

CHROM. 16,874

Note

Quantitative Hochdruckflüssigchromatographie von Isoflavonen in Rotklee (*Trifolium pratense* L.)

J. SACHSE

Eidgenössische Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen Pflanzenbau, Reckenholzstrasse 191/211, CH-8046 Zürich (Schweiz)

(Eingegangen am 2. Mai 1984)

Die quantitative Bestimmung von Isoflavonen ist wegen der östrogenen, antoxidierenden, fungiziden und antihämolytischen Eigenschaften¹⁻³ dieser Substanzen von Bedeutung. Bisher konnten diese Stoffe nach der klassischen säulen- und dünn-schichtchromatographischen Reinigung photometrisch erfasst werden⁴. Die Einführung der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) ermöglicht es, das erste arbeits- und zeitaufwendige Verfahren durch ein rascheres zu ersetzen, worüber bereits einige Publikationen vorliegen. Die Untersuchungen betreffen Reinsubstanzen⁵ sowie die isoflavonhaltigen Pflanzen *Glyzine soja* L.⁶⁻¹¹, *Trifolium subterraneum* L.^{12,13} und *Cicer arietinum* L.¹⁴, die für die menschliche oder tierische Ernährung angebaut werden. Ein Teil der östrogenen Isoflavone wurden sowohl als Glycoside als auch als Aglycone bestimmt. Diese Isoflavone kommen fast nur in den Leguminosen vor, ihre qualitative und quantitative Zusammensetzung ist jedoch in jeder Pflanzenart verschieden, was ein Vergleich zwischen den naheverwandten Arten Rot- und Weissklee zeigt⁴. Ausserdem erfordert wegen des unterschiedlichen komplexen Gehaltes an Begleitstoffen jedes Untersuchungsobjekt eine andere Bestimmungsmethode, so dass vorhandene Verfahren nicht ohne weiteres übernommen werden können. Dies bezieht sich sowohl auf die Extraktion als auch auf die Auftrenntechnik mit HPLC.

Das Ziel dieser Arbeit war es, für die quantitative Bestimmung der fünf Isoflavonaglykone Biochanin A, Formononetin, Pratensein, Genistein und Daidzein in Rotklee mit Hilfe der HPLC eine Methode zu entwickeln.

EXPERIMENTELLER TEIL

Extraktion

Man lässt 1 g gefriergetrocknetes, feingemahlendes Material (dreizehn Rotklee-Zuchtstämme, Ernte 1983, 2. Schnitt) mit 30 ml Wasser 1 h quellen. Nach Zugabe von 100 ml Äthanol (95%) den Ansatz 1 h rühren oder über Nacht stehen lassen. Den festen Anteil abnutschen, mit Äthanol gut nachwaschen und das Filtrat bei 50°C am Rotationsverdampfer eindampfen. Den Rückstand mit 15 ml 2 N Salzsäure 1 Stunde im siedenden Wasserbad hydrolysieren. Nach dem Neutralisieren mit konz. Natronlauge auf pH 5-6 das Hydrolysat mit heissem Äthanol (95%) quantitativ in einen 50 ml Messkolben spülen. Für die Identitäts- und Reinheitsprüfung der Peaks einen Extrakt aus 3 g Klee/100 ml nach dem gleichen Verfahren herstellen.

HPLC

Gerät: Perkin-Elmer Liquid Chromatograph Series 3B, Rheodyne Probenaufgeber 7125 mit 20 μ l Schleife. Detektor: Perkin Elmer Spectrometric Detector LC 75 mit Autocontrol. Schreiber: W + W Recorder 1100. Integrator: Spectra-Physics Autolab System I.

(a) HPLC von Reinsubstanzen: Hibar-Fertigsäule Merck 250 \times 4 mm, LiChrosorb RP-18, 10 μ m. Eluent: Acetonitril (Mallinckrodt Chromar)-bidestilliertes Wasser. Gradient: linear, 15 min, 30 bis 80% Acetonitril. Fließgeschwindigkeit: 1.8 ml/min Papiervorschub: 1 cm/min. Detektion: 260 nm. Schreibervollausschlag bei einer Extinktion von 0.64. Isoflavonkonzentration: 1 μ g/20 μ l.

