

ZUR CHROMATOGRAPHIE VON FLAVONOLEN IM FLIESSMITTELSYSTEM CHLOROFORM-EISESSIG-WASSER

KURT EGGER

Botanisches Institut der Universität Heidelberg (Deutschland)

(Eingegangen den 23. Mai 1960)

Zahlreiche Fließmittelsysteme sind zur chromatographischen Analyse von Flavonolen mit Erfolg erprobt und beschrieben worden. Sie erlauben die Lösung der meisten auftretenden Probleme. Zu den noch unbefriedigend gelösten Aufgaben gehören die Trennung der 3-Rhamnoside von Myricetin, Quercetin und Kaempferol, eine sichere Abtrennung der Monomethyläther von den homologen Hydroxylverbindungen sowie ein sicherer Nachweis des Kaempferols neben seinen häufigsten Begleitern bei möglichst mittleren R_F -Werten.

Mit dem im Folgenden beschriebenen Fließmittelsystem konnten bei geeigneter Variation des Mischungsverhältnisses brauchbare analytische Ergebnisse erzielt werden. Um einen raschen Überblick über die Anwendbarkeit in speziellen Fällen zu ermöglichen, wird die vorangegangene kurze Darstellung¹ ergänzt durch die Wiedergabe des Verhaltens einiger Flavonole im gesamten Bereich der Fließmittelfolge, die durch die Begrenzung der Mischungslücke des ternären Systems Chloroform-Eisessig-Wasser definiert wird (Fig. 1). Die graphischen Darstellungen ent-

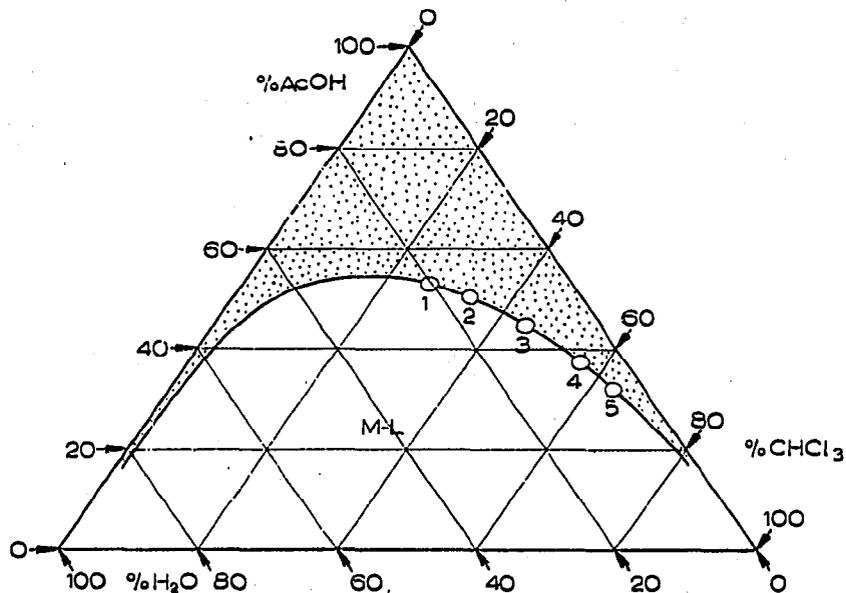


Fig. 1. Diagramm des ternären Systems CHCl_3 -AcOH- H_2O . Die Begrenzung der Mischungslücke (M.-L.) definiert die hier beschriebene Fließmittelfolge. 1-5 die bevorzugten Gemische, für die in Tabelle I R_F -Werte angegeben sind. Gemisch 1: CHCl_3 -AcOH = 1:2, Gem. 2 = 2:3, Gem. 3 = 1:1, Gem. 4 = 3:2, Gem. 5 = 2:1, jeweils wassergesättigt.

halten nur die wichtigsten Verbindungen, weitere Ergebnisse sind in der Tabelle I zusammengefasst.

