

CHROM. 6432

## QUALITATIVER NACHWEIS UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON FLAVONOLEN UND FLAVONEN

W. WILDANGER UND K. HERRMANN

*Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Hannover (B.R.D.)*

(Eingegangen am 22. August 1972; geänderte Fassung am 23. Oktober 1972)

---

### SUMMARY

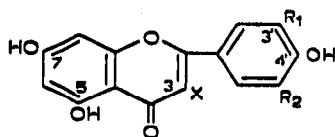
#### *Qualitative identification and quantitative determination of flavonols and flavones*

The method described is suitable for the quantitative determination of flavonols and flavones in plant material and foods. Concentrations of 10 mg/kg fresh weight and higher are determined. The macerated plant material is completely extracted with methanol; the combined extracts are extracted with petroleum ether (b.p. 40–70°) and purified on a polyamide column. Then the glycosides are hydrolysed with 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in methanol and the aglycones formed are identified by thin-layer chromatography. For quantitative determination the hydrolysed extract is carefully applied to cellulose plates in the form of a narrow band and separated in chloroform–formic acid–water (50:45:5). The substances removed can be determined photometrically.

---

### EINLEITUNG

Nach der Ausarbeitung von Bestimmungsmethoden für Hydroxyzimtsäuren<sup>1</sup> und Catechine<sup>2</sup> widmeten wir uns der quantitativen Bestimmung von Flavonen und Flavonolen. Im Pflanzenreich sind die Flavone und besonders die Flavonole als Glykoside sehr verbreitet, wie eine grosse Zahl qualitativer papier- und später dünn-schichtchromatographischer Arbeiten ergeben hat. Die wesentlichsten davon sind in einer Reihe grösserer Übersichtsarbeiten<sup>3–8</sup> referiert. In Übereinstimmung mit anderen flavonoiden Stoffen kommen solche Verbindungen am häufigsten vor, die am Seitenphenyl in 3',4'-Stellung je eine Hydroxylgruppe tragen.



<i>Flavone</i>	X =	H		<i>Flavonole</i>	X =	OH
Apigenin	R <sub>1</sub> =	H	R <sub>2</sub> =	H	R <sub>1</sub> =	H
Luteolin	R <sub>1</sub> =	OH	R <sub>2</sub> =	H	R <sub>1</sub> =	OH
Tricin	R <sub>1</sub> =	OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> =	OCH <sub>3</sub>	R <sub>1</sub> =	OH
Chrysoeriol	R <sub>1</sub> =	OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> =	H	R <sub>1</sub> =	OCH <sub>3</sub>
				Kämpferol	R <sub>1</sub> =	H
				Quercetin	R <sub>1</sub> =	OH
				Myricetin	R <sub>1</sub> =	OH
				Isorhamnetin	R <sub>1</sub> =	OCH <sub>3</sub>
					R <sub>2</sub> =	H

Im Gegensatz zu ihrer weiten Verbreitung sind Angaben über den Gehalt der Nutzpflanzen an Flavon(ol)en bisher relativ selten anzutreffen. Auch sind die Werte, die man gelegentlich findet, oft aufgrund der gewählten papier- und später dünn-schichtchromatographischen Methode (vollständiger oder weitgehender Verzicht auf Reinigungsoperationen; damit Gefahr der Mitbestimmung anderer Stoffe) anzuzweifeln (z.B. Lit. 9-18).

#### EXPERIMENTELLES

##### *Reagenzien*

Die folgenden Reagenzien wurden verwendet: NaHSO<sub>3</sub>, 40%ig in Wasser; Petroläther (Siedebereich 40-70°); methanolische Ammoniaklösung, 0.5 ml 25%ige Ammoniakflüssigkeit + 99.5 ml Methanol; 2%ige methanolische Schwefelsäure, 2 g konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit Methanol auf 100 ml anfüllen; Äthylazetat-Methanol (9 : 1); Polyamid SC-6 < 0.16 mm (Machery, Nagel Cie.); Cellulose (mikrokristallin), Avicel für DC (Merck, Darmstadt, B.R.D.); Flavognost, 1%ig in Methanol (Fa. Heyl & Co., Hildesheim, B.R.D.) (Flavognost = 2-Aminoäthyl-diphenylborat-Komplex); Fließmittel und Lösungsmittel, siehe Text.