(b) HPLC der Klee-Extrakte: Hibar-Fertigsäule Merck 250 \times 4 mm, LiChrosorb RP-18, 5 μ m. Eluent: Acetonitril (Mallinckrodt Chromar)-bidestilliertes Wasser mit einem Zusatz von 0.5% (v/v) Phosphorsäure 85% (Merck p.a.) bzw. 0.5% (v/v) Ameisensäure 98–100% (Merck p.a.). Gradient: 10 min 0.1–20% Acetonitril linear, 42 min 20–33% Acetonitril linear, 10 min 33–37 Acetonitril konkav, 20 min, 40% Acetonitril isokratisch bei Raumtemperatur. Fließgeschwindigkeit: 0.9 ml/min. Detektion: 260 nm, Schreibervollausschlag bei einer Extinktion von 0.16. Papiervorschub: 0.1 cm/min. Integration: Externer Standard, Herkunft der Isoflavone⁴. Standardlösung: Je 5 mg der Isoflavone in 50 ml Äthanol lösen. Etwa 60 μ l dieser Standardlösung bzw. des Extraktes im 50 ml Messkolben injizieren.

Das angefallene Acetonitril auf folgende Weise vernichten: 2 l des Gemisches in einem 3-l Rundkolben mit 400 g techn. Natriumhydroxid in drei Portionen versetzen. Mit aufgesetztem Kühler in einem Abzug gut schütteln, bis zur nächsten Zugabe abkühlen lassen. Das Acetonitril trennt sich bei der ersten Portion Natriumhydroxid von der wässrigen Phase. Nach der letzten Zugabe einige Siedesteine beifügen, das Gemisch in einer Heizkalotte bis zum Sieden der oberen Phase unter guter Kühlung im Abzug erhitzen bis keine zwei Phasen mehr sichtbar sind (etwa 3–4 h). Nach dem Abkühlen kristallisiert der Kolbeninhalt in langen Kristallnadeln fast ohne Flüssigkeitsrest aus.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die gewonnenen Ergebnisse über den Gehalt an Isoflavonen in Rotklee-Zuchtstämmen, die verschiedenen morphologischen Gruppen angehören, zeigen Formononetin und Biochanin A als Hauptkomponenten (Tabelle I). Genistein und Daidzein mit drei bzw. zwei Hydroxylgruppen am Molekül (Fig. 1) können als Vorläufer von Biochanin A und Formononetin betrachtet werden, die in der Pflanze durch Methylierung der Hydroxylgruppe an C-4' zu stabileren sekundären Stoffwechselprodukten überführt werden.

Von den dreizehn untersuchten Genotypen besitzen die Zuchtstämme vier den niedrigsten (398 mg) und acht den höchsten Gehalt (739 mg) an Biochanin A. Für Formononetin sind es die entsprechenden Stämme 11 und 12 mit rund 780 und 980 mg dieses Isoflavons.

Wie Fig. 2 zeigt, lassen sich die fünf Isoflavone einschliesslich des Cumarinderivates Cumöstrol, das ebenfalls in Luzerne und Kleearten gefunden wurde und östrogene Eigenschaften besitzt^{15,16}, innerhalb von 11 min trennen. Da bekanntlich polare Substanzen vor weniger polaren von einer Umkehrphasensäule eluiert werden,

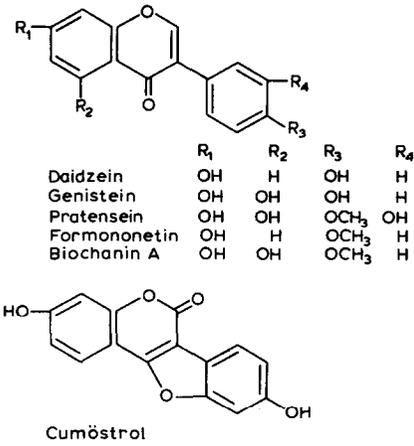


Fig. 1. Strukturformel von einigen Isoflavonen und Cumöstroil.

