

## Verbreitung von Phenolcarbonsäuren und Flavonoiden bei Vitaceen<sup>1)</sup>

von

O. BACHMANN

### Distribution of phenolic acids and flavonoides in Vitaceae

**Summary.** — Phenolic compounds of 90 varieties of Vitaceae were analyzed. The main constituents are flavonol-O-glycosides, predominantly quercetin-3-glycoside and the analogous constituents kaempferol- and myricetin-glycoside. The corresponding glucuronides of quercetin and kaempferol were sometimes present, but myricetin-glucuronides could not be found.

Derivatives of cinnamic acid are contained as depsides, monocaffeoyl tartrate being the main compound. Derivatives of benzoic acid were found only at certain times.

In the genus *Ampelopsis* the distribution of the phenolics allows a chemical characterization. An inhibition of fungal parasites of the vine with biological concentrations of the phenolics analyzed could not be attained.

### Einleitung

Bei der Parasitenresistenz von Pflanzen spielen phenolische Verbindungen eine bedeutende Rolle (WHEELER 1975). Auch bei Rebsorten wurde hin und wieder versucht, deren unterschiedliche Resistenz auf Differenzen im Phenolgehalt zurückzuführen (RUBÉREAU-GAYON 1968, SINGLETON und ESAU 1969). Eindeutige Beziehungen zwischen biologischen Wirkungen und identifizierten Substanzen konnten allerdings nie aufgezeigt werden, da zumeist die eindeutige Identifizierung der Substanzen Schwierigkeiten bereitete (YAP und REICHARDT 1964). Diese wurde erst durch moderne Methoden möglich, welche in der vorliegenden Arbeit bei 90 Arten und Sorten der Vitaceen — zunächst an Flavonoiden und Phenolcarbonsäuren — angewandt wurden.

### Material und Methoden

#### I. Untersuchungsmaterial

##### 1. Probenahme

Das Ausgangsmaterial für diese Untersuchungen wurde der ampelographischen Sammlung der BFA für Rebenzüchtung in Siebeldingen entnommen. In den Jahren 1974 und 1975 wurden zu verschiedenen Terminen, jeweils vormittags, 2—3 Blätter gleicher Insertionshöhe (3.—5. Blatt, von basal aus gezählt) gesammelt und die Blätter halbiert. Eine Hälfte wurde als Kontrolle bei —40 °C eingefroren.

<sup>1)</sup> Teil einer Dissertation, Universität Karlsruhe 1978.

## 2. Herstellung der Pflanzenextrakte für analytische Zwecke

Eine Blatthälfte (Frischgewicht von 3–5 g) wird mit ca. 50 ml abs. Methanol — hierdurch werden die enzymatischen Aktivitäten unterbrochen — im Ultra-Turrax (Janke & Kunkel) zerschlagen. Die methanollöslichen Bestandteile werden 1 h im Wasserbad bei 60 °C extrahiert, und der dünnflüssige Pflanzenbrei wird über eine G II-Fritte abgesaugt. Der Filtrerrückstand wird so lange mit Methanol gewaschen, bis das Filtrat farblos abläuft. Hierzu sind ca. 100 ml Methanol für 5 g frisches Blattmaterial notwendig. Die vereinigten Filtrate werden am Rotavapor (BÜCHI) getrocknet; der grüne schmierige Rückstand wird gewogen und in Methanol aufgenommen (1 g/ml). Die trübe gelbgrüne Lösung wird anschließend über Glaswattefilter in kleine Schraubdeckelflaschen filtriert. Sie verändert sich auch nach längerem Lagern bei –5 °C nicht. Bei manchen Proben fielen nach 2jähriger Lagerung schmutzig weißgraue Kristalle aus. Dem Kristallhabitus nach handelte es sich um Weinstein.

## 3. Gewinnung von Pflanzenphenolen zu präparativen Zwecken

In 3 l kochendes H<sub>2</sub>O werden langsam 300 g Rebenblätter eingebracht. Enzymatische Aktivitäten werden dadurch sofort blockiert. Mit einem Ultra-Turrax wird die Blattmasse zerschlagen, nach Zusatz von 3 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> nochmals kurz aufgekocht, über ein Leinentuch abgesaugt, und das Filtrat möglichst noch heiß 30 min bei 15 · 10<sup>3</sup> Upm zentrifugiert. Der fast blanke Überstand, der alle H<sub>2</sub>O-löslichen Inhaltsstoffe enthält, wird am Rotavapor bei 40 °C zu einem Sirup eingengt. Diesen (ca. 300 g) läßt man unter starkem Rühren in 50 °C heißes Methanol eintropfen, anschließend wird auf –5 °C gekühlt. Über Nacht fällt ein grauer, teilweise kristalliner Schlamm aus, der abgesaugt wird. Das Filtrat ist dann weitgehend eiweißfrei und enthält kein Chlorophyll oder andere lipophile Stoffe. Die Methanollösung wird nochmals eingedampft, mit der 10fachen Menge heißen Methanols aufgenommen und nach ausreichender Kühlung von der zweiten Fällung abgetrennt. Hierbei wird ein großer Teil der organischen Säuren als saure Salze abgetrennt. Versetzt man den eingedampften Methanolauszug jetzt in der Hitze mit H<sub>2</sub>O, so erhält man zu bestimmten Jahreszeiten eine erste rohe Fällung von Flavonoiden, die nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser/Methanol-Mischungen fast frei von Phenolcarbonsäuren ist. Das hier geschilderte Verfahren bietet gegenüber der Extraktion mit reinem Methanol oder Äthanol den Vorteil, daß lipophile Pflanzeninhaltsstoffe nicht anschließend mit Petroläther entfernt werden müssen. Die Phenolausbeuten sind so meist besser als mit rein organischen Lösungsmitteln. Will man eine quantitative Extraktion mit H<sub>2</sub>O erreichen, so ist es notwendig, den Pflanzenbrei mehrfach auszukochen.

Mit der von HERRMANN (1966) vorgeschlagenen Acetonfällung ist es weiterhin möglich, hochmolekulare Gerbstoffe abzuscheiden. Die so gewonnenen Rohflavonoide dienen zur präparativen Chromatographie an PVPP bzw. Amberlite XAD-2.

## II. Analysenmethoden

### 1. Analytische Chromatographie

#### a) DC an Kieselgel

Dieses Verfahren wurde nach den bei STAHL (1967) beschriebenen Methoden durchgeführt, fand jedoch nur bei der Trennung radioaktiver Metaboliten Verwendung.

Zur Trennung der Biosynthesewenigprodukte von Phenolcarbonsäuren erfolgt eine zweidimensionale Trennung an Merck Fertigplatten Nr. 5717. Laufmittel: 1. Benzol/Dioxan/Eisessig (90/25/4). 2. Tetrachlorkohlenstoff/Heptan/Essigester (81/16/8). Zur Ermittlung der günstigsten Aktivitätsmenge wird die aufgetragene Probe mit Hilfe einer Beta-Kamera (Birchover Instruments Ltd.) fotografiert. Bei 15 min Belichtung des Polaroidfilmes muß der Startfleck ausreichend sichtbar sein. Nach der ersten Entwicklung des Chromatogramms wird eine weitere Polaroidaufnahme hergestellt. Der Nachweis radioaktiver Flecken in der zweiten Dimension erfolgt besser mit Hilfe eines Röntgenfilms (Agfa-Gevaert RP-1), dessen höhere Empfindlichkeit und besseres Auflösungsvermögen allerdings durch eine lange Expositionsdauer erkauft werden müssen.

#### b) DC an Mikropolyamid

Die Trennung von Phenolcarbonsäuren erfolgte nach RAPP und ZIEGLER (1973), die der Flavonolglycoside nach EGGER und KEIL (1965).

Polyamid bietet allgemein den Vorteil einer guten Haftfestigkeit an der Platte; günstige Korngrößenbereiche sind leicht erhältlich. Als hochmolekularer Kunststoff ist es in nahezu allen Lösungsmitteln unlöslich, jedoch gut quellfähig. Die stationäre Phase des gequollenen Polyamids hat bei hohen Phenolkonzentrationen noch einen konstanten Verteilungskoeffizienten, und zwar, bis 1/3 der Peptidbindungen abgesättigt sind. Die Kapazität ist hierdurch sehr hoch. Besonders bei präparativen Trennungen in Säulen macht sich der Effekt günstig bemerkbar. Nachteilig ist die irreversible Bindung von Chinonen, die sich durch Acetylieren des Polyamids vermeiden läßt.

Die Besonderheit des Mikropolyamids liegt in der geringen Schichtdicke, verbunden mit einer größeren Homogenität. Da die 5- bis 10fache Empfindlichkeit gegenüber normalen handgefertigten Platten erreicht wird, spielt das kleine Probenvolumen (0,1—0,5  $\mu$ l) keine entscheidende Rolle, jedoch ist die genaue Dosierung entsprechend kritisch. Die feuchte Schicht ist gegen mechanische Verletzungen sehr empfindlich, eine Zwischentrocknung ist beim Aufbringen verdünnter Lösungen nicht möglich. Die Laufzeit der Viertelplatten (75  $\times$  75 mm) beträgt je nach Fließmittel 15—40 min.

Die Trennung in hydrophilen Fließmitteln basiert im wesentlichen auf den unterschiedlichen Zuckersubstituenten der Flavone, sie ist besonders als erste Dimension einer zweistufigen Trennung geeignet. Als günstiges Laufmittel hat sich hierfür Wasser/Äthanol/Methyläthylketon/Acetylaceton (65/15/15/5) bewährt. Die Aglukone verbleiben unter diesen Bedingungen zusammen mit den Glucuroniden am Start. Sie werden in der zweiten Dimension mit mehr oder weniger lipophilen Mischungen getrennt. Auch hier wird die Adsorption am Polyamid durch Verteilungsvorgänge überlagert. Bei unpolaren lipophilen Fließmitteln ist das Polyamid eine quasi-stationäre polare Phase. Eine Gruppenbildung gleichartig glykosidierter Verbindungen tritt nicht mehr auf, da die Verschiedenartigkeit der Aglukone entscheidend ist. Als bestes Fließmittel erwies sich die Mischung Benzol/Methyläthylketon/Methanol (50/25/30). Die Fleckenform der Glykoside wird verbessert, wenn dem Fließmittel Wasser bis zur Sättigung zugesetzt wird. Das Fließmittel wird dann aber sehr empfindlich gegen Temperaturschwankungen.

