

Low-budget-HPTLC im Schülerlabor

Eine schnelle und einfache Trennung von Anthocyanen aus Blüten, Früchten und Fruchtsäften auf kleinen Umkehrphase-Platten

Carina Lämmle und Rudolf Binder

Anthocyane sind in der Natur weit verbreitet und bieten sich als Untersuchungsobjekt in Schülerlaboren unmittelbar an. Für eine gute chromatographische Trennung sind Schülerlabore allerdings oft nicht ausgestattet. Hier wird eine Methode vorgestellt, mit der sich aus Fruchtsäften, kleinen Stückchen einzelner Blütenblätter oder Früchten mit einfachsten Mitteln und geringem Zeitaufwand Anthocyanmuster erstellen lassen.

Die Komponenten dieser Muster lassen sich postchromatographisch auf das pH-Verhalten und die Komplexierung mit Metallionen weiter untersuchen. Außerdem lassen sich mit einer einfachen prä-chromatographischen Glycosidspaltung die Grundkörper der Anthocyane freilegen und chromatographisch trennen. Die Trennung erfolgt auf kleinen RP18W-Platten mit Methanol/Oxalensäure (2%ig), 50/50 als Fließmittel nach einer selbstfokussierenden Auftragung.

Anthocyane

Anthocyane sind in der Natur weit verbreitet und bieten eine reiche Farbpalette mit sehr differenzierten Rot- und Blautönen. Als Farbstoffe bieten sie sich unmittelbar für die chromatographische Untersuchung an. Die Grundkörper der Anthocyane sind allerdings vielfach modifiziert, R3' und R5' können als -H, -OH, oder -OCH₃-Gruppen vorliegen, Position 3 ist in der Regel konjugiert, Position

5 und 7 können ebenfalls glykosiliert sein (Abb. 1 A). Dadurch ergibt sich eine riesige Fülle möglicher Verbindungen.

Auch wenn sich Anthocyane unmittelbar für eine anschauliche Chromatographie anbieten, sind Schülerlabore meist nicht für gute chromatographische Trennmethode ausgestattet, sodass die Vielfalt der Anthocyane nicht erschlossen wird. Hier wird eine Methode vorgestellt, mit der sich aus kleinen Stückchen einzelner Blütenblätter oder Früchten mit einfachsten Mitteln und geringem Zeitaufwand Anthocyanmuster erstellen lassen. Dabei lassen sich natürlich nicht die Hunderte von beschriebenen Anthocyanen trennen, aber postchromatographisch lässt das pH-Verhalten und die Komplexierung mit Metallionen Rückschlüsse auf die chemische Natur einzelner Banden zu und eine prächromatographische Glycosidspaltung hilft, die Grundkörper der Anthocyane freizulegen und einzugrenzen. Ziel der Methode ist es, die Möglichkeiten und Stärken der planaren Chromatographie zu aufzeigen.



Carina Lämmle

» Zur Person

studierte Chemie an der TU-München, zurzeit Promotion am MPI Heidelberg in Chemischer Biologie «

