

## Papierchromatographischer Nachweis von Coumestrol in Pflanzenextrakten

Coumestrol ist ein weit verbreitetes Phytoöstrogen, das von BICKOFF und Mitarb.<sup>1</sup> entdeckt wurde. Über seinen Nachweis mittels Papierchromatographie liegen in der Literatur ziemlich wenig Angaben vor. LYMAN *et al.*<sup>2</sup> wandten diese Methode bei der Isolation von Coumestrol an, LIVINGSTON *et al.*<sup>3</sup> beschreiben ihre Anwendung bei der quantitativen Bestimmung von Coumestrol in Pflanzenextrakten. Da Coumestrol oft von anderen Stoffen maskiert und sein Nachweis dadurch erschwert ist, untersuchten wir näher die Möglichkeiten zur Ausarbeitung eines geeigneten Verfahrens für den Nachweis dieses Stoffes in Pflanzenextrakten. Unsere Aufmerksamkeit widmeten wir vor allem dem Einfluss der Bearbeitung des Pflanzenmaterials, der Extraktion und der Reinigung der Rohextrakte auf den Erfolg des papierchromatographischen Nachweises.

Es wurde frisches sowie auch getrocknetes Pflanzenmaterial benutzt. Frisches Material wurde spätestens 30 Min. nach dem Mähen verarbeitet. Die Extraktion des frischen Materials wurde nach dem Verfahren von BECK<sup>4</sup> durchgeführt. Das trockene Pflanzenmaterial wurde entweder gleich mit Aceton, Methanol, oder 96% Ethanol, oder erst nach vorheriger einstündigen enzymatischen Hydrolyse nach Befeuchten mit Wasser nach den Angaben von LIVINGSTON *et al.*<sup>3</sup> extrahiert.

Die Rohextrakte wurden entweder durch wiederholte Petroläther Extraktion, oder durch Lösen des Residuums nach Abdampfen der Extraktionsmittel in warmen Chloroform und nachheriges Ausschütteln mit 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gereinigt. Aus der 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung wurde der Phytoöstrogene-enthaltende Anteil mit Äther nach vorherigem Ansäuern mit 1 N HCl bis zu pH 5.5 extrahiert. Die Ätherextrakte wurden am Wasserbade unter vermindertem Druck abgedampft und das Residuum gewogen. Dann wurde es in einer Mischung von gleichen Teilen Methanol und Benzol gelöst, so dass 1 ml der Lösung 10–15 mg des Residuums enthielt.

Von dieser Standardlösung wurden Proben von 50–75 µg auf Whatman No. 1 Papier aufgetragen. Die Chromatographie wurde bei Zimmertemperatur ansteigend durchgeführt. Die Kammer war zur Hälfte gesättigt. Als Standard diente eine Lösung von reinem Coumestrol, das uns freundlicherweise von E. M. BICKOFF (U.S.A.) zur Verfügung gestellt wurde. Die Menge des aufgetragenen Coumestrol betrug 1–10 µg. Das Coumestrol wurde am Chromatogramm mit U.V.-Strahlung von 320–400 nm Wellenlänge entdeckt. Wir benutzten auch die Änderung der Fluoreszenz von Coumestrol nach vorheriger Alkalisierung des Papiers mit 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung, oder mit 1 N NaOH. Es wurden zehn Entwicklungssysteme benutzt. Die  $R_F$ -Werte von Coumestrol sind in Tabelle I angeführt.

Bei der Chromatographie der Pflanzenextrakte gaben die Entwicklungssysteme No. 1, 2, 8 und 9 gute Ergebnisse. In den anderen Entwicklungssystemen war Coumestrol regelmässig von verschiedenen Begleitsstoffen maskiert, sodass seine Fluoreszenz schwer erkennbar war. Die besten Resultate erhielten wir mit den vorgehend chloroformgereinigten Extrakten. In diesem Falle war eine Spur von Coumestrol ziemlich gut sichtbar.

Obwohl das Reinigungsverfahren mit Chloroform und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gute Resultate gibt, sind doch auch in diesem Falle Spuren von Begleitsstoffen anwesend. Es empfiehlt sich darum den Coumestrolfleck zu eluieren und das Eluat nach Abdampfen unter vermindertem Druck von neuem zu chromatographieren. Für die erste

Chromatographie empfehlen wir das Residuum von Äther-Extrakt des angesäuerten  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Anteils in Benzol-Methanol zu lösen und mit dem Entwicklungssystem No. 2 zu entwickeln; nach Entdeckung von Coumestrol im U.V.-Licht die Coumestrol-flecke ausschneiden, mit Methanol-Aceton eluieren. Das Eluat abdampfen und das Residuum nach Lösen in Methanol-Benzol auf neues Papier auftragen; dieses Chromatogramm mit dem Entwicklungssystem No. 1, 8 oder 9 entwickeln. In allen Fällen ist es notwendig reines Coumestrol als Kontrolle zu benutzen.

TABELLE I

	<i>Entwicklungssystem</i>	<i>Coumestrol R<sub>F</sub>-Wert</i>
1	Aceton-Eisessig-Wasser (3:1:6)	0.088-0.10
2	Aceton-Wasser (3:7)	0.10 -0.16
3	Chloroform-Eisessig-Wasser (2:1:1)	0.33 -0.40
4	Benzol-Eisessig-Wasser (2:2:1)	0.19 -0.23
5	Butylalkohol-Eisessig-Wasser (4:1:5)	0.91 -0.93
6	Methanol-Benzol (10:40)	0.77 -0.80
7	Eisessig-Wasser (30:20)	0.55 -0.60
8	Eisessig-Wasser-Salzsäure (50:35:15)	0.55 -0.60
9	Benzol-Aceton (9:1)	0.00
10	Methanol-Chloroform (11:89%)	0.91 -0.95

Wird trockenes Pflanzenmaterial benutzt, ist es am besten die Extrahierung mit Aceton oder Methanol durchzuführen. Bei direkter Extrahierung der trockenen Pflanzenmaterials ist die Ausbeute um 40% geringer, als wenn zuerst eine enzymatische Hydrolyse durchgeführt wird. Für die Chromatographie von Coumestrol in Extrakten von trockenem Pflanzenmaterial ist darum die enzymatische Hydrolyse nach vorherigem Befeuchten des Materials mit Wasser und 60 Min. langem Stehenlassen bei Zimmertemperatur empfehlenswert. Für den Nachweis von Coumestrol sind 5-10 g des Pflanzenmaterials ausreichend.

*Biologisches Institut, Veterinärmedizinische-Fakultät,  
Brno (Tschechoslowakei)*

J. CHURÝ

- 1 E. M. BICKOFF, A. N. BOOTH, R. L. LYMAN, A. L. LIVINGSTON, C. R. THOMPSON AND F. DEEDS, *Science*, 126 (1957) 969.
- 2 R. L. LYMAN, E. M. BICKOFF, A. N. BOOTH UND A. L. LIVINGSTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 80 (1959) 61.
- 3 A. L. LIVINGSTON, E. M. BICKOFF, J. GUGGOLZ UND C. R. THOMPSON, *Agr. Food Chem.*, 9 (1961) 135.
- 4 A. B. BECK, *Australian J. Agr. Res.*, 15 (1964) 223.

Eingegangen den 8. August 1966

*J. Chromatog.*, 27 (1967) 329-330