#### c) Nachweis der Flavonoide auf der DC-Platte

Der empfindlichste Nachweis, die Diazotierung von Phenolen, ist bei den Flavonolen unbrauchbar, da nur schwach differenzierte Färbungen entstehen. Mit dem

Phosphormolybdänsäurereagenz erhält man aus phenolischen und anderen Verbindungen blaue Flecke auf gelbem Grund. Das Mikropolyamid ist für diese Reaktion jedoch wenig geeignet. Eisen-III-Salze geben ebenfalls unspezifische blaue bis grüne Färbungen. Andere chelatbildende Metallsalze wie Aluminiumchlorid oder Zirkonoxychlorid und Bleiacetat geben mit Flavonverbindungen gelb bis orange gefärbte Flecken, die besonders im langwelligen UV-Licht eine intensive Fluoreszenz zeigen. Diphenylborsäure- $\beta$ -Aminoäthylester (NEU 1957) ergibt in 0,1%iger Lösung in Methanol das differenzierteste Farbmuster, besonders, mit Polyamidunterlage. Auf Kieselgel wird bei geringer Farbdifferenzierung nur eine mäßige Empfindlichkeit erreicht.

Die erhaltenen Farbtöne sind bei Kämpferol gelbgrün, bei Quercetin gelb (gelb-orange), bei Myricetin orange (orangerot). Für diese Farbvertiefung ist der Substitutionsort der Hydroxylgruppe im Benz- $\gamma$ -Pyron-Ring und im Seitenphenylring entscheidend (NEU 1957). Phenolcarbonsäuren ergeben helle blaue Farbtöne, die keine allgemeingültigen Aussagen zur Konstitution zulassen. Abkömmlinge der Chlorogensäure-Familie fluoreszieren weißblau. Bei Lagerung in der Dunkelheit sind die Färbungen über längere Zeit haltbar. Bei der Betrachtung der Platten ist es jedoch wichtig, die UV-Bestrahlung so kurz wie nur möglich zu halten.

#### d) Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Für die HPLC-Untersuchungen standen zwei Geräte zur Verfügung (Siemens S 200 und Du Pont 840), die mit verschiedenen Pumpsystemen arbeiten. Die Säule hat bei beiden Systemen den gleichen Durchmesser von 3 mm und Längen von 20 bis 50 cm. Bei der Apparatur von Siemens wurden vorwiegend Tantalsäulen eingesetzt, da bei diesem Material katalytische Wandeffekte ausgeschlossen sein sollen. Mit einfachen Edelstahlsäulen konnten jedoch die gleichen Ergebnisse erzielt werden. Wegen katalytischer Einflüsse bei empfindlichen Substanzen wurde gelegentlich auf Glas übergegangen. Die Du-Pont-Säule wurde mit einem Glasmantel versehen, der es erlaubte, die Säule zu thermostatisieren. Das Säulensystem von Siemens wurde am Säulenausgang durch Einpassen einer 5  $\mu$ m Edelstahlfritte gegen das Filterpapierplättchen und die Quarzwolle ausgetauscht.

Die Füllung der Säulen geschah nach der „balanced density slurry method“, d. h. die stationäre Phase wird in einem Medium gleicher Dichte in die Säule filtriert. Unterschiedlich große Partikel können so nicht nach ihrer Größe fraktioniert sedimentieren, sondern man erhält eine homogene Packung. Als stationäre Phase wurden Kieselgel, Polyamid und Ionenaustauscher in ihrer Eignung für die HPLC erprobt.

Zu Beginn der Untersuchungen waren keine geeigneten Polyamid-Füllmaterialien auf dem Markt erhältlich. Aus diesem Grunde mußten sie aus Polyvinylpyrrolidon(PVPP)-Präparaten gewonnen werden, die zur Weinschönung Verwendung finden: In Wasser vorgequollenes PVPP von 40–50  $\mu$ m Partikelgröße wird mit Wasser naß gesiebt, so daß alle Feinanteile entfernt werden. Man erhält eine Fraktion, die zu ca. 80 % aus 40–50  $\mu$ m großen Teilchen besteht. Die 40- $\mu$ m-Partikel lassen sich auch nach tagelangem Schlämmen mit H<sub>2</sub>O nicht entfernen. Die Ausbeute aus 1 kg Material beträgt ca. 2–5 g. Die Teilchen werden unter destilliertem H<sub>2</sub>O aufbewahrt und nach der balanced-density-slurry-Methode in die Du Pont 50-cm-Säule gefüllt. Als Säulenabschlüsse dienen Teflonfritten mit 20  $\mu$ m Porenweite, die man mit einem 3-mm-Korkbohrer leicht ausstanzen kann. Bis 100 atü sind diese Fritten stabil. Mit PVPP sollte der Säulendruck 80 atü nicht übersteigen, da sonst

die Partikel verformt und die Säulenfüllung irreversibel verdichtet werden, so daß kein Fließmittel mehr hindurchgeht.

Zuckermischungen aus der Hydrolyse von Flavonolglycosiden lassen sich an Kationenaustauschern auf Polystyrolbasis gut auftrennen. PALMER und BRANDES (1974) haben erstmals ein System für die HPLC beschrieben und zur Trennung von ionenfreien Zuckerlösungen eingesetzt. Das in der Aminosäureanalytik so bewährte Harz Aminex A 7 erwies sich jedoch nach unseren Beobachtungen als besser, weil es das kritische Zuckerpaar Glucose/Fruktose besser trennt. Außerdem zeigte es sich, daß Äthanol mit anderen Alkoholen die größte Retention an diesem Harz gibt.

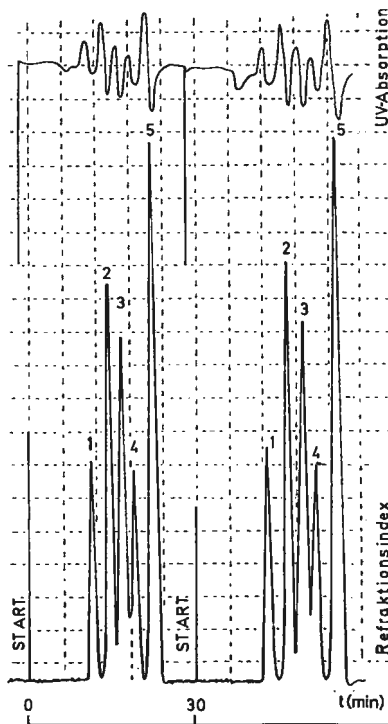


Abb. 1: HPLC-Trennung der wichtigsten Weinhaltstoffe. Simultane Registrierung der Refraktionsänderung und der UV-Absorption. 1 = Saccharose, 2 = Glucose, 3 = Fructose, 4 = Glycerin, 5 = Äthanol.

Fig. 1: Separation by high pressure liquid chromatography of the main constituents of wine. 1 = sucrose, 2 = glucose, 3 = fructose, 4 = glycerol, 5 = ethanol.

Der Nachweis der aufgetrennten Zucker erfolgt mit Hilfe eines Differentialrefraktometers. (Hierbei wird die Änderung des Brechungsindex gegenüber dem reinen Fließmittel gemessen und über einen Schreiber registriert.) Bei Verwendung eines Photometers lassen sich die durchtretenden Zucker — allerdings mit wesentlich geringerer Empfindlichkeit — infolge eines Dispersionseffektes nachweisen. Wenn eine UV-Absorption von einer stark lichtbrechenden Substanz hervorgerufen wird, ist diese Art Absorption mit einem Vorzeichenwechsel verbunden (Abb. 1). In diesem Falle wird der Meßwert fehlerhaft und stellt die der Absorptionsmessung zugeschriebene hohe Spezifität in Frage.

## 2. Präparative Chromatographie an PVPP

Das für die Weinschönung geeignete PVPP wird durch Sieben in einzelne Fraktionen zerlegt, die zusätzlich mit  $H_2O$  auf den Sieben geschlämmt werden. Staubb-

partikel werden auf diese Weise entfernt, so daß die spätere Säulenfüllung einwandfreie Fließeigenschaften zeigt. Eine Partikelgröße von 80—100 mesh bei Säulen von 4 cm  $\varnothing$  und einer Länge von 40—60 cm ermöglicht mit hydrostatischem Überdruck einen vernünftigen Durchfluß. Die Elution wenig polarer Komponenten erfolgt durch einen  $H_2O$ /Methanol-Gradienten; stark polare Komponenten können entweder durch Salzbildung oder durch Zusatz von Ameisensäure eluiert werden. Da die Oxidationsempfindlichkeit die erste Methode ausschließt, wurde der zweite Weg beschritten, bei dem allerdings empfindliche Glycoside ihren Zucker verlieren. Die hydrolyseempfindlichsten Glycoside wie Rutin etc. haben zu diesem Zeitpunkt schon die Säule verlassen. Beim Eindampfen der Fraktionen kommt es entsprechend der unterschiedlichen Flüchtigkeit des Lösungsmittels zu einer Anreicherung der Ameisensäure. Glucuronide des Quercetins und Kämpferols erweisen sich zum Glück als recht säurestabil, doch läßt es sich nicht vermeiden, daß die glucuronidreiche Fraktion auch beträchtliche Mengen Aglukon enthält. Dies gibt vielleicht auch eine Erklärung, warum es nicht gelang, die Glucuronide zu kristallisieren. Durch andere Autoren ist ebenfalls bekannt, wie schwierig es ist, Flavonglucuronide zur Kristallisation zu bringen.

### 3. Photometrische Bestimmungen

#### a) Flavonoide

Ortho-Dihydroxyphenole bilden mit Aluminiumsalzen gelb gefärbte Komplexe, die sich photometrisch (420 nm) leicht bestimmen lassen. Vorversuche hatten ergeben, daß es sich bei den phenolischen Verbindungen der Rebe vorwiegend um Flavonolglycoside des Quercetins, Kämpferols und Myricetins handelte (EGGER *et al.* 1976). Da die Quercetinglycoside schätzungsweise mehr als 80 % ausmachen, daneben Kämpferol und noch weniger Myricetinglycoside vorkommen, darf man annehmen, daß bei einer solchen colorimetrischen Bestimmung der ortho-Diphenole die Färbung vorwiegend von den Quercetinderivaten stammt.

Ausgehend von der Arbeit von WAGENBRETH (1963) wurde die auf DECHENE (1951) zurückgehende Vorschrift zur Gesamtflavonolbestimmung ausprobiert. In einer Lösung aus 1 M Kaliumacetat und 0,1 M  $AlCl_3$  in Methanol unter Zusatz von  $H_2O$  und Probe soll innerhalb 15—30 min der Aluminiumkomplex erhalten werden. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen war die Extinktion jedoch nach 60 min noch nicht stabil. Die Ursache hierfür ist der Wassergehalt des Reaktionsmediums. Es wurde deshalb auf rein methanolische Lösung übergegangen, bei der binnen 60 min eine stabile Extinktion erhalten wurde. Das Kaliumacetat kann unmittelbar im Methanol gelöst werden.

