

**PRÁCTICA VI.6**  
**ANÁLISIS DE FLAVONOIDES EN PLANTAS**  
**ANALYSIS OF FLAVONOIDS IN PLANTS**

**Olga Lock, Isabel Cabello, Víctor Hugo Doroteo**

*Pontificia Universidad Católica del Perú; Departamento de Ciencias – Sección Química, Apartado*

*1761 - Lima – Perú*

[olock@pucp.edu.pe](mailto:olock@pucp.edu.pe)

## **1. Introducción**

Los flavonoides pertenecen a un grupo de compuestos naturales arreglados bajo un sistema  $C_6-C_3-C_6$ , en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. Se conoce como 10 clases de flavonoides los cuales pueden encontrarse como aglicona o bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa. Es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidas a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicósidos conocidos; es también común, que se encuentren en mezclas como agliconas y/o glicósidos, aun de las diferentes clases siendo esto último lo más frecuente.

Se hallan presente en todas las partes de la planta, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles y más restringidos en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas.

Aunque los flavonoides han sido empleados desde mucho tiempo como colorantes de lana, se les atribuye diversas propiedades en las plantas, entre ellos podemos citar (a) protección a los vegetales contra la incidencia de rayos ultravioleta y visible, así como protección contra insectos, hongos virus y bacterias, (b) atrayentes de animales con finalidad de polinización, (c) antioxidantes, (d) control de la acción de las hormonas vegetales, (e) agentes alelopáticos y (f) inhibidora de las enzimas. Por otro lado, estos compuestos poseen también importancia farmacológica, resultado de algunas propiedades

importantes atribuidas a algunos representantes de las diferentes clases, como por ejemplo, antiinflamatorio, antialérgico, antiulcerogénico, antiviral, anticarcinogénico; asimismo, son utilizados para el tratamiento de la fragilidad capilar, de la diabetes, de las afecciones cardíacas, entre otras.

Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados. Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basado inicialmente en un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color; esto, seguido por un examen cromatográfico directamente del extracto y/o del extracto hidrolizado.

En este experimento se describen los ensayos a realizar para detectar la presencia de flavonoides en un extracto a través de una sencilla reacción de coloración y una cromatografía de capa delgada utilizando agentes cromogénicos adecuados. Para el ensayo cuantitativo es usual desarrollarlo de dos maneras, por espectrofotometría ultravioleta – visible utilizando reactivo de desplazamiento para la determinación de flavonoides totales y por cromatografía líquida de alta resolución. En esta practica se está considerando el primer método. Como material vegetal puede utilizarse la manzanilla, la ruda, especies de geranio, entre otras.

## 2. Procedimiento Experimental

### 2.1 *Análisis cualitativo*

#### A. Tratamiento de muestra

Pese 1g de muestra seca y pulverizada en un erlenmeyer de 50 mL, añada 5mL de metanol y caliente por 10 minutos a 60°C (sí es posible hacerlo en el ultrasonido). Filtre sobre un vial (extracto A).

#### B. Prueba a la gota: reacción de Shinoda

Coloque 20 gotas del extracto A en un tubo de ensayo (o en una placa de toque), agregue 2 a 3 virutas de Magnesio y unas gotas

de ácido clorhídrico concentrado. Observe el cambio de coloración

### C. Cromatografía de capa delgada

Utilice cromatofolio de sílica gel 60F<sub>254</sub> (Merck) de 10 cm x 3 cm. Aplique 30  $\mu$  del extracto A a 1cm del borde inferior. La fase móvil es acetato de etilo: metano : agua (100: 13.5: 10). Deje saturar la cámara cromatográfica (diámetro: 8cm, altura: 11cm). Coloque la placa cromatográfica en la cámara y deje hasta que la fase móvil se mueva aproximadamente 8 cm del origen. Puede también ensayar con el sistema acetato de etilo: ácido acético. Ácido fórmico: agua (100:11:11:26).

