

Flavonol-Derivate in Formen der Gattung *Vitis*

von

K. EGGER, J. REICHLING und RITA AMMANN-SCHWEIZER

Flavonol compounds in some members of the genus *Vitis*

S u m m a r y . — The flavonoid compounds of four vines (*Vitis riparia*, *Vitis vinifera* cvs. Riesling and Sylvaner, hybrid Sbl. 5-24-20) have been investigated. Beyond the known main aglycons quercetin and kaempferol we identified myricetin as a third component and showed the presence of two additional minor aglycons, which are not yet identified.

All aglycons are present as glycosides. The glucosides and rhamnoglucosides of quercetin and kaempferol, described by other authors, and of myricetin are present, but only as minor components. The major amount of the flavonoids has been found as 3-glucuronides. The investigations will be continued.

Einleitung

Die meisten Untersuchungen über Flavonoide in der Gattung *Vitis* wurden an Trauben und am Wein vorgenommen (7, 8, 9); nur wenige beziehen sich auf die Blätter. Über den Flavonoidgehalt in Reblättern berichtet HENKE (4) im Zusammenhang mit seinen biochemischen Untersuchungen zur Reblausresistenz. Er fand im Rahmen dieser Arbeit Quercetin und Kaffee- bzw. Chlorogensäure. Später (5, 6) konnte er die Flavonolglykoside Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin) und Quercetin-3-rhamnoglucosid (Rutin) nachweisen. Er fand darüber hinaus innerhalb der Gattung *Vitis* bei allen Arten ein Hauptflavonoid, von dem er annahm, daß es sich um Quercetin-3-glucosid handelte. In den folgenden Jahren konnten YAP und REICHARDT (18) die Substanzen Quercitrin, Rutin und Isoquercitrin in *Vitis*-Sorten identifizieren. Danach übertrifft Quercetin-3-glucosid mengenmäßig alle anderen gefundenen Substanzen. Etwa zur selben Zeit wurden von NUTSUBIDSE und GULBANI (12) in Georgien Untersuchungen über Flavonole während der Entwicklung der Rebe bzw. über Flavonverbindungen in Blatt, Sproß und Beere angestellt. Sie identifizierten als Inhaltsstoffe des Blattes Rutin sowie nach der Hydrolyse zusätzlich die Aglyka Kämpferol und Luteolin. SABAJEV (13) verglich Sorten von *Vitis amurensis* und *Vitis vinifera* im Hinblick auf ihr Flavonolmuster miteinander und fand, daß sich *Vitis vinifera* durch ihren Gehalt an Quercetin-3-rhamnoglucosid auszeichnet. WAGNER *et al.* (17) untersuchten die Blätter der Rebe *Vitis cinerea* DARWIN. Mit Hilfe moderner analytischer Verfahren (UV-, IR-, NMR-Spektren) konnten sie einige weitere Substanzen — Vitexin, Isovitexin, Orientin und Isoorientin — nachweisen und das Vorkommen des Flavonolglykosids Quercetin-3-glucosid bestätigen. SCHAEFER (15), der bei vergleichenden biochemischen Untersuchungen an Reblausgallen auch die phenolischen Inhaltsstoffe von Rebenblättern bearbeitete, konnte neben einer Reihe nicht identifizierter Verbindungen ebenfalls Isoquercitrin, Quercitrin, Quercetin und Rutin nachweisen.

Die vorliegende Untersuchung galt der Frage, ob sich bei verschiedenen Rebenformen charakteristische Muster der Flavonoidglykoside und -aglyka aufzeigen lassen.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial: Untersucht wurden im Mai/Juni und im August gesammelte, voll ausgewachsene Blätter von vier Rebenformen, die uns freundlicherweise von der Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof zur Verfügung gestellt wurden: die *Vitis-vinifera*-Sorten Riesling und Silvaner, die interspezifische Kreuzung Sbl. 5-24-20 und die amerikanische Wildart *Vitis riparia* 1 G. ENGERS; sämtliche Reben waren wurzelecht im Freiland gepflanzt.