Mit Quercetin-7-glucosid (Quercitrin), einem nativen Rebflavonol untergeordneter Bedeutung, wird eine Eichkurve aufgestellt; die ermittelten Extinktionswerte werden als Quercitrin berechnet. Diese Größe kann lediglich als Anhaltswert gelten, da es sehr viele interferierende Substanzen gibt. Die Bestimmung wird jeweils mit 5 ml Blindlösung (0,1 M K-Acetat in  $CH_3OH$  + 10  $\mu l$  Probe gegen 5 ml Reaktionslösung (0,1 M K-Acetat; 0,1 M  $AlCl_3$  in  $Cl_3OH$ ) + 10  $\mu l$  Probe durchgeführt. Nach 60 min wird bei 420 nm die Extinktion der Reaktionslösung gegen die Blindlösung bestimmt.

#### b) UV-Spektroskopie

Hierfür stand ein selbstregistrierendes Spektralphotometer, Modell DB von Beckman, zur Verfügung. Für die Identifizierung von UV-Spektren der Flavonoide wurde auf das Werk von MABRY *et al.* (1970) zurückgegriffen. Dort sind von nahezu

allen bis 1970 beschriebenen Flavonoiden UV- und NMR-Spektren abgebildet. Wenn irgend möglich, werden die Spektren in reinem Methanol, z. B. Uvasol Merck, mit 50 nm/min registriert. Der Zusatz z. B. von Na-Methylat bzw.  $\text{AlCl}_3$  oder Na-Acetat, in Methanol gelöst, bewirkt bei vielen Substanzen eine Verschiebung der Maxima von Absorptionsspektren in eine bestimmte Richtung, je nachdem, ob eine Salzbildung beim Methylatzusatz oder eine Chelatbildung mit  $\text{AlCl}_3$  bei ortho-di-Hydroxygruppen stattfindet. Dies läßt Schlüsse über die Stellung von freien OH-Gruppen am aromatischen Ring zu. Bei Na-Acetat ist zu beachten, daß eine Verunreinigung mit freier Essigsäure vermieden wird. Zu diesem Zweck muß das Acetat in einem Tiegel geschmolzen und sofort in Methanol gelöst werden.

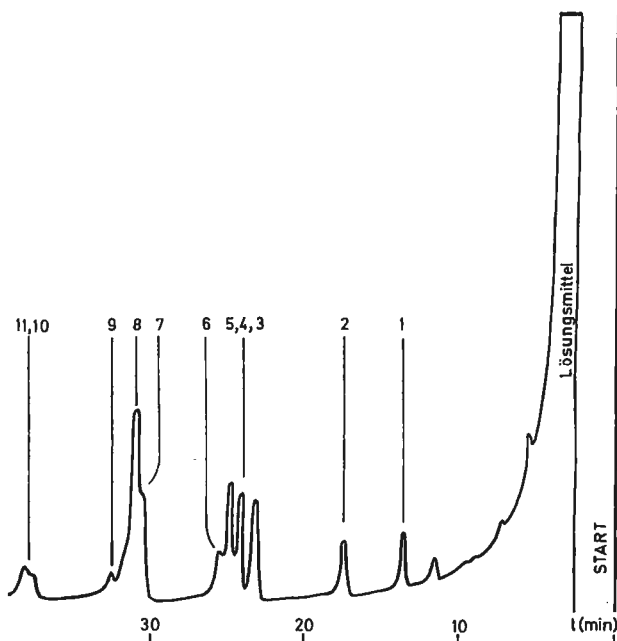


Abb. 2: Phenolcarbonsäuren aus Reben; GC von Silylthern. 1 = Salicylsäure, 2 = p-Hydroxybenzoesäure, 3 = Gentisinsäure, 4 = Vanillinsäure, 5 = Protocatechusäure, 6 = p-Cumarsäure, 7 = Gallussäure, 8 = Ferula- und p-Cumarsäure, 9 = Kaffeesäure, 10 = Ferulasäure, 11 = Kaffeesäure.

Fig. 2: Phenolic acids of Vitaceae. Gas chromatogram of silylethers. 1 = salicylic acid, 2 = p-hydroxybenzoic acid, 3 = gentisic acid, 4 = vanillic acid, 5 = protocatechuic acid, 6 = p-cumaric acid, 7 = gallic acid, 8 = ferulic and p-cumaric acid, 9 = caffeic acid, 10 = ferulic acid, 11 = caffeic acid.

#### 4. Hydrolyse von Flavonglycosiden

##### a) Spaltung mit HCl

Das Glycosid wird in einem verschraubbaren Reagenzglas mit einer Mischung von 2 n HCl/Äthanol (1/1) 2 h im Wasserbad bei 100 °C behandelt und das Aglukon nach Abschluß der Hydrolyse mit Hilfe von PVPP aus der stark salzsauren Lösung entfernt. Der Lösungsvermittler Äthanol sollte hierbei abwesend sein. Mit Hilfe der HPLC nach RAPP *et al.* (1975) wird das Monosaccharid bestimmt. Zur Ermittlung der

Reaktionskinetik werden in regelmäßigen Abständen, der Geschwindigkeit des Analysensystems entsprechend, 5  $\mu$ l entnommen und mit Hilfe der HPLC an einer 30 cm langen XAD-2-Säule mit Wasser/Methanol (7/3) aufgetrennt. Die Halbwertszeit des eingesetzten Glycosides wurde mit wenigstens 5 Punkten ermittelt.

#### b) Enzymatische Spaltungen

Dazu fanden Präparate der Firma Serva (22859,  $\beta$ -Glucuronidase 3.2.1.31 aus Rinderleber; 22830,  $\beta$ -Glucosidase 3.2.1.21 reinst aus Mandeln, 4,5 EU/mg) Verwendung. Die Flavone werden in einer Mischung aus 0,1 ml Enzymlösung (0,1 %, wässrig) 0,1 ml Acetatpuffer (1 M, pH 5,0) und 0,1 ml Flavonlösung (möglichst in Wasser) bei 36 °C 2 h inkubiert.

#### 5. Gaschromatographie von Silyläthern

Zur Silylierung von hydroxyltragenden Verbindungen wird die in Methanol gelöste Probe zunächst in einem 5-ml-Probefläschchen im  $N_2$ -Strom von Lösungsmittel befreit, danach in einer Trockenpistole über  $P_2O_5$  bei 40 °C über Nacht getrocknet und bis zur Umsetzung in einem Exsikkator über  $P_2O_5$  gelagert. Das Silylierungs-Reagenz besteht in Anlehnung an SWEELEY *et al.* (1963) aus 19,5 ml Pyridin, 5,0 ml HMDS (Hexamethyldisilazan) und 0,5 ml TCMS (Trimethylchlorsilan). Das frisch im  $N_2$ -Strom destillierte Pyridin wird an  $Al_2O_3$  (basisch, Merck) getrocknet und in Ampullen eingeschmolzen. Die getrockneten Proben werden in 500  $\mu$ l des Silylierungs-Reagenzes aufgenommen und nach ca. 30 min gaschromatographisch untersucht. Bei dieser Reaktion ist es wichtig, daß alle verwendeten Lösungsmittel und Proben völlig wasserfrei sind. Die umgesetzten Proben sind in dicht verschlossenen Gläschen bei 4 °C ca. 1 Woche haltbar.

Das gaschromatographische System bestand aus einem Siemens-Gerät 350. Die ersten Versuche zur GC-Trennung fanden mit Metallsäulen statt. Diese sind jedoch völlig unzulänglich, da das Pyridin ein starkes Tailing zeigt und völlig unmotivierte „Geisterpeaks“ auftreten. Erst eine 3 m lange Glassäule, von 3 mm  $\phi$  mit 3 % OV-17 auf Chromosorb W/DMCS 80/100 mesh, brachte das gewünschte Ergebnis (Abb. 2). 0,5  $\mu$ l Probenlösung wurden aufgebracht und von 130–260 °C mit einer Heizleistung von 5 °C/min und 30 ml  $H_2$ /min als Trägergas getrennt. Die Detektion geschah mit einem Flammenionisations-Detektor.

### Ergebnisse

Aus 3 kg Blättern erhält man je nach Sorte zwischen 2 und 5 g Rohphenole. Die besten Ausbeuten werden bei der Sorte Sbl. 5-25-20 von Juni bis Juli erzielt. Aus kurz vor dem Blattfall geernteten Blättern läßt sich kein Rohkristallat mehr gewinnen.

Nach ihrem chemischen Aufbau und ihrer wahrscheinlichen Biogenese lassen sich Blattphenole in zwei große Gruppen einteilen, die sich weiter untergliedern lassen:

1. Einfache Phenolcarbonsäuren
  - a) Zimtsäure-Derivate
  - b) Benzoessäure-Derivate
2. Flavonoide Verbindungen
  - a) Flavonole
  - b) Anthocyanidine



Tabelle 1a  
 Einige Eigenschaften wichtiger Phenolcarbonsäuren aus Reben  
 Some properties of important phenolic acids in vines

|                            | Nr. nach<br>KARRER<br>(1958) | Fp. — °C     |              |               | UV-Spektrum                 |                      |
|----------------------------|------------------------------|--------------|--------------|---------------|-----------------------------|----------------------|
|                            |                              | Lit.         | aus<br>Reben | Misch-<br>Fp. | nach HEDIN<br>et al. (1967) | eigene<br>Werte      |
| Protokatechusäure          | 895                          | 195          | 194          | 194—<br>196   | 258<br>293                  | 256<br>292           |
| Salicylsäure               | 885                          | 155          | 154          |               | 235<br>302                  | 236<br>304           |
| p-Hydroxy-Benzoe-<br>säure | 889                          | 210—<br>212  | 208—<br>212  |               | 235<br>302                  | 236<br>304           |
| Gentisinsäure              | 889                          | 196—<br>200  | 194—<br>198  |               | 237<br>332                  | 235<br>330           |
| Gallussäure                | 903                          | 240<br>Zers. | 235<br>Zers. |               | 272                         | 270                  |
| Vanillinsäure              | 896                          | 196—<br>200  |              |               | 257<br>293                  | 255<br>290           |
| Syringasäure               | 909                          | 198—<br>206  | 196—<br>200  |               | 271                         | 270                  |
| p-Cumarsäure               | 951                          | 202—<br>210  | 204—<br>212  | 202—<br>210   | 233<br>274<br>311 sh        | 231<br>272<br>310 sh |
| Kaffeensäure               | 957                          | 195<br>Zers. | 190<br>Zers. |               | k.A.                        | 243<br>326           |
| Ferulasäure                | 959                          | 158—<br>160  |              |               | 237<br>288 sh<br>318        | 235<br>320           |
| Monokaffeoyltartrat        | n.a.                         |              |              |               | k.A.                        | 243<br>300<br>330    |
| Chlorogensäure             | 990                          |              |              |               | k.A.                        | 245<br>300<br>330    |

k.A. = keine Angabe, Lit. = Literaturwert, n.a. = nicht aufgeführt, sh = Schulter, Zers. = Zersetzung.

