

CHROM. 7443

DIE BESTIMMUNG ÖSTROGENER ISOFLAVONE UND CUMÖSTROL IN KLEE (*TRIFOLIUM PRATENSE* L. UND *TRIFOLIUM REPENS* L.)

J. SACHSE

Eidgenössische Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen Pflanzenbau, 8046 Zürich (Schweiz)

(Eingegangen am 23. Januar 1974)

SUMMARY

*The determination of oestrogenic isoflavones and coumestrol in clover (*Trifolium pratense* L. and *Trifolium repens* L.)*

Thirty-two varieties of white clover and twenty varieties of red clover were examined for five isoflavones —biochanin A, formononetin, pratensein, genistein, daidzein— and the coumarin derivate coumestrol known as oestrogenic. A method for the extraction and the cleaning by column and thin-layer chromatography is described. The quantitative analysis is carried out spectrophotometrically. The determination of small amounts of formononetin and coumestrol in white clover is effected semi-quantitatively. The problems with the preparation of the sample, the extraction, the column and thin-layer chromatography and the elution are discussed. The chemical examination of the six oestrogenic substances in clover allows a better judgement whether the reproductive abnormalities for animals must be attributed to these substances or to other causes.

EINLEITUNG

Von den zahlreichen als östrogen bekannten Pflanzen¹ ist vor allem der Klee für die landwirtschaftliche Viehhaltung von Bedeutung. In den vierziger Jahren konnten erstmals Benetts *et al.*^{2,3} Fruchtbarkeitsstörungen bei weidenden Schafen auf Isoflavone im Klee zurückführen. Fünf der bisher entdeckten 55 Isoflavone⁴, nämlich Biochanin A, Formononetin, Pratensein, Genistein und Daidzein, gelten als östrogen⁵. Ihr Vorkommen beschränkt sich mit wenigen Ausnahmen auf die Ordnung der Leguminosen und dort speziell auf die Familie der Papillionaceen⁶. Das später von Bickoff *et al.*⁷ in Ladinoklee gefundene und in anderen Papillionaceen (*Medicago sativa* L., *Trifolium subterraneum* L., *Trifolium pratense* L.) nachgewiesene Cumöstrol⁸, ein Cumarinderivat, zählt ebenfalls zu den östrogen wirkenden Stoffen und biogenetisch zu den Isoflavonen⁹. Über die relative östrogene Aktivität der einzelnen Isoflavone, die etwa $5 \cdot 10^{-6}$ so gross wie die des Diäthylstilböstrols ist¹⁰, herrscht keine Übereinstimmung¹¹⁻¹⁸. Hingegen unterscheidet sich Cumöstrol von den Isoflavonen durch eine 30fach höhere Wirksamkeit als z.B. Genistein¹⁹. Da mit einer so niedrigen Aktivi-

tät der Antifertilitätseffekt schwer zu erklären ist, kommen verschiedene Autoren zu dem Schluss, dass die Isoflavone als Proöstrogene anzusehen sind und im tierischen Körper eine Umwandlung in eigentliche Wirkstoffe erfahren oder die östrogenen Hormone selbst beeinflussen²⁰⁻²². Die Beziehung zwischen Konstitution und östrogenener Aktivität beleuchten Bickoff *et al.*²³ und Warburton²⁴.

Zur Bestimmung der Isoflavonglycoside und -aglycone bieten sich der Tierversuch^{17,25}, die Densitometrie, die Spektrophotometrie und die Fluorimetrie^{5,8,26-29} an. Die biologische Methode hat zwar den Vorteil, ohne Isolierung der zu bestimmenden Stoffe auszukommen, doch dürften ihre Ergebnisse trotz grösseren Arbeitsaufwandes stärkeren Streuungen unterliegen. Bei den übrigen Bestimmungen ist eine Reinigung dieser Flavonoide unerlässlich, wofür die Säulen^{24,30-33}, Papier^{5,8,14,27,29,30,34-40}, Dünnschicht^{28,31-34} und Gaschromatographie⁵ herangezogen wurden. Wie man aus der Literatur entnehmen kann^{28,32,31-34}, beschränken sich die meisten Autoren bei ihrer Untersuchung auf einen Teil dieser Östrogene mit Ausnahme von Lindner⁵, der papierchromatographisch alle sechs Substanzen erfasst. Grössere Schwierigkeiten bieten wegen ihrer geringen Konzentration Daidzein, Genistein, Pratensein und Cumöstrolo, die besonders bei halbquantitativen Untersuchungen³¹ schwer bestimmbar sind.

Wie Legg *et al.*⁴⁵ berichten, sind die Isoflavone in allen Pflanzenteilen des Klees zu finden. Das Vorkommen der einzelnen Phytoöstrogene scheint jedoch vom Alter der Pflanze abhängig zu sein⁴⁶. Ihre Konzentration wird durch die Kleesorte, den Reifezustand der Pflanze, ihren Standort, die Witterung und die Düngung bestimmt.

Untersuchungen über das Vorhandensein dieser Pflanzenöstrogene in den in der Schweiz angebauten Kleesorten liegen unseres Wissens nicht vor. Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur möglichst exakten Bestimmung aller sechs als östrogen bekannten Stoffe im Grünfutter, insbesondere den Kleearten, zu entwickeln. Für den Nachweis von Isoflavonen ist bereits ein dünnschichtchromatographisches Verfahren publiziert worden²⁷, hingegen fehlt noch eine notwendige Reinigungsmethode zur quantitativen Analyse dieser Substanzen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Probenmaterial

(1) Blätter und Stengel des noch nicht blühenden Weissklee (*Trifolium repens* L.), Sortenangaben siehe Tabelle III. Anbauort: Zürich-Reckenholz, 430 m über dem Meeresspiegel; Aussaat: April 1971; Ernte: Mai 1972, erster Schnitt.

(2) Der oberirdische Teil des im vegetativen Stadium befindlichen Rotklee (*Trifolium pratense*), Sortenangaben siehe Tabelle IV. Anbauort: Zürich-Reckenholz, 430 m über dem Meeresspiegel; Aussaat: Frühling 1971; Ernte: Oktober 1972, 4. Schnitt.

