

FLUORESCENZ UND STRUKTUR VON FLAVONEN

HARALD HOMBERG* und HANS GEIGER†

Institut für Chemie der Universität Hohenheim, D-7000 Stuttgart 70, West Germany

(Eingegangen am 4 Januar 1980)

Key Word Index—Flavonoids; fluorescence spectra; structural determination.

Abstract—The fluorescence spectra of 100 flavones, adsorbed on cellulose, with and without shift reagents, are reported. The correlation between fluorescence and structure of these compounds is discussed.

EINLEITUNG

Flavone und Flavonole werden auf Papier- und Dünnschicht-chromatogrammen zumeist durch ihre Fluoreszenz unter einer UV-Lampe (*ca* 360 nm) in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Reagentien (z.B. NH₃, Na₂CO₃, AlCl₃ oder Neu's Reagens [1]) nachgewiesen. Dabei können auch schon wichtige Informationen über das Substitutionsmuster einzelner Flavonoide erhalten werden (vgl.z.B.[1,2]). Leider werden die beobachteten Fluorescenzerscheinungen von verschiedenen Beobachtern oft recht unterschiedlich beschrieben. Dies hat nach unseren Erfahrungen im wesentlichen drei Gründe:

(1) Die Fähigkeit zur Farbwahrnehmung ist nicht bei allen Menschen gleich; insbesondere männliche Individuen leiden z.B. recht häufig an einer angeborenen Rot-Grün-Schwäche bis hin zur Rot-Grün-Blindheit.

(2) Der subjektive Farbeindruck, den eine breite Fluoreszenzbande hervorruft ist häufig verschieden vom Farbeindruck, den eine schmale, bei λ_{max} der Bande liegende Spektrallinie hervorruft, weil die lang- bzw. kurzweligen Teile der Bande in unterschiedlichem Ausmass zum Farbeindruck beitragen. Daher ist es verständlich, daß der subjektive Farbeindruck, den eine Fluoreszenz hervorruft, von deren Intensität abhängt, denn mit abnehmender Intensität wird der Spektralbereich der oberhalb der Wahrnehmbarkeitsschwelle des menschlichen Auges liegt immer schmäler; damit wird aber auch der Farbeindruck, den diese Fluoreszenzbande hervorruft demjenigen immer ähnlicher, den eine bei λ_{max} liegende Spektrallinie hervorruft (Beispielsweise erscheint die Fluoreszenz von Luteolin auf einem Chromatogramm nach dem Besprühen mit Diphenylborsäure- β -aminoethyl-ester gelb, wenn die Konzentration der aufgetragenen Lösung 1 mg/ml beträgt hat, grün dagegen bei 0,01 mg/ml; das Fluoreszenzmaximum liegt bei 545 nm, die grüne Linie des Quecksilbers liegt vergleichsweise bei 546 nm).

(3) Die zusammen mit den UV-Lampen verwendeten Sperrfilter für das sichtbare Licht besitzen alle eine mehr oder weniger große Durchlässigkeit, sowohl am kurz-, als

auch besonders am langwelligen Ende des sichtbaren Spektrums. Dies hat vor allem zur Folge, daß zum einen die Flecke nichtfluoreszierender Substanzen, je nach dem verwendeten Lampen- bzw. Filtertyp, einmal als 'dunkel' oder 'löschen' und ein andermal als 'purpur' beschrieben werden, und zum anderen aus denselben Gründen auch die Farbnuancen der Fluorescenzerscheinungen unterschiedlich erscheinen können.

Auf Grund der oben dargelegten Schwierigkeiten bei der visuellen Beurteilung erschien es uns wünschenswert die Lage der Fluoreszenzmaxima zu messen, damit sie gleich den Absorptionsmaxima zur Identifizierung und Strukturermittlung herangezogen werden können.

Durchführung der Messungen

Die Messungen wurden mit Hilfe eines für Fluoreszenzmessungen ausgerüsteten Chromatogramm-Spektralphotometers direkt auf einer DC-Platte durchgeführt. Dies bietet nicht nur den Vorteil geringen Substanzbedarfs sondern erlaubt auch die Untersuchung der einzelnen Komponenten eines Substanzgemisches, sofern sich diese nur auf der DC-Platte auftrennen lassen. Als Trägermaterial wurde Cellulose gewählt, weil sie in Form von DC bzw. PC das am häufigsten verwendete Material für die analytische Chromatographie von Flavonoiden ist und wohl für jedes Flavonoid ein geeignetes Cellulose-DC-System zu finden ist.

Für die Auswahl der Verschiebungsreagentien, d.h. der Sprühreagentien, waren die folgenden Überlegungen massgebend: (1) Das Reagens durfte nicht flüchtig sein, daher konnte NH₃ nicht verwendet werden, obwohl es in manchen Fällen, auf die unten noch eingegangen wird, Vorteile bringt. (2) Zur Schonung des Geräts sollten Reagentien vermieden werden, die u.U. durch Hydrolyse HCl bilden können; deswegen wurde z.B. auf AlCl₃, ZrOCl₂ und SbCl₃ verzichtet. (3) Da beim Trocknen der Platten eine starke Konzentration der Reagentien, und damit bei Säuren und Basen eine starke Änderung des pH-Werts eintritt, wurde versucht diese Schwierigkeit durch Verwendung von Puffern zu umgehen.

