

Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 91 (2000)

Heft: 2

Artikel: Bestimmung der Isoflavone Daidzein und Genistein in sojahlaltigen Produkten

Autor: Rupp, Heinz / Zoller, Otmar / Zimmerli, Bernhard

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-981865>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 29.03.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Bestimmung der Isoflavone Daidzein und Genistein in sojahaltigen Produkten

Heinz Rupp, Otmar Zoller und Bernhard Zimmerli, Bundesamt für Gesundheit, Sektion Lebensmittelchemie und -analytik, Bern

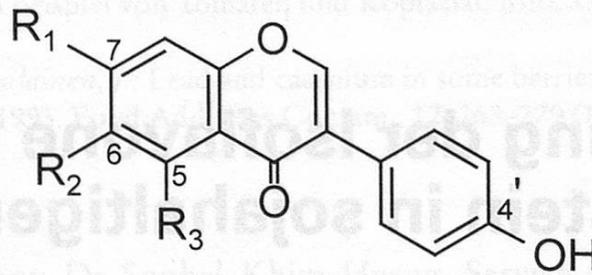
Eingegangen 11. November 1999, angenommen 2. März 2000

Einleitung

Die Gruppe der Flavonoide umfasst mehr als 4000 verschiedene Polyphenole (Aglykone), die vorwiegend an Zucker gebunden (Glykoside), in Pflanzen vorkommen und somit einen integralen Bestandteil der menschlichen Nahrung bilden. Einer hohen Zufuhr dieser teilweise biologisch aktiven Stoffe wird eine präventive Wirkung gegen verschiedene chronisch-degenerative Erkrankungen zugeschrieben (1–3). Die nur in Soja in hohen Konzentrationen vorkommenden Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein weisen in Warmblütern, je nach Konzentration und hormoneller Situation, sowohl östrogene als auch antiöstrogene Eigenschaften auf. Lupinensamen (*Lupinus albus*), enthalten diese Isoflavone ebenfalls, allerdings in etwa 20- bis 60-mal kleineren Konzentrationen als Soja (4).

Abbildung 1 gibt einen Überblick über die im Zusammenhang mit Sojaprodukten wesentlichen Isoflavone und deren β -Glykoside. In dieser Arbeit wird unter der *Totalisoflavonkonzentration* stets die *Summe der Aglykone* Daidzein und Genistein ohne Glycitein verstanden (Glycitein wurde bei unseren Untersuchungen nicht bestimmt). Diese werden anhand der freien Phenole und der Glykoside berechnet oder nach vorgängiger Hydrolyse gemessen. Da im Magen-Darm-Trakt in erster Linie die Aglykone absorbiert werden und die biologisch aktiven Spezies verkörpern (5), ist diese Definition der Totalisoflavonkonzentration auch sinnvoll. In der Literatur herrscht diesbezüglich Verwirrung, denn einige Autoren verstehen unter diesem Begriff ebenfalls die Summe der Aglykone (6), andere aber die Summe der Glykoside und Aglykone (7). *Glycitein*, das bezüglich seiner östrogenen Wirksamkeit vergleichbar ist mit Daidzein und Genistein, beträgt in Sojaprodukten zwischen 5–10 % des Gehaltes der Totalisoflavone (8).

Epidemiologische Studien an Erwachsenen deuten darauf hin, dass eine sojareiche Ernährung, wie sie in Asien üblich ist, mit der im Vergleich zu Europa (USA)



Komponenten	Summenformel	Molare Masse (g/mol)	R1	R2	R3
Daidzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,2	OH	H	H
Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,2	OH	H	OH
Glycitein	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,3	OH	OCH ₃	H
Daidzin	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	416,4	O-Glykosid	H	H
Genistin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,4	O-Glykosid	H	OH
Glycitin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446,4	O-Glykosid	OCH ₃	H
6''-O-Malonyldaidzin	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	502,4	O-Malonylglykosid	H	H
6''-O-Malonylgenistin	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	518,4	O-Malonylglykosid	H	OH
6''-O-Malonylglycitin	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	532,4	O-Malonylglykosid	OCH ₃	H
6''-O-Acetyldaidzin	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₀	458,4	O-Acetylglykosid	H	H
6''-O-Acetylgenistin	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	474,4	O-Acetylglykosid	H	OH
6''-O-Acetylglycitin	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	488,4	O-Acetylglykosid	OCH ₃	H

Abbildung 1 In Soja vorkommende Isoflavone und deren Glykoside

niedrigeren Häufigkeiten von Brust-, Eierstock-, Gebärmutter-, Darm- und Prostatakrebs sowie von Herz- und Kreislauferkrankungen, Menopausebeschwerden und Osteoporose verknüpft sein könnte (9–12). Sojaproteine werden auch in der Produktion von *Säuglingsanfangsnahrung* eingesetzt. Wird ein Säugling ausschliesslich mit solchen Produkten ernährt, führt dies zu einer täglichen Isoflavonexposition von 6–20 mg/kg Körpermasse, wie eine frühere Arbeit zeigte (13). Dies entspricht der 8- bis 25-fachen Dosis, welche bei Frauen zu einer geringen Verlängerung des Menstruationszyklus führen kann (13). Bis zum Vorliegen der Resultate wissenschaftlicher Studien bezüglich einer allfälligen Gesundheitsgefährdung wurde deshalb gefordert, dass isoflavonhaltige Säuglingsanfangsnahrung nur bei präziser medizinischer Indikation und fehlenden Ersatzprodukten eingesetzt werden sollten (13, 14). Ähnliche Forderungen wurden auch von anderen Autoren gestellt (15–19).

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung einer analytischen Methode zur Bestimmung der Isoflavone Genistein und Daidzein in sojahaltigen Lebensmitteln und deren Anwendung im Hinblick auf *Expositionsabschätzungen* schweizerischer Säuglinge und Erwachsener. Die vorgestellte Methodik soll aber auch die Voraussetzung schaffen, allfällige Schwankungen der Isoflavonkonzentrationen bei *Sojabohnen* (z.B. *genetisch veränderte*) zu erfassen und insbesondere

auch entsprechende Gehaltsbestimmungen in sogenannten «*funktionalen Lebensmitteln*» (functional foods) zu erlauben. Entsprechende Produkte mit künstlich erhöhten Isoflavonkonzentrationen werden in den USA bereits im Handel angeboten (13, 14, 20, 21).

Zur Bestimmung der Isoflavone in Soja und dessen Produkten sind insbesondere flüssigchromatographische Verfahren (HPLC) (6, 22–27) beschrieben. Dabei gelangen neben Diodenarray und UV (6) auch elektrochemische Detektoren (22) sowie für Daidzein der Fluoreszenzdetektor zum Einsatz (28). Auch die Kapillarzonen-elektrophorese gestattet die Trennung von Genistein und Daidzein von anderen Inhaltsstoffen (29). Gaschromatographische Verfahren (30, 31), die eine Derivatbildung der Aglykone erfordern, werden eher für die Untersuchung von Körperflüssigkeiten eingesetzt (32–34). Eigene Erfahrungen mit der Gaschromatographie zeigten, dass für Sojaprodukte aufwendige Vorreinigungen der Extrakte notwendig sind, um Daidzein und Genistein störungsfrei bestimmen zu können. Als Grundlage für unsere – auf der HPLC basierenden Arbeiten – dienten deshalb insbesondere die Untersuchungen von *Franke et al.* (6), *Setchell et al.* (22) und *Wang, Murphy* (23, 35), welche keine aufwendigen Reinigungsschritte benötigen.

Experimentelles

Material

Geräte

Flüssigkeits-Chromatographiesystem LC-10 mit Diodenarray-Detektor SPD-M10A mit Autosampler Sil-10A und Auswertungs-Software (Shimadzu, Vertretung: Burkard Instrumente, Geroldswil) sowie Säulenofen Pelcooler (Portman Instruments) und Degasser (OmniLab AG). Weiter wurden verwendet: pH-Meter MP120 (Mettler), Ultraschallbad Marin Elgasonic, Zentrifuge Typ Labofuge 400R (Heraeus Instruments), Zentrifugalmühle Typ ZM1 (Retsch), Gerät für die Bestimmung der Trockenmasse (Mettler LP16/PM200), Lyophilisation mit Minilyo II (Secfroid), Silikonöl Heizbad, Polytron Homogenisator (Kinematica, Luzern) und UV-Spektrophotometer Uvikon 810 (Kontron).

Chemikalien

Ethanol 96 %, hergestellt aus Ethanol 100 % (Merck 100983), Salzsäure 10 mol/l, aus Salzsäure 37 % rauchend (Merck 100317), Methanol (Merck 106007), Hexan (Merck 104367), Ammoniumacetat (Merck 1115), Ethylendiamintetraessigsäure (Merck 8417), Essigsäure konz. (Merck 100063), Daidzein (Toronto Res. Nr. D-10350 und ICN Biomedicals USA), Genistein (Fluka Nr. 91955), Daidzin (Indofine Chemical Company, Belle Mead NJ USA, No 02 - 1096), Genistin (Indofine Chemical Company, Belle Mead NJ, No 02 - 1050), Flavon (Fluka 46370), Glycitein (Apin Chemicals Ltd., England), 2,6-Di-tert.-butyl-p-kresol (BHT, Fluka

34750), Wasser: gereinigt mit ROpure ST (Umkehrosmose) und NANOpure (Ionen austauscher, Aktivkohle, Mikrofiltration), Barnstead.

Proben

Die Kindernährmittel wurden in Apotheken und Drogerien in Bern zwischen 1994–1998 eingekauft, die übrigen sojahlaltigen Lebensmittel in Lebensmittelgeschäften. Einige Muster von Zwischen- sowie ein Endprodukt erhielten wir von der vormaligen Firma Galactina Belp. Die Lecithinproben sowie die Roundup Ready® Sojabohnen wurden uns von der Sektion Mikrobiologie und Hygiene zur Verfügung gestellt. Isomil erhielten wir aus den USA. Die Proben wurden, falls nötig, im Mörser zerkleinert oder gemahlen und die Trockenmasse bestimmt. Zum besseren Vergleich mit Literaturdaten sind sämtliche Konzentrationen auf die Produkte, so wie sie dem Konsumenten angeboten werden sowie auf die Trockenmasse bezogen.