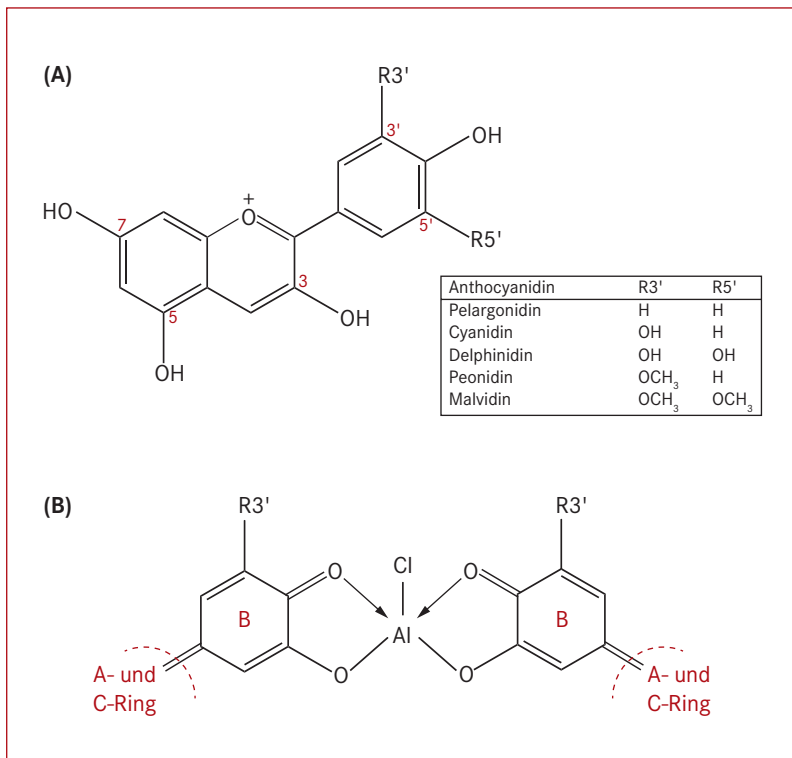


Abb. 1
Häufige Grundkörper von Anthocyanen (A) und Komplexbildung mit Aluminiumchlorid (B)

Umkehrphase

Etwa 95 % aller dünnstichtchromatographischen Methoden verwenden Normalphasen mit Si60-Material. Für Anthocyane sind gelegentlich auch noch papierchromatographische Methoden in Gebrauch. Für die Normalphase ist von *Krüger, Urmann* und *Morlock* eine äußerst leistungsfähige HPTLC-Methode beschrieben [1], außerdem gibt diese Arbeit auch einen Überblick über die Literatur der planaren Chromatographie von Anthocyanen.

Eine gute Trennleistung setzt eine exakte schmalbandige Auftragung voraus. Für schmale Auftragebänden mit organischen Lösungsmitteln ist die Sprühauftragung das Mittel der Wahl. Anthocyane lassen sich im Sauren sehr gut mit Wasser extrahieren. Auf der Umkehrphase hat Wasser eine sehr niedrige Elutionsstärke. Dies lässt sich beim Probenauftrag zur direkten Fokussierung nutzen. Trägt man wässrige Proben auf einer Umkehrphase auf, dann werden Anthocyane (und auch deren Aglykone) direkt an der Auftragestelle gebunden, auch wenn die mit Wasser benetzte Auftragezone relativ groß wird. Die direkte Bindung an die

Wir danken Prof. Dr. Gertrud Morlock für die Überlassung von einigen Referenzverbindungen.

Umkehrphase führt dann zu scharfen Auftragebänden, die der Trennleistung zugute kommen.

Geeignete Platten sind RP18W-Glasplatten von *Merck*. Die Trennleistung dieser Platte ist so gut, dass bereits mit sehr kleinen Platten und damit kurzen Laufzeiten optisch ansprechende Trennungen möglich sind. Für die hier gezeigten Trennungen wurden die Platten auf 25 × 33 mm zugeschnitten, die Trennzeiten liegen bei etwa 10 min.

Fließmittel und Probenvorbereitung

Als Fließmittel wird Methanol/Oxalsäure (2%ig), 50/50 verwendet. Wenn ein vollständig flüchtiges Fließmittel erforderlich ist, lässt sich Oxalsäure durch Trifluoressigsäure (4%ig) ersetzen.

Blütenblätter lassen sich einfach extrahieren, indem man eine kleine Menge (ca. 0,25 bis 0,5 cm²) mit etwa 200 µL 2%iger Ameisensäure im Epi verreibt. Ein passender Potter lässt sich leicht herstellen, indem man etwas Expoyharz mit einem Schaft im Epi aushärten lässt. Die Probenvorbereitung vom frisch „geernteten“ Blütenblatt bis zur einsatzfähigen Probe benötigt damit weniger als 1 min.

Auftragung und Trennung

Auf RP18W-Platten lassen sich mit rein wässrigen Proben von Hand mit einem Filterpapierstreifen sehr schmale Startbänden auftragen. Dazu müssen die zu analysierenden Substanzen hinreichend unpolar sein. Für Anthocyane und deren nicht glycosylierte Grundverbindungen, den Anthocyanidinen, ist dies in saurer Lösung der Fall (Abb. 2). Extrakte mit hohem Gehalt an organischen Lösungsmitteln lassen sich so allerdings nicht scharf auftragen, so muss z. B. Rotwein auf einen Alkoholgehalt unter 5 % verdünnt werden.