Die Rot- und Weisskleeproben wurden bei -20° gelagert, gefriergetrocknet, gemahlen und sofort verarbeitet. Von den Rotkleearten wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Extraktion

Zur quantitativen Erfassung der Isoflavonaglycone sind 10 g getrockneter Klee erforderlich. Die Probe wird mit 100 ml 1 N Salzsäure auf dem siedenden

Wasserbad 1 h hydrolysiert. Nach der Neutralisation mit etwa 40%iger Natronlauge extrahiert man die Probe mit 500 ml Aceton 30 min unter Rückfluss, nutsch ab und kocht noch zweimal mit je 250 ml Aceton 20 min. Die Extrakte werden gesammelt und am Rotationsverdampfer bei 50° auf etwa 20 ml eingengt.

Reinigung des Extraktes

Das oben gewonnene Konzentrat wird mit wenig Äthanol in einen Scheidetrichter gespült und dreimal mit 100 ml Petroläther (Kp. 30–60°) zur Entfernung von Chlorophyll und Lipoiden ausgeschüttelt. Die untere Phase wird mit dem an den Grenzflächen eventuell auftretenden Schlamm vom Petroläther abgetrennt und unter dem Oberflächenverdampfer bei 50° in einem Mörser unter Zusatz von 5 g feinem Seesand und 0.5 g Polyamid (Woelm, Eschwege, B.R.D.) für die Säulenchromatographie zur besseren Verteilung der Masse bis fast zur Trockne eingedampft. Die obere Phase wird verworfen.

Der nächste Reinigungsschritt wird säulenchromatographisch durchgeführt, wofür man 10 g Polyamid Woelm SC mit 35%igem Äthanol in eine Säule von etwa 1.5 cm Durchmesser füllt und mit 5 g grobem Seesand bedeckt. Die feuchte Probenmasse wird mit wenig 35%igem Äthanol auf die Säule gegeben. Die Elution geschieht mit je 100 ml 35 und 40%igem und weiter mit je 200 ml 45, 55, 65, 80 und 95%igem denaturierten Äthanol bei einer Säulentemperatur von 40°, die durch einen Säulenumantel, Durchmesser 3.5 cm, und einen Umlaufthermostaten erzielt wird. Der Säulendurchfluss beträgt für gefriergetrockneten Klee etwa 1 cm/min., gemessen am Absinken des Flüssigkeitsspiegels. Notfalls setzt man die Säule unter schwachen Überdruck. Die Elution kann während der Nacht unterbrochen werden. Das Eluat wird in Fraktionen zu 20 ml aufgefangen. Jeder zweiten Fraktion werden 100 µl zum dünnschichtchromatographischen Nachweis der Isoflavone bzw. des Cumöstrols²⁷ entnommen (siehe Fig. 1 und 2). Die Isoflavone bzw. Cumöstrol enthaltenden Fraktionen werden gesammelt, am Rotationsverdampfer bei 50° eingengt und mit 70%igem denaturierten Äthanol für Weissklee in einen 10 ml, für Rotklee in einen 25 ml Messkolben gespült.

Für die dritte Reinigung der Isoflavone und des Cumöstrols durch Dünnschichtchromatographie werden Platten von den Grössen 20 × 35 cm und 6 × 35 cm verwendet. Die Beschichtung erfolgt wie in früherer Arbeit angegeben²⁷. Die 20 cm breiten Platten werden in fünf Bahnen eingeteilt: eine für die Blindprobe und vier für je eine Probenauftragung. Die Auftragsmengen betragen im Fall des Rotklees aus einem 25 ml Messkolben für Biochanin A 30 µl, Formononetin 20 µl, Pratensein 200 µl, Genistein 150–200 µl und Daidzein 150–200 µl; bei Weissklee aus einem 10 ml Messkolben für Formononetin mindestens 200 µl und für Cumöstrol 200 bis 500 µl, eventuell als Strich appliziert. Auf einer Platte kann jeweils nur ein Isoflavon gereinigt werden. Zwei schmale Glasplatten werden mit dem zu untersuchenden Isoflavon und der Probe beschickt. Sie dienen zur sicheren Auffindung der Isoflavone und werden nach dem Entwickeln eventuell für sich allein mit Reagenzien²⁷ besprüht. Zum Nachweis von Formononetin und Daidzein auf den schmalen Glasstreifen wird bei der quantitativen Analyse 20%ige wässrige Natriumkarbonat-Lösung verwendet. Von den Platten 20 × 35 cm wird jedes Sprühmittel ferngehalten. Zur Reinigung der Isoflavone und des Cumöstrols ist eine drei- bzw. zweifache Entwicklung in folgenden Flüssmitteln erforderlich.

1. Entwicklung: Für alle Isoflavone: Petroläther (Kp. 30–60°)–Benzol–Methyl-

äthylketon-Methanol-Essigsäure (30:30:20:20:2) Fließmittel 1 (siehe Fig. 3). Für Cumöstrol: Benzol-Essigsäureäthylester-Petroläther (Kp. 30-60)-Methanol (6:4:3:1) Fließmittel 2.

2. Entwicklung: Für Pratensein, Genistein und Daidzein: Methanol 90%, Fließmittel 3. Für Biochanin A und Formononetin: Methanol 80%, Fließmittel 4. Für Cumöstrol: Chloroform-Isopropanol (10:1) Fließmittel 5.

3. Entwicklung: Für Pratensein, Genistein und Daidzein Fließmittel 3. Für Biochanin A und Formononetin Fließmittel 4 (siehe Fig. 4).

Entgegen der üblichen Methode werden nach der ersten Entwicklung nicht die unter der UV-Lampe gesuchten Flecken einschliesslich der Blindprobe von der Platte abgeschabt und die Substanzen eluiert, sondern auf der Platte belassen und das übrige Polyamid ober- und unterhalb davon sauber entfernt. Die Platte wird nun auf den leeren Flächen im Giessverfahren²⁷ wieder mit einer entsprechenden Menge Polyamid beschichtet. Je nachdem, ob die Flecken sich in der Nähe der Start- oder Frontlinie befinden, lässt man die Flecken bei der zweiten Entwicklung in der gleichen oder umgekehrten Richtung laufen. Nach der zweiten Auftrennung der Flecken sind die Platten meist ohne erneute Bearbeitung für die dritte Entwicklung bereit. Die Laufzeit beträgt für die erste Auftrennung 3 bis 4 h. Die zweite und dritte erfolgt am besten über Nacht.