Standardlösungen

Als *Stammlösungen* für die Bestimmung der säurehydrolysierten Proben wurden je ca. 5 mg Daidzein und Genistein in 25 ml Ethanol (96 %) im Ultraschallbad gelöst. Bei 4 °C sind die Stammlösungen mindestens drei Monate haltbar. Um die gleiche Lösungsmittelmatrix zu erhalten wie die Proben, wurden die *Arbeitsstandards* im Konzentrationsbereich von etwa 4 µg/ml vor jeder Messserie mit Ethanol 96 %/HCl 10 mol/l 4:1 v/v frisch hergestellt. Die Arbeitsstandards sind bei Raumtemperatur mindestens drei Tage haltbar. Zu Beginn unserer Arbeiten wurde Flavon als interner Standard eingesetzt. Weil gelegentlich Störsignale beim Flavonpeak auftraten, wurde auf diesen internen Standard verzichtet und mit externem Standard quantifiziert.

Zur Quantifizierung nicht hydrolysierter Probenextrakte wurden Stammlösungen von Daidzin, Genistin, Daidzein und Genistein in Methanol hergestellt (ca. 100 µg/ml auf der Mikrowaage). Die Arbeitsstandards wurden mit Methanol/Wasser 4:1 v/v auf etwa 0,3–18 µg/ml (Glykoside) und 0,3–11 µg/ml (Aglykone) verdünnt.

Methoden

Aglykone nach salzsaurer Hydrolyse

Hydrolyse: 0,5–1,5 g der *Proben* (inkl. Lecithin) wurden in einem 100-ml-Rundkolben mit 50 ml des Gemisches aus vier Teilen Ethanol 96 % mit 0,05 % BHT und einem Teil Salzsäure 10 mol/l (v/v) analog der Methode von *Franke et al.* (6) versetzt und gewogen. Im Ölbad bei 90 °C wurde das Gemisch unter Rühren (Magnet) drei Stunden rückflussiert. Nach dem Abkühlen wurde der Masseverlust, der im Bereich von 0,5 g lag, mit Ethanol 96 % ergänzt. Ca. 4 ml des Gemisches wurden 10 Minuten bei rund 4000 g zentrifugiert, der Überstand in ein Vial über-

führt und davon unverzüglich 20 µl (entsprechend 0,2–0,6 mg Probe) chromatographiert.

Von *Sojaöl* wurden 5,0–7,5 g eingewogen, in 50 ml Hexan gelöst und zweimal mit je 25 ml und einmal mit 15 ml Ethanol 96 %/Nanopur Wasser 4:1 v/v extrahiert. Die vereinigten Phasen wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, der Rückstand mit 10 ml Ethanol 96 %/Salzsäure 10 mol/l 4:1 (v/v) versetzt, drei Stunden bei 90 °C Ölbadtemperatur rückflusiert, mit Ethanol 96 % allfällige Verluste ergänzt und 20 µl chromatographiert.

Glykoside und freie Aglykone

0,4–2,5 g des Untersuchungsmaterials wurden in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 25,0 ml Methanol/Wasser 4:1 (v/v) versetzt, zehn Minuten mit dem Polytron-Homogenisator auf Stufe 4 bei Raumtemperatur homogenisiert und ca. 4 ml davon 15 Minuten bei ca. 4 000 g zentrifugiert. Die Lecithinproben wurden zehn Minuten kräftig geschüttelt und ebenfalls zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Vial überführt und chromatographiert.

Chromatographie

In den beiden HPLC-Systemen (I und II) betrug der Fluss 1,0 ml/min, die Säulentemperatur 20 °C, das Einspritzvolumen 20 µl (bei Lecithinproben zum Teil nur 10 µl) und die Eluenten wurden vor dem Gebrauch durch ein Membranfilter (0,45 µm) filtriert.

Obwohl die Probelösungen und Standards in verdünnter Salzsäure gelöst chromatographiert wurden, konnten auch nach längerem Gebrauch keine Schäden am Chromatographiesystem festgestellt werden.

HPLC-System I: Aglykone

Säule: Hypersil 120 - 5 ODS (250 × 4,6 mm), (Macherey-Nagel Nr. 721 672.46) mit Vorsäule Hypersil CC 8/4, 120 - 5 ODS, (Macherey Nagel Nr. 728049.40).

Eluent A: vier Teile wässrige Lösung Ammoniumacetat 0,1 mol/l und 0,26 mmol/l Ethylendiamintetraessigsäure (mit Essigsäure konz. auf pH 4,6 gestellt) und drei Teile Methanol 100 % gemischt (v/v).

Eluent B: Methanol 100 %.

Gradient: von 0 % B auf 55 % B in 33 min, für den neuen Start innerhalb einer Minute auf 0 % B und 5 min rekonditioniert.

UV Detektion bei 260 nm, Auswertung der Peakflächen.

Der Variationskoeffizient der Peakflächen beträgt für Daidzein 2,3 % und für Genistein 0,7 %. Die Variationskoeffizienten der Retentionszeiten lagen innerhalb eines Tages, je nach Substanz, bei 0,05–0,5 % ($n = 5$).

Auswertung: Berechnung mit externem Standard, kalibriert wurde im Bereich 0,4 µg/ml bis 12 µg/ml. Dies entspricht einer Konzentration in der Probe von 20–600 µg/g.

HPLC-System II: Glykoside und freie Aglykone

Säule: refill YMC-Pack, ODS-AQ (250 × 4,0 mm) (Stagroma, Wallisellen) mit Hypersil ODS Vorsäule CC 8/4 (Macherey-Nagel).

Eluent A: 5,00 g Ammoniumacetat in 650 g H₂O + 350 ml Methanol p.a.

Eluent B: Methanol 100 %.

Gradient: 0–10 min: 0 % B, 10–45 min: 0–40 % B, 45–47 min: 40–70 % B, 5 min bei 0 % B konditioniert.

UV Detektion: 254 nm, Auswertung der Peakflächen.

Der Variationskoeffizient der Peakflächen betrug für Daidzin 0,92 %, Genistin 0,94 %, Daidzein 0,74 % und Genistein 0,92 %. Innerhalb einer Messerie (1 Tag) lagen die Variationskoeffizienten der Retentionszeiten je nach Substanz bei 0,3–1,2 % ($n = 4–15$).

Die *Retentionszeiten* der Standards in den zwei HPLC Systemen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

UV-Spektren

Bei allen analysierten Proben wurden mit dem Diodenarray Detektor die UV-Spektren der Peaks im Bereich 230–350 nm mit den entsprechenden Spektren der vorhandenen Standards verglichen. Das Absorptionsmaximum von Daidzein liegt bei 250 nm und jenes von Genistein bei 261 nm. Das Daidzeinspektrum weist im

Tabelle 1
Zusammenstellung der Retentionszeiten (Rt.)

Stoff	t_R (min)	
	HPLC-System I ¹	HPLC-System II ¹
Daidzein	12,8	34,3
Glycitein	13,0	35,2
Genistein	16,5	40,7
Coumestrol ²	20,7	–
Formononetin ²	22,6	–
Biochanin A ²	28,5	–
Flavon ³	29,4	–
Daidzin	4,5	13,2
6''-O-Malonyldaidzin ⁴	–	14,6
Genistin	6,0	21,0
6''-O-Malonylgenistin ⁴	–	22,0
6''-O-Acetyldaidzin ⁴	–	30,7
6''-O-Acetylgenistin ⁴	–	38,0

¹ Siehe unter HPLC-Bedingungen.

² Diese ebenfalls östrogen wirkenden Natur-Stoffe eluieren mit dem HPLC System I mit den angegebenen Retentionszeiten, wurden jedoch nicht näher untersucht.

³ Flavon wurde ursprünglich als interner Standard eingesetzt.

⁴ Von diesen Stoffen verfügten wir über keine Standards. Die Identifikation dieser Stoffe erfolgte mit qualitativen Hinweisen aus der Literatur (25, 38), der Aufnahmen von Spektren, sowie der Beobachtung der Spaltung von Malonylglykosiden zu den entsprechenden Glykosiden.

Gegensatz zum Genistein im Bereich von 290–310 nm ein Plateau auf. Innerhalb der Gruppen Daidzein und dessen Glykosiden sowie Genistein und dessen Glykosiden sind die Spektren fast identisch.

Nachweisgrenzen und Kalibrierung

Bei der Bestimmung der *Aglykone* in den Hydrolysaten betrug die Nachweisgrenze (3-mal Grundrauschen) für Daidzein- und für Genisteinstandards 0,5 ng. Kalibriert wurde mit Daidzein im Bereich 8,0–240 ng und mit Genistein im Bereich 8,3–248 ng.

Bei der Bestimmung der *Aglykone* und der *Glykoside* betragen die Nachweisgrenzen für Daidzin 0,8 ng (Kalibrationsbereich 23,9–358,8 ng), Genistin 1,5 ng (Kalibrationsbereich 21,8–326,6 ng) Daidzein 0,3 ng (Bereich 12,8–255,8 ng) und Genistein 0,3 ng (Bereich 12,0–240,8 ng). Die Kalibrationen waren im untersuchten Bereich linear und verliefen durch den Nullpunkt.

Resultate und Diskussion

Zwei verschiedene Vorgehensweisen werden zur Bestimmung der *Aglykone* Daidzein und Genistein angewendet. Die glykosidischen Bindungen werden entweder hydrolysiert und die *Aglykone* bestimmt oder aber die freien *Aglykone* und die *Glykoside* werden als solche bestimmt und der totale Gehalt an *Aglykon* berechnet. Den grösseren Informationsgehalt liefert das zweite Verfahren, bei dem die neun Isoflavonglykoside Daidzin, Genistin, Glycitin, 6''-O-Acetyldaidzin, 6''-O-Acetylgenistin, 6''-O-Acetylglycitin, 6''-O-Malonyldaidzin, 6''-O-Malonylgenistin, 6''-O-Malonylglycitin sowie die drei *Aglykone* Daidzein, Genistein und Glycitein gleichzeitig bestimmt werden (Abb. 1). Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass als Standardsubstanzen neben den *Aglykonen* Daidzein und Genistein nur die *Glykoside* Daidzin und Genistin kommerziell erhältlich waren. Auf die Bestimmung von Glycitein und der drei entsprechenden *Glykoside*, welche insgesamt zwischen 5 und 10 % der Totalisoflavone ausmachen (8), wurde verzichtet.

Validierungen

Reinheit der Standards

Tabelle 2 ergibt einen Überblick über die zur Abschätzung der Reinheit der verfügbaren kommerziellen Standardsubstanzen durchgeführten Messungen.

