

Beitrag zur Alkalisplaltung von Flavonoiden. Chromatographische und spektrophotometrische Identifizierung der Abbauprodukte

Von

J. J. Chirikdjan, E. Jaag und P. Spiegl

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 17. Januar 1969)

Untersuchungen über den Einfluß von Alkalihydrolyse und Alkalischmelze auf den Abbau des Flavon-aglykons haben gezeigt, daß durch alkalische Hydrolyse eine quantit. Spaltung möglich ist, ohne daß gleichzeitig Entmethylierungen methoxylierter Verbindungen auftreten. Es bildet sich jedoch, durch Schmelze und Hydrolyse gleichermaßen, aus dem Benzo- γ -pyron-Teil immer auch eine geringe Menge von Phenolen, die um eine Hydroxylgruppe weniger besitzen als zu erwarten wäre.

Beim Nachweis der Spaltungsprodukte auf Chromatogrammen mit Hilfe von Diazoniumverbindungen treten gewisse Farbunterschiede auf, je nachdem ob Kieselgel- oder Celluloseschichten* vorliegen. Zur Identifizierung der Abbauprodukte wurden auch die Spektraldaten herangezogen.

A Contribution towards Alkaline Cleavage of Flavonoid Compounds. Chromatographic and Spectrophotometric Identification of the Degradation Products.

Investigations of the effect of alkaline hydrolysis and alkaline fusion on the degradation of flavone aglycons showed, that quant. cleavage can take place through alkaline hydrolysis without simultaneous cleavage of methyl groups from methoxylated compounds. On both, alkaline hydrolysis and fusion, the benzo- γ -pyrone group gives rise additionally to small quantities of phenols which possess one hydroxyl group less than expected.

On chromatographic identification of the cleavage products using diazonium compounds, certain colour differences were

* Bzw. Papierstreifen.

apparent, depending on whether silicagel layers, cellulose layers or paper strips were used. Identification of degradation products was further aided by a study of the spectral data.

Unter den Bedingungen des Alkaliabbaues (durch wäßr. Alkalilösungen, zumeist in der Siedehitze, oder Alkalischmelze bei wesentlich höheren Temperaturen) werden Flavonoide der $C_6-C_3-C_6$ -Reihe bekanntlich zu C_6 -Bausteinen (Phenole) und in C_2 - sowie C_1-C_6 -Einheiten (Essigsäure, Benzoessäurederivate) zerlegt. Es entstehen somit leichter identifizierbare Spaltstücke, die entsprechende Rückschlüsse auf die Struktur des ursprünglich vorliegenden Aglykons zulassen.

Im Rahmen verschiedener Untersuchungen über Flavonfarbstoffe haben wir uns eingehender mit dem Einfluß von Alkalihydrolyse und Alkalischmelze auf die gleichzeitige Entmethylierung methoxylierter Phenole und Phenolcarbonsäuren sowie mit dem Nachweis der gebildeten Spaltstücke befaßt; dazu wurden neben den üblichen Farbreaktionen auch Spektraldaten herangezogen.

1. Methodik des Flavonoidabbaues

1.1. Alkalischmelze

Hydrolyse und Schmelze führen erwartungsgemäß nicht immer zu den gleichen Endprodukten, besonders methoxylierte Flavonoide sind bei der Alkalischmelze sekundären Abbaureaktionen ausgesetzt. Schon beim Erhitzen auf 250° treten Ätherspaltungen auf¹, die zwischen 280 und 300° nahezu quantitativ verlaufen. Unter diesen Bedingungen liefert z. B. das Seitenphenyl des Hesperetins (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon) an Stelle von 3-Hydroxy-4-methoxybenzoessäure praktisch nur noch 3,4-Dihydroxybenzoessäure², eine Entmethylierung, die zur Darstellung von Protocatechusäure aus Vanillin herangezogen werden kann³. Auch nach KOH-Schmelze von 3,5,7,4'-Tetrahydroxy-3'-methoxyflavon (Isorhamnetin) bei 250° konnten wir neben wenig 4-Hydroxy-3-methoxybenzoessäure in der Hauptsache nur mehr Protocatechusäure im Reaktionsgemisch nachweisen.

