

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ANTHOCHLOR-PIGMENTEN

VERGLEICH DES NATÜRLICHEN BRACTEIN-AGLYKONS MIT SYNTHETISCHEM 4,6,3',4',5'-PENTAOXY-AURON

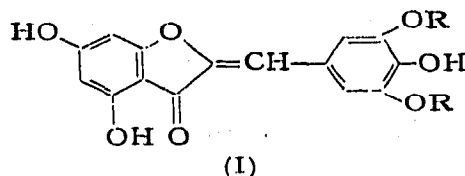
R. HÄNSEL, L. LANGHAMMER, J. FRENZEL UND G. RANFT

*Institut für Pharmakognosie der Freien Universität
Berlin (Deutschland)*

(Eingegangen den 15. November 1962)

EINLEITUNG

Wir berichteten früher über die Isolierung eines glykosidischen Aurons aus *Helichrysum bracteatum*^{1,2}, dessen analytische Eigenschaften² für das Vorliegen eines bisher unbekanntes Naturstoffes der Anthochlorreihe, des 4,6,3',4',5'-Pentaoxyauron-4-glukosids sprechen. Zur endgültigen Konstitutionsaufklärung fehlt die Synthese. Aber weder das Glykosid (= Bractein) selbst noch sein Aglykon sind ohne weiteres zugänglich im Gegensatz zum 4,6,4'-Trioxy-3',5'-dimethoxyauron, das sich vom natürlichen Bractein-Aglykon nur durch Methylierung zweier Hydroxygruppen im Seitenphenyl unterscheidet. Eine Entmethylierung des Dimethylderivates in präparativem Masstabe ist wegen der Instabilität der Verbindung wenig aussichtsreich. Wir hielten es aber für denkbar, dass sich die gesuchte synthetische Vergleichssubstanz unter den Bedingungen der Entmethylierung in geringen Mengen bildet, wenn auch vielleicht nur als Zwischenprodukt. Somit musste es darauf ankommen, Aurone in komplexen Reaktionsgemischen nachzuweisen und zu identifizieren. Im folgenden wird zunächst allgemein über die Dünnschichtchromatographie der Aurone und der verwandten Chalkone berichtet. Die neue Methode dient sodann zum Vergleich des natürlichen Bractein-Aglykons mit synthetischem 4,6,3',4',5'-Pentaoxyauron (I).



R = H: Bractein-Aglykon; R = CH₃: 4,6,4'-Trioxy-3',5'-dimethoxyauron

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON AURONEN UND CHALKONEN⁹

Als phenolische Substanzen lassen sich Aurone und Chalkone grundsätzlich mit der papierchromatographischen Technik trennen³⁻⁵. Werden die im Versuchsteil näher beschriebenen Bedingungen (Versuchsanordnungen von STAHL⁶ für phenolische Naturstoffe wurden modifiziert) eingehalten, so erweist sich aber die Dünnschichtchromato-

graphie der Papierchromatographie bezüglich der Trennschärfe als überlegen — von den bekannten sonstigen Vorteilen ganz abgesehen. Zur näheren Untersuchung des Verhaltens der Anthochlore auf dem Dünnschichtchromatogramm verglichen wir zunächst eine Reihe synthetisierter Aurone und Chalkone. Geeignete Laufmittel für hydroxylierte und methoxylierte Aurone sind Gemische von aliphatischen Estern mit einem lipophilen Lösungsmittel unter Zusatz von Ameisensäure. Bei den entsprechenden Chalkonen eignete sich besser ein Laufmittel ohne Säurezusatz, das dagegen mit einem Formamid-Wassergemisch gesättigt ist.

Die beobachteten Gesetzmässigkeiten waren bei beiden Stoffgruppen die gleichen: Mit zunehmenden hydrophilen Eigenschaften einer Substanz sinkt deren R_F -Wert. Die stark hydrophilen Glykoside der Anthochlore bleiben in den verwendeten Laufmitteln (siehe Methodischer Teil) am Startpunkt zurück.

