

CHROM. 10,186

## Note

### Die Auftrennung und Remissionsmessung *in situ* von Flavonoiden auf Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie-Fertigplatten Kieselgel 60

A. HIERMANN und Th. KARTNIG

Institut für Pharmakognosie der Universität Graz, Universitätsplatz 4/I, A-8010 Graz (Österreich)

(Eingegangen am 12. April 1977)

Die meisten der bisher in der Literatur beschriebenen quantitativen Bestimmungen von Flavonoiden stellen Gesamtbestimmungsverfahren dar. Im besonderen Masse werden dabei die Chelatbildung mit mehrwertigen Metallionen<sup>1</sup> und die Umsetzung mit arylsubstituierten Borsäuren<sup>2</sup> zur photometrischen Bestimmung herangezogen. Mit der Strukturaufklärung zahlreicher, natürlich vorkommender Flavonoide wurde die Möglichkeit zur selektiven Erfassung dieser Naturstoffe geschaffen. Für die Auftrennung der Flavonoidgemische bietet sich vor allem die Dünnschichtchromatographie (DC) an. Über eine anschließende, quantitative Erfassung durch Direktauswertung der UV-Absorption und Fluoreszenz *in situ* wird im Zusammenhang mit den Silymarinen von Halbach und Görler<sup>3</sup> und Wagner und Mitarbeitern<sup>4</sup> berichtet. Spiegl und Mitarbeiter<sup>5</sup> untersuchten die Möglichkeit der qualitativen Analyse von chromatographisch aufgetrennten Flavonoiden durch Remissionsmessung. Durch Detektion mit Na-azetat, AlCl<sub>3</sub> und HCl können an Hand der Verschiebung der Absorptionsbanden gegenüber den Normalspektren strukturelle Merkmale wahrgenommen werden. Nach Angaben der Autoren eignen sich als Sorbentien für die Remissionsmessung besonders Cellulose und Polyamid. Die Absorptionskurven der Remissionsspektren der auf Kieselgel aufgetrennten Flavonoide sind hingegen nach Spiegl und Mitarbeiter<sup>5</sup> sehr abgeflacht und zeigen keine ausgeprägten Maxima.

Für chemotaxonomische Untersuchungen an flavonoidführenden Pflanzen und für die Beobachtung der Flavonoidbildung in Gewebekulturen ist es notwendig, über eine einfache und empfindliche Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung dieser Naturstoffe zu verfügen. In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Möglichkeit einer DC-Auftrennung von Flavonoiden mittels der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC, Nano-DC) und einer anschließenden, quantitativen Auswertung durch Remissionsmessung *in situ* untersucht.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

##### *Qualitative Untersuchung*

Sorptionsschicht, HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (10 × 10 cm; Merck, Darmstadt, B.R.D.). Das Auftragen der Flavonoidlösungen erfolgt mit einer Mikrokapillare 0.75 nl der Fa. Merck (1 cm vom unteren Plattenrand mit einem seitlichen

Abstand von 5 mm). Laufstrecke, 8 cm. FG 1 (für Aglykone): Benzol-Äthylazetat-Ameisensäure (40:10:5), Entwicklungszeit *ca.* 25 Min; FG 2 (für Glykoside): Aceton-Äthylmethylketon-Ameisensäure (50:35:5), Entwicklungszeit *ca.* 25 Min.

Nach Vertreibung des Fließmittels im warmen Luftstrom werden die Flavonoide im UV<sub>254</sub> betrachtet und anschliessend mit Naturstoffreagenz (1% in Methanol) und mit Polyäthylenglykol (PEG) 4000 (5% in Äthanol) detektiert (Betrachten im UV<sub>366</sub>).

#### Remissionsmessung

Die Absorptionskurven wurden ohne Detektion durch Direktauswertung mit

#### TABELLE I

R<sub>F</sub>-WERTE UND ANFÄRBUNG EINIGER FLAVONOIDE NACH DETEKTION MIT NATURSTOFFREAGENZ UND PEG AUF HPTLC-KIESELGELSCHICHTEN

Aglykone wurden mit FG 1, Glykoside mit FG 2 entwickelt.