Unter Anthocyanidinen versteht man eine künstliche Gruppierung von Reaktionsprodukten aus der Säurebehandlung nicht hydrolysierbarer Gerbstoffe; sie sollen an anderer Stelle behandelt werden.

### I. Phenolcarbonsäuren

Die Phenolcarbonsäuren der Rebenblätter sind von RAPP und ZIEGLER (1973) ausführlich behandelt worden. Die dort gezeigten Ergebnisse werden bestätigt und für

Tabelle 1b  
 Einige Eigenschaften wichtiger Phenolcarbonsäuren aus Reben  
 Some properties of important phenolic acids in vines

|                            | FeCl <sub>3</sub> | Nitr.an.<br>Diazot. | DBr.-<br>ChCl. | Farbreaktionen    |  |                 |                         |                                      |
|----------------------------|-------------------|---------------------|----------------|-------------------|--|-----------------|-------------------------|--------------------------------------|
|                            |                   |                     |                | UV <sub>366</sub> | UV <sub>366</sub><br>+ NH <sub>3</sub> | N <sub>EU</sub> | N <sub>EU</sub><br>+ UV | N <sub>EU</sub><br>+ NH <sub>3</sub> |
| Protokatechusäure          | grün              | gelb                | grün-<br>gelb  | —                 | —                                      | —               | blau                    | —                                    |
| Salicylsäure               | rot-<br>viol.     | gelb                | blau           | blau              | blau                                   | —               | blau                    | —                                    |
| p-Hydroxy-Benzoe-<br>säure | grün              | rot-<br>viol.       | blau           | —                 | —                                      | —               | blau                    | —                                    |
| Gentisinsäure              | —                 | —                   | —              | blau              | blau-<br>grün                          | gelb            | —                       | gelb-<br>grün                        |
| Gallussäure                | blau              | —                   | gelb           | —                 | —                                      | —               | blau                    | —                                    |
| Vanillinsäure              | grün              | blau-<br>viol.      | blau           | —                 | —                                      | —               | —                       | —                                    |
| Syringasäure               | —                 | blau                | —              | —                 | —                                      | —               | —                       | blau                                 |
| p-Cumarsäure               | grün              | oliv-<br>grün       | blau           | —                 | blau-<br>viol.                         | —               | —                       | blau-<br>viol.                       |
| Kaffeesäure                | blau              | —                   | grün-<br>blau  | blau              | blau-<br>grün                          | grün-<br>gelb   | —                       | grün-<br>gelb                        |
| Ferulasäure                | blau              | oliv-<br>grün       | blau           | blau              | blau-<br>grün                          | gelb            | —                       | gelb-<br>grün                        |
| Monokaffeoyltartrat        | grün-<br>gelb     | —                   | grün           | blau              | blau-<br>grün                          | gelb-<br>grün   | —                       | blau-<br>grün                        |
| Chlorogensäure             | blau              | gelb                | grün           | blau              | grün                                   | gelb-<br>grün   | —                       | grün-<br>gelb                        |

Diazot. Nitr. an. = diazotiertes Nitroanilin, DBr.-ChCl. = Dibromchinonchlorimid.

einige Kaffeesäureverbindungen ergänzt. Da zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probennahme stark schwankende Phenolcarbonsäuregehalte beobachtet werden, sind bei den weiteren Beobachtungen nur die Kaffeesäure-Derivate berücksichtigt, die zu allen Sammelzeiten zu beobachten sind. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der aus Reben isolierten Phenolcarbonsäuren sind in Tabelle 1 zusammengefaßt und mit Literaturwerten verglichen. Nur auf das wenig bekannte Kaffeesäuredepsid der Weinsäure sei im folgenden näher eingegangen.

Monokaffeoyltartrat ist polarer als die anderen Kaffeesäuredepside und bleibt bei der DC auf Mikropolyamid in Startnähe. Sein UV-Spektrum wird im wesentlichen von den ortho-Dihydroxygruppen der Kaffeesäure bestimmt und ähnelt dem der Kaffeesäure und der Chlorogensäure. Der Kurvenverlauf im kurzwelligen Bereich ist charakteristisch (Abb. 3). Auch gaschromatographisch konnte das Vorliegen der Kaffeesäure bestätigt werden (Abb. 4). Mit den hier angewandten Methoden läßt sich nicht schlüssig beweisen, daß tatsächlich die Monokaffeoylverbindung vor-

liegt; indessen ist es sehr unwahrscheinlich, daß es sich um die entsprechende zweifach substituierte Verbindung (Rosmarinsäure) handelt, da diese Substanz auf Labia-ten und Compositen beschränkt zu sein scheint.

Die durch Ringschluß aus ortho-Hydroxy-Zimtsäuren entstehenden Lactone (die Cumarine) wurden bei den Reben bislang nicht nachgewiesen. Zimtsäuren und Benzoessäuren liegen in Form zweier in ihrem Substitutionsmuster weitgehend übereinstimmender Serien vor. In der Reihe der Zimtsäuren fehlt die der Gallussäure analoge Verbindung, die aus Pflanzen jedoch anscheinend überhaupt noch nicht isoliert worden ist. Die der Salicylsäure analoge ortho-Cumarsäure ließ sich lediglich bei der Rebe nicht nachweisen, während andere Pflanzenarten dieses Paar sehr wohl enthalten können. Die 2,4-Dihydroxy-Verbindung in der Benzoessäure-Serie hat in der Zimtsäure-Reihe ebenfalls keine Entsprechung. Aus dem chemischen Aufbau der Verbindungen erhält man zwar einen Hinweis auf biogenetische Zusammenhänge, kann aber nicht die Oxidation der Zimtsäuren allgemein beweisen.

## II. Flavonolglycoside

Die Flavonoide sind  $C_6-C_3-C_6$ -Körper mit zwei oder drei aromatischen Systemen, die in ihrem B-Kern zum Teil ebenfalls die Substitutionsmuster der Zimtsäuren repräsentieren. Es scheint also bei allen bisher aufgezeigten Verbindungsklassen gleichartige Substitutionsreaktionen zu geben. In Tabelle 2 sind einige spektroskopische Daten der analysierten Verbindungen aufgeführt.

### 1. Quercetin-3-glucuronid (Quercituron)

Von den Flavonolen stehen in bezug auf Menge und Verbreitung die Quercetin-glycoside eindeutig im Vordergrund. Das Quercetin-3-glucuronid ist die Hauptkomponente, wie schon RIBÉREAU-GAYON (1968) für die Beerenhaut-Flavonolglycoside zeigen konnte. Diese Verbindung ist von EGGER *et al.* (1976) für das Rebenblatt nachgewiesen worden.

Bei der präparativen Aufarbeitung wurde eine Fraktion erhalten, die auf Grund der DC-Analyse an Mikropolyamid ausschließlich aus Quercetin-3-Glucuronid und Kämpferol-3-Glucuronid bestand. Versuche, diese mit 30 %iger Schwefelsäure umzukristallisieren, lieferten immer wieder durch Aglukon verunreinigte Präparate.

Tabelle 2  
UV-Absorptionsmaxima einiger Rebphenole  
Spectral maxima of some phenolics in vines

|                            | Nach MABRY <i>et al.</i> (1970) | Eigene Werte          |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Kämpferol                  | 353 sh, 266, 294 sh, 322, 367   | 265, 295 sh, 325, 370 |
| Kämpferol-3-glucosid       | k. A.                           | 266, 325, 365         |
| Kämpferol-3-rhamnoglucosid | k. A.                           | 260, 360              |
| Kämpferol-3-glucuronyl     | k. A.                           | 258, 360              |
| Quercetin                  | 255, 269 sh, 301 sh, 370        | 255, 300 sh, 272      |
| Quercetin-3-glucosid       | k. A.                           | 288, 360              |
| Quercetin-3-rhamnoglucosid | 259, 266 sh, 299 sh, 359        | 260, 300 sh, 360      |
| Quercetin-3-glucuronid     | k. A.                           | 255, 362              |
| Myricetin                  | 254, 272 sh, 301, 374           | 255, 273 sh, 375      |
| Myricetin-3-glucosid       | k. A.                           | 250, 374              |

k. A. = keine Angaben, sh = Schulter.

Abb. 3: UV-Spektren von Kaffeesäure (1), Chlorogensäure (2) und Monokaffeoyltartrat (3).

Fig. 3: UV-spectra of caffeic acid (1), chlorogenic acid (2) and monokaffeoyl tartrate (3).

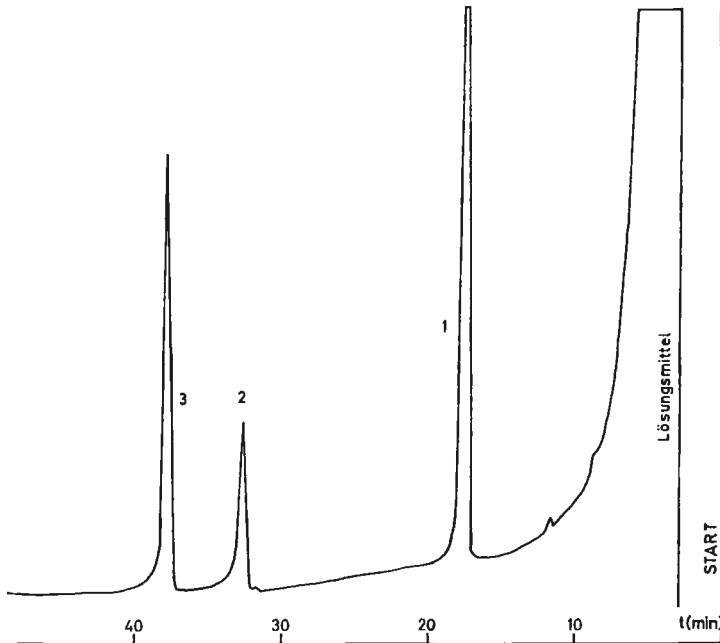
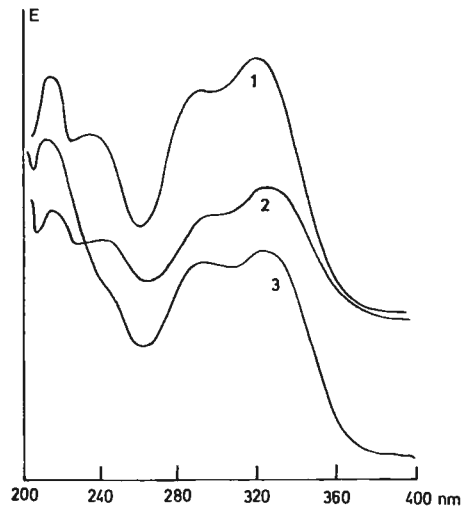


Abb. 4: Gaschromatographische Trennung des Hydrolysates von Kaffeyltartrat (cis- und trans-Isomere von Silyläthern). 1 = Weinsäure, 2 und 3 = Kaffeesäuren.