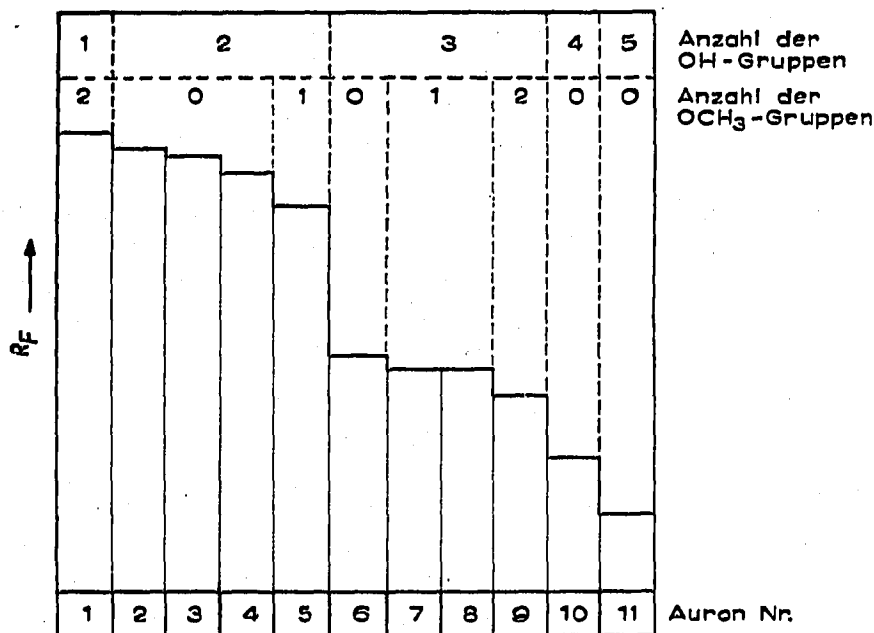


Fig. 1. Graphische Darstellung der R_F -Werte der Aurone (Nr. 1–11) in Abhängigkeit von der Anzahl und der Stellung der Hydroxyl- und Methoxygruppen. Laufmittel: Benzol-Essigester-Ameisensäure, 4,5:3,5:2.

Wie aus Fig. 1 und Tabelle I ersichtlich, haben Anzahl und Stellung der Substituenten im Auron-Molekül einen deutlichen Einfluss auf den R_F -Wert und zwar:

1. Eine zusätzliche Hydroxylgruppe im Molekül erniedrigt den R_F -Wert beträchtlich,
2. Eine zusätzliche Methoxygruppe übt dagegen nur einen geringen Einfluss auf den R_F -Wert aus. Es gilt:

$$R_{F(\text{Auron-OH})} < R_{F(\text{Auron-OCH}_3)} < R_{F(\text{Auron-H})}$$

Diese Gesetzmässigkeiten gestatten es, aus der Höhe des R_F -Wertes Rückschlüsse auf die Konstitution eines unbekanntes Auron-derivates zu ziehen. Da die absoluten Zahlenwerte hier jedoch noch grösseren Schwankungen als bei der Papierchromatographie unterliegen, sollte stets der relative R_F -Wert (Vergleich mit einer bekannten Substanz) bestimmt werden.

Aurone und Chalkone unterscheiden sich durch ihr Farbverhalten im U.V.-Licht: Sämtliche von uns untersuchten Aurone fluoreszieren im U.V.-Licht auf dem Dünnschichtchromatogram gelb bis leuchtend grün, die Chalkone hingegen geben sich

TABELLE I
ÜBERSICHT ÜBER DIE GEPRÜFTEN AURONE

Auron Nr.	Anzahl und Stellung der Substituenten	
	-OH	-OCH ₃
I	6-	3',4'-
2	6,2'-	—
3	6,3'-	—
4	6,4'-	—
5	6,4'-	3'-
6	6,3',4'-	—
7	4,6,3'-	4'-
8	4,6,4'-	3'-
9	4,6,4'-	3',5'-
10	4,6,3',4'-	—
11	4,6,3',4',5'-	—

durch dunkelbraune Farbe zu erkennen. Unter dem Einfluss von Ammoniakdämpfen färben sich die Chalkone tiefrot, die Aurone orange. Das Verhalten der geprüften Chalkone auf dem Dünnschichtchromatogramm zeigt Tabelle II.