Flavonoid	Farbe	R <sub>F</sub> Wert
<i>Aglykone</i>		
3-OH-Flavon	hellblau	0.83
Galangin	blassgelb	0.76
Kämpferid	hellblau	0.71
Chrysin	violett	0.68
Pectofinarigenin	blaubraun	0.60
Acacetin	gelbbraun	0.59
Digicitrin	blaubraun	0.57
Naringenin	ocker	0.56
Kämpferol	hellgelb	0.55
Rhamnetin	orange	0.53
Jaceosidin	blaubraun	0.51
Apigenin	gelb	0.47
Chryseriol	gelborange	0.44
Diosmetin	gelborange	0.42
Quercetin	rotorange	0.40
Morin	hellblau	0.38
Nepetin	orange	0.37
Luteolin	orange	0.35
Fisetin	rotorange	0.30
Dihydroquercetin	rotbraun	0.27
Myricetin	rot	0.23
Dihydrofisetin	rotbraun	0.18
Scutellarein	braunblau	0.14
<i>Glykoside</i>		
Quercitrin	rotorange	0.82
Myricitrin	rot	0.77
Vitexin	gelb	0.75
Apigenin-7-glucosid	gelb	0.71
Luteolin-7-glucosid	orange	0.66
Hyperosid	orange	0.51
Naringin	blaugrau	0.42
Vitexinrhamnosid	gelb	0.37
Luteolin-5-glucosid	hellblau	0.35
Rutin	orange	0.21
Robinin	gelbgrau	0.12

einem Spektralphotometer (Zeiss PMQ 3) im Bereich von 500 bis 240 nm aufgezeichnet (Parameter: siehe unten). Einwandfreie Spektren werden bei Aglykonen im Mengenbereich von 20 bis 30 ng, bei Glykosiden von 30 bis 40 ng erhalten.

#### Quantitative Untersuchung

Zur quantitativen Analyse werden die Flavonoidlösungen mit einer Platin-Iridium Festvolumenauftragekapillare (0.1 nl; Fa. Antech) aufgetragen (1 cm seitlicher Abstand der Flecken voneinander). Nach dem Entwickeln und dem Vertreiben des Fließmittelgemisches wird durch Remissionsmessung *in situ* bei einer Wellenlänge von 360 nm die Absorption gemessen (Spektralphotometer Zeiss PMQ 3; Spaltbreite 6 mm, Monochromatorschlitz 0.5 mm, Dämpfung 3, Servogor S-Schreiber, Spreizung 20 mV quantitativ, 50 mV qualitativ). Der Durchschnitt der mittleren Standardabweichungen beträgt  $\pm 2.1\%$ .

#### ERGEBNISSE

Als Sorptionsschicht wurde HPTLC-Kieselgel 60 (10 × 10 cm) verwendet. Die Auftrennung der uns zur Verfügung stehenden Flavonoid-Aglykone und -Glykoside (Tabelle I) erfolgte mit den Fließmittelgemischen FG 1 und 2.

Die Flavonoidgemische wurden mit einer Mikrokapillare 0.75 nl aufgebracht. Das Sichtbarmachen der aufgetrennten Verbindungen erfolgte—neben der Betrachtung im UV<sub>254</sub>— durch Detektion mit Naturstoffreagenz nach Neu<sup>2</sup> und PEG<sup>5</sup>. Die Nachweisgrenze liegt bei der Detektion mit Naturstoffreagenz bei etwa 5–8 ng.

Neben den  $R_F$ -Werten und der spezifischen Anfärbung der betreffenden Flavonoide können auch die Absorptionskurven der Remissionsmessung zur Identifizierung herangezogen werden. Zur Bestimmung der UV-Absorption *in situ* wird das