Wie R. Neu¹ durch Modellversuche mit Hydroxybenzoessäuren zeigen konnte, sind unter denselben Bedingungen noch Nebenreaktionen anderer Art möglich, wie z. B. die Abspaltung von Hydroxylgruppen (Bildung von Protocatechusäure aus Gallussäure). Es folgt daraus, daß eine durch Alkalischmelze abgespaltene Benzoessäure im Aglykon grundsätzlich noch in anderer Form, in einem höheren Hydroxylierungs- bzw. Methoxyierungsgrad, vorliegen kann.

¹ R. Neu, Mikrochim. Acta [Wien] 1958, 266.

² W. F. Newhall und S. V. Ting, Agricult. Food Chem. 15, 776 (1967).

³ I. A. Pearl, J. Amer. Chem. Soc. 68, 2180 (1946).

Solche Veränderungen der Spaltprodukte sind durch weniger aggressive Verfahren, z. B. Alkalihydrolyse⁴ in Lösung bei niedrigeren Temperaturen, zu umgehen. Noch sicherer aber lassen sich derartige Nebenreaktionen durch die schonendere Methode des reduktiven Abbaues mit Natriumamalgam⁵ verhindern. Neben Phenolen entstehen hiebei aus Flavonoiden Dihydrozimsäuren und Dihydrozimtalkohole, ohne daß gleichzeitig Methoxylgruppen angegriffen werden. Allerdings bereitet der Mangel an Vergleichsmaterial hin und wieder Schwierigkeiten, so daß meistens dennoch dem Alkaliabbau der Vorzug gegeben wird.

Aus dem Benzo- γ -pyron-Teil entstandene Phenolkörper zeigen bezüglich der Entmethylierung eine ähnliche Temperaturabhängigkeit. Wie sich durch Versuche mit verschiedenen Flavonoiden feststellen ließ, kommt es jedoch wieder zur Bildung von Nebenprodukten, die um eine Hydroxylgruppe ärmer sind. Nach Alkalischmelze (250°, 2—3 Min.) des 5-Hydroxy-7-methoxyflavons (Tectochrysin) treten außer dem erwarteten Phloroglucinmonomethyläther auch Resorcinmonomethyläther sowie Phloroglucin und Resorcin auf, die man beide auch aus 3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon (Quercetin) erhält. Die Bildung hydroxylärmerer Phenole dürfte hier weniger die Folge einer Hydroxylgruppenabspaltung vom C-5 sein, als vielmehr auf einer anderen Art der Äthersplaltung des heterocyclischen Ringes beruhen.

Bei der Alkalischmelze von Phloroglucinmonomethyläther und Resorcinmonomethyläther waren ähnliche Erscheinungen nicht festzustellen.

1.2. Alkalische Hydrolyse

An verschiedenen Modellsubstanzen (Methoxybenzoesäuren, methoxylierte mehrwertige Phenole und Flavonoide) verfolgten wir den Einfluß von Hydrolysedauer und Alkalikonzentration auf den Abbau des Aglykons, die Bildung von Spaltprodukten und auf das Auftreten sekundärer Veränderungen. So konnten wir feststellen, daß 5proz. KOH bereits bei Zimmertemperatur innerhalb von 12 Stunden einen teilweisen Abbau bewirkt, aber schon nach 2stdg. Kochen mit 10proz. KOH restlose Spaltung des Aglykons eintritt. Anzeichen einer Entmethylierung waren weder bei Flavonoiden noch bei den Modellsubstanzen zu erkennen.

