

- 12 A.E. Bird und A.C. Marshall, *Biochem. Pharmacol.* 16, 2275 (1967).
- 13 L. Foged, S. Husted und F. Andreasen, *Acta Pharmacol. Toxicol.* 39, 312 (1976).
- 14 K. Paschen, W. Bautz und J. Bohner, *Arzneim.-Forsch.* 26, 2137 (1976).
- 15 K. Seiler und F. Duckert, *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19, 389 (1968).
- 16 S.M. Singhvi, A.F. Heald, H.H. Gadebusch, M.E. Resnick, L.T. Difazio und M.A. Leitz, *J. Lab. Clin. Med.* 89, 414 (1977).
- 17 H. Glasser und J. Krieglstein, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 265, 321 (1970).
- 18 B. Huthwohl und E. Jahnchen, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 273, 204 (1972).
- 19 J. Krieglstein, *Klin. Wschr.* 47, 1125 (1969).
- 20 J. Krieglstein und G. Kuschinsky, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 262, 1 (1969).
- 21 J. Krieglstein und G. Kuschinsky, *Arzneim.-Forsch.* 18, 287 (1968).
- 22 A. Kinawi und K. Min, *Biomed. Tech.* (im Druck).
- 23 A. Kinawi und C. Teller, *Arzneim.-Forsch.* (im Druck).
- 24 A. Kinawi und C. Teller, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* (im Druck).
- 25 W.E. Müller und U. Wollert, *Biochem. Pharmacol.* 25, 141 (1976).
- 26 H. Kurz und G. Friemel, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 257, 35 (1967).

[Ph 982]

---

*Arch. Pharm. (Weinheim)* 312, 213–218 (1979)

## Untersuchungen zur Isolierung von Flavonoiden mit Hilfe der Oxide und Salze zweiwertiger Kationen, 3. Mitt.

### Die Isolierung von Flavonoid-Aglykonen aus Drogen\*\*

Theodor Kartnig\* und Alois Hiermann

Institut für Pharmakognosie der Universität Graz, Universitätsplatz 4/I, A-8010 Graz  
Eingegangen am 10. April 1978

---

Flavonoide können nach der Extraktion aus Drogen mit organischen, neutralen Lösungsmitteln durch Bindung an MgO isoliert werden. Begleitstoffe stören die Sorption im allgemeinen nicht. Für die Reinigung und Auftrennung der isolierten Flavonoide werden mehrere Möglichkeiten aufgezeigt. Die Reindarstellung von Flavonoid-Aglykonen wird am Beispiel von *Folium Digitalis lanatae* beschrieben.

---

\*\* Herrn Prof. Dr. R. Fischer zum 75. Geburtstag gewidmet.

### Isolation of Flavonoids Using Oxides and Salts of Bivalent Cations, III: The Isolation of Flavonoid Aglycones from Drugs

Flavonoids can be isolated by sorption onto MgO from drug extracts with organic neutral solvents. Impurities do not influence this process. Several ways to purify and separate the flavonoids are described. As an example the isolation of the flavonoid aglycones of *Folium Digitalis lanatae* is demonstrated in a scheme.