Die gemessenen molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) ergeben für Genistein und Genistin bei 254 nm höhere Werte als für Daidzein und Daidzin, was qualitativ mit den Literaturdaten übereinstimmt. Andererseits ergibt der Vergleich der gemessenen ϵ -Werte der *Aglykone* mit jenen der entsprechenden *Glykoside* für Genistein um rund 20 % höhere, für Daidzein jedoch, wie erwartet, etwa vergleichbare Werte. Gemäss Literatur sind die ϵ -Werte der jeweiligen *Glykoside* bei 254 nm um jeweils etwa 10 % höher als die der entsprechenden *Aglykone*.

Tabelle 2
Standardsubstanzen unterschiedlicher Herkunft

Nr.	Standard ¹	HPLC- Reinheit ² (%)	Molarer Extinktionskoeffizient (ϵ) (l/mol/cm)		Abwei- chung der ϵ -Werte ⁴ (%)	Reinheit ⁵ (%)
			gemessen	Literatur ³		
1	Genistein (Fluka) (> 98 %, HPLC)	100,0	37697		7,4	100
			EtOH 96 %, 263 nm	37300		
			40065 MeOH 80 %, 254 nm	MeOH 80 %, 254 nm		
2	Genistin (Indofine) (> 90 %, DC)	91,8	32347	41700	-22,4	90
			MeOH 80 %, 254 nm			
3	Genistin (Sigma) (> 99,7 %, HPLC)	99,9	33086	MeOH 80 %, 254 nm	-20,7	100
			MeOH 80 %, 254 nm			
4	Daidzein (Toronto Res.)	97,1	26693		4,5	100
			EtOH 96 %, 250 nm	26000		
			27170 MeOH 80 %, 250 nm	MeOH 80 %, 250 nm		
5	Daidzein (ICN)	100,0	27144		4,4	100
			EtOH 96 %, 250 nm			
6	Daidzin (Indofine)	91,3	27111	29000	-6,5	92
			MeOH 80 %, 254 nm	MeOH 80 %, 254 nm		

¹ In Klammern Lieferfirma sowie deren Reinheitsangabe.

² Aus den Chromatogrammen durch Division der Fläche der Komponente durch die Summe der Flächen aller sichtbaren Peaks berechnet. Daidzein und Genistein sowie die entsprechenden Verunreinigungen wurden bei nominal 260 nm bzw. Daidzin und Genistin bei 254 nm detektiert.

³ Literaturzitat (24).

⁴ Differenz zwischen gemessenem und Literaturwert, bezogen auf den Literaturwert.

⁵ Für die Berechnungen festgesetzte Reinheiten.

Die ϵ -Messwerte für den *Daidzein* Standard Nr. 4 zeigen erstens, dass sich diese für die Lösungsmittel 80 % Methanol und 96 % Ethanol nur geringfügig voneinander unterscheiden (< 2 %) und zweitens, dass diese mit jenem für den Standard Nr. 5 gut übereinstimmen (< 2 %) sowie mit der Literatur praktisch identisch sind (< 5 %). Für diese beiden Standards wurden daher, in Übereinstimmung mit den HPLC-Ergebnissen (Prozente aller sichtbaren Peaks, bezogen auf den Hauptpeak), die Reinheiten für die späteren Berechnungen auf je 100 % festgesetzt.

Der *Daidzin* Standard Nr. 6 wurde hydrolysiert und der Aglykon Peak mit Nr. 5 (als 100 %ig) gemessen. Dies ergab eine Reinheit von Nr. 6 von rund 93 %, was mit den HPLC-Reinheitsdaten von 91,3 % gut übereinstimmt.

Für das Aglykon von Genistin, *Genistein*, stand nur ein einziger Standard zur Verfügung (Nr. 1), dessen ϵ -Wert um nur 7,4 % von der Literatur abweicht. In Übereinstimmung mit den HPLC-Daten wurde dessen Reinheit als 100 % angenommen.

Die Hydrolyse von *Genistin* (Standard Nr. 2) und die Messung von *Genistein* mit Standard Nr. 1 lieferte eine Reinheit von rund 84 %. Der Flächenvergleich der chromatographischen Peaks der Standards Nr. 2 und Nr. 3 ergab andererseits für Nr. 2 eine rund 11 % geringere Reinheit als für Nr. 3. In der Folge wurden, in Übereinstimmung mit den HPLC-Daten (91,8 und 99,9 %) für die Genistinstandards Nr. 2 und Nr. 3, die Reinheiten auf 90 % und 100 % festgesetzt, trotz der unbefriedigenden Übereinstimmung der ϵ -Werte mit der Literatur.

Hydrolyse der Glykoside und Extraktion der Aglykone

Gemäss Literatur ergibt die salzsaure Hydrolyse von Sojamehl rund 13 % mehr *Daidzein* und 5 % mehr *Genistein* als die enzymatische (6). Andererseits gibt es Hinweise, dass die Aglykone in saurer Lösung zersetzt werden. Der Einfluss der *Hydrolysezeit* auf die Glykosidspaltung und die Stabilität der Aglykone wurde deshalb untersucht. Die Resultate sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Ergebnisse mit Standardlösungen der Aglykone *Daidzein* und *Genistein* deuten darauf hin, dass deren Konzentrationen mit steigender Hydrolysezeit tendenziell abnehmen, insbesondere *Genistein*. Demgegenüber zeigen die Resultate mit Sojaprodukten einen entsprechenden Effekt tendenziell nur noch für *Genistein*. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der Folge eine Hydrolysezeit von drei Stunden eingehalten. Angaben aus der Literatur (6), wonach die Konzentrationen der *Daidzein*- und *Genistein*-Standards bei drei Stunden Rückfluss um 14 % zu- bzw. 13 % abnehmen, konnten wir nicht bestätigen. Dies ist aber möglicherweise durch die in unseren Versuchen etwas geringeren Temperaturen bedingt. Die Einwaage vier verschiedener Mengen (0,1–0,8 g) einer Folgenahrung enthaltend Gemüse, Soja, Sojaprotein, Sojamehl und Sojalecithin ergab vergleichbare Resultate (VK: *Daidzein* 0,4 % und *Genistein* 1,8 %). Abbildung 2a zeigt ein typisches *Chromatogramm* einer hydrolysierten Probe.

Tabelle 3
Einfluss der Hydrolysezeiten

Hydrolyse (Stunden)	Standards ¹		Produkt A ³		Produkt B ³		Produkt C ⁴	
	Daidzein (%) ²	Genistein (%) ²	Daidzein (µg/g)	Genistein (µg/g)	Daidzein (µg/g)	Genistein (µg/g)	Daidzein (µg/g)	Genistein (µg/g)
0	100	100	–	–	–	–	–	–
1	100,6 ± 1,2	100,1 ± 1,2	236,3	365,9	50,1	128,6	19,6	33,0
2	100,0 ± 1,5	99,3 ± 1,6	243,6	367,1	50,4	129,4	19,8	34,9
3	99,7 ± 2,3	98,9 ± 1,8	246,7	365,2	50,1	128,4	21,9	33,8
4	98,4 ± 1,5	97,8 ± 1,5	246,5	357,3	49,7	126,3	23,1	33,1
N	12	12	4	4	4	4	4	4
\bar{x}^5	99,7	99,0	243,3	363,9	50,1	128,2	21,1	33,7
s ⁵	1,7	1,6	4,9	4,5	0,3	1,3	1,7	0,9
VK (%)	1,7	1,6	2,0	1,2	0,6	1,0	8,0	2,6

¹ Je 100–200 µg/50 ml Hydrolysereagens (siehe Methoden).

² relative Peakfläche zu Standard (0 Stunden), ± Standardabweichung von je 3 Ansätzen.

³ Sojahlaktose Kinder-Anfangsnahrung, zwei verschiedene Hersteller.

⁴ «Cornatur Burger» mit Soja- und Weizenproteinen.

⁵ Einheiten siehe Spalten.

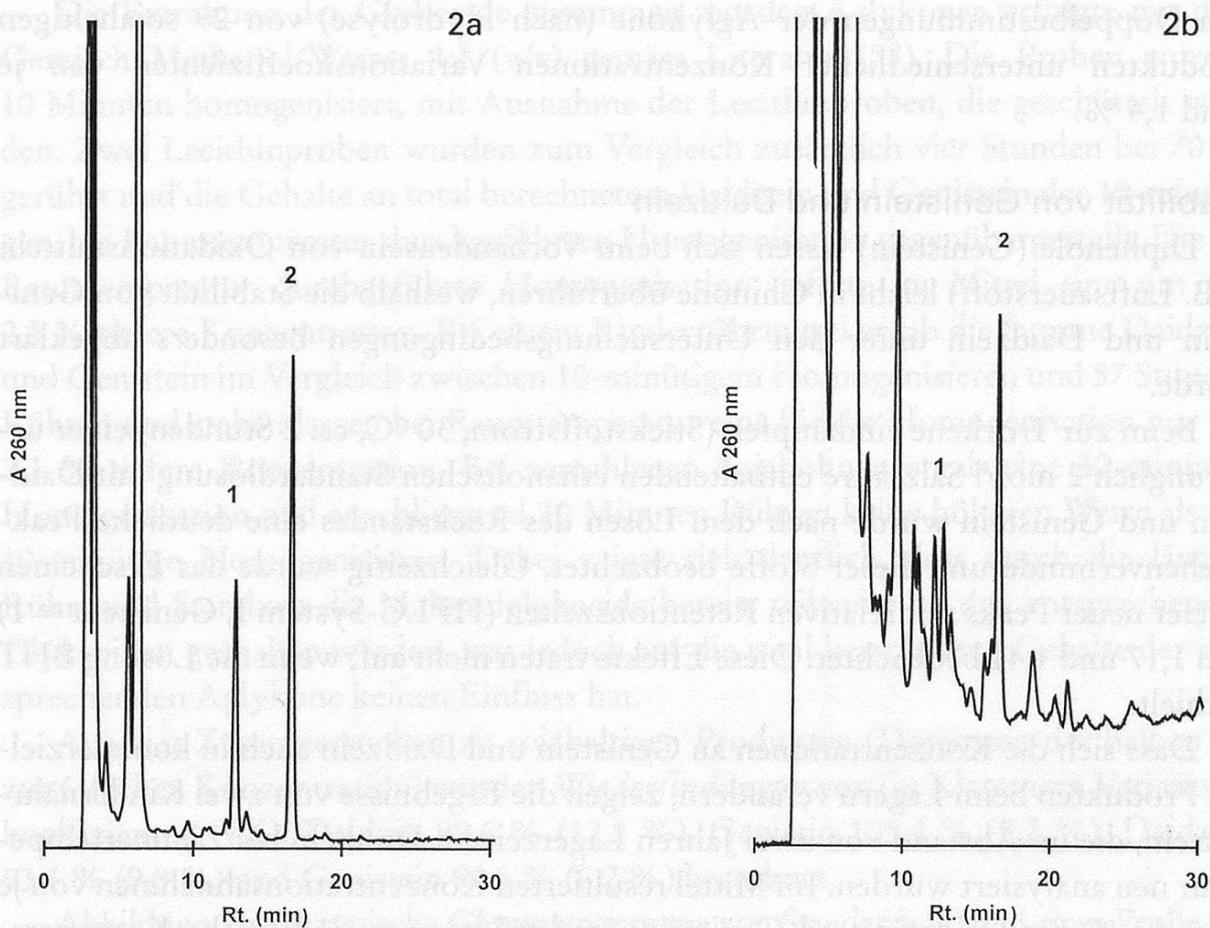


Abbildung 2 **Chromatogramm a: Kindernahrung ohne Saccharose mit Daidzein (1) und Genistein (2). Chromatogramm b: Kindernahrung mit Saccharose mit Daidzein (1) und Genistein (2)**