Die Aufarbeitung und Extraktion der Blattproben erfolgte nach EGGER und REZNIK (2); die Perlonsäulenchromatographie der Flavonole wurde nach SCHÖNSIEGEL und EGGER (16) vorgenommen.

Polyamid-Dünnschichtplatten: 10 g Polyamid-DC 6.6 (Macherey, Nagel & Co.) wurden mit 1 g Cellulose (Cellulosepulver MN 300 für DC) gemischt und in 60 ml Wasser aufgeschlämmt. Anschließend wurde die Suspension ungefähr eine halbe Stunde gut gerührt und dann mit Hilfe eines Streichgerätes auf die Glasplatten aufgetragen. Die angegebene Menge reicht für 5 Platten der Größe 20 × 20 cm.

Zur Sichtbarmachung der Flavonoide dienten 1%ige methanolische Diphenylbor-säure- β -aminoäthylester-Lösung oder 5%ige methanolische $ZrOCl_2$ -Lösung.

Bestimmung der Zucker: Die nach der sauren Hydrolyse gewonnenen Zuckerkomponenten wurden auf Celluloseplatten mit Testzuckern verglichen. Ein Enzymtest mit β -Glucuronidase wurde in Anlehnung an KEIL (10) und HARBORNE (3) durchgeführt.

Ergebnisse

Ein dünn-schichtchromatographischer Vergleich auf Polyamid-DC 6.6 zeigt, daß die vier Rebenformen hinsichtlich der Hauptglykoside und deren Aglyka weitgehend miteinander übereinstimmen, sich jedoch in der mengenmäßigen Zusammensetzung unterscheiden. Qualitative Unterschiede zwischen den einzelnen Rebsorten zeigen sich erst bei den zahlreichen Nebenkomponenten. Unsere Aufmerksamkeit galt daher zunächst den in allen vier Rebenformen vertretenen Hauptflavonolen.

1. **Aglyka.** Nach saurer Hydrolyse und mehrmaligem Auswaschen des Hydrolysates mit Diäthyläther konnten die Aglyka mit Hilfe der Polyamid-DC aufgetrennt werden. Abb. 1 zeigt die Lage der fünf Hauptaglyka, die in allen vier Rebenformen gefunden wurden.

Mit Hilfe der vergleichenden Polyamid-DC, der Farbreaktion mit Diphenylbor-säure- β -aminoäthylester und UV-Spektren konnten die Hauptaglyka 1, 2, 3 auf der DC-Platte als Kämpferol, Quercetin und Myricetin identifiziert werden. Quercetin (Fleck 2) ist von allen Aglyka am stärksten vertreten. Quercetin und Kämpferol (Fleck 1) wurden schon von anderen Autoren (vgl. 4, 5, 6, 12, 14, 15, 17, 18) für die vegetativen Organe von *Vitis vinifera* L. beschrieben. Myricetin (Fleck 3) wurde dagegen in vegetativen Organen von *Vitis*-Formen noch nicht gefunden. Die beiden anderen Aglyka konnten aufgrund ihrer geringen Menge noch nicht bestimmt werden. Sie liegen in der amerikanischen Wildart und in der interspezifischen Kreuzung in größerer Konzentration vor als in den beiden *Vitis-vinifera*-Sorten. Zu der nicht sehr großen Vielfalt der Aglyka in den vier Rebenformen (Ernte der Blätter im August) ist zu bemerken, daß eine im Frühjahr (Mitte Mai) geerntete Probe von einer amerikanischen Wildrebe ein weit größeres Aglykon-Spektrum aufweist. Die-

se Tatsache läßt auf jahreszeitlich verschiedene Muster der Flavonoide in Reben, mit nur vorübergehend auftretenden Komponenten, schließen. Solche jahreszeitlichen Abhängigkeiten des Phenolmusters wurden bei verschiedenen Pflanzen beobachtet (1).

