

## Notes

### Kieselgel-Dünnschichtchromatographie von Flavonoiden

Die Chromatographie von Flavonoiden wurde bisher fast ausschliesslich auf Papier durchgeführt. Besonders brauchbar erwiesen sich die von BATE-SMITH UND WESTALL<sup>1</sup>, ROUX UND EVELYN<sup>2</sup>, HERGERT<sup>3</sup>, HÖRHAMMER, WAGNER UND GÖTZ<sup>4</sup> sowie von EGGER<sup>5</sup> und neuerdings von WONG UND TAYLOR<sup>6</sup> vorgeschlagenen Laufmittel. Die ersten Versuche, Flavonoide auch dünnschichtchromatographisch zu trennen, stammen von STAHL UND SCHORN<sup>7</sup> sowie von PARIS<sup>8</sup>. Zur Auftrennung der Citrus-Bioflavonoide<sup>9</sup>, Kamillenflavone<sup>10</sup> und zum Nachweis von Isoflavonen in Pflanzenextrakten<sup>11</sup> wurde in eigenen Arbeiten die Kieselgel-Dünnschichtchromatographie mit folgenden Systemen verwendet: Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)<sup>9</sup> und wassergesättigtes Chloroform-Eisessig (2:1.5)<sup>10</sup> bzw. (2.5:1)<sup>11</sup>.

Da die Dünnschichtchromatographie sehr selektive Trennungen erlaubt, nur kurze Zeit beansprucht und daher für systematische Untersuchungen bestens geeignet ist, haben wir unsere Versuche auch auf andere Flavonoide ausgedehnt.

Mit dem Laufmittel Benzol-Pyridin-Ameisensäure (36:9:5) erreichten wir eine ausgezeichnete Trennung folgender Flavonoide:

1. Flavone: Apigenin, Acacetin, Luteolin, Pectolarigenin, Genistein.
2. Flavanone: Naringenin, Hesperetin.
3. Flavonole: Kämpferol, Kämpferid, Quercetin, Isorhamnetin, Rhamnetin, Centaureidin.

Das Chromatogrammschema (Fig. 1) gibt eine Übersicht über den Grad der Auftrennung und die Laufhöhe der einzelnen Aglykone bei der Chromatographie

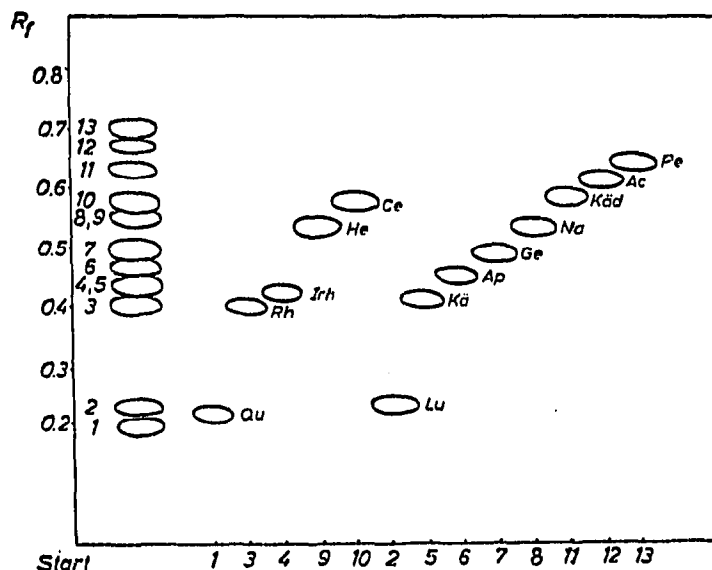


Fig. 1.

über eine Wegstrecke von 15 cm. Die Aglykone sind mit 1–13 beziffert und in Tabelle I und II in ihrer Struktur und ihrem chromatographischen Verhalten näher erläutert.

### Diskussion der $R_F$ -Verteilung

Die Laufrhöhe der Aglykone vergrössert sich mit abnehmender Polarität der Verbindungen. So findet man die Polyhydroxyflavone im  $R_F$ -Bereich von 0.0–0.25, die weniger hydroxylierten und methoxylierten Flavonoide im mittleren  $R_F$ -Bereich von 0.3–0.5 und zwischen 0.5–0.75 die Flavanone einschliesslich der stark methoxylierten Aglykone. In Tabelle I sind die Aglykone nach zunehmenden  $R_F$ -Werten angeordnet.

TABELLE I  
SUBSTITUTION DER UNTERSUCHTEN FLAVONOIDE

Nr.	Aglykon	OH-Substitution	OCH <sub>3</sub> -Substitution
1	Quercetin	5, 7, 3, 3', 4'	—
2	Luteolin	5, 7, 3', 4'	—
3	Rhamnetin	5, 3, 3', 4'	7,
4	Isorhamnetin	5, 7, 3, 4'	3'
5	Kämpferol	5, 7, 3, 4'	—
6	Apigenin	5, 7, 4'	—
7	Genistein	5, 7, 4'	—
8	Naringenin	5, 7, 4'	—
9	Hesperetin	5, 7, 3'	4'
10	Centaureidin	5, 7, 3'	4', 3, 6
11	Kämpferid	5, 7, 3	4'
12	Acacetin	5, 7	4'
13	Pectolarigenin	5, 7	4', 6

Die Trennung lässt sich auf gipshaltigem und gipsfreiem Kieselgel mit dem gleichen Ergebnis durchführen. Bei systematischen Untersuchungen kann die organische Phase nach dem Ausschütteln der Hydrolyselösung direkt ohne weitere Vorbehandlungen zur Chromatographie gebracht werden.

