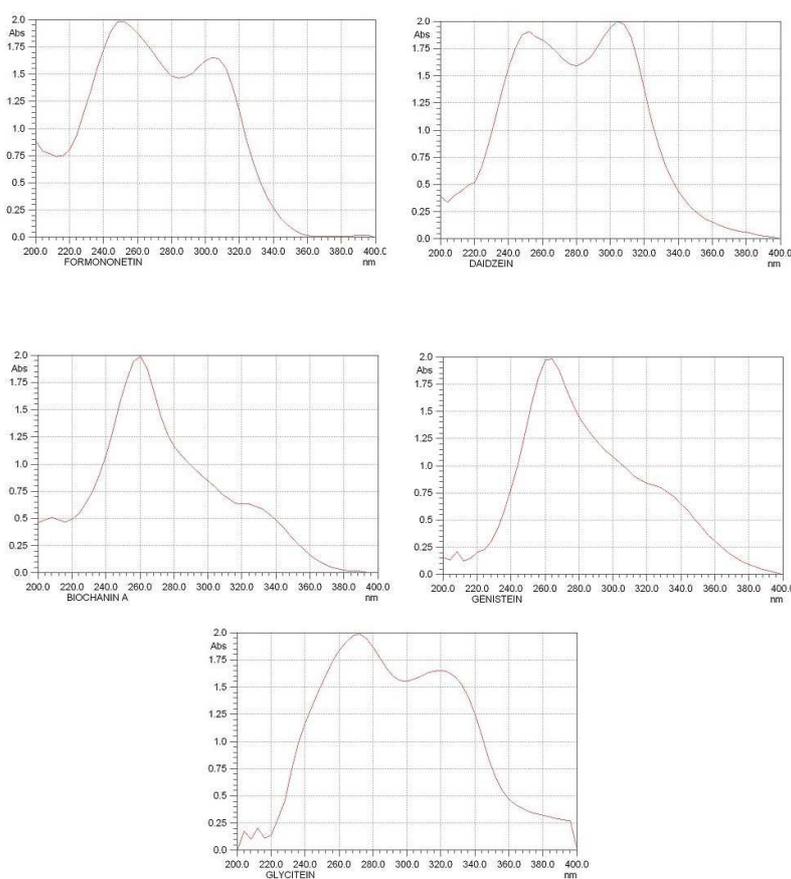


Abb. 22: UV-Spektren der fünf Hauptisoflavone in Rotklee

In den HPLC-Chromatogrammen aller Rotkleepräparate sind die fünf Hauptisoflavone erkennbar. Mit der verwendeten Methode konnten alle wichtigen Peaks basisliniengetreunt werden. Viele weitere Nebenverbindungen sind ebenfalls vorhanden, die zum Großteil laut ihrer UV-Spektren wahrscheinlich auch Isoflavone darstellen. Die drei Präparate zeigen deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der einzelnen Isoflavone (siehe Abbildung 22). Formononetin stellt zwar in allen Extrakten die Hauptkomponente dar, jedoch variieren die weiteren Bestandteile.

Als erstes Hauptisoflavon eluiert bei der angewendeten Methode Daidzein (1) nach 7,3 Minuten, kurz danach Glycitein (2) nach 8,0 Minuten. Genistein (3) besitzt zwar eine Hydroxygruppe mehr als Daidzein, ist aber wegen der bereits erwähnten intramolekularen Wasserstoffbrücke nach außen lipophiler und besitzt deshalb eine Retentionszeit von 10,7 Minuten. Nach 13,8 Minuten konnte Formononetin (4) und als letzte Majorkomponente das lipophile Biochanin A (5) nach 20,5 Minuten detektiert werden. Bei dem Präparat Soja 60 C sind im vorderen Teil des Chromatogramms zusätzlich die hydrophilen Glykoside aus Soja zu sehen.

Ergebnisse

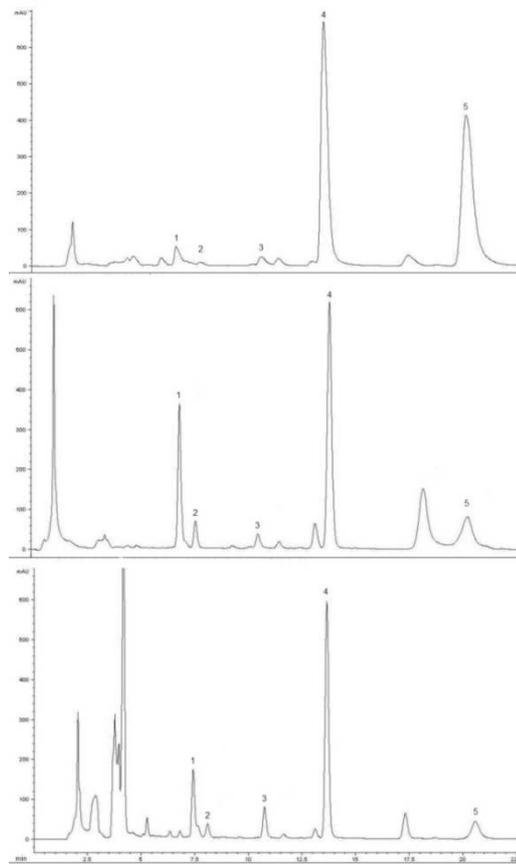


Abb. 23: Chromatogramme der Extrakte von Menoflavon®, Rotklee Kapseln und Soja 60 C (von oben nach unten); Reihenfolge der Elution: Daidzein (1), Glycitein (2), Genistein (3), Formononetin (4), Biochanin A (5)

Um ein bestmögliches Extraktionsmittel zu finden, wurden alkoholisch-wässrige Extrakte der einzelnen NEM hergestellt und über eine HPLC-Analyse miteinander verglichen bezüglich ihres Gehaltes an Isoflavonen. Dabei konnte mit Ethanol (50 %) die höchste Menge erhalten werden, das zweitbeste Extraktionsmittel war Methanol (80 %). Aus diesem Grund erfolgte die weitere Probenaufarbeitung für Nahrungsergänzungsmittel aus Rotklee mit 50 %-igem Ethanol als Solvent. Die einzelnen Präparate wurden jeweils für 20 Minuten bei 60 °C im Ultraschallbad extrahiert, da sich diese Methode in Vorversuchen als geeignetste erwies. Bei den drei Produkten handelte es sich um Hartkapseln mit pulverförmigem Inhalt, allerdings war schon bei der Extrakterstellung ein Unterschied in den Matrices erkennbar, da die Probelösungen unterschiedlich gefärbt waren und verschiedene Mengen an Filtrerrückstand nach der Extraktion vorlagen.

Ergebnisse

Zur Quantifizierung wurden externe Kalibrierfunktionen mit den fünf Majorisoflavonen erstellt. Zu diesem Zweck wurden fünf verschiedene Konzentrationen der Stammlösungen, die den erwarteten Arbeitsbereich abdeckten, dreifach chromatographiert. Die Identifizierung der in den NEM enthaltenen Isoflavone erfolgte anhand der Retentionszeiten und UV-Spektren im Vergleich mit den Referenzmaterialien. Dazu wurden die Standardsubstanzen genau eingewogen und mit Ethanol (50 %) zu Stammlösungen gelöst. Je nach gewünschter Konzentration wurden daraus Verdünnungen hergestellt, wobei dafür wieder Ethanol (50 %) als Solvent verwendet wurde. Die resultierenden Konzentrationsbereiche lagen bei 50- 250 mg/ l für Formononetin, bei 25- 200 mg/ l für Biochanin A, bei 6,3- 230 mg/ l für Daidzein, bei 6- 24,5 mg/ l für Glycitein und bei 4,9- 49 mg/ l für Genistein. Die einzelnen Kalibrierfunktionen zeigten eine gute Linearität mit Korrelationskoeffizienten von 0,99592-0,99984. Die Parameter für die Geradengleichungen der jeweiligen Isoflavone entsprechend der Formel Fläche= A+ B*Konzentration [mg/ l] lauten wie folgt:

	Präzision (A)	Empfindlichkeit (B)
Daidzein	92,6	43708,3
Glycitein	34,4	42705,5
Genistein	73,5	55444,1
Formononetin	273,5	36117,6
Biochanin A	-384,7	60699,5

Tab.1: Kenndaten der Kalibrierreihen für die aufgeführten Isoflavone

Die Nachweisgrenze (limit of detection; LOD) wird definiert als der niedrigste Meßwert, bei dem mit festgesetzter statistischer Sicherheit ein Analyt qualitativ nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz dazu ist die Bestimmungsgrenze (limit of quantification; LOQ) die kleinste Konzentration, bei der ein Analyt mit einer definierten Präzision quantitativ bestimmt werden kann. Erst oberhalb dieser Grenze sind zuverlässige Quantifizierungsergebnisse möglich. Zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die fünf Hauptisoflavone wurden deren Standardlösungen sehr stark verdünnt und die Standardabweichung in der Nähe der Nachweisgrenze im HPLC-Chromatogramm untersucht.

Ergebnisse

Zusammen mit der Steigung der jeweiligen Kalibriergeraden ergaben sich folgende Werte (Gleichungen zur Berechnung siehe Material & Methoden 3.1):

	Daidzein	Glycitein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
Nachweisgrenze [$\mu\text{g/l}$]	151	271	495	115	142
Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/l}$]	457	822	1501	350	431

Tab. 2: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Rotklee-Isoflavone

Die Wiederholpräzision der Bestimmung wurde durch je sechs Einspritzungen der untersuchten Extrakte ermittelt. Die Streuung der Messwerte ist in der nachstehenden Tabelle zusammen mit der Verteilung der Isoflavone in den Rotkleepräparaten dargestellt. Die Werte beziehen sich jeweils auf den Gehalt des Inhaltes einer Kapsel. Das dominierende Isoflavon ist Formononetin mit einem Anteil von 55,1- 67,0 % am Gesamtgehalt, gefolgt von Biochanin A bei Menoflavin® (40,2 %) und Daidzein bei Rotklee Kapseln (21,4 %) und Soja 60 C (13,9 %). Alle weiteren quantifizierten Isoflavone betragen zwischen 0,8 % und 10,9 % der Gesamtisoflavonmenge.

	Menoflavin® 487,1 mg	Rotklee 504,8 mg	Soja 60 C 446,1 mg
Daidzein	1,2 ± 0,1	9,4 ± 0,8	2,2 ± 0,1
Glycitein	0,3 ± 0,03	2,2 ± 0,2	0,8 ± 0,1
Genistein	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,6	1,0 ± 0,1
Formononetin	23,3 ± 0,7	26,3 ± 1,0	10,4 ± 0,2
Biochanin A	17,0 ± 0,1	4,8 ± 0,2	1,2 ± 0,02
Gesamtgehalt	42,2 ± 1,0	43,8 ± 2,7	15,6 ± 0,5
Deklariertes Gehalt	40	40	10

Tab. 3: Ermittelte Isoflavon-Gehalte im Vergleich zu den Angaben des Herstellers (in mg)

Bei Menoflavin® liegt wie zu sehen der ermittelte Gesamtgehalt noch innerhalb eines akzeptierbaren Bereiches im Verhältnis zur Herstellerangabe. Bei dem Präparat Rotklee Kapseln fällt diese Differenz größer aus, der Wert für die fünf Hauptisoflavone liegt insgesamt 9,5 % über dem ausgelobten Wert des Herstellers.

Das dritte untersuchte Nahrungsergänzungsmittel Soja 60 C enthält neben dem Rotklee-Extrakt zusätzlich einen Soja-Extrakt, so dass sich daraus die deutlich erhöhte Abweichung von 54,8 % über der Angabe auf der Verpackung erklären könnte. Die Aglyka Daidzein, Glycitein und Genistein könnten möglicherweise durch Hydrolyse der entsprechenden Glykoside des Soja-Extraktes entstanden sein und nicht aus dem Rotklee stammen.

Ergebnisse

1.2 Soja-Präparate

Soja wurde mittels HPLC in der Vergangenheit von einigen Arbeitsgruppen analysiert. Dabei handelte es sich jedoch größtenteils um Nahrungsmittel wie Sojamehl und Tofu oder um Metabolisierungsprodukte im Urin (Franke et al., 1995; Peñalvo et al., 2004; da Costa César et al., 2006). Heidi Schwartz untersuchte in ihrer Dissertation u.a. Nahrungsergänzungsmittel aus Soja, dabei fand aber die Detektion mit einem coulometrischen Elektroden-Array-Detektor statt. Die dazugehörige HPLC-Methode war wiederum recht zeitintensiv (Heidi Schwartz, 2008).

Die fünf verwendeten Nahrungsergänzungsmittel aus Soja wiesen unterschiedliche Darreichungsformen auf. Bei vier Präparaten handelte es sich um Hartkapseln mit pulverisiertem Inhalt, denen laut Verpackung eine Reihe von weiteren Stoffen wie Vitaminen und Mineralstoffen zugesetzt worden ist, die eventuell die Analyse stören könnten. Die Zubereitung Femiflavon® enthielt eine ölige Suspension in einer Weichkapsel, so dass sie vor der Extraktion bei -80°C eingefroren und mit einem Skalpell aufgeschnitten werden musste, um eine definierte Menge an Inhalt einwiegen zu können. Für die Soja-NEM wurden ebenfalls Vorversuche durchgeführt, um ein optimales Extraktionsmittel mit entsprechenden Extraktionsbedingungen zu finden. Durch die Zugabe von 1ml DMSO erfolgte ein Anlösen des Kapselinhaltes, was aufgrund der schlechten Löslichkeit einiger Isoflavone wie z.B. Glycitin nötig erschien. Daraufhin wurde mit Methanol (80 %) als Solvent für 20 Minuten bei 60 °C im Ultraschallbad extrahiert. Bei diesem Aufarbeitungprozess waren weder Entfetten mit Hexan noch andere Abtrennungsschritte erforderlich.

Die drei Hauptisoflavone Daidzin, Glycitin und Genistin konnten durch Vergleich der Retentionszeiten mit Referenzsubstanzen und über ihre UV-Spektren identifiziert werden. Die UV-Spektren der Glykoside zeigten im Vergleich zu den Aglyka eine leichte bathochrome Verschiebung, das Muster mit seinen beiden Maxima war hingegen jeweils gleich. Als erstes eluierte Daidzin (**1**) nach 11,8 Minuten, gefolgt von Glycitin (**2**) nach 12,3 Minuten, welches aufgrund der zusätzlichen Methoxygruppe lipophiler ist. Genistin (**3**) enthält zwar eine Hydroxygruppe mehr als Daidzin, allerdings bildet diese wie beim Genistein mit der benachbarten Ketogruppe eine intramolekulare Wasserstoffbrücke aus, weshalb es schließlich erst nach 15,7 Minuten detektiert werden kann. In den Chromatogrammen ist zu erkennen, dass die Glykoside der Isoflavone dominieren, da kaum andere Substanzpeaks, vor allem im später eluierenden, lipophilen Bereich zu sehen sind.

Die Schwankungen zwischen den fünf Präparaten bezüglich der Isoflavonverteilung sind stark ausgeprägt, wie an drei exemplarisch ausgewählten Chromatogrammen zu sehen.

Ergebnisse

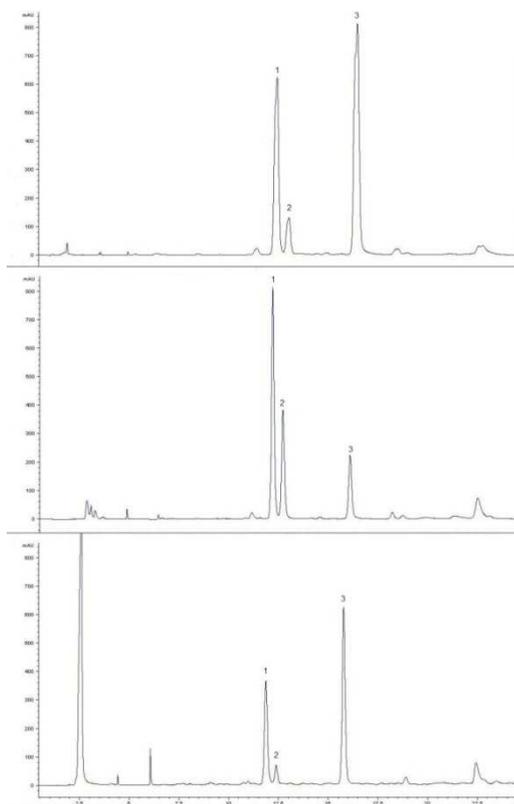


Abb. 24: HPLC-DAD-Chromatogramm der Extrakte von Femiflavon®, Phyto Soja @ 35 und Soja 60 C (von oben nach unten); Reihenfolge der Elution: Daidzin (1), Glycitin (2), Genistin (3)

Die Quantifizierung der drei Isoflavonglykoside erfolgte über die Erstellung von Kalibriergeraden mithilfe von Referenzsubstanzen. Wie bei den Rotklee-Präparaten wurden dafür aus den Stammlösungen fünf verschiedene Konzentrationen hergestellt und diese dreifach eingespritzt. Zum Lösen der Standards wurde wie zur Extraktherstellung Methanol (80 %) verwendet. Die Konzentrationsbereiche lagen bei 50-400 mg/ l für Daidzin, bei 10-200 mg/ l für Glycitin und bei 27-540 mg/ l für Genistin. Die einzelnen Kalibrierfunktionen zeigten eine gute Linearität mit Korrelationskoeffizienten von 0,99644-0,99885.

Die Geradengleichungen der drei Isoflavone entsprechend der Formel Fläche= A+ B*Konzentration [mg/ l] lauten wie folgt:

	Präzision (A)	Empfindlichkeit (B)
Daidzin	102,8	32005,1
Glycitin	251,9	41283,1
Genistin	64,1	81195,3

Tab. 4: Kenndaten der Kalibrierreihen der Soja-Isoflavone

Ergebnisse

Die Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte analog zu den Rotklee-NEM und ergab 660 µg/ l bzw. 2000 µg/ l für Daidzin, 594 µg/ l bzw. 1800 µg/ l für Genistin und 396 µg/ l bzw. 1200 µg/ l für Glycitin.

Alle fünf Extrakte wurden sechsfach quantifiziert und daraus Mittelwert und Streuung berechnet. In der nachfolgenden Tabelle sind die einzelnen Gehalte pro Kapselinhalt in mg aufgeführt.

	Alsifemin® 514,7 mg	Femiflavin® 332,9 mg	Phyto- Soya® 17,5 333,2 mg	Phyto- Soya® 35 333,6 mg	Soja 60 C 446,1 mg
Daidzin	30,6 ± 0,1	25,6 ± 0,2	9,7 ± 0,1	21,2 ± 0,3	10,2 ± 0,1
Genistin	5,2 ± 0,9	21,8 ± 0,8	1,9 ± 0,04	4,3 ± 0,4	8,5 ± 0,5
Glycitin	15,6 ± 0,1	4,4 ± 0,3	4,3 ± 0,1	9,8 ± 0,3	1,7 ± 0,3
Gesamtgehalt als Glykosid	51,4 ± 1,1	51,8 ± 1,3	15,9 ± 0,2	35,3 ± 1,0	20,4 ± 0,9
Gesamtgehalt als Aglykon berechnet	31,8 ± 0,7	32,1 ± 0,8	9,8 ± 0,2	21,9 ± 0,7	12,6 ± 0,6
Deklariertes Gehalt	50	60	17,5	35	20

Tab. 5: Ermittelte Gehalte an Isoflavonen der Soja-Präparate im Vergleich zu den Herstellerangaben

Das vorherrschende Isoflavon in allen fünf Nahrungsergänzungsmitteln ist Daidzin mit Werten zwischen 49,4- 61,2 % bezogen auf den Gesamtgehalt. Die anderen beiden Isoflavone Genistin und Glycitin verteilen sich hingegen unterschiedlich. So ist in Femiflavin® und Soja 60 C Genistin mit 42,1 % bzw. 41,8 % der zweithäufigste Vertreter, in den anderen Präparaten jedoch Glycitin (siehe Abbildung 25). Dies war aufgrund der üblichen Häufigkeitsverteilung dieser Isoflavone in der Sojapflanze in Bezug auf Glycitin so nicht zu erwarten.

Ergebnisse

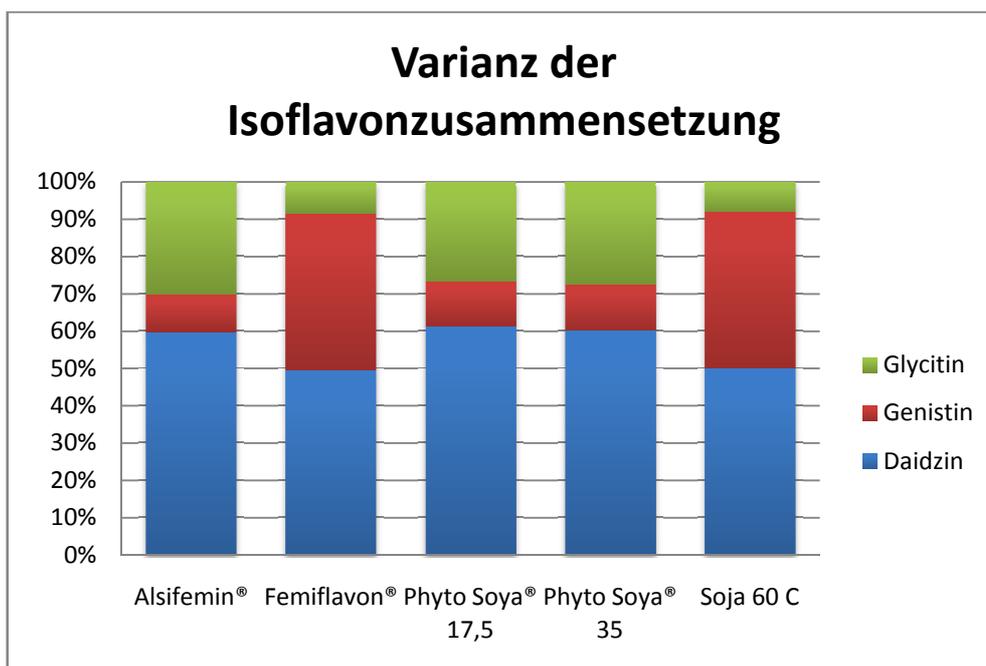


Abb. 25: Unterschiede im Isoflavongehalt der untersuchten NEM

Zur Überprüfung der auf den Verpackungen angegebenen Gehalte wurden die Gesamtgehalte an Isoflavonen mit denen der Hersteller verglichen. Bei Alsifemin®, Phyto Soya® 35 und Soja 60 C stimmen die Werte mit den deklarierten sehr gut überein. Die beiden Produkte Femiflavin® und Phyto Soya® 17,5 lagen mit 86,4 % und 90,3 % an bestimmten Gehalten im Verhältnis zum ausgelobten Wert zwar unter der Angabe des Herstellers, jedoch befinden sie sich noch innerhalb eines möglichen Toleranzbereiches von $\pm 15\%$.

Lediglich bei den Präparaten Phyto Soya® 17,5 und Phyto Soya® 35 gibt es eine Angabe, dass sich der deklarierte Gehalt auf der Verpackung auf die Glykoside bezieht.

Die jeweilige Menge wurde sogar auf die Aglykone heruntergerechnet, allerdings erfolgt diese Kennzeichnung in einer kleinen Tabelle versteckt an der Seite der Verpackung, so dass sie für die durchschnittliche Anwenderin nicht ins Auge fällt. Die anderen Hersteller machen bloß Angaben wie „60 mg Soja-Isoflavone aus 150 mg Sojabohnenkonzentrat“. Im Zuge einer besseren Vergleichbarkeit sollten deshalb die Angaben der Hersteller diesbezüglich verbessert werden, da knapp ein Drittel der Molekülmasse des Glykosids auf den Zuckerrest entfällt, der selbst zwar im Körper abgespalten wird und deshalb für die Wirkung der Isoflavone keine Bedeutung hat, aber aufgrund seiner Hydrophilie die Bioverfügbarkeit im Vergleich zu den Aglyka deutlich erhöht.

2. HPLC-MS-Untersuchungen

Um weitere Informationen über die Bestandteile der Extrakte zu erhalten, wurde eine HPLC-Analyse mit massenspektrometrischer Kopplung durchgeführt. Dabei können durch das Verhältnis der Masse zur Ladung die Peaks den jeweiligen Stoffen bei bekanntem Molekulargewicht zugeordnet werden. Durch die Kombination der HPLC zur Auftrennung und der MS zur Identifizierung kann für jede Zeit des Chromatogramms ein Massenspektrum erstellt werden, wodurch eventuelle Verunreinigungen, die ein ähnliches UV-Spektrum, aber eine andere Masse haben, lokalisiert werden können. Die verwendete Ionisierungstechnik über ESI ist ein schonendes Verfahren, so dass Fragmente nicht zwangsläufig gebildet werden. Meist ist nur die Masse des Pseudomolekülions zu sehen.

Die MS-Untersuchung liefert wichtige Informationen über die Konstitution der einzelnen Bestandteile der Extrakte. So lassen sich die unterschiedlichen Konformationsformen wie z.B. Aglyka und Glykoside eindeutig voneinander unterscheiden, da die Fragmentierung der O-glykosidischen Bindung unter der Abspaltung eines Massenfragments mit $m/z= 162$ u erfolgt, was auf eine Hexose hindeutet. Weiterhin kann aus dem Verlust der Fragmente $m/z= 86$ u und $m/z= 42$ u von einer Malonyl- bzw. Acetylgruppe in der entsprechenden Verbindung ausgegangen werden.

2.1 Rotklee-Präparate

Mit dem entwickelten HPLC-System war es möglich, die einzelnen Verbindungen gut getrennt voneinander detektieren zu können.

Wie erwartet waren als Majorverbindungen Isoflavonaglyka in den drei Rotklee-Extrakten zu finden. Es handelte sich um die bereits über HPLC-DAD identifizierten Verbindungen Daidzein, Genistein, Glycitein, Formononetin und Biochanin A. Weiterhin war in dem NEM Menoflavon® Pratensein, ein hydroxyliertes Biochanin A-Derivat, mit einer Retentionszeit von 6,7 Minuten zu finden. Alle drei Präparate wiesen zudem mit dem verwendeten HPLC-System Pseudobaptigenin bei 7,8 Minuten und Irilon bei 10,4 Minuten auf. Die Identität dieser Inhaltstoffe konnte neben den entsprechenden Massen durch den Vergleich der UV-Spektren mit Literaturdaten bestätigt werden.

Ergebnisse

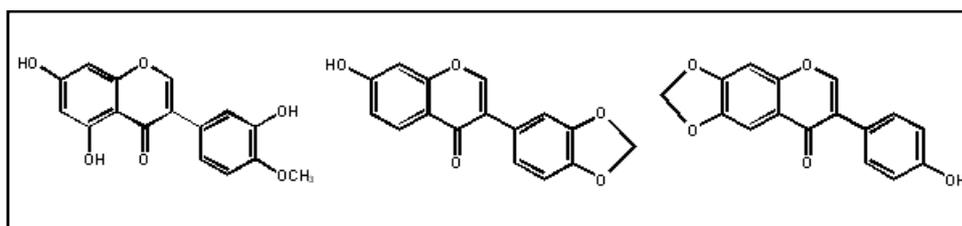


Abb. 26: Von links nach rechts: Pratensein, Pseudobaptigenin und Irilon

In dem Präparat Menoflavon® fanden sich darüber hinaus zu einem sehr geringen Anteil die Glykoside Ononin (Formononetin-7-O-glucosid) und Sissostrin (Biochanin A-7-O-glucosid), die neben dem Pseudomolekülion $[M+H]^+$ von $m/z= 431$ bzw. $m/z= 447$ ebenfalls die Massen der dazugehörigen Aglyka von $m/z= 269$ bzw. $m/z= 285$ bei der Analyse aufzeigten, was von der Abspaltung der Glucose herrührte.

Das Nahrungsergänzungsmittel Soja 60 C, was sowohl einen Rotklee- als auch einen Soja-Extrakt beinhaltet, wies zudem Daidzin auf; auch hier war neben dem Pseudomolekülion ein Peak des Aglykons zu sehen. Wahrscheinlich ist der Ursprung dieser Substanz allerdings nicht in dem Rotklee-Extrakt zu finden, sondern rührt von dem Soja-Anteil her.

Verbindung	Retentionszeit in Minuten	$[M+H]^+$
Ononin	4,0	431
Daidzin	4,2	417
Sissostrin	4,5	447
Daidzein	4,8	255
Glycitein	5,0	285
Genistein	6,1	271
Pratensein	6,7	301
Pseudobaptigenin	7,8	283
Formononetin	8,2	269
Irilon	10,4	299
Biochanin A	13,7	285

Tab. 6: Masse/Ladungs-Zahlen der untersuchten Isoflavone aus den HPLC-ESI(+)-MS-Untersuchungen

Ergebnisse

Bei ausreichend hoher Fragmentorspannung sind im ESI(+)-MS Modus zusätzlich retro-Diels-Alder (rDA)-Fragmentierungen möglich. Diese basieren auf der Spaltung der Isoflavon-Grundstruktur im C-Ring, wodurch zwei charakteristische Fragmente mit noch intaktem aromatischen A- bzw. B-Ring resultieren. Bei dem A-Ring-Fragment handelt es sich dabei um das „Dien“ und bei dem B-Ring-Fragment um das „Dienophil“. Bei einfachen MS-Analysen wie in diesem Fall tritt, wenn überhaupt, nur eine schwache Bildung des rDA-Fragments aus dem A-Ring auf. Das B-Ring-Fragment bleibt hingegen meist ungeladen und wird damit nicht detektiert. Noch intensiver ließen sich die rDA-Fragmente durch den Einsatz von MS-MS detektieren.

Bei den untersuchten Extrakten war in lediglich zwei MS-Spektren der Inhaltstoffe eine Fragmentierung zu beobachten, was auf die relativ geringe Arbeitsspannung zurückzuführen ist. So fand sich im Spektrum von Genistein das rDA-Signal des A-Ring-Fragments mit $m/z=153$. Bei Ononin, dem Glykosid von Formononetin, trat das entsprechende Fragment mit $m/z=137$ als intensives Signal auf.