In den vorangegangenen Mitt.<sup>1,2)</sup> berichteten wir über die Möglichkeit, Flavonoide durch Bindung an säurelösliche Oxide und Salze zweiwertiger Kationen aus Lösungen zu isolieren. Im folgenden seien die Ergebnisse unserer Untersuchungen mitgeteilt, Flavonoid-Aglykone aus Drogenextrakten mittels MgO in säulenchromatographischer Versuchsanordnung abzutrennen bzw. anzureichern. Dazu mußte vor allem geprüft werden, ob die Bindung der Flavonoide an MgO aus Drogenextrakten durch Begleitstoffe behindert wird. Untersuchungen an Extrakten aus Blatt-, Blüten- und Fruchtdrogen (*Folium Digitalis lanatae*<sup>3,4)</sup> und *purpureae*<sup>5)</sup>, *Herba Convallariae*<sup>6)</sup>, *Flos* und *Fructus Crataegi*) ergaben, daß lediglich Gerbstoffe, wenn sie in größeren Mengen vorkommen, die Bindung nennenswert beeinflussen können. Versuche mit Gerbstofflösungen zeigten, daß die „Bindungszone“ der Flavonoide in der MgO-Säule wesentlich breiter wird, wenn die Flavonoide nach oder gleichzeitig mit Gerbstoffen auf die Säule aufgebracht werden. Offensichtlich treten die Gerbstoffe mit den Flavonoiden bei der Komplexbildung mit dem MgO in Konkurrenz, so daß die Flavonoide teilweise erst in tieferen Zonen gebunden werden. Dies kann durch die Verwendung einer größeren Menge MgO ausgeglichen werden, führt jedoch in der Folge zur Vermehrung der Volumina an Salzsäure und Lösungsmittel bei der weiteren Isolierung der Flavonoide. Außerdem gehen die Gerbstoffe teilweise mit in die Flavonoidausschüttelung und verunreinigen unter Umständen die Flavonoide bei der Abscheidung aus den Lösungsmitteln. Es ist daher angezeigt, allzu große Gerbstoffmengen vor der Bindung der Flavonoide an das MgO abzutrennen. Dies kann durch die Wahl eines entsprechenden Lösungsmittels (s. u.), das die Flavonoide gut, die Gerbstoffe hingegen weniger gut extrahiert, erfolgen. Sollte dies aus bestimmten Gründen nicht möglich sein, können z. B. in alkoholischen oder alkoholisch-wässrigen Extrakten die Gerbstoffe durch Zugabe von Ethylacetat gefällt werden.

Bei der Sorption der Flavonoide an MgO aus Drogenextrakten werden verschiedene Extraktivstoffe auf die MgO-Säule aufgebracht und dort zum Teil in unterschiedlichen Bindungsformen von der Säulenfüllung zurückgehalten. Diese Verunreinigungen, die unter Umständen die Reindarstellung der Flavonoide stören können, müssen abgetrennt werden.

Allgemein kann die Abtrennung der Flavonoid-Aglykone von Begleitstoffen bei der Darstellung mittels MgO nach unseren bisherigen Erfahrungen durch die nachstehenden Maßnahmen erfolgen:

1.) Durch die Wahl geeigneter Extraktionsmittel

- 2.) Durch Elution der Begleitstoffe aus der MgO-Säule
- 3.) Durch die Wahl geeigneter Lösungsmittel zur Ausschüttelung oder Perforierung der Flavonoide aus der salzsaurer Lösung der MgO-Säule
- 4.) Durch sc Verfahren bei der Auftrennung des isolierten Flavonoidgemisches

#### ad 1.) Wahl des Extraktionsmittels

Die Wahl des Extraktionsmittels richtet sich nach der Löslichkeit der zu extrahierenden Flavonoid-Aglykone. Damit der Drogenextrakt direkt auf die MgO-Säule aufgebracht werden kann, dürfen nur organische, neutrale Lösungsmittel verwendet werden. Es zeigte sich jedoch, daß die gezielte Extraktion mit selektiven Lösungsmitteln, entsprechend der Polarität der Flavonoid-Aglykone, aufgrund der Lösungsvermittlung von Begleitstoffen nur bedingt ausgenützt werden kann (durch Bindung an MgO und weitere Aufarbeitung konnten wir feststellen, daß z. B. bei Vorreinigung von Drogen mit Petrolether auch polare Flavonoid-Aglykone mit diesem Lösungsmittel extrahiert werden).

Aus verschiedenen Gründen (z. B. Chemotaxonomie) kann die Notwendigkeit bestehen, die in der Pflanze bzw. Droge frei vorliegenden Flavonoid-Aglykone getrennt von den glykosidisch gebundenen zu isolieren. Andererseits kann die Notwendigkeit bestehen, die gesamten Flavonoid-Aglykone, d. h. die frei und glykosidisch gebunden vorliegenden Flavonoide, nach vorangegangener Glykosidsplaltung zu erfassen. Zur Isolierung der Flavonoid-Aglykone haben sich für die genannten zwei Möglichkeiten folgende Vorgangsweisen unter Verwendung von MgO bewährt:

##### a) *Extraktion der frei vorliegenden Flavonoid-Aglykone*

α. Weniger stark polare Aglykone<sup>7)</sup> wie Isoflavone, Flavanone, Dihydroflavonole, höher methylierte Flavone und Flavonole werden am besten mit Benzol, Chloroform, Ether oder Ethylacetat extrahiert.