Die *Wiederfindung der Aglykone nach Hydrolyse* wurde anhand verschiedener kommerzieller Sojaprodukte durch Zusätze ermittelt. Diese wurden den Produkten in Form von Standardlösungen Daidzein und Genistein mittels Pipette (0,5–1,0 ml) zugegeben und das Lösungsmittel (EtOH 96 %) mit Stickstoff abgeblasen. Aus total 40 solcher Ansätze mit unterschiedlichen Isoflavonkonzentrationen der Ausgangsprodukte und Zugaben resultierten mittlere Wiederfindungen (\pm Standardabweichungen) von $101,1 \% \pm 5,1 \%$ für Daidzein und $99,5 \% \pm 4,3 \%$ für Genistein.

Beim Sojaöl ergab sich für das zugesetzte Daidzein und Genistein eine Wiederfindung von $89,7 \%$ bzw. $93,2 \%$ (Einzelversuch).

Unter *Wiederholbedingungen* wurde ein sojahaltiges Kindernährmittel (Anfangsnahrung) fünfmal innerhalb eines Tages mit folgendem Ergebnis analysiert: $50,8 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$ Daidzein und $123,6 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$ Genistein, woraus sich eine Wiederholbarkeit (95 % Vertrauensbereich) von $3,3 \mu\text{g/g}$ für Daidzein und von $2,2 \mu\text{g/g}$ für Genistein ergibt bzw. entsprechende Variationskoeffizienten von je rund 4 % resultierten. Diese entsprechen dem in der Wiederfindungsstudie der Aglykone

an 40 Proben ermittelten Wert von etwa 5 %. Demgegenüber ergaben sich aus den Doppelbestimmungen der Aglykone (nach Hydrolyse) von 29 sojahaltigen Produkten unterschiedlicher Konzentrationen Variationskoeffizienten von je rund 1,4 %.

Stabilität von Genistein und Daidzein

Diphenole (Genistein) lassen sich beim Vorhandensein von Oxidationsmitteln (z.B. Luftsauerstoff) leicht in Chinone überführen, weshalb die Stabilität von Genistein und Daidzein unter den Untersuchungsbedingungen besonders abgeklärt wurde.

Beim zur Trockene eindampfen (Stickstoffstrom, 30 °C, ca. 2 Stunden) einer ursprünglich 2 mol/l Salzsäure enthaltenden ethanolischen Standardlösung mit Daidzein und Genistein wurde nach dem Lösen des Rückstandes eine deutliche Peakflächenverminderung dieser Stoffe beobachtet. Gleichzeitig wurde das Erscheinen zweier neuer Peaks mit relativen Retentionszeiten (HPLC-System I, Genistein ≡ 1) von 1,17 und 1,41 beobachtet. Diese Effekte traten nicht auf, wenn die Lösung BHT enthielt.

Dass sich die Konzentrationen an Genistein und Daidzein auch in kommerziellen Produkten beim Lagern verändern, zeigen die Ergebnisse von zwei Kindernährmitteln, die im Abstand von zwei Jahren Lagerzeit im Dunkeln bei Zimmertemperatur neu analysiert wurden. Im Mittel resultierten Konzentrationsabnahmen von je etwa 12 % für Daidzein und Genistein. In der Literatur sind solche Konzentrationsabnahmen während der Lagerung ebenfalls beschrieben (36).

Hydrolyse kohlenhydrathaltiger Produkte

Im Laufe der Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung mittels Hydrolyse wurde bei einigen Produkten beobachtet, dass sich der Genisteinpeak bei saccharosehaltigen Produkten innerhalb vierstündiger Hydrolyse um etwa 15 % verminderte, jener von Daidzein bei zwei von drei Proben zugenommen hatte. Zudem wurden Störsignale beobachtet (Abb. 2b). Auch zeigte sich bei einer hydrolysierten Probelösung, dass nach zwei Tagen Stehenlassen die Fläche des Genisteinpeaks zunahm und sich das entsprechende UV-Spektrum änderte.

In separaten Versuchen konnte gezeigt werden, dass diese diversen Phänomene nur bei Produkten mit *Saccharose* oder *Fructose* auftraten, nicht jedoch bei solchen, die Glukose, Maltose oder Maltodextrin enthielten. Als für die beobachteten Effekte verantwortliches Agens kommt somit insbesondere Fructose in Frage. Ähnliche Beobachtungen sind auch in der Literatur beschrieben (28), wobei allerdings Fructose nicht als Verursacher eruiert wurde. In der Folge wurde auf die salzsaure Hydrolyse bei saccharosehaltigen Produkten zugunsten der Bestimmung der Glykoside und Aglykone verzichtet. Als Alternative könnte für solche Produkte die enzymatische Glykosidspaltung in Frage kommen (37).

Extraktion der Glykoside und Aglykone

Die Extraktion der Glykoside zusammen mit den Aglykonen erfolgte mit dem Gemisch Methanol/Wasser 4:1 (v/v) gemäss Literatur (38). Die Proben wurden 10 Minuten homogenisiert, mit Ausnahme der Lecithinproben, die geschüttelt wurden. Zwei Lecithinproben wurden zum Vergleich zusätzlich vier Stunden bei 70 °C gerührt und die Gehalte an total berechnetem Daidzein und Genistein der 10-minütigen, bei Raumtemperatur durchgeführten Homogenisation gegenübergestellt. Die bei Raumtemperatur durchgeführte Homogenisation lieferte im Mittel eine um nur 2,3 % tiefere Konzentration. Bei einem Kindernährmittel ergab die Summe Daidzein und Genistein im Vergleich zwischen 10-minütigem Homogenisieren und 57 Stunden Rühren und stehen lassen bei Raumtemperatur eine für die Homogenisation nur um 2,3 % tiefere Konzentration. Bei gemahlene Sojabohnen ergab eine 30-minütige Homogenisation und anschliessend 30 Minuten Rühren keine höheren Werte als das 10-minütige Homogenisieren. Dabei zeigte sich deutlich, dass durch die längere Rühr- und Standzeit die Malonylglykoside bereits teilweise zu den entsprechenden Glykosiden gespalten werden, was jedoch auf die total berechneten Gehalte der entsprechenden Aglykone keinen Einfluss hat.

Aus vier Zusatzversuchen zu sojahaltigen Produkten (Dotierung der halben bis zur 6-fachen Konzentration) wurden *Wiederfindungen* von (in Klammern Variationskoeffizienten, VK): Daidzin 99,6 % (12,2 %), Genistin 105,4 % (9,2 %), Daidzein 93,1 % (9,8 %) und Genistein 94,5 % (6,2 %) berechnet.

Abbildung 3 zeigt typische *Chromatogramme* von Standards (a) und einer Probe (b). Für die Auswertung und Identifikation der Stoffe 6"-O-Malonyldaidzin, 6"-O-Malonylgenistin, 6"-O-Acetyldaidzin und 6"-O-Acetylgenistin, von denen wir keine Standards zur Verfügung hatten, wurden qualitative Hinweise aus der Literatur (25, 38) sowie die Spektren beigezogen. Für die Quantifizierung der Malonyl- und Acetylglykoside wurden die Kalibrationen der entsprechenden Glykoside Daidzin und Genistin verwendet (Annahme gleiche UV-Empfindlichkeit und Korrektur mit Molekularmasse).

Ziel dieser Teilarbeit war nicht die optimale Trennung der 12 Isoflavone (Abb. 1), sondern die Überprüfung der Resultate, die durch die salzsaure Hydrolyse erhalten wurden. Eine vollständigere Trennung der Isoflavone wurde kürzlich mit dem Trennsystem YMC-pack ODS-AM-303 Säule und linearem Gradient mit den Eluenten 0,1 % Essigsäure in Wasser und 0,1 % Essigsäure in Acetonitril beschrieben (27).

