

CHROM. 3812

Dünnschicht-Chromatographie von Flavonoiden und Phenolcarbonsäuren mit Essigsäure auf Celluloseschichten

Die papierchromatographische Trennung von Flavonoiden mit Essigsäure-Wasser-Gemischen als Laufmittel ist schon vor längerer Zeit von BATE-SMITH UND WESTALL¹ sowie von GAGE, DOUGLASS UND WENDER² beschrieben worden. Dieses vorwiegend adsorptionschromatographische Verfahren bietet den Vorteil, dass allein durch Verändern der Säurekonzentration der Trennungsschwerpunkt mehr auf Glykoside (12-, 15%ige Essigsäure) oder zusätzlich auch auf Aglykone (60%ige Essigsäure) verlagert werden kann, wobei—in Übereinstimmung mit den Löslichkeitsverhältnissen—die Aglykone durch niedrigere, die Glykoside aber durch höhere R_F -Werte charakterisiert sind. Eine Hydrolyse leicht spaltbarer Glykoside ist während des Chromatographierens im allgemeinen nicht zu beobachten, so dass lediglich die verhältnismässig langen Laufzeiten einer häufigeren Anwendung im Wege stehen.

Mit der Übertragung des papierchromatographischen Verfahrens in den dünn-schichtchromatographischen Massstab sollte neben einer rascheren Analyse auch eine selektive Trennung von Glykosiden und Aglykonen, in zweidimensionaler Technik mit Essigsäure verschiedener Konzentrationen, erreicht werden. Ein weiteres Ziel der Untersuchungen war die gleichzeitige Lokalisierung einzelner Phenolcarbonsäuren, jedoch nur soweit sie unter Nachweisbedingungen für Flavonoide bei der Chromatographie von Pflanzenauszügen bzw. von Lösungen nach Abbaureaktionen auf der Platte in Erscheinung treten.

Experimentelles

Material. Cellulosepulver MN 300 zur Dünnschicht-Chromatographie (Macherey, Nagel & Co., Düren), Polyamid Woelm DC (M. Woelm, Eschwege); Essigsäure 99-100% p.A. (E. Merck, Darmstadt), Dest. Wasser.

Beschichtung. Eine Mischung von 30 g Cellulosepulver MN 300, 1 g Polyamid Woelm DC, 170 ml Wasser und 10 ml Äthylalkohol wird in einem Elektromixergerät 30 Sek. homogenisiert und anschliessend mit einer Schichtdicke von 3/8 mm auf 10 Platten 20 × 20 cm aufgetragen. Die bei Zimmertemperatur (über Nacht) oder im Warmluftstrom getrockneten Platten zeichnen sich durch fest haftende und glatte Schichten aus, die mit Bleistift beschrieben werden können.

Entwicklung. Fließmittel: 15%ige, 40%ige und 60%ige Essigsäure (v/v).

Nachweisreagentien. Aluminiumchlorid: 2%ige Lösung von $AlCl_3$ in verd. Äthylalkohol (70%ig, v/v). Naturstoff-Reagens-A "Fluka": 2%ige Lösung von Diphenylborsäure-2-aminoäthylester in Äthylalkohol (96%ig, v/v). Eisen(III)-chlorid: 1%ige wässrige Lösung.

Ergebnis

Durch Zusatz von ca. 3% Polyamid erhält man verhältnismässig feste Celluloseschichten, die bei einer Dicke von 0.37–0.38 mm das Trennungsoptimum besitzen. Je nach Essigsäurekonzentration betragen die Laufzeiten im Durchschnitt eineinhalb (15%ige Essigsäure) bzw. dreieinhalb Stunden (60%ige Essigsäure) und liegen damit um rund 80% niedriger als beim papierchromatographischen Verfahren.

TABELLE I

FLUORESZENZ- UND FARBREAKTIONEN VON FLAVONOIDEN UND AROMATISCHEN CARBONSÄUREN

Angaben wie intensiver, unverändert, schwächer oder gelöscht beziehen sich auf die Eigenfluoreszenzen der Verbindungen bei U.V.-Licht von 350 nm.

