

CHROM. 535I

Die dünn-schichtchromatographische Trennung einiger Isoflavone neben Cumöstrol

Die östrogene Aktivität einiger Flavonoide gab den Anlass zu ihrer chromatographischen Trennung (Dünn-schichtchromatographie siehe z.B. Lit. 1-8). Für den gleichzeitigen Nachweis von synthetisiertem Daidzein, Genistein, Pratensein, Formononetin, Biochanin A und Cumöstrol wurde eine schnelle und einfache Methode gesucht.

Eine Trennung dieser Aglycone erwies sich sowohl auf Kieselgel G Merck- als auch auf Cellulose MN 300-Schichten mit den verschiedensten Laufmitteln als unbefriedigend. Kritische Paare waren vor allem Formononetin und Biochanin A sowie Daidzein und Genistein, die sich auf diesen Sorptionsmitteln überlagerten. Erst mit Polyamid Woelm DC wurden wesentliche Unterschiede zwischen den hR_F -Werten der einzelnen Substanzen erzielt.

Für eine Platte 10 × 20 cm ist 1 g Polyamid mit einem Zusatz von 0.2 g Cellulose erforderlich. Die Platten wurden im Giessverfahren mit 6 ml 96 %igem Äthanol hergestellt und luftgetrocknet. Das geeignetste Fliessmittel wurde in der Mischung von Petroläther (Kp. 30-60°)-Benzol-Methyläthylketon-Methanol-Essigsäure (30:30:20:20:2) gefunden. Die Laufstrecke betrug 17 cm nach 30 min bei 23° und Kammer-sättigung. Auftragsmenge: Formononetin, Daidzein und Pratensein, 2 µg; Genistein und Biochanin A, 6 µg; Cumöstrol, 0.2 µg.

TABELLE I

 hR_F -WERTE EINIGER ISOFLAVONE UND CUMÖSTROL

	hR_F	
	Nach 30 min	Nach 90 min
Cumöstrol	6	6.5
Daidzein	28	30
Genistein	32	39
Pratensein	41	49
Formononetin	62	67
Biochanin A	66	79

Die hR_F -Werte sind in Tabelle I zusammengefasst. Die Trennung der Substanzen lässt sich noch verbessern, wenn die Platte weitere 60 min bei gleichen Bedingungen ohne vorheriges Trocknen in der Kammer bleibt, nachdem das Fliessmittel die zuvor markierte Linie im Abstand von 17 cm zum Start erreicht hat (siehe Tabelle I). Wird die Polarität des Laufmittels erhöht, so erzielt man zwar grössere hR_F -Werte, aber keine schärfere Trennung. Die Reproduzierbarkeit der Zahlen war nur mit einem frisch bereitetem Fliessmittel gewährleistet. Mit dem wiederholtem Gebrauch des Lösungsmittelgemisches nehmen sowohl die hR_F -Werte als auch ihre Differenzen zu, woraus sich eine Verkürzung der erforderlichen Trennzeit ergibt.

Tabelle II zeigt einige Nachweismethoden der untersuchten Substanzen mit

TABELLE II

NACHWEISMÖGLICHKEITEN EINIGER ISOFLAVONE UND DES CUMÖSTROLS AUF DER POLYAMID-DÜNNSCICHT-PLATTE

Abkürzungen: TG = Tageslicht; Wärme = 5 min auf etwa 110° erhitzen. Sprühreagentien: (1) —; (5) 2% Zirkonium (IV)-oxidchlorid in Methanol; (6) 1% Diphenylborsäure-2-aminoäthylester in Methanol; Natrium in Äthanol; (9) Benedict-Reagens: 1.73 g Kupfersulfat crist., 17.3 g Natriumcitrat, 10.0 g 2% Eisen (III)-chlorid in Wasser, Lösungen 1:1 kurz vor Gebrauch mischen; (11) 0.5% Echtblausalz B Sulfanilsäure⁹; (13) Diazotiertes Benzidin¹⁰; (14) 5% Phosphormolybdänsäure in Äthanol.

