

ANALYSE VON ISOFLAVONEN IN LEBENSMITTELN ALS DATENQUELLE FÜR ISOFLAVON DATENBANKEN

Heidi Schwartz^a und Gerhard Sontag^b

^aDepartment IFA Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, 3430 Tulln, Österreich

^bInstitut für Analytische Chemie, Fakultät für Chemie, Universität Wien, 1010 Wien,
Österreich

VORKOMMEN, STRUKTUR UND GESUNDHEITLICHE BEDEUTUNG DER ISOFLAVONE

Isoflavone gehören zur Klasse der Phytoöstrogene. In Sojabohnen, die als Hauptquelle von Isoflavonen in der menschlichen Ernährung dienen, kommen Isoflavone hauptsächlich als Malonylglucoside und als freie Glucoside vor. Bei der Verarbeitung erhöht sich – je nach Verarbeitungsart und -ausmaß – der Anteil an Acetylglucosiden, Glucosiden und Agluconen. Die Strukturen sind in Abbildung 1 dargestellt.

In ihrer Eigenschaft als Phytoöstrogene können Isoflavone die Wirkungen endogener Östrogene nachahmen oder modulieren. Beschriebene *in vitro* Effekte inkludieren östrogene und antiöstrogene Wirkung je nach Konzentration an eingesetztem Östrogen sowie antioxidative und entzündungshemmende Wirkung [1, 2]. Auf epidemiologischen Untersuchungen, Interventionsstudien und Fütterungsversuchen basierende Ergebnisse deuten auf eine Reduktion des Risikos für hormonbedingte Krebsarten und kardiovaskuläre Erkrankungen, Erhöhung der Knochendichte und Linderung menopausaler Beschwerden hin [2]. Allerdings sind einige der beschriebenen Effekte nicht eindeutig bewiesen, da besonders bei epidemiologischen Studien Isoflavone nicht als einzige Ursache der beobachteten Effekte angesehen werden dürfen. Weiters wurden bei einigen Interventionsstudien und Fütterungsversuchen widersprüchliche Ergebnisse erhalten. Auch die Umlegung von *in vitro* Ergebnissen auf *in vivo* ist kritisch.

Zu den Fragen zur Wirksamkeit der Isoflavone kommen noch jene der Unbedenklichkeit, besonders im Hinblick auf Isoflavone in Babynahrung und bezüglich Gabe von Isoflavon Nahrungsergänzungsmittel an Frauen in den Wechseljahren, welche

nach sehr geringer Isoflavon Exposition über Jahrzehnte plötzlich Mengen von 20-80 mg/Tag ausgesetzt sind [3].

ISOFLAVON DATENBANKEN

Um eine Abschätzung der täglichen Isoflavon Aufnahme zu ermöglichen, bedarf es Isoflavon Datenbanken. Die bestehenden Datenbanken unterscheiden sich in ihren Zielen, in der Auswahl an abgedeckten Lebensmitteln und Isoflavonen, in den Datenquellen, der Art der Datenpräsentation, der Menge an Information zusätzlich zu den Isoflavongehalten und in der Qualitätskontrolle innerhalb der Datenbank [4]. Dennoch haben sie mit dem gleichen Hauptproblem zu kämpfen: Der Suche nach verlässlichen, repräsentativen Daten.

