

CHROM. 11,679

Note

Vergleichende Untersuchung von Polyamid DC 11- und RP-2-, RP-8- und RP-18-Schichten zur Trennung von methylierten Quercetinderivaten

H. BECKER, J. EXNER und T. BINGLER

Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364, D-6900 Heidelberg (B.R.D.)

(Eingegangen am 7. September 1978; geänderte Fassung eingegangen am 11. Dezember 1978)

Zur Trennung von phenolischen Naturstoffen werden seit langem Polyamide mit Erfolg verwendet. Bei der Chromatographie auf Polyamidschichten spielen vorwiegend Adsorption aber auch Verteilung eine wichtige Rolle^{1,2}.

In der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) hat sich die Verwendung von C-alkylsilanisierten Kieselgelen bewährt. Demgegenüber ist der Einsatz dieses Trennmateri als in der Dünnschichtchromatographie (DC) noch äusserst gering³⁻⁵.

Da aber neuerdings DC-Fertig-Platten mit C-alkylsilanisierten Kieselgelen zur Verfügung stehen, dürfte deren Anwendung rasch zunehmen. Anhand der O-methylierten Quercetin-Derivate, die sich zum Teil nur geringfügig in ihrer Polarität unterscheiden, wollten wir prüfen, ob die "reversed-phase" (RP)-Platten die Trennschärfe der Polyamidschichten erreichen oder sogar Vorteile gegenüber diesen bringen.

MATERIAL UND METHODEN

Testsubstanzen

Als Testsubstanzen standen eine Reihe von methylierten Quercetinderivaten zur Verfügung, die wir z.T. selbst aus Quercetin hergestellt hatten, zum Teil aus *Viscum album* isoliert hatten⁶.

Verwendete Schichten

Polyamid DC-11, Polykondensat der Aminoundecansäure (Macherey, Nagel & Co., Düren, B.R.D.). HPTLC-RP-2; HPTLC-RP-8; HPTLC-RP-18 (Merck, Darmstadt, B.R.D.).

Fließmittel

Polyamid: Benzol-Petrolether (100-140°)-Methylethylketon-Methanol (60:15:15:10). RP-2, RP-8, RP-18: Methanol-, CH₃CN-, Dioxan-Wassermischungen z. Teil unter Zusatz von Essigsäure.

Entwicklung und Detektion

Die Entwicklung erfolgte mit der Circulartechnik⁷. Detektion, UV 366 nm, Besprühen mit Naturstoffreagenz A (Lit. 8).

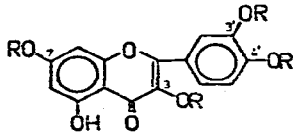


Fig. 1. Quercetin (R = H) und Stellung der Methylgruppen (s. Text).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für die aufzutrennenden Quercetinderivate (Fig. 1) hängt das chromatographische Verhalten wesentlich von der Anzahl der isoliert stehenden Hydroxylgruppen ab. Experimentell ergibt sich auf Polyamidschichten die in Tabelle I angegebene Reihung der Substanzen (Tabelle I).

Obwohl sich diese Quercetinderivate strukturel nur minimal unterscheiden, lässt sich die Trennung auf einer Platte durchführen.

Die Auftrennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Acidität —und damit der Polarität— der Hydroxylgruppen des Quercetins. Nach steigender Acidität lässt sich für die Monomethylether folgende Reihe aufstellen: C-3 (nicht aromatisch, sterisch gehindert), C-3', C-4' (aromatisch, sterisch gehindert), C-7 (aromatisch, sterisch ungehindert).

Werden nun diese einzelnen OH-Gruppen methyliert, so ergibt sich durch den Verlust der jeweiligen Acidität eine Umkehrung der Reihung. Die gleichen Gesetzmässigkeiten gelten auch für die höher methylierten Quercetinderivate.

Neben dem unterschiedlichen chromatographischen Verhalten zeigen die Flavonoidderivate auch noch unterschiedliches Fluoreszenzverhalten, sowie Unterschiede in der Färbung vor und nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A (Lit. 8). Auf Polyamidschichten bilden sich die Farben nach dem Besprühen sofort aus, verstärken sich noch nach einer Stunde und halten ihre Intensität über lange Zeit, sofern sie vor direktem Lichteinfluss geschützt werden.

Zur Ermittlung eines geeigneten Laufmittels auf RP-Schichten mussten verschiedene Vorversuche durchgeführt werden. Da die Polarität des Trenngemisches von relativ polar (Quercetin) bis ziemlich apolar (Trimethylether) reicht, begannen

TABELLE I

hR_F -WERTE DER QUERCETIN (QU)-DERIVATE AUF POLYAMID UND AUF RP-18

Laufmittel: Polyamid, Benzol-Petrolether-Methylethylketon-Methanol (60:15:15:10), RP-18, Methanol-Wasser-Essigsäure (70:28:2).

Detektion: UV 366 nm und Naturstoffreagenz A.

Substanz	Polyamid	RP-18
Qu	20	73
Qu-3-OCH ₃	26	65
Qu-3'-OCH ₃	32	55
Qu-7-OCH ₃	37	44
Qu-3,3'-OCH ₃	42	49
Qu-3,7-OCH ₃	53	33
Qu-7,3'-OCH ₃	59	28
Qu-7,3'4'-OCH ₃	73	19

wir mit dem sehr polaren Laufmittelgemisch Methanol–Wasser (9:1). Dabei zeigte sich, dass die Substanzen sich zwar trennten, jedoch alle in den oberen R_F -Bereich wanderten. Durch allmähliche Polaritätserhöhung (Wasserzugabe bis maximal 40%) ergab sich eine R_F -Wert-Depression aller Substanzen, wobei bei einer Laufmittelzusammensetzung von Methanol–Wasser (7:3) ein Optimum erreicht werden konnte. Essigsäurezusatz bis 2% brachte eine Verschmälerung der Substanzzonen und damit eine verbesserte Auftrennung, wobei der Säurezusatz limitiert ist durch die wesentliche Polaritätserhöhung.