2.2 Soja-Präparate

In den fünf analysierten Präparaten stellten die Glykoside Daidzin, Genistin und Glycitin die Hauptinhaltsstoffe dar. Daneben lagen noch die acetylierten Verbindungen von Daidzin und Genistin vor, 6''-O-Glycitin konnte in keiner der Zubereitungen detektiert werden. Ebenso wurden Aglyka nur in äußerst geringen Spuren gefunden, so dass die für die quantitative Zusammensetzung nur eine untergeordnete Rolle spielen. Von den Malonyl-Derivaten trat nur das von Daidzin in Spuren auf, die anderen waren nicht vorhanden.

Verbindung	Retentionszeit in Minuten	[M+H] ⁺
Daidzin	15,9	417
Glycitin	16,6	447
6''-O-Malonyldaidzin	19,2	503
Genistin	19,9	433
6''-O-Acetyldaidzin	22,8	459
6''-O-Acetylgenistin	24,2	475

Tab. 7: Masse/Ladungs-Zahlen der Soja-Isoflavone aus den HPLC-ESI(+)-MS-Untersuchungen

3. Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)

Aus den einzelnen Nahrungsergänzungsmitteln wurden Extrakte hergestellt wie unter 1.3 beschrieben und mit dem Auftragegerät Linomat IV auf die HPTLC-Platten aufgesprüht. Die Referenzlösungen wurden parallel auf denselben Platten chromatographiert. Nach der Entwicklung der Platten erfolgte die qualitative Auswertung im UV-Licht bei 254 und 366 nm.

3.1 Rotklee-Präparate

Selektivität:

Zum Nachweis der Selektivität des Verfahrens wurden folgende Probelösungen auf einer Platte nebeneinander chromatographiert: Der entsprechende Extrakt des jeweiligen Rotklee-Nahrungsergänzungsmittels, die Referenzlösungen von Formononetin und Biochanin A sowie bei ausreichend hoher Konzentration in dem jeweiligen Präparat ebenfalls Daidzein, Glycitein und Genistein. Nach der Entwicklung erkannte man bei 254 nm die Löschung der einzelnen Isoflavone. Die Zone des Daidzeins lag im unteren R_f -Bereich bei 0,29. Darauf folgten mit steigendem R_f -Wert die Zonen von Glycitein und Genistein bei 0,34 und 0,41. Die Bande von Formononetin war bei $R_f=0,48$ und die von Biochanin A bei $R_f=0,59$ zu sehen. Bei 366 nm war nur bei der Bande des Formononetins eine gelbe Fluoreszenz zu beobachten. Die anderen Isoflavone wiesen keine Fluoreszenz auf.

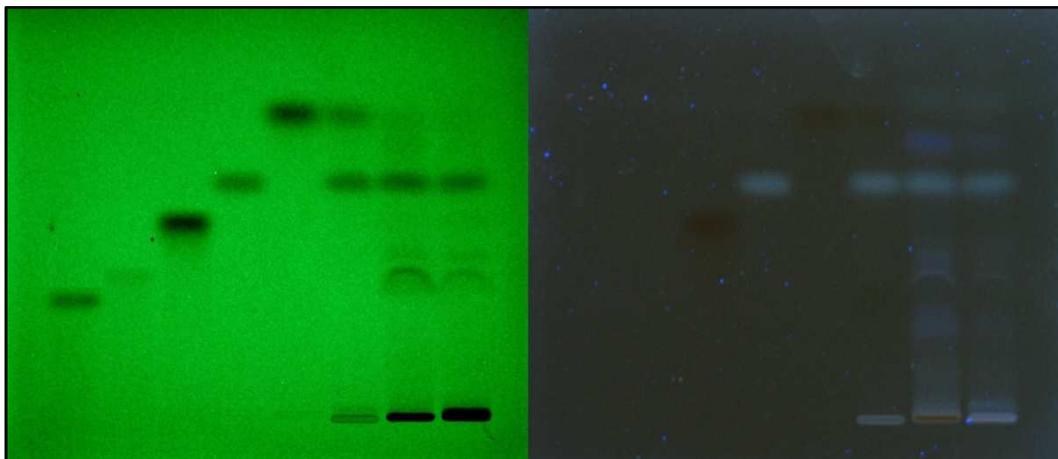


Abb. 27: Selektivität: Bahn 1-5: Referenzsubstanzen Daidzein, Glycitein, Genistein, Formononetin und Biochanin A in dieser Reihenfolge; Bahn 6-8: Extrakte von Menoflavon®, Rotklee Kapseln und Soja 60 C bei 254 nm (links) und bei 366 nm (rechts)

Ergebnisse

Die Platten wurden mittels eines DC-Scanners densitometrisch vermessen und die UV-Spektren der einzelnen Banden mit denen der Referenzen verglichen. Dabei zeigten die Reinstoffe je das gleiche UV-Spektrum wie die entsprechenden Isoflavone in den Extrakten. In der nachfolgenden Abbildung ist das Densitogramm eines Rotklee-haltigen Extraktes dargestellt:

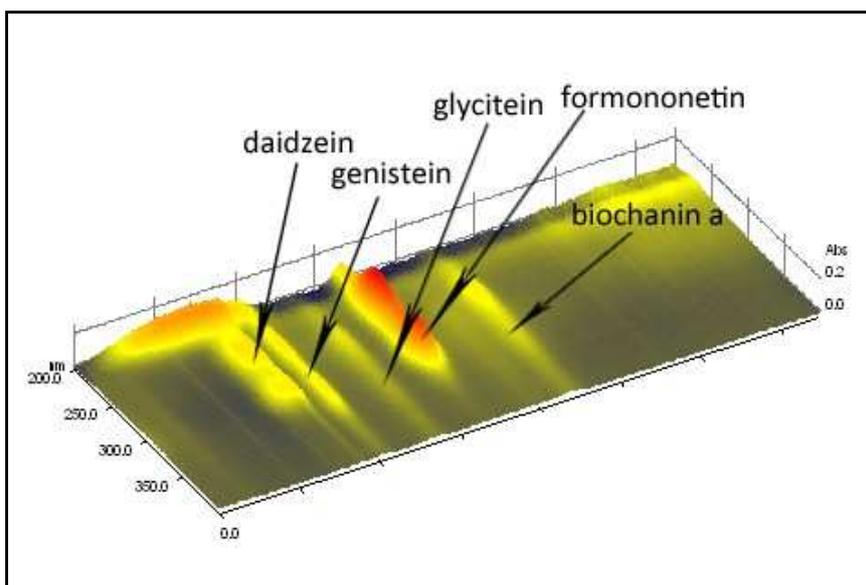


Abb. 28: Densitogramm mit den durch Pfeile gekennzeichneten fünf Hauptisoflavonen

Messbereich, Linearität:

Für die Quantifizierung der Isoflavone in den Proben musste ein Messbereich festgelegt werden. Dazu wurden anhand der über HPLC ermittelten Gehalte 6 verschiedene Konzentrationen der Referenzlösungen mit den Untersuchungslösungen aufgetragen. Der Bereich wurde so gewählt, dass die Gehalte der Isoflavone in der Mitte des Messbereiches lagen.

Zur Überprüfung der Linearität wurden die einzelnen Konzentrationen mit ihren zugehörigen Peakflächen korreliert, dabei ergaben sich Kalibriergeraden mit einer guten Linearität für den angewendeten Konzentrationsbereich.

Ergebnisse

Für die einzelnen Nahrungsergänzungsmittel wurden folgende Messbereiche angewendet:

	Daidzein	Glycitein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
Menoflavon®	n.b.	n.b.	n.b.	91,3- 213	93,6- 218,4
Rotklee Kapseln	46- 107,3	12,3- 28,6	4,9- 11,4	109,5- 255,5	31,2- 72,8
Soja 60 C	13,1- 65,7	12,5- 30,6	9,8- 49	72,1- 180,3	10,4- 52

Tab. 8: Kalibrierbereiche der fünf Isoflavone in Menoflavon®, Rotklee Kapseln und Soja 60 C, angegeben in mg/l
n.b.: nicht bestimmt

Wiederholpräzision:

Auf Grundlage der Ergebnisse zur Ermittlung des Meßbereiches wurden je Nahrungsergänzungsmittel sechs Untersuchungslösungen hergestellt und mit jeweils fünf Konzentrationsstufen an Kalibrierungslösungen dreifach auf eine 200x100 mm Platte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte für jede Platte mit frischem Fließmittel. Mithilfe der aus den Referenzkonzentrationen ermittelten Kalibriergeraden wurde der mittlere Gehalt je Präparat errechnet. Daraus wurde die Wiederholpräzision bestimmt, welche annehmbar war, da der Variationskoeffizient deutlich unter 15% lag (siehe Tabelle 9):

	Daidzein	Glycitein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
Menoflavon®	n.b.	n.b.	n.b.	1,4 %	2,3 %
Rotklee Kapseln	3,3 %	5,0 %	4,6 %	2,4 %	2,6 %
Soja 60 C	1,8 %	6,8 %	8,2 %	5,2 %	7,2 %

Tab. 9: Wiederholpräzision (n=6) der entwickelten HPTLC-Methode für die einzelnen Isoflavone in den untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln; n.b.: nicht bestimmt

Robustheit:

Stabilität der Analyten während der Chromatographie:

Zur Überprüfung der Stabilität der Analyten während der Chromatographie wurden die Extrakte punktförmig am Rand einer HPTLC-Platte aufgetragen und entwickelt. Anschließend wurde die Platte um 90° gedreht und ein zweites Mal entwickelt. Da die Isoflavone alle auf der Winkelhalbierenden lagen und keine Abbauprodukte abseits der Winkelhalbierenden zu erkennen waren, war somit die Stabilität der Analyten während der Chromatographie belegt.

Ergebnisse



Abb. 29: 2D-Entwicklung von 10 µl Rotklee Extrakt

Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte:

Da sich weder optisch noch beim Vermessen der HPTLC-Platten eine Änderung von Bandenintensität und R_f -Werten der untersuchten Isoflavone zeigte, konnte von der Stabilität der verschiedenen Extrakte ausgegangen werden.

Richtigkeit:

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Methode wurden die bestimmten Gehalte an Isoflavonen mit denen der HPLC-Methode verglichen und die prozentuale Wiederfindung bestimmt. Für die beiden Hauptisoflavone Formononetin und Biochanin A wurden Gehalte von 93,3- 100,7 % beziehungsweise 102,0- 109,4 % gefunden.

Nachweisgrenze:

Es wurden die Mindestkonzentrationen an einzelnen Isoflavonen bestimmt, die in der reinen Stammlösung nachgewiesen werden konnten (Tabelle 10). Die Bestimmung erfolgte densitometrisch über das Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1.

	Daidzein	Glycitein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
LOD (ng per band)	12	12	12	14	12

Tab. 10: Nachweisgrenze der Rotklee-Isoflavone

Ergebnisse

Bestimmungsgrenze:

Die Bestimmungsgrenze wurde als kleinste quantifizierbare Konzentration der einzelnen Analyten berechnet. Dazu wurde das Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 herangezogen.

	Daidzein	Glycitein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
LOQ (ng per band)	38	41	39	47	40

Tab. 11: Bestimmungsgrenze der Rotklee-Isoflavone

Quantifizierung:

Die folgende Abbildung zeigt das Densitogramm der fünf Reinstoffe bei 260 nm in einer Konzentration, die der in den Rotklee Kapseln vergleichbar ist:

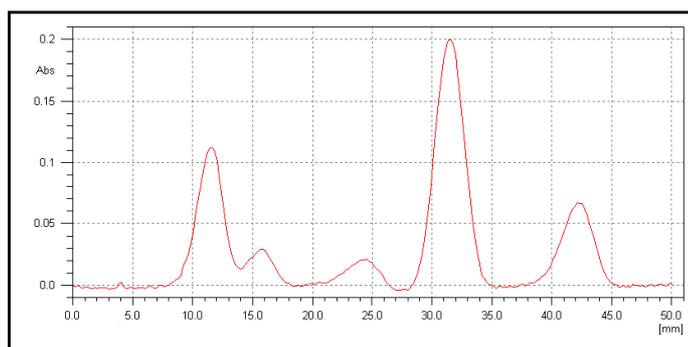


Abb. 30: Densitogramm der Rotklee-Isoflavone

Jedes NEM wurde dazu sechsmal aufgearbeitet und je dreifach mit fünf verschiedenen Konzentrationen an Referenzlösungen auf eine HPTLC-Platte aufgetragen, entwickelt und vermessen. Durch die Integration der Peakflächen konnte mithilfe von Kalibriergeraden der Standards die Menge an Isoflavonen in den drei untersuchten Präparaten, angegeben in mg, ermittelt werden (Tabelle 12).

	Menoflavin®	Rotklee Kapseln	Soja 60 C
Daidzein	Nicht quantifiziert	8,3 ± 0,8	2,0 ± 0,1
Glycitein	Nicht quantifiziert	2,8 ± 0,4	1,0 ± 0,2
Genistein	Nicht quantifiziert	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,3
Formononetin	22,8 ± 0,6	26,5 ± 1,6	9,7 ± 1,2
Biochanin A	17,3 ± 0,4	5,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2
Gesamtgehalt	40,1 ± 1,0	43,9 ± 3,2	15,4 ± 2,0
Deklariertes Gehalt	40	40	10

Tab. 12: Gehalt an Rotklee-Isoflavonen je NEM sowie die Angaben des Herstellers (in mg)

Ergebnisse

3.2 Soja-Präparate

Selektivität:

Zum Nachweis der Selektivität des Verfahrens wurden die entsprechenden Extrakte der jeweiligen Soja-Nahrungsergänzungsmittel sowie die Referenzlösungen von Daidzin, Genistin und Glycitin auf einer Platte nebeneinander chromatographiert. Nach der Entwicklung waren bei 254 nm die Löschungen der einzelnen Isoflavone zu sehen. Die Zone des Glycitins lag im unteren R_f -Bereich bei 0,20. Die Bande von Daidzin war bei $R_f=0,29$ und die von Genistin bei $R_f=0,36$ zu sehen. Bei 366 nm wiesen die Isoflavone keine Fluoreszenz auf.

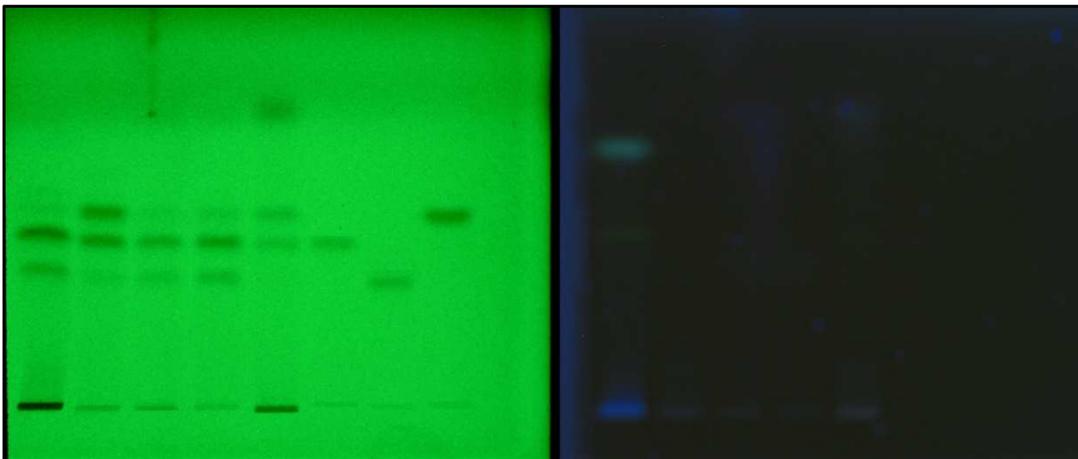


Abb. 31: Selektivität: Bahn 1-5: Extrakte von Alsifemin®, Femiflavin®, Phyto Soya® 17,5, Phyto Soya® 35 und Soja 60 C; Bahn 6-8: Referenzsubstanzen Daidzin, Glycitin, Genistin in dieser Reihenfolge bei 254 nm (links) und bei 366 nm (rechts)

Die Platten wurden analog den HPTLC-Platten der Rotklee-NEM densitometrisch vermessen und die UV-Spektren der einzelnen Inhaltsstoffe mit denen der Referenzsubstanzen verglichen, wobei eine jeweilige Übereinstimmung festgestellt werden konnte. Die Densitogramme der Extrakte der Soja-Präparate sind nachfolgend zu sehen, dabei ist das Präparat Phyto Soya® 17,5 nicht dargestellt, da es eine vergleichbare Zusammensetzung an Bestandteilen wie Phyto Soya® 35 aufwies.

Ergebnisse

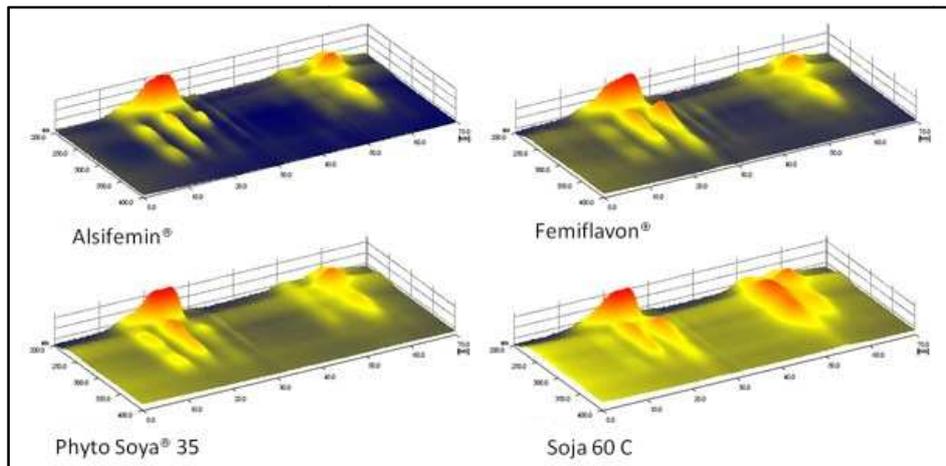


Abb. 32: Densitogramme der untersuchten Soja-NEM

Messbereich, Linearität:

Die Festlegung des Messbereichs erfolgte wie bei den Rotklee-haltigen Nahrungsergänzungsmitteln (siehe 3.1, Messbereich).

Die resultierenden Kalibriergeraden zeigten eine gute Linearität über den gesamten Konzentrationsbereich. Für die einzelnen Zubereitungen wurden folgende Messbereiche gewählt:

	Alsifemin®	Femiflavin®	Phyto Soya® 17,5	Phyto Soya® 35	Soja 60 C
Glycitin	200- 1000	50- 250	50- 250	100- 500	20- 100
Daidzin	400- 2000	200- 1000	200- 1000	200- 100	100- 500
Genistin	54- 270	270- 1350	54- 270	54- 270	135- 675

Tab. 13: Kalibrierbereiche der drei Isoflavone in Alsifemin®, Femiflavin®, Phyto Soya® 17,5, Phyto Soya® 35 und Soja 60 C, angegeben in mg/ l

Wiederholpräzision:

Je sechs Untersuchungslösungen der fünf Soja-NEM wurden hergestellt und mit jeweils fünf Konzentrationsstufen an Kalibrierungslösungen dreifach auf eine 200x 100 mm Platte aufgetragen. Für jede Platte wurde das Fließmittel frisch hergestellt. Der mittlere Gehalt an Isoflavonen pro Präparat konnte anhand der Kalibriergeraden abgelesen werden.

Ergebnisse

Die Wiederholpräzision war annehmbar, da die Variationskoeffizienten unter 15% lagen (siehe Tabelle 14):

	Alsifemin®	Femiflavon®	Phyto Soya® 17,5	Phyto Soya® 35	Soja 60 C
Glycitin	2,0 %	2,6 %	3,9 %	2,2 %	7,7 %
Daidzin	1,3 %	0,8 %	0,4 %	1,4 %	1,8 %
Genistin	4,5 %	1,9 %	4,6 %	5,1 %	2,9 %

Tab. 14: Wiederholpräzision (n=6) der entwickelten HPTLC-Methode für die einzelnen Isoflavone in den untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln

Robustheit:

Stabilität der Analyten während der Chromatographie:

Der Nachweis wurde durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie erbracht. 10 µl der Probelösung wurden punktförmig auf die Ecke einer HPTLC-Platte aufgesprüht mit 1 cm Abstand zum linken und unteren Plattenrand. Nach der Entwicklung wurde die Platte um 90° gedreht und noch einmal entwickelt. Die Zonen im Chromatogramm lagen auf einer Geraden, die vom Auftragepunkt bis zum Treffpunkt der beiden Fließmittelfronten verlief.

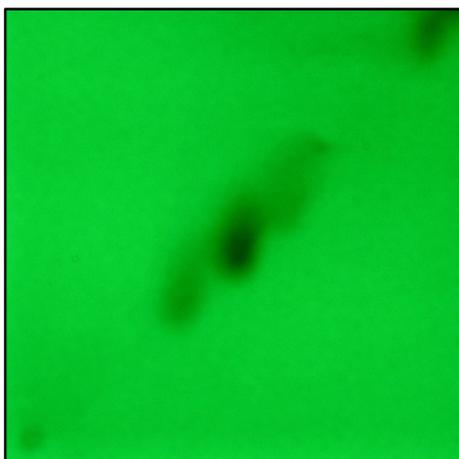


Abb. 33: 2D-Entwicklung von 10 µl
Phyto Soya® 35 Extrakt

Ergebnisse

Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte:

Da sich weder optisch noch beim Vermessen der HPTLC-Platten eine Änderung von Bandenintensität und R_f -Werten der untersuchten Isoflavone zeigte, konnte von der Stabilität der verschiedenen Extrakte ausgegangen werden.

Richtigkeit:

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Methode wurden die bestimmten Gehalte an Isoflavonen mit denen der HPLC-Methode verglichen und die prozentuale Wiederfindung bestimmt. Sie lag für Daidzin bei 94,5 - 98,7 %, für Genistin bei 99,2- 113,7 % und für Glycitin bei 86,8- 107,5 % je nach Präparat.

Nachweisgrenze:

Es wurden die Mindestkonzentrationen an einzelnen Isoflavonen bestimmt, die in der reinen Stammlösung nachgewiesen werden konnten (Tabelle 15). Die Bestimmung erfolgte densitometrisch über das Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1.

	Daidzin	Glycitin	Genistin
LOD (ng per band)	20	14	18

Tab. 15: Nachweisgrenzen der Soja-Isoflavone

Bestimmungsgrenze:

Die Bestimmungsgrenze wurde als kleinste quantifizierbare Konzentration der einzelnen Analyten berechnet. Dazu wurde das Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 herangezogen.

	Daidzin	Glycitin	Genistin
LOQ (ng per band)	66	47	60

Tab. 16: Bestimmungsgrenzen der Soja-Isoflavone

Ergebnisse

Quantifizierung:

Aus jedem Präparat wurden sechs methanolische Extrakte hergestellt und je dreifach mit fünf verschiedenen Konzentrationen an Referenzlösungen auf eine HPTLC-Platte aufgetragen, entwickelt und vermessen. Durch die Ermittlung der zu den entsprechenden Peakflächen gehörenden Konzentration konnte die Menge an Isoflavonen, angegeben in mg pro Kapsel, ermittelt werden (Tabelle 17).

	Alsifemin®	Femiflavin®	Phyto Soya® 17,5	Phyto Soya® 35	Soja 60 C
Daidzin	30,2 ± 0,8	25,0 ± 0,4	9,4 ± 0,1	20,4 ± 0,6	9,6 ± 0,3
Genistin	5,8 ± 0,5	21,6 ± 0,8	2,3 ± 0,2	4,9 ± 0,5	9,6 ± 0,6
Glycitin	16,1 ± 0,6	4,7 ± 0,3	4,3 ± 0,3	9,7 ± 0,4	1,5 ± 0,2
Gesamt- gehalt als Glykoside	52,1 ± 1,9	51,3 ± 1,5	16,0 ± 0,6	35,0 ± 1,5	20,7 ± 1,1
Gesamt- gehalt als Aglyka	32,2 ± 1,2	31,8 ± 0,9	9,9 ± 0,4	21,7 ± 0,9	12,8 ± 0,8
Hersteller- angabe	50	60	17,5	35	20

Tab. 17: Gehalte an Soja-Isoflavonen sowie Deklarationen auf der Verpackung (in mg)

4. FTIR-Spektroskopie

4.1 Qualitative IR-Untersuchungen

4.1.1 Rotklee-Präparate

Zu Beginn der Untersuchungen wurden IR-Spektren der fünf Referenzsubstanzen aufgenommen, um gemeinsame und unterschiedliche Strukturen identifizieren zu können. Dabei zeigten sich einige funktionelle Elemente, die mit leichten Unterschieden in den Wellenzahlen in den Spektren der einzelnen Isoflavone zu erkennen waren.

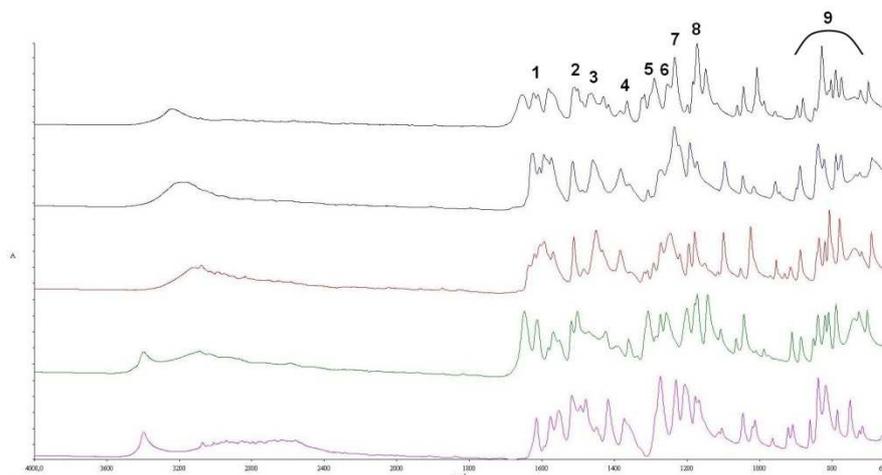


Abb. 34: IR-Spektren der Rotklee-Isoflavone mit den charakteristischen Peaks, die in Tabelle 18 (Seite 86) genauer erläutert werden; von oben nach unten: Biochanin A, Daidzein, Formononetin, Genistein und Glycitein

Die breite Bande bei $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ ist auf die Hydroxylgruppe der Phenolringe zurückzuführen. Dabei handelt es sich genauer um die Streckschwingung der O-H-Bindung. Im verhältnismäßig großen Bereich von ca. $1900\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ liegen die Valenzschwingungen der Carbonylgruppen. Für die genaue Lage, an der die jeweilige Carbonylschwingung auftritt, sind verschiedene Effekte der Substituenten verantwortlich.

Bei allen fünf Isoflavonen handelt es sich um α , β , α' , β' -ungesättigte Ketone, was die Wellenzahl im Vergleich zum einfachen Keton deutlich verringert, allerdings stellen sie gleichzeitig vinyloge Ester dar, wodurch die Wellenzahl wiederum etwas erhöht wird. Da der Aromat ebenfalls seine Wirkung als Elektronenschieber ausübt, liegt die Bande unter dem Standardwert 1700 cm^{-1} bei $1650\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$.

Ergebnisse

Bei Biochanin A und Genistein ist als weitere Besonderheit die vinyloge Carbonsäure zu betrachten, die einen größeren elektronenziehenden Einfluss auf die Carbonylverbindung ausübt und dementsprechend zu einem Signal bei höheren Wellenzahlen als bei Daidzein, Glycitein und Formononetin führt. Die Valenzschwingungen der C=C-Bindung der Aromaten und des ungesättigten Ketons befinden sich bei 1620 bis 1420 cm^{-1} , sind allerdings recht unspezifisch, da viele Stoffe dieses Strukturmerkmal aufweisen.

Einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein phenolischer Hydroxylgruppen liefern die Schwingungsbanden bei $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ und 1250 cm^{-1} , die phenolischen O-H- und C-O-Streckschwingungen zuzuordnen sind, wobei es in diesem Bereich bereits zu einer starken Überlappung der Gruppenfrequenzen kommt. Von 1500- 600 cm^{-1} ist der Fingerprint-Bereich zu finden, der wichtige Hinweise zur Charakterisierung liefert, jedoch die Identifizierung einzelner funktioneller Gruppen schwierig macht. Bei ca. 1175 cm^{-1} ist gut getrennt von anderen die Bande der aliphatischen C-O-Valenzschwingung zu erkennen, die bei allen fünf Isoflavonen ungefähr bei der gleichen Wellenzahl liegt, da sie den Ringsauerstoff im Flavon-Grundgerüst gemeinsam besitzen.

Bei sehr niedrigen Wellenzahlen von 900- 700 cm^{-1} verursacht die Anregungsenergie *out of plane* Schwingungen des aromatischen Ringes.

In folgender Tabelle sind die wichtigsten Banden mit ihrer strukturellen Zuordnung aufgeführt:

	Ursprung	Zuordnung
1	C=O	α , β , α' , β' -ungesättigtes Keton
2	C=C	Aryl-substituierte Doppelbindung
3	C=C	Valenzschwingung des Benzolringes
4	O-H	Beugeschwingung des Phenols
5	O-H	<i>in plane</i> Beugeschwingung des Phenols
6	C-O	Aryl-Alkylether Beugeschwingung
7	C-O	Streckschwingung des Phenols
8	C-O	Streckschwingung des Ethers
9	C-H	<i>out of plane</i> des aromatischen Ringes

Tab. 18: Bandenzuordnung der Rotklee-Isoflavone

Ergebnisse

Anschließend wurden die pulverförmigen Kapselinhalte vermessen. Da hier aber der Einfluß der anderen Bestandteile wie Kapselfüllmaterial und Zusatzstoffe zu groß war, konnten aus den Spektren keine brauchbaren Informationen gewonnen werden (Abb. 35).

