



Ionenchromatographische Trennung und selektive Detektion von Flavonoid-Glycosiden und deren Al(III)-Komplexen mittels gepulster amperometrischer Detektion

L. Sonnenschein* und A. Seubert

Abstract

Ionenchromatographie in Kombination mit gepulster amperometrischer Detektion (PAD) als selektive Nachweismethode wurde für die Trennung und Bestimmung von Flavonoiden und deren Al(III)-Komplexen eingesetzt. Als Beispielsubstanzen wurden Quercetin sowie dessen glycolysiertes Derivat Rutin verwendet.

Einleitung

Flavonoide stehen vor allem aufgrund ihrer biologischen und physiologischen Wirkung in Pflanzen sowie auf den Menschen im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Sie wirken u. a. antioxidativ und zeigen inhibitorische Effekte in verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung.

Zudem sind Flavonoide in der Lage, Metallionen chelatartig zu komplexieren. Quercetin und Rutin, deren Strukturformeln in **Abb. 1** dargestellt sind, besitzen je zwei Bindungsstellen für Al(III).

Die Kombination von Ionenchromatographie und amperometrischer Detektion gewinnt besonders im Bereich der Kohlenhydratanalytik an Bedeutung^[1].

Neben dieser Einsatzmöglichkeit kann die Amperometrie und im Speziellen die gepulste Amperometrie auch auf den Nachweis von Flavonoiden und deren Al(III)-Komplexen ausgeweitet werden. Sie ermöglicht eine selektive und empfindliche Detektion nach vorangegangener ionenchromatographischer Trennung.

Experimenteller Aufbau

Eine Schema des verwendeten Trennsystems ist in **Abb. 2** gezeigt.

Entscheidend für eine zersetzungsfreie Trennung von Al(III)-Komplexen ist die Kühlung der Trennsäule auf 0° C. Nachsäulenaddition von NaOH steigert die Empfindlichkeit der Detektion. Die Bedingungen der Trennungen sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Als Austauscher wurde für die Trennung der Komplexe ein in der Arbeitsgruppe hergestellter Kationenaustauscher verwendet. Dabei handelt es sich um ein PS/DVB-Grundmaterial, welches mit einer aromatischen Sulfonsäure funktionalisiert wurde.

Tabelle 1: Instrumentelle Bedingungen

IC-Parameter	PAD-Parameter
<ul style="list-style-type: none"> Anionen-Säule: - Grundmaterial: PS/DVB - funktionalisiert mit Ethyldimethylamin (EDMA) - Säulendimensionen: 100 mm x 4,6 mm 	<ul style="list-style-type: none"> Nachsäulenadditiv: 300 mmol/l Natronlauge - Flussrate Additiv: 0.15 - 0.30 ml/min
<ul style="list-style-type: none"> Kationen-Säule: - Grundmaterial: PS/DVB - funktionalisiert mit Arylsulfonsäure - Säulendimensionen: 100 mm x 4,6 mm - Austauscherkapazität: 100 µeq/Säule - Säulentemperatur: 0°C 	<ul style="list-style-type: none"> Elektrode: Drei-Elektroden-Anordnung mit Gold-Arbeits Elektrode - Pulsequenz: Dreistufige Sequenz mit oxidativer Detektion
<ul style="list-style-type: none"> HPLC-Pumpe: - Metrohm 709 IC Pumpe - Injektionsventil: - Metrohm 812 Valve Unit - Injektionsvolumen: - 20 µl - Eluent: - 50 - 200 mmol/l NaNO₃ pH 3.50 (gepuffert mit 4mmol/l NaN₃) - Flussrate: - 0.25 - 1.00 ml/min 	<ul style="list-style-type: none"> Potential V: -0.2 -0.4 -0.6 -0.8 -1.0 -1.2
<ul style="list-style-type: none"> - Detektor: - Metrohm 817 Bioscan 	

Ergebnisse

Zunächst wurde das Retentionsverhalten der freien Flavonoide im Rahmen der Anionenchromatographie untersucht. Entgegen den Erwartungen zeigen beide Beispielsubstanzen starke Retention. Die Abhängigkeit der Retentionsfaktoren k' von hydrophoben Effekten sind in **Abb. 3** in der nächsten Spalte dargestellt. Ionische Wechselwirkungen sind unter den gegebenen Bedingungen vernachlässigbar (mittlere Ladung des Rutin: -0.1).

Die Variation des Acetonitril-Anteils liefert eine starke Abhängigkeit der Retentionsfaktoren. Trotz der positiv geladenen stationären Phase ist der hydrophobe Einfluss groß. Gleiches ergibt sich bei Verwendung von Kationenaustauschermaterialien. Diese Wechselwirkungen sind auch bei der Trennung der Flavonoid-Al(III)-Komplexe zu berücksichtigen.