Je nach Blütenmaterial ist eine Filtration der Proben sinnvoll. Dies lässt sich direkt

mit dem Auftragen verbinden, wenn man kleine Filterpapierstreifen von ca. 4 × 6 mm verwendet. Als Halter und „Filteranlage“ lässt sich eine Kreuzpinzette oder eine Zeckenzange verwenden (Abb. 2).

Die Trennung kann in einem kleinen Becherglas erfolgen und benötigt etwa 1 mL Fließmittel. Auch eine sehr einfache Horizontalkammer z. B. aus einem PE-Block mit einer 6 mm und einer 2 mm tiefen Nut hat sich bewährt. Das Fließmittel wird der Platte über einen Filterpapierstreifen, der als Docht wirkt, zugeführt. Der Fließmittelbedarf liegt hier bei etwa 300 µL pro Platte.

Referenzverbindungen

Neben den 5 häufigsten Anthocyanidinen (Abb. 1) gibt es zahlreiche weitere Varianten, die alle in verschiedenster Weise glykosyliert oder anderweitig modifiziert vorliegen können. Hier werden exemplarisch die Grundtypen Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin und Peonidin sowie ihre 3-O-glucoside betrachtet. Von Malvidin wird zusätzlich das 3,5-Diglucosid verwendet. Stammlösungen dieser 11 Verbindungen wurden mit ca. 1 mg/mL in Methanol mit 0,5 % HCl hergestellt und 1:10 verdünnt. Die Vergleichsverbindungen wurden von *ABCR* (Karlsruhe), *PhytoLab* (Vestenbergsgreuth), *Sigma-Aldrich* (Steinheim) oder *Carl Roth* (Karlsruhe) bezogen [1].

Im Gegensatz zu einer für die Normalphase beschriebenen Methode [1] lassen sich mit der hier verwendeten Methode nicht alle 11 getesteten Verbindungen vollständig trennen (Abb.3). Ein Vorteil der planaren Chromatographie ist allerdings die einfache postchromatographische Zugänglichkeit, die zusätzliche Informationen liefern kann, wie im Folgenden gezeigt wird.

pH-Wert

Die im Säuren entwickelten Anthocyane behalten ihre rote Farbe auch beim Trocknen weitgehend bei. Im alkalischen Milieu er-



Abb. 2 Auftragung mit einem Filterpapierstreifen: Der Filterstreifen wird von der Zeckenzange gehalten, die Probe wird in das Greiferdreieck gegeben und fließt bei Kontakt mit der Platte durch den Filterstreifen.

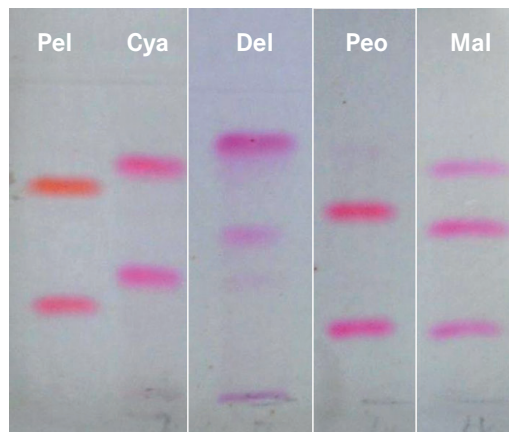


Abb. 3 Referenzverbindungen: Pel: Pelargonidin, Cya: Cyanidin, Del: Delphinidin, Peo: Peonidin, Mal: Malvidin. In der gleichen Spur ist jeweils eine Mischung des Aglycon und des zugehörigen 3-Glucosids aufgetragen, bei Malvidin zusätzlich das 3,5-Diglucosid. Die Fließmittelfront liegt außerhalb der Abbildung.

folgt ein differenzierter Farbumschlag nach blau. Der pH-Shift lässt sich z. B. durch Tauchen in Na_2CO_3 -Lösung oder, sehr fein abgestuft, mit NH_3 -Dampf über einer offenen Ammoniakflasche erreichen. Für manche Komponenten der Chromatogramme erfolgt im Alkalischen allerdings kein Farbumschlag. So haben die Farbstoffe der Amaranth-Blüte eine Polarität im Bereich der Anthocyane, färben sich im Alkalischen aber nicht blau. Amaranth enthält Betacyane. Abbildung 4 zeigt, dass auch Blüten von Athern

