

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. NH_3 , Na_2CO_3 , AlCl_3 oder Neu's Reagenz [1]) nachgewiesen. Dabei können auch schon wichtige Informationen über das Substitutionsmuster einzelner Flavonoide erhalten werden (vgl. z.B. [1, 2]). Leider werden die beobachteten Fluoreszenzerscheinungen 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. kurzwelligen 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 schmaler; 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 -aminoethylester gelb, wenn die Konzentration der aufgetragenen Lösung 1 mg/ml betragen hatte, 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 'löschend' und ein andermal als 'purpur' beschrieben werden, und zum anderen aus denselben Gründen auch die Farbnuancen der Fluoreszenzerscheinungen unterschiedlich erscheinen können.

Auf Grund der oben dargelegten Schwierigkeiten bei der visuellen Beurteilungen 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 NH_3 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 AlCl_3 , ZrOCl_2 und SbCl_3 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) Ethylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz (EDTA). Mit diesem Komplexbildner besprühen wir seit langem routine-mässig unsere Chromatogramme

* Aus der Staatsexamensarbeit 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 NH_3 beim Nachweis der Abwesenheit einer freien OH-4'-Gruppe unterlegen ist, wurde versucht das für unsere Zwecke ungeeignete NH_3 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 1. 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 492	L 505	L 530	L 525	L 415
Flavonol	(2)	●								532	532					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	410	480	412	470
										412	412	412	410	412	412	410

● = OH, ○ = Me, unb. = unbehandelt.

EDTA = mit 0,2M Ethylendiamintetraessigsäure-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 0,1M Tris-HCl-Puffer besprüht (pH = 8,0), Mg = mit 5 proz. Lösung von $\text{Mg}(\text{MeCOO})_2$ 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 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 löschender 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—und 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 Fluoreszenz des Flavonsystems kennen zu lernen wurden zunächst sämtliche Monohydroxy- sowie *o*-Dihydroxyflavone und deren Methylether untersucht.

Tabelle 1 zeigt das Fluoreszenzverhalten 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 Fluoreszenz ist das Vorhandensein einer Methoxylgruppe in beliebiger Position oder einer Hydroxylgruppe in einer anderen Position als 5 und 8. Das Nichtauftreten einer Fluoreszenz 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 Fluoreszenzverhalten 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 Fluoreszenz 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 fluoreszieren. Daß die Fluoreszenz 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 Fluoreszenz des Anions beobachtet. Dagegen könnte angewendet werden, daß 8 in neutraler und schwach basischer Lösung durchaus verschiedene Absorptionsspektren 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 undissoziiertes Phenol die Fluoreszenz des entsprechenden Anions zeigen kann [9]. Bei den in einem Teil der Fluoreszenzspektren von 2, 12 und 16 auftretenden beiden Maxima dürfte es sich um die Fluoreszenzen der neutralen Moleküle bzw. der entsprechenden Anionen handeln. Tris-Puffer beeinflusst nur das Fluoreszenzspektrum von 2 in dem es die kurzwellige Bande zum Verschwinden bringt. Magnesiumacetat scheint auf die Monohydroxyflavone im wesentlichen als Base zu wirken; eine Komplexbildung mit 2 oder 4 läßt sich nicht erkennen. Kaliumtetraoxalat beeinflusst nur die Fluoreszenz von 5 und 13, d.h. den beiden Methylethern, bei denen ein Proton zwischen zwei periständigen Sauerstoffen chelatartig gebunden werden kann.