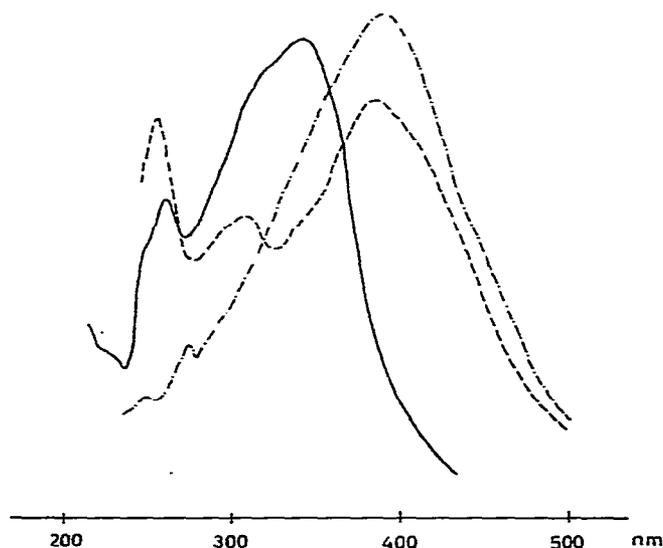


Fig. 1. Remissionsspektren einiger Flavonoid-Aglykone. —, Acacetin; ---, Quercetin; - · - · - Fisetin.

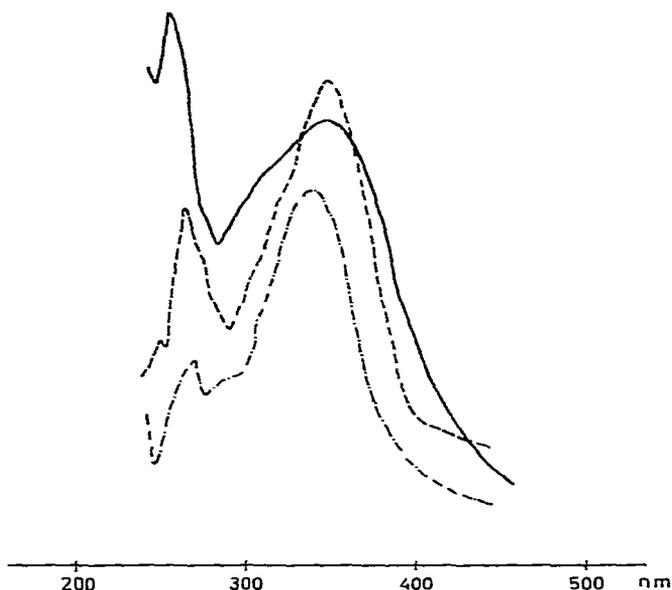


Fig. 2. Remissionsspektren unterschiedlich glykosidierter Flavonoide. —, Rutin; ---, Robinin; - · - · -, Apigenin-7-glucosid.

Fliessmittelgemisch im warmen Luftstrom von der Platte vertrieben und die Remissionsspektren im Bereich von 500 bis 240 nm aufgenommen (Fig. 1 und 2 zeigen die Spektren einiger repräsentativer Flavonoid-Aglykone und -Glykoside). Alle von uns untersuchten Flavonoide weisen zwischen 330 und 390 nm ein deutlich ausgeprägtes