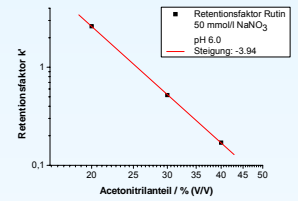


Abb. 3: Retentionsfaktoren des Rutin in Abhängigkeit des Acetonitrilanteils.

In Anlehnung an die Arbeit von Markham und Porter^[2] konnte gezeigt werden, dass sich abhängig vom Aluminiumgehalt der Lösung Komplexe unterschiedlicher Stöchiometrien bilden (**Abb. 4a** nach Job am Beispiel Quercetin). Dabei liegen u. a. Komplexe mit M/L-Verhältnissen von 2:1, 1:1 und 1:2 vor.

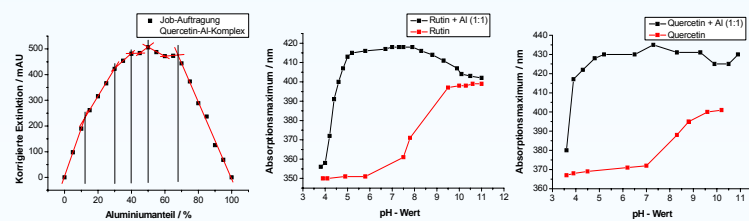
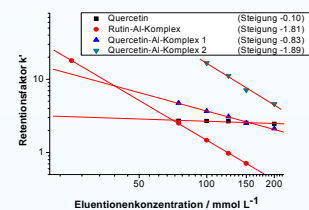


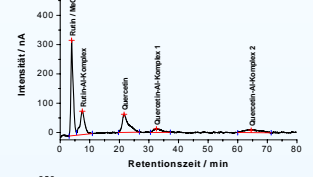
Abb. 4: a) Komplexstöchiometrie für Quercetin nach Job, b, c) pH-Stabilitäten der Komplexe (1:1).

Für die chromatographische Trennung sind die pH-Stabilitäten der Komplexe entscheidend (siehe **Abb. 4 b, c**). In den Messlösungen müssen stabile Komplexe vorliegen. Liegt der pH-Wert bei 4.35, ist dies der Fall und die Komplexe überdauern die Trennung bei einem Eluent-pH-Wert von 3.5.

Abb. 5 a zeigt die Abhängigkeit der Retentionsfaktoren der Komplexe von der Elutionenkonzentration. Injiziert wurden 1:1-Mischungen der Flavonoide mit Al(III). Es werden ein Rutin-Al-Komplex der Ladung +2 sowie Quercetin-Al-Komplexe der Ladungen +2 und +1 beobachtet. Das freie Quercetin liegt ungeladen vor.



Die Trennung eines Gemisches aus Rutin, Quercetin und Aluminium (**Abb. 5 b**) erfolgt bei einer NaNO₃-Konzentration von 125 mmol/l bei 40% Acetonitril innerhalb von 80 min. Eine Optimierung der Trennung durch Kühlung unter 0°C oder durch Verwendung einer höher kapazitiven Trennsäule ist denkbar.



Wie in **Abb. 5 c** gezeigt, liefert die Detektion bei Variation der Messpotentiale für beide freien Flavonoide korrelierende Signalintensitäten. Eine Selektivität bezüglich des glycolysierten Derivats ist nicht zu erkennen.

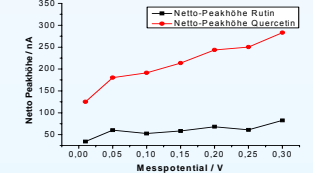


Abb. 5: a) Ermittlung der mittleren Ladung der Komplexe, b) Trennung von Rutin, Quercetin und deren Al-Komplexen, c) Selektivität der Detektion.

Zusammenfassung/Ausblick

Es kann gezeigt werden, dass die Trennung und Detektion von Flavonoid-Al(III)-Komplexen mithilfe der Kationenchromatographie kombiniert mit PAD möglich ist. Die Selektivität der Detektion bezogen auf die Flavonoid-Al(III)-Komplexe ist noch zu untersuchen. Anhaltspunkte zur Optimierung der Trennung und Verkürzung der Trenndauer werden verfolgt.

References

- [1] Cataldi, T.R.I.; Campa, C.; De Benedetto, G. E.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000), S. 739-758.
- [2] Markham, K.R.; Porter, L.J.: *J. Chem. Soc. (C)* 9 (1970), S. 1309-1313.