Mögliche Datenquellen sind wissenschaftliche Literatur, chemische Analyse direkt für die Datenbank, Berechnung auf der Basis von Zutatenlisten und Herstellerinformationen, andere Datenbanken und Abschätzung über den Isoflavongehalt ähnlicher Lebensmittel. Bei der Erstellung von Datenbanken ist es wichtig, sich der Limitierungen der einzelnen Datenquellen bewusst zu sein. Bei wissenschaftlicher Literatur unterscheidet man zwischen Publikationen, die Methodenentwicklung beschreiben, Artikeln, die die natürliche oder durch Verarbeitung eingebrachte Variabilität der Isoflavongehalte untersuchen und Arbeiten, in denen Analysen direkt zur Erstellung einer Datenbank durchgeführt wurden. In Methodenentwicklungsartikeln ist oftmals die Probenbeschreibung mangelhaft. Weiters werden meist wenig repräsentative Proben herangezogen, um die entwickelte Methode zu testen. In Artikeln, die die Variation der Isoflavongehalte in Lebensmitteln untersuchen, wird wiederum selten besonderes Augenmerk auf die analytischen Methoden gelegt. Publikationen, die Analyse für Datenbanken beschreiben, haben unterschiedliche Qualität im Hinblick auf Probenahme, Probenbeschreibung, analytische Methode und Qualitätskontrolle.

Direkte chemische Analyse als Datenquelle ist nur für eine begrenzte Anzahl an Lebensmitteln möglich. Ein Einsatzgebiet ist die Analyse von Nahrungsmitteln, die bei Interventionsstudien verabreicht werden und deren genaue Isoflavonkonzentration ermittelt werden muss. Weitere Situationen, in denen direkte chemische Analyse angebracht ist, sind Lücken in der vorhandenen Literatur zu der interessierenden

Lebensmittelklasse und eine geplante Abschätzung der Isoflavonaufnahme in einem bestimmten Land, zu dessen Isoflavonquellen es keine aktuellen und repräsentativen Daten gibt.

ALLGEMEINES ANALYSENSHEMA UND PROBLEMATIK DER EINZELNEN SCHRITTE

Die Analyse folgt dann folgendem Schema: Probenahme – Probenvorbereitung – Probenaufarbeitung – Messung – Auswertung und Präsentation der Ergebnisse. Die schwierigste Aufgabe ist eine repräsentative Probenahme, um der natürlichen Variabilität der Isoflavongehalte in Sojabohnen und der Batch zu Batch Variabilität in verarbeiteten Lebensmitteln Rechnung zu tragen. Nach der Bereitung von stabilen, homogenen Proben im Laufe der Probenvorbereitung kommt die zweitgrößte Fehlerquelle nach der Probenahme, die Probenaufarbeitung. Diese ist allerdings verglichen mit der Probenahme leichter zu entschärfen, wenn man sich gewisser Fehlerquellen bewusst ist und diese meidet.

Das Hauptproblem ist, dass es keine allgemein anerkannte und weithin verwendete Referenzmethode zur Probenaufarbeitung von Isoflavonen in Lebensmitteln gibt. Es wurden viele Methoden publiziert, die sich in vielen Parametern unterscheiden. Grundsätzlich differenziert man zwischen Extraktions- und Hydrolysemethoden, die sich wiederum in saure, basische und enzymatische Hydrolyse teilen.

Publizierte Extraktionsmethoden unterscheiden sich im Extraktionslösungsmittel, in der Anzahl der Extraktionen, der Extraktionsmethode, der Extraktionstemperatur und im verwendeten Extraktionsadditiv. Hydrolytische Methoden unterscheiden sich im Hinblick auf das Hydrolysereagens bzw. Enzym, die Molarität des Hydrolysereagens, die Hydrolysezeit, das Lösungsmittel und den Zeitpunkt der Hydrolyse (vor oder nach der Extraktion). Abbildung 1 gibt einen Überblick über die gängigen Probenaufarbeitungsmethoden zur Analyse von Isoflavonen in Lebensmitteln.