Unter diesen Bedingungen lieferte 3,5,7,4'-Tetrahydroxy-3'-methoxyflavon (Isorhamnetin) aus dem Seitenphenyl lediglich 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure. Aus dem Benzo- γ -pyronkern des 5-Hydroxy-7-methoxyflavons erhält man auf diese Weise Phloroglucinmonomethyläther, daneben — wie

⁴ P. Karrer, Bull. soc. chim. France **1928**, 1041.

⁵ H. M. Hurst und J. B. Harborne, Phytochem. [London-New York] **6**, 1111 (1967).

bei der Alkalischmelze — eine geringe Menge Resoreinmonomethyläther. Beim 3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon ist neben Phloroglucin stets auch etwas Resorcin zu finden.

2. Identifizierung der Spaltungsprodukte

Bei Analysen im Mikromaßstab sind Auftrennungen in Phenole und Phenolcarbonsäuren (mittels NaHCO_3) — die an sich bloß eine Anreicherung darstellen — kaum erforderlich, da genügend geeignete chromatographische Trennmethode zur Verfügung stehen.

Phenole (aus dem Benzo- γ -pyronkern stammend) bzw. Phenolcarbonsäuren (hervorgegangen aus dem Seitenphenyl) lassen sich auf dem Chromatogramm verhältnismäßig einfach als gefärbte Diazoniumverbindungen nachweisen. Nur bei aromatischen Carbonsäuren ohne freie Hydroxylgruppe versagt die Reaktion und nach dem Besprühen erscheinen bestenfalls sekundäre Produkte, wenn die primären Körper (Methyläther) teilweise entmethyliert wurden. Zur Lokalisierung benötigt man dann Nachweisreagentien, die nicht nur für phenolische Hydroxylgruppen spezifisch sind⁶. Somit kann auch in diesen Fällen ein Identitätsnachweis geführt werden, sei es durch vergleichende Chromatographie mit authentischem Material oder durch Messung der Absorptionsspektren nach vorangegangener Zonenelution.

2.1. Aromatische Carbonsäuren

2.1.1. Chromatographische Untersuchungen

Von den zahlreichen in der Literatur beschriebenen Verfahren benutzten wir für papierchromatographische Trennungen das Gemisch nach *Partridge*⁷ bzw. für zweidimensionale Chromatographie das Verfahren nach *Armstrong*⁸. Dünnschichtchromatographie auf Kieselschichten nach *Hurst* und *Harborne*⁵ führte gleichfalls zu zufriedenstellenden Resultaten, insbesondere in bezug auf die Trennung von Vanillin- und Isovanillinsäure, die durch geringfügige Variation des Lösungsmittelgemisches möglich wird.

Obwohl sich die erwähnten chromatographischen Methoden durch verhältnismäßig gute Reproduzierbarkeit auszeichnen, empfiehlt es sich dennoch, stets auch die entsprechenden Vergleichssubstanzen mitlaufen zu lassen.

Zur Sichtbarmachung der Flecke wurde in erster Linie die Silbernitrat—Phenol-Methode nach *Löffler* und *Reichl*⁶ herangezogen, nach der sich — ähnlich einem photographischen Negativbild — die meist hellen Säureflecke scharf vom dunklen Untergrund abheben und nur reduzierende Säuren (z. B.

⁶ J. E. Löffler und E. R. Reichl, *Mikrochim. Acta* **1953**, 79.

⁷ S. M. Partridge, *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).

⁸ M. D. Armstrong, K. N. F. Shaw und P. E. Wall, *J. Biol. Chem.* **218**, 293 (1956).

Gallussäure) dunkler als der Untergrund erscheinen. Dieses Verfahren ist für Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie gleich gut geeignet und in Empfindlichkeit und Lokalisierbarkeit den mit Indikatoren geführten Nachweisen überlegen. Die Farbreaktionen mit diazotiertem p-Nitroanilin⁹, diazotierter Sulfanilsäure¹⁰ bzw. 1proz. Eisen(III)-chloridlösung bieten die Möglichkeit einer weiteren Identifizierung, wobei wir die Beobachtung machten, daß geringfügige Farbunterschiede zwischen Papier und Kieselgel bestehen, die Tab. 1 zu entnehmen sind.