Es soll noch darauf hingewiesen werden, dass farbliche Unterschiede nach Behandeln mit Sprühreagenzien auf dem Papierchromatogramm deutlicher zum Ausdruck kommen als auf dem Dünnschichtchromatogramm. Für diesen Nachweis empfiehlt es sich daher, ein Stoffgemisch zunächst dünnschichtchromatographisch mit Hilfe eines Streifenchromatogramms zu trennen, die gewünschte Zone mit Methanol zu eluieren und dann erst das Papierchromatogramm dieses Eluates mit den in Frage kommenden Reagenzien zu besprühen.

TABELLE II
ÜBERSICHT ÜBER DIE GEPRÜFTEN CHALKONE

Anzahl und Stellung der Substituenten		R _F
-OH	-OCH ₃	
2'-	—	0.77
2'-	4',6'-	0.46
2'-	4,4',6'-	0.27
2,2'-	—	0.24
2'-	3,4,-	0.22
2',4-	—	0.18
2',4'-	—	0.18
2',3-	4-	0.13
2',4'-	4-	0.13
2',3,4'-	—	0.03

VERGLEICH DES NATÜRLICHEN
BRACEIN-AGLYKONS MIT SYNTHETISCHEM 4,6,3',4',5'-PENTAOXY-AURON

Entmethyliert man 4,6,4'-Trioxy-3',5'-dimethoxy-auron mit Jodwasserstoffsäure nach ZEISEL und chromatographiert das Reaktionsgemisch (siehe Methodischer Teil) nach der o.a. Methode, so findet man neben einer Reihe von nicht näher definierten Zersetzungs- und Reaktionsprodukten eine Substanz, die sich wie ein Auron verhält. Sie hat einen auffallend niedrigen R_F -Wert; das spricht nach den vorher erörterten Gesetzmässigkeiten für die grosse Zahl von OH-Gruppen im Molekül eines Pentaoxy-aurons (Fig. 1). Wie wir schon in einer früheren Mitteilung berichteten, verhielt sich die Substanz sowohl auf dem Dünnschichtchromatogramm als auch papierchromatographisch in mehreren Laufmitteln völlig identisch mit dem Aglykon des von uns isolierten Bracteins, sowohl in Bezug auf die Höhe des R_F -Wertes als auch in Bezug auf die Farbe im Tageslicht, U.V.-Licht und nach Bedampfen mit Ammoniak (Tabelle III).

TABELLE III

CHROMATOGRAPHISCHER VERGLEICH DES HYDROLYSEPRODUKTES DES BRACEINS MIT EINEM REAKTIONSPRODUKT NACH BEHANDELN VON 4,6,4'-TRIOXY-3',5'-DIMETHOXY-AURON MIT HJ NACH ZEISEL

Laufmittel für Dünnschichtchromatographie:

1 = Benzol-Essigester-Ameisensäure (4.5:3.5:2.0).

2 = Chloroform-Essigester-Ameisensäure (5:4:1).

3 = Toluol-Ameisensäureäthylester-Ameisensäure (5:4:1).

Laufmittel für Papierchromatographie:

a = 60 %ige Essigsäure.

b = 50 %iges Isopropanol.

c = *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5).

d = *m*-Kresol-Eisessig-Wasser (48:2:50).

T.L. = Tageslicht; U.V. = U.V.-Licht; NH_3 = Behandeln des Chromatogramms mit Ammoniak.

<i>R_F</i> -Wert		
Laufmittel Nr.	Hydrolyseprodukt des Bracteins (Bractein-Aglykon)	Reaktionsprodukt nach Behandeln von 4,6,4'-Trioxy-3',5'-dimethoxy-auron mit HJ
1	0.25	0.25
2	identische Fleckenhöhen im "Durchlaufverfahren"	
3	identische Fleckenhöhen im "Durchlaufverfahren"	
a	0.15	0.15
b	0.37	0.37
c	0.25	0.25
d	0.03	0.03
Farbverhalten		
T.L.	gelb	gelb
U.V.	zitronengelb	zitronengelb
T.L.- NH_3	orange-rot	orange-rot
U.V.- NH_3	orange-rot	orange-rot

METHODISCHER TEIL

Herstellung der Vergleichssubstanzen

Die Synthese der Aurone erfolgte in Anlehnung an die Synthese des Aureusidins nach FARKAS *et al.*⁷ aus dem entsprechenden Cumaranon und den jeweiligen Aldehyden über das Acetat. Die Chalkone wurden nach der Methode von NADKARNI UND WHEELER⁸ durch Kondensation des entsprechenden Acetophenons mit dem geeigneten Aldehyd bei 0° in stark alkalischem Milieu synthetisiert.