» Im Schülerlabor sind einfache und robuste Methoden gefragt. Umkehrphasen sind hier oft eine gute Wahl, weil sich wässrige Proben mit einfachen Mitteln fokussiert auftragen lassen. «

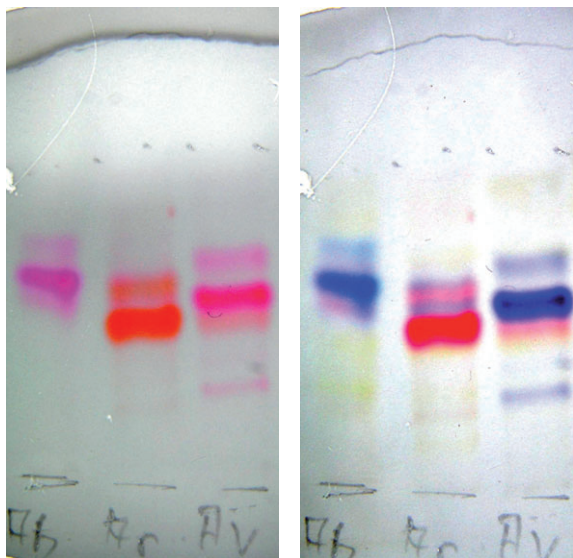


Abb. 4 Farbumschlag von Rot nach Blau durch pH-Verschiebung: links: sauer, rechts: nach Bedampfen mit NH_3 , Bahnen von links: blaue, rote und violette Aster. Nicht alle Komponenten sind pH-sensitiv.

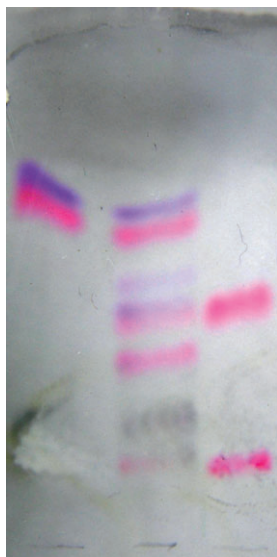


Abb. 5 Pinguicula vulgaris-Extrakt postchromatographisch mit AlCl_3 behandelt; Bahnen von links: nativer Extrakt, Extrakt nach Glycosidspaltung, Peonidin und sein 3-O-glucosid. Blaue Banden sind „aluminiumpositiv“, rote Banden sind „aluminiumnegativ“.

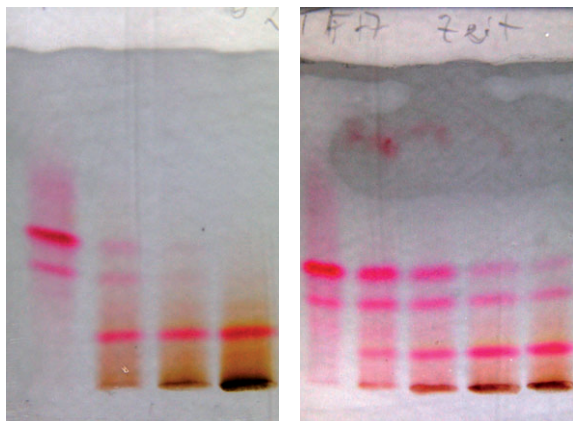


Abb. 6 Glycosidspaltung in einer Probe von Sauerkirschnektar; linke Platte: Spaltung 30 min bei 121 °C, Bahnen von links: 0, 10, 20, 30 % TFA; rechte Platte: Spaltung im kochenden Wasserbad mit 20 % TFA: Bahnen von links: 0, 10, 20, 40, 60 min Kochzeit

Komponenten enthalten können, die nicht pH-sensitiv sind und wohl nicht zu den Anthocyanen gehören.