##### *Bereitung der Polyamidsäule*

In ein 30 cm langes Chromatographierohr von 4.5 cm Durchmesser wird unten ein Glaswollepfropfen eingesetzt und die Polyamidsuspension, die mindestens 3 h vorher angerührt worden ist, bis zur Füllhöhe von etwa 15 cm eingegossen. Den oberen Abschluss der Säule bildet eine 2 cm starke Schicht Seesand, um ein Hochwirbeln der Polyamidpartikel zu vermeiden, und darüber wiederum ein Glaswollepfropfen. Zum Konditionieren der Säule wird mit 1000 ml methanolischer Ammoniaklösung gespült und dann die Säule mit 2000 ml Wasser neutral und alkoholfrei gewaschen.

##### *Herstellung der Cellulose-Platten*

18 g Cellulose werden mit 100 ml Wasser in einem Haushaltsmixer (z.B. Krups Charly) 90 sec homogenisiert und mit einer Schichtdicke von 0.3 mm auf die Glasplatten ausgestrichen. Nach der Lufttrocknung sind die Platten gebrauchsfertig.

Beim manuellen Spülen der Platten, bei Verwendung eines Spülautomaten und beim Auflegen der Platten auf die Streichschablone ist mit Gummihandschuhen zu arbeiten!

##### *Extraktion der Glykoside aus dem pflanzlichen Gewebe*

Ca. 200 g Pflanzenteile (auf 0.1 g genau gewogen) werden mit einem Edelstahlmesser grob zerkleinert, in einen mit 100 bis 200 ml Wasser und 10 ml NaHSO<sub>3</sub>-Lösung versehenen Haushaltsmixer gegeben, darin soweit wie möglich (etwa 5 min) zerkleinert und anschliessend in einem 1000 ml Becherglas mit dem Homogenisator

“Ultra-Turrax” (Fa. Janke & Kunkel, Hohenstaufen, B.R.D.) bis zur pastösen Konsistenz behandelt.

Die Masse wird dann 5 min lang zur Inaktivierung der Enzyme aufgekocht, abgekühlt und 10 min lang bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert, der Rückstand in einem 500 ml NS-Rundkolben mit Methanol am langsam laufenden Rotationsverdampfer im siedenden Wasserbad 10 min erhitzt. Hierbei ist der Rotationsverdampfer an die Vakuumpumpe angeschlossen, die Belüftung aber geöffnet. Danach wird wie vorstehend zentrifugiert und die Methanol-Extraktion des Rückstandes noch zweimal wiederholt. Dann vereinigt man den zuerst erhaltenen wässrigen Extrakt mit den drei Methanol-Auszügen und zentrifugiert einen dabei entstandenen Niederschlag (z.B. Chlorophyll) ab.

Der Niederschlag wird noch einmal mit ca. 100 ml 50%igem wässrigem Methanol 5 min heiss extrahiert (um eventuell mitgerissene Flavon(ol)glykoside auszuwaschen), anschliessend abzentrifugiert und verworfen. Die vereinigten Extrakte werden am Vakuumrotationsverdampfer bei max. 40° Badtemperatur auf ca. 200 ml eingedampft, mit ca. 100 ml Methanol versetzt und zur Reinigung mit Petroläther<sup>3</sup> ca. 12–30 h in einem 1000 ml Perforator (Flüssig-flüssig-Extraktor) extrahiert.

Hierdurch wird die anschliessende säulenchromatographische Reinigung erheblich erleichtert. Ein vorheriger Methanolzusatz verbessert die Löslichkeit organischer Bestandteile in der wässrigen Phase, wodurch der Wirkungsgrad der Extraktion erhöht wird<sup>3</sup>. Zur Verbesserung der Phasentrennung wurde in die Petrolätherphase eine dichte Packung Glaswolle eingelegt, die die vom Petroläther hochgerissenen Wassertröpfchen vereinigt und zurückfallen lässt. Dadurch wird die untere Phase nicht teilweise in den Destillierkolben verschleppt!

Die extrahierte Lösung bringt man unter obigen Bedingungen auf ca. 50 ml und füllt mit Wasser auf 200 ml an.