Unter Beachtung der vorstehenden Randbedingungen entschieden wir uns für die folgenden Verschiebungsreagentien:

(1) *Ethyldiamintetraessigsäure-dinatriumsalz (EDTA)*. Mit diesem Komplexbildner besprühen wir seit langem routine-mäßig unsere Chromatogramme

* Aus der Staatsexamsarbeit von cand.rer.nat.H.H.

† Herrn Prof. Dr. S. Beckmann zum 75. Geburtstag gewidmet.

nachdem wir gefunden hatten, daß im Papier bzw. in der Cellulose vorhandene mehrwertige Kationen das Fluoreszenzverhalten beträchtlich beeinflussen können [3].

(2) *Diphenylborsäure-β-aminoethylester* (NA). Dieses von Neu [1] für den Nachweis von Flavonoiden eingeführte Reagenz wurde gewählt, weil die von ihm hervorgerufenen Verschiebungen der Fluoreszenzmaxima besonders groß sind.

(3) *Magnesiumacetat* (Mg). Dieses Reagenz wurde von Shibata [4] für den Nachweis von 5-Hydroxyflavonen empfohlen. Im Gegensatz zum NA befinden sich alle von ihm erzeugten Fluoreszenzen in einem ziemlich engen Spektralbereich; dies bringt zwar für die Strukturermittlung keinen wesentlichen Nutzen; es dürfte aber für die gleichzeitige quantitative fluorometrische Bestimmung von verschiedenen 5-Hydroxyflavonen von Vorteil sein, besonders wenn man das Verschiebungsreagenz zwecks gleichmäßiger Verteilung gleich dem Fließmittel zusetzt, wie dies schon vorgeschlagen worden ist [5]. Aus diesem Grund wurde die Wirkung dieses Reagenz auf alle Verbindungen untersucht.

(4) *Natriumcarbonat* (Soda). Dieses Reagenz wird schon lange zum Besprühen von Flavonoidchromatogrammen verwendet (vgl. z.B. [2]). Orientierende Remissionsmessungen haben ergeben, daß dessen Einfluss auf die, auf der DC-Platte gemessenen, Absorptionsspektren ungefähr demjenigen von Natriummethylat bei den Lösungsspektren [6] entspricht [7].

(5) *Tris-Puffer vom pH 8* (Tris). Nachdem, wie unten gezeigt wird, Soda dem NH₃ beim Nachweis der Abwesenheit einer freien OH-4'-Gruppe unterlegen ist, wurde versucht das für unsere Zwecke ungeeignete NH₃ durch Tris zu ersetzen. Nachdem aber die Messungen an den in Tab. 1 u. 2 zusammengefassten Verbindungen ergeben hatte, daß dieses Reagenz nur in Ausnahmefällen eine Verschiebung erzeugt wurde auf seine weitere Verwendung verzichtet.

(6) *Kaliumtetraoxalat* (K-ox). In der älteren Literatur wird häufig das Fluoreszenzverhalten von Flavonoiden in Gegenwart starker Säuren erwähnt (vgl. z.B. [8]); entsprechendes Verhalten kann man auch schon beim Besprühen mit relativ starken organischen Säuren (z.B. Ameisensäure oder Oxalsäure) beobachten, doch sind die

Tabelle I. Fluoreszenzverhalten von Flavon und dessen Monohydroxy- und Monomethoxyderivaten

Substanz	Nr.	Substitutionsmuster						Fluoreszenzmaxima (nm)					
		Chromenon	Phenyl	unb.	EDTA	NA	Soda	Tris	Mg	K-ox			
		3	5	6	7	8	2'	3'	4'				
Flavon	(1)						L 415	L 415	L	L	L	L	415
Flavonol	(2)	●					532	532	492	505	530	525	532
Flavonol-methylether	(3)	○					440	437	435	440	437	442	445
5-Hydroxyflavon	(4)	●					L	L	520	L	L	L	L
5-Methoxyflavon	(5)	○					457	447	447	450	457	452	492
6-Hydroxyflavon	(6)	●					460	†	460	520	462	520	460
6-Methoxyflavon	(7)	○					447	437	432	437	445	440	455
7-Hydroxyflavon	(8)	●					505	497	485	497	495	492	502
7-Methoxyflavon	(9)	○					440	440	*	*	*	*	440
8-Hydroxyflavon	(10)	●					N	N	490	N	N	N	N
8-Methoxyflavon	(11)	○					470	465	450	465	465	462	470
2'-Hydroxyflavon	(12)	●					427	497	495	522	505	510	430
2'-Methoxyflavon	(13)	○					430	420	420	420	425	417	470
3'-Hydroxyflavon	(14)	●					442	430	427	540	432	432	430
3'-Methoxyflavon	(15)	○					437	430	430	427	442	430	435
4'-Hydroxyflavon	(16)	●					412	415	415	487	420	475	415
4'-Methoxyflavon	(17)	○					480	470	470	480	480	475	470
							412	412	412	410	412	412	410

● = OH, ○ = Mc, unb. = unbehandelt.