Komplexe mit Metallionen

Die große Fülle an Blautönen unter den Blütenfarben war namensgebend für die Anthocyane. Die ursprüngliche Vermutung, dass der pH-Wert innerhalb der Blütenblätter für die blaue oder rote Farbe verantwortlich ist, ist widerlegt, vielmehr beruhen blaue Färbungen auf Komplexen der Anthocyane mit mehrwertigen Metallionen, meist Aluminium und/oder Eisen [2]. Im stark Säuren, bei der Extraktion und der Chromatographie, werden diese Komplexe zerstört. Die ursprünglichen Komplexe lassen sich nicht ohne Weiteres wieder herstellen, aber das Tauchen der Platten in AlCl_3 -Lösung führt bei Anthocyanen mit mindestens 2 vicinalen Hydroxylgruppen am B-Ring zu blauen Komplexen, deren Grundstruktur in Abbildung 1 B angegeben ist.

Für Cyanidin und Delphinidin und ihre Glucoside führt die AlCl_3 -Behandlung auch postchromatographisch zu einer Blauverschiebung, für Peonidin, Malvidin und Pelargonidin ist dies, bedingt durch ihre Struktur, nicht der Fall.

Dieser „Aluminiumtest“ kann helfen, die Grundkörper zuzuordnen. Der Pinguicula vulgaris-Extrakt in Abbildung 5, linke Bahn, enthält eine „aluminiumpositive“ und eine „aluminiumnegative“ Komponente. Durch Glycosidspaltung (s. unten) werden aus jeder der Komponenten weitere Bestandteile freigesetzt (Abb. 5 mittlere Bahn).

Glycosidspaltung

Glycoside lassen sich im Säuren hydrolysieren. Eine praktisch vollständige Glycosidspaltung wurde mit 40 μL Trifluoressigsäure in 200 μL Extrakt nach 30 min bei 121 °C (z. B. im Autoklaven oder Dampfkochtopf) erreicht. Aber auch eine partielle Glycosidspaltung (z. B. 20 min im kochenden Was-

serbad) kann interessant sein, weil damit zusätzlich Spaltprodukte erhalten werden können. Nach Verdünnung (1:3) kann der Spaltungsansatz direkt aufgetragen werden. Abbildung 6 zeigt die Abhängigkeit der Glycosidspaltung von der Zeit, der Temperatur und der Konzentration an Trifluoressigsäure.

Störende Matrizes und Nachweis anderer Verbindungen

Gelegentlich behindert die Probenmatrix eine unmittelbare Trennung der Anthocyane. Bei Konfitüre z. B. stört der hohe Zucker- und Pektingehalt. Wasserlösliche Matrizes lassen sich in einem ersten Chromatographieschritt mit Wasser auswaschen. Mit Wasser als Fließmittel bleiben Anthocyane am Startfleck gebunden, während die störende Matrix im Bereich der Front wandert. Nach Trocknen der Platten erfolgt im zweiten Chromatographieschritt die Trennung der Anthocyane.

Bei dem beschriebenen Waschschrift liegt die Matrix noch im Bereich unterhalb der Waschfront vor. Setzt man die Startbänder in einem ausreichenden Abstand vom unteren Plattenrand, dann lässt sich der Waschschrift mit der oben beschriebenen einfachen Horizontalkammer auch entgegen der eigentlichen Chromatographierichtung durchführen. Die mobile Phase kann für die Trennung dann oberhalb der störenden Matrixbestandteile zugeführt werden. In Abbildung 7 sind Erdbeer- und Pflaumenkonfitüre (Bahn 1 und 3) sowie Johannisbeergelee (Bahn 2) nach Verdünnung mit Wasser (1:2) aufgetragen und im Waschschrift gegen die Chromatographierichtung gereinigt (blauer Pfeil). Für Bahn 1 und 2 ist nach der Reinigung eine chromatographische Trennung (grüner Pfeil) möglich, für Bahn 3 war der Reinigungsschritt nicht ausreichend (Abb. 7).

Bei der Bedampfung im Ammoniak werden gelegentlich zusätzliche gelbe Banden sichtbar. Diese Banden lassen sich mit Naturstoffreagenz nach *Neu* in kräftigen Gelb- bis Orangetönen anfärben, was auf Flavonoide schließen lässt (Abb. 8).