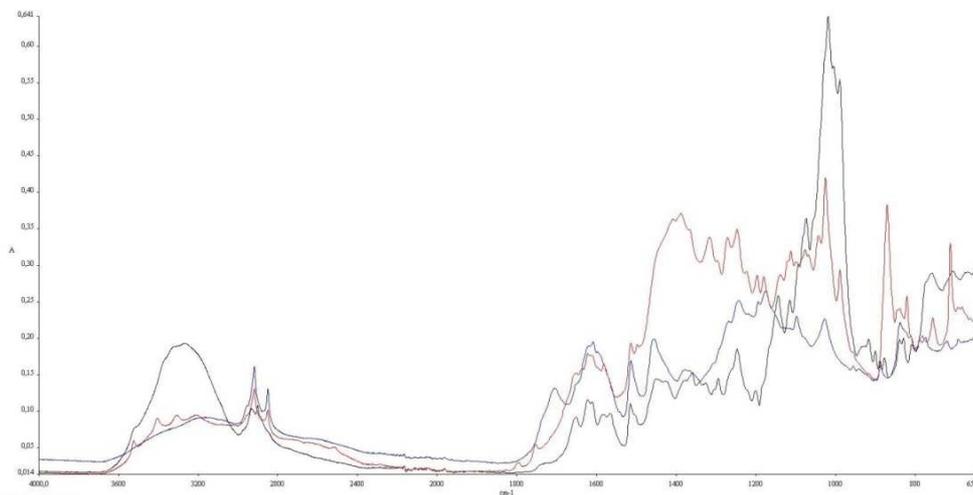


Abb. 35: MIR-Bereich der Kapselinhalte der drei Rotklee-NEM; schwarz: Menoflavin®, blau: Rotklee Kapseln, rot: Soja 60 C

Um möglichst wenig Begleitstoffe, die Isoflavone hingegen quantitativ erfassen zu können, wurden aus den Nahrungsergänzungsmitteln Extrakte wie unter Material & Methoden 1.3 beschrieben hergestellt. Diese wurden anschließend zur Trockne aufkonzentriert, um den Einfluß des Lösungsmittels zu eliminieren. Dieses hätte die Banden der Inhaltsstoffe des Extraktes im IR-Spektrum komplett überlagert, so dass keine Auswertung möglich gewesen wäre.

Ergebnisse

Durch optischen Vergleich der jeweiligen Banden der Extrakte mit denen der Referenzsubstanzen sollten die Einzelkomponenten identifiziert werden.

In der folgenden Abbildung ist das Präparat Rotklee Kapseln den Referenzen gegenübergestellt.

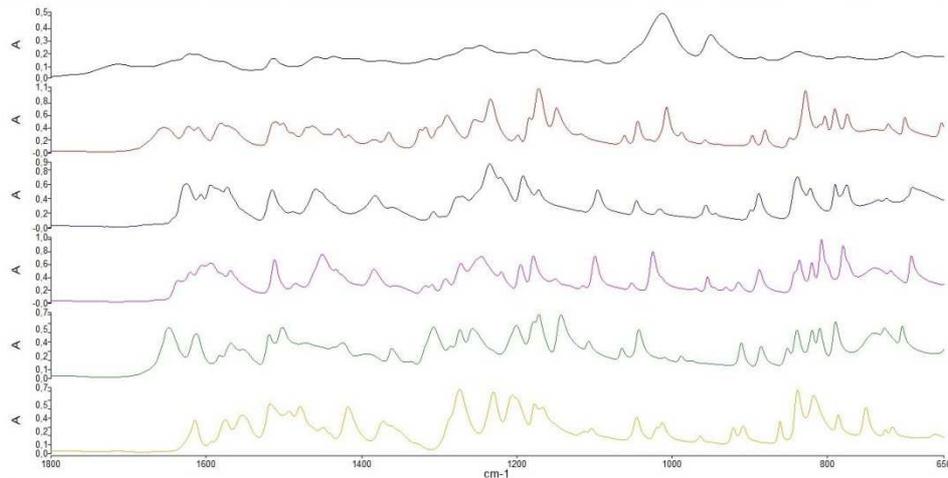


Abb. 36: IR-Spektren im Bereich von 1800- 650 cm^{-1} , von oben nach unten: Extrakt aus Rotklee Kapseln, Biochanin A, Daidzein, Formononetin, Genistein und Glycitein

Im Spektrum des Nahrungsergänzungsmittels ist deutlich erkennbar, dass Formononetin die Hauptkomponente darstellt und die anderen Isoflavone in geringeren Mengen vorliegen. So zeigen sich Übereinstimmungen mit Formononetin bei folgenden Wellenzahlen: 1621 cm^{-1} , 1433 cm^{-1} , 1246 cm^{-1} , 1195 cm^{-1} , 1178 cm^{-1} , 1098 cm^{-1} , 887 cm^{-1} , 838 cm^{-1} und 810 cm^{-1} . Mit Daidzein, dem zweithäufigsten der fünf Isoflavone, hat es immernoch die Banden bei 1514 cm^{-1} , 1458 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} , 887 cm^{-1} , 838 cm^{-1} und 773 cm^{-1} gemeinsam.

Hinweise auf Biochanin A lieferten die Banden bei 1621 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} und 773 cm^{-1} , wobei dabei zu bedenken ist, dass bei 1621 cm^{-1} und 773 cm^{-1} keine Unterscheidung zu Formononetin und Daidzein möglich ist, da sie bei der gleichen Wellenzahl ebenfalls eine Bande besitzen. Genistein und Glycitein waren mit den Banden bei 1610 cm^{-1} und 838 cm^{-1} bzw. 1417 cm^{-1} , 1177 cm^{-1} , 1011 cm^{-1} und 838 cm^{-1} nicht eindeutig nachweisbar.

Durch die Bildung der ersten Ableitung konnten die individuellen Strukturen der Spektren noch besser sichtbar gemacht werden, da hier mathematisch berechnet schärfere Banden entstehen. Die Ergebnisse dieser Operation sind in Tabelle 19 dargestellt.

Ergebnisse

Inhaltsstoff	Wellenzahl in cm^{-1}
Formononetin	1612, 1582, 1545, 1519, 1322, 1296, 1222, 1200, 1182, 1102, 1029, 957, 891, 845, 811
Daidzein	1612, 1519, 1467, 1253, 1222, 1144, 1102, 957, 891, 845
Biochanin A	1628, 1612, 1519, 1419, 1320, 1296, 1200, 776
Glycitein	1582, 1519, 1440, 1422
Genistein	1440, 1320, 1182, 957, 891

Tab. 19: Übereinstimmende Wellenzahlen der Rotklee-Isoflavone mit dem Extrakt aus Rotklee Kapseln

Als Nächstes wurde der Bereich ab 1800 cm^{-1} und der Fingerprint-Bereich des IR-Spektrums des Präparats Menoflavin® betrachtet im unbehandelten Zustand und nach Bildung der ersten Ableitung (Abbildung 37).

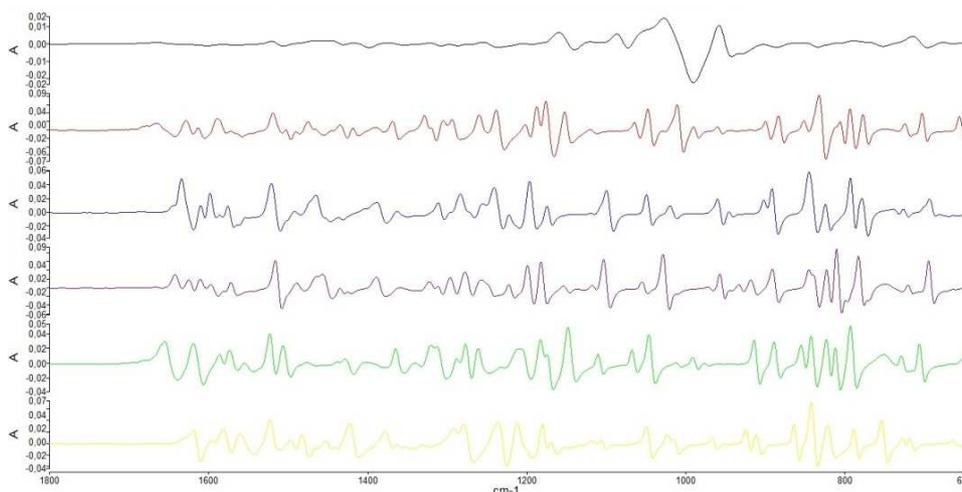


Abb. 37: 1. Ableitung der Spektren von Menoflavin®, Biochanin A, Daidzein, Formononetin, Genistein und Glycitein (von oben nach unten)

Auch hier entfällt die quantitativ größte Menge auf Formononetin, wobei vor allem in der ersten Ableitung der deutliche Anteil an Biochanin A zu erkennen ist, was bereits durch die HPLC-Analyse bestätigt wurde. Im Spektrum des Extraktes sind verhältnismäßig viele auch im Spektrum von Daidzein enthaltene Banden zu sehen, obwohl davon im Extrakt nicht viel vorhanden ist. Dies lässt sich aber wiederum damit erklären, dass drei Banden sowohl beim Formononetin als auch beim Daidzein auftreten und sie deshalb wahrscheinlich nicht Daidzein zuzuordnen sind. Die einzelnen Banden des unbehandelten Spektrums und der ersten Ableitung sind in der Tabelle 20 aufgeführt.

Ergebnisse

Inhaltsstoff	Wellenzahl in cm^{-1}
Formononetin	1514, 1317, 1294, 1272, 1195, 1179
1.Ableitung	1642, 1625, 1464, 1322, 1296, 1277, 1029, 957, 845
Daidzein	1625, 1514, 1294, 1272, 899, 838
1.Ableitung	1610, 1564, 1521, 1465, 1255, 902, 845, 793
Biochanin A	1623, 1610, 1365, 1198, 1148
1.Ableitung	1665, 1628, 1613, 1519, 1419, 1320, 1202, 1187, 1048, 1029
Glycitein	1590, 1272, 951, 838
1.Ableitung	1464, 1441, 1084, 865, 843
Genistein	1648, 1272, 1180, 839
1.Ableitung	1320, 1277, 1047, 843, 812

Tab. 20: Übereinstimmende Wellenzahlen der Rotklee-Isoflavone mit dem Extrakt aus Menoflavin®

Schließlich wurde der Trockenextrakt des Nahrungsergänzungsmittels Soja 60 C IR-spektroskopisch vermessen und ausgewertet (Abbildung 38). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 21 zu sehen. Als Hauptinhaltsstoffe des ethanolischen Extraktes wurden Formononetin und Daidzein über HPLC identifiziert, weiterhin Biochanin A, Genistein und in geringster Konzentration Glycitein. Dies spiegelt sich auch in der jeweiligen Bandenanzahl wider.

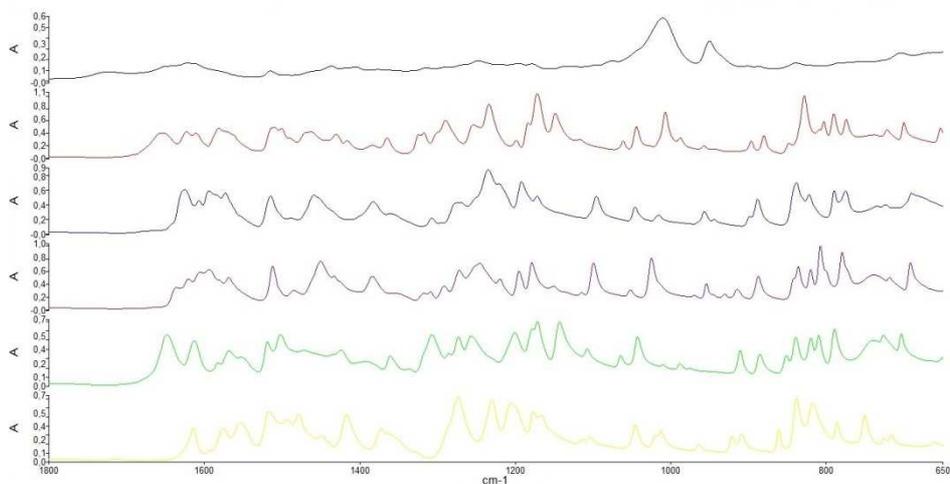


Abb. 38: IR-Spektrum von dem Trockenextrakt aus Soja 60 C, Biochanin A, Daidzein, Formononetin, Genistein und Glycitein und im Bereich von 1800- 650 cm^{-1}

Ergebnisse

Inhaltsstoff	Wellenzahl in cm^{-1}
Formononetin	1621, 1435, 1291, 1247, 1195, 1178, 1099, 887
1.Ableitung	1627, 1613, 1296, 1222, 1200, 1182, 1101, 1029, 958, 935, 889, 846, 824, 810
Daidzein	1515, 1013, 899, 838
1.Ableitung	1586, 1520, 1255, 1222, 1146, 1120, 1101, 1049, 846
Biochanin A	1621, 1610, 1291, 808, 774
1.Ableitung	1627, 1613, 1519, 1418, 1319, 1296, 1200, 1120, 1049, 1029, 777
Glycitein	1112, 951, 838, 785
1.Ableitung	1497, 1181, 1084, 1049, 822, 791
Genistein	1610, 1178, 886, 839
1.Ableitung	1586, 1319, 1182, 1148, 958, 889, 824, 793

Tab. 21: Übereinstimmende Wellenzahlen der Rotklee-Isoflavone mit dem Extrakt aus Soja 60 C

4.1.2 Soja-Präparate

Die Pulver aus den Kapseln der Präparate Alsifemin®50, Phyto Soya® 17,5mg, Phyto Soya® 35mg und Soja 60 C bzw. die Paste von Femiflavon® wurden durch das IR-Spektrometer vermessen. Aus diesem Gemisch konnten jedoch wie bei den Rotklee-NEM keine Ergebnisse geschlussfolgert werden aufgrund der zu starken Behinderung der Wirkinhaltsstoffe und der Hilfsstoffe (Abbildung 39).

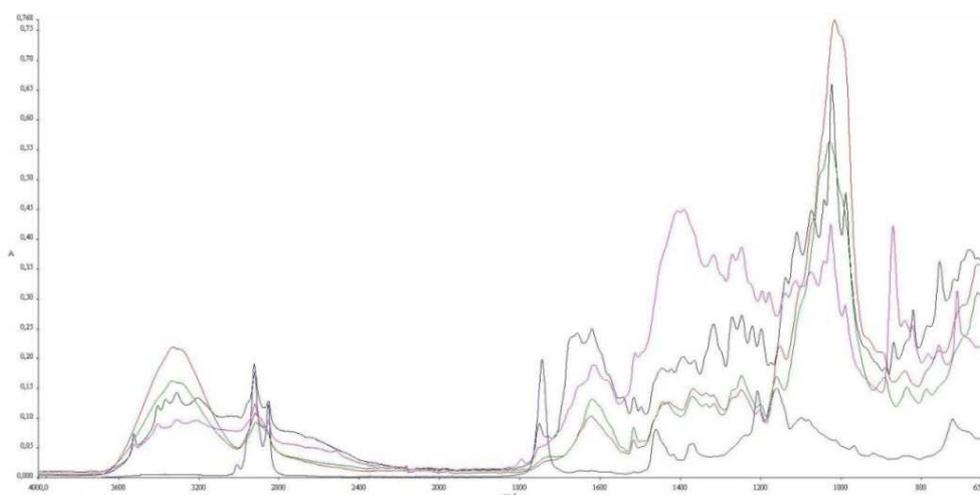


Abb. 39: Kapselinhalte der Soja-haltigen Nahrungsergänzungsmittel: pink: Soja 60 C; rot: Phyto Soya® 17,5; grün: Phyto Soya® 35; blau: Femiflavon®; schwarz: Alsifemin®

Ergebnisse

Deshalb wurden methanolische Extrakte aus den fünf Nahrungsergänzungsmitteln hergestellt und am Speedvac®-Concentrator zur Trockne eingengt. Von diesen wurden genauso wie von den drei Standardsubstanzen Daidzin, Genistin und Glycitin Spektren aufgenommen und miteinander verglichen.

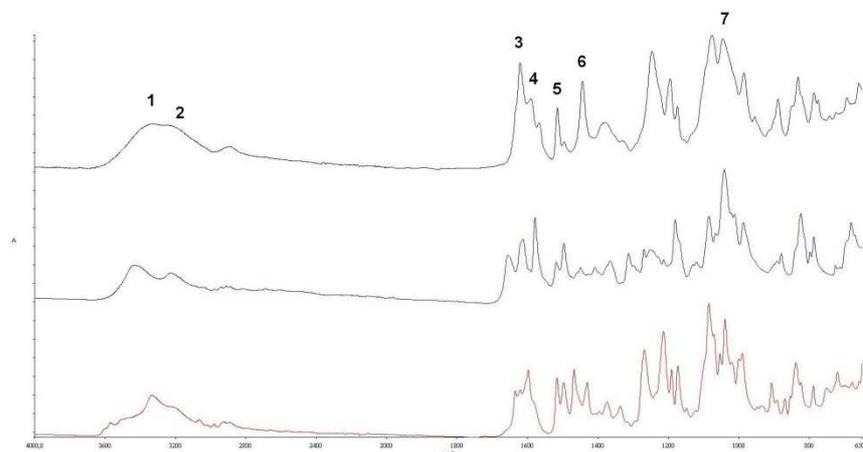


Abb. 40: Infrarotspektren der Isoflavonglykoside aus Soja, von oben nach unten: Daidzin, Genistin und Glycitin; die Zuordnung der Peaks ist in Tabelle 22 aufgeführt

	Ursprung	Zuordnung
1	O-H	Valenzschwingung der Hydroxylgruppe des Phenols und der Glucose
2	C-H	Aromatische Beugeschwingung
3	C=O	α , β , α' , β' -ungesättigtes Keton
4	C-C	Aryl-substituierte Doppelbindung
5	C-H	Valenzschwingung der aliphatischen Wasserstoff-Kohlenstoff-Bindung
6	C-O	Aryl-Alkylether Beugeschwingung
7	C-O	Acetal der glykosidischen Bindung

Tab. 22: Bandenzuordnung für die Soja-Isoflavone

Die breite Bande bei ca. 3300 cm^{-1} ist eindeutig durch Valenzschwingungen um die Sauerstoff-Wasserstoff-Bindung der Hydroxylgruppen der Glucose und des Phenolrings des Isoflavons erklärbar. Die Banden oberhalb 3000 cm^{-1} sind spezifisch für Beugeschwingungen zwischen Kohlenstoff und Wasserstoff in Aromaten, diese Region ist dementsprechend bei allen drei Hauptinhaltsstoffen vorhanden. Im Bereich von 1655 bis 1600 cm^{-1} liegen die Schwingungen der Carbonylbindung des Isoflavongrundgerüsts vor.

Ergebnisse

Es kommt zu minimalen Unterschieden durch Substituenteneffekte. Bei Genistin ist als nächste Besonderheit die vinyloge Carbonsäure zu betrachten, wodurch die Carbonylbande folglich zu höheren Wellenzahlen verschoben wird im Gegensatz zu Daidzin und Glycitin.

Im Bereich von 1515 bis 1430 cm^{-1} befinden sich die relativ unspezifischen Deformationsschwingungen der Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung des Glykosids. Ein Unterschied zu Glycitin ist schwach erkennbar. Dieser Inhaltsstoff besitzt in diesem Bereich mehr Banden als die anderen beiden, was auf das Vorhandensein einer gesättigten Etherstruktur aufmerksam macht. Der ungefähre Standardwert liegt bei 1470 bis 1370 cm^{-1} , wobei hier die Bande zu höheren Wellenzahlen verschoben wird durch den Substituenteneinfluss der Carbonylverbindung.

Die Beugeschwingungen der Kohlenstoff-Sauerstoff-Einfachbindung des Phenols und der primären und sekundären Alkohole der Glukose liegen im Bereich von ungefähr 1270 bis 1200 cm^{-1} . Ein weiterer Bandenbereich, der zu erwähnen ist aufgrund seiner großen Intensität, liegt zwischen 1100 und 1000 cm^{-1} . Diese Peaks sind charakteristisch für Alkyletherstrukturen. Aufgrund der glykosidischen Bindung mit Glucose liegt ein Acetal, einem Diether entsprechend, vor. Diese Struktur ist bei allen drei Hauptinhaltsstoffen von *Glycine max* (L.) MERR. im IR-Spektrum vorhanden.

Bei der weiteren Untersuchung der Nahrungsergänzungsmittel wurden die Extrakte der Präparate vermessen und mit den Spektren der Standardsubstanzen verglichen, um die Einzelkomponenten zu identifizieren.

In der folgenden Abbildung wird das Präparat Alsifemin® den Referenzen gegenübergestellt:

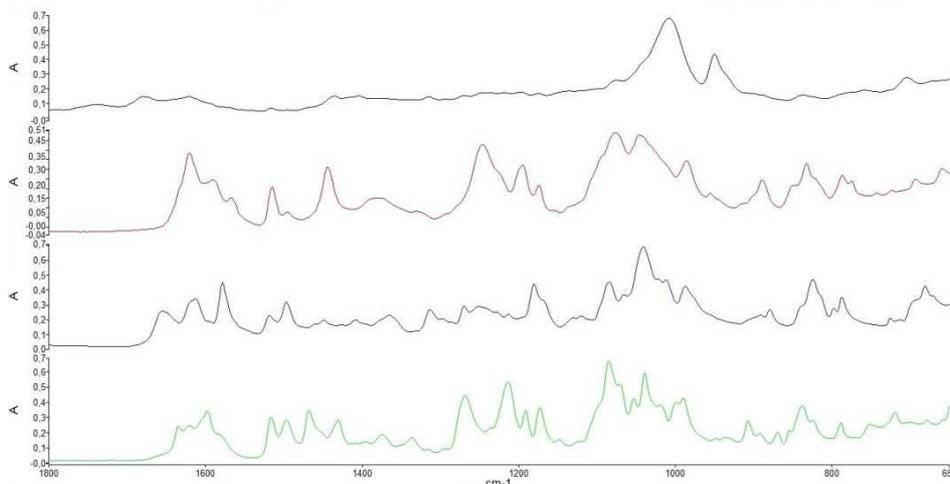


Abb. 41: IR-Spektren von Alsifemin®, Daidzin, Genistin und Glycitin

Ergebnisse

Inhaltsstoff	Wellenzahl in cm^{-1}
Daidzin	1621, 1515, 1246, 1174, 1077
1.Ableitung	1626, 1595, 1520, 1276, 1204, 1178, 1086, 958
Genistin	1496, 1313, 1269
1.Ableitung	1626, 1501, 1319, 1276
Glycitin	1515, 1496, 1269, 1174
1.Ableitung	1626, 1520, 1501, 1472, 1299, 1178

Tab. 23: Wellenzahlen der drei Isoflavone in Übereinstimmung mit Alsifemin®

Im Spektrum des Nahrungsergänzungsmittels ist deutlich erkennbar, dass Daidzin die Hauptkomponente darstellt und Glycitin und Genistin in geringeren Mengen vorliegen. Wenn man jedoch den Fingerprint-Bereich genauer anschaut, können auch Banden beziehungsweise Schultern entdeckt werden, die nicht von Daidzin hervorgerufen werden.

Schultern sind keine eigenständigen Banden, sondern Erhebungen in einem Aufstieg oder in einem Abstieg eines anderen Peaks. Sie sind deswegen nicht so spezifisch, ermöglichen aber eine Abschätzung bezüglich des Vorhandenseins weiterer Substanzen. Bei 1269 cm^{-1} besitzt das Spektrum von Alsifemin® eine Schulter, die nicht mit dem Inhaltsstoff Daidzin erklärbar ist, sondern mit Glycitin und Genistin. Beide besitzen bei der gleichen Wellenzahl eine Bande, eine Unterscheidung zwischen beiden ist daher nicht möglich.

Für die Weiterbearbeitung der Spektren wurde die erste Ableitung gebildet um Unterschiede deutlicher sichtbar zu machen und eine genauere Identifizierung der Inhaltsstoffe aus dem Extrakt vornehmen zu können. Bei dieser Untersuchung sind eindeutige Gemeinsamkeiten zu Daidzin bei den Wellenzahlen 1595 cm^{-1} , 1204 cm^{-1} , 1086 cm^{-1} und 958 cm^{-1} vorhanden, die jeweils nur bei Daidzin und im Extrakt anzutreffen sind. Da Glycitin, wie bereits über HPLC analysiert, den zweithäufigsten Inhaltsstoff darstellt, sind hier ebenfalls relativ viele gemeinsame Absorptionsschläge zu sehen, wobei nur die beiden bei 1472 cm^{-1} und 1299 cm^{-1} spezifisch sind.

Ergebnisse

In folgender Abbildung ist der Bereich ab 1800 cm^{-1} und der Fingerprint-Bereich des IR-Spektrums des Präparats Femiflavon® mit dem der Referenzen gegenübergestellt, wobei im Bereich von 4000 bis 1800 cm^{-1} keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Referenzen und Femiflavon® sichtbar waren.

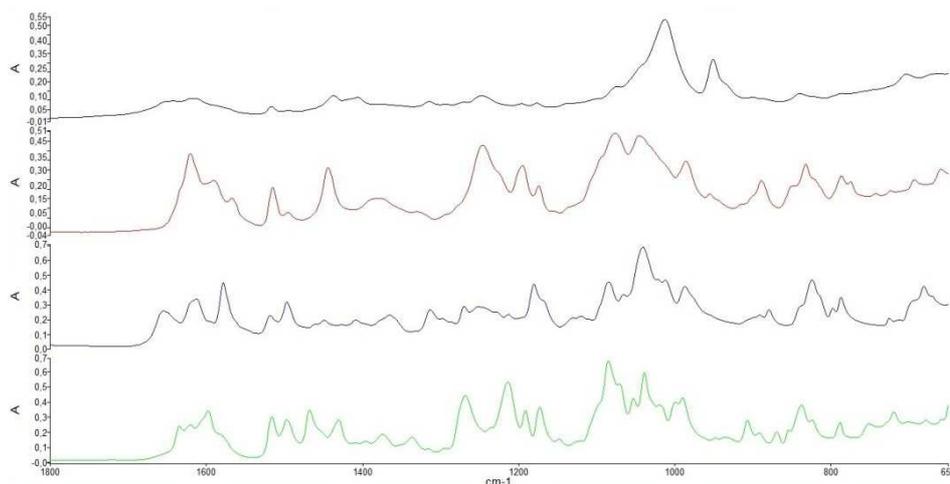


Abb. 42: Infrarot-Spektren von Femiflavon® sowie den drei Isoflavonen Daidzin, Genistin und Glycitin

Bei den Banden von Genistin ergibt sich eine größere Deckung als bei Alsifemin®, was durch den größeren Gehalt in Femiflavon® erklärbar ist. Die Anwesenheit von Daidzin kann ebenfalls durch eindeutige Banden belegt werden (siehe Tabelle 24). Der Nachweis von Glycitin ist hingegen aufgrund der geringen Menge schwieriger. Als Indizien können die Banden bei 1516 cm^{-1} und 838 cm^{-1} angesehen werden.

Inhaltsstoff	Wellenzahl in cm^{-1}
Daidzin	1621, 1495, 1246, 1195, 786
1.Ableitung	1520, 1499, 1300, 1258, 1204, 1086, 958
Genistin	1518, 1495, 1408, 1313, 1180
1.Ableitung	1625, 1523, 1501, 1319, 1258, 1051, 845
Glycitin	1621, 1516, 1495, 838
1.Ableitung	1625, 1521, 1300, 1279, 1022

Tab. 24: Wellenzahlen der drei Isoflavone in Übereinstimmung mit Femiflavon®

Ergebnisse

Als nächstes wurde das Nahrungsergänzungsmittel Phyto Soya® 17,5 mg Kapsel betrachtet. In der Abbildung 43 sind die Spektren der ersten Ableitung gegenübergestellt.

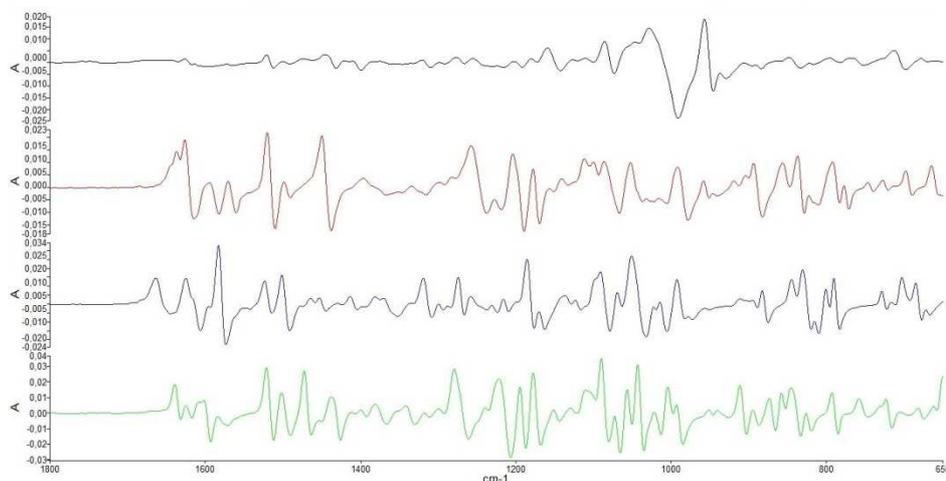


Abb. 43: 1. Ableitung der Spektren von Phyto Soya® 17,5 mg, Daidzin, Genistin und Glycitin

Als Hauptinhaltsstoff wurde Daidzin, gefolgt von Glycitin, durch die HPLC gefunden. Übereinstimmende Banden sind in Tabelle 25 aufgeführt. Bei 1365 cm^{-1} liegt die einzige Bande, die mit Genistin übereinstimmt, bei Daidzin und Glycitin jedoch nicht auftritt und daher einen Anhaltspunkt für dieses Isoflavon liefert.