Die nachstehend aufgeführten Aurone (1)–(7) sind in der Literatur noch nicht beschrieben und lassen sich folgendermassen charakterisieren:

(1) *6,2'-Dioxy-auron*. Gef.*: C, 70.98, 70.74; H, 3.95, 4.28 %. Ber. für C₁₅H₁₀O₄ (254.23): C, 70.86; H, 3.96 %.

Schmp. = ab 310° Zers. U.V.-Absorption in Methanol: λ_{Max.} [mμ] 265, 375 (log ε = 3.93, 4.25). I.R.-Spektrum (in KBr) [cm⁻¹]: 1900 (w), 1820 (w), 1650 (s), 1630 (s), 1600 (s), 1560 (s), 1490 (s), 1450 (s), 1330 (s), 1300 (s), 1260 (s), 1230 (s), 1190 (s), 1160 (s), 1140 (s), 1105 (s), 1040 (m), 960 (w), 945 (m), 910 (m), 860 (m), 850 (m), 830 (s), 780 (m), 760 (s), 695 (m), 665 (m), 660 (m).

(2) *6,3'-Dioxy-auron*. Gef.: C, 70.57, 70.45; H, 4.11, 4.09 %. Ber. für C₁₀H₁₅O₄ (254.23): C, 70.86; H, 3.96 %.

Schmp. = 278°. U.V.-Absorption in Methanol: λ_{Max.} [mμ] 265, 340 (log ε = 4.03, 4.35). I.R.-Spektrum (in KBr) [cm⁻¹]: 1800 (w), 1660 (s), 1630 (s), 1610 (s), 1600 (s), 1570 (s), 1520 (m), 1480 (s), 1455 (s), 1450 (s), 1360 (s), 1340 (s), 1320 (s), 1290 (s), 1240 (s), 1215 (s), 1195 (s), 1165 (s), 1150 (s), 1135 (s), 1105 (s), 985 (s), 960 (m), 910 (m), 860 (m), 840 (m), 810 (m), 770 (s), 720 (m), 700 (m), 675 (m), 555 (m).

(3) *6-Oxy-3',4'-dimethoxy-auron*. Gef.: C, 68.28, 68.24; H, 4.74, 4.89 %. Ber. für C₁₇H₁₄O₆ (298.28): C, 68.45; H, 4.73 %.

Schmp. = 220°. U.V.-Absorption in Methanol: λ_{Max.} [mμ] 256, 386 (log ε = 3.82, 4.24). I.R.-Spektrum (in KBr) [cm⁻¹]: 1880 (w), 1670 (s), 1595 (s), 1510 (s), 1480 (s), 1455 (s), 1435 (m), 1410 (m), 1335 (m), 1310 (s), 1285 (s), 1250 (s), 1330 (s), 1190 (m), 1160 (m), 1140 (s), 1120 (s), 1090 (s), 1035 (m), 1015 (m), 970 (m), 950 (m), 920 (w), 870 (m), 840 (m), 820 (w), 800 (m), 760 (m), 730 (m), 695 (m), 660 (s).

(4) *6,4'-Dioxy-3'-methoxy-auron*. Gef.: C, 67.55, 67.55; H, 4.29, 4.46 %. Ber. für C₁₆H₁₂O₆ (284.26): C, 67.60; H, 4.26 %.

Schmp. = 269–270°. U.V.-Absorption in Methanol: λ_{Max.} [mμ] 255, 393 (log ε = 4.03, 4.50). I.R.-Spektrum (in KBr) [cm⁻¹]: 1680 (s), 1640 (s), 1590 (s), 1510 (s), 1490 (s), 1460 (s), 1425 (s), 1330 (s), 1290 (s), 1260 (s), 1230 (s), 1200 (s), 1170 (s), 1130 (s), 1100 (s), 1035 (s), 970 (m), 960 (s), 880 (m), 840 (s), 810 (m), 790 (m), 780 (m), 760 (m), 730 (m), 695 (m), 655 (m).

