

# Anwendung der DC-MALDI-Kopplung für die Flavonoidanalyse



Dr. Ivana Kroslovakova, Wissenschaftliche Mitarbeiterin,  
ivana.kroslovakova@zhaw.ch

Simona Pedrussio, Wissenschaftliche Assistentin, Fachgruppe Phyto-  
pharmazie und Naturstoffe, simona.pedrussio@zhaw.ch

Dr. Evelyn Wolfram, Leiterin Fachgruppe Phytopharmazie und Naturstoffe,  
evelyn.wolfram@zhaw.ch

**Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe, vor allem aus Blüten und Früchten. Sie haben gesundheitsrelevante Bedeutung in Lebens-, Nahrungsergänzungs- und pflanzlichen Arzneimitteln. Ihre Zusammensetzung ist für viele Pflanzenrohstoffe typisch. Ihr Bandenmuster (Lage und Farbe) auf Dünnschichtchromatogrammen (DC) wird für die Qualitätskontrolle genutzt. Die Kopplung von DC mit MALDI-TOF MS liefert zusätzlich wertvolle Informationen über die Molekularmasse jeder Bande und erlaubt dadurch eine detailliertere Charakterisierung der Probe.**

Für eine Machbarkeitsstudie der Kopplung von Dünnschichtchromatographie (HPTLC\*) mit MALDI-TOF MS\*\* wurden die Flavonoid-Aglyka Luteolin und Quercetin mit ihren glykosidischen Formen Luteolin-7-O-Glukosid und Rutin (Quercetin-3-O-Glucorhamnosid) als Referenzsubstanzen gewählt (siehe Abb. 1). Flavonoide

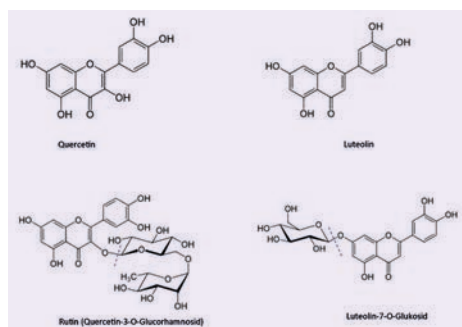


Abb. 1: Strukturformeln der untersuchten Flavonoidreferenzen. Die hervorgehobene Linie zeigt die mögliche Position von Fragmentierung im MS oder durch Hydrolyse.

sind Polyphenole mit antioxidativen Eigenschaften. In der Natur kommen sie hauptsächlich als Glykoside vor. Die Zuckergruppen ermöglichen eine gute Bioverfügbarkeit. Durch Hydrolysevorgänge, z. B. durch Enzyme, oder bei der Probenvorbereitung können die Zuckergruppen abgespalten werden. Es entstehen die zum Flavonoidglykosid korrespondierenden Aglyka.

### Spezielle DC-Platten und Adapter notwendig

Für die Kopplung der Dünnschichtchromatographie mit MALDI-TOF MS müssen spezielle HPTLC-Platten mit leitfähigem Aluminium als Schichtgrundlage verwendet werden. Ein eigens von Bruker Daltonics entwickelter DC-MALDI-Adapter ermöglicht das Einbringen der Platte in

den Hochvakuumbereich, wo der Laser das DC abtasten kann (siehe Abb. 2). Das dank moderner HPTLC-Geräte (CAMAG, Muttenz) reproduzierbare Flavonoid DC wurde zweimal erstellt: einmal mit der für den Flavonoidnachweis üblichen Anfärbung (Aufnahme bei 254 und 366 nm, siehe Abb. 3 links). Und ein weiteres, um das nur mit Matrix behandelte Chromatogramm von der Startposition bis zur Laufmitelfront mit MALDI-TOF MS zu untersuchen. Abb. 3 zeigt das Ergebnis der Untersuchungen: Die im DC als eine Bande erscheinenden Aglyka Luteolin und Quercetin (Zone 3) können durch die Kopplung mit MALDI detektiert und unterschieden werden. Die chromatographische Trennung vor der MALDI-TOF-MS-Analyse ermöglicht bei komplexen Mischungen, wie z. B. Pflanzenextrakten, eine wichtige Differenzierung: Fragmente, die im MS entstehen (siehe Quercetin im Spektrum auf der Höhe von Rutin in Abb. 3), werden nicht als in der Probe vorkommende Derivate, hier simuliert mit Quercetin als Referenz, fehlinterpretiert.