Index	Verbindung	Eigenfluoreszenz bei 350 nm	Fluoreszenz mit $AlCl_3$	Fluoreszenz mit Naturstoff-Reagens-A	Färbung mit $FeCl_3$
<i>Flavonoide</i>					
A	Quercetin	gelb	grüngelb	orange	graugrün
B	Quercetin-3-galactosid (Hyperosid)	braun	grüngelb	orange	graugrün
C	Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	braun	grüngelb	orange	graugrün
D	Quercetin-3-glucorhamnosid (Rutin)	braun	gelb	orange	grün
E	Luteolin	braun	grüngelb	grüngelb	graugrün
F	Luteolin-7-glucosid	braun	grüngelb	ocker	grün
G	Ombuin	gelb	grüngelb	grüngelb	braun
H	Ombuinglucorhamnosid	gelb	grüngelb	grüngelb	grün
I	Apigenin-8-C-glucosid (Vitexin)	braun	grüngelb	grüngelb	braun
K	Tectochrysin	braun	gelb	gelb	rot
L	Fisetin	grüngelb	grüngelb	orange	grün
M	Kämpferol	gelb	grüngelb	grün	grün
N	Isorhamnetin	gelb	grüngelb	grün	graugrün
O	Morin	grüngelb	grün	grün	grün
<i>Phenolcarbonsäuren</i>					
1	2-Hydroxybenzoesäure	violett	unverändert	intensiver	violettrot
2	3-Hydroxybenzoesäure	— ^a	—	—	gelblich
3	4-Hydroxybenzoesäure	— ^a	—	—	gelb
4	2,4-Dihydroxybenzoesäure	— ^a	violett	—	violettrot
5	2,5-Dihydroxybenzoesäure	i blau	blau	intensiver	blau
6	3,4-Dihydroxybenzoesäure	— ^a	—	violett	grün
7	3,5-Dihydroxybenzoesäure	violett	violett	gelöscht	gelblich
8	3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure	— ^a	—	—	gelbbraun
9	4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure	— ^a	—	—	gelbbraun
10	3,4,5-Trihydroxybenzoesäure	— ^a	—	violett	grauviolett
11	3-Methoxy-4,5-dihydroxybenzoesäure	— ^a	—	violett	graublau
12	3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure	— ^a	—	—	rosa
13	3-Hydroxyzimtsäure	i violett	unverändert	gelöscht	gelblich
14	4-Hydroxyzimtsäure	violett	unverändert	schwächer	orange
15	3,4-Dihydroxyzimtsäure	i violett	intensiver	weiss ^b	grau
16	4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure	i violett	intensiver	unverändert	rosa

^a Deutliche Fluoreszenz bei 254 nm, zumeist violett.

^b Zusätzlich gelbgrüne Eigenfarbe.

Die Zusammenstellung in Fig. 1 zeigt am Beispiel einiger Flavonoide die Abhängigkeit von R_F -Wert und Säurekonzentration. Es ist bezeichnend, dass mit Ansteigen der Essigsäurekonzentration über 15–40–60% die Aglykon- R_F -Werte annähernd linear zunehmen, während die von den Glykosiden bei Verwendung von 40- bzw. 60%iger Essigsäure zurückgelegte Wegstrecke nur geringe Unterschiede zeigt. Dadurch wird in kombinierter, zweidimensionaler Chromatographie mit Essigsäuren verschiedener Konzentration (z.B. 60%ig und 15%ig) die Akzentuierung einer Aglykon- und einer Glykosidtrennung möglich.

Fluoreszenz- und Farbreaktionen einiger Phenolcarbonsäuren, die gelegentlich in Begleitung von Flavonoiden auftreten, sind in der Tabelle I zusammengefasst,