β. Polare Aglykone wie Flavone, Flavonole, Aurone und Chalcone werden am besten mit Ethylacetat oder Aceton extrahiert.

Verunreinigungen durch Gerbstoffe und ähnliche Verbindungen sind bei der Extraktion mit diesen Lösungsmitteln nur im geringen Ausmaß zu erwarten. Eine Vorreinigung der Droge mit Petrolether ist somit bei Verwendung der oben angeführten Extraktionsmittel nicht erforderlich. So können z. B. Extrakte mit Ethylacetat oder Aceton selbst aus stark gerbstoffhaltigen Drogen, z. B. *Fructus Crataegi*, direkt auf die MgO-Säule aufgebracht werden. Farbstoffe und Lipide sowie nicht chelatbildende Pflanzensäuren stören ebenfalls nicht.

##### b) *Extraktion der Aglykone nach Spaltung der Flavonoid-Glykoside*

Die Extraktion erfolgt wie unter a) beschrieben. Ergänzend sei festgehalten, daß sich für die Freisetzung der Flavonoid-Aglykone neben der üblichen Spaltung der Glykoside durch Verwendung von β-Glykosidasen folgende zwei Verfahren für Drogen im Hinblick auf die Isolierung der Flavonoid-Aglykone mit Hilfe von MgO bewährt haben:

##### α. Spaltung der Glykoside mit drogen-eigenen Enzymen

Die Droge wird mit Wasser versetzt, einige Zeit bei Raumtemp. zur Fermentierung stehen gelassen, anschließend 10 % Methanol zugesetzt und unter Erwärmen und Rühren oder Schütteln extrahiert. Nach Abtrennen der Drogenanteile wird die wäßrig-methanolische Lösung mit Ether

oder Ethylacetat perforiert. Das Perforat wird nach Trocknen über Natriumsulfat auf die MgO-Säule aufgebracht.

#### **β. Spaltung der Glykoside durch Säurehydrolyse**

Die Droge wird mit HCl (7 %) über zwei Std. unter Rückfluß am Wasserbad erhitzt (C-Glykoside müssen entsprechend länger hydrolysiert werden). Nach Abtrennen der Drogenanteile wird die salzsaure Lösung mit Ether oder Ethylacetat perforiert. Das Perforat wird nach Trocknen über Natriumsulfat auf die MgO-Säule aufgebracht.

### **ad 2.) Elution der Begleitstoffe aus der MgO-Säule**

Infolge der festen Bindung der Flavonoide an MgO können Begleitstoffe, die durchweg weniger stark an MgO sorbiert werden, aus der Säule eluiert werden. Die Wahl der Elutionsflüssigkeit wird jeweils durch Vorversuche auf MgO-beschichteten Platten<sup>8)</sup> oder einer kleinen MgO-Säule zu ermitteln sein. Benützt man die DC auf MgO zur Ausmittlung (meist genügt einfaches Tüpfeln), soll die Aufschlammflüssigkeit für die MgO-Beschichtung dem Lösungsmittelgemisch zur Einschlämmung der MgO-Säule entsprechen. Dadurch kann das Sorptionsverhalten der verschiedenen Begleitstoffe am besten von der DC auf die Säule übertragen werden. Prinzipiell können alle neutralen, organischen Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische verwendet werden. Bei unseren bisherigen Untersuchungen haben sich folgende Lösungsmittelgemische bewährt:

Ethylacetat/Methanol (2/1), Benzol/Methanol (1/3) und Dioxan/Methanol (2/1). Der filtrierte Drogenextrakt wird direkt auf die MgO-Säule gebracht. Durch Elution mit dem durch Tüpfeln oder einen kleinen Säulenvorversuch als optimal gefundenen Lösungsmittelgemisch werden die Begleitstoffe aus der MgO-Säule ausgewaschen, während die Flavonoide an MgO sorbiert bleiben. Herstellung der MgO-Säule: X Gramm MgO ( $X = 1-3\%$  der eingesetzten Drogenmenge) werden mit Ethylacetat in eine Glassäule entsprechender Dimension eingeschlämmt.