TABELLE I

R_F -WERTE VON 24 FLAVONOLEN IN FÜNF VERSCHIEDENEN GEMISCHEN VON CHLOROFORM, EISESSIG UND WASSER

Name	Substitution	Chloroform-Eisessig: Mischungsverhältnis				
		1	2	3	4	5
		1:2	2:3	1:1	3:2	2:1
Rhamnocitrin	3,5,4'-OH 7-OCH ₃	98	97	97	96	96
Kaempferid	3,5,7-OH 4'-OCH ₃	96	95	94	94	93
Galangin	3,5,7-OH	95	94	92	91	91
Datiscetin	3,5,7,2'-OH	95	95	87	81	68
Rhamnetin	3,5,3',4'-OH 7-OCH ₃	86	80	72	63	51
Isorhamnetin	3,5,7,4'-OH 3'-OCH ₃	79	75	68	59	50
Kaempferol	3,5,7,4'-OH	68	62	50	38	28
Morin	3,5,7,2',4'-OH	61	52	31	21	15
Patuletin	3,5,7,3',4'-OH 6-OCH ₃	59	52	37	28	19
Nortangeretin	3,5,6,7,4'-OH	40	34	21	15	09
Quercetin	3,5,7,3',4'-OH	40	34	22	13	08
Quercetagetin	3,5,6,7,3',4'-OH	46	34	16	07	03
Myricetin	3,5,7,3',4',5'-OH	19	14	06	03	03
Norauranetin	3,6,7,8,4'-OH	18	13	06	03	02
<i>Glykoside</i>						
Afzelin	K-3-rh	75	64	38	19	13
Kaempferol-3-arabinosid	K-3-arab	74	60	36	20	13
Astragalinalin	K-3-gluk	69	54	31	15	08
Quercitrin	Q-3-rh	61	48	24	10	05
Robinin	K-3-rhgal-7-rh	65	51	20	07	03
Hyperosid	Q-3-gal	55	43	18	07	03
Nicotiflorin	K-3-rhgluk	59	48	14	07	03
Rutin	Q-3-rhgluk	52	41	13	05	02
Myricitrin	My-3-rh	44	33	13	04	02
Quercimeritrin	Q-7-gluk	34	27	10	03	02

Erläuterungen: K = Kaempferol, Q = Quercetin, -rh = -rhamnosid, -arab = -arabinosid, -gluk = -glukosid, -gal = -galaktosid. Mischungsverhältnisse in Volumenteilen. Wanderungswerte in $R_F \times 100$.

Zur Darstellung. Bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse muss über die Einteilung der Abszisse willkürlich verfügt werden. Die in den Fig. 3-6 verwendete Skala stellt die linear gestreckte Begrenzung der Mischungslücke dar, welcher willkürlich die Länge 10 zugeschrieben wird. Die Mischungsverhältnisse, die den Skalenteilen im einzelnen zuzuordnen sind, lassen sich der Fig. 2 entnehmen. Ab Skalenteil 5 ist die Abszisse annähernd linear bezüglich des Gehaltes der Gemische an Chloroform, von 0-5 dagegen annähernd linear bezüglich des Wassergehaltes. Auf diese Weise kommt der Einfluss aller drei Komponenten des Gemisches gleichmässig zur Geltung, was nicht der Fall ist, wenn auf der Abszisse nur % H₂O oder % CHCl₃ linear abgetragen werden. So erkennt man auch klar die Abhängigkeit der R_F -Werte von der Essigsäure-Konzentration: die maximalen R_F -Werte liegen im Gebiet maximalen Essigsäure-Gehaltes.