Methodenvergleich

26 sojahaltige Produkte (ohne Saccharose) wurden sowohl nach dem Hydrolyseverfahren (Aglykone), wie auch mit dem Verfahren ohne Hydrolyse (Glykoside und Aglykone) untersucht. Die Ergebnisse (Anhang 1) der gemessenen (x) und berechneten (y) Aglykonkonzentrationen wurden einander gegenübergestellt ($y = a + bx$). Die entsprechenden Achsenabschnitte (a) waren nicht von Null verschieden ($p > 0,1$). Die entsprechenden Steigungen (b) sind hingegen für Daidzein mit $0,918 \pm 0,009$ signifikant tiefer ($p \ll 0,001$) und für Genistein mit $1,028 \pm 0,009$ grösser als Eins ($0,01 >$

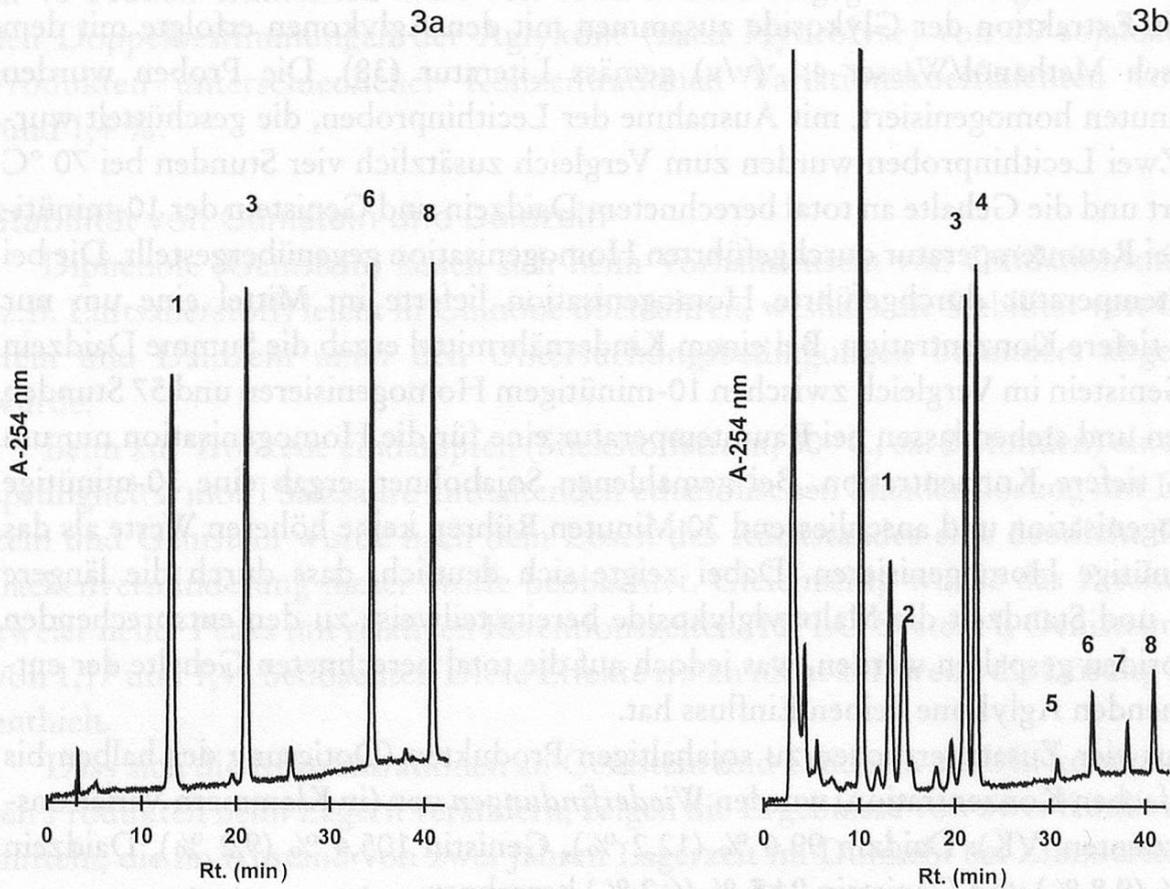


Abbildung 3 **Chromatogramm a: Standard mit Daidzein (1), Genistein (3), Daidzein (6), Genistein (8). Chromatogramm b: Extrakt Kindernährmittel mit Daidzein (1), 6''-O-Malonyldaidzin (2), Genistein (3), 6''-O-Malonylgenistein (4), 6''-O-Acetyldaidzin (5), Daidzein (6), 6''-O-Acetylgenistein (7), Genistein (8)**

Tabelle 4
Gehalt an «Daidzein» und «Genistein» bei der Hydrolyse von drei saccharosehaltigen Produkten E, F, G

Hydrolyse (Stunden)	«Daidzein» (µg/g)			«Genistein» (µg/g)		
	E	F	G	E	F	G
1	134,9	190,4	25	278,3	231,5	102,5
2	139,9	196,4	30	261,4	225	98,8
3	136,9	193,9	38,5	237	211,8	95
4	145,6	189,4	38,4	222,4	201,9	85

$p > 0,001$). Somit sind die Daidzeinwerte, die aus den Glykosiden und Aglykonen berechnet wurden, um 8,2 % tiefer und die Genisteinwerte um 2,8 % höher als die mittels Hydrolyse erhaltenen Werte. In Anbetracht der Unsicherheit der verfügbaren Standards (Tabelle 2) sowie den getroffenen Annahmen zur Auswertung der Glykoside, von welchen keine Standards vorhanden waren, kann dieses Ergebnis als akzeptabel eingestuft werden.

Anwendungen

Sojaprodukte des Schweizer Marktes

Die Analysenergebnisse der nach Hydrolyse untersuchten 52 Proben sind in den Tabellen 5a und 5b zusammengestellt. In der Regel handelt es sich um die Mittelwerte von Doppelbestimmungen. *Sojabohnen* ergaben Totalisoflavongehalte im Bereich von rund 1020–2500 µg/g Trockenmasse. Bei Vergleichen mit Gehaltsangaben aus der Literatur wurde in der Regel Glycitein nicht dazugerechnet. In der Literatur variiert der Gehalt zwischen 241 µg/g und 2389 µg/g, wobei die Konzentrationen zwischen 400 µg/g und 2400 µg/g etwa homogen verteilt sind (39). Die gentechnisch veränderte Sorte Roundup Ready® lag ebenfalls im Bereich der übrigen drei Sojabohnensorten (Tabelle 5a). Für *Sojamehl* tendierte der Daidzeingehalt von 1350 µg/g (Literatur 226–742 µg/g) zu höheren Werten, während der Genisteingehalt (1013 µg/g) im Rahmen anderer Untersuchungen (478–1123 µg/g) lag (39). Die zwei von uns untersuchten *Sojaisolate* ergaben in einem Fall eine um etwa 30 % höhere Konzentration Totalisoflavone (1646 µg/g), während das andere Produkt mit 941 µg/g im Konzentrationsbereich von Literaturangaben (25) lag. Die Ergebnisse der Totalisoflavongehalte für Tofu und Miso lagen im Bereich der Literaturangaben (39). Die untersuchte Tofumischung (Trockenpulver) ergab einen Totalisoflavongehalt von 2400 µg/g.

Ein Kochversuch (10 min in siedendem Wasser gekocht) mit sojahaltigen Spaghetti mit kleinem Totalisoflavongehalt (94,8 µg/g, Tabelle 5a) ergab, dass davon schätzungsweise 20 % ins Kochwasser übergehen.

Lecithin und Öl

Bei den vier von uns untersuchten *Lecithinen* Chocotop 320, Flüssiglecithin (Lukas Meyer GmbH, Hamburg), Sternprime N-10 und Sterncithin F-10 lag der Mittelwert für Daidzein bei 103,1 µg/g (Bereich 37,9–258,8 µg/g) und für Genistein bei 97,3 µg/g (Bereich 38,7–188,5 µg/g), wobei Chocotop 320 drei- bis fünfmal höhere Gehalte aufwies als die anderen drei Produkte. Für Lecithin konnten in der Literatur keine Werte gefunden werden.

Während bei einer anderen Untersuchung (24) in *Sojaöl* keine Isoflavone gefunden werden konnten, fanden wir bei einem gekauften und einem in unseren Laboratorien kalt gepressten Öl geringe Mengen zwischen 0,2–4,2 µg/g Totalisoflavone; bei einem dritten Sojaöl lag die Konzentration unter 0,1 µg/g.

Kindernährmittel

Bei den sojahaltigen Kindernährmitteln, die zwischen 1995 und 1997 in der Schweiz gekauft wurden, variiert die Totalisoflavonkonzentration zwischen 180 und 1171 µg/g Pulver. Für die Konzentrationen der drei im Schweizer Handel (1997) erhältlichen *Säuglingsanfangsnahrungen* errechnet sich ein Mittelwert an Totalisoflavonen von 331 µg/g Pulver (180, 200 und 614 µg/g). Dieser Mittelwert ist

Tabelle 5a

Isoflavone in sojahaltigen Produkten des Schweizer Marktes (nach Hydrolyse)

Produkte	TM ¹ (g/100 g)	Daidzein ² (µg/g)	Genistein ² (µg/g)	Total ² (µg/g)	Total pro TM (µg/g)
<i>Sojabohnen-Mehl-Schrot</i>					
Sojabohnen (Rapunzel, USA)	93,5	1026	1201	2227	2382
Sojabohnen (Biona)	94,8	433,8	531,9	966	1019
Sojabohnen (Morga)	98,2	788,7	826,8	1616	1646
Sojabohnen (Roundup Ready [®])	92,1	777	1091	1868	2028
Sojabohnen (Galactina), gemahlen	93,3	606,1	1045	1651	1770
Vollsojamehl (Morga)	94,5	1350	1013	2363	2500
Sojaflocken (Migros)	98,5	733,6	1193	1927	1956
<i>Sojaproteinisolate</i>					
Sojaproteinisolat (Supro [®])	94,4	539,6	1106	1646	1744
Sojaproteinisolat (Ardex [®])	92,2	282,2	659	941	1021
<i>Joghurt</i>					
Joghurt «Soyana»	34,6	115,8	141,6	257	743
Joghurt «Bifisoy»	27,3	116,3	188,1	304	1114
<i>Fleischersatz Produkte</i>					
Tempeh geräuchert ⁴	32,5	50	110,6	161	495
Tofu Medaillons ⁴	39,4	302,6	393,4	696	1766
Tofu Aufschnitt ⁴	55,3	33,7	53,9	87,6	158
Veget. Cevapcici ⁴	50,1	25,4	34,4	59,8	119
Veget. Schinken ⁴	50,5	24,4	39,7	64,1	127
Cornatur Burger ⁴	48,0	15,8	30,1	45,9	96
Tofu Burger ⁴	43,8	62,1	101,2	154	352
Veget. Bratwurst ⁴	46,1	⁻⁵	4,3	4,3	–
Peach Braten ⁴	47,6	12,7	22,7	35,4	74
Cornatur Burger (Migros)	54,7	23,1	34,9	58	106
Tofu frisch	27,6	73	111,9	185	670
Tofu frisch (Migros)	30,0	119,3	196,8	316	1053
Tofumischung (Pulver zum Anrühren)	96,6	1028	1405	2433	2519
<i>Verschiedene</i>					
Yasoya nature (1998)	40,7	279,7	444,9	725	1781
Yasoya nature (1997)	44,8	260,2	453,7	714	1594
Soja Spaghetti, roh (Morga)	91,8	36,4	58,4	94,8	103
Flüssiglecithin (Firma A)	–	50,7	38,7	89,4	–
Lecithin Chocotop 320 (Firma A)	–	258,8	188,5	447	–
Lecithin Sternprime N-10 (Firma B)	–	37,9	75,5	113	–
Sterncithin F-10 (Firma B)	–	64,8	86,6	151	–
Miso, Sojapaste mit Vollreis	49,6	191,9	275,1	467	942
Soja-Drink grano vita	8,1	12,5	27,2	39,7	490
Soja Instant Drink Pulver ³	97,5	134,6	189,8	324	332
Sojaöl (l'Olivier)	–	<0,03	0,06	<0,09	–
Sojaöl (kalt gepresst) ⁶	–	0,06	0,13	0,19	–
Sojaöl (Morga)	–	0,83	3,39	4,2	–

¹ Trockenmasse.² Konzentrationen bezogen auf frisches Handelsprodukt (Frischmasse).³ Enthält Saccharose, deshalb ohne Hydrolyse mit HPLC-System II analysiert und Konzentration an Daidzein und Genistein berechnet.⁴ Lyophilisat analysiert, Konzentrationen auf Frischmasse umgerechnet.⁵ Nicht bestimmt.⁶ Von uns im Labor gewonnen.