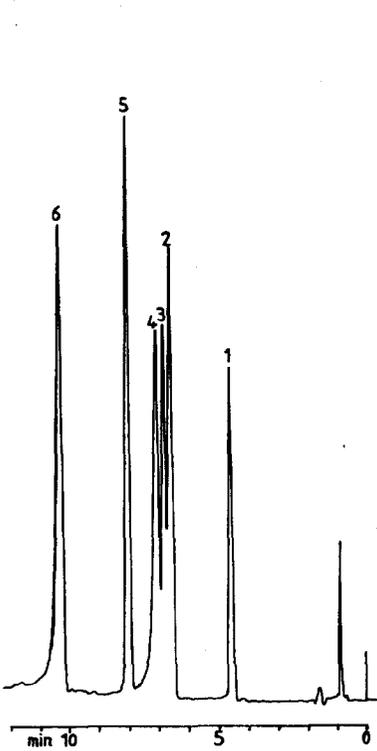


Fig. 2. HPLC-Chromatogramm von fünf Isoflavonen und Cumöstroil. 1 = Daidzein, 2 = Genistein, 3 = Cumöstroil, 4 = Pratensein, 5 = Formononetin, 6 = Biochanin A. Chromatographische Bedingungen siehe experimentellen Teil.

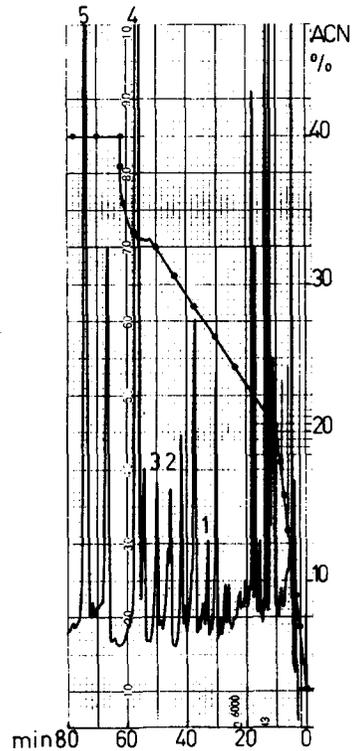


Fig. 3. HPLC-Chromatogramm eines Rotklee-Extraktes. 1 = Daidzein, 2 = Genistein, 3 = Pratensein, 4 = Formononetin, 5 = Biochanin A. Chromatographische Bedingungen siehe experimentellen Teil.

TABELLE I
ISOFLAVONGEHALT EINIGER ROTKLEEZUCHTSTÄMME (mg/100 g TROCKENSUBSTANZ)

Die Einzelwerte wurden durch Doppelbestimmungen ermittelt.

Stamm- Nr.	Biochanin A			Formononetin			Pratensein			Genistein			Daidzein		
	\bar{x}	x	d^*	\bar{x}	x	d	\bar{x}	x	d	\bar{x}	x	d	\bar{x}	x	d
1	519	848	1.2	832	53	1.9	56	4.3	83	18	1.2	83	17	18	5.6
	507	815			58					16				16	
2	457	865	3.2	837	82	3.2	82	0	67	13	0.7	67	14	13	3.6
	428	809			82					14				14	
3	511	830	1.0	850	57	2.3	57	0	68	12	11.7	68	13	12	3.8
	501	870			57					13				13	
4	398	896	0	895	56	0.2	61	6.9	57	10	10.9	57	13	12	3.8
	398	893			65					13				13	
5	492	887	0.1	907	66	2.1	64	3.0	72	4	2.1	72	6	4	21.4
	493	926			62					7				7	
6	606	939	1.9	960	55	2.1	55	0	25	3	2.0	25	3	3	0
	630	980			55					3				3	
7	450	857	0.1	820	51	4.4	50	2.0	54	7	0.9	54	6	7	14.3
	449	781			49					5				5	
8	764	849	3.3	832	76	2.1	68	11.2	44	4	6.9	44	4	4	0
	713	814			59					4				4	
9	526	843	0.6	841	65	0.3	62	5.4	59	9	3.9	62	9	9	5.6
	532	838			58					8				8	
10	504	753	3.2	765	78	1.6	80	2.4	57	7	0.9	57	6	7	21.4
	538	777			82					4				4	
11	495	749	2.9	779	51	3.7	49	3.9	57	4	10.9	57	5	4	10.4
	525	809			47					5				5	
12	515	978	0.6	979	52	0.1	53	1.0	44	7	1.1	44	7	7	0
	521	980			53					7				7	
13	466	983	4.4	954	50	3.0	51	1.0	42	6	2.4	41	6	6	0
	511	925			51					6				6	
			$\bar{d} = 1.7$					$\bar{d} = 2.1$			$\bar{d} = 3.1$				$\bar{d} = 6.9$
											$\bar{d} = 4.3$				