Fig. 4: Separation of the hydrolysate of caffeoyl tartrate by gas chromatography (cis- and trans isomers of silyl ethers). 1 = tartaric acid, 2 and 3 = caffeic acids.

Diese Fraktion, welche in der DC die Glucuronidflecken lieferte, wurde für die enzymatischen und salzsauren Hydrolysen verwendet. Als Strukturbeweise sind die folgenden Eigenschaften zu werten:

1. die Stabilität gegenüber Säuren,
2. das Verhalten gegenüber spezifischen Hydrolasen,
3. die UV-spektroskopischen Daten, die mit den von RIBÉREAU-GAYON (1968) veröffentlichten übereinstimmen (Abb. 5).

## 2. Quercetin-3-rhamnosid

Ordnet man die Flavonolglycoside in dem chromatographischen System nach EGGER und KEIL (1965) auf der Polyamidplatte an, dann folgt mit steigendem  $R_f$ -Wert auf das 3-Glucuronid das 3-Rhamnosid (Abb. 6). Dieses ist eine weitverbreitete Verbindung, die von allen Untersuchern beobachtet wurde. Die salzsaure Hydrolyse lieferte außer dem Aglukon Quercetin ein Monosaccharid, welches sich mit der HPLC als Rhamnose identifizieren ließ. Der niedrige  $R_f$ -Wert schließt ein Diglucosid aus, zumal Diglucoside aus Rhamnose bisher nicht bekannt wurden. Die Rhamnosidstufe wird auf dem Mikropolyamid nicht ganz so ideal von der 2-Glucosidstufe abgetrennt, wie von EGGER und KEIL (1965) beschrieben. Die Flecken lassen sich auf dem Mikropolyamid als angetrennte Doppelflecke erkennen, die sich mit Farbrea-gentien leider nicht farblich differenzieren lassen.

Das Quercetin-3-rhamnosid wurde außerdem mit  $\beta$ -Glucosidase (3.2.1.21) und Glucuronidase (3.2.1.31) 24 h behandelt; beides blieb völlig wirkungslos.

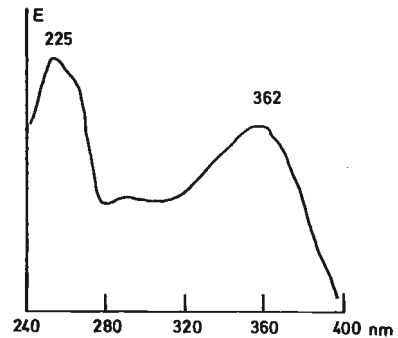


Abb. 5: UV-Spektrum von Quercetin-3-glucuronid aus Reben in Methanol.

Fig. 5: UV-spectrum of a methanolic solution of quercetin-3-glucuronide of Vitaceae.

## 3. Quercetin-3-glucosid (Isoquercitrin)

Dieses wird durch HCl so schnell hydrolysiert, daß eine Untersuchung der Hydrolysekinetik nicht möglich ist. Die HPLC-Analyse dauert ca. 10 min. In der zweiten Analysenprobe läßt sich schon kein Glycosid mehr nachweisen.

Quercetin-3-glucosid wird von  $\beta$ -Glucosidase (3.2.1.21) innerhalb einer Stunde vollständig gespalten.

## 4. Quercetin-3-rhamnoglucosid (Rutin)

Die Rhamnoglucosidstufe ist in Pflanzen wahrscheinlich das am häufigsten nachgewiesene Flavonolglycosid, bei den Reblatflavonolglycosiden jedoch nicht immer nachweisbar. Hierfür gibt es zwei Erklärungen: Entweder kommt die Substanz wirklich nicht vor. Oder es kommt infolge der Säurelabilität bei der Aufarbeitung durch die pflanzeigenen Säuren zur hydrolytischen Spaltung. Da vorzugsweise Rhamnose abgespalten wird, entsteht das bereits beschriebene Quercetin-3-

glucosid. Das Fehlen des Rutins ist also nur bei Abwesenheit von Quercetin-3-glucosid zu beweisen.

### 5. Kämpferol-Glycoside

In biogenetischer Hinsicht stehen die Kämpferol-Glycoside als im B-Ring mono-hydroxylierte Verbindungen vor den ortho-Dihydroxy-Derivaten des Quercetins. Sie sind quantitativ jedoch von untergeordneter Bedeutung, so daß die isolierten Mengen für eine Zuckeranalyse nicht ausreichend waren und nur UV-spektroskopische Daten ermittelt werden konnten.

Von den Kämpferol-Derivaten kommt bei vielen Rebenarten die Diglucosidstufe vor, die dem Rutin entspricht. Mit Neus Reagenz (1957) läßt sich unter dem langwelligen UV die grünliche Färbung des Flecks sehr gut beobachten.

Kämpferol-3-glucuronid konnte nicht von dem strukturanalogen Quercetin-Derivat getrennt werden, dessen UV-Spektrum aus diesem Grund nicht ganz mit

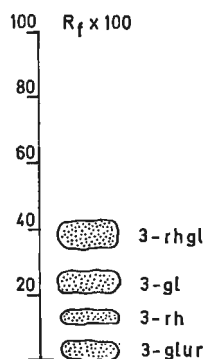


Abb. 6: DC-Chromatogramm von Rebenflavonoiden auf Mikropolyamid-Laufmittel: Wasser/Äthanol/Methyläthylketon/Acetylaceton (65/15/15/5). 3-rhgl = 3-Rhamnoglucosid, 3-gl = 3-Glucosid, 3-rh = 3-Rhamnosid, 3-glur = 3-Glucuronid.

Fig. 6: DC chromatogram of *Vitis* flavonoids on micropolyamide. Eluent: water/ethanol/methylethylketone/acetylacetone (65/15/15/5). 3-rhgl = 3-rhamnoglucoside, 3-gl = 3-glucoside, 3-rh = 3-rhamnoside, 3-glur = 3-glucuronide.

den Literaturwerten in Übereinstimmung zu bringen ist. Auf Papier lassen sich mit wassergesättigtem Phenol die beiden Substanzen zwar trennen, nicht aber mit Methanol wieder von dem Papier herunterlösen.

Als weiteres Glycosid, welches ein Analogon in der Quercetin-Reihe hat, konnte das Kämpferol-3-glucosid auf Grund seiner UV-spektroskopischen und Färbereigenschaften sicher erkannt werden.

### 6. Myricetin-Glycoside

Das am stärksten hydroxylierte System am B-Ring ist das Myricetin, welches glykosidiert als 3-Rhamnoglucosid vorliegt. Myricetin-Glycoside konnten in Reben nur selten nachgewiesen werden. Sie müssen jedoch weiter verbreitet sein; denn nach der Hydrolyse einiger Rebenblattextrakte findet sich Myricetin als Aglukon, während vorher kein Glycosid auffindbar war. Es lag demnach eine Überlagerung durch die stärker hervortretenden Quercetinverbindungen vor. Myricetin-Rhamnoglucosid dürfte vorkommen, da an der entsprechenden Stelle des Chromatogramms nach Zumischen von Myricetin-3-Rhamnoglucosid kein weiterer Fleck auftrat, sondern nur der vorhandene stärker sichtbar wurde. Die rötliche Färbung, die mit Neus Reagenz erhalten wird, ist gut sichtbar. Die unterschiedlich glykosidierten Myricetin-Glycoside müssen demnach als bislang ungeklärte Stoffgruppe der Rebenflavonolglycoside gelten.

## 7. Vorkommen freier Aglukone

Abschließend muß noch auf die freien Aguklone eingegangen werden, die sich in manchen Rebenextrakten finden. Das genuine Vorkommen läßt sich mit den derzeitigen Methoden nicht beweisen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die beobachteten Aglukone wenigstens teilweise durch Hydrolyse von Glycosiden bei der Aufarbeitung entstanden sind. Dem Vorkommen dieser Verbindungen darf aus diesem Grund keine systematische Bedeutung beigemessen werden.

## a) Unterscheidbarkeit der Aglukone auf Grund ihrer Färbbarkeit

Kämpferol-, Quercetin- und Myricetin-Glycoside sind in ihrem Färbeverhalten doch so ähnlich, daß kaum differenzierte Farbtöne (siehe S. 243) erhalten werden konnten. Zu der Farbbestimmung auf Chromatogrammen seien aus diesem Grund hier einige kritische Bemerkungen angefügt.

Tabelle 3

Farbreaktionen von Aglukonen. Farbwerte nach KORNERUP und WANSCHER (1963). Siehe auch Tabelle 1

Colour reactions of aglucones. Colour values after KORNERUP and WANSCHER (1963). See also table 1

|   | Kämpferol | Quercetin | Myricetin |
|---|-----------|-----------|-----------|
| Diazo-p-Nitroanilin                           | 4 B 6     | 4 B 3     | 4 B 3     |
| Fast Red                                      | 2 A 4     | 2 B 4     | 4 B 6     |
| 2,6-Dibromchinonchlorimid                     | 4 C 4     | 4 C 4     | 4 C 4     |
| NEUS Naturstoffreagenz                        | 1 A 4     | 4 A 4     | 5 A 5     |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 5 %, nach 2 d | 1 B 2     | 3 B 2     | 8 B 2     |

Von der Konzentrationsabhängigkeit des Farbeindruckes abgesehen, ist dem Farb-Vorstellungsvermögen des Beobachters auch bei der detailliertesten Farbbeschreibung eine enge Grenze gesetzt. Die günstigsten Bedingungen erhält man mit einer Farbtafel, die einen Vergleich mit einem bestimmten Farbmuster erlaubt. Zur Farbbeschreibung und Bestimmung geeignet sind die Farbmeßtafeln von OSTWALD (1939) oder die Horticultural Color Chart (1938). Das für chromatographische Zwecke geeignetste Werk ist das von KORNERUP und WANSCHER (1963). Die auftretenden Farben lassen sich als eine Kombination von zwei Zahlen und einem Buchstaben weitgehend nach Farbton und Grauwert ermitteln (Tab. 3). Bei den unterschiedlichsten Färbungen ist kein Farbton aufgetreten, der mit der Farbtafel nicht bestimmbar gewesen wäre. Schwierigkeiten machen lediglich kräftige Grautöne mit einem Farbstich. Dort versagt das menschliche Auge meistens. Es ist auch möglich, einigermaßen sicher bei gedämpftem Licht eine Chromatogrammplatte im UV-Licht zu beobachten und die Fluoreszenzfarben mit Hilfe der Farbtafel zu bestimmen. Das Verfahren hat den Vorteil, daß einem zweiten Beobachter leicht mitgeteilt werden kann, welche Farbe man selbst gesehen hat. Die verbale Farbbeschreibung ist nur für reine Spektralfarben sicher möglich. Bei den Färbungen auf der DC handelt es sich aber meistens um sehr fein abgestufte Farbtöne mit unterschiedlichen Grauwerten.