EDTA = mit 0,2 M Ethylenediamintetraessigsäure-Dinatriumsalz in Wasser besprüht, NA = mit 1 proz. Lösung von Triphenylborsäure-β-aminoethylester in Methanol besprüht, Soda = mit 5 proz. Lösung von Na₂CO₃ in Wasser besprüht, Tris = mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer besprüht (pH = 8,0), Mg = mit 5 proz. Lösung von Mg (MeCOO)₂ in Wasser besprüht, K-ox = mit einer gesättigten (2 proz.) Lösung von KH(COO)₂ · H₂(COO)₂ in Wasser besprüht.

Nicht unterstrichener Wert = sehr schwache, gerade noch meßbare Fluoreszenz, unterbrochen unterstrichener Wert = schwache, aber gut meßbare Fluoreszenz, durchgehend unterstrichener Wert = Fluoreszenz mittlerer Intensität, doppelt unterstrichener Wert = sehr starke Fluoreszenz.

L = dunkler, die Eigenfluoreszenz der Schicht löschen Fleck. N = der Fleck bleibt unsichtbar, dh. er ist neutral.

* = der Fleck erscheint matt blau, die Fluoreszenz ist aber nicht meßbar.

† = schlecht reproduzierbares Fluoreszenzmaximum (zwischen 477 und 500 nm).

Ergebnisse je nach Trocknungsgrad der Schicht—and damit der Konzentration der Säure—recht unterschiedlich. Es wurde daher versucht auch hier mit einem Puffer, nämlich $\text{KH}_3(\text{C}_2\text{O}_4)_2$, zum Ziel zu kommen. Da auch hierbei nur in Einzelfällen nennenswerte Effekte auftraten, wurden die betreffenden Werte nur in den Tabellen 1 und 2 aufgenommen.

ERGEBNISSE

Um den Einfluß einzelner Substituenten auf die Fluorescenz des Flavonsystems kennen zu lernen wurden zunächst sämtliche Monohydroxy- sowie *o*-Dihydroxyflavone und deren Methylether untersucht.

Tabelle 1 zeigt das Fluorescenzverhalten des Flavons und seiner Monosubstitutionsprodukte. Die Werte sprechen im wesentlichen für sich, auf einige hervorstechende Punkte wird im folgenden eingegangen werden; die zahlreichen kleineren Verschiebungen bis ca 25 nm werden erst unten im Zusammenhang mit den Werten aus den Tabellen 2 und 3 besprochen. Die Minimalbedingung für das Auftreten einer Fluorescenz ist das Vorhandensein einer Methoxylgruppe in beliebiger Position oder einer Hydroxylgruppe in einer anderen Position als 5 und 8. Das Nichtauftreten einer Fluorescenz dürfte durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken bedingt sein (loose-bolt-Effekt!), damit steht im Einklang, daß 4 und 10 neben 2 die einzigen Verbindungen in Tabelle 1 sind, deren Fluorescenzverhalten durch NA verändert wird. Von 2'-Hydroxyflavon (12) könnte man an sich ähnliches Verhalten erwarten, doch besteht hier wegen der freien Drehbarkeit der Phenyl-Chromenonbindung die Möglichkeit einer anderen Orientierung (vgl. aber unten Verb. 25!).

Unter dem Einfluß von Na_2CO_3 beobachtet man, wiederum mit Ausnahme von 4 und 10 bei allen

Hydroxyflavonen die Fluorescenz der entsprechenden Anionen, wobei auffällt, daß gerade die Anionen von 6 und 14 bei denen der mesomere Effekt der Carbonylgruppe keine Rolle spielt, relativ langwellig fluorescieren. Daß die Fluorescenz von 7-Hydroxyflavon (8) durch Na_2CO_3 nicht verändert wird, bedeutet nicht, daß diese Verbindung nicht in das entsprechende Anion überführt wird, sondern im Gegenteil, daß man bei dieser Verbindung auch in neutraler und selbst mäßig saurer Lösung (K-ox!) nur die Fluorescenz des Anions beobachtet. Dagegen könnte eingewendet werden, daß 8 in neutraler und schwach basischer Lösung durchaus verschiedene Absorptionspektren liefert [6, 7]; aber es ist bekannt, daß sich die Dissoziationskonstanten von Phenolen im Grundzustand und im angeregten Zustand um bis zu sechs oder acht Zehnerpotenzen unterscheiden können, und daß sich prototrope Gleichgewichte während der Lebensdauer des angeregten Zustands einstellen können, sodaß auch ein im Grundzustand praktisch undissoziertes Phenol die Fluorescenz des entsprechenden Anions zeigen kann [9]. Bei den in einem Teil der Fluorescenzspektren von 2, 12 und 16 auftretenden beiden Maxima dürfte es sich um die Fluorescenzen der neutralen Moleküle bzw. der entsprechenden Anionen handeln. Tris-Puffer beeinflußt nur das Fluorescenzspektrum von 2 in dem es die kurzwellige Bande zum Verschwinden bringt. Magnesiumacetat schient auf die Monohydroxyflavone im wesentlichen als Base zu wirken; eine Komplexbildung mit 2 oder 4 lässt sich nicht erkennen. Kaliumtetraoxalat beeinflußt nur die Fluorescenz von 5 und 13, d.h. den beiden Methylethern, bei denen ein Proton zwischen zwei peri-ständigen Sauerstoffen chelatartig gebunden werden kann.