* d = Prozentuale Abweichung der Einzelwerte x vom Mittelwert \bar{x} . \bar{d} = Mittlere prozentuale Abweichung.

ergibt sich für die sechs Substanzen die Reihenfolge: Daidzein, Genistein, Cumöstrol, Pratensein, Formononetin und Biochanin A. Obgleich Daidzein eine Hydroxylgruppe weniger als Genistein besitzt (Fig. 1), wird es vor letzteren eluiert. Der Wasserstoff der Hydroxylgruppe an C-5 ist durch Van der Waalssche Kräfte an die Keto gruppe an C-4 gebunden, wodurch Genistein lipophilere Eigenschaften erhält. Das gleiche gilt für das Isoflavonpaar Formononetin und Biochanin A. Eine Methoxylgruppe statt einer Hydroxylgruppe an C-4' macht die Verbindung unpolarer, infolgedessen werden Daidzein, Genistein und Cumöstrol vor Pratensein, Formononetin und Biochanin A eluiert. Durch eine dritte Hydroxylgruppe an C-3' wird Pratensein vor Formononetin und Biochanin A, aber wegen der Methoxygruppe an C-4' nach Genistein von der Säule abgelöst. Cumöstrol ist mit zwei Hydroxylgruppen an C-7 und C-4', einer Sauerstoffbrücke zwischen C-4 und C-6' und der Ketogruppe an C-2 weniger polar als Genistein.

Der aus 1 g Probenmaterial erhaltene Extrakt enthält noch so viele bei 260 nm absorbierende Substanzen, dass die Bestimmung der fünf Isoflavone, deren Absorptionsmaxima bei 250 und 263 nm liegen, nicht mehr in kurzer Zeit erfolgen kann, wenn möglichst nicht verunreinigte Peaks erhalten werden sollen. Ausserdem war es vorteilhaft, die Ionisation der Isoflavone durch Säurezusatz im Eluenten B zu unterdrücken und somit schärfere Peaks zu erzielen. Dafür boten sich sowohl Phosphorsäure als auch Ameisensäure⁵ in einer Konzentration von 0.5% (v/v) an. Höhere

TABELLE II

IDENTIFIKATION UND REINHEITSPRÜFUNG DER ISOFLAVONPEAKS

Messung jedes Isoflavonpeaks an drei Punkten.

Isoflavone	Extinktionsquotient "absorbance ratio"						Extinktionsbereich der Isoflavone aus dem Extrakt
	240/257 nm		257/230 nm		240/310 nm		
	Standard	Extrakt	Standard	Extrakt	Standard	Extrakt	
Daidzein	1.00	1.03	2.43	2.58	2.46	2.67	0.011-0.032
	1.01	1.03	2.45	2.58	2.47	2.67	
	1.01	1.04	2.48	2.18	2.50	2.27	
Genistein	0.45	0.38	5.98	8.67	2.78	3.33	0.006-0.025
	0.46	0.48	6.03	4.16	2.81	2.00	
	0.46	0.57	6.11	3.50	2.83	2.00	
Pratensein	0.50	0.71	4.08	3.17	2.11	2.25	0.012-0.055
	0.52	0.65	4.09	3.43	2.13	2.25	
	0.51	0.68	4.08	3.15	2.11	2.15	
Formononetin	0.95	0.96	2.57	2.58	2.45	2.49	0.199-1.036
	0.96	0.96	2.57	2.58	2.47	2.49	
	0.96	0.96	2.57	2.60	2.48	2.50	
Biochanin A	0.46	0.43	6.11	6.00	2.83	2.94	0.016-0.297
	0.47	0.45	6.19	6.18	2.89	2.81	
	0.48	0.45	6.17	6.30	2.96	2.84	