2.1.2. *Spektrophotometrische Untersuchungen*

Insbesondere bei Säuren, die keine freie phenolische Hydroxylgruppe enthalten bzw. durch Farbreaktionen nicht einwandfrei zu unterscheiden sind, stellen die Absorptionsspektren verlässliche Identifizierungshilfen dar. Für spektrophotometrische Messungen geeignete Lösungen können durch Elution der Chromatogrammzonen in ausreichendem Reinheitsgrad gewonnen werden. In Tab. 2 sind die Absorptionsmaxima chromatographisch reiner Verbindungen zusammengestellt, die mit einem Spektralphotometer Beckman DB mit Automatschreiber aufgezeichnet wurden. Der Vollständigkeit wegen sind auch solche Verbindungen aufgenommen worden, die sich schon durch Farbreaktionen allein hinreichend identifizieren lassen.

2.2. *Phenole*

2.2.1. *Chromatographie der abgespaltenen Phenole*

Wie bei Phenolcarbonsäuren ist auch bei den Phenolen das *Partridge*-Gemisch⁷ für die Papierchromatographie und das Verfahren von *Hurst* und *Harborne*⁵ für dünn-schichtchromatographische Trennungen auf Kieselgelschichten geeignet. Auch die Sichtbarmachung der Phenole erfolgt zweckmäßigerweise mit diazotiertem p-Nitroanilin⁹ und mit diazotierter Sulfanilsäure¹⁰ oder mit 1proz. Eisen(III)-chloridlösung (Tab. 1).

2.2.2. *Spektrophotometrische Untersuchungen*

In den meisten Fällen ist durch Farbreaktionen und vergleichende Chromatographie mit authentischen Verbindungen eine verlässliche Identifizierung der abgespaltenen Phenole möglich, so daß die spektrophotometrische Messung den Charakter einer zusätzlichen Aussage besitzt und bereits ermittelte Befunde erhärtet. Die in Tab. 2 zusammengestellten Daten stellen eigene Meßergebnisse mit chromatographisch reinen Substanzen dar.

⁹ H. G. Bray, W. V. Thorpe und K. White, *Biochem. J.* **46**, 271 (1950).

¹⁰ B. N. Ames und H. K. Mitchell, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 252 (1952).

Tabelle 1. Farbreaktion von aromatischen Carbonsäuren und Phenolen auf Cellulose und Kieselgel-G-Schichten

Substanz	diazot. p-Nitroanilin		diazot. Sulfaminsäure		Eisen(III)-chlorid	
	Cellulose	Kieselgel-G	Cellulose	Kieselgel-G	Cellulose	Kieselgel-G
a) Säuren						
Benzoessäure	—	—	—	—	—	—
2-Hydroxybenzoessäure	orange gelb	gelblich	gelblich	gelborange	violettrot	violett
3-Hydroxybenzoessäure	i. rot	orangerot	i. gelb	i. gelb	gelblich	gelblich
4-Hydroxybenzoessäure	i. rot	gelbbraun	i. gelb	i. gelb	gelb	gelblich
		später				
		orangerot				
2-Methoxybenzoessäure	—	—	—	—	—	—
3-Methoxybenzoessäure	—	—	—	—	—	—
4-Methoxybenzoessäure	—	—	—	—	—	—
2,4-Dihydroxybenzoessäure	gelbbraun	gelbbraun	orange	gelborange	violettrot	violett
2,5-Dihydroxybenzoessäure	gelblich	bräunlich	grau	hellviolett	blau	blau
3,4-Dihydroxybenzoessäure	bräunlich-violett	bräunlich-violett	rosa	i. orange	grün	grün
3,5-Dihydroxybenzoessäure	i. rot	gelborange	gelb bis braunorange	gelb bis braunorange	gelblich	gelblich
3-Hydroxy-4-methoxybenzoessäure	violett	braunviolett	gelblich orange	gelborange	gelbbraun	gelb