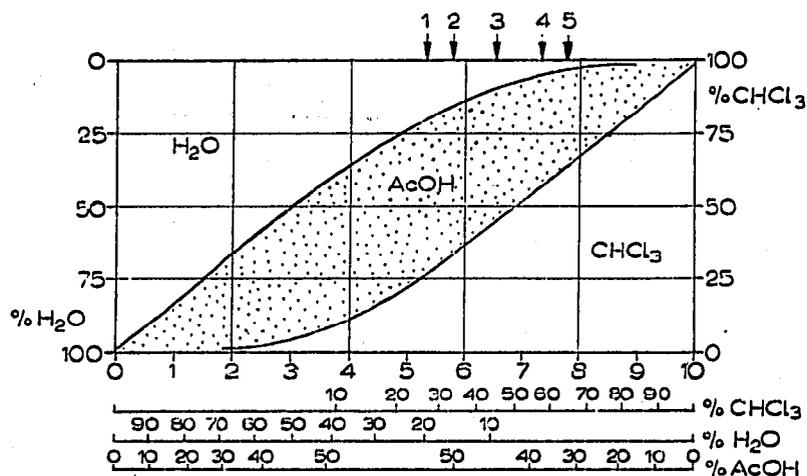


Fig. 2. Diagramm der an der Begrenzung der Mischungslücke liegenden Gemische des Systems CHCl_3 -AcOH- H_2O . Der Rand der Mischungslücke ist linear abgetragen und mit einer Dezimalskala versehen. 1-5 die bevorzugten Gemische, vgl. Fig. 1. Der Fig. können die den einzelnen Skalenwerten zuzuordnenden Mischungsverhältnisse entnommen werden.

METHODE

Die Ergebnisse wurden bei aufsteigender Entwicklung der Chromatogramme teils in einfachen Glastöpfen, teils in der Kammer nach EGGÉR UND ENSSLIN² gewonnen. Die Laufzeit beträgt etwa 13-18 Stunden bei einer Laufstrecke von 17-20 cm. Als Lösungsmittel dienten 20 verschiedene Gemische (gleichmässig über den Rand der Mischungslücke verteilt) von Chloroform, Eisessig und Wasser. Die fertigen getrockneten Chromatogramme wurden mit 5%iger saurer methanolischer Lösung von Zirkonoxychlorid gesprüht. Es wurde das sehr harte Papier 263 von Macherey, Nagel & Co. verwendet. Die Temperatur im Chromatographierraum betrug $19 \pm 1^\circ$.

Die starke Flüchtigkeit des Chloroforms erfordert gut geschlossene Kammern und Temperaturen möglichst nicht über $18-20^\circ$. Da die R_F -Werte sehr stark vom Chloroform-Gehalt abhängen (steiler Kurvenverlauf gerade im bevorzugten Gebiet), muss sogar berücksichtigt werden, dass nach dem Einbringen des Gemisches ein beträchtlicher Anteil an Chloroform an die Kammeratmosphäre abgegeben wird. Im Falle ungenügend geschlossener Kammern wird die Reproduzierbarkeit der Werte sehr schlecht. Die in der vorangegangenen Mitteilung¹ beschriebenen R_F -Werte sind noch durchweg zu hoch und entsprechen einem Gemisch mit niedrigerem Chloroform-Gehalt als angegeben. Die Entwicklung darf auch nicht zu lange dauern, da stets etwas Lösungsmittel vom Papier verdunstet und die R_F -Werte damit verfälscht werden.

Die Laufgeschwindigkeit hängt stark von der Zusammensetzung des Gemisches ab. Sie geht bei maximaler Essigsäure-Konzentration durch ein Minimum, steigt zur Wasserseite hin mässig, zur Chloroformseite hin sehr stark an. Chloroformreiche Gemische steigen gut doppelt so rasch als Butanolgemische. Die Entwicklung erfolgt bei den meist verwendeten weichen Papieren (Schleicher und Schüll 2043, Whatman No. 1) so rasch, dass die optimale Trennung nicht mehr erreicht wird. Bei den sehr harten Papieren (Macherey, Nagel & Co., No. 263, Schleicher und Schüll. 2045a) jedoch

geht die Entwicklung hinreichend langsam, um die hohe Trennfähigkeit voll auszunutzen, gleichzeitig aber noch hinreichend schnell, um die oft auftretenden Störungen durch Temperaturgefälle gering zu halten.

Innerhalb der Gruppe der Tri- bis Hexa-oxyflavone, ihrer Glykoside und Monomethyläther wird eine sehr scharfe Differenzierung erreicht. Die Fleckenzeichnung ist im Bereich 3.5–7.5 sehr gut, ausserhalb stört vor allem bei den Aglykonen Schweifbildung.