Tabelle 5b

Sojahaltige Kindernährmittel des Schweizer Marktes (nach Hydrolyse)

Produkt, Einkaufsjahr, Einnahmealter	TM ¹ (g/100 g)	Daidzein ² (µg/g)	Genistein ² (µg/g)	Total ² (µg/g)
<i>Anfangsnahrung</i>				
Mamina Soja Vegetabile Anfangsnahrung, 1997	94,7	246,7	367,1	614
Mamina Soja Vegetabile Anfangsnahrung, 1995	94,3	457,5	589,9	1047
Mamina Soja Vegetabile Anfangsnahrung, 1995	95,4	352,6	388,3	741
Bébédor Soja, 1997	98,5	58,4	141,5	200
Milupa SOM, 1995	95,4	89,9	191,4	281
Milupa SOM, 1997	97,2	50,4	129,4	180
Humana SL, 1995	96,6	88,7	199,9	289
Isomil ³ , 1996, USA (selbst importiert)	96,1	27,4	73,8	101
<i>Folge- und Zusatznahrung</i>				
Mamina Soja Junior, 1997, nach 7 Monaten	96,2	348,5	550,2	899
Mamina Soja Junior, 1995, nach 7 Monaten	95,7	442,2	520,3	963
Mamina Soja Légumes, 1997, nach 4 Monaten	96,6	500,4	670,3	1171
Mamina Soja Légumes, 1995, nach 4 Monaten	95,7	260,3	447,7	708
Milupa Mehrkornbrei, 1995, ab 3 Monaten	94,2	106,5	217,7	324
Hosana, 1997, Schoppenzusatz, ab 1 Monat	92,2	93,5	148,6	242
Mamina Soja Früchtebrei ³ , 1995, nach 5 Monaten	95,6	123,9	278,2	402
Mamina Soja Vollkornbrei ³ , 1995, nach 5 Monaten	96,2	184,3	222,4	407

¹ Trockenmasse.² Konzentration bezogen auf «Pulver».³ Enthält Saccharose, deshalb ohne Hydrolyse mit HPLC-System II analysiert und Konzentration an Daidzein und Genistein berechnet.

höher als der für neuseeländische (127–147 µg/g) und amerikanische (214–267 µg/g Daidzein, Genistein und Glycitein) Produkte (15, 25). Bei zwei gleichen Produkten schweizerischer Anfangsnahrung lagen die Konzentrationen der Totalisoflavone 1997 um 17–41 % tiefer als 1995. Beim Isomil (aus USA), das ohne Hydrolyse analysiert wurde, fanden wir mit 101,2 µg/g im Vergleich zu zwei anderen Studien (25, 40) rund 45 % weniger Totalisoflavone. Bei zwei *Folgenahrungen*, die ab dem fünften und achten Monat empfohlen werden, lagen die Totalisoflavonkonzentrationen mit 708–1171 µg deutlich höher. Im Gegensatz zu den amerikanischen Produkten, die meistens nur Sojaisolat (zwischen 14,6 und 21 %) als Isoflavonlieferant enthalten, sind gemäss Deklaration in einigen von uns untersuchten Produkten, insbesondere bei Produkten mit höheren Isoflavonkonzentrationen, mehrere verschiedene Zusätze wie Soja, Sojaeiweiss, Sojamehl und Sojalecithin enthalten. Bei drei weiteren sojahaltigen Folgenahrungen (Früchtebrei, Vollkornbrei und Mehrkorn) lagen die Totalisoflavonkonzentrationen zwischen 320 und 400 µg/g.

Glykoside und Aglykone

Aus den Resultaten zu den Glykosid- und Aglykonbestimmungen (Anhang 2) ergeben sich weitere Erkenntnisse. Die beiden *Sojabohnensorten* Rapunzel und Bi-

ona sowie die beiden sojahaltigen Joghurts enthalten wenig Acetylglykoside, dafür relativ viel thermolabile Malonylglykoside, was darauf deutet, dass diese Produkte thermisch wenig belastet wurden. Bei der Sojabohne von Morga ist der Gehalt an Acetylglykosid mit 111,2 µg/g 6"-O-Acetyldaidzin und 130,5 µg/g 6"-O-Acetylgenistin relativ hoch, im Vergleich zu den Sojabohnen Biona und Rapunzel sowie der Literatur, wo für die Acetylderivate von Daidzin und Genistin Konzentrationen < 9 µg/g gefunden wurden (23, 35). Beim Sojamehl, ebenfalls von Morga, ist der Gehalt an Acetylglykosid (Acetyldaidzin 523,8 µg/g und Acetylgenistin 443,2 µg/g) noch höher.

Sojamehl und *Sojaschrot* zeigten ein ähnliches Profil, wenig «freies» Aglykon (< 5 %) und ein Verhältnis Malonylglykosid zu Glykosid von 0,47–0,59 sowie relativ viel Acetylglykoside. Dies könnte ein Hinweis auf eine ähnliche Behandlung bei der Produktion sein. Lecithin, welches wahrscheinlich bei der Isolation thermisch beansprucht wird, enthält praktisch keine Malonylglykoside, dafür relativ viel Acetylglykoside sowie «freies» Aglykon. Bei 27 Produkten variierte das Konzentrationsverhältnis 6"-O-Malonyldaidzin zu Daidzin zwischen 0,05 und 3,7 und der Faktor 6"-O-Malonylgenistin zu Genistin bei 30 Produkten zwischen 0,1 und 3,9. Diese Verhältnisse können Aufschlüsse über die Behandlung bei der Produktion oder bei unbehandelten Sojabohnen über die Herkunft der Varietät geben (35). Bei den untersuchten Sojabohnen war die 6"-O-Malonylgenistin Konzentration von den acht quantifizierten Isoflavonen in Übereinstimmung mit der Literatur (23) jeweils die höchste Konzentration, was ebenfalls bei zwei Drittel der 30 untersuchten Produkten der Fall war.

Der prozentuale Anteil an «freiem» Aglykon vom total berechneten Aglykongehalt (Anhang 2) beträgt für die vier Produkte Sojabohnen (3 Sorten), Sojaschrot, Vollsojamehl und Sojaflocken für Daidzein im Mittel 2,8 % (Bereich 0,7–4,3 %) und für Genistein 2,1 % (Bereich 0,4–4,3 %). Am höchsten sind die «freien» Aglykongehalte beim Lecithin (37,2–41,5 %), dem Sojaisolat Ardex (30,5–42,4 %), bei den Spaghetti und dem Soja Instant Drink Pulver (Bereich 30,5–79,6 %). Bei den 13 untersuchten Kindernährmitteln liegt der «freie» Aglykongehalt für Daidzein im Mittel bei 12,4 % (Bereich 6,2 %–24 %) und beim Genistein bei 8,8 % (Bereich 4,4 %–18,3 %). Entsprechende Anteile freie Aglykone (Daidzein 5,9–17,1 % und Genistein 5,4–11,1 %) wurden auch bei anderen Untersuchungen von Kindernährmitteln gefunden (25).

Abschätzung der täglichen Zufuhr

Säuglinge und Kleinkinder

Ausgehend von den aktuellsten Resultaten der drei 1997 im Schweizer Handel erhältlichen Säuglingsanfangsnahrungen ergibt sich unter Berücksichtigung der Dosierungsangaben auf den Packungen für die ersten 4–5 Lebensmonate eine durchschnittliche tägliche Zufuhr von Totalisoflavonen von 7,1 mg pro kg Körpermasse

(KM) bzw. 3,4, 4,5 und 13,5 mg/kg KM/Tag. Bei einem 1995 gekauften Produkt ergab sich demgegenüber eine tägliche Zufuhr von 20 mg/kg KM/Tag (13).

Anhand von Literaturdaten aus den USA ergibt sich nach Umrechnung auf die Summe der Aglykone, Daidzein und Genistein für zwei Pulvernahrungen eine tägliche Zufuhr zwischen 3,3 und 7,3 mg/kg KM sowie für drei Flüssigprodukte eine solche zwischen 2,2 und 7,6 mg/kg KM (7). Diese Werte liegen etwas höher als in entsprechenden Untersuchungen aus Neuseeland, wo eine mittlere tägliche Zufuhr von 3,2 mg/kg KM berechnet wurde (15). In einer englischen Studie wurde eine tägliche Zufuhr von 5,0 mg Isoflavonen (inkl. Glycitein) für 1- bis 2-monatige und von 4,5 mg für 4- bis 6-monatige Säuglinge pro kg KM erhalten (40).

Daneben ermittelten wir für zwei, ebenfalls 1997 eingekaufte *Folgenahrungen* (ab dem fünften und achten Monat) tägliche Zufuhren an Totalisoflavonen von je maximal 20 mg/kg KM.

Erwachsene

Gemäss der Aussenhandelsstatistik (korrigiert für Exporte) wurden zwischen 1995–97 in der Schweiz nur rund 3 % der importierten Sojabohnen zur Herstellung von Nahrungsmitteln verwendet. Der Rest diente vor allem als Futtermittel und zur Ölgewinnung (Margarine). Um für die Schweiz eine Zufuhr für Isoflavone abzuschätzen, wurden für die Jahre 1995 bis 1997 die Differenzen aus Import und Export von Sojabohnen und Sojamehl für die Lebensmittelherstellung herangezogen (41).

