

CHROM. 11,818

## Note

### Auftrennung und Remissionsmessung *in situ* von Flavonoid-Aglykonen auf Hochleistungsdünnschichtchromatographie-Fertigplatten RP-18 F<sub>254</sub>S

A. HIERMANN

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

(Eingegangen am 27. Februar 1979)

Die Auftrennung von Flavonoiden mittels Dünnschichtchromatographie (TLC) erfolgt im allgemeinen auf Cellulose-, Polyamid- oder Kieselgeschichten. In diesem Zusammenhang ist es oft von Interesse eine qualitative und quantitative Analyse der aufgetrennten Flavonoide unmittelbar auf der Sorptionsschicht durchzuführen. Zu diesem Zweck werden die Absorptions- oder (nach entsprechender Detektion) die Fluoreszenzspektren *in situ* aufgenommen<sup>1,2</sup>. Als Sorbentien für die Absorptionsmessung eignen sich vor allem Cellulose und Polyamid. Die auf normalen Kieselgeschichten aufgetrennten Flavonoide zeigen sehr abgeflachte und bathochrom verschobene Absorptionsspektren. Dies dürfte auf eine Chelatbildung der Flavonoide mit anwesenden Metallsalzen zurückzuführen sein. Nur bei Verwendung der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)-Fertigplatten Kieselgel 60 konnten einwandfreie, deutlich ausgeprägte Absorptionsbanden erhalten werden<sup>3</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wird die Auftrennung sowie die qualitative und quantitative Analyse mittels Remissionsmessung auf HPTLC-Fertigplatten RP-18 F<sub>254</sub>S beschrieben.

#### EXPERIMENTELLES

##### TLC-Auftrennung

Sorptionsschicht: HPTLC-Fertigplatten RP-18 F<sub>254</sub>S (10 × 10 cm; Merck, Darmstadt, B.R.D.). Auftragen: Mikrokapillare bis max. 1 µl (1 cm vom unteren Plattenrand, seitlich 0.5 cm). Fließmittel: FG 1 (für wenig methylierte und nicht methylierte Flavonoid-Aglykone); Methanol-Wasser-Ameisensäure (28:10:5); Laufstrecke 8 cm. FG 2 (für höher methylierte Flavonoid-Aglykone); Methanol-Wasser-Ameisensäure (28:4:5). Detektion; UV-254 und Naturstoffreagens (1 % in Methanol) Betrachten im UV-360.

In Tabelle I sind die  $R_f$ -Werte der untersuchten Flavonoid-Aglykone aufgezeigt.

##### Remissionsmessung *in situ*

*Qualitative Auswertung.* Für die qualitative Analyse der aufgetrennten Flavonoid-Aglykone werden nach Vertreiben des Fließmittels die Absorptionsspektren mit einem Spektralphotometer (Zeiss PMQ 3) im Bereich von 500-200 nm aufgenommen (Parameter siehe *Quantitative Auswertung*). Die untere Nachweisgrenze liegt bei etwa

TABELLE I

$R_F$ -WERTE UND ABSORPTIONSMAXIMA VON FLAVONOID-AGLYKONEN AUF HPTLC-FERTIGPLATTEN RP-18 F<sub>254</sub>S

FG 1 = Methanol-Wasser-Ameisensäure (28:10:5), FG 2 = Methanol-Wasser Ameisensäure (28:4:5).