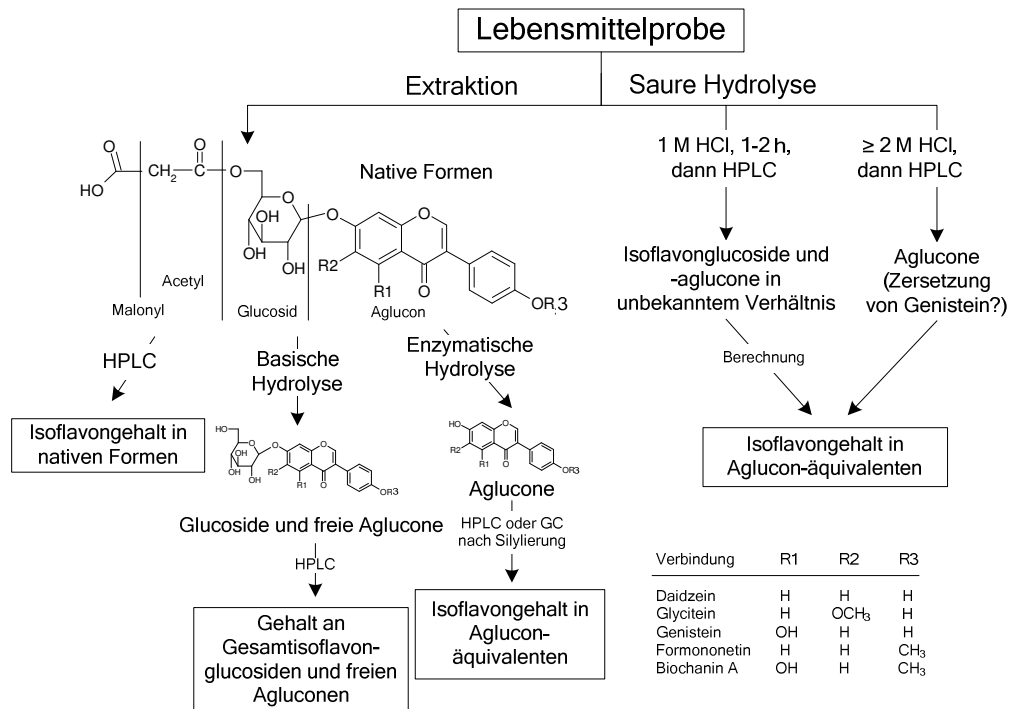


Abbildung 1: Probenaufarbeitungsmethoden zur Analyse von Isoflavonen in Lebensmitteln

VERGLEICH VON PROBENAUFARBEITUNGSMETHODEN

Um die verschiedenen in der Literatur verwendeten Probenaufarbeitungsmethoden zu vergleichen und eine optimale, möglichst universell anwendbare Methode zu finden, wurden unterschiedliche Sojaprodukte (Sojabohnen, Tofu, Soja Drink, Soja Schnitzel und vegetarische Bratwurst ohne Ei) auf verschiedene Arten aufgearbeitet (Extraktion, saure, basische und enzymatische Hydrolyse) und mittels HPLC-UV-MS analysiert [5]. Dabei wurden Vor- und Nachteile der einzelnen Aufarbeitungsarten herausgearbeitet, der Einfluss unterschiedlicher Methodenparameter evaluiert, mögliche Fehlerquellen aufgespürt und eine optimale Aufarbeitungsstrategie gefunden.

Generell wurden bei der Analyse von verschiedenen Sojalebensmitteln mit optimierten Extraktions- und Hydrolysemethoden ähnliche Ergebnisse erhalten, wenn auch mit unterschiedlich großem Aufwand und mit unterschiedlichem Ausmaß an zusätzlicher Information. Die Vorteile von direkter Extraktion sind Information über das Muster an nativen Formen und geringer Zeitbedarf. Zu den Nachteilen zählen Instabilität der Malonyl- und Acetylglucoside in der Probe und in Standardlösungen, die Abhängigkeit

der Extraktionsausbeute von der Lebensmittelmatrix und besonders im Fall von Lebensmitteln, die Soja als Nebenkomponente enthalten, komplexe Chromatogramme, die neben den jeweils 4 Formen von Genistein, Daidzein und Glycitein auch eine Reihe an Matrixkomponenten enthalten.