Daraus errechnete sich eine tägliche Pro-Kopf-Verzehrmenge an Sojabohnen und Sojamehl von 1,05 Gramm, was mit der mittleren Totalisoflavonkonzentration von 1,6 mg/g zu einer täglichen Pro-Kopf-Zufuhr von 1,7 mg führt, entsprechend etwa 0,03 mg/kg KM für Erwachsene. In den USA wurde demgegenüber der tägliche Konsum an Sojabohnen im Jahre 1991 auf 7,5 g und 1996 auf 11,2 g geschätzt (42), was mit einer Totalisoflavonkonzentration von wiederum 1,6 mg/g zu einer täglichen Pro-Kopf-Zufuhr von 12–18 mg führt. Asiaten konsumieren umgerechnet schätzungsweise zwischen 10–55 mg Totalisoflavone (24, 43), d.h. im Vergleich zur Schweiz im Mittel rund 6- bis 30-mal mehr.

Es gilt zu berücksichtigen, dass bei unserer Berechnung importierte sojahaltige Produkte wie Miso, Tofu usw., deren Mengen allerdings gering sein dürften, nicht berücksichtigt werden konnten, weil diese Produkte in der Aussenhandelsstatistik nicht enthalten sind (41).

Zusammenfassung

Es wird eine auf der RP-HPLC mit UV Detektion basierende Methode zur Bestimmung der Isoflavone Daidzein und Genistein (Aglykone) beschrieben und validiert. Die Aglykone sowie die Glykoside werden entweder als solche oder nach salzsaurer Hydrolyse bestimmt. Die Resultate der beiden Verfahren wurden einander gegenübergestellt, wobei sich eine zufriedenstellende Übereinstimmung ergab. Die salzsaure Hydrolyse ist für saccharose- und fructosehaltige Produkte nicht ge-

eignet. 52 aus Soja gewonnene Produkte des Schweizer Marktes wurden untersucht. Daidzein wurde in Konzentrationen von $< 0,03 \mu\text{g/g}$ (Sojaöl) bis $1028 \mu\text{g/g}$ (Tofumischung, Pulver) gefunden, während Genistein von $0,06 \mu\text{g/g}$ (Sojaöl) bis $1405 \mu\text{g/g}$ (Tofumischung, Pulver) variiert. Für die Schweizer Bevölkerung wurde eine mittlere tägliche Pro-Kopf-Zufuhr von $1,7 \text{ mg}$ Totalisoflavone geschätzt. Bei Säuglingen beträgt die tägliche Zufuhr für drei in der Schweiz erhältliche sojahaltige Anfangsnahrungen $3\text{--}13 \text{ mg/kg KM}$ und bis zu maximal 20 mg/kg KM für je zwei Folgenahrungen, die ab dem fünften und achten Monat empfohlen werden.

Résumé

Une méthode par RP-HPLC et détection UV pour la détermination des isoflavones daidzéine et génistéine est décrite et validée. Les glycosides sont analysés tels quels ou après hydrolyse par acide chlorhydrique. Les deux méthodes ont été comparées et les résultats sont satisfaisants. L'hydrolyse par acide chlorhydrique n'est pas appropriée pour les produits contenant du saccharose ou du fructose. Entre 1995 et 1998, des analyses de daidzéine et génistéine ont été effectuées sur 52 produits à base de soja, provenant du marché suisse. La daidzéine a été trouvée en concentration de $< 0,03 \mu\text{g/g}$ (huile de soja) à $1028 \mu\text{g/g}$ (mélange de tofu en poudres), et la génistéine varie de $0,06 \mu\text{g/g}$ (huile de soja) à $1405 \mu\text{g/g}$ (mélange de tofu en poudres). L'apport moyen journalier suisse est de $1,7 \text{ mg}$ de isoflavones total par habitant. L'apport journalier suisse pour les nourrissons, calculé à partir de trois sortes de poudres à base de soja pour le premier âge, est de $3\text{--}13 \text{ mg/kg}$ de masse corporelle. Celle, calculé à partir de deux sortes de poudres de lait de suite, recommandées du 5^e au 8^e mois, est de maximum 20 mg/kg de masse corporelle.

Summary «Determination of the Isoflavones Daidzein and Genistein in Soy Containing Products»

A method based on RP-HPLC with UV detection for the determination of the isoflavones daidzein and genistein (aglycones) is described and validated. The glycosides and aglycones are analyzed as such or after acid hydrolyses. The results of the two procedures were in acceptable agreement. However, if the products contain saccharose or fructose the procedure based on an acid hydrolysis is unsuitable. 52 soy-containing products from the Swiss market were analyzed. Daidzein was found in concentrations of $< 0,03 \mu\text{g/g}$ (soybean oil) to $1028 \mu\text{g/g}$ (tofu mixtures, powder) while genistein varied from $0,06 \mu\text{g/g}$ (soybean oil) to $1405 \mu\text{g/g}$ (tofu mixtures, powder). The mean per capita Swiss daily intake was estimated at $1,7 \text{ mg}$ total isoflavones. For infants of less than five month the daily intake, based on three different products was in the range of $3\text{--}13 \text{ mg/kg}$ body mass and up to a maximum, of 20 mg/kg body mass for two products recommended for ages over five months.

Key words

Isoflavones, Daidzein, Genistein, Soy-based products, Switzerland

Anhang 1

Vergleich der Resultate zwischen hydrolysierten und nicht hydrolysierten Proben

Produkt	Daidzein hydrolysiert (µg/g)	Daidzein berechnet (µg/g)	Differenz zur hydrolyse ¹ (%)	Genistein hydrolysiert (µg/g)	Genistein berechnet (µg/g)	Differenz zur hydrolyse (%)
Mamina Soja Vegetabile Anfangsnahrung 1997	246,7	250,0	1,3	367,1	383,7	4,5
Mamina Soja Légumes 1995	260,3	271,3	4,2	447,7	520,4	16,2
Mamina Soja Légumes 1997	500,4	469,9	- 6,1	670,3	659,4	-1,6
Mamina Soja Junior 1995	442,2	464,5	5,0	520,3	568,6	9,3
Mamina Soja Junior 1997	348,5	336,0	- 3,6	550,2	549,1	-0,2
Milupa SOM 1995	89,9	84,4	- 6,1	191,5	197,1	2,9
Milupa Mehrkorn 1995	106,5	98,9	- 7,1	217,7	197,7	-9,2
Humana SL	88,7	78,9	-11,0	199,9	181,3	-9,3
Bébédor Soja	58,4	57,0	- 2,4	141,5	136,0	-3,9
Hosana Schoppenzusatz	93,5	82,2	-12,1	148,6	137,7	-7,3
Sojabohnen Rapunzel	1026	926,3	- 9,7	1201	1247	3,8
Sojabohnen Morga	788,7	714,0	- 9,5	826,8	855,2	3,4
Sojabohnen Biona	433,8	439,0	1,2	531,9	548,7	3,2
Tofumischung	1028	975,1	- 5,1	1405	1464	4,2
Vollsojamehl	1350	1187	-12,1	1013	1066	5,2
Sojaproteinisolat Supro®	539,6	484,3	-10,2	1106	1084	-2,0
Sojaproteinisolat Ardex®	282,2	232,7	-17,5	659,0	623,3	-5,4
Sojaschrot gemahlen	606,1	537,4	-11,3	1045	1030	-1,4
Sojaflocken	733,6	695,6	- 5,2	1193	1295	8,5
Cornatur Burger	23,1	18,9	-18,2	34,9	35,4	1,4
Soja Spaghetti roh gemahlen	6,4	gestört	-	58,4	53,3	-8,7
Yasoya nature	260,2	226,1	-13,1	453,7	417,4	-8,0
Bifisoy Yoghurt	116,3	127,8	9,9	188,1	221,2	17,7
Soyana Yoghurt	115,8	124,0	7,1	141,6	171,0	20,8
Lecithin Chocotop	258,8	234,7	- 9,3	188,5	186,8	-0,9
Flüssiglecithin	50,7	44,2	-12,8	38,7	38,9	0,5

¹(berechnet-hydrolysiert)/hydrolysiert.

Anhang 2

Resultate Isoflavonbestimmung ohne Hydrolyse sowie Berechnung der Summe der Aglykone Daidzein und Genistein¹

Produkt	Daidzin (µg/g)	MD ² (µg/g)	AD ³ (µg/g)	Daidzein (µg/g)	Total Daidzein (µg/g)	Genistin (µg/g)	MG ⁴ (µg/g)	AG ⁵ (µg/g)	Genistein (µg/g)	Total Genistein (µg/g)
<i>Sojabohnen, -mehl, -schrot, -flocken</i>										
Sojabohnen «Biona»	173,5	642,6	8,9	2,9	439,0	204,2	792,4	9,8	2,4	548,7
Sojabohnen «Morga»	516,0	640,6	111,2	13,1	714,0	564,5	801,1	130,5	10,4	855,2
Sojabohnen «Rapunzel»	479,0	1187	6,7	29,4	926,3	626,0	1580	9,5	26,7	1247
Sojaflocken	530,5	558,0	113,3	26,5	695,6	44,9	1063	212,5	28,7	1295
Sojaschrot gemahlen	539,2	287,5	84,8	15,6	537,4	979,7	582,1	163,3	21,4	1030
Vollsojamehl Morga	1001	466,4	523,8	49,0	1187	834,7	471,9	443,2	45,5	1066
<i>Sojaproteinisolate</i>										
Sojaproteinisolat Ardex [®]	94,7	137,4	11,9	98,7	232,7	261,8	467,3	46,1	189,8	623,3
Sojaproteinisolat Supro [®]	272,3	432,4	59,4	66,3	484,3	558,2	1057	147,2	100,0	1084
<i>Yoghurt</i>										
Yoghurt «Bifisoy»	102,4	108,1	<2,4	9,2	127,8	160,9	193,7	<0,6	19,4	221,3
Yoghurt «Soyana»	86,4	138,6	0,6	0,75	124,0	117,7	184,1	0,5	1,2	171,0
<i>Verschiedene Produkte</i>										
Cornatur Burger	13,1	8,9	4,9	3,7	18,9	23,8	21,4	7,3	5,2	35,4
Flüssiglecithin	19,8	<1,4	26,5	16,7	44,2	15,0	3,2	23,0	14,8	38,9
Lecithin Chocotop	96,1	<1,4	158,7	87,3	234,7	60,3	11,3	114,8	77,2	186,2
Soja Instant Drink Pulver	35,6	68,7	2,4	76,8	134,7	67,5	124,8	4,8	79,8	189,8
Soja Spaghetti roh gemahlen	8,6	-6	<2,4	25,9	>32,5	9,4	13,1	0,7	40,2	53,3
Tofumischung	465,5	1218	50,7	46,2	975,1	692,4	1796	81,0	48,7	1464
Yasoya nature	169,0	212,1	10,8	9,6	226,1	297,2	397,7	22,5	11,5	417,4
<i>Kindernahrungen</i>										
Bébédor Soja	52,3	25,0	8,7	7,6	57,0	115,6	72,9	22,9	12,7	136,0
Hosana (Schoppenzusatz)	86,3	4,1	28,1	11,8	82,2	140,7	12,8	52,3	13,3	137,7
Humana SL	65,4	47,8	7,6	10,6	78,9	148,5	114,4	21,3	16,7	181,3
Isomil	21,3	16,9	6,3	2,2	27,3	57,4	45,0	19,1	3,6	73,8
Mamina Soja Früchtebrei	77,7	115,4	8,2	13,5	123,9	173,2	257,2	20,5	24,2	278,2