	$\frac{1}{UV}$	$\frac{2}{UV}$	$\frac{Wärme + UV}{UV}$	$\frac{3}{UV}$	$\frac{4}{UV}$	$\frac{Wärme + Ammoniak + UV}{UV}$
Cumöstrol	violett	rosaviolett	blau, später gelb	violett	violett	violett
Daidzein	blauschwarz	weissblau	weissblau	weissblau	—	blau
Genistein	dunkel	dunkel	dunkel	—	gelbgrün	gelb
Pratensein	dunkel	dunkel	dunkel	—	gelbgrün	gelb
Formononetin	blauschwarz	weissblau	weissblau	weissblau	—	blau
Biochanin A	dunkel	—	dunkel	—	gelbgrün	gelb
Bemerkungen						

TABELLE II (Fortsetzung)

	$\frac{8}{UV}$	$\frac{9}{UV}$	$\frac{10}{TG}$	$\frac{Wärme}{TG}$	$\frac{11}{UV}$	$\frac{12}{TG}$
Cumöstrol	hellviolett	violett	—	—	violett	—
Daidzein	dunkelviolett	weissblau	—	blaugrün	—	—
Genistein	dunkelviolett	dunkel	—	blau	—	violett
Pratensein	dunkelviolett	dunkel	blaugrün ^a	kräftig blau	—	intensiv violett
Formononetin	dunkelviolett	weissblau	—	—	—	—
Biochanin A	dunkelviolett	dunkel	—	blaugrün ^b	—	violett
Bemerkungen	Untergrund grün		^a Sofort sichtbar Nach Stunden alle Flecken ausser Formononetin intensiv blau	^b Am schwächsten		Untergrund gelb, Färbung der Flecken sehr langsam

(2) 5%ige, wässrige Natronlauge; (3) 25%ige Ammoniaklösung; (4) 1% Aluminiumchlorid in Äthanol; (7) 2% Fluoreszenzindikator Woelm 254 nm wurden dem Polyamid beigemischt; (8) 0.04% Fluorescein-Natriumcarbonat wasserfrei zu 100 ml in Wasser lösen; (10) 1% Kaliumhexacyanoferrat (III) in Wasser, in Wasser, frisch herstellen, 0.1 N Natronlauge, Lösungen nacheinander aufsprühen. (12) Diazotierte

5		6		7		UV	
Wärme + UV	Ammoniak + UV	UV	Wärme		Ammoniak		
			TG	UV	TG		UV
violett	violett	violett	—	violett	—	violett	hellviolett
—	weissblau	—	—	—	—	weissblau	schwach dunkelblau
gelbgrün	olivgrün	gelb	schwach gelb	leuchtend gelb	grüngelb	leuchtend gelb	dunkelblau
gelbgrün	olivgrün	gelb	schwach gelb	leuchtend gelb	grüngelb	leuchtend gelb	dunkelblau
—	weissblau	—	—	—	—	weissblau	schwach dunkelblau
gelbgrün	olivgrün	gelb	schwach gelb	leuchtend gelb	grüngelb	leuchtend gelb	dunkelblau
							Untergrund hellgrün

12		13		14			
TG	UV	Ammoniak		TG	UV	Wärme	
		TG	UV			TG	UV
—	violett	—	violett	—	violett	—	violett
—	—	—	weissblau	—	blassblau	—	blau
blassgelb	dunkel	gelb	dunkel	orangebraun ^c	dunkel	—	dunkel
kräftig gelb	dunkel	gelb	dunkel	stark ^d orangebraun	dunkel	graugrün	schwarz
—	—	—	weissblau	—	blassblau	—	blau
blassgelb	dunkel	gelb	dunkel	orangebraun ^c	dunkel	—	grau

^c Farbe sehr blass, spät sichtbar

^d sofort sichtbar

^e Färbung gering, wird

allmählich sichtbar

Farben nicht beständig, Platte

dunkelt nach

verschiedenen Sprühmitteln. Ohne Besprühen geben sich im UV-Licht Formononetin und Daidzein durch eine schwache, helle-, Cumöstrol durch eine stark violette Fluoreszenz und Genistein, Pratensein sowie Biochanin A als dunkle Flecken zu erkennen. Eine Identifizierung ist somit nicht nur durch die R_F -Werte, sondern auch durch die verschiedenen Farbreaktionen der Isoflavone und des Cumöstrols bei Tages- und UV-Licht möglich (siehe Fig. 1).