4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure	violett	braunviolett	orange	gelborange	gelbbraun	gelb
3,4-Dimethoxybenzoesäure	—	—	—	—	—	—
3,4,5-Trihydroxybenzoesäure	hell gelbbraun	gelbbraun	grünlich- braun	grünlich- braun	grauviolett	blaugrau
3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoe- säure	hell gelbbraun	gelbbraun	grünlich- braun	grünlich- braun	blaugrau	blaugrau
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoe- säure	blau	gelbbraun	rot	orange	rosa	—
3,4,5-Trimethoxybenzoesäure	—	—	—	—	—	—
b) <i>Phenole</i>						
Phenol	i. rot	gelbblichbraun	gelb	gelb	grauviolett	grünlich
Brenzkatechin	violett	braun	orange	bräunlich	grün	—
Resorcin	gelb	gelb	zitronengelb	gelb	grauviolett	—
Hydrochinon	graubraun	grün	graubraun	braun	—	—
Phloroglucin	gelb	gelborange	orange	gelblich	grauviolett	gelbbraun
Pyrogallol	braun	braun	braun	braun	braun	gelbbraun
Resorcin-Monomethyläther	rot	orange	gelb	gelb	lila	gelbbraun
Phloroglucin-Monomethyläther	gelb	gelborange	gelb	gelb	grauviolett	bräunlich

i. = intensiv.

Tabelle 2. UV-Spektren, gemessen in 96proz. Äthanol;
Wellenlänge in nm

Substanz	Maxima	Minima
a) <i>Säuren</i>		
Benzoessäure	279, 272	277, 254
2-Hydroxybenzoessäure	301, 229	258, 219
3-Hydroxybenzoessäure	297, 229	261, 224
4-Hydroxybenzoessäure	254	222
2-Methoxybenzoessäure	292, 230	258, 218
3-Methoxybenzoessäure *	290, 235	
4-Methoxybenzoessäure	250	220
2,4-Dihydroxybenzoessäure	295, 255	275, 234
2,5-Dihydroxybenzoessäure	336, 235	267, 230
3,4-Dihydroxybenzoessäure	295, 260	280, 236
3,5-Dihydroxybenzoessäure	295, 240	268, 235
3-Hydroxy-4-methoxybenzoessäure	294, 256	276, 235
4-Hydroxy-3-methoxybenzoessäure	290, 259	279, 234
2,3-Dimethoxybenzoessäure *	294	
2,4-Dimethoxybenzoessäure *	291, 257	
2,6-Dimethoxybenzoessäure *	282	
3,4-Dimethoxybenzoessäure	289, 249	271, 231
3,4,5-Trihydroxybenzoessäure	273	241
3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoessäure	271	238
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoessäure	273, 216	239
3,4,5-Trimethoxybenzoessäure	295, 262	235
b) <i>Phenole</i>		
Phenol	(280 i), 275	239
Brenzkatechin	278, 215	244, 210
Resorcin	283, 277	279, 244
Hydrochinon	294	251
Phloroglucin	(275 i), 272, 267, (255 i)	270, 247
Pyrogallol	(300 i), 264	244
Resorcin-Monomethyläther	281, 275	279, 244
Phloroglucin-Monomethyläther	(272 i), 267	250

i = Inflexion.

* = Daten der Literatur entnommen.

3. Experimenteller Teil

3.1. Alkaliabbau

Chromatographisch getrennte Flavonoide werden nach Elution bandförmiger Zonen in Form von Trockenrückständen gewonnen und dem Alkaliabbau unterworfen.

3.1.1. *Alkalischmelze*

Man verreibt einige mg Substanz mit 2—3 Plätzchen KOH, erhitzt in einem kleinen Glasröhrchen 2—3 Min. auf 250°. Nach dem Abkühlen wird mit wenig Wasser aufgenommen und mit HCl angesäuert.