Die Kupplung mit Diazoniumsalzen (Fast Red) ist in der normalen Weise nur in 8-Stellung des A-Ringes als para-Substitution möglich. Reaktionen in der ortho-Stellung sind am B-Ring bei Kämpferol und Quercetin möglich, während Myricetin

am B-Ring keinen Angriffspunkt mehr für einen elektrophilen Angriff des Diazoniumkations bietet. Die Färbung von Gallussäure mit Diazoniumverbindungen entspricht etwa dem Myricetin. Die Gelbfärbung der Diazoverbindungen mit den Flavonolen wird in erster Linie durch das Substitutionsmuster am A-Ring bestimmt. Da es bei den Rebflavonolen keine Variabilität am A-Ring gibt, lassen die entstandenen Farbtöne bei der Diazotierungsreaktion keine hinreichende Differenzierung zu. Die Farblacke mit Metallen sind ebenfalls kaum zur Unterscheidung geeignet. Am verlässlichsten ist noch die Reaktion mit Alkali, die mit Myricetin eine grüne Färbung liefert, welche nach einigen Tagen in einen unverwechselbaren grauroten Ton übergeht. Hierbei lassen sich Quercetin und Kämpferol schlecht unterscheiden. Der Borkomplex mit  $\text{NH}_4\text{S}$  Reagenz erlaubt aber eine gute Differenzierung des Kämpferols von dem Paar Quercetin und Myricetin. Der Unterschied zwischen Quercetin und Myricetin ist meistens nicht zu beobachten. Die Glycosidierung in 3-Stellung verbessert die Unterscheidbarkeit etwas zugunsten des Myricetin-Glycosides, welches gegenüber dem Aglukon deutlich rot gefärbt ist. Eine Erklärung für dieses Phänomen kann nicht gegeben werden.

Tabelle 4

Umwandlung von Flavonolen in die entsprechenden Anthocyanidine. Verschiebung der UV-Spektren und der  $R_f$ -Werte auf Celluloseplatten mit FORESTAL-Fließmittel  
Conversion of flavonols to corresponding anthocyanidins. Shift of UV-spectra and  $R_f$ -values on cellulose plates with FORESTAL solvent

| Flavonoidpaar          | Verschiebung der Absorptionsbande I | Verschiebung der $R_f$ -Werte $\times 100$ |
|------------------------|-------------------------------------|--|
| Kämpferol/Pelargonidin | 367/518 nm                          | 55/68                                      |
| Quercetin/Cyanidin     | 370/535 nm                          | 41/49                                      |
| Myricetin/Delphinidin  | 374/546 nm                          | 28/32                                      |

#### b) Reduktion von Flavonolen zu Anthocyanidinen

Da es sehr leicht möglich ist, die Flavonole in saurer Lösung zu Anthocyanidinen zu reduzieren, wurde versucht, über die entstehenden Anthocyanidine eine Differenzierung zu erreichen. Die im UV-Spektrum nach rot verschobene Bande I zeigt bei den Anthocyanidinanalogen größere Unterschiede als bei den Flavonolen (Tabelle 4). Die Reduktionsreaktion erfordert allerdings relativ hohe Flavonolkonzentrationen.

### III. Verbreitung identifizierter Verbindungen bei Arten der Vitaceen

#### 1. Die Gattung *Vitis*

In der Folge sollen nur solche Verbindungen betrachtet werden, die über die ganze Vegetationsperiode vorhanden bzw. eindeutig abwesend sind.

Für die Gruppe der Phenolcarbonsäuren gilt generell, daß die Mengenverhältnisse in den Blättern je nach dem Termin der Probenahme starken Schwankungen unterworfen sind. Für eine Sortencharakterisierung kommen sie also weniger in Frage. Im Gegensatz dazu bleiben die Flavonoidmuster der untersuchten Pflanzen mehr oder weniger konstant.



Tabelle 5

Verteilung von Flavonolglycosiden bzw. deren Agluconen (1—13) und einigen Phenolcarbonsäuren (14—16) bei Vitaceen (systematische Gliederung nach GALET 1967). In der Spalte 17 ist der Gesamtgehalt an Flavonolen angegeben

Distribution of flavonol O-glycosides and their aglucones (1—13) and some phenolic acids (14—16) in Vitaceae (arrangement according to the system of GALET 1976). Column 17 indicates the total amount of flavonols

|                                  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17  |
|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| <b>Vitis</b>                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <b>I. Sektion Vitis</b>          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <b>Serie 1 — Candicansoideae</b> |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. candicans</i> (45)         | + | + | + | + | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 95  |
| <i>V. longii</i> (51)            | + | + | + | + | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 145 |
| <i>V. simpsonii</i> (81)         | + | + | + | + | + | - | - | + | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 184 |
| <b>Serie 2 — Labruscae</b>       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. labrusca</i> (48)          | + | + | + | + | + | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 94  |
| (49)                             | + | + | + | + | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 152 |
| <b>Serie 3 — Caribaeae</b>       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. caribaea</i> (82)          | + | + | + | + | - | + | - | - | - | +  | -  | -  | -  | +  | +  | -  |     |
| (83)                             | + | + | + | + | - | + | - | - | - | +  | -  | -  | -  | +  | +  | -  |     |
| <b>Serie 4 — Arizonae</b>        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. arizonica</i> (40)         | + | + | + | + | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | +  | 113 |
| <i>V. californica</i> (44)       | + | + | + | + | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | +  | 173 |
| <b>Serie 5 — Cinereae</b>        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. cinerea</i> ARNOLD (88)    | + | + | + | + | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 180 |
| <i>V. berlandieri</i> (42)       | + | + | + | + | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 183 |
| (43)                             | + | + | - | - | - | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 126 |
| <i>V. baileyana</i> (87)         | + | + | + | + | - | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 201 |
| <b>Serie 6 — Aestivalae</b>      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. aestivalis</i> (38)        | + | + | + | + | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 209 |
| (39)                             | + | + | + | + | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | 109 |
| <i>V. linsecumii</i> (50)        | + | + | - | + | - | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 198 |
| <b>Serie 7 — Cordifoliae</b>     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. cordifolia</i> (47)        | + | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 144 |
| <b>Serie 8 — Flexuosae</b>       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. amurensis</i> (89)         | + | + | + | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 142 |
| <i>V. piasezkii</i> (90)         | + | + | - | - | - | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 86  |

Erläuterungen am Ende der Tabelle.

| (noch Tabelle 5)         | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17  |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| Serie 9 — Spinosae       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. armata</i> (41)    | + | + | + | + | - | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 133 |
|                          | + | + | + |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| Serie 10 — Ripariae      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. riparia</i> (53)   | + | + | + | + | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 97  |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (54)                     | + | + | + | + | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | +  | 218 |
|                          | + | + | + |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (55)                     | + | + | + | + | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | +  | 141 |
|                          | + | + | + |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (56)                     | + | + | + | + | - | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | 124 |
|                          | + | + | + |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (57)                     | + | + | + | + | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | 133 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (58)                     | + | + | + | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 73  |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (59)                     | + | + | + | + | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 146 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (60)                     | + | + | + | + | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 108 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (61)                     | + | + | + | + | - | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 75  |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (62)                     | + | + | + | + | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  |    | 107 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (63)                     | + | + | + | + | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  |    | 109 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (64)                     | + | + | + | + | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | +  | 105 |
|                          | + | + | + | + |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (65)                     | + | + | + | + | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 70  |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (66)                     | + | + | + | + | + | - | + | - | - | +  | -  | -  | -  | +  | -  | +  | 198 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (67)                     | + | + | + | + | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 205 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (69)                     | + | + | + | - | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 167 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (70)                     | + | + | + | + | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 275 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. rupestris</i> (74) | + | + | + | + | + | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | 91  |
|                          | + | + | + |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (75)                     | + | + | + | + | + | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | 110 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (76)                     | + | + | + | + | + | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 71  |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (77)                     | + | + | + | + | + | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | 77  |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (78)                     | + | + | + | + | - | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 85  |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (79)                     | + | + | + | + | + | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | 86  |
|                          | + | + | + |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| Serie 11 — Viniferae     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V. vinifera</i> (36)  | + | + | + | + | + | + | - | - | + | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  |     |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (37)                     | + | + | + | + | - | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 171 |
|                          | + | + | + |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (84)                     | + | + | - | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 103 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |
| (85)                     | + | + | + | - | - | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 198 |
|                          | + | + |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |     |

Erläuterungen am Ende der Tabelle.

| (noch Tabelle 5)         | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17  |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| (86)                     | + | + | + | + | - | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 123 |
| <i>V. silvestris</i> (1) | + | + | + | - | + | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | 195 |
| (2)                      | + | + | + | - | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 95  |
| (3)                      | + | + | + | - | + | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 174 |
| (4)                      | + | + | + | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 208 |
| (6)                      | + | + | + | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 155 |
| (7)                      | + | + | + | + | - | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 119 |
| (8)                      | + | + | + | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 129 |
| (9)                      | + | + | + | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 195 |
| (10)                     | + | + | - | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 173 |
| (11)                     | + | + | + | + | - | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 104 |
| (13)                     | + | + | + | - | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 104 |
| (14)                     | + | + | + | + | + | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 64  |
| (15)                     | + | + | + | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 115 |
| (16)                     | + | + | + | + | - | - | - | + | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 94  |
| (17)                     | + | + | + | + | + | + | - | + | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 144 |
| (18)                     | + | + | + | + | + | - | - | + | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 114 |
| (19)                     | + | + | + | + | + | + | - | + | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | 200 |
| (20)                     | + | + | + | + | + | + | - | + | + | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | 120 |
| (21)                     | + | + | + | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 101 |
| (22)                     | + | + | + | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 112 |
| (23)                     | + | + | + | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 110 |
| (24)                     | + | + | + | + | + | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  |     |
| (25)                     | + | + | + | + | + | + | + | + | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 126 |
| (27)                     | + | + | + | + | + | + | - | + | - | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 159 |
| (29)                     | + | + | + | + | + | + | - | + | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 220 |
| (30)                     | + | + | + | + | - | + | - | + | - | +  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 161 |