Die dünnschichtchromatographische Reinigung des Cumöstrols erfolgt nach dem gleichen Verfahren, jedoch auf Kieselgel G-Platten mit den oben aufgeführten Fließmitteln. Die Platten 20 × 35 cm werden im Giessverfahren mit 9.6 g Kieselgel G (Merek, Darmstadt, B.R.D.) in 30 ml Äthanol-Wasser (9:1) hergestellt und ohne Aktivieren luftgetrocknet.

Quantitative Analyse

Nach der letzten Entwicklung und ausreichendem Trocknen werden die unter einer UV-Lampe markierten Flecken einschliesslich der Blindprobe mit einer Rasierklinge von der Platte geschabt, in einem Zentrifugenröhrchen mit Glasschliffstopfen gesammelt und mit 5 ml Methanol (p.a.) versetzt. Für die Elution von Biochanin A, Pratensein, Genistein, Daidzein und Cumöstrol lässt man die Suspensionen 24 h bei Zimmertemperatur stehen und schüttelt dreimal in regelmässigen Zeitabständen. Danach wird durch ein Allihn'sches Filtrerröhrchen D 4 filtriert und die Extinktion der klaren Lösung am Spektrophotometer gemessen.

Für die Elution des Formononetins werden 5 ml 70%iger Methanol (p.a.) verwendet. Die Zentrifugenröhrchen bringt man 24 h in ein Wasserbad von 60° und schüt-

Fig. 1. Polyamid-Dünnschichtplatte mit Fraktionen 10-20 eines Rotkleextraktes, im UV-Licht fotografiert. Kolonne 4: Vergleichssubstanzen, von oben nach unten Biochanin A, Formononetin, Pratensein, Genistein, Daidzein. Im Extrakt sind nachweisbar Biochanin A, Formononetin und Genistein. Die Platte ist mit Diphenylborsäure-2-aminoäthylester in Äthanol und mit 20%iger Natriumkarbonat-Lösung besprüht.

Fig. 2. Polyamid-Dünnschichtplatte mit vier Fraktionen eines Weisskleextraktes, im UV-Licht fotografiert. Kolonne 3: Vergleichssubstanz Cumöstrol. Die roten Flecken stammen von Chlorophyll. Die Platte ist nicht besprüht.

Fig. 3. Erste Reinigung von Formononetin auf Polyamid in Fließmittel 1. Die Platte mit Kontrollstreifen ist unbesprüht. Aufnahme im UV-Licht.

Fig. 4. Dritte Reinigung von Formononetin auf Polyamid in Fließmittel 4, ohne Besprühen. Aufnahme im UV-Licht.

Fig. 1.



Fig. 2.

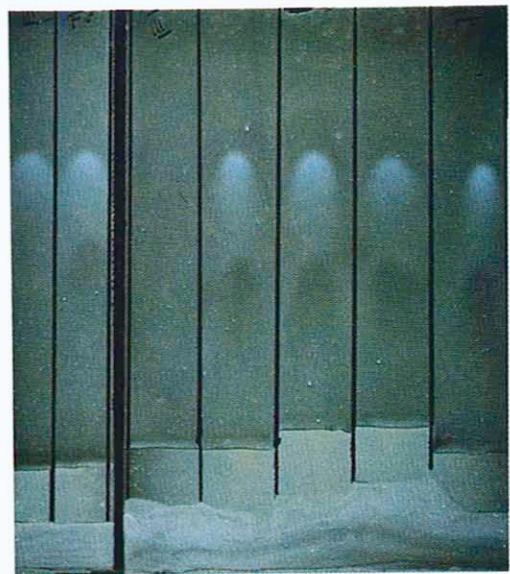
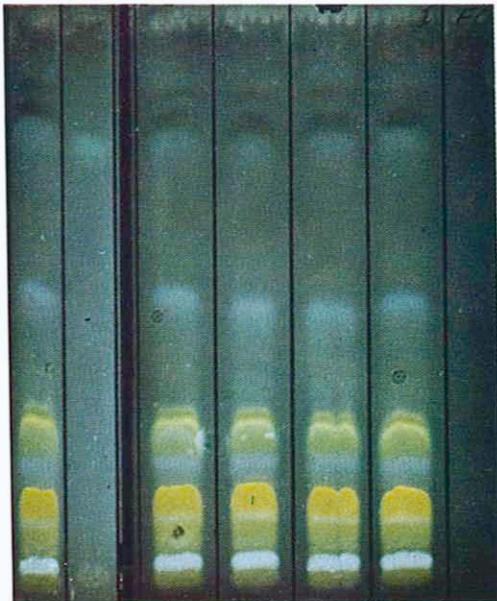
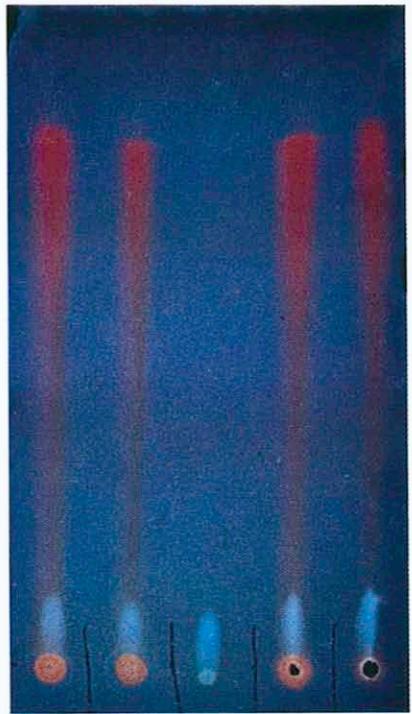


Fig. 3.

Fig. 4.

telt tagsüber in Abständen von 2 h. Bei der Elution des Formononetins muss die Höhe des Methanolspiegels im Zentrifugenröhrchen markiert werden, da trotz Beschwerden der Schliffstopfen ein Teil des Methanols bei 60° verdunstet und vor dem Filtrieren ergänzt werden muss.