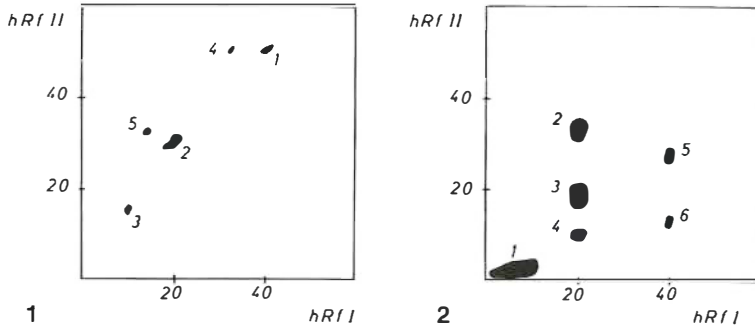


Abb. 1: Lage der Hauptglyka in einem zweidimensionalen Polyamid-Dünnschichtchromatogramm. Fließmittel: 1. Dimension: Benzol/Petroläther/Methyl-äthyl-keton/Methanol (40 : 15 : 25 : 15); 2. Dimension: Benzol/Methyl-äthyl-keton/Methanol (25 : 17 : 25).
Abb. 2: Lage der Hauptglykoside in einem zweidimensionalen Polyamid-Dünnschichtchromatogramm. Laufmittel: 1. Dimension: H₂O/Methanol/Methyl-äthyl-keton/Acetyl-aceton (65 : 15 : 15 : 5); 2. Dimension: Benzol/Methyl-äthyl-keton/Methanol (50 : 25 : 30).

Fig. 1: The position of the main aglycons in a two dimension polyamid-TLC. Solvent: 1st dimension: Benzene/petroleum ether/methyl-ethyl-ketone/methanol (40 : 15 : 25 : 15); 2nd dimension: Benzene/methyl-ethyl-ketone/methanol (25 : 17 : 25).

Fig. 2: The position of the main glycosides in a two dimension polyamid-TLC. Solvent: 1st dimension: H₂O/methanol/methyl-ethyl-ketone/acetylacetone (65 : 15 : 15 : 5); 2nd dimension: Benzene/methyl-ethyl-ketone/methanol (50 : 25 : 30).

2. Glykoside. — Um einen allgemeinen Überblick über die Glykosidierungsstufen bzw. ihre Unterschiede in den vier Rebenformen zu bekommen, wurden die Rebenextrakte zusammen mit entsprechenden Vergleichssubstanzen in einem wäßrigen Laufmittel entwickelt. Danach herrschen bei allen vier Rebenformen hauptsächlich drei Glykosidierungsstufen vor, nämlich die Hexuronid-, die Hexosid- und die Methylpentohexosid-Stufe. Bei *Vitis riparia* tritt die Methylpentohexosid-Stufe stark zurück. Ein zweidimensionales Chromatogramm gibt mehr Aufschlüsse über das Vorhandensein einzelner Glykoside, wobei das unpolare Laufmittel der 2. Dimension nun nach dem Aglykonanteil auftrennt (s. Abb. 2).

Außer den Hauptglykosiden, die sich in allen vier Rebenformen wiederfinden, tauchen nun unterschiedliche Nebenglykoside und Blaufluoreszenzen auf. In einer ersten Untersuchung haben wir uns mit den Flecken 1, 2, 3, 4, 5, 6 näher befaßt. Am Start verbleibt der große gelbe Fleck 1. Aufgrund dieses Verhaltens auf Polyamid-DC 6.6 liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um Flavonoid-Glucuronide handeln könnte. Um dies nachzuprüfen, trennten wir die vermutete Glucuronid-Fraktion über eine Perlonssäule von den anderen Glykosiden ab. Die reine Glucuronid-Fraktion wurde einem Enzymtest unterworfen. Ein Test mit anderen Glykosiden ergab den Nachweis, daß β -Glucuronidase streng spezifisch nur die Glucuronide spaltet. Der Testansatz führt zu zwei Aglyka, die entsprechend ihren Rf-Werten und ihrer Farbreaktion mit Diphenylborsäure- β -aminoäthylester mit den authentischen Vergleichssubstanzen Kämpferol und Quercetin übereinstimmen. My-