In Tabelle 2 ist das Fluoreszenzverhalten der *o*-Dihydroxy- und *o*-Dimethoxyflavone aufgeführt. In unbehandeltem Zustand fluoreszieren alle Verbindungen

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

Substanz	Nr.	Substitutionsmuster								Fluoreszenzmaxima (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 Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz in Wasser besprüht, NA = mit 1proz. Lösung von Triphenylborsäure- β -aminoethylester in Methanol besprüht, Soda = mit 5proz. Lösung von Na_2CO_3 in Wasser besprüht, Tris = mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer besprüht (pH = 8,0), Mg = mit 5proz. Lösung von Mg (MeCOO)₂ in Wasser besprüht, K-ox = mit einer gesättigten (2proz.) 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 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 löschender Fleck, N = der Fleck bleibt unsichtbar, dh. 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)	○			○							<u>452</u>	442	440	<u>442</u>	<u>440</u>
Apigenin trimethylether	(29)	○			○					○		<u>425</u>	420	407	<u>415</u>	<u>410</u>
Luteolin tetramethylether	(30)		○		○				○	○		<u>427</u>	422	422	<u>422</u>	<u>422</u>
Fisetin tetramethylether	(31)	○			○				○	○		<u>442</u>	437	430	<u>435</u>	<u>440</u>
Galangin trimethylether	(32)	○	○		○							<u>447</u>	437	<u>432</u>	<u>437</u>	<u>437</u>
Quercetin pentamethylether	(33)	○	○		○				○	○		<u>437</u>	432	<u>432</u>	<u>432</u>	<u>432</u>
7-Hydroxy-2'-methoxyflavon	(34)				●		○					<u>415</u>	<u>415</u>	405	<u>492</u>	<u>420</u> <u>475</u>
7-Hydroxy-4'-methoxyflavon	(35)				●					○		405	<u>402</u> <u>470</u>	<u>402</u> <u>470</u>	<u>490</u>	<u>405</u> <u>480</u>
7-Hydroxy-3',4'-dimethoxy-flavon	(36)				●				○	○		430	425	425	<u>495</u>	<u>430</u>
7,2'-Dihydroxyflavon	(37)				●		●					422	<u>430</u> 500	422	512	<u>497</u>
7,4'-Dihydroxyflavon	(38)				●					●		<u>410</u>	412	410	<u>470</u>	<u>467</u>
Luteolin-5,3'-dimethylether	(39)		○		●				○	●		<u>430</u>	430	430	<u>487</u>	<u>465</u>
Quercetin-5,3'-dimethylether-3-glucosid	(40)	△	○		●				○	●		<u>445</u>	440	445	<u>505</u>	<u>460</u>
Luteolin-5-methylether	(41)		○		●				●	●		430	440	490	<u>480</u>	<u>475</u>
Luteolin-5-glucosid	(42)		△		●				●	●		440	445	505	<u>485</u>	<u>490</u>
Azaleatin-3-galactosid	(43)	△	○		●				●	●		<u>445</u>	445	505	<u>495</u>	<u>485</u>
4'-Methoxyflavonol	(44)	●								○		<u>430</u> <u>532</u>	430 535	<u>500</u>	<u>510</u>	<u>530</u>
Fisetin-7,3',4'-trimethylether	(45)	●			○				○	○		<u>495</u>	495	<u>495</u>	<u>502</u>	<u>500</u>
Kämpferol-5,4'-dimethylether	(46)	●	○		●					○		<u>535</u>	535	502	<u>495</u>	<u>525</u>
Quercetin-5,3',4'-trimethylether	(47)	●	○		●				○	○		<u>540</u>	<u>540</u>	<u>515</u>	<u>495</u>	<u>535</u>
Quercetin-5,3'-dimethylether	(48)	●	○		●				○	●		<u>540</u>	540	525	<u>505</u>	<u>540</u>
Fisetin	(49)	●			●				●	●		<u>535</u>	<u>540</u>	560	<u>560</u>	<u>535</u>
Azaleatin	(50)	●	○		●				●	●		<u>540</u>	540	557	<u>512</u>	<u>540</u>
Robinetin	(51)	●			●				●	●	●	<u>540</u>	<u>540</u>	572	*	<u>535</u>
Apigenin-7,4'-dimethylether	(52)	●			○					○		L	L	<u>510</u>	515	<u>505</u>
Luteolin-7,4'-dimethylether	(53)	●			○				●	○		L	L	<u>515</u>	<u>497</u>	<u>495</u>
Diosmetin-7-rutinosid	(54)	●			△				●	○		L	L	500	<u>500</u>	<u>495</u>
Chrysin	(55)	●			●							L	L	<u>515</u>	L	<u>505</u>
5,7-Dihydroxy-2'-methoxy-flavon	(56)	●			●		○					L	L	507	470	<u>495</u>
Acacetin	(57)	●			●					○		L	L	510	L	<u>500</u>
Tricetin-3',4',5'-trimethylether	(58)	●			●				○	○	○	L	L	<u>515</u>	L	<u>500</u>
Diosmetin	(59)	●			●				●	○		L	L	512	<u>500</u>	<u>497</u>
Genkwanin	(60)	●			○					●		L	L	<u>505</u>	<u>485</u>	<u>500</u>
Apigenin-7-glucosid	(61)	●			△					●		L	L	510	<u>490</u>	<u>485</u>
Chrysoeriol-7-glucosid	(62)	●			△				○	●		L	L	<u>500</u>	<u>490</u>	<u>485</u>
Luteolin-7,3'-diglucosid	(63)	●			△				△	●		L	L	<u>515</u>	<u>500</u>	<u>485</u>
Apigenin	(64)	●			●					●		L	L	<u>515</u>	<u>485</u>	<u>495</u>
Chrysoeriol	(65)	●			●				○	●		L	L	505	<u>500</u>	<u>485</u>
Luteolin-3'-glucosid	(66)	●			●				△	●		L	L	520	<u>490</u>	<u>480</u>
Tricin	(67)	●			●				○	●	○	L	L	<u>505</u>	<u>515</u>	<u>490</u>
Luteolin-7-methylether	(68)	●			○				●	●		L	L	<u>547</u>	<u>500</u>	<u>505</u>
Luteolin-7-glucosid	(69)	●			△				●	●		L	L	<u>550</u>	<u>500</u>	<u>505</u>