Herstellen der Eichkurven. Von jeder Substanz verwendet man 10 mg in 10 ml Äthanol gelöst und unterwirft sie einzeln dem oben beschriebenen Analysengang. Die Isoflavone bzw. Cumöstrol enthaltenden Fraktionen von der Säule werden gesammelt, eingeengt und mit Äthanol in einen 25 ml Messkolben gespült. Die Auftragsmengen auf den Dünnschichtplatten betragen 40, 80, 120, 160 und 200 μ l. An Hand der gefundenen Extinktionen bei 250 nm für Daidzein und Formononetin, bei 263 nm für Biochanin A, Genistein und Pratensein sowie bei 343 nm für Cumöstrol werden die Eichkurven in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 16 μ g/ml aufgestellt.

Halbquantitative Analyse

Die Extraktion und Reinigung der Flavonoide durch Ausschütteln und Säulenchromatographie wird wie oben beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen engt man ein und spült das Konzentrat in einen 10 ml Messkolben. Auf einer Polyamidplatte 20 \times 20 cm bereitet man sich eine Standardreihe von 5–50 μ g Formononetin bzw. 0.2–2 μ g Cumöstrol. Von jeder Kleeprobe werden auf einer Polyamidplatte (10 \times 20 cm) drei Flecken verschiedener Konzentration, z.B. 20, 40 und 60 μ l, aus dem 10 ml Messkolben aufgetragen. Alle Platten werden im Fließmittel I entwickelt, mit 20%iger Natriumkarbonat-Lösung besprüht und die Flecken der Probe mit denen der Standardplatte unter der UV-Lampe verglichen.

Synthese der Isoflavone und des Cumöstrols

Daidzein, Genistein und Biochanin A wurden nach der Methode von Yoder *et al.*⁴⁸ aus 2,4-Dihydroxyphenyl-4'-hydroxybenzylketon, 2,4,6-Trihydroxyphenyl-4'-hydroxybenzylketon, 2,4,6-Trihydroxyphenyl-4'-methoxybenzylketon und Äthoxalylchlorid synthetisiert. Nach der Umkristallisation in Äthanol fallen Genistein (Fp. 295°; Acetat 196–199°), Daidzein (Fp. 320–324°; Acetat 186°) und Biochanin A (Fp. 212°) als Nadeln aus. Formononetin wurde aus 2,4-Dihydroxyphenyl-4'-methoxybenzylketon und Orthoameisensäuretriäthylester in Pyridin nach Iyer *et al.*⁴⁹ gewonnen. Das in Äthanol umkristallisierte Pulver schmilzt bei 255–257°. Eine weitere Synthesemöglichkeit besteht in der Umsetzung vom obigen Keton mit Dimethylformamid und Phosphoroxychlorid nach Kagel *et al.*⁵⁰. Die Synthese von Pratensein erfolgte gemäss Wong⁵¹ und nach Baker *et al.*⁵². Der Schmelzpunkt des in Äthanol gereinigten Produktes beträgt 271–273°. Cumöstrol lässt sich nach Jurd⁵³ herstellen: Fp. 380–385°. Die Schmelzpunkte wurden mit der Thiele-Apparatur bzw. im Metallblock bestimmt und sind unkorrigiert. Die Absorptionsspektren der synthetisierten Substanzen stimmen mit den in der Literatur zitierten überein^{54,55}.

ERGEBNIS UND DISKUSSION

Für die Untersuchung auf Isoflavone sind in Mitteleuropa vor allem der als Viehfutter verwendete Weiss- und Rotklee von Bedeutung. Der in Australien häufig angebaute und isoflavonreiche *Trifolium subterraneum* gedeiht in unseren Breiten nicht. Belässt man Klee zum Trocknen auf dem Feld, so geht seine östrogene Aktivität verloren^{56,57}. Hingegen soll durch sorgfältige Ofentrocknung keine Abnahme an Iso-

TABELLE I

ISOFLAVONGEHALT DES ROTKLEES (SORTE OBERHAUNSTÄDTER) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER LAGERUNG

Lagerung	mg/100 g Trockensubstanz				
	Biochanin A	Formononetin	Pratensein	Genistein	Daidzein
Gefriergetrocknet, sofort verarbeitet	365	948	40	50	23
Gefriergetrocknet, 8 Monate bei Raum- temperatur gelagert	193	248	22	32	14
Gefriergetrocknet, 8 Monate bei 4 gelagert	199	224	20	30	28

flavonen eintreten^{56,58}. Eine längere Lagerung getrockneter Proben ist möglichst zu vermeiden, da sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4° ein Isoflavonverlust entsteht (siehe Tabelle I).

Bei der Extraktion der östrogenen Stoffe ist zu beachten, dass diese zum grössten Teil als Glycoside in der Pflanze vorliegen. Verschiedene Autoren schlugen eine Glycosidspaltung durch endogene Glycosidasen vor^{29,41}. Nach Francis und Millington⁵⁹ ist jedoch gleichzeitig mit der Wirkung von Polyphenoloxidasen zu rechnen, die einen Teil der Isoflavone, besonders leicht das Genistein, zerstören können. Wir zogen daher die einstündige Säurehydrolyse mit 1 N Salzsäure auf dem Wasserbad vor⁶⁰. Eine Neutralisation der Salzsäure nach der Hydrolyse auf etwa pH 5-7 ist notwendig, da sonst die noch vorhandene Salzsäure im konzentrierten Extrakt das Polyamid auf der Säule als auch auf der Dünnschichtplatte auflöst. Zur Extraktion wird allgemein für die Gewinnung der Isoflavonaglycone aus Trockenmaterial Aceton verwendet, das nach Bickoff *et al.*⁶¹ die meisten Östrogene und die wenigsten Ballaststoffe erfassen soll. Das Entfernen der Ballaststoffe ist durch die alleinige Verwendung von Petroläther zum Ausschütteln begrenzt, da bereits Formononetin in dem polareren Lösungsmittel Chloroform und alle anderen Isoflavone einschliesslich Cumöstrin in Äther oder Essigester gelöst werden. Diese Beschränkung lässt sich auch nicht umgehen, indem man die Isoflavone durch Laugenzugabe in ihre Salze überführt und somit in der wässrigen Phase zurückhält. Ausserdem konnten wir bei der spektrophotometrischen Untersuchung von Formononetin in ammoniakalischer Lösung feststellen, dass seine Absorption abnimmt. Es scheint also für Isoflavone keine Stabilität im alkalischen Milieu zu bestehen.