3.1.2. *Alkalihydrolyse*

Etwa 1 mg Substanz wird in einem Kolben mit 10 ml 10proz. KOH 2 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen säuert man mit HCl an.

3.2. *Spektrophotometrische Messung der Spaltprodukte*

Die mit Äther aus angesäuerter Lösung ausgeschüttelten Spaltungsprodukte werden eindimensional chromatographiert. Nach beendeter Chromatographie werden die Zonen (durch Besprühen der Randpartien) aufgesucht und ausgeschnitten bzw. abgeschabt, eluiert und mit einem geeigneten Spektrophotometer (Beckman DB mit Automatschreiber) in 96proz. Äthanol durchgemessen.

3.3. *Papierchromatographie*

3.3.1. *Nach Partridge*⁷

LMS: *n*-Butanol—Eisessig—Wasser (4 : 1 : 5); zweiphasig.

Papier: Whatman 1 oder Schleicher & Schüll 2043b; absteigend.

3.3.2. *Nach Armstrong, Shaw und Wall*⁸; *zweidimensional*

LMS I: 2-Propanol—Ammoniak (konz.)—Wasser (8 : 1 : 1); einphasig.

LMS II: Benzol—Propionsäure—Wasser (2 : 2 : 1); zweiphasig.

Papier: Whatman 1; aufsteigend.

3.4. *Dünnschichtchromatographie*

*Nach Hurst und Harborne*⁵; *zweidimensional*

LMS I: Essigsäure—Chloroform (10 : 90); einphasig.

LMS Ia: Zur Trennung von Vanillinsäure/Isovanillinsäure: Essigsäure—Chloroform (6 : 94); einphasig.

LMS II: Essigester—Benzol (45 : 55); einphasig.

Trägerschichte: Silikagel (Kieselgel G „Merck“), Schichtdicke 0,25 mm.

3.5. *Nachweisreagentien*

3.5.1. *Silbernitrat—Phenol-Methode*⁶

Die lufttrockenen Chromatogramme werden zunächst mit Reagens I und erst nach anschließendem Trocknen (105—110°) mit Reagens II besprüht. Gleich darauf bringt man die Chromatogramme wieder in den Trockenschrank (105—110°) und beobachtet die schon nach wenigen Sekunden eintretende Färbung.

Reagens I: Lösung von 1,7 g AgNO₃ in 100 ml Wasser.

Reagens II: Gleiche Teile wassergesättigt. Phenol und 0,2proz. NaOH werden einige Minuten gut durchgeschüttelt; verwendet wird die untere (phenol.) Phase.

Mit Ausnahme der Stellen, an denen sich nichtreduzierende Verbindungen befinden und die rein weiß bleiben, bräunt sich die gesamte Fläche. Stärker reduzierende Substanzen werden bereits durch AgNO_3 braun und verfärben sich nach Phenolzusatz schwarz.

3.5.2. *Diazotiertes p-Nitroanilin*⁹

25 ml 0,3proz. p-Nitroanilinlösung in 8proz. HCl werden mit 1,5 ml 5proz. NaNO_2 -Lösung unmittelbar vor der Verwendung gemischt. Das Chromatogramm wird mit diesem Reagens und nachher noch mit 20proz. Na_2CO_3 -Lösung besprüht.

3.5.3. *Diazotierte Sulfanilsäure*¹⁰

25 ml frisch bereitete 5proz. NaNO_2 -Lösung werden bei 0° langsam zu 5 ml Sulfanilsäurelösung (0,9 g in 9 ml konz. HCl gelöst und mit H_2O auf 100 ml verdünnt) zugesetzt. Die Chromatogramme werden mit dem Reagens und anschließend noch mit 20proz. Na_2CO_3 -Lösung besprüht.

3.5.4. *1proz. Lösung von $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in Wasser.*