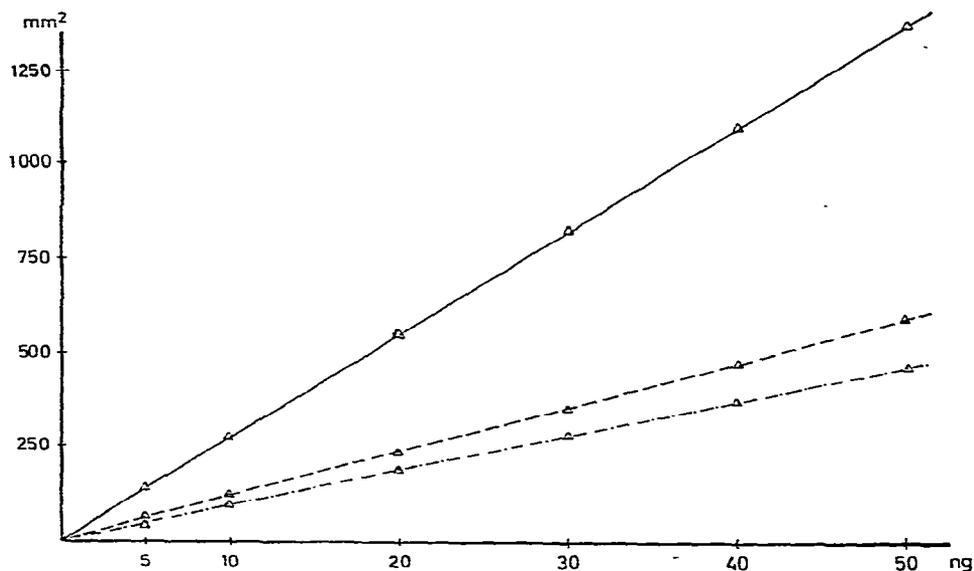


Fig. 3. Durch Remissionsmessung erstellte Eichkurven einiger Flavonoid-Aglykone. —, Acecatin; ---, Quercetin; - · - · -, Fisetin.

Maximum auf. Damit ist auch die Voraussetzung für eine quantitative Auswertung gegeben.

Inwieweit man durch die so erhaltenen Absorptionsspektren vor und nach Umsetzung mit Na-azetat,  $AlCl_3$  und  $HCl$  auf die Struktur der Flavonoide schliessen kann, ist Gegenstand unserer derzeitigen Untersuchungen. Zur quantitativen Erfassung der Flavonoide durch Remissionsmessung auf Kieselgel-HPTLC-Schichten wurden einige Modellflavonoide mit einer Platin-Iridiumkapillare aufgebracht und die Eichkurven erstellt (siehe Fig. 3 und 4). Die Nachweisgrenze liegt für Aglykone bei 5 ng und für Glykoside bei 8 ng.

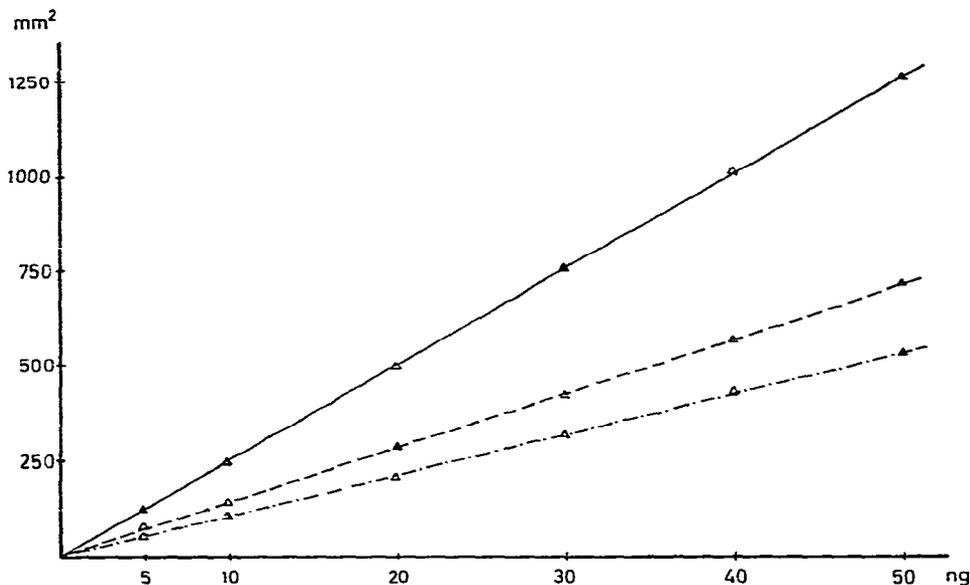


Fig. 4. Durch Remissionsmessung erstellte Eichkurven unterschiedlich glykosidierter Flavonoide. —●—, Apigenin-7-glucosid; - - - △ - - -, Robinin; —■—, Rutin.

#### LITERATUR

- 1 Z. J. Vejdeck und B. Kakac, *Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organischer Verbindungen*, Bd. II, Gustav Fischer, Jena, 1973.
- 2 R. Neu, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 802.
- 3 G. Halbach und K. Görler, *Z. Naturforschung B*, 26 (1961) 971.
- 4 H. Wagner, P. Diesel und M. Seitz, *Arzneim.-Forsch.*, 24 (1974) 466.
- 5 P. Spiegel, Ch. Dittrich und K. Jentzsch, *Sci. Pharm.*, 44 (1976) 129.