In Tabelle 2 ist das Fluorescenzverhalten der *o*-Dihydroxy- und Dimethoxyflavone aufgeführt. In un behandeltem Zustand fluorescieren alle Verbindungen

Tabelle 2. Fluorescenzverhalten der *o*-Dihydroxy- und *o*-Dimethoxyflavone

Substanz	Nr.	Substitutionsmuster								Fluorescenzmaxima (nm)								
		Chromenon	Phenyl	unb.	EDTA	NA	Soda	Tris	Mg	K-ox	3	5	6	7	8	2'	3'	4'
5,6-Dihydroxyflavon	(18)	● ●		L	L	L	L	L	L	L								
5,6-Dimethoxyflavon	(19)	○ ○		500	490	485	497	490	490	495								
6,7-Dihydroxyflavon	(20)	● ●		465	502	507	537	507	520	467								
6,7-Dimethoxyflavon	(21)	○ ○		440	435	430	435	435	435	445								
7,8-Dihydroxyflavon	(22)	● ●		L	L	557	500	L	510	L								
7,8-Dimethoxyflavon	(23)	○ ○		487	480	480	480	482	480	482								
2',3'-Dihydroxyflavon	(24)	● ●		N	485	525	L	L	507	N								
2',3'-Dimethoxyflavon	(25)	○ ○		475	465	460	465	470	465	475								
3',4'-Dihydroxyflavon	(26)	● ●		452	455	520	517	467	490	450								
3',4'-Dimethoxyflavon	(27)	○ ○		440	437	435	440	442	440	442								

● = OH, ○ = Me, unb. = unbehandelt.

EDTA = mit 0,2 M Ethylen diamintetraessigsäure-Dinatriumsalz in Wasser besprüht, NA = mit 1 proz. Lösung von Triphenylborsäure- β -aminoethylester in Methanol besprüht, Soda = mit 5 proz. Lösung von Na_2CO_3 in Wasser besprüht, Tris = mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer besprüht ($\text{pH} = 8,0$), Mg = mit 5 proz. Lösung von Mg (MeCOO)₂ in Wasser besprüht, K-ox = mit einer gesättigten (2 proz.) Lösung von $\text{KH}(\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2(\text{COO})_2$ in Wasser besprüht.

Nicht unterstrichener Wert = sehr schwache, gerade noch meßbare Fluorescenz, unterbrochen unterstrichener Wert = schwache, aber gut meßbare Fluorescenz, durchgehend unterstrichener Wert = Fluorescenz mittlerer Intensität, doppelt unterstrichener Wert = sehr starke Fluorescenz.

L = dunkler, die Eigenfluorescenz der Schicht löscher Fleck, N = der Fleck bleibt unsichtbar, d.h. er ist neutral.

Tabelle 3. Fluoreszenzverhalten verschiedener, meist natürlich vorkommender Flavone