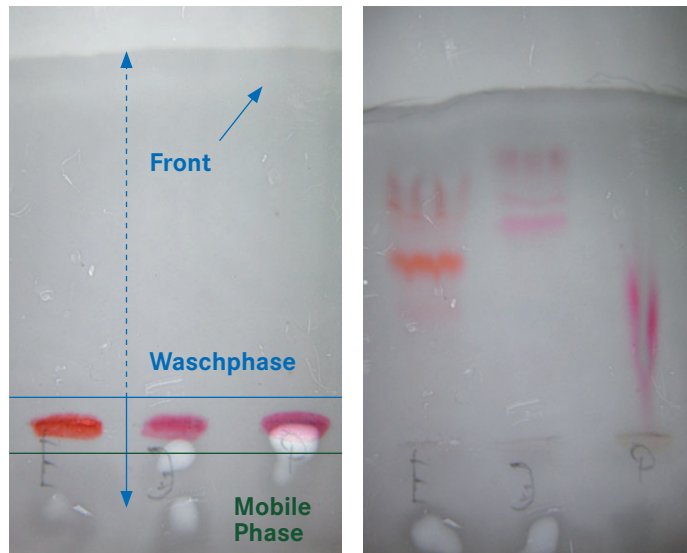


Abb. 7 Prächromatographischer Waschschrift zur Reduzierung der Matrix: Die Waschphase wurde an der blauen, die mobile Phase nach dem Trocknen an der grünen Linie zugeführt.

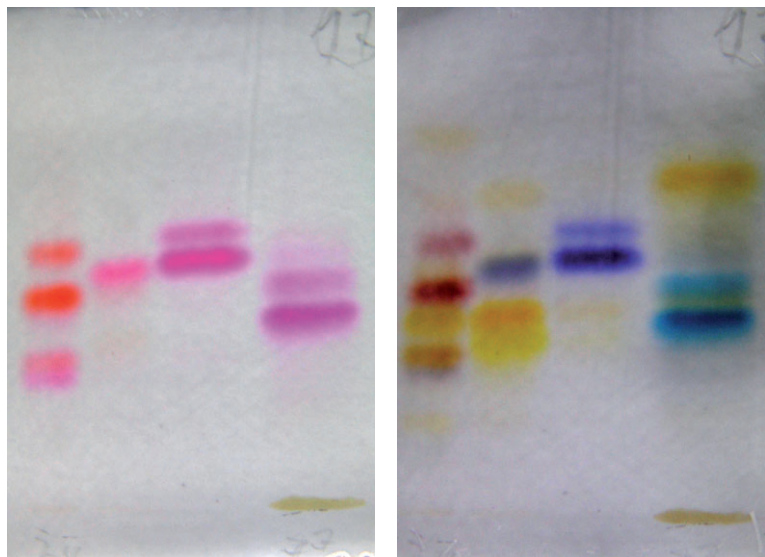


Abb. 8 Linke Platte: sauer, rechte Platte alkalisch und in Naturstoffreagenz getaucht; Bahnen von links: Roter Gauchheil, Ackerwinde, Stockrose, Tollkirsche (Blüte)

Anwendung der Methode

Die Methode wurde in einem Schülerprojekt zur Strukturaufklärung der Anthocyane der Tollkirsche entwickelt und für die Isolierungs- und Reinigungsschritte erfolgreich eingesetzt [3].

Mit den hier beschriebenen Vereinfachungen, vor allem bei der Extraktion und der Auftragung, lässt sich die Methode zur schnellen einfachen Erstellung von Antho-

» Die leistungsstarke Anthocyan-HPTLC setzt scharfe Auftragbanden voraus. Wässrige Proben lassen sich auf Umkehrphasen oft auch mit einfachem bandenförmigem Kontakt auftragen. «