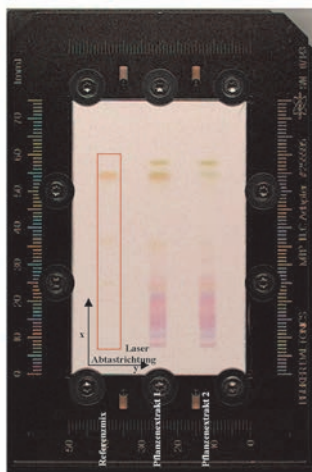


Abb. 2: DC-MALDI-Adapter (Bruker Daltonics) mit einem eingespannten HPTLC-Chromatogramm auf einer Silica-Schicht auf Aluminium (Merck, Darmstadt).

### Erfolgreiche Machbarkeitsstudie

Die Machbarkeitsstudie konnte die Eignung der MS Abtast-Methode für die Untersuchung von Flavonoid-DCs belegen. Ergebnisse von Wareneingangs- oder Stabilitätsprüfungen, wie sie z. B. vom Arzneibuch bei Phytopharmaka vorgeschrieben sind, Anbaustudien oder die Erforschung noch wenig bekannter Pflanzen u. v. a. können mit dieser Methode mit Daten zur Molekularmasse ergänzt werden. Den Einsatz der durch die notwendige Infrastruktur recht kostenintensiven Methode sehen die Autorinnen in der Naturstoffforschung sowie in der Phase der Optimierung und Charakterisierung von HPTLC-Methoden.

Acknowledgement: Merck Darmstadt AG stellte die HPTLC-Platten für das Projekt zur Verfügung

\*Hochreproduzierbare Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie durch Instrumentierung durch CAMAG, Muttenz und HPTLC-Schichten von Merck, Darmstadt  
\*\*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

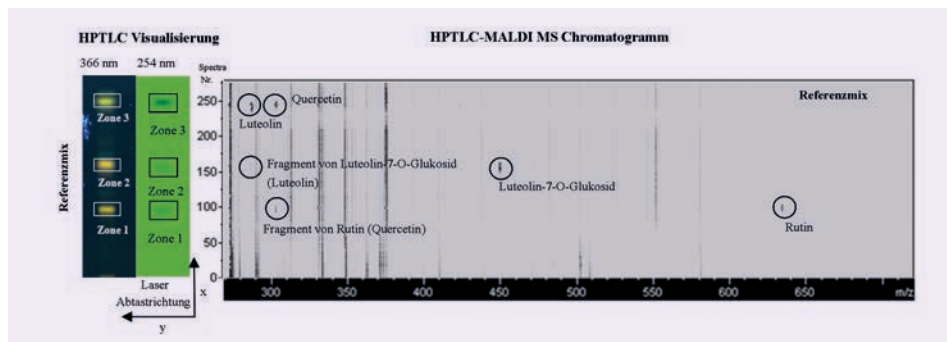


Abb. 3: Links: Aufnahme der HPTLC-Chromatogramme bei 366 und 254 nm. Rechts: 2D-HPTLC-MALDI-MS-Chromatogramm (Abtaststrecke ausgedrückt in fortlaufenden Spektrozahlen bei einer Schrittlänge von 0.2 mm).

Literatur: Kroslovakova I., Pedrussio S. and Wolfram E. (2016). Direct coupling of HPTLC with MALDI-TOF MS for qualitative detection of flavonoids on phytochemical fingerprints. *Phytochemical Analysis* – eingereicht (Status am 11. Februar 2016: «accepted with minor corrections»).