Erläuterungen am Ende der Tabelle.

| (noch Tabelle 5)                     | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |     |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| <b>II. Sektion <i>Muscadinia</i></b> |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>V.-rotundifolia</i> -Kreuzungen   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
| T 6-38 OLMO (71)                     | + | + | + | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 304 |
| T 6-42 OLMO (72)                     | + | + | + | + | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | 300 |
| <b>Ampelopsis</b>                    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
| Sektion <i>Vitifoliae</i>            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
| Serie 1 — Reniformae                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>A. aegiophylla</i> (35)           | + | + | + | + | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 66  |
| Serie 2 — Cordiformae                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>A. cordata</i> (33)               | + | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 68  |
| Serie 3 — Cuneiformae                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
| <i>A. brevipedunculata</i> (32)      | + | - | - | + | - | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | 101 |
| <i>A. heterophylla</i> (31)          | + | + | + | - | - | + | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | 128 |
| <i>A. aconitifolia</i> (80)          | + | - | + | + | - | + | - | + | - | +  | -  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | 160 |

1 = Quercetin-3-glucosid, 2 = Quercetin-3-glucuronid, 3 = Quercetin-3-rhamnosid, 4 = Kämpferol-3-glucosid, 5 = Myricetin-3-glucosid, 6 = Quercetin-3-rhamnoglucosid, 7 = Kämpferol-3-glucuronid, 8 = Quercetinderivate höherer Glycosidierungsstufen, 9 = Kämpferol-3-rhamnoglucosid, 10 = Quercetin, 11 = Kämpferol-3-rhamnosid, 12 = Kämpferolderivate höherer Glycosidierungsstufen, 13 = Myricetin, 14 = Monokaffeoyltartrat, 15 = Chlorogensäure, 16 = Kaffeesäurederivat unbekannter Konstitution, 17 = Gesamtflavonole, als Quercitrin-Äquivalente (in mg/10 g Blattfrischgewicht) bestimmt.

In Tabelle 5 ist das Vorkommen der wichtigsten Verbindungen zusammengestellt. Quantitative Angaben können nur für die Summe der Flavonoide gemacht werden, die als Quercetin-3-rhamnosid-Äquivalente bestimmt wurden. Es ist zu beachten, daß Tabelle 5 nur Aussagen über identifizierte Verbindungen macht, nicht jedoch über deren Gesamtzahl. Oft enthalten die Chromatogramme weitere Flecken, die nicht eindeutig zu identifizieren sind.

Allgemein läßt sich für die Flavonolglykoside der Gattung *Vitis* sagen, daß in 3-Stellung glykosidierte Flavonole vorherrschend sind, und daß neben dem Glucosid des Quercetins das 3-Glucuronid ein sehr konstantes Merkmal ist. Auch das Kämpferol-3-glucosid kommt relativ oft vor. Von den Myricetin-Glykosiden ist Myricetin-3-glucosid bei mehr als der Hälfte aller *Vitis*-Arten vertreten. Höher glykosidierte Verbindungen des Quercetins sind nur bei 14 % der untersuchten Arten vorhanden, während die analogen Kämpferolderivate als selten bezeichnet werden müssen.

Die Depside der Kaffeesäure sind mit Wein- und Chinasäure vertreten, wobei es bisher noch nicht gelungen ist, ein potentiell Äpfelsäurederivat zu entdecken. Das unbekannte Depsid (Kaffeesäurederivat unbekannter Konstitution) ist aller Wahrscheinlichkeit nach ein Zuckerester der Kaffeesäure, jedoch sicher kein Depsid der Äpfelsäure.

Die Sektion *Vitis* hat mit Quercetin-3-glucosid und Quercetin-3-glucuronid ein konstantes Merkmal. Lediglich *V. cordifolia* (47) ist nicht in der Lage, Quercetin-3-

glucuronid zu synthetisieren. Vergleicht man die einzelnen Serien der systematischen Anordnung entsprechend, dann ergeben sich jedoch einige Besonderheiten: Die Candicansoideae erzeugen mit Ausnahme von *V. simpsonii* (81) sehr viel Kämpferol-3-glucuronid. Ähnlich verhält sich *V. californica* (44) aus der Serie der Arizonae, deren Kaffeesäuredepside jedoch unterschiedlich sind. Die Serie 2 läßt sich von 3 chemisch nicht unterscheiden. Die Arizonae sind wie die Cinereae durch wenig Quercetin-3-glucuronid charakterisiert. Dafür treten bei dieser Gruppe C-Glykoside auf, die nicht isoliert wurden. Bei Serie 6 und 7 kommen derartige Verbindungen wahrscheinlich ebenfalls vor. Die einzige untersuchte Art der Serie Cordifoliae, *V. cordifolia* (47), ist in bezug auf bekannte Flavonolglykoside völlig verarmt. Die Darstellung in Tabelle 5 könnte den Anschein erwecken, als enthielte diese Art lediglich zwei Verbindungen. Die DC-Platte ist jedoch voller Flecken, die nicht identifiziert werden konnten. Für eine präparative Aufarbeitung stand nicht genügend Blattmaterial zur Verfügung, da die Pflanzen in unserem Klima schlecht wachsen. Die Serien 7, 8 und 9 (Cordifoliae, Flexuosae, Spinosaee) zeigen eingeschränkte Depsidsynthese.

Serie 10 (Ripariae) lag in 2 Arten verschiedener Herkünfte vor. Bei *V. riparia* mit 17 Herkünften (Nr. 53—70) läßt sich die artspezifische Variabilität des Stoffmusters aufzeigen. Es konnten zwischen 6 und 8 verschiedene Substanzen identifiziert werden. Zweimal kamen 6, sonst 7—8 Verbindungen vor. Es besteht jedoch keine Korrelation zwischen der beträchtlich streuenden Gesamtmenge der Flavonolglykoside und deren unterschiedlicher Anzahl. Hier muß auch erwähnt werden, daß bei den unterschiedlichen Herkünften beträchtliche morphologische Unterschiede zu beobachten sind.

Bei *V. riparia* sind Nr. 53, 60, 65 und 70 chemisch nahezu völlig identisch. Anzahl und Art der Flecken sind gleich, es bestehen lediglich Unterschiede in der Gesamtflavonolglykosidmenge. Darüber hinaus sind zwei große Gruppen durch Kämpferol-3-glucuronid unterscheidbar: Bei 53, 54, 57, 58, 60, 65 und 70 (Gruppe I) fehlt es, während es bei 55, 56, 59, 62, 63, 66, 67 und 69 (Gruppe II) gebildet wird. In Tabelle 5 sind die Formen der Gruppe II durch Unterstreichung hervorgehoben. Lediglich bei 58 scheint die Synthese von Kämpferol ganz zu unterbleiben, da dort auch kein Kämpferol-3-glucosid zu finden ist. Auffallend ist die große Konstanz von Monokaffeoyltartrat, wie sie bei keiner zweiten Gruppe mehr vorkommt.

Chlorogensäure wird von immerhin 10 der 17 Arten gebildet. Das unbekannte Kaffeesäuredepsid ist relativ selten (5 von 17 Arten). An Flavonolglykosiden arme Formen kommen nur wenige vor.

*V. rupestris* ist der *V.-riparia*-Gruppe II sehr ähnlich. Kämpferol-3-glucuronid kommt durchgängig vor, während Monokaffeoyltartrat nur in 3 der 5 Proben vorhanden ist. Chlorogensäure ist artkonstant. In 3 Proben tritt das unbekannte Kaffeesäurederivat auf. Die Gesamtflavonolglykosidmenge ist gering.

Die Serie 11 (Viniferae) schließt sich mit ihrer ursprünglichsten Form (*V. silvestris*) eng an die Serie 10 (Ripariae) an. Die 26 Proben könnten eventuell auf der Basis von Kämpferol-3-glucuronid oder der verstärkten Synthese von Kaffeesäuredepsiden in zwei Gruppen unterteilt werden.

Von den *V.-vinifera*-Formen wurden nur wenige untersucht. Quercetin-3-rhamnoglucosid war meist vorhanden; Monokaffeoyltartrat wird von allen Arten gebildet, während Chlorogensäure bei zweien fehlt. Das unbekannte Kaffeesäurederivat ist nicht nachzuweisen; im ganzen zeigt sich die nahe Verwandtschaft zu *V. silvestris*.

Nach dem System von GALET (1967) steht die Sektion Muscadinia am Ende. Sie ist sowohl morphologisch wie cytologisch gut von der Sektion Vitis abgegrenzt. Gemeinsame Merkmale mit der Gattung *Ampelopsis* sind nicht zu übersehen. Die vorliegenden Kreuzungen 71 und 72 zeigen ein verarmtes Muster an Flavonolglykosiden, jedoch eine außerordentlich hohe Phenolbiosynthese. Diese Leistung haben die Pflanzen mit der Elternart *V. rotundifolia* gemeinsam.

## 2. Die Gattung *Ampelopsis*

Bei den untersuchten *Ampelopsis*-Arten ist Quercetin-3-glucuronid zwar vorhanden, aber in deutlich geringerer Konzentration. Auf der Basis einer Schätzung der Flavonolglykosidmenge läßt sich ein differenziertes Bild erstellen. Die biochemische Gliederung der Gattung *Ampelopsis* stimmt mit der morphologischen weitgehend überein. Die einzelnen Serien sind gut voneinander abgegrenzt. *A. aegirophylla* (35) als asiatische Art steht chemisch den Arten der Serie Cuneiformae durch das Fehlen der Kaffeesäurederivate nahe. Bei der nordamerikanischen Art aus der Serie Cordiformae, *A. cordata* (33), werden keine Kaffeesäuredepside gebildet. Auffallend bei den Cuneiformae ist das generelle Vorkommen von Quercetin, welches nur bei *heterophylla* (31) aus Rutin hätte entstehen können; bei *brevipedunculata* (32) ist keine hydrolysierbare Vorstufe des Aglukons vorhanden. Innerhalb der Gattung kommen mit Sicherheit noch andere phenolische Verbindungen vor, da auf den DC-Platten sich einige Flecken mit dem Borsäurereagenz anfärben, die nicht mit den hier beschriebenen Substanzen identisch sind.