Zur photographischen Wiedergabe wurde das Rundfilterchromatogramm mit Glykosiden unbehandelt gegen eine blau fluoreszierende Unterlage gepresst und im auffallenden U.V.-Licht photographiert. Die Glykosidzonen erscheinen dabei dunkel auf blauem Grund. Fig. 7 stellt somit ein Positiv dar. Das aufsteigend entwickelte Chromatogramm mit Aglykonen wurde nach dem Sprühen mit Zirkon unter Verwendung eines gelbdurchlässigen Filters im auffallenden U.V.-Licht photographiert. Es erscheinen helle Flecken auf dunklem Grund. Fig. 8 stellt also ebenfalls ein Positiv dar.

DISKUSSION DER R_F -WERTE

(1) Glykoside. Das Verhalten der Glykoside sei am Beispiel der 3-Rhamnoside von Myricetin, Quercetin und Kaempferol gezeigt. Diese Verbindungen werden in Butanol-Essigsäure-Wasser-Gemischen zwar noch gut getrennt, besitzen dort aber unangenehm hohe Wanderungswerte, die vor allem ein präparatives Arbeiten mit Zellsäulen erschweren. In wasserreichen Mischungen dagegen ist die Trennung sehr schlecht. Fig. 3 zeigt die R_F -Werte in der Chloroform-Fliessmittelfolge. Im Bereich

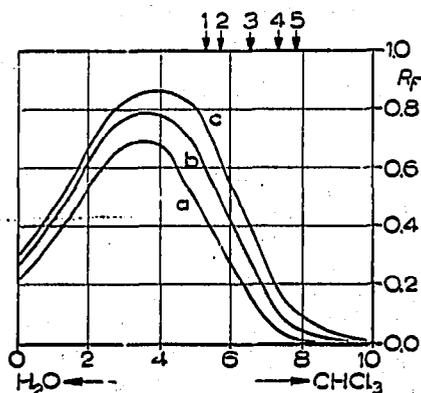


Fig. 3. Abhängigkeit der R_F -Werte der Glykoside Myricitrin (a), Quercitrin (b) und Afzelin (c) von der Zusammensetzung des Fliessmittels. Erläuterungen vgl. Fig. 1 und 2.

4.5–7.5 verlaufen die Kurven nahezu parallel. Das erlaubt, beliebig niedrige Wanderungswerte durch geeignete Wahl der Chloroform-Konzentration einzustellen. Bei Gemischen mit über 45 % CHCl_3 wird zweckmässigerweise auf Durchlauf entwickelt. Das Verfahren lässt sich gut auf Zellsäulen übertragen³.

Die 3-Hexoside verhalten sich ähnlich wie die Rhamnoside. Im Bereich 4–8 verlaufen ihre R_F -Kurven so, dass gilt:

$$R_F(\text{My} - \text{hex}) < R_F(\text{My} - \text{rh}) < R_F(\text{Q} - \text{hex}) < R_F(\text{Q} - \text{rh}) < R_F(\text{K} - \text{hex}) < R_F(\text{K} - \text{rh}) \quad (1)$$

wobei rh = 3-rhamnosid, hex = 3-hexosid. Diese Beziehung (1) wird durch das in Fig. 7 wiedergegebene Rundfilterchromatogramm veranschaulicht. Es ist mit dem Gemisch Chloroform-Eisessig 1:1, wassergesättigt, entwickelt worden.

(2) Die analytisch besonders wichtigen Aglykone, Myricetin, Quercetin, und Kaempferol werden im Bereich 4–8 sehr gut getrennt. Die R_F -Werte zeigt Fig. 4.