Substanz	Nr.	Substitutionsmuster								Fluoreszenzmaxima (nm)					
		Chromenon				Phenyl				unb.	EDTA	NA	Soda	Mg	
		3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'				
Chrysin dimethylether	(28)	○	○								452	442	440	442	440
Apigenin trimethylether	(29)	○	○					○			425	420	407	415	410
Luteolin tetramethylether	(30)	○	○				○	○			427	422	422	422	422
Fisetin tetramethylether	(31)	○	○				○	○			442	437	430	435	440
Galangin trimethylether	(32)	○	○								447	437	432	437	437
Quercetin pentamethylether	(33)	○	○				○	○			437	432	432	432	432
7-Hydroxy-2'-methoxyflavon	(34)		●				○				415	415	405	492	420
7-Hydroxy-4'-methoxyflavon	(35)		●					○			405	402	402	490	405
7-Hydroxy-3',4'-dimethoxyflavon	(36)		●				○	○			430	425	425	495	430
7,2'-Dihydroxyflavon	(37)		●			●					422	430	422	512	497
7,4'-Dihydroxyflavon	(38)		●					●			410	412	410	470	467
Luteolin-5,3'-dimethylether	(39)	○		●			○	●			430	430	430	487	465
Quercetin-5,3'-dimethylether-3-glucosid	(40)	△	○		●			○	●		445	440	445	505	460
Luteolin-5-methylether	(41)	○		●				●	●		430	440	490	480	475
Luteolin-5-glucosid	(42)	△		●				●	●		440	445	505	485	490
Azaleatin-3-galactosid	(43)	△	○		●			●	●		445	445	505	495	485
4'-Methoxyflavonol	(44)	●						○			430	430	500	510	530
Fisetin-7,3',4'-trimethylether	(45)	●		○			○	○			495	495	495	502	500
Kämpferol-5,4'-dimethyl-ether	(46)	●	○		●			○			535	535	502	495	525
Quercetin-5,3',4'-trimethyl-ether	(47)	●	○		●			○	○		540	540	515	495	535
Quercetin-5,3'-dimethylether	(48)	●	○		●			○	●		540	540	525	505	540
Fisetin	(49)	●		●				●	●		535	540	560	560	535
Azaleatin	(50)	●	○		●			●	●		540	540	557	512	540
Robinetin	(51)	●		●				●	●	●	540	540	572	*	535
Apigenin-7,4'-dimethylether	(52)	●		○				○			L	L	510	515	505
Luteolin-7,4'-dimethylether	(53)	●		○				●	○		L	L	515	492	495
Diosmetin-7-rutinosid	(54)	●		△				●	○		L	L	500	500	495
Chrysin	(55)	●		●							L	L	515	L	505
5,7-Dihydroxy-2'-methoxyflavon	(56)	●		●			○				L	L	507	470	495
Acacetin	(57)	●		●				○			L	L	510	L	500
Tricetin-3',4',5'-trimethylether	(58)	●		●			○	○	○		L	L	515	L	500
Diosmetin	(59)	●		●				●	○		L	L	512	500	497
Genkwanin	(60)	●		○				●			L	L	505	485	500
Apigenin-7-glucosid	(61)	●		△				●			L	L	510	490	485
Chrysoeriol-7-glucosid	(62)	●		△			○	●			L	L	500	490	485
Luteolin-7,3'-diglucosid	(63)	●		△			△	●			L	L	515	500	485
Apigenin	(64)	●		●				●			L	L	515	485	495
Chrysoeriol	(65)	●		●			○	●			L	L	505	500	485
Luteolin-3'-glucosid	(66)	●		●			△	●			L	L	520	490	480
Tricin	(67)	●		●			○	●	○		L	L	505	515	490
Luteolin-7-methylether	(68)	●		○			●	●			L	L	547	500	505
Luteolin-7-glucosid	(69)	●		△			●	●			L	L	550	500	505

Tabelle 3. (Fortsetzung)

Substanz	Nr.	Substitutionsmuster								Fluoreszenzmaxima (nm)					
		Chromenon				Phenyl				unb.	EDTA	NA	Soda	Mg	
		3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'				
Tricetin-7-glucosid	(70)	●		△			●	●	●		L	L	550	505	505
Luteolin	(71)	●		●			●	●			L	L	545	510	505
Tricetin	(72)	●		●			●	●	●		L	L	550	530	505
Scutellarein-7-glucosid	(73)	●	●	△			●				L	L	L	490	510
Scutellarein	(74)	●	●	●			●	●			L	L	L	480	517
Quercetin-3,7,3',4'-tetramethylether	(75)	○	●		○		○	○			L	L	520	L	492
Galangin-3-methylether	(76)	○	●		●						L	L	530	L	490
Kämpferol-3-glucosid-7-rhamnosid	(77)	△	●		△		●				L	L	510	495	495
Kämpferol-3-glucosid	(78)	△	●		●		●				L	L	520	500	500
Quercetin-3-glucosid-7-rhamnosid	(79)	△	●		△		●	●			L	L	555	500	500
Quercetin-3-glucosid	(80)	△	●		●		●	●			L	L	560	525	505
Myricetin-3-galactosid	(81)	△	●		●		●	●	●		L	L	560	510	†
Herbacetin-3-sophorosid-8-glucosid	(82)	△	●		●	△	●				L	L	532	L	515
Gossypetin-3-sophorosid-8-glucosid	(83)	△	●		●	△	●	●			L	L	555	‡	495
Tamarixetin-7-rhamnoglucosid	(84)	●	●		△		●	○			535	540	510	500	510
Galangin	(85)	●	●		●						530	540	527	505	515
Kämpferid	(86)	●	●		●			○			525	540	515	495	510
Tamarixetin	(87)	●	●		●		●	○			532	545	520	535	510
Spiräosid	(88)	●	●		●		●	△			530	545	520	510	510
Kämpferol-7-glucosid	(89)	●	●		△		●				535	540	515	520	510
Rhamnazin	(90)	●	●		○		○	●			522	540	510	530	510
Kämpferol	(91)	●	●		●		●				525	540	515	545	512
Isorhamnetin	(92)	●	●		●		○	●			535	542	515	545	510
Morin	(93)	●	●		●		●	●			500	510	520	545	515
Rhamnetin	(94)	●	●		○		●	●			525	540	565	515	510
Quercetin-7-glucosid	(95)	●	●		△		●	●			540	545	565	515	515
Quercetin	(96)	●	●		●		●	●			530	542	560	540	515
Myricetin-3'-methylether	(97)	●	●		●		○	●	●		540	547	567	*	515
Myricetin	(98)	●	●		●		●	●	●		540	545	565	*	515
Quercetagetrin	(99)	●	●	●	●		●	●			L	L	570	‡	520
Gossypetin	(100)	●	●	●	●	●	●	●			L	L	§		L