Wie eine Prüfung ergab, enthält der an den Grenzflächen auftretende Schlamm Formononetin. Bereits Wong weist auf die Schwierigkeit hin, Formononetin in Lösung zu bringen²⁹. Dieser Schlamm darf daher beim Abtrennen der isoflavonhaltigen unteren Phase nicht mit dem Petroläther verworfen werden, sondern muss nach dem Eindampfen der unteren Phase mit auf die Säule gebracht werden. Eine direkte Dünnschichtchromatographie nach dem Ausschütteln ist allein durch den vorhandenen festen Anteil nicht möglich. Ein Versuch zeigt auch, dass durch zu viele störende Substanzen die geringen Mengen Isoflavone überlagert und die Platte selbst überladen werden.

Zur säulenchromatographischen Reinigung der Isoflavone war Polyamid ver-

TABELLE II

WIEDERGEFUNDENE MENGEN SYNTHETISIERTER ISOFLAVONE NACH DER CHROMATOGRAPHIE AUF POLYAMIDSÄULEN VON 20 UND 40°

Isoflavone	Wiedergefundene Menge (%)	
	20°	40°
Biochanin A	92	108
Formononetin	21	89
Pratensein	89	96
Genistein	86	102
Daidzein	95	97
Cumöstrol	93	98

glichen mit Kieselgel und Cellulose am besten geeignet. Sein Nachteil ist die geringe Fließgeschwindigkeit des Elutionsmittels bei niedrigem Alkoholgehalt. Eine Auflockerung des Polyamids durch Celite-Zugabe brachte keinen Erfolg. Wurden von den synthetisierten Isoflavonen und dem Cumöstrol 10 mg der Säulenchromatographie auf 10 g Polyamid und einer Elution mit 35–95%igem Äthanol unterworfen, so konnten etwa 90% der meisten Isoflavone und des Cumöstrols von Formononetin jedoch nur 20% wiedergefunden werden. Durch Erwärmen der Säule auf 40° wurde eine gute Fließgeschwindigkeit erzielt und die eluierten Substanzmengen auf etwa 100% bei Formononetin auf 90% erhöht (siehe Tabelle II). Die Elution soll mit 35%igem Äthanol begonnen werden, um das von der Neutralisation herrührende Natriumchlorid und störende braune, wasserlösliche Substanzen zu entfernen. Etwa ab Fraktion 7 erscheinen Formononetin und Biochanin A. In den Fraktionen 10 bis 20 kommen Genistein, Pratensein und Daidzein vor. Um alles Formononetin zu erfassen, sind je nach Gehalt im gefriergetrockneten Klee die Fraktionen 7 bis 40 zu sammeln. Mit 80 und 95%igem Äthanol wird Cumöstrol eluiert, das aber in unserem Rotkleematerial nicht nachweisbar war. Restliches Chlorophyll tritt mit 65%igem Äthanol aus der Säule und stört weder die Bestimmung der Isoflavone noch die des Cumöstrols.

Da die Konzentrationen der einzelnen Isoflavone im Klee recht unterschiedlich sind, ist eine Trennung dieser Substanzen auf der Säule erschwert: sie bleibt der Dünnschichtchromatographie vorbehalten. Dafür wurde ein neues Verfahren entwickelt: Die gesuchten Flecke werden nicht wie gewöhnlich nach dem Markieren abgeschabt, eluiert, filtriert, die Eluate eingedampft und der Rückstand erneut aufgetragen, sondern man belässt die Flecken zur Vermeidung von Substanzverlusten und zur Arbeitseinsparung auf den Platten und erneuert besser das übrige Polyamid. Nach der zweiten und dritten dünnschichtchromatographischen Entwicklung kann ein Teil des Polyamids zurückgewonnen und für qualitative Zwecke verwendet werden. Die Betrachtung und Markierung der Isoflavonflecken unter der UV-Lampe soll im nassen und trockenen Zustand bei 254 und 366 nm geschehen. Biochanin A, Pratensein und Genistein sind erst nach dem Trocknen als dunkle Flecken sichtbar, Formononetin und Daidzein nach der zweiten und dritten Entwicklung besonders auf der feuchten Platte. Ist das Fließmittel von der Platte verdunstet, so nimmt die Fluoreszenz der beiden letzten Isoflavone ab, die Flecken erscheinen kleiner, was zu Substanzverlust führt. Ebensovichtig für die Reinheit der Isoflavone ist die Prüfung der feuchten und trockenen Platte auf störende fremde Flecken.

Die Reinigung des Cumöstrols, das durch seine intensive Fluoreszenz stets leicht zu erkennen war, ist deshalb auf Kieselgel vorgenommen worden, weil die Entwicklung auf Polyamid zu starker Schwanzbildung führte. Die Flecken sind sehr ausgedehnt, und die Ergebnisse wurden durch die grosse zu eluierende Polyamidmenge gefälscht. Auf der Kieselgel-Platte wurden oberhalb des Cumöstrolsfleck zwei weitere gut getrennte Flecken gleicher Fluoreszenz beobachtet. Das dem Cumöstrol sehr ähnliche Absorptionsspektrum und die gegenüber Cumöstrol höheren R_F -Werte lassen in diesen beiden Flecken 4'-O-Methylcumöstrol und 3'-Methoxycumöstrol vermuten⁶²⁻⁶⁵, wobei die beiden nicht identifizierten Stoffe im Vergleich mit Cumöstrol in manchen Weissklesorten überwogen, die gefundenen Mengen jedoch unbedeutend sind.

Führt man die Untersuchung nach dem Auftragen der Probe oder nach jeder dünn-schichtchromatographischen Entwicklung nicht weiter und lässt die Platten an der Luft und dem Licht einige Tage liegen, so wird die eluierte Isoflavonmenge aus

TABELLE III

FORMONONETIN- UND CUMÖSTROLGEHALT VERSCHIEDENER WEISSKLEESORTEN

-- weniger als 1 mg/100 g wasserfreien Klee.