TABELLE III
REINHEITSPRÜFUNG DER ISOFLAVONPEAKS MIT DEM "ABSORBANCE INDEX" Q*

Standard	Wellenlänge (nm)										Diskriminator**
	210	220	230	240	250	260	270	280	290		
Daidzein	A	281	199	228	296	334	284	222	150	122	1.02
	B	202	143	161	211	238	202	156	106	87	
	Q	1.39	1.39	1.42	1.40	1.40	1.41	1.42	1.42	1.40	1.02
Genistein	A	518	368	268	330	527	779	549	305	225	1.01
	B	552	349	255	313	500	735	525	291	215	
	Q	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.06	1.06	1.05	1.05	1.01
Pratensein	A	264	204	136	117	170	254	206	121	103	1.03
	B	237	181	122	106	153	225	185	107	91	
	Q	1.11	1.13	1.11	1.10	1.11	1.13	1.11	1.13	1.13	1.03
Formononetin	A	203	148	167	221	251	229	177	115	88	1.01
	B	151	109	124	163	184	169	132	86	65	
	Q	1.34	1.36	1.35	1.36	1.36	1.36	1.34	1.34	1.35	1.01
Biochanin A	A	271	185	129	152	238	354	277	157	111	1.03
	B	183	125	88	103	160	243	189	107	77	
	Q	1.48	1.48	1.47	1.48	1.49	1.46	1.47	1.47	1.44	1.03
Aus <i>Rotklee</i> Formononetin	A	545	398	449	572	642	577	454	301	240	1.02
	B	275	203	231	294	329	293	230	153	124	
	Q	1.98	1.96	1.94	1.95	1.95	1.97	1.97	1.97	1.94	1.02
Biochanin A	A	116	77	54	62	97	141	111	64	46	1.05
	B	88	59	40	47	71	106	82	47	34	
	Q	1.32	1.31	1.35	1.32	1.37	1.33	1.35	1.36	1.35	1.05

* Q = A/B; A + B = Extinktion an zwei verschiedenen Punkten eines Peaks.

** Diskriminator = höchster Q-Wert/tiefsten Q-Wert.

Konzentrationen brachten keine weiteren Vorteile. Die bessere Auftrennung wird mit Ameisensäure erreicht, die einerseits Ionendepression ermöglicht, andererseits auch als Lösungsmittel für die Isoflavone wirkt. Nachteilig ist die Eigenabsorption der Ameisensäure unter 250 nm, die die Aufnahme von Absorptionsspektren und eine Reinheitsprüfung der Isoflavonpeaks durch "absorbance ratio" und den "absorbance index" (siehe unten) ausschliesst. Fig. 3 zeigt ein Chromatogramm eines Rotklee-Extraktes. Peaks 1-5 wurden mit Vergleichssubstanzen und an Hand ihrer Absorptionsspektren, die direkt während der unterbrochenen Elution mit Hilfe des LC-75-Autocontrol-Detektors erhalten wurden, identifiziert. Allerdings sagen die Absorptionsspektren über eventuelle Verunreinigungen eines Peaks wenig aus. Dies wurde aus dem Quotienten zweier Extinktionen bei verschiedenen Wellenlängen an einem Peak ermittelt und ergibt die "absorbance ratio" (Tabelle II)¹⁷. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 240, 257 und 310 nm an der auf- und absteigenden Seite des Peaks sowie auf seinem Scheitelpunkt. Der Peak ist dann nicht verunreinigt, wenn die erhaltenen Quotienten an allen drei Messpunkten wenig von einander abweichen und den Werten der Standardsubstanzen entsprechen. Dies trifft für Biochanin A und Formononetin eindeutig, für Daidzein annähernd und für Genistein und Pratensein nicht mehr zu. Allerdings muss erwähnt werden, dass konstante Extinktionsquotienten nur dann zu erhalten sind, wenn die Extinktionen nicht unter 0.05 liegen, da sonst geringe Messabweichungen bereits wesentliche Veränderungen der Quotienten bedingen. Diese Methode erlaubt es gleichzeitig zu erkennen, ob die Verunreinigung vor oder nach dem interessierenden Peak eluiert wird. Ausserdem lässt sich ermitteln, ob zwei schlecht getrennte Peaks auf einen Riss in der Säule zurückzuführen sind oder tatsächlich zwei verschiedene Substanzen bedeuten. Ein Urteil über die Trennleistung einer Säule nach längerem Gebrauch ist durch diese Technik ebenfalls möglich.