La placa desarrollada se seca con aire caliente (puede utilizar una secadora de cabello) y se visualiza en la lámpara de onda larga (366 nm) y/o se aspersa con una solución de NP-PEG. Observe las fluorescencias coloreadas nuevamente a la luz UV 366 nm después del aspersionado. Determine el valor de R<sub>f</sub> de cada componente.

El agente cromogénico NP-PEG, consiste en (a) una solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP) y (b) una solución etanólica al 5% de polietilenglicol – 400 (PEG). Se aspersa primero con (a), seguido de (b).

## 2.2 *Análisis cuantitativo por espectrofotometría UV-V*

### Tratamiento de muestra

Pese 1g de muestra seca y pulverizada en un erlenmeyer de 50 mL, añada 20 mL de etanol al 80%. Lleve al ultrasonido por 30 minutos a la temperatura de 60° (o utilice una plancha de calentamiento). Filtre, recogiendo el filtrado en una fiola de 25 mL y lleve a volumen con etanol al 80%.

En una fiola de 10 mL coloque 100  $\mu$ L del extracto anterior, 200  $\mu$ L de solución de acetato de potasio 1M y 200  $\mu$ L de nitrato de aluminio al 10% y lleve a volumen con etanol al 80%.

Deje reposar por 40 minutos y proceda a leer a 415 nm.

Haga un duplicado.

#### B. Preparación de curva de calibración

Pese 2,7 mg de quercetina en una fiola de 10 mL y lleve a volumen con etanol al 80%. Tome 700  $\mu$ L, 350  $\mu$ L, 175  $\mu$ L y 100  $\mu$ L en 4 fiolas de 10 mL, y añada en cada uno 200  $\mu$ L de acetato de potasio 1M y 200  $\mu$ L de nitrato de aluminio al 10% en cada una; finalmente lleve a volumen con etanol al 80%.

Proceda a leer a 415 nm cada solución y elabore la curva estándar.

#### C. Resultados

Usando la curva estándar calcule la concentración de flavonoides totales expresado como quercetina. Como información de referencia se incluye los del apio y manzanilla, los cuales pueden variar en función de la procedencia de la muestra.

|                           | Apio   | Manzanilla |
|---------------------------|--------|------------|
| [Flavonoides totales]     | 0,0412 | 5,574      |
| expresado como quercetina |        |            |
| (mg/g)                    |        |            |

### 3. Comentarios

El análisis cualitativo es muy simple de realizar. Para la cromatografía de capa delgada se prefiere utilizar los cromatofolios de aluminio, los que pueden ser adquiridos comercialmente, a fin de ahorrar tiempo, con la ventaja adicional que puede ser utilizado al momento con otras dimensiones. Los solventes utilizados son de uso común y el revelado de las placas podría ser hecho con solución etanólica de cloruro férrico de no contarse con el NP-PEG.

Para el análisis cuantitativo se está proponiendo el método más accesible, permitiendo obtener los flavonoides totales expresados como quercetina.

#### 4. Bibliografía

1. Lock, O. Investigación Fitoquímica, Método en el Estudio de Productos Naturales. Fondo Editorial PUCP. Lima. 1994, pp. 114-130
2. Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B., The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, Berlín. 1970, pp
3. Oliveira, C.M., et. al. Farmacognosia, da Planta ao Medicamento. Editora DAUFSC, Florianapolis. 1999, pp. 489-493
4. Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M., Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography. Springer-Verlag, Berlín. 1996, pp
5. Park, Y., Koo, M., Ikegaki, M., Contado, J., Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq. Biol. Technol.* (1997) **40** (1), 97-106.

**Olga Lock**

[olock@pucp.edu.pe](mailto:olock@pucp.edu.pe)

El trabajo en los laboratorios de Medicinal Chemistry debe mantener altos estándares de precaución y buen uso.

El manejo de instrumental eléctrico, la utilización de calor, el material de cristal y los disolventes no presentan un especial problema, si se siguen las instrucciones del supervisor.