Inhaltsstoff	Wellenzahl in cm^{-1}
Daidzin	1621, 1516, 1495, 1246, 1195, 1077
1.Ableitung	1626, 1520, 1500, 1255, 1203, 1086, 958
Genistin	1516, 1495, 1365, 1268
1.Ableitung	1626, 1320, 1276, 1255
Glycitin	1620, 1516, 1495, 1315, 1268, 1148
1.Ableitung	1626, 1520, 1500, 1300, 1130

Tab. 25: Wellenzahlen der drei Isoflavone in Übereinstimmung mit Phyto Soya® 17,5 mg

Das Präparat Phyto Soya® 35 mg stammt vom gleichen Hersteller wie Phyto Soya® 17,5 mg und weist ähnliche Verhältnisse in der Zusammensetzung der einzelnen Isoflavone auf, allerdings ist deren Menge pro Kapseln wie deklariert annähernd doppelt so hoch.

Ergebnisse

So geben ebenfalls die Banden bei 1516 cm^{-1} , 1495 cm^{-1} , 1246 cm^{-1} und bei 1195 cm^{-1} Hinweise auf Daidzin, für Glycitin sind es die Peaks 1516 cm^{-1} , 1495 cm^{-1} , 1315 cm^{-1} und 1268 cm^{-1} . Für die Anwesenheit von Genistin sprechen die Ausschläge bei 1516 cm^{-1} , 1495 cm^{-1} und bei 1268 cm^{-1} . Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die beiden Peaks bei 1516 cm^{-1} und bei 1495 cm^{-1} in den Spektren aller drei Isoflavone zu finden und daher nicht spezifisch sind.

Zum Schluss wird auf das Nahrungsergänzungsmittel Soja 60 C näher eingegangen. Die Hauptinhaltsstoffe sind Daidzin und Genistin, die jedoch in sehr geringen Konzentrationen von $0,091$ und $0,076\text{ mg pro ml Extrakt}$ vorliegen. Dies und das Vorhandensein der Isoflavone von Rotklee, die ebenfalls Bestandteil dieser Zubereitung sind, erschwert die Identifikation von Daidzin, Genistin und Glycitin in dem evaporierten, methanolischen Extrakt des Präparats.

Als Anhaltspunkte für Daidzin zählen die Banden bei 1515 cm^{-1} und bei 1246 cm^{-1} , für Genistin bei 1408 cm^{-1} , 1313 cm^{-1} und 1180 cm^{-1} . Für Glycitin, das in einer Konzentration von $0,015\text{ mg pro ml Extrakt}$ vorliegt, ist keine charakteristische Bande im IR-Spektrum erkennbar. Selbst nach Bildung der ersten Ableitung der Spektren sind nur relativ wenige Peaks erkennbar, die sich zuordnen lassen (Abbildung 44).

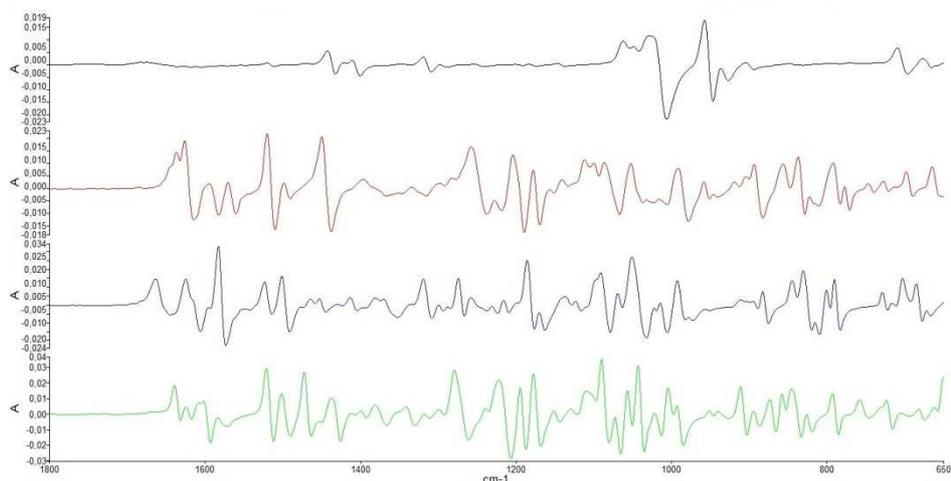


Abb. 44: 1. Ableitung der Spektren von Soja 60 C, Daidzin, Genistin und Glycitin

Ergebnisse

4.2 Quantifizierung mithilfe der IR-Spektroskopie

4.2.1 Rotklee-Präparate

Zuerst wurde versucht, den Einfluss der Begleitstoffe in den Nahrungsergänzungsmitteln zu identifizieren. Dazu wurden die einzelnen Standardsubstanzen in Ethanol 50 % gelöst und zwar in dem Verhältnis, wie sie in den entsprechenden pflanzlichen Zubereitungen vorkommen. Daraufhin wurde ein Differenzspektrum zwischen den Präparaten und der evaporierten Mischung an Reinstoffen gebildet. Ziel war es, ein Spektrum der Begleitstoffe zu erhalten, das von weiteren unbekanntem Proben abgezogen werden kann und als Ergebnis ein Spektrum der fünf Standards liefert (Matrix+Inhaltsstoffe – Matrix = Inhaltsstoffe). Dies zeigte praktisch aber keine sinnvollen Ergebnisse, da eine Beeinflussung der Wirkstoffe und Hilfsstoffe zu einer zu starken Überlappung der Banden führte und das formale Differenzieren nicht möglich war.

Am Beispiel von Menoflavon® wird dies in folgender Abbildung dargestellt:

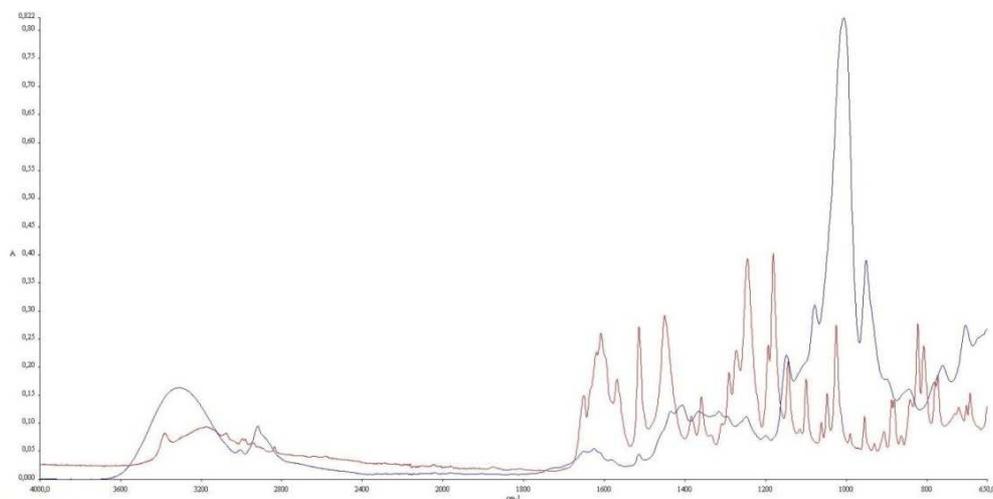


Abb. 45: Blaue Kurve: Menoflavon®-Extrakt, Rote Kurve: Nachmischung der in Menoflavon® enthaltenen Isoflavone im Mischungsverhältnis wie sie laut HPLC in dem Extrakt vorkommen

Da offensichtlich eine Quantifizierung über das Erstellen von Nachmischungen oder über eine spezifische Absorptionsbande mittels Lambert-Beerschem Gesetz nicht möglich war, wurden im weiteren Untersuchungsverlauf die Extrakte mit Standardsubstanzen unterschiedlicher Konzentrationen versetzt. Jedoch waren bei der Betrachtung der Spektren die minimalen Veränderungen in der Konzentration von z.B. Formononetin optisch nicht sichtbar.

Ergebnisse

Bei der Bildung der ersten Ableitung war dagegen ein Unterschied im Spektrum erkennbar (Abbildung 46), da durch diese mathematische Operation die relativ geringen Signaländerungen vor dem spektralen Untergrund verstärkt wurden. Dieser offensichtlich doch vorhandene Unterschied in den Spektren bildete die Grundlage für die Entwicklung eines quantitativen Modells, das die Korrelation der Spektren mit den entsprechenden Konzentrationswerten vornimmt.

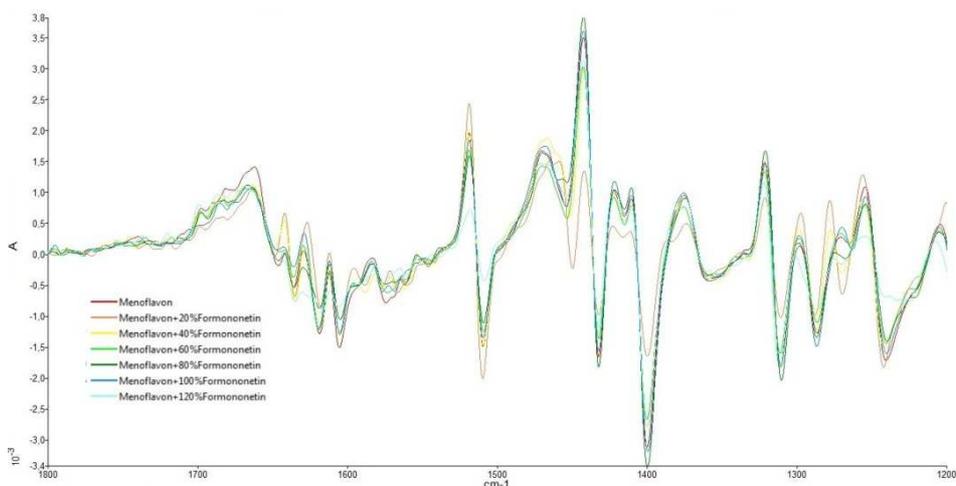


Abb. 46: 1. Ableitung im Bereich von 1800- 1200 cm^{-1} von Menoflavon® mit unterschiedlichen Zusätzen an Formononetin

Um eine einfache, schnelle und kostengünstige Quantifizierung von Nahrungsergänzungsmitteln zu ermöglichen, wurden statistische Modelle entwickelt, die mithilfe von IR-Spektren eine entsprechende Analyse durchführen.

Damit ein mathematisches System aussagekräftige Ergebnisse ermittelt, die repräsentativ sind für unbekannte Proben, wird eine große Stichprobenmenge benötigt. Dieser Kalibrationsdatensatz weist seinerseits einen hohen Informationsgehalt auf, da jedem Komponentenwert eine ganze spektrale Struktur anstatt einem spektralen Datenpunkt zugeordnet wird.

Es wurden die Extrakte an sich und die mit Standardsubstanzen versetzten Extrakte vermessen. Um den gesamten Kalibrationsbereich abzudecken, wurden Extrakte der Nahrungsergänzungsmittel hergestellt, die über präparative HPLC von einzelnen Inhaltsstoffen befreit wurden. Diese Untersuchungsexemplare konnten dann ebenfalls für die Modellentwicklung herangezogen werden, um den Einfluss der einzelnen Isoflavone auf das IR-Spektrum des gesamten Extrakts zu bestimmen. Für die Modellentwicklung wurde der PLS1-Algorithmus verwendet.

Ergebnisse

Bei der ersten Kalibrierung über den gesamten Wellenlängenbereich wurden die IR-Spektren der gesamten Proben mit den mittels HPLC ermittelten Gehaltskonzentrationen korreliert. Als Probenvorbereitung wurde zuerst eine interaktive Basislinienkorrektur der gesamten Stichprobe mithilfe der Software von Perkin-Elmer durchgeführt, um den Versatz der Grundlinie in den Spektren auszugleichen.

Eine Datenvorbehandlung bietet sich an, um die Spektren zu präparieren und dem PLS-Algorithmus eine möglichst gute Korrelation zwischen den Spektral- und den Konzentrationsdaten zu ermöglichen. Diese Methode und die Wahl geeigneter Frequenzbereiche sind wichtige Parameter für die Entwicklung von präzisen Modellen. Eine Basislinienkorrektur sollte immer für eine Quant+-Kalibrierung durchgeführt werden, da dieser Versatz ein allgemein auftretender Unterschied zwischen den verschiedenen Spektren ist und als Folge ein schlechtes Modell entstehen würde. Bei der Entwicklung der Quantifizierungsmethode wurde ebenfalls als Vorbehandlung unter anderem die Funktion „Offset“ verwendet. Diese Option bestimmt die mittlere Intensität für das ganze Spektrum und subtrahiert diesen Mittelwert von jedem einzelnen Intensitätswert des Spektrums. Da die Vorbehandlung der Spektren mittels Offset-Option jedoch mitunter für eine verlässliche, exakte Auswertung der unbekanntenen Proben nicht ausreichend war, wurden weitere Vorbehandlungsmethoden angewandt.

So konnte der Einfluß der wellenlängenabhängigen Lichtstreuung durch die Anwendung der Streuungskorrektur (Standard Normal Variate= SNV) kompensiert werden. Bereiche im Spektrum, die für das analytische Problem unerheblich waren oder einen negativen Einfluß auf das erzeugte Modell ausüben könnten, wurden als „Blanks“ von der Analyse ausgeschlossen.

Da wie bereits erwähnt die Bildung der Ableitung eines Spektrums die Unterschiede im Kurvenverlauf deutlicher zeigt, wurde schließlich auch die erste oder zweite Ableitung der Kalibrierungsproben erzeugt, um damit Modelle zu erstellen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Kalibrierung über den gesamten Wertebereich sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 µl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 µl)		
	4000- 650 Offset	4000- 650 1. Ableitung	4000-650 2. Ableitung
Daidzein (0,049)	7/ 83/ 0,0172	9/ 95/ 0,0117	9/ 94/ 0,0140
Formononetin (0,247)	4/ 40/ 0,0591	5/ 83/ 0,0385	9/ 91/ 0,0303
Biochanin A (0,074)	8/ 83/ 0,0319	9/ 95/ 0,0198	8/ 96/ 0,0183
Gesamtisoflavone (0,394)	4/ 36/ 0,0632	6/ 70/ 0,0499	8/ 91/ 0,0330
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ 2 Ausreißer	→ 3 Ausreißer	→ 8 Ausreißer

Tab. 26: Modellparameter für Daidzein, Formononetin, Biochanin A und die Gesamtisoflavone; mit Genistein und Glycitein wurden aufgrund ihres zu geringen Gehaltes keine Modelle erstellt

Dabei ist zu sehen, dass es bei jeder untersuchten Stichprobenmenge, also bei jeder unterschiedlichen Fragestellung, zu verschiedenen guten Modellen kommt. Bei den Modellen, wo nur der Versatz korrigiert wurde, bestand für Daidzein und Biochanin A eine gute Übereinstimmung. Dies ist an der hohen spektralen Varianz ablesbar, die die Modelle erklären können, jedoch sind der Rang und der SEP sehr hoch. Diese Methoden sind demzufolge nicht sehr robust. Bei Formononetin und dem Gesamtisoflavongehalt gab es hingegen eine starke Streuung, so dass diese Modellparameter nicht optimal zu sein schienen.

Weiterhin zeigte sich die Auswirkung der Bildung von Ableitungen. Da Veränderungen im Spektrum in Abhängigkeit von der Substanzmenge deutlicher hervortreten, kommt es zu einer Verbesserung der Modelle. Die Streuung der Werte ist geringer, es lässt sich ein größerer Anteil der spektralen Varianz erklären und der Standardvorhersagefehler sinkt dadurch. Allerdings mussten 17 Proben aus dem Kalibrierungssatz entfernt werden, da ihr Bandenmuster nicht zu den anderen für diese Methode passte. Außerdem wurden drei Proben (zwei bezüglich ihres Biochanin A-Gehaltes und eine wegen der Daidzein-Angabe) als Ausreißer identifiziert. Diese Ausreißer konnten nicht aus dem Modell als fehlerhaft entfernt werden, da die Mahalanobis-Distanz nicht erhöht war und somit keine zusätzlichen Merkmale der Probe vorhanden waren, die durch das Modell nicht ausreichend beschrieben wurden.

Ergebnisse

Durch Bildung der zweiten Ableitung erlangten relativ breite Banden eine steilere Form, wodurch die Unterschiede in den Spektren noch deutlicher wurden. Als Nachteil ist jedoch zu erwähnen, dass das spektrale Rauschen ebenfalls aufgewertet wird und damit einen Störfaktor im Spektrum darstellt, welcher die Modellbewertung unter Umständen verschlechtert.

Die Werte für die Modelle über den gesamten Spektrenbereich von 4000- 650 cm^{-1} erschienen noch optimierbar, was eine weitere Datenbehandlung zur Folge hatte. Aufgrund der Betrachtung des kompletten Spektrums lagen zwar mehr spektrale Datenpunkte und somit mehr Informationen pro Komponentenwert vor, jedoch führte dies nicht automatisch zu einem bestmöglichen Modell. Es kann dann sogar zu einer Verschlechterung kommen, da Strukturen, die nicht von den eigentlichen Komponentenwerten stammen, miteinbezogen werden wie z.B. spektrales Rauschen oder Absorptionsbanden von Störkomponenten. Um dies auszuschließen, erfolgte eine weitere Untersuchung der Spektren, um gezielt nach relevanten Bereichen zu suchen.

Aufgrund der geringen Veränderung im Bereich von 4000- 1800 cm^{-1} in den Spektren der Nahrungsergänzungsmittel bei unterschiedlichem Inhaltsstoffgehalt sowie der hohen Rauschanfälligkeit wurde bei der nächsten Kalibrierung auf diesen Bereich verzichtet (Tabelle 27).

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 μl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 μl)		
	1800- 650 Offset	1800- 650 1. Ableitung	1800-650 2. Ableitung
Daidzein (0,049)	5/ 77/ 0,0191	5/ 86/ 0,0157	6/ 94/ 0,0137
Formononetin (0,247)	2/ 29/ 0,0647	4/ 77/ 0,0411	4/ 55/ 0,0672
Biochanin A (0,074)	9/ 92/ 0,0244	7/ 95/ 0,0193	5/ 88/ 0,0276
Gesamtisoflavone (0,394)	4/ 57/ 0,0557	4/ 66/ 0,0517	3/ 65/ 0,0700
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ 1 Ausreißer	→ 1 Ausreißer	→ 3 Ausreißer

Tab. 27: Modellparameter für den Bereich von 1800- 650 cm^{-1}

Für die Bestimmung von Daidzein zeigte sich eine geringfügige Absenkung des SEP, die anderen Parameter verschlechterten sich allerdings im Vergleich zur vorhergehenden Kalibrierung.

Ergebnisse

Daraufhin wurden verschiedene Frequenzbereiche mit unterschiedlicher Daten- vorbehandlung untersucht, um für jeden Inhaltsstoff das bestmögliche Modell zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde sich an den Ergebnissen der qualitativen Untersuchungen hinsichtlich wichtiger Banden und Störfaktoren orientiert.

Zunächst erfolgte die Betrachtung des engeren Wellenzahlenbereiches von 1620- 1000 cm^{-1} .

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 μl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 μl)		
	1620- 1100 Offset	1620- 1100 1. Ableitung	1620- 1100 2. Ableitung
Daidzein (0,049)	4/ 81/ 0,0166	4/ 85/ 0,0155	7/ 93/ 0,0118
Formononetin (0,247)	6/ 57/ 0,0517	6/ 70/ 0,0458	6/ 72/ 0,0452
Biochanin A (0,074)	6/ 87/ 0,0289	10/ 95/ 0,0204	10/ 95/ 0,0206
Gesamtisoflavone (0,394)	6/ 65/ 0,0526	6/ 71/ 0,0519	5/ 70/ 0,0574
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ 5 Ausreißer	→ 4 Ausreißer	→ 3 Ausreißer

Tab. 28: Modellparameter für den Bereich von 1620- 1100 cm^{-1}

Für Biochanin A zeigten sich sehr gute Werte für die spektrale Varianz und den Standardvorhersagefehler in der ersten und zweiten Ableitung. Trotz des geringeren SEP ist die Kalibrierung anhand der zweiten Ableitung vorzuziehen, da es keine Ausreißer für Biochanin A bei ihrer Modellerstellung gab, wohingegen bei der ersten Ableitung eine Probe entfernt werden musste.

Die Musteranalyse (Abbildung 47) wies eine zufällige und ungeordnete Verteilung der Proben auf. Bestimmte Gruppierungen und Muster könnten ein Modell nachteilig beeinflussen und die Anfertigung von individuellen Quantifizierungsmodellen notwendig machen, was die Flexibilität einschränken würde.

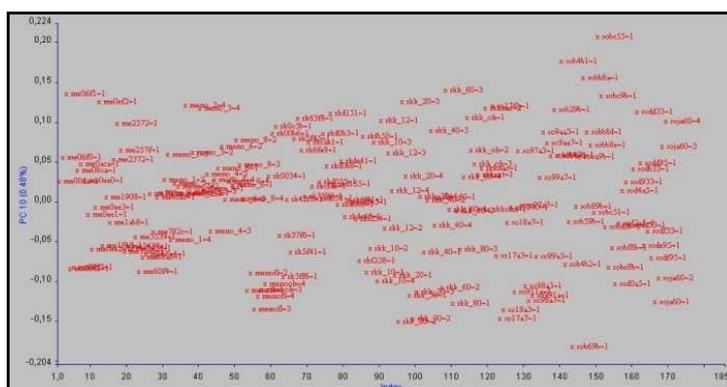


Abb. 47: Streudiagramm der Scores aller Referenzproben für Biochanin A im Bereich von 1620- 1100 cm^{-1} nach Bildung der 2. Ableitung

Ergebnisse

Zur weiteren Optimierung wurden die Potentiale der Wellenzahlen gegen die einzelnen Wellenzahlen aufgetragen, auch „Variable Leverage“ genannt. So schienen die Bereiche von 1125- 875 cm^{-1} im unbehandelten Spektrum und von 1350- 900 cm^{-1} im Spektrum der ersten Ableitung des Wellenzahlenbereichs von 1800- 650 cm^{-1} für die teilweise schlechte spektrale Varianz und den hohen Standardvorhersagefehler verantwortlich, da die Darstellung des „Variable Leverage“ diese Bereiche als einflußreich auf die Kalibrierung zeigte (Abbildung 48).

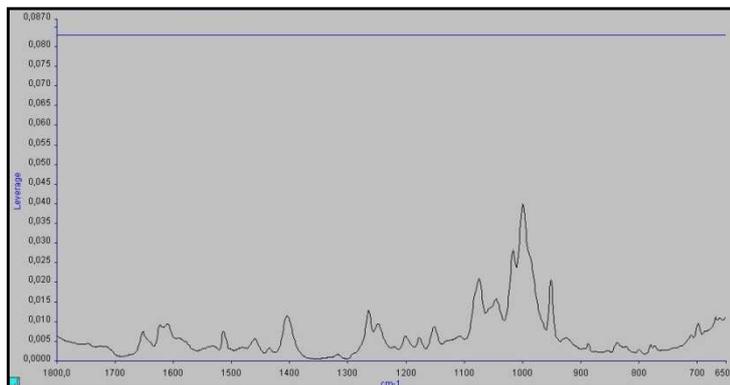


Abb. 48: Variable Leverage Graph der Kalibrierung über den Bereich von 1800- 650 cm^{-1} mit Offset-Korrektur

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 μl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 μl)	
	1800- 1125 875- 650 Offset	1800- 1350 900- 650 1. Ableitung
Daidzein (0,049)	4/ 81/ 0,0170	4/ 82/ 0,0168
Formononetin (0,247)	6/ 59/ 0,0501	7/ 68/ 0,0494
Biochanin A (0,074)	7/ 85/ 0,0317	6/ 89/ 0,0275
Gesamtisoflavone (0,394)	7/ 70/ 0,0493	7/ 72/ 0,0531
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ keine Ausreißer	→ 2 Ausreißer

Tab. 29: Modellparameter für den Bereich von 1800- 650 cm^{-1} mit Lücken (Blanks) für die Bereiche mit einem hohen Einfluß auf die Kalibrierung

Ergebnisse

Da dies nicht den erwarteten Erfolg brachte, wurden daraufhin Modelle der 2. Ableitung mit unterschiedlich gesetzten Lücken erstellt. Schließlich konnten drei Kalibrierungen gefunden werden, die gute Werte lieferten (siehe Tabelle 30).

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 µl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 µl)		
	1800- 1550 1490- 1220 900- 650 2. Ableitung	1800- 1550 1490- 1050 900- 650 2. Ableitung	1800- 1550 1490- 1050 900- 680 2. Ableitung
Daidzein (0,049)	8/ 94/ 0,0130	7/ 94/ 0,0115	7/ 95/ 0,0108
Formononetin (0,247)	7/ 77/ 0,0448	6/ 81/ 0,0402	10/ 89/ 0,0360
Biochanin A (0,074)	7/ 92/ 0,0260	7/ 94/ 0,0222	6/ 93/ 0,0230
Gesamtisoflavone (0,394)	5/ 68/ 0,0593	5/ 74/ 0,0509	5/ 74/ 0,0495
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ 2 Ausreißer	→ 2 Ausreißer	→ 2 Ausreißer

Tab. 30: Modellparameter für die 2. Ableitung mit unterschiedlich gesetzten Lücken

Für Formononetin ließ sich so ein Modell entwickeln, mit dem der Großteil der spektralen Varianz erklärt werden konnte, was sich wiederum positiv auf die Vorhersagegenauigkeit auswirkte, wie in den folgenden Graphiken zu sehen.

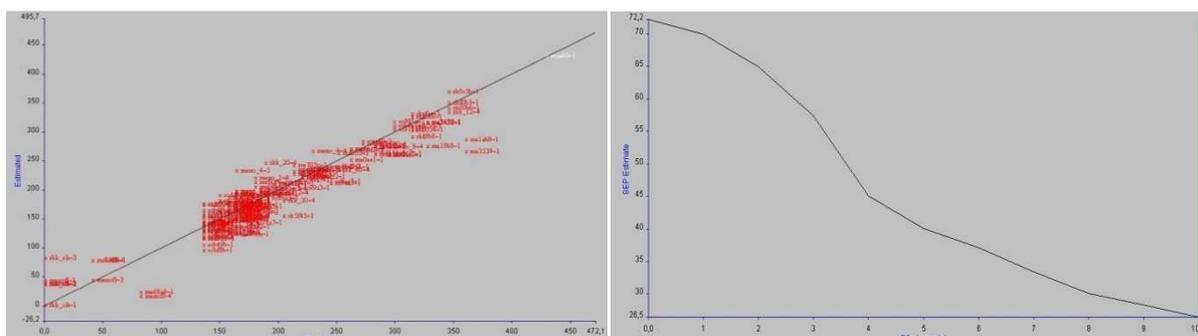


Abb. 49: Korrelation der Schätzwerte mit den Referenzwerten (links) und Auftragung des Standardvorhersagefehlers gegen die Faktorenanzahl für Formononetin mit dem am besten passenden Modell (1800- 1550, 1490- 1050, 900- 680 cm^{-1} , 2. Ableitung)

Ergebnisse

Abschließend sind in der folgenden Tabelle die jeweils optimalen Methoden zur Quantifizierung der Isoflavone aufgelistet:

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 µl)	Modelleigenschaften	No. of LV's (Rang)	Varianz	SEP (mg pro 500 µl)
Daidzein (0,049)	1800- 1550 1490- 1050 900- 680 2. Ableitung	7	95 %	0,0108
Formononetin (0,247)	1800- 1550 1490- 1050 900- 680 2. Ableitung	10	89 %	0,0360
Biochanin A (0,074)	1620- 1100 2. Ableitung	10	95 %	0,0206
Gesamtisoflavone (0,394)	4000-650 2. Ableitung	10	92 %	0,0398

Tab. 31: Die ausgewählten, am besten geeigneten Modelle

Bei der Berechnung des relativen Standardvorhersagefehlers (SEP/ Mittelwert x 100 %) ergaben sich für Daidzein 22,0 %, für Formononetin 14,6 %, für Biochanin A 27,8 % und für den Gesamtisoflavongehalt 10,1 %. Legt man die Grenze der FDA von 15 % für die Bestimmung des Gehaltes pflanzlicher Zubereitungen angelehnt an das Arzneibuch zugrunde, würden sich die erstellten Modelle für Formononetin und die Gesamtisoflavone zur Quantifizierung geeignet sein. Der Fehler bei Daidzein und Biochanin A war hingegen so hoch, dass hier nur eine grobe Abschätzung des Gehaltes möglich ist.

Um die entwickelten Methoden hinsichtlich ihrer Vorhersagefähigkeit zu testen, wurde je Nahrungsergänzungsmittel der Gehalt an Formononetin und Gesamtisoflavonen von unbekanntem Proben vorhergesagt.

Die Resultate sind nachfolgend dargestellt:

Präparat	Ermittelter Wert an Formononetin pro Kapsel in mg mittels IR	Ermittelter Wert an Formononetin pro Kapsel in mg mittels HPLC	Ermittelter Wert an Isoflavonen pro Kapsel in mg mittels IR	Ermittelter Wert an Isoflavonen pro Kapsel in mg mittels HPLC
Menoflavon®	26,3 ± 3,2	23,3 ± 0,7	46,3 ± 3,3	42,2 ± 1,0
Rotklee Kapseln	24,1 ± 3,5	26,3 ± 1,0	43,1 ± 4,3	43,8 ± 2,7
Soja 60 C	11,2 ± 1,6	10,4 ± 0,2	14,6 ± 1,7	15,6 ± 0,5

Tab. 32: Ergebnisse der Vorhersage von unbekanntem Proben (n= 6)

Ergebnisse

Der Mahalanobissche Abstand der Werte für den Gehalt der unbekanntenen Proben sollte kleiner als 1 sein, damit der Kalibrierungssatz repräsentativ für sie ist. Darüber hinaus sollten die normierten Restwerte, also die Quotienten der Restvarianz der einzelnen zu analysierenden Probe und der mittleren Restvarianz des gesamten Kalibrierungssatzes, nicht größer als 3 sein, da sonst das Restspektrum wahrscheinlich noch Merkmale enthält, die während der Kalibration nicht beschrieben wurden. Dies war hier deutlich erfüllt, so dass die verwendeten Modelle für eine Vorhersage geeignet sind.