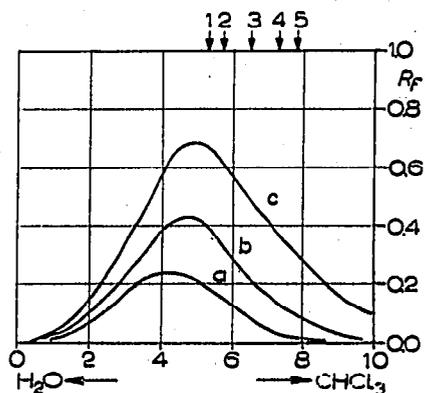


Fig. 4. Abhängigkeit der R_F -Werte der Aglykone Myricetin (a), Quercetin (b) und Kaempferol (c) von der Zusammensetzung des Fließmittels. Erläuterungen vgl. Fig. 1 und 2.

Insbesondere um 6–7.5 ist die Bestimmung von Quercetin und Kaempferol wesentlich sicherer als bei Entwicklung in Butanol-Gemischen, wo die zu hohen Wanderungswerte und die häufige Überlagerung mit fluoreszierenden Begleitern stören⁴. Fig. 8 zeigt die Abtrennung des Kaempferols von dem sehr viel tiefer liegenden Quercetin, entwickelt mit dem Gemisch Chloroform-Eisessig 2:3, wassergesättigt.

(3) Überraschend ist das Verhalten der Methyläther, das die Fig. 5 und 6 zeigen. Im Bereich 5–10 bewirkt die Methoxylgruppe nicht, wie beim Partridge-Gemisch,

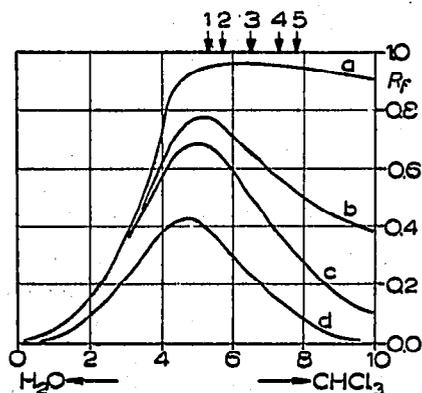
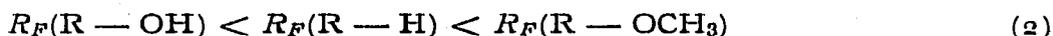


Fig. 5. Abhängigkeit der R_F -Werte der Methyläther Kaempferid (a) und Isorhamnetin (b) sowie der zugehörigen Hydroxylverbindungen Kaempferol (c) und Quercetin (d) von der Zusammensetzung des Fließmittels. Erläuterungen vgl. Fig. 1 und 2.

eine geringe Senkung des R_F -Wertes, sondern erhöht diesen im Gegenteil so stark, dass der Methyläther im Chromatogramm höher zu liegen kommt als die um einen Substituenten ärmere Hydroxylverbindung. Das ergibt die Beziehung:



die für Tri- bis Hexa-oxyflavone gültig ist. Im Partridge-Gemisch gilt dagegen:

$$R_F(R - OH) < R_F(R - OCH_3) < R_F(R - H). \quad (3)$$

Das gestattet, Methyläther im zweidimensionalen Chromatogramm gut zu charakterisieren. Zusammen mit den korrespondierenden Hydroxylverbindungen der Beziehungen (2) und (3) entwickelt, verraten sie sich durch eine charakteristische Dreiecks-Anordnung der Flecke. Isorhamnetin und Rhamnetin lassen sich eindimensional neben Quercetin und Kaempferol sicher bestimmen (Fig. 8, Chromatogramm aufsteigend in $CHCl_3$ -AcOH 2:3, wassergesättigt, entwickelt). Die Beziehung (2) ist auch für Glykoside von Methyläthern gültig.