ricetin konnte in der Glucuronid-Fraktion nicht festgestellt werden. Als Uronsäure konnte dünn-schichtchromatographisch D-Glucuronsäure nachgewiesen werden. Damit ist die Vermutung bestätigt, daß es sich um Kämpferol- und Quercetin-3- β -glucuronid handelt. Das Vorkommen dieser Substanzgruppe in Reblättern wurde bisher in der Literatur noch nicht erwähnt. Die Glykosid-Flecken 2, 3, 4, 5 und 6 (vergl. Abb. 2) untersuchten wir mit Hilfe der DC mit authentischen Substanzen und der Vermessung im Dünn-schichtscanner. Hierbei entspricht der Fleck 2 der Vergleichssubstanz Kämpferol-3-glucosid, der Fleck 3 der Vergleichssubstanz Quercetin-3-glucosid, und der Fleck 4 könnte aufgrund seiner Lage und Farbreaktion mit Diphenylborsäure- β -aminoäthylester dem Myricetin-3-glucosid entsprechen. Bei den Glykosid-Flecken 5 und 6 dürfte es sich nach dem Rf-Vergleich mit authentischer Substanz, der Farbreaktion mit dem oben angeführten Reagenz und der Vermessung mit dem DC-Scanner um Kämpferol-3-rhamnoglucosid und Quercetin-3-rhamnoglucosid handeln. Danach liegt Myricetin vorwiegend, wenn nicht ausschließlich, als 3-Glucosid vor.

Ein dünn-schichtchromatographischer Vergleich der Zucker aus den sauren Hydrolysat zeigt neben der schon erwähnten D-Glucuronsäure auch die beiden Zucker Glucose und Rhamnose.

Zusammenfassung

In einem ersten Ansatz, dem weitere Absicherungen und Identifizierungen durch Isolierung größerer Substanzmengen folgen sollen, wurden die Blätter von vier Rebenformen auf ihren Flavonoidgehalt hin untersucht. Vergleichschromatogramme zeigen, daß einige Hauptflavonoide in allen vier Rebenformen vorkommen; darüber hinaus unterscheiden sie sich jedoch durch zahlreiche weitere Spurenverbindungen. In Bestätigung bisheriger Arbeiten wurden als Hauptglykone Quercetin und das in geringerer Konzentration vorliegende Kämpferol nachgewiesen. Bisher für die Reben nicht angegeben ist Myricetin, das in den von uns untersuchten Proben vorkommt. Zwei weitere Aglyka lassen sich derzeit noch nicht dünn-schichtchromatographisch identifizieren.

Alle Aglyka liegen in glykosidischer Bindung vor. Wir konnten bestätigen, daß Glucoside und Rhamnoglucoside in der Rebe vorliegen. Jedoch machen diese Verbindungen keineswegs die Hauptmasse der Glykoside in diesen Pflanzen aus. Die Hauptmenge des Quercetins und Kämpferols liegt in Form von Glucuroniden vor. Myricetin scheint allerdings nicht an der Glucuronid-Fraktion beteiligt zu sein. Es befindet sich im wesentlichen in der Glucosid-Fraktion. Die Untersuchungen zur endgültigen Bestätigung dieser Befunde und zur Analyse weiterer Begleit-substanzen werden fortgesetzt.