Der Gattung *Vitis* am ähnlichsten ist *A. heterophylla* (31). Diese Art enthält viel Quercetin-3-glucosid und Quercetin-3-glucuronid. Ob das Fehlen von Myricetin-derivaten charakteristisch ist, läßt sich bei der geringen Anzahl untersuchter Arten nicht sicher sagen.

Gemeinsam ist allen untersuchten Arten, daß sie relativ geringe Mengen Flavonolglykoside produzieren.

## Diskussion

Alle Versuche, Pilzparasiten der Rebe mit physiologisch vertretbaren Konzentrationen der untersuchten Stoffe zu hemmen, gingen negativ aus. Desgleichen war keine Korrelation der bekannten Resistenzeigenschaften der untersuchten Arten mit Art und Menge der enthaltenen Phenolcarbonsäuren oder Flavonole festzustellen. Vorab darf jedoch erwähnt werden, daß eine andere Stoffgruppe mit stark hemmenden Eigenschaften nachgewiesen werden konnte (BACHMANN, in Vorbereitung). An dieser Stelle sollen lediglich noch kurz die biogenetischen Zusammenhänge der Rebphenole untereinander diskutiert werden.

Wie Versuche mit markierten Verbindungen zeigten (BACHMANN, in Vorbereitung), entstehen erwartungsgemäß die Zimtsäuren bei Reben aus L-Phenylalanin. Unterschiedlich hydroxylierte Verbindungen wie p-Cumarsäure und Kaffeesäure sind die wichtigsten Derivate. Die OH-Gruppe der p-Cumarsäure wird ausschließlich auf der Stufe der Zimtsäure eingeführt. Der zweite mögliche Weg über die Desaminierung des Tyrosins wurde nicht gefunden.

Die Zimtsäurederivate werden entweder in den B-Ring der Flavonole eingebaut oder sie bilden mit der Wein- bzw. der Chinasäure Depside. Die neuesten Ergebnisse von CASTINO und DI STEFFANO (1976) zeigen, daß neben der Kaffeesäure auch die übrigen Zimtsäuren, wie p-Cumar- und Ferulasäure als Tartrate vorkommen. Von den genannten Autoren wurde allerdings Wein analysiert. Die Phenole mögen demnach schon unterschiedliche chemische Reaktionen erfahren haben.

Die Existenz homologer Glieder der Benzoesäure erklärt sich zwanglos aus ihrer Biosynthese: Die Startsubstanz der Flavonoidbiosynthese, das Cinnamoyl-S-CoA, wird einer  $\beta$ -Oxydation unterworfen, und es entstehen die Benzoesäuren. Durch Anknüpfen von Acetyl- oder Malonyl-CoA resultieren Flavonoide, deren A-Ring keine Variabilität im Hydroxylierungsmuster zeigt. Sein Syntheseweg dürfte demnach bei allen Formen gleich verlaufen. Die Variabilität ist ausschließlich auf den B-Ring beschränkt, der das Substitutionsmuster der Zimtsäuren widerspiegelt. Die  $\beta$ -Oxidation zu den Benzoesäuren der Salicylsäure und der Gentisinsäure ist nicht zu erklären, denn als Vorstufen wären o-Cumarsäure und 1,3-Dihydroxyzimtsäure notwendig. Der Nachweis dieser Substanzen gelang aber nicht. Ebenso wenig konnten die als Vorstufen auch in Frage kommenden Cumarine gefunden werden.

Phenolcarbonsäuren mit Methoxygruppen begegnen uns in der Ferulasäure/Vanillinsäure bzw. der Syringasäure. Der A-Ring der Flavonole ist beim Kämpferol p-Cumarsäure und beim Quercetin Kaffeesäure. Die symmetrische Trihydroxyzimtsäure aus dem A-Ring des Myricetins konnte bei Pflanzen noch nicht nachgewiesen werden. Sollten bei der Gattung *Vitis* noch neue Aglukone aufgefunden werden, dann wäre hier in erster Linie das Isorhamnetin, welches als A-Ring die Ferulasäure trägt, zu erwarten.

Auffallend ist, daß methoxylierte Verbindungen auf die einfachen Phenolcarbonsäuren bzw. bei den Flavonoiden auf die Anthocyanidine beschränkt sind. Eine biogenetische Beziehung zwischen Flavonolen und Anthocyanidinen läßt sich aus dieser Beobachtung nicht ableiten. Bei den Rebenanthocyanidinen sind methoxylierte Aglukone eher die Regel, während die analog gebauten Flavonole fehlen.

### Zusammenfassung

An 90 Vitaceen-Formen wurden phenolische Blatinhaltsstoffe untersucht. Wildformen standen im Vordergrund des Interesses, da bei diesen Formen die größten Unterschiede zu erwarten sind.

Flavonolglycoside stellen qualitativ und quantitativ die wichtigste Gruppe dar. Neben Quercetin-3-O-Glycosiden kommen die analogen Kämpferol- und Myricetin-Glycoside vor.

Die analogen Glucuronide von Quercetin und Kämpferol konnten ebenfalls identifiziert werden, nicht aber die entsprechende Myricetin-Verbindung.

Phenolcarbonsäuren der Zimtsäure-Reihe sind hauptsächlich in Form von Depsiden vorhanden. Besonders das Monokaffeoyltartrat ist sehr weit verbreitet. Abkömmlinge der Benzoesäure-Reihe sind dynamische Komponenten, die nur temporär nachweisbar sind.

Die Verbreitung der identifizierten Flavonoide bei 78 *Vitis*- und 5 *Ampelopsis*-Arten wurde untersucht. Allen *Vitis*-Arten gemeinsam ist das Quercetin-3-glucosid. Fast ebenso häufig ist Quercetin-3-glucuronid. Diese Verbindung wurde erstmals für eine größere Zahl von *Vitis*-Arten nachgewiesen. Das 3-Glucuronid wurde bisher häufig für 3-Rhamnosid oder 3-Glucosid gehalten. Bei der salzsauren Hydrolyse zeichnet sich das 3-Glucuronid durch große Stabilität aus, im Gegensatz zu den anderen Glycosiden. Mit zuckerspezifischen Glycosidasen ist eine saubere Unterscheidung der einzelnen Verbindungen möglich.

Die Phenolspektren der vikariierenden europäischen Art *Vitis silvestris* und der nordamerikanischen *Vitis riparia* zeigen weitgehende Übereinstimmung.

Eine Hemmung des Parasiten *Botrytis cinerea* durch Flavonolglycoside oder Phenolcarbonsäuren konnte nicht erzielt werden.

Die isolierten und identifizierten Phenole wurden in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften mit den entsprechenden Literaturwerten verglichen.

Den Mitarbeitern der Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof, welche an dieser Arbeit mitgewirkt haben, danke ich herzlich.

### Literatur

- ANONYMOUS (1938 und 1941): Horticultural colour chart. Vols. I and II. British Colour Council, London.
- CASTINO, M. e DI STEFFANO, R., 1976: Frazionamento degli acidi fenolici dei vini bianchi per gel filtrazione. Riv. Viticolt. Enol. 29, 290—305.
- DECHENE, E. B., 1951: The determination of rutins in tablets. J. Amer. Pharm. Assoc. 40, 93—94.
- EGGER, K. und KBIJL, M., 1965: Verteilungschromatographische Trennung von Flavongemischen auf Polyamid. Z. Anal. Chem. 210, 201—208.
- — , REICHLING, J. und AMMANN-SCHWEIZER, R., 1976: Flavonol-Derivate in Formen der Gattung *Vitis*. *Vitis* 15, 24—28.
- GALET, P., 1987: Recherches sur les méthodes d'identification et de classification des Vitacées des zones tempérées. Thèse Fac. Sci. Montpellier.
- HEDIN, P. A., MINYARD, J. P. and THOMPSON, A. C., 1967: Chromatographic and spectral analysis of phenolic acids and related compounds. J. Chromatography 30, 43—53.
- HERRMANN, K., 1967: Über Hydroxy-Zimtsäuren und ihre Bedeutung in Lebensmitteln. Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch. 133, 158—177.
- KARRER, W., 1958: Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe. Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart.
- KORNERUP, A. and WANSCHER, J. H., 1963: Methuen handbook of colour. Methuen & Co. Ltd., London.
- MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. and THOMAS, M. B., 1970: The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- NEU, R., 1957: Chelate von Diarylborsäuren mit aliphatischen Oxyalkylaminen als Reagenzien für den Nachweis von Oxyphenyl-benzo- $\gamma$ -pyronen. Naturwissenschaften 44, 181.
- OSTWALD, W., 1939: Die kleine Farbmeßtafel. Verlag Muster-Schmidt K.G., Berlin.
- PALMER, J. K. and BRANDES, W. B., 1974: Determination of sucrose, glucose and fructose by liquid chromatography. J. Agricult. Food Chem. 22, 709—712.
- RAPP, A., BACHMANN, O. und ZIEGLER, A., 1975: Bestimmung von Zucker, Glycerin und Äthanol im Wein mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigchromatographie. Dt. Lebensm.-Rundsch. 71, 345—348.
- — und ZIEGLER, A., 1973: Bestimmung der Phenolcarbonsäuren in Rebblättern, Weintrauben und Wein mittels Mikro-Polyamid-Dünnschichtchromatographie. *Vitis* 12, 226—236.
- RIBÉREAU-GAYON, P., 1968: Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris.
- SINGLETON, V. L. and ESAU, P., 1969: Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. Acad. Press, New York and London.
- STAHL, E., 1967: Dünnschichtchromatographie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- SWEETLEY, C. C., BENTLEY, R., MAKITA, M. and BELLS, W. W., 1963: Gasliquid chromatography of trimethylsilyl-derivates of sugars and related substances. J. Amer. Chem. Soc. 85, 2497—2507.
- WAGENBRETH, A. N., 1963: Qualitative und quantitative Bestimmung phenolischer Blattinhaltsstoffe in Unterlagen und Unterlagen-Sorten-Kombinationen der Gattung *Pyrus* während der Vegetationsperiode. Arch. Gartenbau 11, 339—386.
- WHEELER, H., 1975: Plant pathogenesis. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- YAP, F. und REICHARDT, A., 1964: Vergleichende Untersuchungen der Flavonoide und Oxyzimtsäuren in den Blättern artreiner *Vitis*-Sorten und ihrer Bastarde. Züchter 34, 143—156.

Eingegangen am 31. 5. 1978

DR. O. BACHMANN  
BFA für Rebenzüchtung  
Geilweilerhof  
D 6741 Siebeldingen