● = OH, ○ = Me, △ = glykosyloxy-, unb. = unbeschichtet.

EDTA = mit 0,2 M Ethylen diamintetraessigsäure-Dinatriumsalz in Wasser besprüht, NA = mit 1 proz. Lösung von Triphenylborsäure-β-aminoethylester in Methanol besprüht, Soda = mit 5 proz. Lösung von Na_2CO_3 in Wasser besprüht, Mg = mit 5 proz. Lösung von $\text{Mg}(\text{MeCOO})_2$ in Wasser besprüht.

Nicht unterstrichener Wert = sehr schwache, gerade noch meßbare Fluoreszenz, unterbrochen unterstrichener Wert = schwache, aber gut meßbare Fluoreszenz, durchgehend unterstrichener Wert = Fluoreszenz mittlerer Intensität, doppelt unterstrichener Wert = sehr starke Fluoreszenz.

L = dunkler, die Eigenfluoreszenz der Schicht löscher Fleck.

* = dunkler, die Eigenfluoreszenz der Schicht löscher Fleck, der bei der Betrachtung am Tageslicht blau-violett erscheint.

† = schwach gelbliche, aber nicht meßbare Fluoreszenz.

‡ = dunkler, die Eigenfluoreszenz der Schicht löscher Fleck, der bei der Betrachtung am Tageslicht braun-gelb erscheint.

§ = dunkler, die Eigenfluoreszenz der Schicht löscher Fleck, der bei der Betrachtung am Tageslicht rostrot erscheint.

|| = dunkler, die Eigenfluoreszenz der Schicht löscher Fleck, der bei der Betrachtung am Tageslicht oliv-grün erscheint.

mit Ausnahme von **18**, **22** und **24**. Für **18** und **22** gilt das oben über **4** und **10** Gesagte. **24** ist im Gegensatz zu **12** offenbar so auf der Cellulose orientiert, daß die 2'-OH-Gruppe sich in peri-Stellung zum Chromenonsauerstoff befindet, wodurch sich eine Wasserstoffbrücke ausbilden kann; auf dem mit EDTA besprühten Chromatogramm ist der Ring offenbar zumindest teilweise entsprechend wie in **12** orientiert. Mit NA bilden alle Dihydroxyflavone mit Ausnahme von **18** fluoreszierende Komplexe; wobei bei **22** und **24** offen bleiben muß zwischen welchen beiden der drei benachbarten Sauerstoffe der Chelatring geschlossen wird (*ortho* oder *peri*). Ob die Verschiebung der Fluoreszenz durch Magnesiumacetat auf Salz- oder Komplexbildung beruht kann nur bei **24** eindeutig zu Gunsten der Letzteren entschieden werden.

In Tabelle 3 ist das Fluoreszenzverhalten weiterer, meist natürlich vorkommender Flavone und Flavonole angegeben. An Hand dieser Beispiele soll gezeigt werden wie sich die gleichzeitige Anwesenheit von mehreren der vorstehend besprochenen Strukturelemente auswirkt. Hier konnte selbstverständlich keine Vollständigkeit angestrebt werden, doch dürften die untersuchten Verbindungen, die fast alle im Rahmen eigener Arbeiten isoliert worden sind, einen guten Querschnitt durch die am häufigsten natürlich vorkommenden Typen darstellen. Schon ein kurzer Blick auf Tabelle 3 zeigt, daß diese Verbindungen, soweit sie im Ring A das Resorcin oder Phloroglucinoxygenierungsmuster besitzen, sich so einheitlich verhalten, daß man für sie das Fluoreszenzverhalten vorhersagen kann. Die Anzahl von Verbindungen, die zusätzliche Substituenten in 6- bzw. 8-Stellung tragen, ist in Tabelle 3 leider zu gering um in diesen Fällen sichere Vorhersagen machen zu können; in welcher Richtung in diesen Fällen die Effekte zu suchen sind kann man aber den Tabellen 1 und 2 entnehmen.