(5) *4,6,4'-Trioxy-3'-methoxy-auron*. Gef.: C, 64.10, 64.22; H, 4.09, 4.15 %. Ber. für C₁₆H₁₂O₆ (300.26): C, 64.00; H, 4.03 %.

Schmp. = 271–273°. U.V.-Absorption in Methanol: λ_{Max.} [mμ] 401 (log ε = 4.47). I.R.-Spektrum (in KBr) [cm⁻¹]: 1840 (w), 1750 (w), 1690 (s), 1640 (s), 1605 (s), 1590 (s), 1520 (s), 1475 (s), 1460 (s), 1420 (s), 1415 (s), 1350 (s), 1310 (s), 1270 (s), 1230 (s), 1190 (s), 1150 (s), 1120 (s), 1060 (s), 1030 (s), 990 (m), 970 (m), 905 (m), 875 (m), 835 (m), 810 (m), 800 (m), 775 (w), 740 (m), 700 (m), 670 (m).

* Wir danken der Fa. Schering für die Ausführung sämtlicher Verbrennungsanalysen.

(6) *4,6,3'-Trioxy-4'-methoxy-auron*. Gef.: C, 64.08, 64.28; H, 4.20, 4.46 %. Ber. für $C_{16}H_{12}O_6$ (300.26): C, 64.00; H, 4.03 %.

Schmp. = 284°. U.V.-Absorption in Methanol: λ_{Max} . [$m\mu$] 265, 395 ($\log \epsilon = 3.92, 4.49$). I.R.-Spektrum (in KBr) [cm^{-1}]: 1670 (s), 1640 (s), 1590 (s), 1520 (s), 1525 (s), 1460 (s), 1435 (s), 1380 (m), 1350 (s), 1310 (s), 1265 (s), 1240 (s), 1205 (s), 1170 (s), 1150 (s), 1120 (s), 1060 (s), 1025 (s), 995 (m), 980 (m), 920 (w), 890 (w), 880 (m), 860 (w), 850 (w), 835 (m), 820 (m), 800 (m), 795 (m), 760 (m), 715 (w), 700 (m), 620 (m).

(7) *4,6,4'-Trioxy-3',5'-dimethoxy-auron*. Gef.: C, 62.00, 62.21; H, 4.58, 4.76 %. Ber. für $C_{17}H_{14}O_7$ (330.28): C, 61.82; H, 4.27 %.

Schmp. = 260°. U.V.-Absorption in Methanol: λ_{Max} . [$m\mu$] 260, 399 ($\log \epsilon = 3.96, 4.43$). I.R.-Spektrum (in KBr) [cm^{-1}]: 1670 (s), 1640 (s), 1605 (s), 1580 (s), 1510 (s), 1460 (s), 1445 (s), 1420 (s), 1390 (m), 1355 (s), 1330 (s), 1285 (s), 1245 (s), 1215 (s), 1185 (s), 1150 (s), 1110 (s), 1070 (s), 1000 (m), 920 (w), 910 (m), 880 (m), 830 (m), 820 (m), 770 (m), 720 (w), 710 (m), 690 (m).

Entmethylierungsverfahren

Entmethyliert wurde mit Jodwasserstoffsäure nach ZEISEL. 200 mg Substanz, 2 ml Acetanhydrid, 200 mg roter Phosphor und 5 ml frisch destillierte Jodwasserstoffsäure wurden 1/2 Stunde lang unter Stickstoffatmosphäre auf 140° erwärmt, das Reaktionsgemisch in etwa 10 ml destilliertes Wasser gegossen, mit Natriumbicarbonat bis etwa pH = 4 neutralisiert, vom Phosphor abfiltriert, die Lösung mit Äther ausgeschüttelt, die gewaschene und getrocknete Ätherphase eingeeengt und zur chromatographischen Untersuchung benutzt. Eine präparative Isolierung, etwa durch Sammeln des Produktes aus verschiedenen Ansätzen, gelang uns nicht, da die Stabilität der Verbindung so gering ist, dass die Mengen für eine präparative Darstellung nicht ausreichen. Auch mehrfach modifizierte Arbeitsmethoden führten zu keinem besseren Ergebnis; so variierten wir sowohl die Säurekonzentration wie die Reaktionszeit, verwendeten bei der Aufarbeitung als Oxydationsschutz Natriumdithionit oder Natriumthiosulfat, variierten den pH-Wert vor dem Ausschütteln mit Äther oder auch Essigester. Ein Arbeiten im alkalischen Bereich verbot sich mit Rücksicht auf die drei vicinalen OH-Gruppen der Verbindung.