Literaturverzeichnis

1. AHLGRIIM, E., 1955: Über den Gesamtflavonolgehalt sowie den Rutingehalt verschieden alter Blätter bei *Fagopyrum*-Arten. *Naturwissenschaften* 42, 465—466.
2. EGGER, K. und REZNIK, H., 1961: Die Flavonolglykoside der Hamamelidaceen. *Planta* 57, 239—249.
3. HARBORNE, J. B., 1965: Plant polyphenols. XIV. Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. *Phytochemistry* 4, 107—120.
4. HENKE, O., 1958: Untersuchungen über die biochemischen Grundlagen der Reblausresistenz. *Phytopathol. Z.* 32, 149—152.
5. — —, 1959: Untersuchungen über den Einfluß von *Vitis cinerea* ARNOLD auf einige biochemische Eigenschaften von Kreuzungsnachkommen. *Z. Pflanzenzücht.* 41, 253—270.

6. — — , 1961: Über die Bedeutung der Stickstoffverbindungen für die stoffwechselfysiologischen Beziehungen zwischen Parasit und Wirt am Beispiel Reblaus-Rebe. *Phytopathol. Z.* 41, 387—426.
7. HENNIG, K. und BURKHARDT, R., 1958: Der Nachweis phenolhaltiger Verbindungen und hydroaromatischer Oxycarbonsäuren in Traubenbestandteilen, Wein und weinähnlichen Getränken. *Weinberg u. Keller* 5, 542—552, 593—600.
8. — — und — — , 1960: Vorkommen und Nachweis von Quercitrin und Myricitrin in Trauben und Wein. *Weinberg u. Keller* 7, 1—3.
9. HEHRMANN, K., 1963: Über die phenolischen Inhaltsstoffe der Trauben und des Weines (Flavonoide, Phenolkarbonsäuren, Farbstoffe, Gerbstoffe). *Weinberg u. Keller* 10, 154—164, 208—220.
10. KEIL, M., 1965: Zur Kenntnis von Flavon-o-glykosiden in Ranunculaceen. Diss. Univ. Heidelberg.
11. NEU, R., 1956: Ein neues Reagenz zum Nachweis und zur Unterscheidung von Flavonen im Papierchromatogramm. *Naturwissenschaften* 43, 82.
12. NUTSUBIDSE, N. W. und GULBANI, D. J., 1964: Flavonole in der Rebe (russ.). *Soobshch. Akad. Nauk Gruzinsk. SSR* 36, 345—352.
13. RIBÉREAU-GAYON, P., 1964: Les flavonosides de la baie dans le genre *Vitis*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 258, 1335—1337.
14. SABAJEW, S. J., 1970: Gehalt an Flavonolen und aromatischen Säuren in den Blättern verschiedener Rebsorten (russ.). *Vinodel. Vinogradar. SSR* 5, 48—50.
15. SCHAEFER, H., 1974: Weitere Untersuchungen über den Stoffwechsel der Reblausblattgallen unter besonderer Berücksichtigung des an die Galle angrenzenden Gewebes. *Weinwiss.* 29, 133—164.
16. SCHÖNSIEGEL, J. und EGGER, K., 1969: Flavonolglykoside in Blüten von *Narcissus pseudonarcissus*. *Z. Naturforsch.* 24 b, 1215.
17. WAGNER, H., PATEL, J., HÜRHAMMER, L., YAP, F. und REICHARDT, A., 1967: Flavon-C-Glykoside in den Blättern von *Vitis cinerea* DARWIN. *Z. Naturforsch.* 22 b, 988—989.
18. YAP, F. und REICHARDT, A., 1964: Vergleichende Untersuchungen der Flavonoide und Oxymzimsäuren in den Blättern artreiner *Vitis*-Sorten und ihrer Bastarde. *Züchter* 34, 143—156.

Wir danken der Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof für die Überlassung des Rebenmaterials und Herrn Dr. RAPP für fördernde Gespräche.

Eingegangen am 26. 11. 1975

Prof. Dr. K. EGGER
RITA AMMANN-SCHWEIZER
Botanisches Institut der
Universität Heidelberg
Hofmeisterweg 4
6900 Heidelberg 1

Dr. J. REICHLING
Institut für Pharmazeutische Biologie
der Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364
6900 Heidelberg 1