Die ermittelten Werte stimmten ungefähr mit den deklarierten überein. Zum Großteil lagen die Schätzwerte über den Werten der HPLC und nur im Fall von Rotklee Kapseln bezüglich des Gesamtisoflavongehaltes darunter.

4.2.2 Soja-Präparate

Wie in den Spektren der Extrakte zu sehen, haben wie bei den Rotklee-Präparaten die Zusatzstoffe der Nahrungsergänzungsmittel einen bedeutenden Einfluß auf das IR-Spektrum. Bei Vergleich der Spektren der Extrakte und der Nachmischung der Standards war keine Deckungsgleichheit von Banden bei entsprechender Wellenzahl gegeben wie an folgendem Beispiel zu sehen.

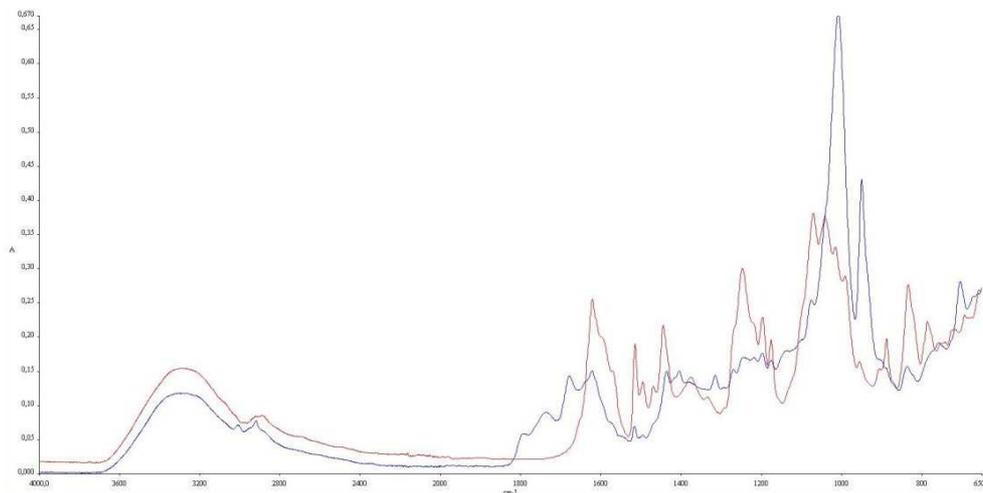


Abb. 50: Blaue Kurve: Alsifemin®-Extrakt, Rote Kurve: Nachmischung der in Alsifemin® über HPLC bestimmten Isoflavone

Ergebnisse

Es erfolgte zu Beginn eine Betrachtung des gesamten Wellenzahlenbereiches wie bei den Rotklee-Präparaten.

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 µl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 µl)		
	4000- 650 Offset	4000- 650 1. Ableitung	4000- 650 2. Ableitung
Daidzin (0,118)	6/ 65/ 0,0341	8/ 86/ 0,0224	8/ 86/ 0,0220
Genistin (0,042)	13/ 96/ 0,0103	9/ 98/ 0,0071	12/ 98/ 0,0070
Glycitin (0,049)	6/ 77/ 0,0122	10/ 94/ 0,0072	11/ 94/ 0,0071
Gesamtisoflavone (0,206)	8/ 84/ 0,0346	8/ 90/ 0,0285	8/ 94/ 0,0281
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ keine Ausreißer	→ 5 Ausreißer	→ 2 Ausreißer

Tab. 33: Modellparameter für den Bereich von 4000 bis 650cm⁻¹

In der folgenden Abbildung sind die ermittelten Schätzwerte aus dem Modell gegen die angegebenen Werte für die jeweiligen Hauptinhaltsstoffe dargestellt. Bei dieser Methode bestand für Genistin eine relativ gute Übereinstimmung zwischen der Schätzung und dem tatsächlichen Wert, bei Daidzin und Glycitin jedoch gab es eine starke Streuung. Die große Kongruenz bei Genistin war auch anhand der hohen spektralen Varianz ablesbar, jedoch waren der Rang und der SEP relativ hoch, wodurch die Methode nicht robust genug für zukünftige Bestimmungen sein könnte.

Ergebnisse

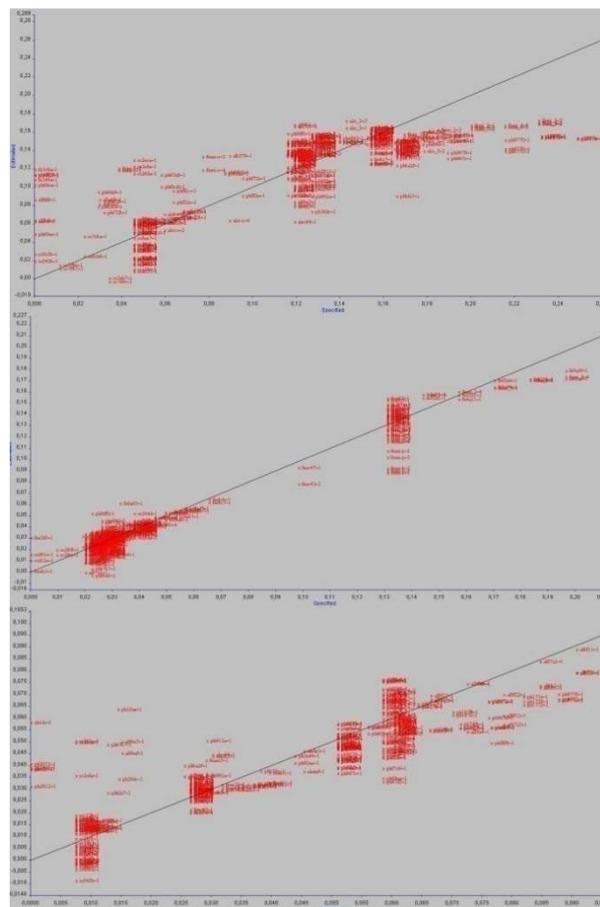


Abb. 51: Korrelationen der Schätzwerte mit den Referenzwerten für die drei Hauptinhaltsstoffe für den Wellenzahlenbereich $4000\text{-}650\text{cm}^{-1}$ mit der Offset-Option

Bei der ersten Ableitung ist eine Verbesserung des Modells erkennbar. Die Streuung von Daidzin und Glycitin ist geringer und aus der Tabelle ist eine größere Varianz mit einem entsprechend kleineren SEP für alle drei Stoffe ablesbar. Bei Genistin hat die Varianz im geringeren Maße zugenommen und der Rang ist deutlich abgesunken.

Ergebnisse

Aufgrund einer geringfügigen Veränderung im Bereich von 4000 bis 2000 cm^{-1} im Spektrum der Nahrungsergänzungsmittel sowie aufgrund der höheren Rausanfälligkeit wurde bei der nächsten Kalibrierung auf diesen Bereich verzichtet. In nachstehender Tabelle sind die Modellparameter aufgelistet.

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 μl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 μl)		
	2000- 650 Offset	2000- 650 1. Ableitung	2000- 650 2. Ableitung
Daidzin (0,118)	6/ 63/ 0,0345	7/ 84/ 0,0234	8/ 88/ 0,0224
Genistin (0,042)	8/ 92/ 0,0140	9/ 98/ 0,0074	7/ 97/ 0,0094
Glycitin (0,049)	6/ 76/ 0,0123	16/ 97/ 0,0065	6/ 90/ 0,0085
Gesamtisoflavone (0,206)	6/ 78/ 0,0404	8/ 90/ 0,0286	8/ 92/ 0,0279
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ 2 Ausreißer	→ 4 Ausreißer	→ keine Ausreißer

Tab. 34: Modellparameter für den Bereich von 2000 bis 650 cm^{-1}

Für die Bestimmung des Gesamtisoflavongehalts sind gute Ergebnisse für den Rang, die Varianz und den Standardvorhersagefehler bei der zweiten Ableitung vorhanden. Die Korrelation der Schätzwerte mit den Referenzwerten zeigte zudem keine Ausreißer für dieses Modell, was eine Verbesserung gegenüber dem vorangegangenen darstellt. Die Analyse des Modells auf Strukturauffälligkeiten lieferte keine Muster und war somit für die Untersuchung aller fünf Nahrungsergänzungsmittel geeignet (Abbildung 52).

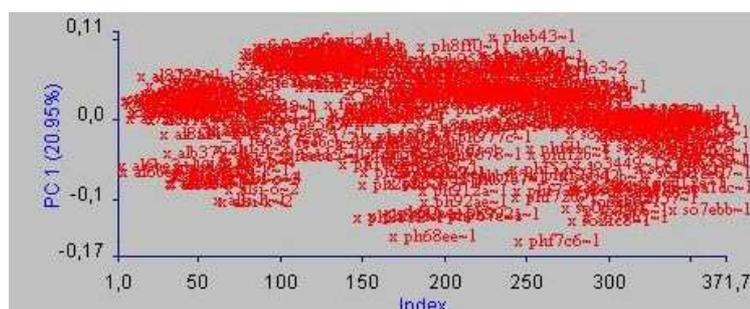


Abb. 52: Streudiagramm der Scores für alle Referenzproben

Bei der qualitativen Untersuchung der IR-Spektren wurde festgestellt, dass der Bereich um die Wellenzahlen von 1075 bis 950 cm^{-1} keine Hinweise auf die Inhaltsstoffe gibt. Diese Frequenzen erschienen dementsprechend für eine Quantifizierung nicht nötig.

Ergebnisse

Weiterhin schien diese Region zu einer Verschlechterung der Kalibrierung zu führen, da es starke Unterschiede zwischen den einzelnen IR-Spektren gab. In diesem Fall war es von Nutzen diesen Bereich herauszulassen und eine Lücke zu setzen, wobei beachtet werden musste, inwiefern sich das auf die Güte des Modells auswirken würde. In der folgenden Wertetabelle sind weitere Parameter für drei Modelle aufgelistet, bei denen der Wellenlängenbereich von 1075 bis 950cm⁻¹ ausgeschlossen ist.

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 µl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 µl)		
	2000- 650 Blank 1075- 950 Offset	2000- 650 Blank 1075- 950 1. Ableitung	2000- 650 Blank 1075- 950 2. Ableitung
Daidzin (0,118)	9/ 81/ 0,0239	6/ 83/ 0,0224	7/ 88/ 0,0224
Genistin (0,042)	10/ 94/ 0,0109	7/ 96/ 0,0090	7/ 97/ 0,0094
Glycitin (0,049)	10/ 88/ 0,0081	7/ 89/ 0,0079	6/ 90/ 0,0085
Gesamtisoflavone (0,206)	7/ 84/ 0,0351	6/ 88/ 0,0304	6/ 91/ 0,0288
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ 7 Ausreißer	→ keine Ausreißer	→ keine Ausreißer

Tab. 35: Modellparameter für den Bereich von 2000 bis 650cm⁻¹ mit der Lücke von 1075-950cm⁻¹

Für Genistin ergaben sich sehr gute Werte bezüglich der spektralen Varianz und des Standardvorhersagefehlers. Weiterhin hatten die beiden Modelle der ersten und zweiten Ableitung den Vorteil, dass keine Kalibrierungsproben als Ausreißer entfernt werden mussten. Das Streudiagramm lieferte zwar eine leichte Gruppierung bei geringem Index. Dies ist zu vernachlässigen, weil es sich sowohl um Proben von Alsifemin® als auch von Femiflavin® handelt, von denen ebenfalls weitere Exemplare bei größerem Index aufzufinden sind (Abbildung 53).

Ergebnisse

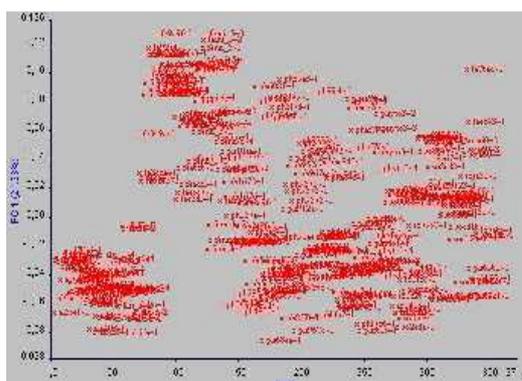


Abb. 53: Musteranalyse für Genistin im Bereich von 2000- 650cm⁻¹, Blank 1075- 950 cm⁻¹ mit der ersten Ableitung als Option

Bei der weiteren Optimierung des Modells wurden unterschiedliche Spektralbereiche ausgewählt. Für die Beurteilung, welcher Bereich wichtig ist, beziehungsweise welche Spektralregion für die schlechte Varianz und den schlechten SEP verantwortlich sein könnte, wurde wiederum die Darstellung „Variable Leverage“ (Auftragung der Potentiale der Variablen gegen die für die Kalibration verwendeten Variablen) verwendet, da hier spektrale Ausreißer identifiziert werden können.

Der nächste zu untersuchende Bereich war von 1600 bis 650 cm⁻¹ mit der gleichen gesetzten Lücke. Es erfolgt eine weitere Eingrenzung, weil die Möglichkeit bestand, dass durch das größere Spektrum mehr Störgrößen und mehr Rauschen in die Modellkalibration miteinbezogen werden.

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 µl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 µl)		
	1600- 650 Blank 1075- 950 Offset	1600- 650 Blank 1075- 950 1. Ableitung	1600- 650 Blank 1075-950 2. Ableitung
Daidzin (0,118)	8/ 79/ 0,0250	6/ 84/ 0,0233	6/ 85/ 0,0240
Genistin (0,042)	6/ 89/ 0,0151	7/ 96/ 0,0100	7/ 97/ 0,0099
Glycitin (0,049)	11/ 90/ 0,0756	12/ 95/ 0,0066	6/ 91/ 0,0083
Gesamtisoflavone (0,206)	6/ 89/ 0,0151	6/ 88/ 0,0310	8/ 92/ 0,0285
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ 8 Ausreißer	→ 1 Ausreißer	→ 1 Ausreißer

Tab. 36: Modellparameter für den Bereich von 1600- 650 cm⁻¹ mit einer Lücke von 1075- 950 cm⁻¹

Ergebnisse

Im nächsten Versuch wurde auf den Bereich von 1075 bis 950 cm^{-1} nicht verzichtet, jedoch auf die Region von 900 bis 650 cm^{-1} .

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 μl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 μl)		
	1600- 900 Offset	1600- 900 1. Ableitung	1600- 900 2. Ableitung
Daidzin (0,118)	5/ 60/ 0,0362	8/ 85/ 0,0221	8/ 87 / 0,0219
Genistin (0,042)	14/ 96/ 0,0105	8/ 96/ 0,0100	7/ 96/ 0,0096
Glycitin (0,049)	8/ 80/ 0,0116	8/ 91/ 0,0080	12/ 95/ 0,0073
Gesamtisoflavone (0,206)	10/ 87/ 0,0318	8/ 89/ 0,0293	8/ 91/ 0,0285
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ 4 Ausreißer	→ 1 Ausreißer	→ 1 Ausreißer

Tab. 37: Modellparameter für den Bereich von 1600- 900 cm^{-1}

Danach erfolgte die Betrachtung des Wellenlängenbereiches von 1500 bis 980 cm^{-1} .

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 μl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 μl)		
	1500- 980 Offset	1500- 980 1. Ableitung	1500- 980 2. Ableitung
Daidzin (0,118)	8/ 80/ 0,0263	7/ 84/ 0,0233	7/ 86/ 0,0218
Genistin (0,042)	12/ 95/ 0,0109	10/ 96/ 0,0100	11/ 98/ 0,0080
Glycitin (0,049)	8/ 86/ 0,0102	9/ 90/ 0,0080	7/ 90 / 0,0084
Gesamtisoflavone (0,206)	5/ 72/ 0,0455	6/ 88/ 0,0307	5/ 87/ 0,0322
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ 2 Ausreißer	→ keine Ausreißer	→ 3 Ausreißer

Tab. 38: Modellparameter für den Bereich von 1500 bis 980 cm^{-1}

Ergebnisse

Bei diesem Modell (zweite Ableitung) wurde ebenfalls die Struktur im Datensatz für Daidzin (links) und Glycitin (rechts) betrachtet. Bei beiden ist eindeutig eine zufällige und nicht strukturierte Anordnung erkennbar.

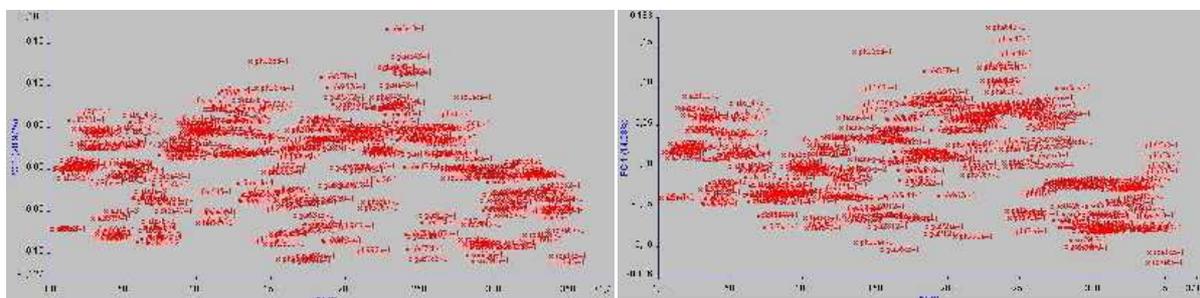


Abb. 54: Musteranalyse für Daidzin (links) und Glycitin (rechts) im Bereich von $1500\text{-}980\text{cm}^{-1}$ mit dem Modell der zweiten Ableitung

Aufgrund der guten Parameter für die Eigenschaft Daidzin wird ebenfalls der SEP und die Gegenüberstellung der Schätzwerte und Referenzwerten dargestellt.

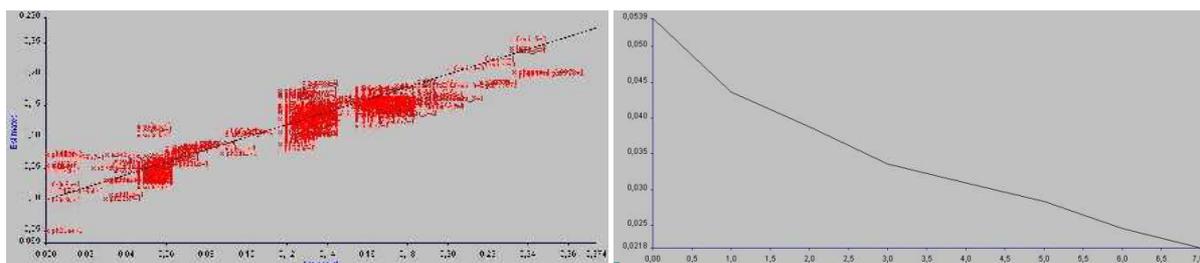


Abb. 55: Korrelation der Schätzwerte mit den Referenzwerten (links) und Auftragung des Standardvorhersagefehlers gegen die Faktorenanzahl für Daidzin für das Modell mit dem Bereich von 1500 bis 980 cm^{-1} mit gebildeter zweiter Ableitung

In der Abbildung 56 sind die Potentiale der Wellenzahlen gegen die für die Kalibration verwendeten Wellenzahlen für Glycitin aufgetragen. Das Potential ist das Maß für den Effekt, den eine Wellenzahl im Vergleich zu den anderen Wellenzahlen hat. Es beschreibt den Einfluss auf die Kalibration.

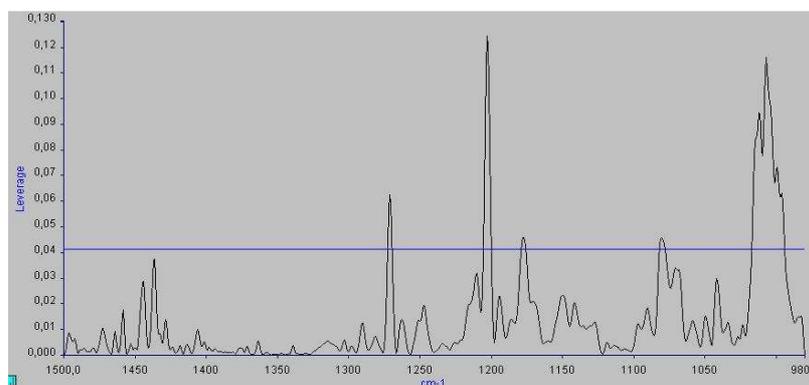


Abb. 56: Gegenüberstellung der Potentiale der Wellenzahlen mit den für die Kalibration verwendeten Wellenzahlen für das Modell mit dem Bereich von 1500 bis 980cm^{-1} mit gebildeter zweiter Ableitung

Ergebnisse

Aus dem Übertritt der Grenzlinie resultierte eine Verschlechterung des Modells, sodass der stärkste Bereich für eine neue Kalibrierung entfernt wurde, indem eine Lücke von 1220 bis 1190 cm^{-1} gesetzt wurde. In der Wertetabelle sind die Parameter für dieses Modell aufgelistet.

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 μl)	Anzahl Hauptkomponenten (No. of LV's) / spektrale Varianz in %/ SEP (Standard Error of Prediction in mg pro 500 μl)		
	1500- 980 Blank 1220- 1190 Offset	1500- 980 Blank 1220- 1190 1. Ableitung	1500- 980 Blank 1220- 1190 2. Ableitung
Daidzin (0,118)	8/ 80 / 0,0263	7/ 84/ 0,0231	7/ 86/ 0,0219
Genistin (0,042)	13/ 95/ 0,0106	8/ 96/ 0,0104	9/ 98/ 0,0080
Glycitin (0,049)	8/ 84/ 0,01007	8/ 90/ 0,0082	11/ 95/ 0,0071
Gesamtisoflavone (0,206)	10/ 88/ 0,0310	6/ 88 / 0,0311	6/ 90/ 0,0292
Durch die Kalibrierung entfernte Proben	→ 3 Ausreißer	→ 1 Ausreißer	→ keine Ausreißer

Tab. 39: Modellparameter für den Bereich von 1500 bis 980 cm^{-1} mit einer Lücke von 1220- 1190 cm^{-1}

Die Korrelation der Schätzwerte mit den Referenzwerten (links) und der SEP gegen die Faktorenanzahl (rechts) sind für die erste Ableitung von Glycitin durch folgende Abbildungen gekennzeichnet.

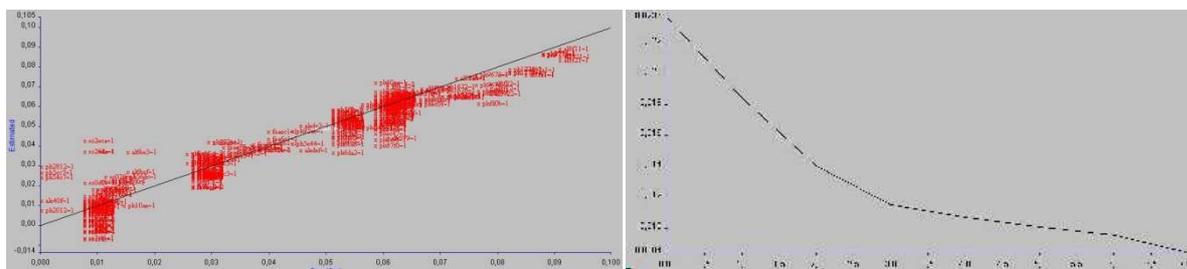


Abb. 57: Estimated vs Specified-Graph (links) und Standardvorhersagefehler (rechts) für die gewählten Optionen

Ergebnisse

Abschließend sind in der folgenden Tabelle die optimalen Methoden für die jeweiligen Stoffe und für den Gesamtgehalt an Isoflavonen und die entsprechenden Parameter aufgelistet.

Inhaltsstoffe (Mittelwert des Gehaltes in mg pro 500 µl)	Modelleigenschaften	No. of LV's (Rang)	Varianz	SEP (mg pro 500 µl)
Daidzin (0,118)	1500- 980 2. Ableitung	7	86 %	0,0218
Genistin (0,042)	2000- 1075 950- 650 1. Ableitung	7	96 %	0,0090
Glycitin (0,049)	1500- 900 1. Ableitung	9	91 %	0,0076
Gesamtisoflavone (0,206)	2000- 650 2. Ableitung	8	92 %	0,0279

Tab. 40: Die ausgewählten, am besten geeigneten Modelle

Bei Daidzin lag der relative Fehler der Vorhersage bei 18,5 %, dieser Wert liegt über der vorgegebenen Grenze von 15%. Bei Genistin betrug der Fehler bei optimalem Rang 18,6 % und überstieg dementsprechend ebenfalls die Grenze. Der Fehler bei Glycitin war 15,7 % groß und in der Nähe der Fehlerschwelle. Für die Bestimmung des Gehalts an Gesamtisoflavonen besaß das beste Modell den Rang 8 mit einer erklärten spektralen Varianz von 92,4 % und einem relativen Standardvorhersagefehler von 13,5 %, welches sich damit zur quantitativen Kontrolle der Angaben auf dem Präparat eignen würde.

Um die Menge an Soja-Isoflavonen zu bestimmen, wurden unbekannte Proben der jeweiligen Nahrungsergänzungsmittel mithilfe der ermittelten Methode analysiert. In der Tabelle 41 sind die geschätzten Werte an Isoflavonen aufgeführt.

Präparat	Ermittelter Wert an	Ermittelter Wert an
	Isoflavonen pro Kapsel in mg mittels IR	Isoflavonen pro Kapsel in mg mittels HPLC
Alsifemin®	51,2 ± 6,9	51,4 ± 1,1
Femiflavon®	54,9 ± 7,4	51,8 ± 1,3
Phyto Soya® 17,5	18,6 ± 2,5	15,9 ± 0,2
Phyto Soya® 35	33,3 ± 4,5	35,3 ± 1,0
Soja 60 C	35,8 ± 4,9	20,4 ± 0,9

Tab. 41: Vorhersage-Ergebnisse für unbekannte Proben (n= 6)

Ergebnisse

Da der Mahalanobissche Abstand der Werte kleiner als 1 und die normierten Restwerte kleiner als 3 waren, kann das entwickelte Modell zur Quantifizierung der Gesamisoflavonmenge mittels IR genutzt werden.

Die ermittelten Werte stimmten ungefähr mit den deklarierten Werten überein. Nur bei Alsifemin® war ein niedrigerer Wert an Isoflavonen ermittelt worden, bei den anderen vier Präparaten lag er über dem über HPLC ermittelten Wert. Bei Soja 60 C handelte es sich sogar um eine 79 %ige Steigerung des Gehalts.

5. Clusteranalyse

Die Clusteranalyse dient dazu, Objekte so zu gruppieren, dass die Unterschiede zwischen den Objekten innerhalb der Cluster minimiert und zwischen den Clustern maximiert wird.

Dazu wurde der Ward-Algorithmus angewendet, der als hierarchische Methode über die euklidische Distanz Objekte zu Clustern zusammenfasst, bei denen nur ein minimaler Zuwachs der Fehlerquadratsumme zu verzeichnen ist.

Für die Clusteranalyse der normalisierten Absorptionsspektren wurden jeweils fünf Trockenextrakte der einzelnen NEM eingelesen und in verschiedenen Wellenlängenregionen untersucht. Bestmögliche Resultate konnten im Bereich von 1800- 1200 cm^{-1} unter Bildung der zweiten Ableitung erhalten werden, um die Spektren von Rotklee- und Soja-Zubereitungen voneinander zu trennen (Abbildung 58). Allerdings wurden zwei Spektren von methanolischen Extrakten von Soja 60 C mit den fünf ethanolischen Extrakten zu einem Cluster zusammengefasst, was an der Ähnlichkeit der Spektren liegen dürfte. Die Zuordnung gestaltete sich daher als schwierig, da dieses Nahrungsergänzungsmittel sowohl Rotklee als auch Soja enthält. Es war jedoch mit dieser Methode möglich, die drei Rotklee-Präparate auch untereinander in verschiedene Cluster einzuordnen, bei den Soja-NEM wurde ein Spektrum von Phyto Soya® 35 mg dem Cluster von Phyto Soya® 17,5 mg zugeordnet, was durch die vergleichbare Zusammensetzung begründet sein dürfte. Weiterhin wurden aus den Spektreninformationen der Alsifemin®-Extrakte zwei Cluster gebildet. Somit scheint insgesamt nur eine Unterteilung in Rotklee- und Soja-Präparate aufgrund der wachsenden Heterogenität als aussagekräftig.