Saure Hydrolyse ist imstande, sowohl Esterbindungen als auch glucosidische Bindungen zu spalten. Allerdings ist die Hydrolyse glucosidischer Bindungen unter jenen Bedingungen, unter denen alle Isoflavonaglucone stabil sind (Rückflusskochen für 2 h mit 1 M HCl), nicht vollständig, sodass neben den freigesetzten Agluconen auch die restlichen Glucoside analysiert werden müssen. Dies erfordert Aglucon- und Glucosidstandards ohne Informationen über native Formen oder den Gesamtglucosidgehalt zu liefern. Höhere Molaritäten oder längere Hydrolysendauer führen zu teilweiser Zerstörung von Genistein. Eine Alternative wäre saure Hydrolyse mit 1 M HCl für 2 h bei 75°C im Ultraschallbad. Hier findet vollständige Freisetzung der Aglucone statt, die erhaltenen Chromatogramme sind aber durch stärkeres Basislinienrauschen gekennzeichnet.

Basische Hydrolyse (Verseifung eines methanolisch-wässrigen Extraktes mit 0.14 M Natronlauge bei Raumtemperatur) wurde in einer kollaborativen Studie getestet [6]. Bereits 10 min genügen zur vollständigen Spaltung von Malonyl- und Acetylglucosiden zu Glucosiden, sodass eine Summenbestimmung von Gesamtglucosiden und freien Agluconen möglich ist. Ein Nachteil ist bedingte Stabilität mancher Isoflavonglucoside (Daidzin und Glycitin) in Acetonitril enthaltender alkalischer Lösung, was von Bedeutung ist, weil wässriges Acetonitril bei einigen Lebensmittelmatrices bessere Extraktionsausbeuten liefert als wässriges Methanol und basische Hydrolyse immer im Anschluss an eine Extraktion durchgeführt wird [5].

Enzymatische Hydrolyse ist die mildeste, bei Verwendung unspezifischer Enzympräparate wie *Helix Pomatia* Saft (β -Glucuronidase, Arylsulfatase) aber gleichzeitig vollständigste Hydrolysemethode von nativen Isoflavonen in Sojalebensmitteln. Es werden nur Agluconstandards zur Quantifizierung benötigt, dafür aber keine Informationen zu nativen Formen erhalten. Ein Nachteil der Methode ist, dass die Gesamtausbeute von der Effizienz der vorangehenden Extraktion abhängig ist, sodass diese separat optimiert werden muss.

Auch in der chromatographischen Messung der Probelösungen nach der Probenaufarbeitung lauern Fehlerquellen. Meist wird HPLC-UV zur Analyse von Isoflavonen in Sojalebensmitteln eingesetzt. Aufgrund der Instabilität von veresterten Glucosidstandards ist es anzuraten, Malony- und Acetylglucoside (nach Identifizierung mittels authentischer Standards, LC-MS und / oder Literaturvergleich) über molekulargewichtskorrigierte Kalibrierfunktionen für Isoflavonglucoside zu quantifizieren [7], das Ergebnis in Agluconäquivalente umzuwandeln und mit dem Ergebnis der enzymatischen Hydrolyse zu vergleichen (siehe unten).

OPTIMALE PROBENAUFARBEITUNGSSTRATEGIE

Die optimale Probenaufarbeitungsstrategie ist in Abbildung 2 dargestellt. Wenn nur Agluconäquivalentgehalte von Interesse sind, ist enzymatische Hydrolyse mit Helix Pomatia Saft nach zweimaliger Extraktion mit Acetonitril/Wasser in Gegenwart von Zinksulfat Heptahydrat für klare Extrakte die Methode der Wahl. Sind auch native Formen gefragt, ist es anzuraten, nach Extraktion und HPLC-analyse die Agluconäquivalentgehalte zu berechnen und mit dem Ergebnis der enzymatischen Hydrolyse zu vergleichen, um nicht erkannte Koelution auszuschließen. Wenn weder veresterte Glucosidstandards noch LC-MS zur Identifizierung von nativen Formen zur Verfügung stehen und Informationen über Gesamtglucoside ausreichen, ist basische Hydrolyse eine Alternative zur direkten HPLC-Analyse nach Extraktion.