Flavonoid-Aglykone	$R_F$ -Werte		Absorption in Methanol		Absorption in situ	
	FG 1	FG 2	Bande I	Bande II	Bande I	Bande II
<i>Flavone</i>						
Luteolin	0.66	0.77	349	253	351	266
Apigenin	0.59	0.70	336	268	340	271
Nepetin	0.52	0.80	346	273	350	270
Chrysoeriol	0.52	0.81	347	269	348	271
Dinatin	0.49	0.71	335	274	340	276
Diosmetin	0.48	0.70	344	267	346	270
Jaceosidin	0.47	0.71	342	275	349	276
Digicitrin	0.37	0.63	336	281	345	285
Chrysin	0.35	0.54	313	268	327	270
Acacetin	0.26	0.49	327	269	342	265
Pectolinarigenin	0.23	0.49	332	276	340	271
Flavon	0.22	0.44	294	250	315	255
Apigenin 5,7,4'-OCH <sub>3</sub>	0.08	0.33	333	270	344	270
<i>Flavonole</i>						
Quercetagenin	0.99	0.99	375	264	372	270
Myricetin	0.84	0.92	374	254	372	270
Fisetin	0.73	0.88	363	248	365	265
Morin	0.73	0.91	370	264	372	271
Quercetin	0.71	0.82	370	256	376	261
Kämpferol-7,4'-OCH <sub>3</sub>	0.56	0.25	367	270	380	270
Kämpferol-3-OCH <sub>3</sub>	0.54	0.73	351	270	358	269
Kämpferol	0.52	0.91	367	266	369	276
Quercetin-3,3'-OCH <sub>3</sub>	0.51	0.72	355	256	361	260
Rhamnetin	0.42	0.68	371	256	377	265
Galangin	0.30	0.59	359	267	367	276
Kämpferol-7-OCH <sub>3</sub>	0.28	0.53	368	269	375	271
Myricetin-7,3',4'-OCH <sub>3</sub>	0.26	0.53	371	264	372	270
Kämpferol-4'-OCH <sub>3</sub>	0.25	0.51	367	267	375	269
3-Hydroxyflavon	0.19	0.40	344	239	353	246
Kämpferol-3,7,4'-OCH <sub>3</sub>	0.11	0.33	350	270	362	260
Quercetin-7,3',4'-OCH <sub>3</sub>	0.09	0.31	370	256	376	260
<i>Flavanone</i>						
Naringenin	0.76	0.85	326	289	330	295
Hesperetin	0.71	0.84	326	282	—	302
<i>Dihydroflavonole</i>						
Dihydroquercetin	0.94	0.96	340	293	—	295
Dihydrofisetin	0.94	0.96	310	278	317	286

50 ng. In Fig. 1 sind die Absorptionsspektren von verschiedenen Flavonoidtypen (Flavon, Flavonol, Flavanon und Dihydroflavonol) aufgezeigt.

*Quantitative Auswertung.* Für die quantitative Analyse wird die Flavonoidlösung mittels einer Mikrokapillare mit Festvolumen 0.1  $\mu$ l aufgetragen (siehe *TLC-Auftren-*

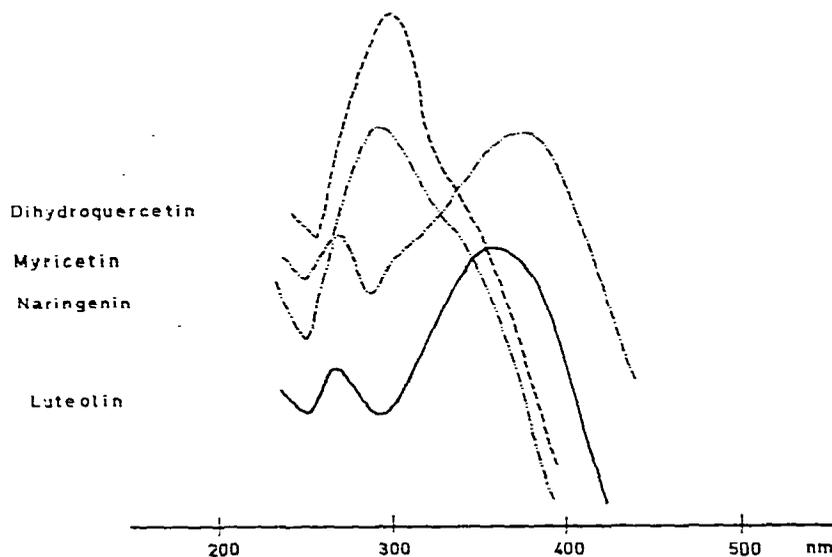


Fig. 1. Remissionsspektren von Flavonoid-Aglykonen auf RP-18-Schicht.