Ergebnisse

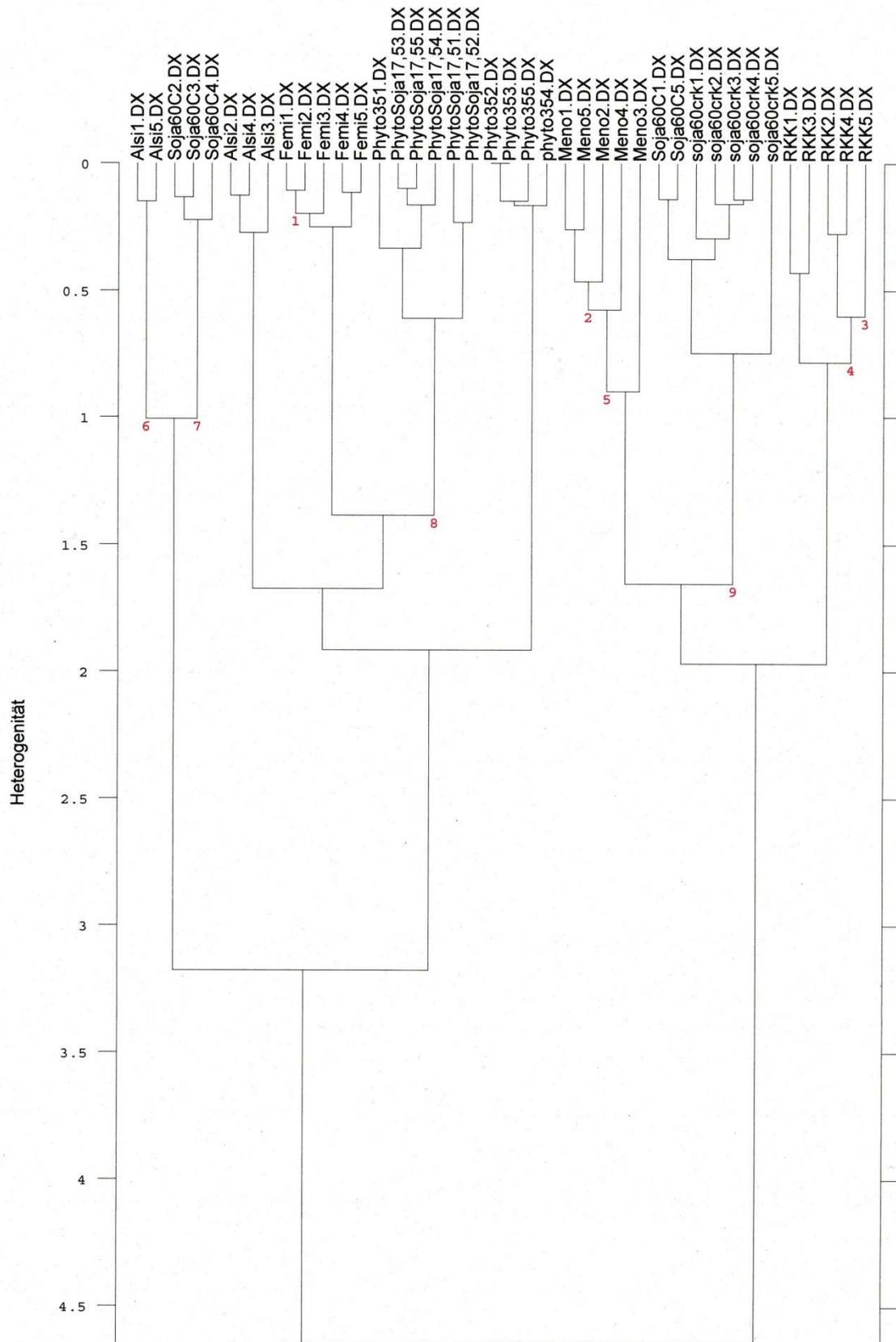


Abb. 58: Dendrogramm basierend auf den acht untersuchten Präparaten, jeweils fünffach aufgearbeitet

Ergebnisse

In der folgenden Abbildung sind die Spektren der zweiten Ableitung aller acht NEM zu sehen, die Pfeile markieren charakteristische Bereiche innerhalb der Spektren. So ist in den rot dargestellten Kurven der Rotklee-Präparate bei ca. 1600 cm^{-1} ein Maximum zu sehen, das in den Kurven der Soja-Zubereitungen (grün) nicht erscheint. Andererseits treten nur in den grünen Ableitungsspektren Maxima bei ca. 1509 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1386 cm^{-1} und 1361 cm^{-1} und ein Minimum bei 1495 cm^{-1} auf.

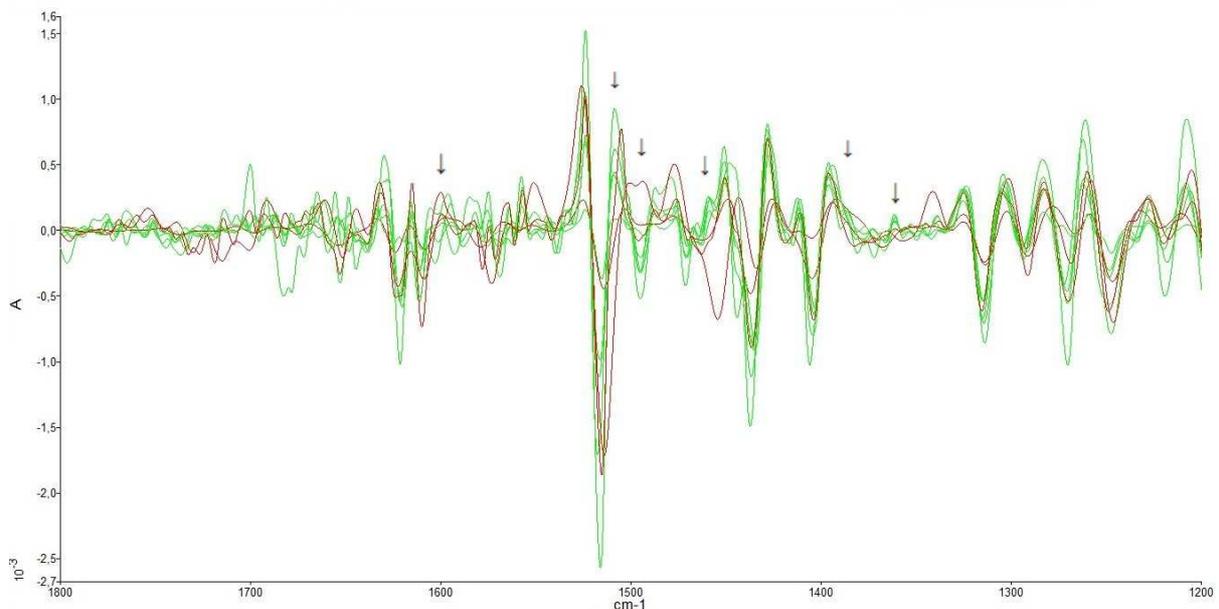


Abb. 59: Kurven der zweiten Ableitung der Rotklee- (rot) und Soja-Präparate (grün) im Bereich von $1800\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$; die Pfeile zeigen besondere, extraktsspezifische Merkmale

6. Raman-Spektroskopie

Da sich in einem Raman-Spektrum die Informationen aller chemischen Bestandteile einer Probe überlagern, stellt das Raman-Spektrum somit einen Fingerabdruck der Probe dar. Die Peaks in einem Raman-Spektrum lassen sich wie in einem IR-Spektrum bestimmten funktionellen Gruppen zuordnen. Aufgrund der sehr geringen Raman-Aktivität von Wasser können auch wässrige Lösungen untersucht werden, was mithilfe der MIR-Spektroskopie nicht möglich wäre.

Ein Problem der Raman-Spektroskopie liegt in der Fluoreszenz, die sich darin begründet, dass die Auftrittswahrscheinlichkeit dafür deutlich höher ist. Sie besitzt folglich einen höheren Streuungsquerschnitt als die Raman-Streuung. Da die Fluoreszenzstrahlung längerwellig als die zur Anregung einfallende Strahlung ist, tritt sie dementsprechend auf der Stokes-Seite auf. Reduzieren lässt sich dies durch einen Wechsel der Anregungsfrequenz des Lasers, da die resultierenden Fluoreszenzbanden davon unabhängig sind, die Banden der zu untersuchenden Probe hingegen schon. Allerdings kann es hierbei durch eine zu hohe Anregungsfrequenz zu einem Verbrennen der Probe kommen, was auch bei dunkel gefärbten Proben auftreten kann. Durch die Verwendung eines NIR-Lasers konnten Fluoreszenzeffekte ebenfalls verringert werden, da diese Strahlung in der Regel nicht energiereich genug ist, um Moleküle in einen elektronisch angeregten Zustand zu überführen. Weitere Verbesserungen wurden durch die Nutzung eines Germanium-Detektors erzielt.

6.1 Rotklee-Präparate

Bei Vermessen der pulverförmigen Kapselinhalte der Rotklee-Nahrungsergänzungsmittel konnte kein aussagefähiges Raman-Spektrum aufgenommen werden, da es durch die Färbung der Proben zu einer zu starken Absorption von Wärme kam und die Proben verbrannten. Da wie erwähnt in der Raman-Spektroskopie eine Messung in wässrigen Lösungen möglich ist, wurden als nächstes die Extrakte analysiert.

Ergebnisse

Wie in Abbildung 60 dargestellt, weisen die entsprechenden Kurven einige schmale, diskrete Banden auf.

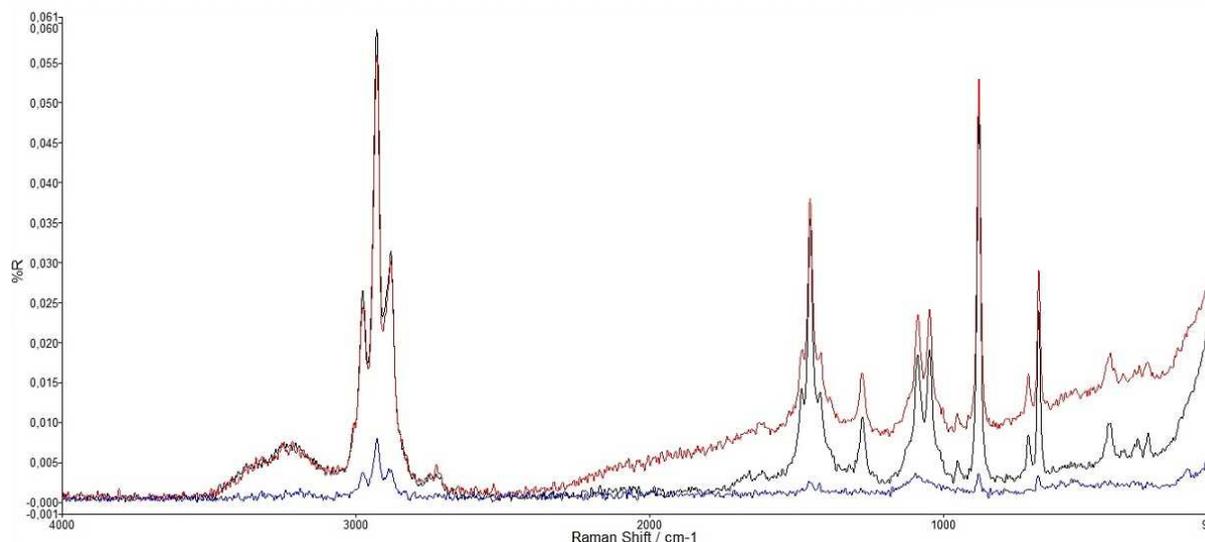


Abb. 60: Ramanspektren der drei Rotklee-Extrakte; schwarz: Menoflavon®, rot: Rotklee Kapseln, blau: Soja 60 C

Die Peaks lassen sich verschiedenen chemischen Bestandteilen der Extrakte zuordnen. Bei $\sim 3230 \text{ cm}^{-1}$ ist der OH-Bauch des Ethanols und des Wassers zu sehen. Ebenso gehören der Tripelpeak bei $2978, 2931$ und 2883 cm^{-1} sowie die Banden bei $1455, 1277, 1089, 1049, 882$ und 438 cm^{-1} zum Ethanol. Das DMSO, was zum Anlösen der Kapselinhalte genutzt wurde, zeigte sich bei $1049, 953, 677, 340$ und 306 cm^{-1} im Spektrum. Folglich rufen die anderen Bestandteile der Extrakte die verbleibenden Peaks bei 1619 und 713 cm^{-1} allein hervor. Diese können der Valenzschwingung der C=O-Bindung und der Deformationsschwingung der C-C-C-Bindung zugeschrieben werden. Ob eventuell Banden des Lösungsmittels zusätzliche Banden der Extraktbestandteile überlagerten, konnte so jedoch nicht bestimmt werden.

Ergebnisse

Um den Einfluß des Lösungsmittels zu eliminieren, wurde dementsprechend der evaporierte Trockenextrakt vermessen (Abbildung 61).

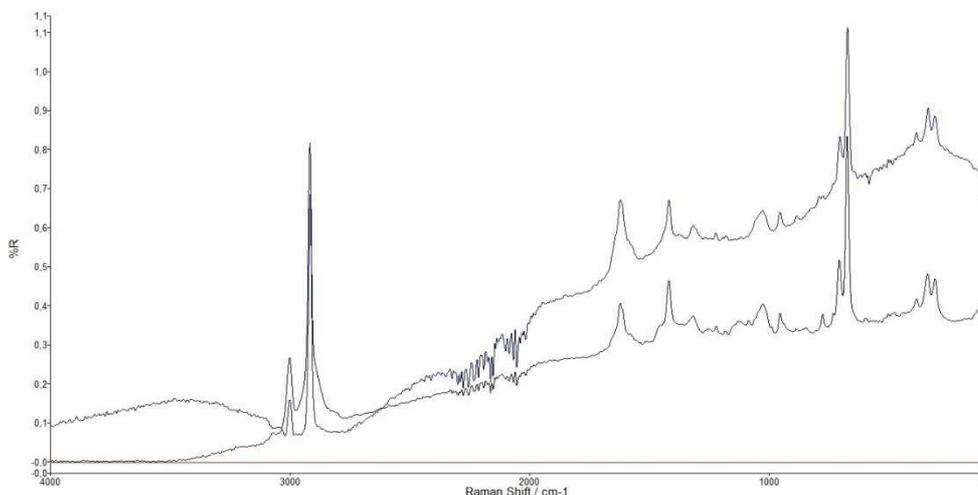


Abb. 61: Ramanspektren der drei Rotklee-Trockenextrakte; schwarz: Menoflavin®, rot: Rotklee Kapseln, blau: Soja 60 C

Augenscheinlich war es nicht möglich, vom Trockenextrakt der Rotklee Kapseln ein Raman-Spektrum aufzunehmen. Die Ursache liegt abermals in der Färbung der Probe, die nach Entzug des Lösungsmittels fast schwarz war. Die anderen beiden Präparate zeigten hingegen einige Banden, die ebenso in den ethanolischen Extrakten zu finden waren.

So waren bei 3004 cm^{-1} der Peak der C-H-Valenzschwingung von aromatischen Substanzen und bei 2915 cm^{-1} die Bande der aliphatischen, symmetrischen C-H- Streckschwingung von CH_3 - und CH_2 -Gruppen zu sehen, ebenso bei 1421 cm^{-1} die C=C-Valenzschwingung von Aromaten.

Da das Ethanol aus der Probe entfernt wurde, können diese Peaks somit Extraktbestandteilen zugerechnet werden. Die Bande bei 1619 cm^{-1} , die bereits im Extrakt zu sehen war, tritt auch hier auf. Bei den Wellenzahlen 1321 und 1030 cm^{-1} waren die Valenzschwingungen der aromatischen C-C-Bindung sowie der C-O-Bindung zu finden. Da die Bande bei 1049 cm^{-1} sowohl durch Ethanol als auch durch DMSO hervorgerufen wird, kann diese nach der Evaporation leider nicht eindeutig zugeordnet werden, da es nicht möglich war, das DMSO quantitativ aus der Probe zu entfernen. Das Vorhandensein von DMSO zeigt sich im Fingerprintbereich des Spektrums zudem durch die Bande der C-S-Valenzschwingung bei 677 cm^{-1} und die Banden bei 953 , 340 und 306 cm^{-1} . Der Peak bei 882 cm^{-1} der C-O-C-Deformationsschwingung kann allerdings wieder einem Extraktbestandteil zugeschrieben werden, genauso wie der Peak bei 707 cm^{-1} der C-C-C- *in plane*-Deformationsschwingung.

Ergebnisse

Es war möglich, die chemische Struktur der gelösten Inhaltsstoffe über Raman-Spektroskopie genauer zu bestimmen. Es handelt sich um aromatisch-aliphatische Verbindungen mit partieller Ether- und Ketonstruktur, was als Beschreibung auch auf Isoflavone zutrifft.

6.2 Soja-Präparate

Auch hier war es nicht möglich, aus den Kapselinhalten ein auswertbares Ramanspektrum zu erstellen. Lediglich beim hellgelb gefärbten Alsifemin®-Pulver waren einige, sehr kleine Banden erkennbar und zwar bei 1621, 1320, 1126, 1030, 821 und 629 cm^{-1} , wobei nicht sicher war, ob diese zu Stoffen gehörten, die gelöst im Extrakt vorliegen würden.

Aus diesem Grund wurden die methanolische Extrakte der Soja-Nahrungsergänzungsmittel untersucht (Abbildung 62).

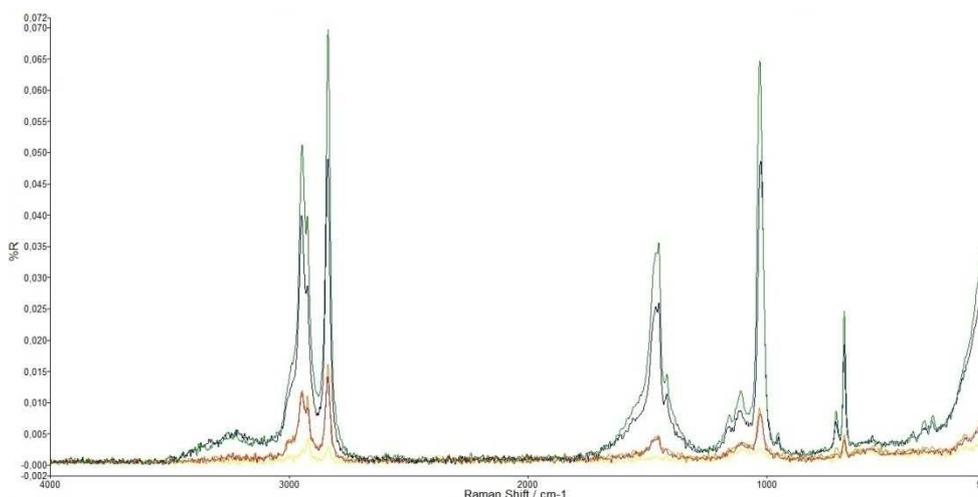


Abb. 62: Ramanspektren der Soja-Extrakte; gelb: Alsifemin®, orange: Soja 60 C, rot: Femiflavon®, blau: Phyto Soya® 17,5, grün: Phyto Soya® 35

Der Anteil des Methanols ist deutlich im Spektrum zu sehen. Er zeigt sich durch die intensiven Banden der aliphatischen C-H-Valenzschwingung bei 2950 und 2838 cm^{-1} , der O-H-Deformationsschwingung bei 1460 cm^{-1} und der C-O-Valenzschwingung bei 1030 cm^{-1} . Die Peaks vom DMSO liegen wiederum bei 953, 677, 340 und 306 cm^{-1} . Als einzige weitere Banden traten die der C-H-*in plane*-Beugeschwingung bei 1113 cm^{-1} und die der C-C-C-Deformationsschwingung bei 709 cm^{-1} auf.

Ergebnisse

Bei Vermessen der Soja-Trockenextrakte von Soja 60 C und Femiflavon® traten leichte Fluoreszenzeffekte auf, zu sehen an der horizontalen Verschiebung der Kurven im Vergleich zu denen der anderen (Abbildung 63). Mehrere, gut voneinander getrennte Peaks waren trotzdem in allen Proben zu sehen.

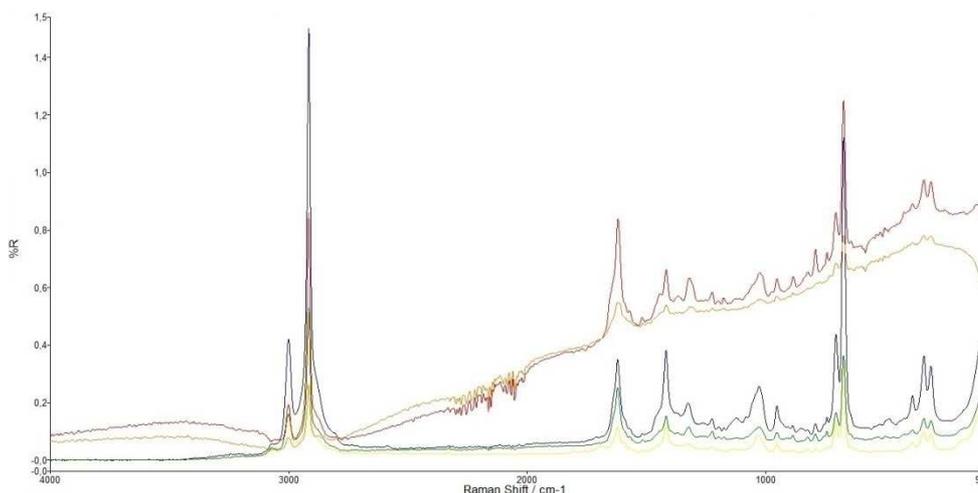


Abb. 63: Ramanspektren der evaporierten Soja-Extrakte; gelb: Alsifemin®, orange: Soja 60 C, rot: Femiflavon®, blau: Phyto Soya® 17,5, grün: Phyto Soya® 35

Knapp über 3000 cm^{-1} waren die Bande der aromatischen C-H-Valenzschwingung und bei 2916 cm^{-1} die der entsprechenden C-H-Valenzschwingung von Aliphaten zu erkennen, bei 1421 cm^{-1} lag die zugehörige Bande für die C=C-Valenzschwingung. Die Valenzschwingung einer Carbonylgruppe war durch den Peak bei 1619 cm^{-1} zu sehen. Die auch hier noch existierenden Restmengen an DMSO führten zu den bekannten Banden bei 953 , 677 , 340 und 306 cm^{-1} . Bei den Wellenzahlen 1321 und 1030 cm^{-1} traten die Valenzschwingungen der aromatischen C-C-Bindung sowie der C-O-Bindung auf und im Fingerprint-Bereich zeigten sich schließlich die C-O-C-Deformationsschwingung bei $\sim 886\text{ cm}^{-1}$, die C-H-*out of plane*-Schwingung bei 792 cm^{-1} und die C-C-C-*in plane*-Deformationsschwingung bei 707 cm^{-1} . Im oberen Wellenzahlenbereich war die Lage der Banden vergleichbar mit denen der Rotklee-Präparate, Unterschiede ergaben sich im Bereich zwischen 850 - 720 cm^{-1} (Abbildung 63). So waren nur in den reinen Soja-Zubereitungen Peaks bei 824 , 792 und 743 cm^{-1} vorhanden, die reinen Rotklee-Präparate zeigten hingegen Peaks bei 776 und 731 cm^{-1} . Die beiden Trockenextrakte von Soja 60 C besaßen in diesem Bereich ein ähnliches Muster mit Banden bei 788 , 774 und 731 cm^{-1} .

Diskussion

1. Quantitative Bestimmung der Isoflavongehalte über HPLC

1.1 Rotklee-Präparate

Bei der durchgeführten Quantifizierung von Isoflavonen aus Rotklee-haltigen Nahrungsergänzungsmitteln konnten die Hauptisoflavone von Rotklee bestimmt werden, die auch in den untersuchten Proben die Majorkomponenten dieser Naturstoffklasse darstellten. Bei dem Präparat Menoflavon® lag der Anteil an Biochanin A im Vergleich zu den anderen allerdings recht hoch, was möglicherweise durch unterschiedliche Anbaugelände und Vegetationsbedingungen zu erklären ist. Auch die anderen Isoflavone traten aufgrund natürlicher Schwankungen in unterschiedlichen Zusammensetzungen auf.

Die Nebenisoflavone machen zwar nur einen geringen Anteil aus, wurden allerdings auch nicht quantifiziert, so dass dies zu einem niedrigeren Gehalt als vom Hersteller angegeben hätte führen können. Allerdings lagen die Werte für alle drei Präparate über der Deklaration auf der Verpackung, bei der Zubereitung Soja 60 C sogar deutlich darüber mit ~50 %. Damit liegt der wahre Wert an Gesamtisoflavonen wahrscheinlich noch höher.

Von den Produzenten der Nahrungsergänzungsmittel gab es keine genauen Angaben bezüglich des Herstellungsprozesses und der Zusammensetzung an Isoflavonen. Aufgrund der verschiedenen Gehalte an individuellen Isoflavonen und deren unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten und Rezeptoraffinitäten und damit verbundenen pharmakologischen Wirkungen sollte dies aber auf jeden Fall aufgeführt werden. Die im Extrakt enthaltenen Isoflavone lagen als Aglyka vor, wobei sie in der Pflanze als Glykoside gespeichert werden. Diese Umwandlung erfolgt jedoch relativ zügig durch enzymatische Hydrolyse bei der Ernte und anschließender Aufarbeitung.

Die tägliche Verzehrempfehlung von 40- 80 mg ist aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Extrakte zu allgemeingültig gehalten, darüber hinaus fehlen Studien zur Toxizität, so dass die empfohlene Aufnahmemenge korrigiert werden könnte. Da Rotklee kein übliches Lebensmittel darstellt, gibt es hier auch keine Langzeitbeobachtungen am Menschen wie bei Soja. Daher wären tiefgehende biologische Testungen unbedingt erforderlich.

1.2 Soja-Präparate

Insgesamt fünf Nahrungsergänzungsmittel auf Soja-Basis wurden mittels HPLC qualitativ und quantitativ untersucht. Wie erwartet machten die Glykoside Daidzin, Genistin und Glycitin den Großteil der Extrakte aus. Acetyl- und Malonylderivate konnten nur in Spuren über LC-MS gefunden werden, der Anteil der Aglyka war ebenfalls relativ gering.

Betrachtet man die ermittelten Werte im Vergleich zu den Herstellerangaben so fällt auf, dass es eine weitestgehende Übereinstimmung nur mit den Isoflavonen in ihrer glykosidischen Form gibt. Dies ist jedoch nur auf zwei Zubereitungen deklariert, die anderen sprechen lediglich von „Soja-Isoflavonen“. Hier sollte ein entsprechender Hinweis gesetzlich vorgeschrieben werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, da wie bereits erwähnt die Konjugationsform einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit hat. Bei drei Zubereitungen lag der ermittelte Wert sehr nah beim angegebenen, bei Femiflavon® und Phyto Soya® 17,5 ergaben sich allerdings Abweichungen von 13,6 % und 9,7 %. Womöglich wurde hier der Anteil an Minorisoflavonen miteingerechnet, was den Gehalt erhöhen würde.

Wie bei den Rotklee-Präparaten gibt es auch hier eine Varianz in der Isoflavonzusammensetzung, wobei Daidzin bei allen fünf Zubereitungen dominiert. Allerdings lag der Anteil an Glycitin bei Alsifemin®, Phyto Soya® 17,5 und Phyto Soya® 35 relativ hoch, da es hier die zweitgrößte Fraktion ausmachte. Üblicherweise sind jedoch methylierte Isoflavone in Soja in geringerem Ausmaß zu finden.

Diese Tatsache kann verschiedene Ursachen haben wie Wetterbedingungen, Bodenqualität oder die Verwendung unterschiedlicher Varietäten an Sojabohnen, wodurch es zu einer verstärkten Expression der Isoflavon-6-O-Methyltransferase kommen kann.

Zur HPLC-Analytik von Nahrungsergänzungsmitteln auf Rotklee- und Soja-Basis gibt es bereits einige Veröffentlichungen, wobei dort andere Präparate Gegenstand der Untersuchungen waren (Maul, 2008; Stürtz, 2008). Diese Arbeiten kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass sich die Angaben der Hersteller teilweise deutlich von den ermittelten Werten unterschieden. Darüber hinaus zeigte sich auch hier die große Varianz in der Zusammensetzung an einzelnen Isoflavonen in den verschiedenen Nahrungsergänzungsmitteln. Es ergab sich die Forderung nach einer genaueren Deklaration auf der Verpackung bezüglich des Konjugationsgrades und der Menge an Einzelkomponenten.

2. HPTLC- Analytik

Die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) ist ein modernes Verfahren, das sich durch eine große Flexibilität auszeichnet. Durch Variation der mobilen und der stationären Phase lassen sich die unterschiedlichsten Trennprobleme lösen. Weitere Vorteile sind eine einfache Handhabung und geringere Material- und Betriebskosten als z.B. bei der HPLC. Neben Identitäts- und Reinheitsprüfungen sowie der Inprozesskontrolle in Pharma-Unternehmen eignet sich die HPTLC auch zur Quantifizierung bestimmter Inhaltsstoffe nach erfolgter Elution. Aufgrund der heutigen Gerätetechnik wie automatische Probenauftragung und Vermessung mittels eines densitometrischen Scanners kommt es dabei nach entsprechender Validierung zu vergleichbar guten Ergebnissen wie durch HPLC-Analyse.

Seit einigen Jahren gibt es deshalb Bemühungen, die teilweise überarbeitungswürdigen dünnschichtchromatographischen Methoden im Europäischen Arzneibuch durch standardisierte HPTLC-Verfahren zu ersetzen.

Der wichtigste Schritt der Methodenerstellung war die Wahl und Optimierung der mobilen Phase. Dies erfolgte anhand des „Prisma-Modells“ unter Einteilung der Lösungsmittel in acht Selektivitätsklassen nach Snyder. Ziel dabei war es, ein Fließmittel zu finden, das die Isoflavone gut von den anderen Bestandteilen der Extrakte, aber auch untereinander ausreichend trennt. Da die Verwendung von modifizierten Kieselgelschichten keinen Vorteil für die chromatographische Trennung brachte, konnten die untersuchten Proben auf HPTLC-Kieselgelplatten analysiert werden. Durch die nach der Entwicklung folgende densitometrische Auswertung bei 200- 800 nm war es möglich, anhand der Absorptionskurven die einzelnen Substanzen zu identifizieren und den entsprechenden Substanzklassen zuzuordnen. Eine Visualisierung mit Derivatisierungsreagenzien wie Naturstoffreagenz war nicht notwendig. Dies hätte zudem einen negativen Effekt auf die Bandenschärfe gehabt und die Güte der Analyse verschlechtert.

Für die Validierung der entwickelten Analyseverfahren dienten die ICH-Richtlinien Q2A und Q2B, die üblicherweise für die Etablierung von Methoden der pharmazeutischen Qualitätskontrolle verwendet werden. Da sich die Untersuchungsobjekte in einer Grauzone zwischen Lebens- und Arzneimittel bewegen, wurden die strengeren Anforderungen angewandt.