Este documento ha sido supervisado por el Prof. OLGA LOCK SING ([olock@pucp.edu.pe](mailto:olock@pucp.edu.pe)) quien informa que no existen problemas específicos de seguridad en la realización de este ejercicio, incluyendo toxicidad, inflamabilidad y explosión, ni cualquier otro destacable, dentro de lo usual en un laboratorio de Medicinal Chemistry.

Se agradecerá comunicar al Editor cualquier posible incidencia.

## EXERCISE VI.6

### ANALYSIS OF FLAVONOIDS IN PLANTS

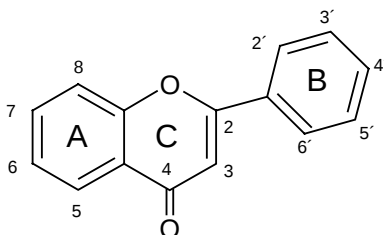
**Olga Lock\*, Isabel Cabello, and Victor H. Doroteo**

*Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias, Sección Química,  
Apartado 1761, Lima, Perú*

\*E-mail: olock@pucp.edu.pe

#### 1. INTRODUCTION

Flavonoids belong to a group of natural compounds that contain 15 carbon atoms in their basic nucleus and arranged in a C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> configuration, that is, two aromatic rings linked by a three-carbon unit which may or may not be part



of a third ring; conventionally, these rings are labelled as A, B, and C.

These compounds occur as aglicones or O-glycosides in which one or more of their hydroxyl groups is bonded to one or more sugar molecules by an acid-labile hemiacetal bond. Sugars such as glucose, galactose, rhamnose, xylose, and arabinose are the most commonly involved, having a much higher possibility of being in C<sub>3</sub> or C<sub>7</sub> position.

Although flavonoids have been mainly used as wool colorants, some of their actions in plants involve (a) protecting them against UV and visible light exposure; (b) attracting bees, butterflies, and other insects in the pollination process; (c) repelling insect attacks; (d) and their behavior as growth regulators and enzyme inhibitors in vitro. Some flavonoids also exhibit a variety

of biological effects such as antiinflammatory, antiallergenic, antiulcerogenic, antiviral, anticarcinogenic, or antioxidant; besides that, they can be used in the treatment of diseases such as diabetes, cardiac problems, or in capillary fragility, among others.

Flavonoids possessing in their structure more than one unsubstituted hydroxyl groups, or a sugar, are polar compounds and because of this, are soluble in solvents such as ethanol, methanol, or water. In the same way, less polar aglycones tend to be more soluble in solvents such as ether and chloroform. Both groups usually show intense absorptions in the UV–vis region of the electromagnetic spectrum due to the presence of an aromatic conjugated system in their structures.

A preliminary classification of the flavonoid type in a plant extract can be performed, based on its solubility and color reaction behavior, followed by a chromatographic test.

In this experiment, we describe the tests for the detection of flavonoids in a plant extract using an easy color reaction (Shinoda reaction) and a thin-layer chromatographic analysis with suitable spray reagents, and the quantitative analysis by UV–vis spectroscopy technique with shift reagents.

## 2. EXPERIMENTAL PROCEDURE

### 2.1. QUALITATIVE ANALYSIS

#### 2.1.2. Sample preparation

Weigh 1 g of dried and powdered sample in a 50-mL Erlenmeyer flask, add 5 mL of methanol, and heat the mixture in a water bath for about 10 min at 60 °C (use a sonicator if possible). Filter the solution through a filter paper (A extract).

### 2.1.2. Shinoda reaction

Place in a test tube 20 drops of the A extract, add a few magnesium shavings, and some drops of concentrated hydrochloric acid. Look at the color change.