Wenn man also nur die Verbindungen mit dem Resorcin- und Phloroglucinoxygenierungsmuster im Ring A berücksichtigt, so ergibt sich folgendes Bild:

(1) Verbindungen, die keine freien OH-Gruppen in 5- und 3-Stellung besitzen (**28–43**) fluoreszieren, unbehandelt oder mit EDTA besprührt, kräftig im Bereich zwischen 400 und 450 nm [eine Ausnahme ist u.U. möglich, wenn OH-7 die einzige freie OH-Gruppe ist (vgl. Substanz **8** und das oben über sie Gesagte)]. Eine oder mehrere freie OH-Gruppen werden bei diesen Verbindungen durch eine bathochrome Verschiebung mit Soda um 45–90 nm angezeigt, einen Zusammenhang mit deren Position lässt das vorliegende Material noch nicht erkennen. Eine *o*-Dihydroxygruppierung im Ring B (und nur solche werden hier berücksichtigt!) bewirkt beim Besprühen mit NA eine bathochrome Verschiebung um 60–65 nm [Ausnahmen sind hier u.U. bei 2,3-Dihydroxygruppierungen möglich (vgl. Substanz **24**)].

(2) Verbindungen ohne freie OH-Gruppe in 5-Stellung aber mit freier OH-Gruppe in 3-Stellung (**44–51**) fluoreszieren unbehandelt oder mit EDTA besprührt recht stark bei 495–540 nm. Mit NA behandelt fluoreszieren die Verbindungen ohne *o*-Dihydroxygruppierung im Ring B bei 495–525 nm; diejenigen mit freien OH-Gruppen in 3'- und 4'-Stellung bei 557–572 nm. Die Verschiebungen mit Na_2CO_3 können auf Grund des vorliegenden Materials noch nicht gedeutet werden; auf die oxydative Zersetzung von **51** wird erst unten im Zusammenhang mit ähnlichen Fällen eingegangen.

(3) Verbindungen, die eine freie OH-Gruppe in 5-Stellung, aber keine freie OH-Gruppe in 3-Stellung

besitzen (**52–72** und **75–81**) fluoreszieren unbehandelt oder mit EDTA besprührt nicht. Nach dem Besprühen mit NA fluoreszieren die Verbindungen ohne *o*-Dihydroxygruppierung im Ring B zwischen 500 und 530 nm; diejenigen mit freien OH-Gruppen in 3'- und 4'-Stellung zwischen 545 und 560 nm. Nach dem Besprühen mit Na_2CO_3 fluoreszieren alle Verbindungen mit freiem OH-4' mehr oder weniger stark bei 485–530 nm; die Verbindungen ohne freies OH-4' fluoreszieren entweder nicht oder schwach. Eindeutiger ist hier die visuelle Betrachtung in NH_3 -Atmosphäre; hierbei fluoreszieren alle Verbindungen mit freiem OH-4' und alle Verbindungen ohne freies OH-4' fluoreszieren nicht (vgl. hierzu auch [2 und 6]). Nach dem Besprühen mit Magnesiumacetat fluoreszieren alle Verbindungen dieser Gruppe, mit Ausnahme von **81**, dessen Fluoreszenz nicht messbar ist, im Bereich zwischen 480 und 505 nm.

(4) Die Verbindungen mit freien OH-Gruppen in 3- und 5-Stellung (**84–98**) liegen in ihrem Verhalten zwischen der 2. und 3. Gruppe: Unbehandelt oder mit EDTA besprührt fluoreszieren diese Verbindungen nur schwach bis mässig zwischen 500 und 547 nm [wenn man vom Morin (**93**) mit seiner 2'-OH-Gruppe absieht liegen die EDTA-Werte sogar in dem engen Bereich zwischen 540 und 547 nm]. Nach dem Besprühen mit NA liegt die Fluoreszenz der Verbindungen ohne freie *o*-Dihydroxygruppe zwischen 510 und 527 nm; die Fluoreszenz der Verbindungen mit freien OH-Gruppen in 3'- und 4'-Stellung liegt dagegen bei 560–567 nm.

Aus den Verschiebungen der Fluoreszenz durch Na_2CO_3 können bislang keine Gesetzmäßigkeiten abgeleitet werden, weil hierbei auch Unterschiede zwischen Methoxyl- und Glykosyloxygruppen beachtet werden (vgl. z.B. **87** und **88**); zur Charakterisierung einer bestimmten Verbindung sind die Werte jedoch gut brauchbar.

Von diagnostischem Wert sind jedoch die im Tageslicht zu beobachtenden olivgrünen bis blauen Verfärbungen der mit Na_2CO_3 besprühten Flecke von **100** bzw. **51, 97** und **98**, die durch Luftoxydation entstehen; wobei besonders auf den Myricetin-3'-methylether hingewiesen sei, weil dieses Beispiel zeigt, daß für die Entstehung der Farbe die *o*-Dihydroxygruppierung hinreichend ist, und die dritte Sauerstofffunktion nur zur Erniedrigung des Redoxpotentials dient (vgl. auch [2] und [10]).