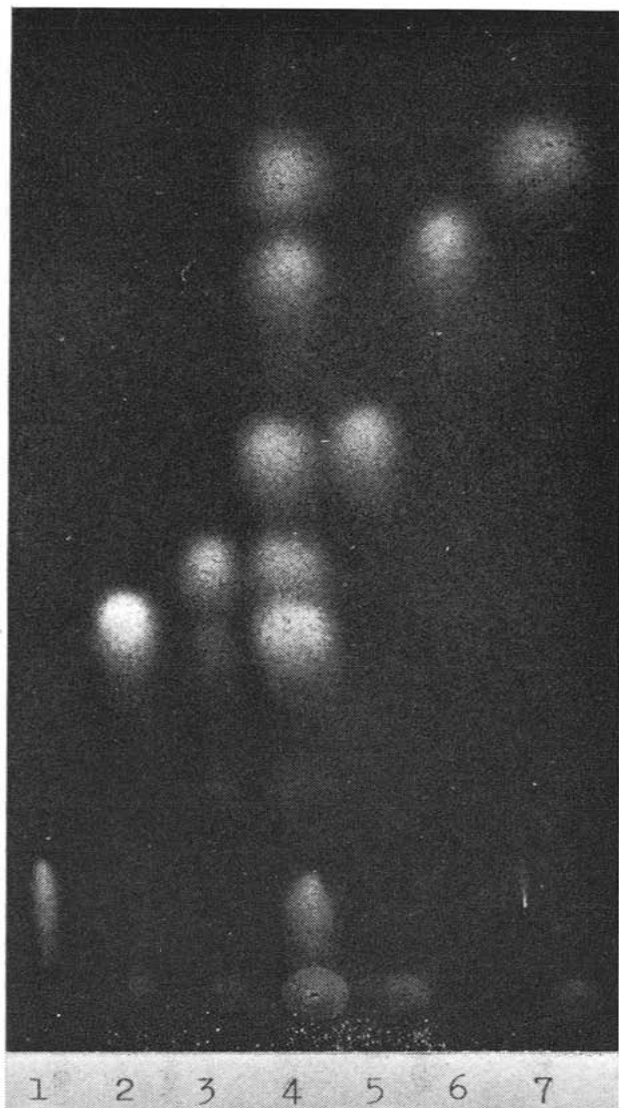


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm einiger Isoflavone und Cumöstrol im UV-Licht aufgenommen. 1 = Cumöstrol; 2 = Daidzein; 3 = Genistein; 4 = 1-3 und 5-7; 5 = Pratensein; 6 = Formononetin; 7 = Biochanin A. Laufzeit, 90 min; Sprühmittel, Reagens 6 und 9, siehe Tabelle II. Weitere Einzelheiten im Text.

Wie aus den Angaben zu ersehen ist, können mit dieser Methode 6 chemisch engverwandte Stoffe im eindimensionalen Dünnschichtverfahren leicht und rasch getrennt werden.

Eidgenössische Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen Pflanzenbau,
8046 Zürich (Schweiz)

J. SACHSE

- 1 A. B. BECK, *Aust. J. Agric. Res.*, 15 (1964) 223.
- 2 G. SCHULTZ, *Naturwiss.*, 52 (1965) 517.
- 3 H. GRISEBACH UND W. BARZ, *Z. Naturforsch.*, 19B (1964) 569.
- 4 W. BARZ, *Z. Naturforsch.*, 24B (1969) 234.
- 5 H. GRISEBACH UND G. BRANDNER, *Z. Naturforsch.*, 16B (1961) 2.
- 6 A. NILLSON, J. L. HILL UND H. L. DAVIES, *Biochim. Biophys. Acta*, 148 (1967) 92.
- 7 G. TANG UND R. H. COMMON, *Biochim. Biophys. Acta*, 158 (1968) 402.
- 8 M. I. ELGHAMRY, E. GRUNERT UND G. SCHULTZ, *Biol. Zentralbl.*, 88 (1969) 769.
- 9 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S. 851, No. 230.
- 10 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S. 818, No. 24.

Eingegangen am 27. Januar 1971

J. Chromatogr., 58 (1971) 297-301