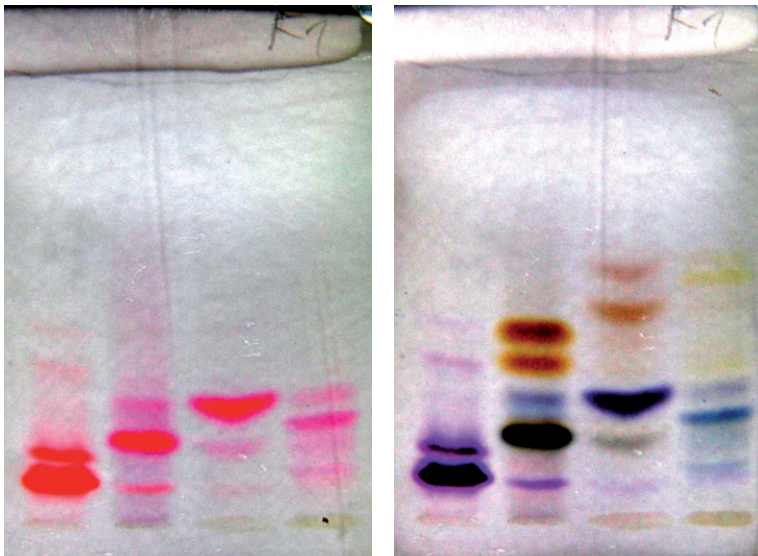


Abb. 9 Links: sauer, rechts: alkalisch. Bahnen von links: Radieschenschale, Salat (Lollo rosso), Rhabarberschale, Schnittlauchblüte

cyanmustern aus unterschiedlichsten Blüten, Früchten und Fruchtsäften und zur Demonstration der Leistungsfähigkeit der HPTLC einsetzen. Die Methode hat sich in Schülerpraktika als sehr robust erwiesen, und beim Sammeln der Blüten lassen sich dabei auch noch ein paar Pflanzenkenntnisse vermitteln. Abbildung 9 zeigt einen Streifzug durch den Garten, zudem ist eine Verschleppung von Farbstoffen bei unzureichender Reinigung der Zeckenzange zu erkennen: Verschleppte Farbstoffe aus der ersten Bahn (Radieschenschalen) sind im Alkalischen aufgrund ihrer anderen Farbqualität auch in der zweiten Bahn zu erkennen.

Für den beliebten Schulversuch, Rotkohlsaft als pH-Indikator zu verwenden, lässt sich zeigen, dass neben dem pH-Wert auch Ionen die Farbe beeinflussen: Die Komponenten des Rotkohlsafts färben sich mit Aluminiumchlorid trotz des sauren pH-Werts blau.

Fazit

Die Technik des selbstfokussierenden Probenauftrags auf der Umkehrphase wird in unserem Schülerforschungszentrum gerne

als Startpunkt für die Analyse wässriger Proben eingesetzt [4]. So konnten wir synthetische Farbstoffe in wässrigen Auszügen von Lebensmitteln direkt chromatographieren (Fließmittel: Acetonitril/Methanol/Natriumsulfat 3%ig 3/3/10). In aufgelösten Tabletten lassen sich Spuren an Salicylsäure von Acetylsalicylsäure trennen (Fließmittel: HCl 0,1 molar/Methanol/Essigsäureethylester 4/4/2); mit 2%igem Eisenchlorid wird Salicylsäure selektiv gefärbt, bei Erhitzen auf 140 °C färbt sich auch Acetylsalicylsäure violett an.

Es bleibt zu hoffen, dass sich solche Chromatogramme nicht als „Flecken“ der Dünnschichtchromatographie einprägen, sondern als Ergebnis einer leistungsfähigen Trennung mit vielfältigen Möglichkeiten.

Referenzen

- [1] Krüger S, Urmann O, Morlock G: Development of a planar chromatographic method for quantitation of anthocyanes in pomace, feed, juice and wine. *J Chromatogr A* **1289**, 105–18 (2013).
- [2] Bayer E et al.: Complex formation and flower colors. *Angew Chem Int* **5**, 791 (1966). <http://dx.doi.org/10.1002/anie.196607911>.
- [3] Lämmle C, Binder: *Swiss Pharma* 35 (2013) 35 (2013) 23. <http://www.verlag-dr-felix-wuest.ch/wp-content/uploads/2015/02/SWISS-PHARMA-03.2013.pdf>
- [4] Binder R, Lämmle C: Reversed phase high performance thin layer chromatography of aqueous samples in student laboratories using anthocyanin patterns from flower petals. *J Chem Educ* Juni 2019; doi: 10.1021/acs.jchemed.8b00900. ■

›› Die Konzepte von Polarität, pH-Wert, Farbigkeit, Komplexbildung und Spaltung kovalenter Glycosidbindungen werden für Schüler durch HPTLC von Anthocyanen experimentell erfahrbar. ‹‹

Kontakt

Dr. Rudolf Binder

Schülerforschungszentrum
Südwürttemberg (SFZ) e. V.
Klösterle 1a
88348 Bad Saulgau
rudolf.binder@mailbox.org
www.sfz-bw.de