Die Analyten waren vor und während der Chromatographie stabil, so dass weder Abbau- noch Umlagerungsprozesse stattgefunden haben, die besonders die anschließende Quantifizierung verfälscht hätten. Da das Fließmittel immer unmittelbar vor der Benutzung hergestellt wurde, waren auch hier keine Zersetzungsprozesse zu erwarten.

Diskussion

Die Applikation der Extrakte auf die Kieselgel-Platten mittels Aufsprühen durch das automatische Auftragegerät Linomat IV lieferte scharfe Banden, was eine reproduzierbare quantitative Auswertung erst möglich machte. Durch das Vermessen der resultierenden Peaks bei einer bestimmten Wellenlänge konnte deren Fläche ermittelt und damit analog zur HPLC eine Kalibriergerade erstellt werden. Primär wird die densitometrische Auswertung in der Dünnschichtchromatographie zur Überprüfung von chemisch klar definierten Einzelsubstanzen eingesetzt, es gibt allerdings auch einige Veröffentlichungen in der Phytoanalytik (Farina et al., 1995; Günther und Schmidt, 2005).

2.1 Rotklee-Präparate

Hinsichtlich der Verwendung der HPTLC zur Analytik von Rotklee gibt es von der Firma „Camag“ zwei Application Notes. Die eine befasst sich mit der Unterscheidung von Rot- und Weißklee anhand des Fingerprintbereiches im Chromatogramm, die zweite anhand des Vorhandenseins von Formononetin nur in Rotklee. Weitere Publikationen zu dünnschichtchromatographischen Methoden für die Trennung der Isoflavone sind vorhanden, aber aufgrund der Instrumentierung und der Verwendung von normalen DC-Platten als stationäre Phase veraltet und für eine verlässliche Methode wenig geeignet (Sachse, 1974; Kallela, 1975). In diesem Fall war es notwendig, eine neue HPTLC-Methode zu entwickeln und anschließend zu validieren.

Die Selektivität des erarbeiteten Verfahrens konnte für die fünf Isoflavone durch die gleichzeitige Entwicklung von Extrakt und Referenzsubstanzen auf einer HPTLC-Platte und darauffolgendem Vergleich von R_f -Werten, Fluoreszenzeffekten und UV-Spektren gewährleistet werden. Die Isoflavone waren gut aufgelöst auf der Platte zu erkennen, weiterhin gab es in den verschiedenen Extrakten weitere Banden von Inhaltsstoffen, von denen der Großteil aufgrund seiner Hydrophilie im unteren R_f -Bereich nahe der Startlinie zu finden war.

Die Werte für die Wiederholpräzision lagen für Daidzein bei $CV \leq 3,3 \%$, für Genistein bei $CV \leq 8,2 \%$, für Glycitein bei $CV \leq 6,8 \%$, für Formononetin bei $CV \leq 5,2 \%$ und für Biochanin A bei $CV \leq 7,2 \%$ (siehe Tabelle 9). Vergleicht man dies mit den Ergebnissen der HPLC-Untersuchung ($CV \leq 3,3 \%$ für Daidzein, $CV \leq 6,1 \%$ für Genistein, $CV \leq 5,0 \%$ für Glycitein, $CV \leq 1,6 \%$ für Formononetin und $CV \leq 1,4 \%$ für Biochanin A) so sind die Schwankungen um den Mittelwert zwar für alle fünf Isoflavone größer, liegen aber immernoch unter der Vorgabe von $\leq 15 \%$.

Diskussion

Sie übertreffen damit zwar deutlich den für die Analyse von chemischen Standards erlaubten Wert von CV= 1- 2 %, wie es von der FDA proklamiert wird. Jedoch ist zu bedenken, dass es sich hierbei um biologische Proben handelt, wo es aufgrund der Komplexität an Bestandteilen zu Matrixeffekten und Interferenzen kommen kann.

In dem folgenden Diagramm sind die über HPLC und HPTLC erhaltenen Mengen an Isoflavonen gegenübergestellt. Die Werte der beiden Verfahren zeigen eine gute Übereinstimmung untereinander. Von daher ist die entwickelte Methode als Alternative zur Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durchaus geeignet und könnte direkt für die Analyse der untersuchten NEM angewendet werden.

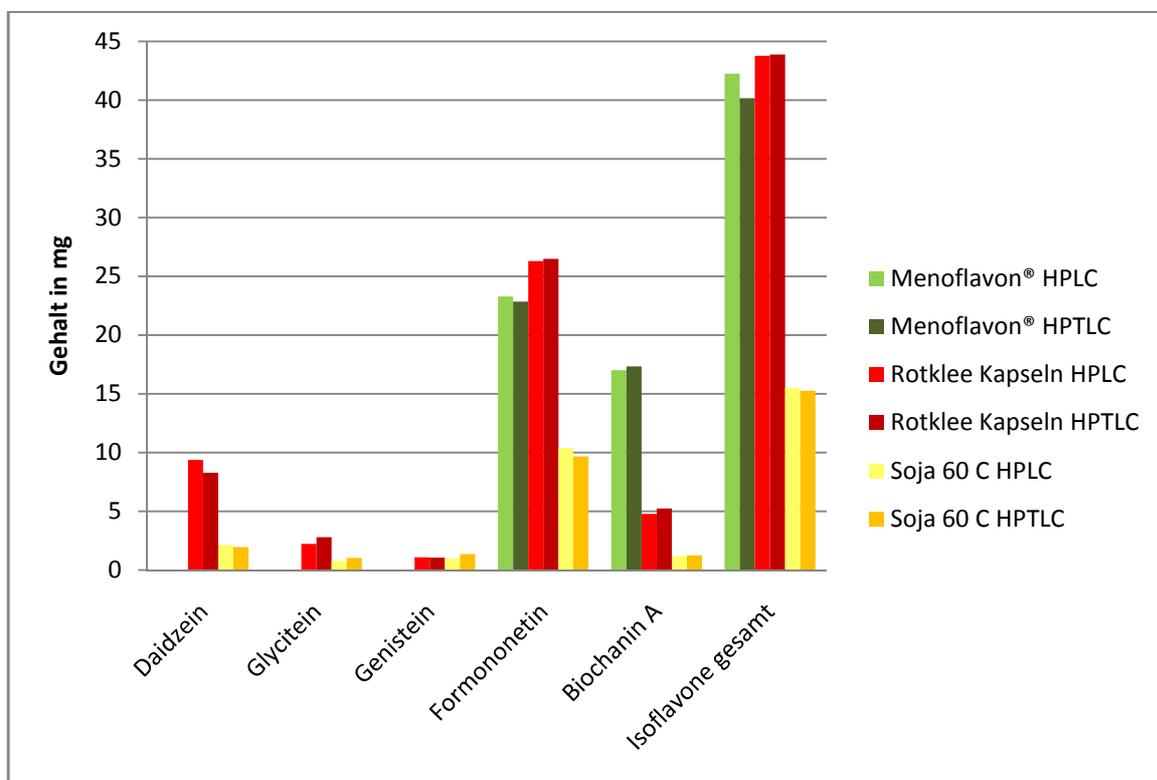


Abb. 64: Vergleich der Quantifizierung der Rotklee-Isoflavone über HPLC und HPTLC

2.2 Soja-Präparate

Yuan et al. untersuchten 2006 Soja-Isoflavone in Sojabohnen und nahmen dafür die HPLC- und DC-Analytik zur Hilfe. Die entwickelte dünnschichtchromatographische Methode nutzte Daidzein und Genistein als Standardsubstanzen, da der Soja-Extrakt einer sauren Hydrolyse unterzogen wurde, um die entsprechenden Aglyka zu erzeugen. Durch die Aufarbeitung gehen jedoch wichtige Informationen verloren, da somit keine Aussagen mehr zum Verhältnis von Glykosiden zu Aglyka getroffen werden können. Besonders in Zubereitungen stellt sich aber diese Frage, da es durch den Herstellungsprozess der Nahrungsergänzungsmittel zu Spaltungsreaktionen gekommen sein kann, woraus andere Eigenschaften der Isoflavone resultieren.

Durch die gemeinsame Chromatographie von Extrakten und Standardsubstanzen konnten Daidzin, Genistin und Glycitin selektiv nachgewiesen werden (siehe Abbildung 31). Es zeigten sich zudem teilweise zusätzliche Banden mit kleinen R_f -Werten. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um wasserlösliche Vitamine, die den Präparaten als weitere gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe zugesetzt wurden. Bei Alsifemin® ist auf der Verpackung genauer deklariert, dass die Kapseln u.a. Vitamine der B-Gruppe enthalten wie Thiamin und Riboflavin. Mit dem entwickelten Fließmittelsystem waren die R_f -Werte dieser Stoffe jedoch so klein, dass es keine Beeinträchtigung der Isoflavon-Auftrennung gab.

Die Präzisionswerte der drei Isoflavone lagen für die HPTLC-Untersuchung zwischen CV= 0,4 und 1,8 % für Daidzin, CV= 1,9 und 5,1 % für Genistin und CV= 2,0 und 7,7 % für Glycitin. Die relativ großen Schwankungen in der Analytik von Naturstoffen zeigen sich auch in anderen Arbeiten zur Validierung. So lag z.B. der ermittelte Variationskoeffizient für die Bestimmung von Rutin in *Passiflora*-Arten zwischen 0,4 und 13,0 % (Perreira et al., 2004). Salicin konnte über eine validierte HPTLC-Methode in *Salix* sp. quantifiziert werden mit Variationswerten zwischen 1,1 und 4,2 % (Wagner et al., 2008).

Die Wiederfindungsrate für Daidzin von 94,5- 98,7 % in Bezug auf die Resultate der HPLC-Untersuchung lässt vermuten, dass die Quantifizierung von Einzelsubstanzen in Extrakten diversen Einflüssen durch andere Inhaltsstoffe und Matrixeffekte unterliegen. Bei Genistin und Glycitin war hingegen kein eindeutiger Trend zu ausschließlich größeren oder kleineren Werten im Vergleich zu den HPLC-Ergebnissen zu verzeichnen.

Diskussion

Betrachtet man die Werte der Gehaltsbestimmung beider Verfahren, so führen sie zu vergleichbaren Resultaten (Abbildung 65). Die entwickelte HPTLC-Analytik könnte daher zur Kontrolle der vorliegenden Präparate angewandt werden. Für Soja-Zubereitungen anderer Hersteller wäre es sicher nach entsprechender Testung auf interferierende Bestandteile auch geeignet.

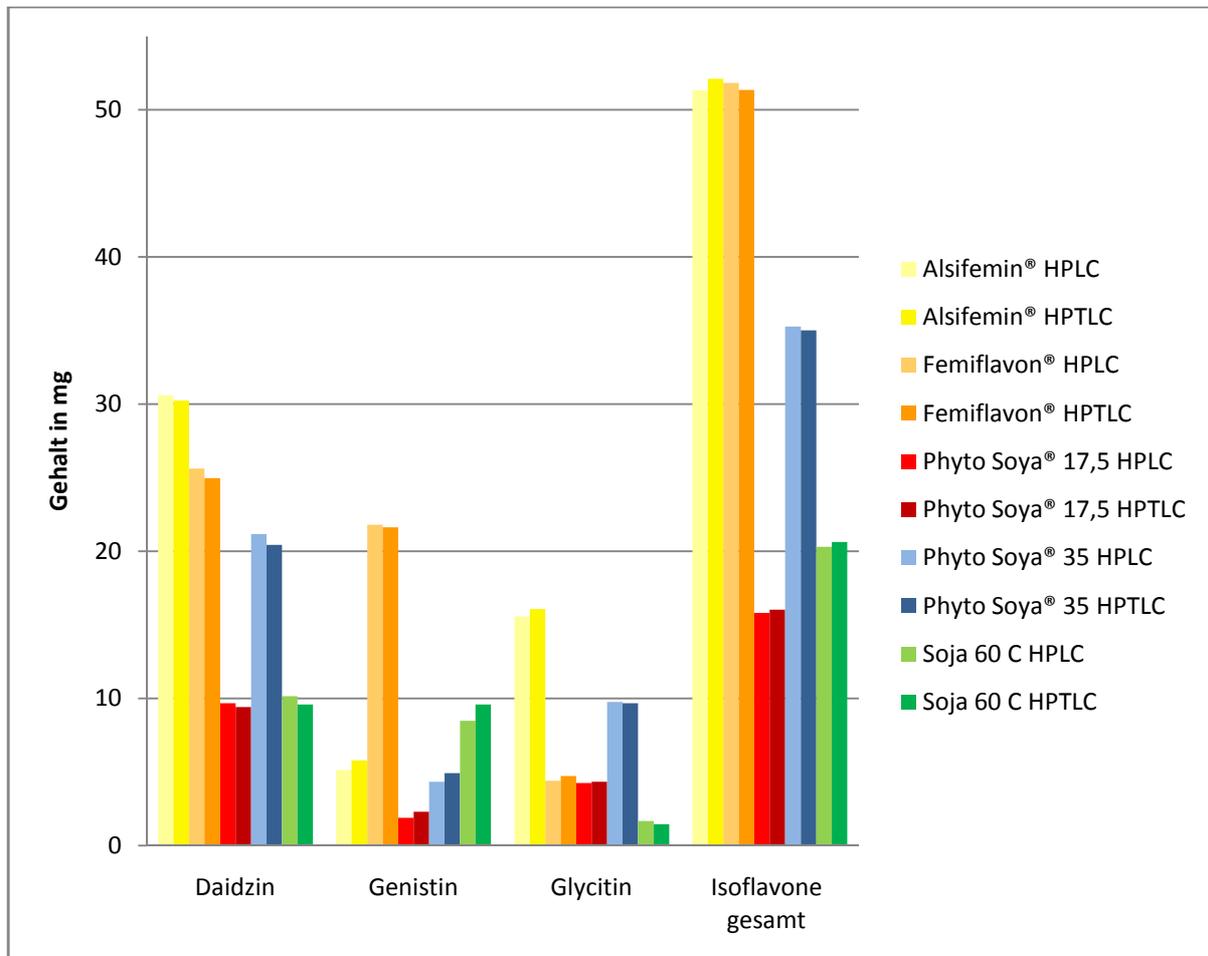


Abb. 65: Gehalte an Isoflavonen der Soja-Isoflavone nach HPLC- und HPTLC-Analytik

3. Qualitative und quantitative IR-Analyse

Mit der Anwendung der IR-Spektroskopie war eine schnelle qualitative Analyse der Nahrungsergänzungsmittel mit einem geringen Aufwand für die Probenvorbereitung möglich. Dazu wurden Spektren der Referenzsubstanzen aufgenommen und mit denen der Extrakten verglichen. Das Gegenüberstellen der Spektren ermöglichte eine Abschätzung bezüglich des Vorhandenseins der Isoflavone in einer komplexen Matrix.

Bei der weiteren Untersuchung der Präparate wurde auf die Spektren in Kombination mit den über HPLC ermittelten Gehalten an Isoflavonen ein PLS-Algorithmus angewendet. Die Notwendigkeit der vorhergehenden Gehaltsbestimmung über eine andere Analysemethode macht die Etablierung einer IR-Vorschrift kosten- und zeitintensiv. Ist jedoch eine passende Methode gefunden und validiert, sind Analysen ohne weitere Vorbereitungen oder Materialverbrauch innerhalb weniger Minuten möglich. Mithilfe der multivariaten Kalibration werden dabei kleinste Veränderungen im IR-Spektrum erkannt und in Beziehung zu den sich ändernden Konzentrationen gesetzt. Dies macht eine Quantifizierung der Bestandteile möglich. Ein Ziel war es, breit anwendbare Modelle zu erstellen, so dass die Rotklee- und die Soja-Zubereitungen jeweils mit einem Modell pro Isoflavon analysierbar sein sollten. Die Analyse mehrerer unterschiedlicher Präparate mit der gleichen Wirkkomponente führt zu einem robusteren Modell. Sollen allerdings neue Präparate vermessen werden, die nicht einen Teil des Kalibrierungssatzes darstellten, so ist eine kritische Betrachtung der Ergebnisse und eventuelle Überarbeitung der Methode notwendig. Ebenso sollte von Zeit zu Zeit eine Modellpflege erfolgen, indem unbekannte Proben vorhergesagt werden und neue Proben zum Kalibrierungssatz hinzugefügt werden, um die Verlässlichkeit des Modells zu gewährleisten.

3.1 Rotklee-Präparate

Rotklee-Pflanzen wurden bereits auf ihren Isoflavon- und Phenolcarbonsäure-Gehalt hin untersucht, sowohl über NIR- als auch über MIR-Analytik (Fiedler et al., 2011). Da die dazugehörigen Spektren aber aufgrund der unterschiedlichen Begleitstoffe anders aussahen, konnten die dabei erstellten Modelle nicht zur Gehaltsbestimmung der Nahrungsergänzungsmittel genutzt werden.

Diskussion

Für Daidzein, Formononetin und Biochanin A wurden jeweils Quantifizierungsmodelle erstellt. Aufgrund der geringen Konzentration an Genistein und Glycitein in den Zubereitungen und dem damit verbundenen geringen Einfluß auf die IR-Spektren wurden dafür keine Modelle erzeugt, da diese nicht stabil genug geworden wären.

Bei Formononetin, dem Hauptinhaltsstoff aller drei betrachteten Nahrungsergänzungsmittel, ist durch das bestmögliche Modell bei einem Rang von 10 eine kumulative spektrale Varianz von 89 % erreicht worden. Dieser Wert liegt noch ein ganzes Stück von 100 % entfernt, da eine große Variabilität in den Spektren vorhanden war, die nicht komplett durch das Modell beschrieben werden konnte. Ein Aspekt dieser großen Abweichung war die Komplexität der untersuchten Probe. Weiterhin war die Probenvorbereitung ausschlaggebend, da die Herstellung einiger Proben des Kalibrierungssatzes über einen HPLC-Durchlauf erfolgte. Dabei wurde der Extrakt mittels HPLC aufgetrennt und Formononetin entfernt. Dieser zusätzliche Schritt erhöht den Fehler der Analyse, lässt sich aber um den ganzen Kalibrierungsbereich abzudecken, nicht vermeiden. Der Standardvorhersagefehler für Formononetin betrug 14,6 %. Dieser Wert liegt knapp unter der von der FDA geforderten Grenze von 15 % bezüglich des Fehlers bei bioanalytischen Methoden („Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation“). Zu bedenken ist allerdings, dass es sich hierbei um die Vermessung eines Extraktes handelt, der nicht in einzelne Komponenten vor der Quantifizierung aufgetrennt wird.

Für Daidzein konnte das beste Modell bei einem Rang von 7 95 % der kumulativen spektralen Varianz erklären. Trotzdem war der relative Fehler der Vorhersage mit 22,0 % eindeutig zu hoch. Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass Daidzein das am geringsten konzentrierte Isoflavon dieser Untersuchung war, so dass sich Zwischenschritte wie der HPLC-Lauf oder geringfügige Schwankungen bei der Spektrenaufnahme stärker auswirken. Zur Quantifizierung ist diese Methode somit nicht geeignet, allenfalls eine Tendenz lässt sich abschätzen.

Als drittes wurden die Spektren bezüglich ihres Gehaltes an Biochanin A der PLS-Regression unterzogen. Mit 95 % konnte wieder ein Großteil der Änderungen im Spektrum in Abhängigkeit von der Konzentration beschrieben werden, wobei der relative SEP mit 27,8 % sogar noch höher war als bei Daidzein. Da es deutliche Unterschiede im Biochanin A-Gehalt der Nahrungsergänzungsmittel gab, könnte darin die Ursache zu sehen sein. Je größer der abzudeckende Bereich ist, umso mehr haben Abweichungen einen Einfluss auf die Gesamtstreuung der Messwerte. Hier könnte eine Quantifizierung durch die Erstellung von einzelnen Modellen je Präparat zu besseren Ergebnissen führen.

Diskussion

Schließlich wurde ein bestmögliches Modell für den Gesamtisoflavongehalt der Proben aufgestellt. Es zeichnete sich durch einen guten Rang (10), eine gut beschriebene Variabilität der Spektren des Kalibrationssatzes mit 92 % und einen geringen Standardvorhersagefehler von 10,1 % aus. Das ermittelte Modell kann zur Überprüfung des Gehaltes von unbekanntem Proben genutzt werden.

Wie bereits im Ergebnisteil in Tabelle 32 dargestellt, konnte bei der Vorhersage unbekannter Proben mit den entwickelten Modellen ein vergleichbares Ergebnis wie bei der HPLC-Untersuchung erzielt werden, wobei die Schätzwerte größtenteils etwas höher lagen als die Werte der HPLC.

3.2 Soja-Präparate

Wang et al. fanden 2011 heraus, dass über Nahinfrarot-Spektroskopie in Kombination mit multivariater Analyse eine Bestimmung des Isoflavongehaltes von Sojabohnen möglich ist. Eine Quantifizierung einzelner Isoflavone war aber nicht möglich. Weitere Publikationen zur Analyse von Soja-haltigen Zubereitungen oder über MIR-Spektroskopie waren nicht zu finden.

Da keine auffälligen Strukturen in der Datenmatrix bei der jeweiligen Musteranalyse („Score vs Score“) erkennbar waren, war das Einbeziehen aller fünf Nahrungsergänzungsmittel möglich. Bei Daidzin, der Majorkomponente der fünf Soja-haltigen Zubereitungen, betrug der Fehler der Vorhersage 18,5 % bei einem Rang von 7 und einer kumulativen spektralen Varianz von 86 %. Offenbar war die Variabilität in den Spektren in Relation zu dem dazugehörigen Gehalt an Daidzin zu groß, um durch die gewählte Anzahl an Hauptkomponenten ausreichend beschrieben werden zu können. Zudem resultierte ein SEP, der nur noch eine Abschätzung unbekannter Proben möglich macht, für eine sichere Quantifizierung aber nicht geeignet wäre. Für Abschätzungsverfahren wird ein Höchstwert von 20 % für den Fehler angestrebt.

Mit 15,7 % war der Fehler bei Glycitin deutlich niedriger als bei Daidzin, darüber hinaus konnte mit 91 % ein größerer Teil der Varianz innerhalb der Spektren durch das Modell ausgedrückt werden. Dementsprechend sind Aussagen zum Mengeninhalte für diesen Inhaltsstoff zuverlässiger und genauer.

Die kumulative Varianz bei der Methode für Genistin betrug 96 % bei einem Rang von 7. Aufgrund des SEP von 18,6 % war keine ausreichende Präzision gegeben, so dass hier wie bei den anderen beiden Isoflavonen nur eine Abschätzung des Gehaltes möglich ist.

Diskussion

Für die Gesamtisoflavonbestimmung lag der Varianz-Wert bei 92 %. Die gute Korrelation der Referenzwerte mit den geschätzten Werten spiegelte sich im Standardvorhersagefehler von 13,5 % wider. Das erstellte Modell kann somit zur Gehaltsbestimmung verwendet werden.

Bei der Vorhersage unbekannter Proben lag eine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen deklariertem und ermitteltem Inhalt vor, jedoch war bei dem Präparat Soja 60 C eine deutliche Abweichung festzustellen (siehe Tabelle 41).

Dies könnte durch die weiteren Isoflavone des Rotklee in dieser Zubereitung begründet sein, da sie einen Einfluß auf das Infrarot-Spektrum haben und damit zu falschen Ergebnissen führen können. Interessanterweise resultierten aus dem Soja-Anteil bei der Erstellung der Quantifizierungsmodelle für Rotklee keine fälschlichen Vorhersagen, so dass dort die Änderungen im Spektrenmuster das geeignetste Modell nicht negativ beeinflusst haben.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Quantifizierung über die PLS-Regression anhand der IR-Spektren der Pflanzenextrakte für den Gesamtisoflavongehalt in Rotklee und Soja und für Formononetin möglich war. Bei den anderen Bestandteilen war der Standardvorhersagefehler dafür zu groß, aber eine Abschätzung des Gehaltes war immernoch möglich. Bei der Höhe des Fehlers ist aber zu bedenken, dass der Fehler der Gehaltsbestimmung über HPLC, die als Grundlage für die Erstellung der Modelle genutzt wurde, darin enthalten ist. Für eine genauere Bestimmung der Mengen ist die HPLC-Analytik mit externer Kalibrierung besser geeignet. Sie führt eindeutig zu besseren Ergebnissen wie an den entsprechenden Schwankungen der Werte für die einzelnen Isoflavone und den Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden zu sehen. Jedoch ist die Analyse aufwendiger, teurer und zeitintensiver, so dass die entwickelten Methoden eine gute und schnelle Alternative darstellen.

Sie könnten in Industrie und Überwachungsbehörden als schnelleres und kostengünstiges Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes eingesetzt werden. Weiterhin bieten sich die Modelle auch als Screening Instrument für die Untersuchung von anderen Nahrungsergänzungsmitteln auf Isoflavon-Basis an.

4. Clusteranalyse

Mithilfe der Clusteranalyse war es möglich, die Rotklee- und Soja-Zubereitungen anhand ihrer Infrarot-Spektren in verschiedene Cluster zusammenzufassen. Eine falsche Zuordnung trat nur bei einigen Proben des Präparates Soja 60 C auf, was durch das Vorhandensein von beiden Pflanzenextrakten begründet sein dürfte. Dieses Problem war bereits bei der Vorhersage des Gesamtisoflavongehaltes von Soja-Zubereitungen über PLS-Regression zu beobachten. Daher scheint die Clusteranalyse für Mischungen beider Pflanzen nicht geeignet zu sein, für Extrakte von einer Pflanze hingegen schon.

Bisherige Veröffentlichungen zur Clusteranalyse beschäftigten sich u.a. mit der Unterscheidung verschiedener japanischer Soja-Varietäten (Yan et al., 2011) und dem Einfluß von Anbaugebiet und genetischer Varianz auf den Isoflavongehalt von Soja (Carrão-Panizzi et al., 2009). Rotklee aus unterschiedlichen Gebieten der Türkei konnte anhand seines Protein- und Ballaststoff-Gehaltes geclustert werden (Asci, 2012).

5. Raman-Spektroskopie

Isoflavone wurden als Reinstoffe über oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) analysiert. Dabei werden die Untersuchungssubstanzen mit nanostrukturierten Metallen versetzt, die eine ausgeprägte elektromagnetische Feldverstärkung erreichen und somit zu einer Intensivierung der Ramanbanden führen (Sekine et al., 2011).

Bei der durchgeführten Untersuchung mit einfacher Raman-Spektroskopie war es nicht nur möglich, die Isoflavone in den einzelnen Extrakten anhand ihrer funktionellen Gruppen zu charakterisieren, sondern auch aufgrund der Verschiebung einzelner Banden zwischen Rotklee- und Soja-Präparaten zu unterscheiden. Aufgrund der Möglichkeit der direkten Extraktvermessung ohne vorhergehende Evaporation stellt dieses Verfahren eine zeitsparende und einfach durchzuführende Erweiterung des analytischen Spektrums dar.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Nahrungsergänzungsmittel aus Rotklee und Soja hinsichtlich ihres Isoflavon-Gehaltes untersucht. Die Isoflavone zählen zu den Phytoestrogenen, die aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit zum 17- β -Estradiol eine gewisse Affinität zum Estrogen-Rezeptor besitzen. Aufgründessen sollen sie Wechseljahresbeschwerden wie Hitzewallungen vermindern und werden daher als pflanzliche Alternative zur medikamentösen Hormon-Ersatz-Therapie beworben.

Da bei Nahrungsergänzungsmitteln keine Deklaration auf der Verpackung hinsichtlich der genauen qualitativen und quantitativen Zusammensetzung an individuellen Isoflavonen vorgeschrieben ist, wird eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen auf dem Markt erhältlichen Präparaten unmöglich. Bislang fehlten zuverlässige und praktikable Analysemethoden, so dass es Ziel dieser Arbeit war, die verschiedenen Zubereitungen über verschiedene Verfahren zu untersuchen und diese bezüglich ihrer Eignung zu bewerten.

Als erstes wurde zur Charakterisierung für die einzelnen Nahrungsergänzungsmittel aus Rotklee und Soja jeweils eine HPLC-DAD-Methode erzeugt. Über die Erstellung von externen Kalibriergeraden konnten die Majorisoflavone quantifiziert werden. Zur Überprüfung der Identität wurden zusätzlich LC-(ESI)-MS-Analysen angewandt. Es zeigte sich eine große Varianz in der Isoflavonzusammensetzung zwischen den einzelnen Präparaten sowie im Gesamtgehalt.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Untersuchung der Zubereitungen über HPTLC. Es gelang, zwei selektive Verfahren zu entwickeln, mit denen eine Quantifizierung über Densitometrie nach erfolgter Auftrennung der Extrakte möglich war. Die beiden Methoden erlaubten eine schnelle Analyse und führten zu vergleichbaren Ergebnissen wie die HPLC-Bestimmung.

Schließlich wurden von den verschiedenen Extrakten Infrarot-Spektren erstellt. Durch Vergleich mit den Spektren der Hauptisoflavone als Reinsubstanzen konnten spezifische Banden identifiziert werden, die auch in den Extrakten zu finden waren. Daraufhin wurden die Infrarot-Spektren einem PLS-Algorithmus unterworfen, wodurch Quantifizierungsmodelle für die Majorisoflavone und den Gesamtisoflavongehalt erzeugt werden konnten. Bei den Rotklee-Präparaten war eine Gehaltsbestimmung für Formononetin und die Gesamtisoflavone möglich, für Daidzein und Biochanin A hingegen nur eine grobe Abschätzung. Im Fall der Soja-Zubereitungen konnte das Modell für die Gesamtisoflavone zur Quantifizierung genutzt werden. Bei den Einzelstoffe war der Standardvorhersagefehler dafür zu groß, wobei die Modelle immernoch zur Abschätzung genutzt werden können, z.B. im Rahmen von Screening-Verfahren. Durch die Vorhersage unbekannter Proben konnte die Aussagefähigkeit der verschiedenen Kalibrierungsmodelle überprüft und bestätigt werden, da sich die Ergebnisse der HPLC-Analytik bestätigen ließen.