Tabelle 3. (Fortsetzung)

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

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

EDTA = mit 0,2M Ethylendiamintetraessigsäure-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, Mg = mit 5 proz. Lösung von Mg(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 löschender Fleck.

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

† = schwach gelbliche, aber nicht meßbare Fluoreszenz.

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

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

|| = dunkler, die Eigenfluoreszenz der Schicht löschender 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 Phloroglucinoxymuster 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 Phloroglucinoxymuster im Ring A berücksichtigt, so ergibt sich folgendes Bild:

(1) Verbindungen, die keine freien OH-Gruppen in 5- und 3-Stellung besitzen (**28–43**) fluorescieren, unbehandelt oder mit EDTA besprüht, 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**) fluorescieren unbehandelt oder mit EDTA besprüht recht stark bei 495–540 nm. Mit NA behandelt fluorescieren 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 Na₂CO₃ 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**) fluorescieren unbehandelt oder mit EDTA besprüht nicht. Nach dem Besprühen mit NA fluorescieren 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 Na₂CO₃ fluorescieren alle Verbindungen mit freiem OH-4' mehr oder weniger stark bei 485–530 nm; die Verbindungen ohne freies OH-4' fluorescieren entweder nicht oder schwach. Eindeutiger ist hier die visuelle Betrachtung in NH₃-Atmosphäre; hierbei fluorescieren alle Verbindungen mit freiem OH-4' und alle Verbindungen ohne freies OH-4' fluorescieren nicht (vgl. hierzu auch [2 und 6]). Nach dem Besprühen mit Magnesiumacetat fluorescieren 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 besprüht fluorescieren 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 Na₂CO₃ 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 Na₂CO₃ 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 Absorptionsspektren. 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. fluoreszieren 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 Verschiebungsreagentien 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 Fluoreszenz 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. Spiegl, 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. Quim.* **7**, 83.
12. Hezel, U. (1973) *Angew. Chem.* **85**, 334.