Weiter wurden die für RP-Material in der HPLC erfolgreich eingesetzten Laufmittel Acetonitril, Dioxan, Tetrahydrofuran in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen verwendet. Diese Laufmittel erforderten aufgrund ihrer starken eluierenden Wirkung einen wesentlich höheren Wasserzusatz, wobei sich die schlechte Benetzbarkeit der Platten nachteilig auswirkte. Der Versuch, Methanol ganz oder teilweise durch Methylethylketon zu ersetzen, brachte zwar noch eine Auftrennung der Substanzen, aber alle waren im höheren R_F -Wertbereich zusammengedrängt.

Ein weiterer Versuch, durch kleine Anteile von Benzol auf die Trennbarkeit des Gemisches einzuwirken, lieferte ein überraschendes Ergebnis. Bei bereits 3%iger Benzolzugabe zum Laufmittel Methanol–Wasser (7:3) trat eine teilweise Inversion der Substanzen ein, die wir nicht eindeutig begründen können. Wahrscheinlich liegen durch die Zugabe eines apolaren Fliessmittels sowohl Verteilung als auch Adsorption vor. Demnach wurden die besten Ergebnisse mit Methanol–Wasser-Gemisch (7:3) unter Essigsäurezusatz erzielt.

Bei gleicher Laufmittelzusammensetzung vermag allein die Länge der Alkylketten der jeweiligen stationären Phase die Auftrennung wie folgt zu beeinflussen: Die RP-2-Phase bewirkt aufgrund ihres relativ polaren Charakters eine geringe Retention der apolaren Substanzen, die nur durch eine Erhöhung des Wasseranteils kompensiert werden kann. Jedoch tritt dabei eine wesentliche Zonenverbreiterung auf. Wie zu erwarten, brachte das RP-8-Material eine wesentliche Verbesserung der R_F -Wert-Verteilung der Substanzen, RP-18-Material weist eine weitere Verbesserung durch eine Zonenverschmälerung auf.

Die Laufzeiten betragen bei einer Laufstrecke von etwa 4 cm (bei Laufmittel Methanol–Wasser, 7:3) für RP-2-Phase, 45 min, für RP-18, 70–80 min und bei RP-8, 60 min. Mit der Durchlauftechnik (Erhöhung der Laufzeit auf 80 min) kann auch auf RP-8 die gleiche Trennschärfe wie für RP-18 erreicht werden.

Die Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Quercetinderivate sind auf der Umkehrphase erwartungsgemäss dieselben wie auf Polyamid. Das Sprühreagenz Naturstoffreagenz A liefert jedoch wesentlich schwächere Farbintensitäten, die leider auch nicht über längere Zeit stabil bleiben.

Beim Vergleich der Elutionsreihenfolge der Substanzen auf Polyamid und RP-Material ergibt sich bis auf eine Ausnahme eine genaue Umkehrung der Reihenfolge (Tabelle I). Lediglich Qu-3-3'-OCH₃ und Qu-7-OCH₃ behalten ihre Reihenfolge bei. Wahrscheinlich wirkt sich die freistehende apolare Gruppe an C-7 an RP-Material stärker aus als auf Polyamid.

Es empfiehlt sich, für eine chromatographische Auswertung eines unbekanntes Flavonoidgemisches die Kombination der Chromatographie sowohl auf einer polaren Schicht (Polyamid) als auch auf RP-Material, da Substanzen polarerer Art auf der polaren Schicht im optimalen R_F -Bereich (0.3–0.6) aufgetrennt werden, die apolaren

dagegen in der Front zusammengedrängt werden. Auf RP-Material lassen sich diese "schlecht getrennten" Substanzen in den optimalen R_F -Bereich bringen und somit gut auftrennen.

Besonders empfiehlt sich die Anwendung der RP-Materialien bei Arbeiten mit Rohextrakten aus Pflanzen, da die häufig sehr störenden lipophilen Anteile, wie z.B. Chlorophyll, am Start zurück bleiben. Diese Tatsache könnte einen Vorteil darstellen bei der quantitativen Direktvermessung, da der Plattenuntergrund wesentlich sauberer bleibt.

Die alkylsilanisierten Kieselgele bieten aufgrund der verteilungschromatographischen Trenneffekte eine sinnvolle Ergänzung zu der vorwiegend auf Adsorption beruhenden Chromatographie der Flavonoide auf Polyamid.

DANK

Herrn Doz. Dr. Wollenweber, Darmstadt, danken wir für wertvolle Hinweise bei der Polyamidchromatographie.

LITERATUR

- 1 K. Egger und M. Keil, *Z. Anal. Chem.*, 210 (1964) 201.
- 2 H. Wagner, L. Hörhammer und K. Macek, *J. Chromatogr.*, 31 (1967) 455.
- 3 R. E. Kaiser und R. Rieder, *J. Chromatogr.*, 142 (1977) 411.
- 4 E. von Arx und M. Faupel, *J. Chromatogr.*, 154 (1978) 68.
- 5 J. Sherma und M. Latta, *J. Chromatogr.*, 154 (1978) 73.
- 6 J. Exner, *Dissertation*, Universität Heidelberg, Heidelberg, 1978.
- 7 H. Becker, J. Exner und J. E. Averett, *Phytochem. Bull.*, 10 (1977) 36.
- 8 R. Neu, *Naturwissenschaften*, 43 (1956) 82.