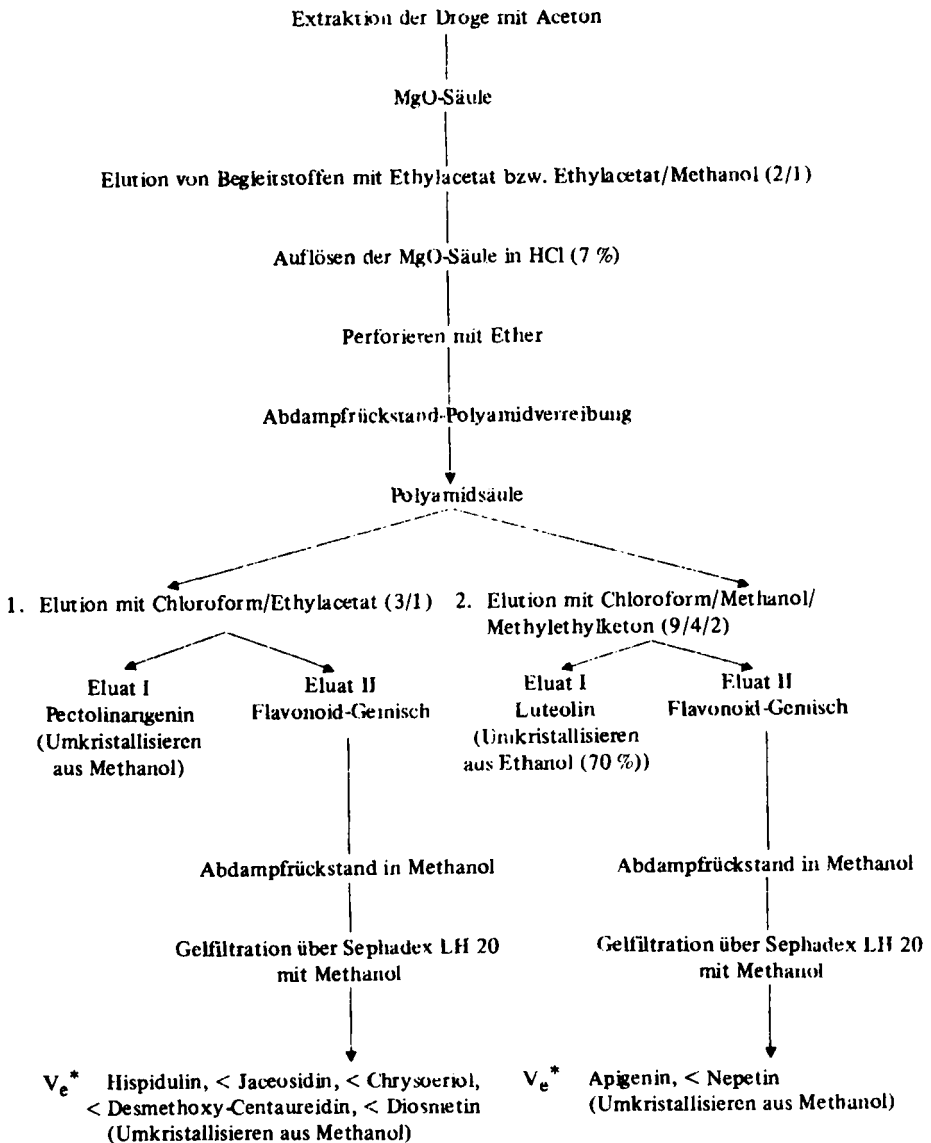
### **ad 3.) Abtrennung der Begleitstoffe bei der Perforation der salzsauren Lösung der MgO-Säule**

Die Zone der MgO-Säule, die die Flavonoid-Aglykone enthält, wird in einer entsprechenden Menge HCl (7 %) unter Kühlung gelöst. (Sollte die Notwendigkeit bestehen, die wäßrige, salzsaure Lösung über längere Zeit stehen zu lassen, empfiehlt es sich, mit Natriumhydrogencarbonat und Ammoniumchlorid auf  $\text{pH} = 3$  zu puffern). Dabei werden die Flavonoid-Aglykone aus ihren Komplexen in Freiheit gesetzt. Durch Ausschütteln oder Perforieren mit Ether, Ethylacetat oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel werden diese der salzsauren Lösung entzogen und allein oder als Gemisch mit geringen Mengen an Verunreinigungen als Originalverbindungen erhalten. Begleitstoffe, die bis in die salzsaure-wäßrige Lösung gelangen, werden je nach ihrer chemischen Natur entweder in der salzsauren Lösung verbleiben oder in eine der Perforationsflüssigkeiten gelangen.