nung). Nach dem Entwickeln des Chromatogrammes wird das Fließmittelgemisch im Luftstrom vertrieben und die Absorption der zu bestimmenden Flavonoid-Aglykone bei der entsprechenden Wellenlänge (siehe Absorptionsmaxima in Tabelle I) in Remission gemessen. Werden mehrere Flavonoid-Aglykone auf einer Laufbahn in einem Scan quantitativ erfasst, so wird die Absorption bei einer mittleren Wellenlänge von 360 nm (Flavone und Flavonole und 290 nm (Flavanone und Dihydroflavonole) gemessen. Die untere Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 ng. Der Durchschnitt der mittleren Standardabweichung beträgt  $\pm 2.6\%$ .

Parameter: Spektralphotometer Zeiss PMQ 3; Spaltbreite 6 mm, Monochromatorspalt 0.5 mm, Dämpfung 3, Servogor S-Schreiber, Spreizung 20 mV, qualitativ 50 mV.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zur Auftrennung von Flavonoiden auf Reversed-Phase (RP) HPTLC-Schichten haben sich als Fließmittel vor allem Methanol-Wasser-Gemische geeignet. Wie aus Fig. 2 zu ersehen ist, können die Trennbedingungen durch Erhöhung bzw. Erniedrigung des Wasseranteiles beim Fließmittelsystem Methanol-Wasser-Ameisensäure wesentlich beeinflusst werden. Um eine Schwanzbildung bei der TLC-Auftrennung weitestgehend zu vermeiden, ist der Zusatz von Ameisensäure erforderlich. Es ist dabei zweckrässig, höher methylierte Aglykone mit dem Fließmittelgemisch FG 1 Methanol-Wasser-Ameisensäure (28:4:5) und wenig methylierte sowie nicht methylierte Aglykone mit dem Fließmittelgemisch FG 2 Methanol-Wasser-Ameisensäure (28:10:5) aufzutrennen. Das TLC Verhalten der Flavonoid-Aglykone entspricht dabei im wesentlichen den allgemeinen Kriterien der Reversed-Phase Chromatographie.

Für eine generelle TLC-Auftrennung von Flavonoid-Glykosiden scheint uns dagegen dieses lipophile Sorptionsmittel nicht besonders geeignet, da der Wasseranteil des Fließmittels so weit erhöht werden müsste, dass die Benetzbarkeit der hydropho-