Zusammenfassung

Die einzige Abweichung ergab sich bei dem Präparat Soja 60 C für den Gesamtgehalt an Soja-Isoflavonen, was in dem ebenfalls beinhalteten Rotklee-Extrakt dieses Nahrungsergänzungsmittels begründet gewesen sein dürfte. Durch eine abschließende Clusteranalyse konnten die Rotklee- und die Soja-Extrakte schließlich anhand ihrer Infrarot-Spektren in zwei verschiedene Cluster getrennt werden.

Als eine weitere Analysemöglichkeit wurden die Extrakte mit einem Raman-Spektrometer vermessen. Es traten Banden auf, die den Isoflavonen als Inhaltsstoffe zugeteilt werden konnten, darüber hinaus war eine Unterscheidung zwischen Rotklee- und Soja-Extrakten möglich. Dieses Verfahren besitzt ein großes Potential und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Die entwickelten Analysemethoden konnten zeigen, dass sich große Unterschiede zwischen den verschiedenen Nahrungsergänzungsmitteln mit Rotklee und Soja befinden. Es besteht aber hiermit die Möglichkeit für die Hersteller, die Zusammensetzung an einzelnen Isoflavonen zu analysieren und anzugeben. Ebenfalls können die Überwachungsbehörden nun zur Kontrolle eine Auswahl an Analysetechniken nutzen. Diese tragen somit zu einer Erhöhung der Sicherheit von Nahrungsergänzungsmitteln mit Isoflavonen bei.

Summary

In the present work nutritional supplements of red clover and soy have been investigated for their isoflavone content. Isoflavones belong to the subclass of phytoestrogens showing an affinity to the estrogen-receptor due to their structural similarity to 17- β -estradiol. They are considered to have a positive effect on menopausal problems such as hot flushes and are therefore advertised as an alternative to hormone replacement therapy.

Regrettably, no declaration of the individual isoflavone composition is given by the manufacturers making a comparison between the different preparations impossible. There is a lack of analytical methods, so the goal of this investigation was to develop new techniques for this purpose and evaluate their suitability.

First the different botanical supplements of red clover and soy were characterized using established HPLC-DAD-methods. By external calibration with stock solutions of standards a quantification of the major isoflavones was possible. The identity of the isoflavones in the extracts was assured by HPLC-mass spectroscopy. A high variation in the qualitative and quantitative composition of the isoflavones turned out between the supplements.

Furthermore, the extracts were analyzed by high performance thin layer chromatography. It was possible to develop appropriate methods for the separation and successive densitometric quantification of the different plant extracts. The two methods for the red clover and soy preparations led to comparable results to the HPLC analysis.

FTIR spectra of the different extracts were measured. By comparing the spectra of the extracts with the spectra of the reference major isoflavones specific bands could be identified which were also found in the extracts. A PLS-algorithm was applied to the infrared spectra leading to quantification models for the main isoflavones and the whole isoflavone content. For the red clover preparations a determination of formononetin and the whole isoflavone content was possible while for daidzein and biochanin a just a rough estimation could be achieved. In case of the soy extracts a strong model for the whole isoflavone content could be built. The standard error of prediction for the individual isoflavones daidzin, genistin and glycitin was too high for that purpose but these models could still be used for estimation e.g. in screening investigations. By the prediction of unknown samples the fitness of the different calibration models was examined. The results were comparable to the HPLC data with one deviation by the product Soja 60 C for the whole content of soy isoflavones for which the also containing red clover extract in this preparation could be responsible.

Finally, the spectra of all extracts were submitted to a cluster analysis. It was possible to separate the red clover and soy preparations into two different clusters.

Summary

As a subject for future investigations raman spectra of the extracts were elucidated. Certain bands in the spectra could be assigned to the isoflavones. Moreover the analysis resulted in a distinction between the red clover and the soy extracts. For that reason this technique shows a great potential and should be further examined.

The developed investigation methods were able to show the big differences between the nutritional supplements of red clover and soy. The manufacturerers could use these methods as analytical tools for the determination of the individual isoflavone composition. For a better comparability a declaration should be given on the different products as a result. The supervising authorities could also use these techniques which would increase the security of botanical supplements with isoflavones.

Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

Adams, N. R. (1976). "Pathological changes in the tissues of infertile ewes with clover disease." Journal of Comparative Pathology **86**(1): 29-35.

Ahuja, I., Kissen, R., Bones A. M. (2012). "Phytoalexins in defense against pathogens." Trends in Plant Science **17**(2): 73-90.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagama, S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. (1987). "Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases." Journal of Biological Chemistry **262**(12): 5592-5595.

Andlauer, W., Kolb, J., Fürst, P. (2000). "Isoflavones from Tofu Are Absorbed and Metabolized in the Isolated Rat Small Intestine." The Journal of Nutrition **130**(12): 3021-3027.

Andlauer, W., Kolb, J., Stehle, P., Fürst, P. (2000). "Absorption and Metabolism of Genistein in Isolated Rat Small Intestine." The Journal of Nutrition **130**(4): 843-846.

Arai, Y., Uehara, M., Sato, Y., Kimira, M., Eboshida, A., Adlercreutz, H., Watanabe, S. (2000). "Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake." J Epidemiol **10**(2): 127-135.

Asci, O. O. (2012). "Biodiversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) collected from Turkey. II: Nutritional values." African Journal of Biotechnology **11**(18): 4248-4257.

Atkinson, C., Frankenfeld, C. L., Lampe, J.W. (2005). "Gut Bacterial Metabolism of the Soy Isoflavone Daidzein: Exploring the Relevance to Human Health." Experimental Biology and Medicine **230**(3): 155-170.

Bingham, S. A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L., Coward, A. (1998). "Phyto-oestrogens: where are we now?" British Journal of Nutrition **79**(5): 393-406.

Boller, B., Posselt, U. K., Veronesi, F. (2010). Fodder Crops and Amenity Grasses, Springer Science+Business Media, New York.

CAMAG (10/03). HPTLC Identification of Red Clover (*Trifolium pratense*) F-22A.

CAMAG (10/03). HPTLC Identification of Red Clover (*Trifolium pratense*) F-22B.

Carrão Panizzi, M. C., Berhow M. B., Gontijo Mandarino, J. M., Neves de Oliveira, M. C. (2009). "Environmental and genetic variation of isoflavone content of soybean seeds grown in Brazil." Pesq. agropec. bras. **44**(11): 1444-1451.

Cassidy, A. (2004). "Phytoestrogens and women's health." Women's Health Medicine **1**(1): 30-33.

Chen, C.Y., Bakhiet, R., Hart, V., Holtzman, G. (2005). "Isoflavones improve plasma homocysteine status and antioxidant defense system in healthy young men at rest but do not ameliorate oxidative stress induced by 80% VO₂pk exercise." Ann Nutr Metab **49**(1): 33-41.

Chun, O. K., Chung, S. J., Song W. O. (2009). "Urinary Isoflavones and Their Metabolites Validate the Dietary Isoflavone Intakes in US Adults." Journal of the American Dietetic Association **109**(2): 245-254.

Literaturverzeichnis

- Clarke, D. B. und Lloyd, A. S. (2004). "Dietary exposure estimates of isoflavones from the 1998 UK Total Diet Study." Food Additives and Contaminants **21**(4): 305-316.
- Clement, Y. N., Onakpoya, I., Hung, S. K., Ernst, E. (2011). "Effects of herbal and dietary supplements on cognition in menopause: A systematic review." Maturitas **68**(3): 256-263.
- Coward, L., Barnes, N. C., Setchell, K. D. R., Barnes, S. (1993). "Genistein, daidzein, and their .beta.-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets." Journal of Agricultural and Food Chemistry **41**(11): 1961-1967.
- 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. (2006). "Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts." Journal of Chromatography B **836**(1–2): 74-78.
- Day, A. J., Cañada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., McLauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R. A., Williamson, G. (2000). "Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase." FEBS letters **468**(2): 166-170.
- Deluca, D., Krazeisen, A., Breitling, R., Prehn, C., Möller, G., Adamski, J. (2005). "Inhibition of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases by phytoestrogens: Comparison with other steroid metabolizing enzymes." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **93**(2–5): 285-292.
- Djuric, Z., Chen, G., Doerge, D. R., Heilbrun, L. K., Kucuk, O. (2001). "Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women." Cancer Letters **172**(1): 1-6.
- Dragan, Y. P., Xu, Y.-d., Pitot, H. C. (1991). "Tumor promotion as a target for estrogen/antiestrogen effects in rat hepatocarcinogenesis." Preventive Medicine **20**(1): 15-26.
- Farina, A., Doldo, A., Cotichini, V., Rajevic, M., Quaglia, M. G., Mulinacci, N., Vincieri, F. F. (1995). "HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in Malva Silvestris L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **14**(1–2): 203-211.
- Fiedler, A., Schütze, W., Gierus, M., Schulz, H. (2011). NIR- und MIR-Spektroskopie an Rotklee – Untersuchungen zum Wirkstoffgehalt von Trifolium pratense am Beispiel von Isoflavonen und Phenolcarbonsäuren - NIR and MIR spectroscopic studies of Trifolium pratense regarding the concentration of isoflavones and phenolic acids 6. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen. Berlin, Germany: 67-69.
- Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M., Narala, K. (1995). "Rapid HPLC Analysis of Dietary Phytoestrogens from Legumes and from Human Urine." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) **208**(1): 18-26.
- Gao, Y. H. und Yamaguchi, M. (1999). "Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: apoptosis is induced through Ca²⁺ signaling." Biological & pharmaceutical bulletin **22**(8): 805-809.
- Grisebach, H. und Barz, W. (1969). "Biochemie der Flavonoide." Naturwissenschaften **56**(11): 538-544.

Literaturverzeichnis

- Günther, M. und Schmidt, P. C. (2005). "Comparison between HPLC and HPTLC-densitometry for the determination of harpagoside from *Harpagophytum procumbens* CO₂-extracts." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **37**(4): 817-821.
- Gustafsson, J. (2000). "An update on estrogen receptors." Seminars in Perinatology **24**(1): 66-69.
- GyoRgy, P., Murata, K., Ikehata, H. (1964). "Antioxidants isolated from Fermented Soybeans (Tempeh)." Nature **203**(4947): 870-872.
- Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., King, M.C. (1990). "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21." Science **250**(4988): 1684-1689.
- Hartman, G., West, E., Herman, T. (2011). "Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests." Food Security **3**(1): 5-17.
- He, X.-g., Lin, L.-z., Lian, L.-z. (1996). "Analysis of flavonoids from red clover by liquid chromatography—electrospray mass spectrometry." Journal of Chromatography A **755**(1): 127-132.
- Heinonen, S.-M., Hoikkala, A., Wähälä, K., Adlercreutz, H. (2003). "Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects.: Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **87**(4–5): 285-299.
- Helen, R. (2010). "Safety of herbal medicinal products in women with breast cancer." Maturitas **66**(4): 363-369.
- Hermann, F. J. (1953). A Botanical Synopsis of Cultivated Clovers. In: United States Department of Agriculture Monographs, U.S. Dept. of Agriculture.
- Hodgson, J. M., Puddey, I. B., Croft, K. D., Mori, T. A., Rivera, J., Beilin, L. J. (1999). "Isoflavonoids do not inhibit in vivo lipid peroxidation in subjects with high-normal blood pressure." Atherosclerosis **145**(1): 167-172.
- Huang, Y., Kangas, L. J., Rasco, B. A. (2007). "Application of artificial neural networks in food science." Critical Reviews in Food Science & Nutrition **47**: 113-126.
- Imhof, M., Molzer, S., Imhof, M. (2008). "Effects of soy isoflavones on 17 β -estradiol-induced proliferation of MCF-7 breast cancer cells." Toxicology in Vitro **22**(6): 1452-1460.
- James, A. D., Ayensu, E. S. (1984). Medicinal Plants of China. Washington, DC, Reference Publications.
- Jha, H. C., von Recklinghausen, G., Zilliken, F. (1985). "Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids." Biochemical Pharmacology **34**(9): 1367-1369.
- Kallela, K. (1975). "The effect of storage on the estrogenic effect of red clover silage." Nord Vet Med **27**(11): 562-569.
- Kim, H., Peterson, T. G., Barnes, S. (1998). "Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways." The American Journal of Clinical Nutrition **68**(6): 1418S-1425S.

Literaturverzeichnis

- Klus, K. und Barz, W. (1998). "ChemInform Abstract: Formation of Polyhydroxylated Isoflavones from the Isoflavones Genistein and Biochanin A by Bacteria Isolated from Tempe." ChemInform **29**(29).
- Knight, D. C. und Eden, J. A. (1995). "Phytoestrogens- a short review." Maturitas **22**(3): 167-175.
- 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., Puffenbarger, R. S. (2000). "Vegetables, Fruits, Legumes and Prostate Cancer: A Multiethnic Case-Control Study." Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention **9**(8): 795-804.
- Krenn, L., Unterrieder, I., Ruprecht, R. (2002). "Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography." Journal of Chromatography B **777**(1-2): 123-128.
- Kuiper, G. G. J. M., Lemmen, J. G., Carlsson, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., Gustafsson, J. (1998). "Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β ." Endocrinology **139**(10): 4252-4263.
- Lamartiniere, C. A., Moore, J., Holland, M., Barnes, S. (1995). "Neonatal Genistein Chemoprevents Mammary Cancer." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) **208**(1): 120-123.
- Lethaby, A., Marjoribanks, J., Kronenberg, F., Roberts, H., Eden, J., Brown, J. (2007). "Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms." Cochrane Database of Systematic Reviews **4**.
- Lorraine A, F. (2003). "Soy isoflavones: hope or hype?" Maturitas **44, Supplement**(0):21-29.
- Martin, M. E., Haourigui, M., Pelissero, C., Benassayag, C., Nunez, E. A. (1995). "Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein." Life Sciences **58**(5): 429-436.
- Maul, R. (2008). Metabolismus von Rotkleeisoflavonen. Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie Universität Hamburg. **Dr. rer. nat.**
- McMurray, C. H., Laidlaw, A. S., McElroy, M. (1986). "The effect of plant development and environment on formononetin concentration in red clover (*Trifolium pratense* L.)." Journal of the Science of Food and Agriculture **37**(4): 333-340.
- 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. (2002). "Effects of Genistein and Hormone-Replacement Therapy on Bone Loss in Early Postmenopausal Women: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study." Journal of Bone and Mineral Research **17**(10): 1904-1912.
- Mousavi, Y. und Adlercreutz, H. (1993). "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 **58**(7): 301-304.

Literaturverzeichnis

Muthyala, R. S., Ju, Y. H., Sheng, S., Williams, L. D., Doerge, D. R., Katzenellenbogen, B. S., Helferich, W. G., Katzenellenbogen, J. A. (2004). "Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta." Bioorganic & Medicinal Chemistry **12**(6): 1559-1567.

National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) (2001). Chart Book on Cardiovascular, Lung and Blood Disease. Bethesda, NHLBI.

Naumann, D. (1984). "Some ultrastructural information on intact, living bacterial cells and related cell-wall fragments as given by FTIR." Infrared Physics **24**(2-3): 233-238.

Newbold, R. R., Banks, E. P., Bullock, B., Jefferson, W. N. (2001). "Uterine Adenocarcinoma in Mice Treated Neonatally with Genistein." Cancer Research **61**(11): 4325-4328.

Nikander, E., Metsä-Heikkilä, M., Ylikorkala, O., Tiitinen, A. (2004). "Effects of Phytoestrogens on Bone Turnover in Postmenopausal Women with a History of Breast Cancer." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **89**(3): 1207-1212.

Okura, A., Arakawa, H., Oka, H., Yoshinari, T., Monden, Y. (1988). "Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [VAL 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **157**(1): 183-189.

Peñalvo, J. L., Nurmi, T., Adlercreutz, H. (2004). "A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products." Food Chemistry **87**(2): 297-305.

Pereira, C. A. M., Yariwake, J. H., Lanças, F. M., Wauters, J.-N., Tits, M., Angenot, L. (2004). "A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method." Phytochemical Analysis **15**(4): 241-248.

Petri Nahas, E., Nahás Neto, J., De Luca, L., Traiman, P., Pontes, A., Dalben, I. (2004). "Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy." Maturitas **48**(4): 372-380.

Ramos, G., Dias, P., Morais, C., Fröhlich, P., Dall'Agnol, M., Zuanazzi, J. (2008). "LC Determination of Four Isoflavone Aglycones in Red Clover (&i&t;Trifolium pratense L.)." Chromatographia **67**(1): 125-129.

Rowland, I., Wiseman, H., Sanders, T., Adlercreutz, H., Bowey, E. (1999). "Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora." Biochemical Society transactions **27**(2): 304-308.

Rüfer, C. E., Bub, A., Möseneder, J., Winterhalter, P., Stürtz, M., Kulling, S. E. (2008). "Pharmacokinetics of the soybean isoflavone daidzein in its aglycone and glucoside form: a randomized, double-blind, crossover study." The American Journal of Clinical Nutrition **87**(5): 1314-1323.

Sachse, J. (1974). "[Determination of oestrogenic isoflavones and coumestrol in clover (*trifolium pratense* L. and *trifolium repens* L.) (author's transl)]." J Chromatogr **96**(1): 123-136.

Sacks, F. M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P., Winston, M. (2006). "Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health." Circulation **113**(7): 1034-1044.

Literaturverzeichnis

Samman, S., Lyons Wall, P. M., Chan, G. S. M., Smith, S. J., Petocz, P. (1999). "The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women." Atherosclerosis **147**(2): 277-283.

Sathyapalan, T., Manuchehri, A. M., Thatcher, N. J., Rigby, A. S., Chapman, T., Kilpatrick, E. S., Atkin, S. L. (2011). "The Effect of Soy Phytoestrogen Supplementation on Thyroid Status and Cardiovascular Risk Markers in Patients with Subclinical Hypothyroidism: A Randomized, Double-Blind, Crossover Study." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **96**(5): 1442-1449.

Schwartz, H. (2008). Analysis of bioactive compounds in foods: Isoflavones, tocopherols, tocotrienols and plant sterols. Chemie, Universität Wien. **Dr. rer. nat.**

Sekine, R., Vongsvivut, J., Robertson, E. G., Spiccia, L., McNaughton, D. (2011). "Analysis of 5-Hydroxyisoflavones by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Genistein and Methoxy Derivatives." The Journal of Physical Chemistry B **115**(47): 13943-13954.

Setchell, K. D. R. (1998). "Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones." The American Journal of Clinical Nutrition **68**(6): 1333S-1346S.

Setchell, K. D. R. und Cassidy, A. (1999). "Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health." The Journal of Nutrition **129**(3): 758.

Setchell, K. D. R., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J. E. (1997). "Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula." The Lancet **350**(9070): 23-27.

Shedd-Wise, K. M., Alekel, D. L., Hofmann, H., Hanson, K. B., Schiferl, D. J., Hanson, L. N., Van Loan, M. D. (2011). "The Soy Isoflavones for Reducing Bone Loss Study: 3-Yr Effects on pQCT Bone Mineral Density and Strength Measures in Postmenopausal Women." Journal of Clinical Densitometry **14**(1): 47-57.

Shimizu, H., Ross, R. K., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B. E., Mack, T. M. (1991). "Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County." Br J Cancer **63**(6): 963-966.

Snyder, L. R. (1978). "Classification off the Solvent Properties of Common Liquids." Journal of Chromatographic Science **16**(6): 223-234.

Snyder, L. R., Carr, P. W., Rutan, S. C. (1993). "Solvatochromically based solvent-selectivity triangle." Journal of Chromatography A **656**(1-2): 537-547.

Stuart, B. (1996). Modern Infrared Spectroscopy. Analytical Chemistry by Open Learning, Ed. Ando, D.J. John Wiley & Sons, Chichester.

Stürtz, M. (2008). Analytik von Isoflavonen aus Soja, Rotklee und Iris sowie deren Quantifizierung in Nahrungsergänzungsmitteln. Institut für Lebensmittelchemie, Technische Universität Braunschweig. **Dr. rer. nat.**

Subramanian, A., Ahn, J., Balasubramaniam, V. M., Rodriguez-Saona, L. (2006). "Determination of Spore Inactivation during Thermal and Pressure-Assisted Thermal Processing Using FT-IR Spectroscopy." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(26): 10300-10306.

Literaturverzeichnis

Taku, K., Lin, N., Cai, D., Hu, J., Zhao, X., Zhang, Y., Wang, P., Melby, M. K., Hooper, L., Kurzer, M. S., Mizuno, S., Ishim, Y., Watanabe, S. (2010). "MS509 effects of soy isoflavone extract supplements on blood pressure in adult humans: systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials." *Atherosclerosis Supplements* **11**(2): 212.

Taku, K., Melby, M. K., Kurzer, M. S., Mizuno, S., Watanabe, S., Ishim, Y. (2010). "Effects of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." *Bone* **47**(2): 413-423.

Taku, K., Umegaki, K., Sato, Y., Taki, Y., Endoh, K., Watanabe, S. (2007). "Soy isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials." *The American Journal of Clinical Nutrition* **85**(4): 1148-1156.

Teede, H. J., Dalais, F. S., Kotsopoulos, D., Liang, Y.-L., Davis, S., McGrath, B. P. (2001). "Dietary Soy Has Both Beneficial and Potentially Adverse Cardiovascular Effects: A Placebo-Controlled Study in Men and Postmenopausal Women." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**(7): 3053-3060.

Tewari, J. und Irudayaraj, J. (2004). "Quantification of Saccharides in Multiple Floral Honeys Using Fourier Transform Infrared Microattenuated Total Reflectance Spectroscopy." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(11): 3237-3243.

This, P., de Cremoux, P., Leclercq, G., Jacquot, Y. (2011). "A critical view of the effects of phytoestrogens on hot flashes and breast cancer risk." *Maturitas* **70**(3): 222-226.

Tikkanen, M. J., Wähälä, K., Ojala, S., Vihma, V., Adlercreutz, H. (1998). "Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(6): 3106-3110.

Tolleson, W. H., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Marques, M. M., Roberts, D. W. (2002). "Metabolism of Biochanin A and Formononetin by Human Liver Microsomes in Vitro." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(17): 4783-4790.

Traganos, F., Ardelt, B., Halko, N., Bruno, S., Darzynkiewicz, Z. (1992). "Effects of Genistein on the Growth and Cell Cycle Progression of Normal Human Lymphocytes and Human Leukemic MOLT-4 and HL-60 Cells." *Cancer Research* **52**(22): 6200-6208.

van de Weijer, P. H. M. und Barentsen, R. (2002). "Isoflavones from red clover (Promensil®) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo." *Maturitas* **42**(3): 187-193.

Vega-López, S., Yeum, K.-J., Lecker, J. L., Ausman, L. M., Johnson, E. J., Devaraj, S., Jialal, I., Lichtenstein, A. H. (2005). "Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones." *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**(1): 43-49.

Wagner, S., Ureña, A., Reich, E. Merfort, I. (2008). "Validated HPTLC methods for the determination of salicin in *Salix* sp. and of harpagoside in *Harpogophytum procumbens*." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **48**(3): 587-591.

Wan, Y., Ye, M., Yang, W., Weiguo, L., Taiwen, L. (2011). "Multivariate analysis on isoflavone content for soybean land races in Sichuan Basin." *Journal of Animal & Plant Sciences* **11**(2): 1380-1393.

Literaturverzeichnis

- Wang, L.-l., Duan, C.-x., Shuang, S.-m., Ren, G.-x. (2011). "Determine the isoflavones content in soybean and analysis by near-infrared reflectance spectroscopy(NIRS)." Food Science and Technology **1**.
- Wangen, K. E., Duncan, A. M., Merz-DeMlow, B. E., Xu, X., Marcus, R., Phipps, W. R., Kurzer, M. S. (2000). "Effects of Soy Isoflavones on Markers of Bone Turnover in Premenopausal and Postmenopausal Women." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **85**(9): 3043-3048.
- Ward, H. A. und Kuhnle, G. G. C. (2010). "Phytoestrogen consumption and association with breast, prostate and colorectal cancer in EPIC Norfolk." Archives of Biochemistry and Biophysics **501**(1): 170-175.
- Wei, H., Cai, Q., Ran, R. O. (1996). "Inhibition of UV light- and Fenton Reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein." Carcinogenesis **17**(1): 73-77.
- Wilcox, J. N. und Blumenthal, B. F. (1995). "Thrombotic Mechanisms in Atherosclerosis: Potential Impact of Soy Proteins." The Journal of Nutrition **125**(3 Suppl): 631S-638S.
- Wilson, R. (2008). Soybean:Market Driven Research Needs.Kapitel 1 in Genetics and genomics of soybean., Springer Verlag.
- Wilson, T. A., Nicolosi, R. J., Kotyla, T., Fleckinger, B. (2007). "Soy protein without isoflavones reduces aortic total and cholesterol ester concentrations greater than soy protein with isoflavones compared with casein in hypercholesterolemic hamsters." Nutrition Research **27**(8): 498-504.
- Wiseman, H., Casey, K., Clarke, D. B., Barnes, K. A., Bowey, E. (2002). "Isoflavone Aglycon and Glucoconjugate Content of High- and Low-Soy U.K. Foods Used in Nutritional Studies." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(6): 1404-1410.
- Wuttke, W., Jarry, H., Seidlova-Wuttke, D. (2007). "Isoflavones—Safe food additives or dangerous drugs?" Ageing Research Reviews **6**(2): 150-188.
- Yanagihara, K., Ito, A., Toge, T., Numoto, M. (1993). "Antiproliferative Effects of Isoflavones on Human Cancer Cell Lines Established from the Gastrointestinal Tract." Cancer Research **53**(23): 5815-5821.
- Yang, H., Irudayaraj, J., Paradkar, M. M. (2005). "Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy." Food Chemistry **93**(1): 25-32.
- Young, J. P. W. und Johnston, A. W. B. (1989). "The evolution of specificity in the legume-rhizobium symbiosis." Trends in Ecology & Evolution **4**(11): 341-349.
- Yuan, D., Chen, Y., Bai, X., Pan, Y., Kano, Y. (2006). "TLC and HPLC Analysis of Soy Isoflavones in Semen Sojæ Praeparatum." Asian Journal of Traditional Medicines **1**((3-4)): 166-172.

Publikationsverzeichnis**Originalarbeiten**

Kasper J, Melzig MF, Jenett-Siems K. New phenolic compounds of *Acmella ciliata*. *Planta Med.* 2010; 76(6): 633-5.

Kasper J, Melzig MF. HPTLC Method for the Quantification of Isoflavones in Nutritional Supplements of Red Clover (*Trifolium pratense* L.). *J Plan Chromatogr.* 2010; 24(5): 373-5.

Vorträge

Kasper J, Melzig MF, Jenett-Siems K. Phytochemische Untersuchungen an *Acmella ciliata* (H.B.K.) Cassini. DPhG Landesgruppentagung "Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor." Berlin, 2008

Kasper J, Mulsow K, Melzig MF. Investigations of the isoflavone composition of soy (*Glycine max* (L.) Merr.) based botanical supplements by FT-IR spectroscopy and multivariate analysis. Young Researcher Meeting, Münster, 2012

Posterpräsentationen

Jenett-Siems K, Kasper J, Melzig MF. Phytochemical investigation of *Acmella ciliata* (H.B.K.) Cass.. DPhG Jahrestagung, Jena, 2009

Kasper J, Melzig MF. Quantification of isoflavones in nutritional supplements of red clover by HPLC and HPTLC analysis. 58 th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Berlin, 2010

Kasper J, Melzig MF. Quantification of isoflavones in soy-based nutritional supplements by HPTLC analysis. International Symposium for HPTLC, Basel, 2011

Kasper J, Melzig MF. Quality control of red clover based nutritional supplements by FTIR and chemometric analysis. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Antalya, 2011

Kasper J, Melzig MF. Mid-infrared spectroscopy determination of the isoflavone content in nutritional supplements of red clover. Joint Meeting ÖPhG-DPhG, Innsbruck, 2011

Publikationsverzeichnis

Eidenschink J, Mulsow K, Melzig MF. Investigation of the Isoflavone Composition of soy (*Glycine max* (L.) Merr.) based botanical supplements by FT-IR spectroscopy and multivariate analysis. 60th International Congress (Joint Meeting with ASP, AFERP, PSE and SIF) and Annual Meeting of GA, New York, 2012

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M.F. Melzig für die Ermöglichung dieser Arbeit und für das Überlassen des interessanten und vielseitigen Themas. Insbesondere danke ich ihm für die stetige wissenschaftliche und praktische Unterstützung im Laufe meiner Arbeit.

Für die Erstellung des Zweitgutachtens möchte ich Frau Prof. Dr. M.K. Parr meinen Dank aussprechen.

Des Weiteren möchte ich meiner Diplomandin Katharina Mulsow für die Unterstützung und die Generierung von Ergebnissen für diese Arbeit danken.

Zu großem Dank bin ich auch Frau Dr. A. Fiedler und Herrn G. Gudi vom Julius-Kühn-Institut, Berlin, verpflichtet für die Nutzung des Raman-Spektrometers und der Software zur Clusteranalyse meiner Proben.

Darüber hinaus möchte ich der Frauenförderung der Freien Universität danken, die es mir durch die großzügige Finanzierung meiner Doktorandenstelle ermöglicht hat, meine Kräfte komplett auf die Forschung konzentrieren zu können. Weiterhin konnte ich durch die finanzielle Unterstützung bei den Kongressreisen nach Jena, Antalya und New York meine wissenschaftlichen Ergebnisse präsentieren.

Einen speziellen Dank für die fachkundige Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre möchte ich an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Arbeitskreises aussprechen, darunter besonders Frau Conny Görick, deren intensive und häufig selbstlose Zusammenarbeit eine große Hilfe darstellte.

Meinen Eltern möchte ich für ihren unerschütterlichen Glauben und ihren liebevollen Rückhalt bei allen Entscheidungen auf meinem bisherigen Lebensweg danken.

Zu guter Letzt bin ich meinem Mann Colin sehr dankbar für seine uneingeschränkte Liebe.

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin,

Juliane Eidenschink