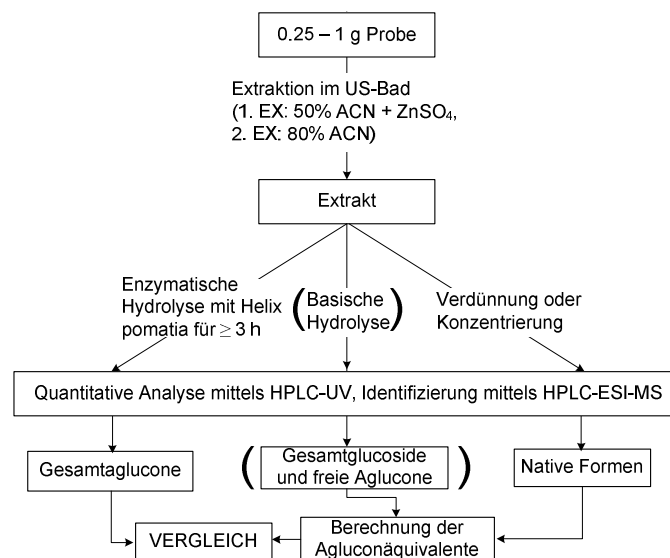


Abbildung 2: Empfohlene Probenaufarbeitungsmethoden

LITERATURÜBERBLICK UND EMPFEHLUNGEN

Publizierte Arbeiten haben sehr heterogene Qualität – nicht nur in Bezug auf die angewandten analytischen Methoden, sondern auch in Bezug auf die Probenahme, Probenvorbereitung, Probenbeschreibung, Präsentation der Ergebnisse und Qualitätskontrolle. Um Datenbank fitte Daten zu produzieren, sollten repräsentative Proben genommen und stabile, homogene Unterproben bereitet werden. Zusätzlich sollten detaillierte Informationen zu den Proben, zur Probenahme, Probenvorbereitung, Probenaufarbeitung, Analyse und Qualitätskontrolle in der Publikation gegeben werden. Weiters sollten Fehlerquellen bei der Analyse (unvollständige Hydrolyse bei Verwendung zu spezifischer Enzyme oder 1 M HCl für ≤ 2 h, Instabilität gewisser Isoflavone bei saurer oder basischer Hydrolyse, Extraktionsverluste bei nur einmaliger Extraktion, Koelution, Instabilität veresterter Glucosidstandards, ...) beachtet und vermieden werden. Isoflavongehalte sollten schließlich (nach Möglichkeit zusammen mit der natürlichen Standardabweichung) in Agluconäquivalenten auf Frischgewichtsbasis angegeben werden, um einen Vergleich mit anderen Daten zu ermöglichen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Isoflavon Datenbanken notwendige Werkzeuge zur Abschätzung der Isoflavonaufnahme sind, aber mit inhomogener Literatur als Datenquelle zu kämpfen haben. Bei zukünftiger Isoflavonanalyse sollten die nun bekannten Fehlerquellen vermieden werden, um die Aufnahme der neuen Daten in Isoflavon Datenbanken zu erleichtern.

References:

- [1] Hwang, C. S., Kwak, H. S., Lim, H. J. et al.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 101 (2006) 246-253.
- [2] Mortensen, A., Kulling, S., Schwartz, H. et al.: *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) S266 –S309.
- [3] Schwartz, H., Sontag, G.: *Monatsh. Chem* 139 (2008) 865–872.
- [4] Schwartz, H., Sontag, G., Plumb, J.: *Food Chem.* 113 (2009) 736–747.
- [5] Schwartz, H., Sontag, G.: *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 204–215.
- [6] Klump, S.P., Allred, M.C., MacDonald, J.L., Ballam, J.M.: *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1865-1883.
- [7] Collison, M.W.: *J. AOAC Int.* 91 (2008) 489-500.