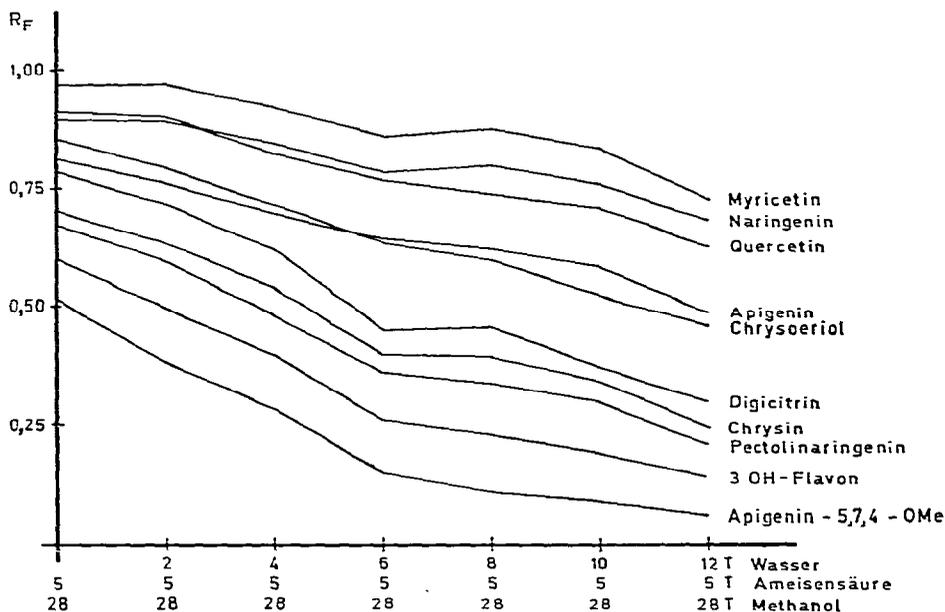


Fig. 2. Einfluss des Wasseranteiles auf die Trennung von Flavonoid-Aglykonen auf RP-18-Schicht.

ben RP-Schicht überschritten wird. Für die Identifizierung bzw. qualitativen Analyse wurden die Absorptionsspektren in Remission aufgenommen.

Die Absorptionsmaxima der von uns untersuchten Flavonoid-Aglykone sind in Tabelle I aufgezeigt. Interessant erscheint dabei, dass die Lage der Absorptionsbanden strukturbedingten Gesetzmässigkeiten unterliegt, wie sie von Mabry *et al.*<sup>4</sup> bei der UV-spektroskopischen Analyse der in Methanol aufgenommenen Spektren beschrieben sind. Bei den in Remission auf RP-Schichten aufgenommenen Absorptionsspektren sind die Maxima gegenüber den in Methanol aufgenommenen nur geringfügig bathochrom verschoben. Die Absorptionsmaxima der uns zur Verfügung stehenden Flavonoid-Aglykone lagen bei *Flavonen*, Bande I, bei 315–351 nm (in Methanol bei 304–350 nm), bei *Flavonolen*, Bande I, bei 353–385 nm (in Methanol bei 352–384 nm) (bei nicht substituierter 3-OH-Gruppe) und bei *Flavanonen* und *Dihydroflavonolen*, Bande II, bei 287–296 nm (in Methanol bei 270–295 nm).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist ersichtlich, dass auch lipophile Sorptionsschichten für die Auftrennung von Flavonoid-Aglykonen geeignet sind. Die TLC-Untersuchungen wurden sowohl an Gemischen von Reinsubstanzen als auch an Flavonoid-führenden Pflanzenextrakten durchgeführt (*Crataegus*, *Digitalis*, *Aesculus* und *Convallaria*). Lipophile Begleitstoffe wie Chlorophylle, Lipide, Carotinoide etc. verbleiben grösstenteils an der Startlinie. Hydrophile Begleitstoffe wie Gerbstoffe, Pflanzensäuren etc. wandern an der Front. Die aufgetrennten Flavonoid-Aglykone konnten durch Remissionsmessung *in situ* qualitativ und quantitativ analysiert werden.

#### DANK

Für die Überlassung von Kämpferol-7-OCH<sub>3</sub>, -7,4'-OCH<sub>3</sub> und -3,7,4'-OCH<sub>3</sub>,

Quercetin-3,3'-OCH<sub>3</sub> und -7,3',4'-OCH<sub>3</sub>, und Myricetin-7,3',4'-OCH<sub>3</sub> danke ich Herrn Dozent E. Wollenweber, Botanisches Institut der Technischen Hochschule Darmstadt herzlich.

#### LITERATUR

- 1 P. Spiegel, Ch. Dittrich und K. Jentzsch, *Sci. Pharm.*, 44 (1976) 126.
- 2 P. P. S. Schmid, *J. Chromatogr.*, 157 (1978) 217.
- 3 A. Hiermann und Th. Kartnig, *J. Chromatogr.*, 140 (1977) 322.
- 4 T. J. Mabry, K. R. Markham und M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, New York, Heidelberg, Berlin, 1970, S. 33-249.