(4) Morin und Daticetin haben in der gesamten Folge auffallend hohe R_F -Werte, Fisetin, Robinetin, 3,6,7,8,4'-Pentahydroxyflavon sowie 3,6,7,8,3',4'-Hexahydroxy-

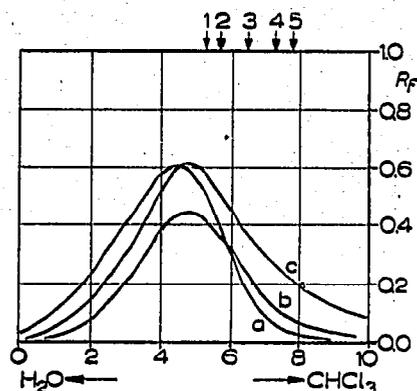


Fig. 6. Abhängigkeit der R_F -Werte der Aglykone Quercetagenin (a), Nortangeretin (b) und Patuletin (c) von der Zusammensetzung des Fließmittels. Erläuterungen vgl. Fig. 1 und 2.

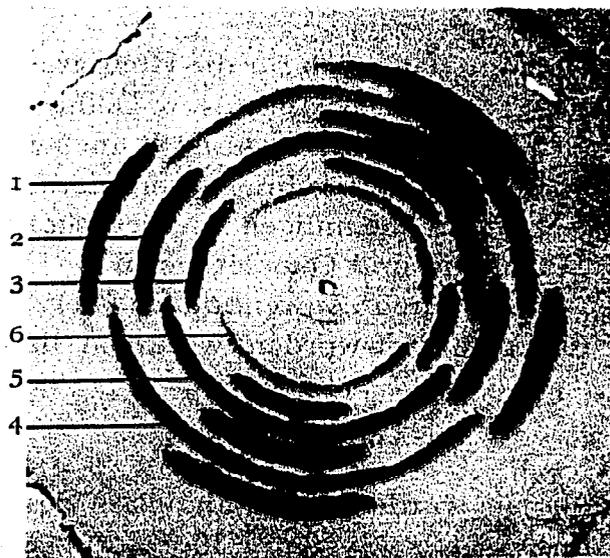


Fig. 7. Rundfilterchromatogramm, das die R_F -Beziehung (1) veranschaulicht, mit den Glykosiden: 1 = Afzelin, 2 = Quercitrin, 3 = Myricitrin, 4 = Astragalinalin, 5 = Hyperosid, 6 = unbekanntes Myricetin-3-hexosid. Fließmittel $CHCl_3$ -AcOH 1:1, wassergesättigt. Papier von Macherey, Nagel & Co., No. 263.

flavon wandern dagegen sehr langsam. Ihr R_F -Wert konvergiert mit steigender CHCl_3 -Konzentration rasch gegen jenen der Verbindungen, die in 5-Stellung zusätzlich eine OH-Gruppe tragen. Galangin wandert geringfügig langsamer als Kaempferid. Robinin hat in der ganzen Folge höhere R_F -Werte als Rutin, die Werte konvergieren stetig mit steigendem CHCl_3 -Gehalt der Gemische.