### 2.1.3. Thin-layer chromatography (TLC) analysis

- a. Apply 30  $\mu\text{L}$  of the A extract in a  $10 \times 3$  cm silica gel 60F<sub>254</sub> (Merck) TLC plate.
- b. Let the chromatography chamber saturate (use a beaker of 8 cm diameter and 11 cm height) with a mixture of ethyl acetate:methanol:water (100:13.5:10). Alternatively, a mixture of ethyl acetate:acetic acid:formic acid:water (100:11:11:26) can be used as mobile phase
- c. Place the plate in the chamber and let it develop until the mobile phase moves up to 8 cm height. Dry the plate with hot air (by means of a hair dryer) and detect the spots with long-wave UV–vis lamp and/or spraying the plate with a NP-PEG solution. Observe the fluorescence colors under UV light after spraying it.
- d. Calculate the  $R_f$  value for the marked spots.

## 2.2. QUANTITATIVE ANALYSIS BY UV–VIS SPECTROSCOPY

### 2.2.1. Sample preparation

- a. Weigh 1 g of dried and powdered sample in a 50-mL Erlenmeyer flask, add 20 mL of 80 % ethanolic aqueous solution. Place it in a sonicator for about 30 min at 60 °C (use a hot plate). Filter the solution into a 25-mL volumetric flask and bring up to volume with 80 % ethanolic aqueous solution.
- b. Place 100  $\mu\text{L}$  of the extract solution obtained in (a), in a 10-mL volumetric flask, add 200  $\mu\text{L}$  of 1 M potassium acetate and 200  $\mu\text{L}$  of 10 % aluminum nitrate solutions, bring up to volume with 80 % ethanolic aqueous solution.

- c. Let the solution stand for 40 min and determine the absorbance A at 415 nm.

### 2.2.2. Standard calibration curve

- Weigh 2.7 mg of quercetin in a 10-mL volumetric flask and dissolve with 80 % ethanolic aqueous solution (stock solution).
- Prepare four solutions, by placing 700.0, 350.0, 175.0, and 100.0  $\mu\text{L}$  from the stock solution in 10-mL volumetric flasks and adding to each one 200  $\mu\text{L}$  1M potassium acetate and 200  $\mu\text{L}$  10 % aluminum nitrate solutions. Bring up to volume with 80 % ethanolic aqueous solution.
- Determine A at 415 nm after 40 min for each solution and draw the standard curve.

### 2.2.3. Results

- Calculate the total flavonoid concentration using the standard curve, and express it as quercetin.
- As reference information, we are including the values for celery and chamomile. These contents can vary as a function of the sample source.

|                         | Celery | Chamomile |
|-------------------------|--------|-----------|
| Total flavonoids (mg/g) | 0.041  | 5.57      |

## 3. Notes

- The qualitative analysis is very simple to be followed. It is suitable to use aluminum foil plates which are, commercially available and can be cut to the desired size, for TLC analysis.

- b. The solvents used in the experiment are the ones commonly used in the laboratory; as an alternative spray reagent, a ferric chloride ethanolic solution may be used.
- c. The chromogenic agent NP-PEG is constituted using the following solutions: (a) 1 % diphenylboryloxyethylamine (NP) methanolic solution and (b) 5 % polyethylenglycol-400 (PEG) ethanolic solution. To use it, first spray (a), then (b).
- d. We consider the UV–vis spectroscopy method as the most suitable for the flavonoid quantification, because of its accessibility and availability of reagents.

## REFERENCES

1. Lock, O. 1994. *Investigación Fitoquímica, Método en el Estudio de Productos Naturales*. Fondo Editorial PUCP. Lima.
2. Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer–Verlag, Berlín.
3. Oliveira, C.M., et. al. 1999. *Farmacognosia, da Planta ao Medicamento*. Editora DAUFSC, Florianapolis.
4. Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M., 1996. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography*. Springer-Verlag, Berlín.
5. Park, Y., Koo, M., Ikegaki, M., Contado, J., 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq. Biol. Tecnol.* **40** (1), 97-106.

**Olga Lock**

olock@pucp.edu.pe

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories.

The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. OLGA LOCK SING ([olock@pucp.edu.pe](mailto:olock@pucp.edu.pe)) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.