#### *Säulenchromatographische Reinigung des Extraktes über Polyamid*

Nach dem Auftragen und Einsickern der Lösung in die Polyamidsäule wäscht man diese mit 1000 ml Wasser zur weitgehenden Entfernung von Begleitsubstanzen und eluiert dann die Flavonoide mit 500 ml methanolischer Ammoniaklösung. Alle gefärbten adsorbierten Stoffe schieben sich visuell erkennbar durch die Säule. Das gelb bis grünlichgelb oder bei Anwesenheit von Anthocyaninen auch blauviolett gefärbte Eluat wird im Rotationsverdampfer bei max. 40° Badtemperatur eingedampft, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und im Messkolben auf 10 ml angefüllt. Diese Lösung (Lösung I) kann zur Bestimmung der Glykoside verwendet werden.

#### *Hydrolytische Spaltung der Flavon(ol)glykoside*

Zur Bestimmung der Aglykone wird Lösung I, bzw. ein aliquoter Teil davon, mit 25 ml 2%iger methanolischer Schwefelsäure versetzt und mit Methanol auf 50 ml angefüllt, so dass die erhaltene Lösung 1% Schwefelsäure enthält. Nun wird 60 min (bzw. länger, wenn die Hydrolysezeit nicht ausreichte; vgl. hierzu die Angaben über die hydrolytische Spaltung der Flavon(ol)glykoside auf S. 438) am Rückfluss hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wird methanolische Ammoniaklösung bis pH 8 (mit Potentiometer gemessen) zugegeben und die Lösung am Rotationsverdampfer bei max. 40° Badtemperatur eingedampft. Der Rückstand wird in ca. 100 ml Wasser

aufgenommen, und die Flavon(ol)e werden der wässrigen Lösung durch viermalige Extraktion mit *ca.* 150 ml Äthylacetat-Methanol (9:1) entzogen.

Am Rotationsverdampfer dampft man die vereinigten Extrakte auf etwa 1 ml ein. Der Rückstand, der die Aglykone quantitativ enthält, wird in einen Messkolben gebracht und auf 10 ml mit Methanol angefüllt. Diese Lösung (Lösung II) dient zur qualitativen und quantitativen dünnschichtchromatographischen Bestimmung der Aglykone.

Zur qualitativen Prüfung wird diese Lösung punktförmig auf Celluloseplatten, zusammen mit Vergleichssubstanzen, aufgetragen und mit den Fließmitteln S<sub>2</sub>,

TABELLE I

DIE *hR<sub>F</sub>*-WERTE VERSCHIEDENER FLAVON- UND FLAVONOLAGLYKONE UND DEREN FARBREAKTION NACH BESPRÜHEN MIT FLAVOGNOST

Fließmittel: S<sub>1</sub> = Benzol-Essigsäure (50:50); S<sub>2</sub> = Chloroform-Ameisensäure-Wasser (50:45:5) S<sub>3</sub> = Butanol-Essigsäure-Wasser (40:10:50); S<sub>4</sub> = Butanol-Essigsäure-Wasser (30:35:15); S<sub>5</sub> = Salzsäure-Essigsäure-Wasser (3:30:10) (Forestal-Gemisch); S<sub>6</sub> = Phenol-Wasser (100:39, w/w). Tectochrysin (5-OH, 7-OCH<sub>3</sub>), Chrysin (5,7-OH) und 5,7-Dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavon laufen mit Ausnahme von Fließmittel S<sub>2</sub> meistens mit der Fließmittelfront.

Bezeichnung	Stellung der OH- und OCH <sub>3</sub> -Gruppen am Flavongrundgerüst	Fließmittel						Farbe der Flecken mit Flavognost im UV-Licht <sup>a</sup>
		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	
Apigenin	5,7,4'-OH	46	76	90	82	73	93	schmutzig orange-gelb
Luteolin	5,7,3',4'-OH	16	63	81	65	57	62	gelb
Acacetin	5,7-OH, 4'-OCH <sub>3</sub>	92	86	—	—	87	100	schmutzig gelb-orange
Kämpferol	3,5,7,4'-OH	34	52	87	69	57	58	gelblich grün
Quercetin	3,5,7,3',4'-OH	11	34	66	45	39	32	orange
Myricetin	3,5,7,3',4',5'-OH	4	20	39	22	25	15	orange
Morin	3,5,7,2',4'-OH	19	66	93	78	72	57	grün
Kämpferid	3,5,7-OH, 4'-OCH <sub>3</sub>	88	68	100	87	75	94	gelblich grün
Isorhamnetin	3,5,7,4'-OH, 3'-OCH <sub>3</sub>	46	54	73	64	54	72	schmutzig gelblich grün
Rhamnetin	3,5,3',4'-OH, 7-OCH <sub>3</sub>	39	54	73	64	54	72	rosa
Fisetin	3,7,3',4'-OH	9	48	63	52	44	45	orange
Robinetin	3,7,3',4',5'-OH	5	33	34	26	30	22	orange

<sup>a</sup> Ohne Anwendung der UV-Lampe sind die Flecken mit Flavognost wesentlich schwächer zu erkennen.