Sorte	Herkunft des Saatgutes	mg/100 g wasserfreien Klee	
		Formononetin	Cumöstrol
Ladino	U.S.A., Handel	61	--
Ladino Lodi gig.	Lodi, Italien	40	--
Dänisch Handel	Dänemark, Handel	51	--
Cultura	Cebeco, Niederlande	76	--
Pertina	Cebeco, Niederlande	40	--
Wilka	Van der Have, Niederlande	76	--
Retor	Van der Have, Niederlande	66	--
Barbian	Barenburg, Niederlande	61	--
Pelu	Petersen, B.R.D.	66	--
Podkowa	Rolimpex, Polen	60	--
Mega Trifolium	Trifolium, Dänemark	81	--
Blanca	R.V.O., Belgien	22	--
Daeno	Daehnfeldt, Dänemark	47	--
Trifo Daehnfeldt	Daehnfeldt, Dänemark	31	--
NFG-Gigant	Deutsche Saatveredelung, Bremen, B.R.D.	37	--
von Kamekes	Deutsche Saatveredelung, Bremen, B.R.D.	66	--
Steinacher	Baywa, B.R.D.	91	--
Lodi Oetofte	Roskilde, Dänemark	70	--
Mira Oetofte	Roskilde, Dänemark	78	--
Wild English Oetofte	Roskilde, Dänemark	92	--
Oetofte	Roskilde, Dänemark	38	--
Milka	Pajbjerg, Dänemark	45	--
Milkanova	Pajbjerg, Dänemark	91	--
Huia	Palmerston, Neuseeland	60	--
S 100	Aberystwyth, Grossbritannien	35	--
S 184	Aberystwyth, Grossbritannien	63	--
Louisiana S-1	Agricultural Experiment Station, La., U.S.A.	47	--
Trévisé	Clause, Frankreich	47	--
Tregor	Vilmorin, Frankreich	62	--
Crau	INRA, Frankreich	28	--
Sabeda	PBI, Cambridge, Grossbritannien	76	--
Regal	Agricultural Experiment Station, Ala., U.S.A.	40	--

dem Polyamid durch erhöhte Adsorption oder Zerstörung der Substanzen erniedrigt. Nachdem die konzentrierten Fraktionen auf der Platte aufgetragen sind, soll die erste Entwicklung direkt anschliessend, die zweite in der folgenden Nacht und die dritte in der nächsten erfolgen. Zwei Tage nach dem Beschicken der Platte soll eluiert und am dritten gemessen werden.

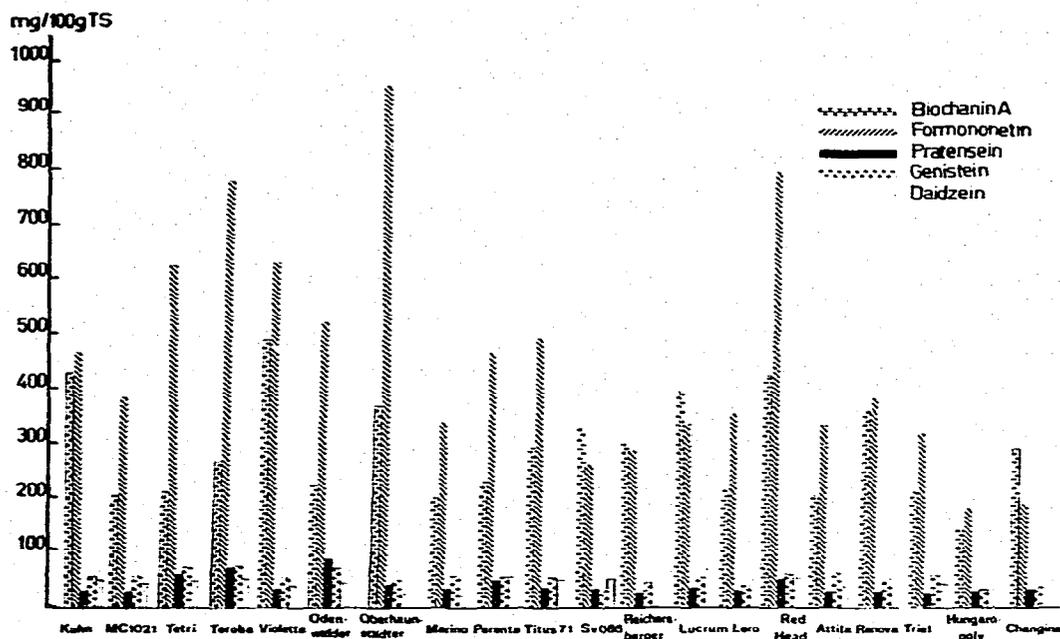


Fig. 5. Isoflavongehalt verschiedener Rotkleearten.

Wie Tabelle III zeigt, ist der Isoflavongehalt im Weissklee gegenüber Rotklee irrelevant: zusätzlich wurden geringe Mengen Cumöstrol gefunden. Für diese Bestimmung genügte uns die oben beschriebene halbquantitative Methode. Die Ergebnisse stimmen mit anderen Untersuchungen aus der Literatur überein^{8,42,66,67}, so dass für die Verfütterung von Weissklee keine Bedenken hinsichtlich Fortpflanzstörungen durch Isoflavone bestehen.

Betrachtet man nun das Isoflavonvorkommen in Rotklee (siehe Tabelle IV und Fig. 5), so kann man feststellen, dass mit Ausnahme von Cumöstrol alle fünf Isoflavone nachweisbar sind. Weiterhin dominieren im Rotklee Biochanin A und Formononetin gegenüber den anderen drei Substanzen, wie bereits Wong²⁹ berichtete. Im *Trifolium subterraneum* herrschen hingegen Biochanin A und Genistein vor. Im wesentlichen stimmen die ermittelten und die in der Literatur angegebenen Isoflavonkonzentrationen im Rotklee überein^{5,66}, die in erster Linie für künstlich getrockneten Klee gelten. Ein strenger Vergleich ist wegen der verschiedenen Arbeitsmethoden und Kleesorten, sowie der unterschiedlichen Wachstumsstadien der Pflanze nur bedingt möglich. Immerhin lässt sich erkennen, dass das Vorkommen und die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Isoflavone in den untersuchten Rotkleearten im we-