Dünnschichtchromatographie

Als Platten verwendeten wir für die Chromatographie der Aurone gepufferte Kieselgel G-Platten, die nach der Arbeitsvorschrift von STAHL⁰ hergestellt wurden. (30 g Kieselgel G in 60 ml Wasser, gepuffert mit 1.5 g Natriumacetat, 1 Stunde getrocknet bei 105°). Als Laufmittel verwendeten wir folgende Gemische:

- (1) Benzol-Essigester-Ameisensäure (4.5:3.5:2.0),
- (2) Chloroform-Essigester-Ameisensäure (6:3:1) neben (5:4:1),
- (3) Toluol-Ameisensäureäthylester-Ameisensäure (5:4:1).

In manchen Fällen bewährte sich, besonders bei Verwendung von Laufmittel (3), das sog. "Durchlaufverfahren": man lässt das Chromatogramm, wenn das Laufmittel das Ende der Glasplatte erreicht hat, noch weiter laufen, so dass die Flecken höher steigen. Man errechnet dann nicht den R_F -Wert, sondern setzt die Höhe der Flecken nur in Relation zu der Höhe des Fleckes einer in ihrer Konstitution bekannten Substanz.

Für die Chromatographie der Chalkone verwendeten wir folgende Platten: 15 g

Kieselgel G und 15 g Kieselgur G in 60 ml Wasser, 1 Stunde bei 105° getrocknet.
Als Laufmittel verwendeten wir:

(4) Cyclohexan-Essigester (7:1, v/v), gesättigt mit 5 ml Wasser und 10 ml Formamid.

Papierchromatographie

Papier: Schleicher & Schüll 2043 bM.

Laufmittel:

- (a) Essigsäure (60 %ig),
- (b) Isopropanol (50 %ig),
- (c) *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:5:1),
- (d) *m*-Kresol-Eisessig-Wasser (48:2:50).

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Trennung von Anthochlor-Pigmenten eignet sich die Dünnschichtchromatographie auf gepufferten Platten. Auf Zusammenhänge zwischen Zahl der Hydroxy- und Methoxygruppen im Molekül und dem Verhalten auf dem Dünnschichtchromatogramm wird an Hand von synthetisierten Anthochloren, die teilweise noch nicht beschrieben sind, hingewiesen. Die Methode wird herangezogen zur Identitätsprüfung von natürlichem Bractein-Aglykon, das mit dem durch Entmethylierung von 4,6,4'-Trioxy-3',5'-dimethoxy-auron erhaltenen Auron verglichen wird.

SUMMARY

Thin-layer chromatography on buffered plates is suitable for the separation of anthochlor pigments. It is shown that a relationship exists between the number of hydroxy and methoxy groups in the molecule and its mobility. Some of the aurones examined were synthesized for the first time. The method is employed to prove the identity of the natural bractein-aglycone, isolated from flowers of *Helichrysum bracteatum*, by comparing it with the product obtained by demethylation of 4,6,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxy-aurone.

LITERATUR

- ¹ A. G. ALBRECHT, *Dissertation*, Berlin, 1962.
- ² R. HÄNSEL, L. LANGHAMMER UND A. G. ALBRECHT, *Tetrahedron Letters*, 14 (1962) 599.
- ³ E. C. BATE-SMITH UND T. SWAIN, *J. Chem. Soc.*, (1953) 2185.
- ⁴ T. A. GEISSMAN, J. B. HARBORNE UND M. K. SEIKEL, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 825.
- ⁵ B. HARBORNE UND T. A. GEISSMAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 829.
- ⁶ E. STAHL UND P. J. SCHORN, *Z. Physiol. Chem.*, 325 (1961) 263.
- ⁷ L. FARKAS, L. PALLOS UND G. HIDASI, *Ber.*, 94 (1961) 2221.
- ⁸ D. R. NADKARNI UND T. S. WHEELER, *J. Chem. Soc.*, (1938) 1320.
- ⁹ J. FRENZEL, *Dissertation* (in Vorbereitung).