Fig. 1

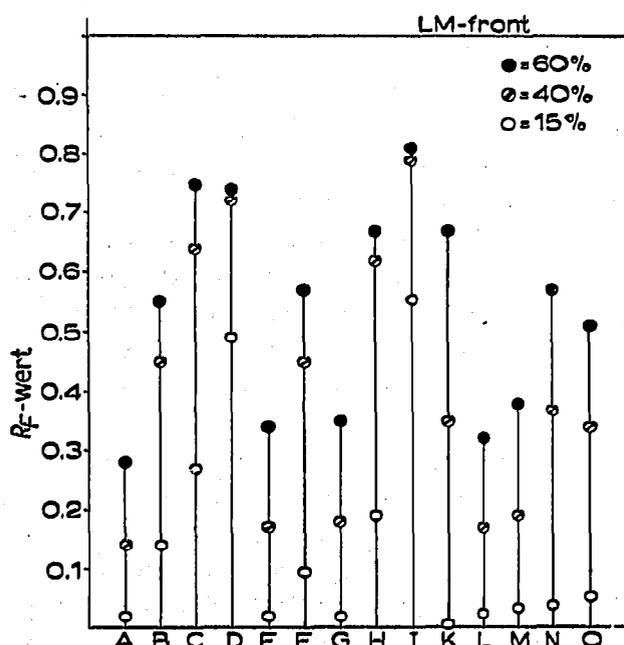


Fig. 1. Flavonoide. A = Quercetin; B = Quercetin-3-galactosid; C = Quercetin-3-rhamnosid; D = Quercetin-3-glucorhamnosid; E = Luteolin; F = Luteolin-7-glucosid; G = Ombuin; H = Ombuinglucorhamnosid; I = Apigenin-8-C-glucosid; K = Tectochrysin; L = Fisetin; M = Kämpferol; N = Isorhamnetin; O = Morin.

Fig. 2

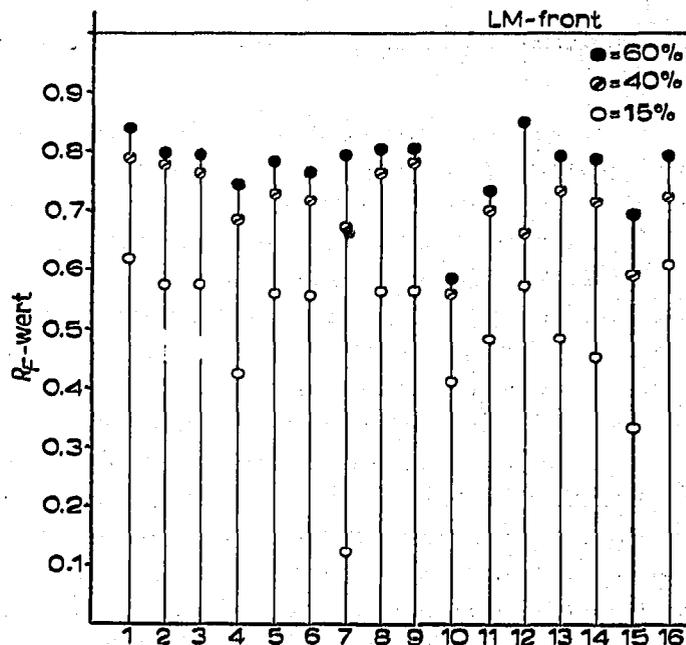


Fig. 2. Phenolcarbonsäuren. 1 = 2-Hydroxybenzoesäure; 2 = 3-Hydroxybenzoesäure; 3 = 4-Hydroxybenzoesäure; 4 = 2,4-Dihydroxybenzoesäure; 5 = 2,5-Dihydroxybenzoesäure; 6 = 3,4-Dihydroxybenzoesäure; 7 = 3,5-Dihydroxybenzoesäure; 8 = 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure; 9 = 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure; 10 = 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure; 11 = 3-Methoxy-4,5-dihydroxybenzoesäure; 12 = 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure; 13 = 3-Hydroxyzimtsäure; 14 = 4-Hydroxyzimtsäure; 15 = 3,4-Dihydroxyzimtsäure; 16 = 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure.

ihre R_F -Werte, bezogen auf 15-, 40- und 60%ige Essigsäure, gehen aus Fig. 2 hervor. Aromatische Carbonsäuren erschweren oft durch ihre intensive Eigenfluoreszenz die Lokalisierung von Flavonoiden. Derartige Störungen treten besonders bei der chromatographischen Verfolgung des Alkaliabbaues häufiger auf und machen eine vorherige Abtrennung dieser Verbindungen, wie z.B. durch vorgeschaltete Chromatographie mit Wasser, erforderlich. Unter diesen Bedingungen werden die Säureflecke fast durchwegs in R_F -Bereiche über 0.80 geschoben, während Flavonoide praktisch keine Wanderung erkennen lassen und sich erst bei der nachfolgenden Chromatographie mit Essigsäure in der beschriebenen Weise auftrennen.

Pharmakognostisches Institut der
Universität Wien (Österreich)

P. SPIEGL

1 E. C. BATE-SMITH UND R. G. WESTALL, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 427.

2 TH. B. GAGE, C. D. DOUGLASS UND S. H. WENDER, *Analyt. Chem.*, 23 (1951) 1582.

Eingegangen am 1. Oktober 1968