TABELLE IV
ISOFLAVONGEHALT VERSCHIEDENER ROTKLEESORTEN

Sorte	Typ	Herkunft des Saatgutes	mg/100 g wasserfreien Klee					
			Biochanin A	Formononetin	Pterocystin	Genistein	Daidzein	
Kuhn	Diploid	Van der Have, Niederlande	429	465	25	53	48	
MC 1021	Diploid	Forschungsanstalt Lausanne, Schweiz	201	369	24	55	43	
Tetri	Tetraploid	Mommersteeg, Niederlande	235	632	60	71	44	
Teroba	Tetraploid	Cebeco, Niederlande	263	768	77	78	52	
Violetta	Diploid	R. v. P., Belgien	478	628	32	53	51	
Odenwälder	Diploid	Städtische Saatzeit, B.R.D.	222	520	86	71	42	
Oberhaunstädter	Diploid	Franz Lütjamm, B.R.D.	369	940	41	50	24	
Marino	Diploid	Deutscher Saatgut-Handelsbetrieb, D.D.R.	200	317	33	55	56	
Perenia	Tetraploid	Deutscher Saatgut-Handelsbetrieb, D.D.R.	225	440	43	52	55	
Titus 71	Diploid	Deutscher Saatgut-Handelsbetrieb, D.D.R.	285	519	38	54	50	
Sv 086	Tetraploid	Saatzeit Steinell, B.R.D.	332	315	35	33	36	
Reichersberger	Diploid	Svalöf, Schweden	306	293	24	45	38	
Luernum	Diploid	Oberösterreich, Saatbahngossenschaft, Österreich	410	366	35	50	51	
Lero	Diploid	Saatzeit Steinach, B.R.D.	212	224	26	33	40	
Red Head	Diploid	Lembke, B.R.D.	397	448	52	57	58	
Atilla	Tetraploid	Van der Have, Niederlande	209	204	27	60	61	
Renova	Diploid	Van der Have, Niederlande	356	349	28	53	54	
Triel	Diploid	Forschungsanstalt Zürieh-Reckenholz, Schweiz	209	210	24	57	59	
Hungaropoly	Diploid	Vilmorin, Frankreich	148	143	29	32	34	
Changins	Tetraploid	Kompolt, Ungarn	292	289	29	39	37	
	Diploid	Forschungsanstalt Lausanne, Schweiz		182	194			

sentlichen genetisch bedingt sind. Bei der Untersuchung von Klee ist darauf zu achten, ob es sich um gesunde oder kranke Pflanzen handelt. Bickoff *et al.*⁶⁸ konnten an der Luzerne nachweisen, dass ihr Cumöstrolgehalt durch den Befall mit Pilzen, Bakterien oder Viren ansteigt. Obgleich der Isoflavongehalt im Rotklee niedriger als im *Trifolium subterraneum* ist, ist den Fortpflanzungsstörungen in der Rind- und Schafhaltung, besonders bei Grünfütterung von *Trifolium pratense*, vermehrte Aufmerksamkeit zuzuwenden.

ZUSAMMENFASSUNG

Für die Bestimmung der fünf als Östrogen bekannten Isoflavone — Biochanin A, Formononetin, Pratensein, Genistein, Daidzein — und des Cumarinderivates Cumöstrol in 32 Weissklee- und 20 Rotkleesorten wird eine Extraktionsmethode, sowie ein säulen- und dünnschichtchromatographisches Reinigungsverfahren beschrieben. Die quantitative Untersuchung wird spektrophotometrisch durchgeführt. Für die Bestimmung geringer Mengen Formononetin und Cumöstrol in Weissklee wird eine halbquantitative Methode angegeben. Die bei der Probenaufbereitung, Extraktion, Säulen- und Dünnschichtchromatographie sowie bei der Elution auftretenden Probleme werden diskutiert. Die chemische Untersuchung der sechs östrogenen Stoffe in Klee ermöglicht eine bessere Beurteilung, ob eventuelle Fruchtbarkeitsstörungen in der Viehhaltung auf diese Substanzen oder andere Ursachen zurückzuführen sind.

LITERATUR

- 1 R. B. Bradbury und D. E. White, *Vitam. Horm.*, 12 (1954) 207.
- 2 H. W. Benetts, *J. Dep. Agr. W. Austr.*, 21 (1944) 104.
- 3 H. W. Benetts, E. J. Underwood und F. L. Schier, *Aust. Vet. J.*, 22 (1946) 2.
- 4 J. B. Harborne, D. Boulter und B. L. Turner, *Chemotaxonomy of the Leguminosae*, Academic Press, London, New York, 1971, S. 48.
- 5 H. R. Lindner, *Aust. J. Agr. Res.*, 18 (1967) 305.
- 6 J. B. Harborne, *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, Academic Press, London, New York, 1967, S. 166.
- 7 E. M. Bickoff, A. N. Booth, R. L. Lyman, A. L. Livingston, C. R. Thompson und F. DeEds, *Science*, 126 (1957) 969.
- 8 J. Guggolz, A. L. Livingston und E. M. Bickoff, *J. Agr. Food Chem.*, 9 (1961) 330.
- 9 W. Barz und H. Grisebach, *Z. Naturforsch. B*, 21 (1966) 1113.
- 10 s. 6 S. 295.
- 11 D. S. Flux, G. F. Wilson und E. Wong, *J. Sci. Food Agr.*, 15 (1964) 407.
- 12 E. Cheng, L. Yoder, C. D. Story und W. Burroughs, *Science*, 120 (1954) 575.
- 13 E. W. Cheng, L. Yoder, C. D. Story und W. Burroughs, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 61 (1955) 652.
- 14 G. S. Pope und H. G. Wright, *Chem. Ind. (London)*, (1954) 1019.
- 15 A. Nillson, J. L. Hill und H. L. Davies, *Biochim. Biophys. Acta*, 148 (1967) 92.
- 16 E. Wong und D. S. Flux, *J. Endocrinol.*, 24 (1962) 341.
- 17 A. W. H. Braden, N. K. Hart und J. A. Lamberton, *Aust. J. Agr. Res.*, 18 (1967) 335.
- 18 E. M. Bickoff, A. L. Livingston, A. P. Hendrickson und A. N. Booth, *J. Agr. Food Chem.*, 10 (1962) 410.
- 19 E. M. Bickoff, *Physiology of Reproduction, Proceedings of the Twenty-Second Biology Colloquium, Oregon State University*, Oregon State University Press, 1961, S. 101.
- 20 G. W. Moersch, D. F. Morrow und W. A. Neuklis, *J. Med. Chem.*, 10 (1967) 154.
- 21 J. D. Biggers, in J. W. Farbain (Editor), *Pharmakology of Plant Phenolics*, Academic Press, London, New York, 1958, S. 51-69.