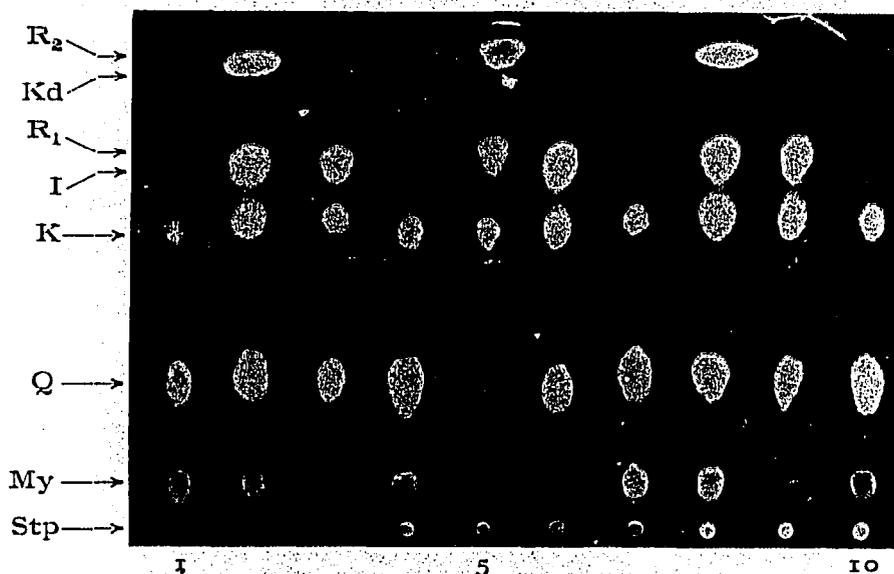


Fig. 8. Aufsteigend entwickeltes Chromatogramm mit Aglykonen. Über den Startpunkten 1-4 und 6-10 verschiedene Mischungen von: My = Myricetin, Q = Quercetin, K = Kaempferol, I = Isorhamnetin, Kd = Kaempferid. Laufspur 5 trägt ein natürliches Gemisch der Aglykone aus Rhamnusbeeren mit Rhamnetin (R_1) und Rhamnocitrin (R_2). Stp = Startlinie mit nachträglich markierten Startpunkten.

DANK

Herrn Prof. G. BARGELLINI, Rom, danke ich für die Überlassung von 3,6,7,8,4'-Pentahydroxyflavon, Herrn Prof. T. R. SESHADRI, New-Delhi, für die Zusendung von Nortangeretin. Herrn Prof. Dr. L. HÖRHAMMER, München, gilt mein besonderer Dank für die Überlassung von Astragalin, Kaempferol-3-rhamnoglukosid und Kaempferol-3-arabinosid. Meinem ehemaligen Institutskollegen Dr. W. ENSSLIN danke ich für Proben von Patuletin und Quercetagenin.

Die Untersuchungen sind durch Zuwendungen der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht und gefördert worden, wofür an dieser Stelle gedankt sei.

ZUSAMMENFASSUNG

An einer Reihe von Flavonolen wurde die Abhängigkeit des R_F -Wertes von der Zusammensetzung des Lösungsmittels (System Chloroform-Eisessig-Wasser) gezeigt. Dabei ergibt sich: Gemische im Bereich von 25-70% CHCl_3 sind zur Chromatographie von Flavonolen vorzüglich geeignet. Bei guter Trennschärfe liegen einige günstige R_F -Beziehungen vor, die gestatten:

(1) Kaempferol sehr sicher und getrennt von störenden Begleitern zu bestimmen,
(2) Methyläther glatt von zugrunde liegenden Hydroxylverbindungen zu trennen und sie—insbesondere im zweidimensionalen Chromatogramm—schnell als solche zu erkennen,

(3) eine sehr scharfe Trennung der Rhamnoside, Glukoside und Gemische beider von Myricetin, Quercetin und Kaempferol durchzuführen.

Besonders günstig sind Gemische von Chloroform und Eisessig im Verhältnis von 1:2 bis 2:1, jeweils wassergesättigt und einphasig. Es werden die R_F -Werte von 24 Flavonolen in 5 Gemischen dieses Bereichs gegeben.

SUMMARY

The dependence of the R_F value on the composition of the solvent system (chloroform-acetic acid-water) is demonstrated in the case of a number of flavonols. It was established that mixtures containing 25–70 % CHCl_3 are well suited for the chromatography of flavonols and that the R_F relations make it possible:

(1) to obtain kaempferol free from troublesome impurities,

(2) to separate methyl ethers clearly from the corresponding hydroxyl compounds and, especially in the case of two-dimensional chromatography, to rapidly recognize the methyl ethers as such, and

(3) to obtain a very sharp separation of the rhamnosides, glucosides and mixtures thereof from myricetin, quercetin and kaempferol.

Water-saturated and mono-phase mixtures of chloroform and acetic acid with ratios ranging from 1:2 to 2:1 are particularly favourable. The R_F values of 24 flavonols obtained with five mixtures within this range are given.

LITERATUR

- ¹ K. EGGER, *Z. anal. Chem.*, 171 (1959) 96.
- ² K. EGGER UND W. ENSSLIN, *Z. anal. Chem.*, 169 (1959) 16.
- ³ K. EGGER UND H. REZNIK, *Z. Naturforsch.*, (im Druck).
- ⁴ H. REZNIK UND K. EGGER, *Z. Naturforsch.*, 15 b (1960) 247.