

CHROM. 5615

Dünnschichtchromatographie von Flavonoiden nach Zusatz von komplexbildenden Reagentien zum Fliessmittel

Die meisten Flavone und Flavonole sowie deren Glykoside besitzen die Eigenschaft im UV-Licht zu fluoreszieren. Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung sehr geringer Substanzmengen reicht jedoch diese Eigenfluoreszenz zur Sichtbarmachung der Flecke häufig nicht aus, so dass die Chromatogramme mit komplexbildenden Reagentien wie AlCl_3 , ZrOCl_2 bzw. organischen Borverbindungen (z.B. Naturstoff-Reagens nach NIE^1), besprüht werden müssen. Dies bietet den Vorteil, dass einzelne Flavonoide dabei charakteristische Farb- bzw. Fluoreszenznuancierungen geben, wodurch eine gute Differenzierung der Flecke erreicht wird. Bei der Auftrennung von Flavonoidgemischen kommen allerdings auf dem Dünnschichtchromatogramm oft mehrere Substanzzonen knapp übereinander zu liegen oder sie überlappen sich sogar teilweise. Anschliessendes kräftiges Besprühen kann dabei ein "Ineinanderfliessen" der Flecke zur Folge haben, wobei u.U. zwei ursprünglich getrennte Verbindungen als einheitlicher Fleck betrachtet werden.

Um diese Fehlerquelle in der Flavonoid-Analytik auszuschalten, haben wir eine Reihe von Versuchen unternommen, die Reagentien zur Sichtbarmachung schon vor der Auftrennung des Substanzgemisches zuzusetzen, so dass ein nachfolgendes Besprühen entbehrlich ist. Dies kann vor allem auch dann von Bedeutung sein, wenn eine quantitative fluorimetrische Auswertung der Chromatogramme angestrebt wird, weil man damit die Schwierigkeit des gleichmässigen Besprühens der ganzen Platte umgehen kann.

Methodik

Die Versuche wurden mit drei verschiedenen Sorptionsmitteln vorgenommen: Cellulose + 3% Polyamid², Polyamid + 20% Cellulose³ und Kieselgel G, aktiviert.

Als Fliessmittel dienten: 60%-ige Essigsäure², Chloroform-Methanol-Methyläthylketon-Ameisensäure (70:10:5:1) (Ref. 3) und Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (5:4:1) (Ref. 4).

An Reagentien gelangten AlCl_3 und Diphenyl-borsäure-2-aminoäthylester (Naturstoff-Reagens nach NIE^1) zum Einsatz. Der Reagenszusatz erfolgte nach drei verschiedenen Verfahren:

- (1) Das Reagens wurde der Sorptionsmittelsuspension in fester Form zugefügt.
- (2) Die gestrichene Platte wurde vor dem Chromatographievorgang durch Besprühen mit der Reagenslösung und anschliessendes Trocknen imprägniert.
- (3) Das Reagens wurde jeweils der Fliessmittelkomponente mit den besten Lösungseigenschaften zugesetzt und diese Lösung dann mit den übrigen Laufmittelbestandteilen vereinigt.

Folgende Verbindungen standen als Testsubstanzen zur Verfügung: Quercetin, Kämpferol, Morin, Fisetin, Apigenin, Patuletin, Galangin, Kämpferid und Pectolarigenin. Die Konzentration der einzelnen Flavonoide wurde so gewählt, dass die Flecke bei den gleichzeitig ausgeführten Vergleichschromatogrammen ohne Reagenszusatz im UV-Licht (360 nm) gerade noch sichtbar waren.

Ergebnisse

Die nach den Verfahren (1) und (2) ausgeführten Versuche führten zu keinen zufriedenstellenden Resultaten. Vor allem wurde in einzelnen Fällen das Reagens vom Fließmittel an die Front gewaschen, das übrige Chromatogramm gleich der ohne Reagenszusatz ausgeführten Vergleichsplatte. Gute Ergebnisse erzielten wir hingegen beim Zusatz des Komplexbildners zum Fließmittel (3. Methode). Dabei erwies sich eine Reagenskonzentration von 0.2% für Diphenyl-borsäure-2-aminoäthylester und von 0.5% für $AlCl_3$ als ausreichend. Die Flavonoidflecke zeigten im UV-Licht die gleichen Fluoreszenzfarben und -intensitäten wie auf der Vergleichsplatte nach starkem Besprühen mit der Reagenslösung. Bemerkenswert ist, dass auch die R_f -Werte auf den jeweils korrespondierenden Platten innerhalb der üblichen Grenzen unverändert waren, was für eine Wanderung der freien Verbindungen (dissoziierte Komplexe) spricht.

Folgende Sorptionsmaterial-Fließmittel-Kombinationen erwiesen sich als besonders gut geeignet:

Cellulose-Schichten. In 60%-iger Essigsäure als Laufmittel ergaben sich sowohl mit Naturstoff-Reagens als auch mit $AlCl_3$ scharf abgegrenzte, deutlich fluoreszierende Flecke.

Polyamid-Schichten. Das mit Naturstoff-Reagens versetzte Gemisch Chloroform-Methanol-Methyläthylketon-Ameisensäure lieferte gute Resultate. Bei $AlCl_3$ -Zusatz tritt allerdings Schwanzbildung der Flecke auf. Bei dem Versuch, für Polyamid-Platten das Lösungsmittelsystem Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure zur Chromatographie einzusetzen, erzielten wir ohne Reagenszusatz einen sehr guten Trenneffekt, der aber im reagenshaltigen Fließmittel durch starke Schwanzbildung wieder verloren ging.

Kieselgel G-Schichten. In Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure wurden mit Naturstoff-Reagens fluoreszierende Flecke erhalten, während die geprüften Flavonoide ohne Sprühmittel im UV-Licht kaum zu erkennen waren. Hier sind allerdings auch die Versuche mit $AlCl_3$ -Zusatz zum Laufmittel negativ verlaufen.

*Pharmakognostisches Institut
der Universität Wien (Österreich)*

W. BLEIBER

*Pharmakologisches und Toxikologisches
Institut der Ruhr-Universität Bochum (B.R.D.)*

J. J. CHIRIKDJIAN*

1 R. NEU, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 181.

2 P. SPIEGEL, *J. Chromatogr.*, 39 (1969) 93.

3 K. EGGER, *Planta Med.*, 12 (1964) 265.

4 E. STAHL UND P. J. SCHORS, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 325 (1961) 293.

Eingegangen am 6. August 1971

* Zur Zeit Pharmakologisches Institut der Universität Wien (Österreich).