Mit dem neu entwickelten Laufmittel erreichten wir eine Trennung auch solcher Aglykongemische, die papierchromatographisch bisher nur schwer trennbar waren. Die Isomerenpaare Genistein und Apigenin sowie Rhamnetin und Isorhamnetin sind scharf voneinander getrennt und können auch farblich nach Behandlung mit Sprühreagenzien gut voneinander unterschieden werden. Als Sprühmittel bewährten sich basisches Bleiacetat und Antimon-(III)-chlorid<sup>12</sup>. Diese geben auch bei den übrigen Flavonoiden so starke Farbunterschiede, dass bereits eine gewisse Charakterisierung möglich ist. Tabelle II gibt die Fluoreszenzfarben wieder, die nach dem Besprühen im U.V.-Licht auftreten.

### Methodik

Zur Herstellung der Dünnschicht-Platten kann Kieselgel "Woelm" oder Kieselgel G "Merck" verwendet werden. 20 g Kieselgel rührt man mit 40 ml Wasser an (ausreichend für vier Platten 12 × 20 cm) und streicht in bekannter Weise<sup>13</sup> aus. Anschliessend gibt man die Platten zur Aktivierung 30 Min. in den Trockenschrank bei 100°. Nach dem Ausgiessverfahren von HÖRHAMMER und Mitarb.<sup>14</sup> werden 4 g Kieselgel "Woelm" mit 16 ml Äthylacetat angeschüttelt und gleichmässig auf vier

TABELLE II  
FLUORESZENZFARBEN DER FLAVONOIDE

Nr.	Aglykon	Sprühreagenzien	
		Bas. Bleiacetat	Antimon-(III)-chlorid
1	Quercetin	braun	gelb
2	Luteolin	braungelb	gelb
3	Rhamnetin	braun	gelb
4	Isorhamnetin	gelb	grün
5	Kämpferol	leuchtend gelb	grün
6	Apigenin	hellgelb	fahlgelb
7	Genistein	weissgelb	gelbbraun
8	Naringenin	fahlblau	gelbbraun
9	Hesperetin	mattblau	schwarzbraun
10	Centauroidin	braun	braungelb
11	Kämpferid	grüngelb	grüngelb
12	Acacetin	fahlgelb	fahlgelb
13	Pectolarigenin	schwarzbraun	schwarzbraun

Platten der Dimension 12 × 20 cm verteilt. Um Schwanzbildung bzw. Überdecken anderer Aglykone zu vermeiden, trägt man pro Fleck ca. 0.5 µg Aglykon auf. Für die Herstellung des Laufmittels Benzol-Pyridin-Ameisensäure (36:9:5) wurden Benzol mit einem Siedepunkt von 79–82°, Pyridin pur. von Riedel de Haen und Ameisensäure 98–100 %ig von Merck verwendet. Die Glaskammer muss vor der Chromatographie 12 bis 15 Stunden mit dem Laufmittel gesättigt werden. Dieses kann ohne Nachlassen der Trennfähigkeit bis zum völligen Verbrauch verwendet werden. Die Laufzeit beträgt bei einer Temperatur von 20° ± 2° und bis zu einer Laufhöhe von 15 cm 1.5 Stunden. Als Sprühreagenzien wurden eine etwa 25 %ige wässrige Lösung von basischem Bleiacetat und eine 10 %ige Antimon-(III)-chloridlösung in Chloroform verwendet. Vor dem Besprühen müssen die Platten eine Stunde mit warmem Föhn behandelt werden, um sie von der Ameisensäure und dem Pyridin zu befreien. Für die Auswertung der Fluoreszenzfarben benutzten wir eine U.V.-Lampe mit einem Maximum von 366 mµ.

Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der  
Universität München (Deutschland)

L. HÖRHAMMER  
H. WAGNER  
K. HEIN

- <sup>1</sup> E. C. BATE-SMITH UND R. G. WESTALL, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 427.
- <sup>2</sup> D. G. ROUX UND S. R. EVELYN, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 537.
- <sup>3</sup> H. L. HERGERT, *Forest Prod. J.*, 10 (1960) 610.
- <sup>4</sup> L. HÖRHAMMER, H. WAGNER UND H. GÖTZ, *Arch. Pharm.*, 291/63 (1958) 44.
- <sup>5</sup> K. EGGER, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 74.
- <sup>6</sup> E. WONG UND A. O. TAYLOR, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 449.
- <sup>7</sup> E. STAHL UND P. J. SCHORN, *Z. Physiol. Chem.*, 325 (1961) 263.
- <sup>8</sup> R. PARIS, *Pharm. Acta Helv.*, 36 (1961) 276.
- <sup>9</sup> L. HÖRHAMMER UND H. WAGNER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 102 (1962) 759.
- <sup>10</sup> L. HÖRHAMMER, H. WAGNER UND B. SALFNER, *Arzneimittel-Forsch.*, 13 (1963) 33.
- <sup>11</sup> L. HÖRHAMMER UND H. WAGNER, *Arzneimittel-Forsch.*, 12 (1962) 1002.
- <sup>12</sup> R. NEU UND P. HAGEDORN, *Naturwissenschaften*, 40 (1953) 411.
- <sup>13</sup> E. STAHL, *Z. Anal. Chem.*, 181 (1961) 311.
- <sup>14</sup> L. HÖRHAMMER, H. WAGNER UND G. BITTNER, *Deut. Apotheker*, 14 (1962) 148.

Eingegangen den 16. April 1963