Produkt	Daidzin (µg/g)	MD ² (µg/g)	AD ³ (µg/g)	Daidzein (µg/g)	Total Daidzein (µg/g)	Genistin (µg/g)	MG ⁴ (µg/g)	AG ⁵ (µg/g)	Genistein (µg/g)	Total Genistein (µg/g)
Mamina Soja Junior 1995	304,4	410,3	28,0	55,5	464,5	360,6	511,0	43,4	52,1	568,6
Mamina Soja Junior 1997	243,0	275,4	15,6	39,6	336,0	383,9	466,5	31,4	48,1	549,1
Mamina Soja Légumes 1995	159,1	241,4	12,2	45,2	271,3	303,9	472,4	35,0	64,3	520,4
Mamina Soja Légumes 1997	313,4	313,8	12,4	112,9	469,9	435,2	489,6	20,6	120,4	659,4
Mamina Soja Veg. Anfangsnahrung 97	163,3	253,1	12,2	15,4	250,0	231,7	403,2	20,6	17,0	383,7
Mamina Soja Vollkornbrot	117,4	175,2	11,5	17,6	184,3	138,6	215,4	16,0	14,3	222,4
Milupa Mehrkorn 1995	64,0	88,2	11,0	9,1	98,9	131,0	172,1	24,8	12,0	197,7
Milupa SOM 1995	56,1	71,6	6,6	10,3	84,4	137,1	166,1	18,5	14,3	197,1

¹ Bei den beiden Lecithinen und Mamina Soja Vegetabile Anfangsnahrung 97 wurde eine Bestimmung durchgeführt, ansonsten Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

² MD = 6"-O-Malonyldaidzin.

³ AD = 6"-O-Acetyldaidzin.

⁴ MG = 6"-O-Malonylgenistin.

⁵ AG = 6"-O-Acetylgenistin.

⁶ Das Signal wurde durch Matrixbestandteile gestört und konnte nicht ausgewertet werden.

Literatur

- 1 Crozier, A., Lean, M.E.J., Mc Donald, M.S. and Black, C.: Quantitative analysis of flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and cellery. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 590–595 (1997).
- 2 Cook, N.C. and Samman D.S.: Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.* **7**, 66–76 (1996).
- 3 Manach, C., Regeat, F., Texier, O., Agullo, G., Demigne, C. and Remesy, C.: Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4 oxo flavonoids. *Nutr. Res.* **16**, 517–544 (1996).
- 4 Tóth, J. und Wink, M.: Isoflavone in Lupinen: Mögliche gesundheitliche Konsequenzen. In: Wink, M. (Hrsg.), *Lupinen in Forschung und Praxis*, 53–63. M. Rheinheimer, Ludwigshafen 1998.
- 5 Piskula, M.K., Yamakoshi, J. and Iwai, Y.: Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Letters* **447**, 287–291 (1999).
- 6 Franke, A.A., Custer, L.J., Cerna, C.M. and Narala, K.K.: Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1905–1913 (1994).
- 7 Setchell, K.D.R., Zimmer Nechemias, L., Cai, J. and Heubi, E.: Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J. Clin. Nutr.* **68** (suppl.), 1453–1461 (1998).
- 8 Song, T.T., Hendrich, S. and Murphy, P.A.: Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1607–1610 (1999).
- 9 Cassidy, A.: Physiological effects of phyto estrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 399–417 (1997).
- 10 Murkies, A.L., Wilcox, G. and Davis, S.: Clinical review 92, Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 297–303 (1998).
- 11 Kurzer, M. and Xu, X.: Dietary phytoestrogens. *Annu. Rev. Nutr.* **17**, 353–81 (1997).
- 12 Tham, D.M., Gardner, C.D. and Hashell, W.L.: Potential health benefits dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, mechanistic evidence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 2223–2235 (1998).
- 13 Zimmerli, B. und Schlatter, J.: Vorkommen und Bedeutung der Isoflavone Daidzein und Genistein in der Säuglingsanfangsnahrung. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **88**, 219–232 (1997).
- 14 Tönz, O. und Zimmerli, B.: Phytoöstrogene in Säuglingsnahrung auf Sojaproteinbasis. *Paediatrica* **8**, 14–15, (1997).
- 15 Irvine, C.H.G., Fitzpatrick, M.G. and Alexander, S.L.: Phytoestrogens in soy based infant foods: concentrations, daily intake, and possible biological effects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**, 247–253 (1998).
- 16 Robertson, I.G.: Phytoestrogens: toxicology and regulatory recommendations. *Proc. Nutr. Soc. New Zealand* **20**, 35–42 (1995).
- 17 Sheehan, D.M.: Herbal medicines, phytoestrogens and toxicity: risk: benefit considerations. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* **217**, 379–385 (1998).
- 18 Slavin, J.: More information on phytoestrogens in breast milk. *Clin. Chem.* **43**, 548–549 (1997).
- 19 Fitzpatrick, M.: Comments on isoflavones in soy based infant formula. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3396–3397 (1998).
- 20 Bingham, S.A., Atkinson, C., Liggins J., Bluck, L. and Coward, A.: Phyto estrogens: where are we now? *Br. J. Nutr.* **79**, 393–406 (1998).
- 21 Oerter Klein, K.: Isoflavones, soybased infant formulas, and relevance to endocrine function. *Nutr. Rev.* **56**, 193–204 (1998).
- 22 Setchell, K.D.R., Welsh, M.B. and Lim, C.K.: High performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical, and thermospray mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.* **386**, 315–323 (1987).
- 23 Wang, H. and Murphy, P.A.: Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1666–1673 (1994).

- 24 Coward, L., Barnes, C., Setchell, K.D.R. and Barnes, S.: Genistein, daidzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1961–1967 (1993).
- 25 Murphy, P.A., Song, T., Buseman, G. and Barua, K.: Isoflavones in soy based infant formulas. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4635–4638 (1997).
- 26 Nguyenle, T., Wang, E. and Cheung, P.: An investigation on the extraction and concentration of isoflavones in soy based products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 221–232 (1995).
- 27 Song, T., Barua, K., Buseman, G. and Murphy, P.A.: Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am. J. Clin. Nutr.* **68** (suppl), 1474S–9S (1998).
- 28 Wang, G. Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, M. and Carman, A.S.: A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 185–190 (1990).
- 29 Aussenac, T., Lacombe, S. and Daydé, J.: Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 1480S–5S (1998).
- 30 Lu, L.J., Broemling, L.D., Marshall, M.V. and Ramanujam, V.M.S.: A simplified method to quantify isoflavones in commercial soybean diets and human urine after legume consumption. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev.* **4**, 497–503 (1995).
- 31 Liggins, J., Leslie, J., Bluck, J.C., Coward, W.A. and Bingham, S.: Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal. Biochem.* **264**, 1–7 (1998).
- 32 Kelly, G.E., Nelson, C., Waring, M.A., Joannou, G.E. and Reeder, A.Y.: Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin. Chim. Acta* **223**, 9–22 (1993).
- 33 Morton, M.S., Wilcox, G., Wahlqvist, M.L. and Griffiths, K.: Determination of lignans and isoflavonoids in human female plasma following dietary supplementation. *J. Endocrinol.* **142**, 251–259, (1994).
- 34 Adlercreutz, H., Fotsis, T., Lampe, J., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G. and Hase, T.: Quantitative determination of omnivorous and vegetarian woman by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand. J. Clin. Lab Invest* **53**, 5–18 (1993).
- 35 Wang, H.J. and Murphy, P.A.: Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year and location. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1674–1677 (1994).
- 36 Davies, C.G.A., Netto, F.M., Glassenap, N., Gallaher, C.M., Labuza, T.P. and Gallaher, D.D.: Indication of the Maillard reaction during storage of protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2485–2489 (1998).
- 37 Knight, D.C., Eden, J.A., Huang, J.L. and Waring, M.A.: Isoflavone content of infant foods and formulas. *J. Paediatr. Child Health* **34**, 135–138 (1998).
- 38 Barnes, S., Kirk, M. and Coward, L.: Isoflavones and their analysis by HPLC mass spectrometry. *J. of Agric. Food Chem.* **42**, 2466–2474 (1994).
- 39 Reinli, K. and Block, G.: Phytoestrogen content of foods a compendium of literature values. *Nutrition Cancer.* **26**, 123–148 (1996).
- 40 Anonymous: Ministry of Agriculture Fisheries and Food (MAFF), Food Surveillance Information Sheet, No. 167, (1998).
- 41 Anonym: Schweizerische Aussenhandelsstatistik 1995–97, Oberzolldirektion Bern.
- 42 Osborne, S.E.: Does soy have a E? *Natural Health*, March, 111–158 (1998).
- 43 Fukutake, M., Takahashi, K., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K.: Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food Chem. Toxicol.* **34**, 457–461 (1996).

Korrespondenzadresse: Dr. Bernhard Zimmerli, Bundesamt für Gesundheit, Abteilung Lebensmittelwissenschaft, Sektion Lebensmittelchemie und -analytik, CH-3003 Bern