- 22 Y. Folman und G. S. Pope, *J. Endocrinol.*, 34 (1966) 215.
- 23 E. M. Bickoff, A. L. Livingston und A. N. Booth, *Arch. Biochem. Biophys.*, 88 (1960) 262.
- 24 W. K. Warburton, *Quart. Rev.*, 8 (1954) 67.
- 25 D. H. Curnow, T. J. Robinson und E. J. Underwood, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 26 (1948) 171.
- 26 A. L. Livingston, E. M. Bickoff, J. Guggolz und C. R. Thompson, *J. Agr. Food Chem.*, 9 (1961) 135.
- 27 A. L. Livingston, E. M. Bickoff, J. Guggolz und C. R. Thompson, *Anal. Chem.*, 32 (1960) 1620.
- 28 W. Barz, *Z. Naturforsch. B.*, 24 (1969) 234.
- 29 E. Wong, *J. Sci. Food Agr.*, 13 (1962) 304.
- 30 G. S. Pope, S. A. Simpson, P. V. Elcoak und D. G. Andrews, *Chem. Ind. (London)*, (1953) 1092.
- 31 L. Hörhammer, H. Wagner und H. Grasmaier, *Naturwissenschaften*, 45 (1958) 388.
- 32 G. Schultz, *Naturwissenschaften*, 52 (1965) 517.
- 33 D. H. Curnow, *Biochem. J.*, 58 (1954) 283.
- 34 E. Wong, *J. Sci. Food Agr.*, 14 (1963) 376.
- 35 E. Wong, P. I. Mortimer und T. A. Geissman, *Phytochemistry*, 4 (1965) 89.
- 36 M. N. Cayen, G. Tang und R. H. Common, *Biochim. Biophys. Acta*, 86 (1964) 56.
- 37 E. Wong und A. O. Taylor, *J. Chromatogr.*, 9 (1962) 449.
- 38 J. Churý und F. Prošek, *Vet. Med. Prague*, 13 (1968) 305; *C.A.*, 70 (1969) 34902f.
- 39 E. C. Bate-Smith, T. Swain und G. S. Pope, *Chem. Ind. (London)*, (1953) 1127.
- 40 D. H. Curnow und R. C. Rossiter, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 33 (1955) 243.
- 41 A. B. Beck, *Aust. J. Agr. Res.*, 15 (1964) 223.
- 42 C. M. Francis, A. J. Millington und E. T. Bailey, *Aust. J. Agr. Res.*, 18 (1967) 47.
- 43 R. L. Lyman, A. N. Booth, E. M. Bickoff und A. L. Livingston, *Arch. Biochem. Biophys.*, 80 (1959) 61.
- 44 H. Grisebach und G. Brandner, *Z. Naturforsch. B.*, 16 (1961) 2.
- 45 S. P. Legg, D. H. Curnow und S. A. Simpson, *Biochem. J.*, 46 (1950) XIX.
- 46 R. C. Rossiter und A. B. Beck, *Aust. J. Agr. Res.*, 18 (1967) 561.
- 47 J. Sachse, *J. Chromatogr.*, 58 (1971) 297.
- 48 L. Yoder, E. Cheng und W. Burroughs, *Proc. Iowa Acad. Sci.*, 61 (1954) 271.
- 49 R. N. Iyer, K. H. Shah und K. Venkataraman, *Proc. Indian Acad. Sci.*, 33A (1951) 116.
- 50 S. A. Kagel, P. Madhavan Nair und K. Venkataraman, *Tetrahedron Lett.*, (1962) 593.
- 51 E. Wong, *J. Org. Chem.*, 28 (1963) 2336.
- 52 W. Baker, J. B. Harborne und W. D. Ollis, *J. Chem. Soc. (London)*, (1953) 1852.
- 53 L. Jurd, *J. Org. Chem.*, 29 (1964) 3036.
- 54 T. J. Mabry, K. R. Markham und M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verlag, Berlin, 1970.
- 55 O. H. Emerson und E. M. Bickoff, *J. Amer. Chem. Soc.*, 80 (1958) 4380.
- 56 H. L. Davies und M. L. Dudzinski, *Aust. J. Agr. Res.*, 16 (1965) 937.
- 57 C. M. Francis und A. J. Millington, *Aust. J. Agr. Res.*, 16 (1965) 23.
- 58 W. Dedio und K. W. Clark, *Can. J. Plant Sci.*, 49 (1969) 185.
- 59 C. M. Francis und A. J. Millington, *Aust. J. Agr. Res.*, 16 (1965) 557.
- 60 H. Imaseki, R. E. Wheeler und T. A. Geissman, *Tetrahedron Lett.*, (1965) 1785.
- 61 E. M. Bickoff, A. N. Booth, R. L. Lyman, A. L. Livingston und A. P. Hendrickson, *J. Animal Sci.*, 18 (1959) 1000.
- 62 L. Jurd, *J. Org. Chem.*, 24 (1959) 1786.
- 63 E. M. Bickoff, A. L. Livingston, S. C. Witt, R. E. Lundin und R. R. Spencer, *J. Agr. Food Chem.*, 13 (1965) 597.
- 64 E. M. Bickoff, R. R. Spencer, B. E. Knuckles und E. R. Lundin, *J. Agr. Food Chem.*, 14 (1966) 444.
- 65 C. M. Francis und A. J. Millington, *Aust. J. Agr. Res.*, 22 (1971) 75.
- 66 A. Shutt, A. Axelsen und H. R. Lindner, *Aust. J. Agr. Res.*, 18 (1967) 647.
- 67 E. Cheng, C. D. Story, L. C. Payne, L. Yoder und W. Burroughs, *J. Animal Sci.*, 12 (1953) 507.
- 68 E. M. Bickoff, G. M. Loper, C. H. Hanson, J. H. Graham, S. C. Witt und R. R. Spencer, *Crop Sci.*, 7 (1967) 259.