Ein weiterer Test auf verunreinigte Peaks stellt der "absorbance index"¹⁸ dar, bei dem die Extinktionen eines Peaks an zwei verschiedenen Punkten über das Absorptionsspektrum der entsprechenden Substanz z.B. aller 10 nm von 210 bis 290 nm gemessen werden. Der Quotient aus den beiden Werten sollte bei jeder Wellenlänge gleich sein bzw. nicht mehr als 2% abweichen. Das wird erreicht, wenn die Extinktionen hoch sind, diese sich bei derselben Wellenlänge durch Änderung der Konzentrationen in der Messzelle wesentlich unterscheiden, so dass daraus ein hoher Quotient resultiert (Tabelle III). Mit Eichsubstanzen lässt sich dies ohne Mühe erzielen, im Rotklee-Extrakt liegen jedoch nur Formononetin und Biochanin A in ausreichender Konzentration vor. Hingegen sind die Mengen an Daidzein, Genistein und Pratensein eindeutig zu gering, so dass das Verhältnis des Signals zum Rauschen sehr ungünstig wird. Eine starke Konzentrierung des Extraktes würde die Trennleistung der verwendeten Säule durch den grossen Anteil an Begleitstoffen übersteigen. Eine verlustlose Vorreinigung der Extrakte mit einer Sep-Pak C₁₈ Cartridge von Waters Associates ermöglicht zwar die Abtrennung der vor Daidzein eluierbaren Stoffe, vereinfacht aber das eigentliche Trennproblem nicht.

Da sich Rotklee-Extrakte in ihrer chemischen Zusammensetzung und in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden können, was sich schon oft beim Extrahieren und Filtrieren bemerkbar macht, kann die Auftrennung der Isoflavone durch HPLC in ihrer Qualität schwanken. Wegen der zahlreichen unbekanntenen und womöglich chemisch sehr ähnlichen Begleitstoffe muss damit gerechnet werden, dass eventuelle Verunreinigungen gleiche Retentionszeiten wie die interessierenden Substanzen besitzen und infolgedessen nicht von einander trennbar sind.

LITERATUR

- 1 M. Naim, B. Gestetner, S. Zilkah, Y. Birk und A. Bondi, *J. Agr. Food Chem.*, 22 (1974) 806.
- 2 M. Naim, B. Gestetner, A. Bondi und Y. Birk, *J. Agr. Food Chem.*, 24 (1976) 1174.
- 3 T. M. Siddiqui und M. Siddiqui, *Lipids*, 11 (1976) 243.
- 4 J. Sachse, *J. Chromatogr.*, 96 (1974) 123.
- 5 K. Vande Castele, H. Geiger und G. F. Van Sumere, *J. Chromatogr.*, 240 (1982) 81.
- 6 A. C. Eldridge, *J. Chromatogr.*, 234 (1982) 494.
- 7 P. A. Murphy, *J. Chromatogr.*, 211 (1981) 166.
- 8 L. G. West, P. M. Birac und D. E. Pratt, *J. Chromatogr.*, 150 (1978) 266.
- 9 R. E. Carlson und D. Dolphin, *J. Chromatogr.*, 198 (1980) 193.
- 10 A. C. Eldridge, *J. Agr. Food Chem.*, 30 (1982) 353.
- 11 A. C. Eldridge und W. F. Kwolek, *J. Agr. Food Chem.*, 31 (1983) 394.
- 12 G. F. Nicollier und A. C. Thompson, *J. Chromatogr.*, 249 (1982) 399.
- 13 J. J. Patroni, W. J. Collins und W. R. Stern, *J. Chromatogr.*, 247 (1982) 366.
- 14 S. Z. Dziedzic und J. Dick, *J. Chromatogr.*, 234 (1982) 497.
- 15 E. M. Bickoff, A. N. Booth, R. L. Lymann, A. L. Livingston, C. R. Thompson und F. DeEds, *Science*, 126 (1957) 969.
- 16 J. Guggolz, A. L. Livingston und E. M. Bickoff, *J. Agr. Food Chem.*, 9 (1961) 330.
- 17 R. Yost, J. Stoveken und W. MacLean, *J. Chromatogr.*, 134 (1977) 73.
- 18 A. F. Poile und R. D. Conlon, *J. Chromatogr.*, 204 (1981) 149.