### **ad 4.) Chromatographische Verfahren zur Auftrennung des Flavonoidgemisches**

Welches Verfahren zur weiteren Auftrennung des Flavonoidaglykongemisches heranzuziehen ist, wird naturgemäß von den Eigenschaften der Aglykone bestimmt sein. Neben den Möglichkeiten der Auftrennung über Polyamid-, Kieselgel- oder Zellosesäulen hat sich nach unseren Erfahrungen die Anwendung der Gelfiltration gut bewährt. Diese kann sowohl allein als auch in Kombination

Schema zur Isolierung von Flavonoid-Aglykonen aus *Folium Digitalis lanatae*



\* $V_e$  = Elutionsvolumen

mit den oben angeführten *sc* Methoden im Anschluß an die Anreicherung mittels MgO und Extraktion aus der wässrig-salzsäuren Phase erfolgen. Vor allem die Fraktionierung mit Methanol über Sephadex LH 20 eignet sich in besonderem Maße für die Auftrennung der Flavonoid-Aglykone<sup>9)</sup>. Bei einigen Drogen (*Crataegus*, *Convallaria*, *Aesculus*) ist es uns gelungen, die Aglykone nach Extraktion, Reinigung über MgO und anschließender Trennung über Sephadex LH 20 mittels Zirkulartechnik rein darzustellen. Bei schwer zu trennenden Aglykongemischen, wie etwa in *Folium Digitalis lanatae*, ist eine Auftrennung in die einzelnen Aglykone durch Gelfiltration in Verbindung mit anderen herkömmlichen Methoden erforderlich. Sollten Begleitstoffe bis in die Perforationsflüssigkeit, mit der die Flavonoid-Aglykone der salzsäuren Lösung des MgO entzogen wurden, gelangt sein, werden sie letztlich bei der zur Auftrennung des Flavonoidgemisches vorteilhaften *sc* Fraktionierung über Polyamid-, Kieselgel-, Zellulose- oder Biogel- (Sephadex) Säulen abgetrennt. Die Wahl der Lösungsmittel für Polyamid-, Kieselgel- oder Zellulosesäulen erfolgt am besten durch Vorversuche mittels DC. Bei Verwendung von Sephadex LH 20 hat sich Methanol am besten bewährt. Unsere bisherigen Erfahrungen bei der Darstellung von Flavonoid-Aglykonen zeigten, daß mit Hilfe von MgO auch jene Flavonoide isoliert werden können, die nur in sehr kleinen Mengen in den Drogen vorkommen. Durch die beschriebenen Maßnahmen zur Abtrennung von Begleitstoffen während der Darstellung ist die Gewinnung von chromatographisch reinen Flavonoid-Aglykonen möglich. Der gesamte Arbeitsgang der Isolierung von Flavonoid-Aglykonen aus einer Droge ist im folgenden Schema am Beispiel von *Folium Digitalis lanatae* dargestellt.

#### Literatur

- 1 Th. Kartnig und A. Hiermann, Arch. Pharm. (Weinheim) *310*, 737 (1977).
- 2 A. Hiermann und Th. Kartnig, Arch. Pharm. (Weinheim) *311*, 609 (1978).
- 3 A. Hiermann, Th. Kartnig, O. Seligmann und H. Wagner, Planta Med. *32*, 24 (1977).
- 4 A. Hiermann und Th. Kartnig, Planta Med. *34*, 225 (1978).
- 5 Th. Kartnig, J. Böhm und A. Hiermann, Planta Med. *32*, 347 (1977).
- 6 Th. Kartnig, A. Hiermann und Ch. Vrečer, Planta Med. *33*, 412 (1978).
- 7 J.B. Haborne, T.J. Mabry und H. Mabry, The Flavonoids, p.3, Chapman and Hall, London 1975.
- 8 Th. Kartnig und G. Mikula, Zentralbl. Pharm. *109*, 251 (1970).
- 9 K.M. Johnston, D.J. Stern und A.C. Waiss, Jr., J. Chromatogr. *33*, 539 (1968).

[Ph 985]