Schlußbemerkungen

Obwohl bei den vorstehenden Betrachtungen nur solche Verschiebungen, die sehr viel grösser sind als jeder mögliche Messfehler berücksichtigt wurden, lassen sich schon aus diesen Verschiebungen und dem Auftreten, bzw. Nichtauftreten einer Fluoreszenz, mit einer Ausnahme, dieselben Schlüsse ziehen, wie aus den Absorptionspektronen. Die Ausnahme betrifft die Frage nach dem Vorliegen einer freien OH-Gruppe in 7-Stellung, aber der Nachweis dieser Gruppe aus den oft recht kleinen Verschiebungen in den Absorptionsspektren ist nicht unproblematisch (vgl. [11]). Überdies beruht dieser Nachweis auf der Annahme, daß die Bande I einem Cinnamoyl und Bande II einem Benzoylchromophor zuzuschreiben ist; dies ist aber sehr unwahrscheinlich, man wird vielmehr Bande I einem n, π^* - und Bande II einem π, π^* -Übergang zuordnen müssen. Aussagen über zusätzliche Substituenten in 6- und 8-Stellung werden, nach den wenigen Beispielen in Tabellen 1–3 zu schliessen, möglich sein, doch reicht das vorhandene Material zum

Erkennen der Gesetzmässigkeiten noch nicht aus. Ebenso möchten wir bislang noch keine Schlüsse aus den zahlreichen kleineren Unterschieden, die sich in Tabellen 1-3 finden ziehen, obwohl sich auch hier Gesetzmässigkeiten ahnen lassen (z.B. fluorescieren in Gegenwart von Na_2CO_3 nur Flavonole mit drei freien OH-Gruppen in 5-, 7- und 4'-Stellung bei 540–545 nm).

Abschliessend sei bemerkt, daß man für Vorproben die Lage der Maxima starker Fluoreszenzen auch visuell ungefähr abschätzen kann, wenn man zum Vergleich Fluoreszenzbanden bekannter Wellenlänge heranzieht, wobei aber auf Grund des in der Einleitung Gesagten die Konzentration der Auftragslösungen von fraglicher Substanz und Testsubstanz ca 1 mg/ml betragen sollte. Folgende leicht zugängliche Testsubstanzen sind geeignet Chlorogensäure (unb. 430 nm; NA 495 nm), Morin (NA 520 nm), Luteolin (NA 545) und Quercetin (NA 560 nm).

EXPERIMENTELLES

Die untersuchten Flavone und Flavonole waren entweder in unserem Laboratorium vorhanden, oder sie wurden nach bekannten Methoden synthetisiert; die Identität ist in jedem Fall gesichert.

Für die DC wurden selbst beschichtete Celluloseplatten (MN 300, Machery, Nagel u. Co., Düren/Rhld) und als Fliessmittel wurden Essigsäure-Wasser-Gemische verwendet, deren Zusammensetzung so gewählt wurde, daß der R_f -Wert der zu untersuchenden Substanz zwischen 0,2 und 0,8 liegt. Die Zusammensetzung der Verschiebungsgemische ergibt sich aus den Legenden zu Tabellen 1-3.

Die Messanordnung bestand aus dem Monochromator, Empfänger und Anzeigegerät des Spektralphotometers PMQ II sowie dem Kreuztisch, dem Messkopf und der Spezialleuchte 1 des Chromatogramm-Spektralphotometers KM 3 (Carl Zeiss, Oberkochen). Zur Anregung der Fluorescenz wurden die entsprechenden Liniengruppen des Hg-Spektrums [um 365 nm für die längenwelligen und um 313 nm für die kurzwelligen (unter 450 nm) Fluoreszenzen] mit den entsprechenden Monochromatfiltern isoliert. Gemessen wurde in 5 nm-Schritten. Zur Messmethodik vgl. [12].

LITERATUR

1. Neu, R. (1954) *Z. Analyt. Chem.* **142**, 335; (1956) *Z. Analyt. Chem.* **151**, 328; (1956) *Mikrochim. Acta* 1169; (1957) *Naturwissenschaften* **44**, 181.
2. Harborne, J. B. (1959) *J. Chromatogr.* **2**, 581.
3. Beckmann, S. und Geiger, H. (1963) *Phytochemistry* **2**, 281.
4. Shibata, S. und Kasahara, A. (1952) *J. Pharm. Soc. Jpn* **72**, 1386.
5. Spiegel, P., Dittrich, Ch. und Jentzsch, K. (1976) *Sci. Pharm.* **44**, 129.
6. Mabry, T. J., Markham, K. R. und Thomas, M. B. (1979) *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, Berlin.
7. Homberg, H. und Geiger, H., unveröffentlicht.
8. (1934) *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie* (Hrsg. Dt. chem. Ges.) 4. Auflage, Bd. 18, J. Springer, Berlin.
9. Förster, Th. (1950) *Z. Elektrochem.* **54**, 531.
10. Harbone, J. B. (1969) *Phytochemistry* **8**, 177.
11. Bacon, J. D., Mabry, T. J. und Mears, J. A. (1976) *Rev. Latinoam. Quím.* **7**, 83.
12. Hezel, U. (1973) *Angew. Chem.* **85**, 334.