S<sub>4</sub> und S<sub>5</sub> (s. Tabelle I) chromatographiert. Anschliessend wird mit Flavognost besprüht. Zur Trennung des Kämpferols vom Isorhamnetin sind die Fließmittel S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>6</sub> und 60%ige Essigsäure geeignet.

#### Dünnschichtchromatographische Trennung der Aglykone und spektrophotometrische Messung

Mit dem Mikrodoser nach Dibbern der Fa. Desaga, Heidelberg, B.R.D. (500  $\mu$ l-Spritze) werden jeweils 2 ml von Lösung II strichförmig auf Celluloseplatten aufgetragen, wozu 5–20 Platten, je nach Flavon(ol)gehalt, benötigt werden. Damit der Mikrodoser die Celluloseschicht beim Auftragen nicht durch den Kapillarschlauch verletzte (wodurch die Substanzzonen nicht mehr bandförmig laufen konnten), mussten entweder recht teure Platten mit geschliffenen Kanten oder ein geeigneter Halterungsrahmen (Eigenanfertigung) verwendet werden.

Die Platten entwickelt man in S<sub>2</sub> bis *ca.* 1 cm unter den oberen Rand und

trocknet im Abzug bei laufendem Kaltluftgebläse (Föhn) *ca.* 1 h, bis kein Geruch von Ameisensäure mehr wahrzunehmen ist. Die Substanzen werden nun markiert, sofern sie nicht schon durch eigene Farbintensität zu erkennen sind. Dies geschieht entweder auf jeder Platte unter der UV-Lampe oder durch Besprühen von einer oder zwei Platten mit Flavognost. Die  $hR_F$ -Werte sind dann auf die zur Auswertung gelangenden Platten übertragbar.

Die entsprechenden Substanzzonen werden mit dem Sorbens von den Platten abgekratzt. Dazu dient ein im Winkel von *ca.* 45° quer abgeschnittener und geschliffener Spatel. Das Sorbens mit dem Flavon(ol) wird in einem 250 ml NS-Rundkolben mit *ca.* 150 ml Methanol übergossen und am Rotationsverdampfer ohne Vakuum im siedenden Wasserbad 10 min erhitzt.

Nach dem Zentrifugieren (*ca.* 3000 × g, 5 min) behandelt man das Sorbens noch zweimal in gleicher Weise. Die drei Zentrifugate werden vereint und am Vakuumrotationsverdampfer bei max. 40° Badtemperatur eingedampft.

Der Rückstand wird in Methanol p.A. aufgenommen und quantitativ in einen 10 ml Messkolben gebracht. Von gleichermassen entwickelten Platten werden gleichgrosse Sorbensbezirke entsprechend aufgearbeitet, die Extrakte eingedampft und auf 10 ml angefüllt (Blindlösung). Die Messung erfolgt im Maximum der langwelligen Hauptbande gegen die Blindlösung. Bei beträchtlichen Flavon(ol)gehalten ist es erforderlich, die Lösungen auf das zeh- bis hundertfache zu verdünnen, um im linearen Bereich des Photometers messen zu können.

### Berechnung

wobei

$$m = \frac{E \cdot b \cdot 100}{f \cdot c \cdot a} \text{ (mg)}$$

$a$  = ursprüngliche Einwaage, g

$b$  = Volumen von Lösung II (hydrolysierte Extrakte), ml

$c$  = davon auf ausgewertete Platten aufgetragene Menge, ml

$f$  = Eichfaktor (Extinktion des Aglykons, wenn 0.1 mg in 10 ml Methanol gelöst waren)

$E$  = gemessene Extinktion bei der Analyse

$m$  = Gehalt an gesuchtem Flavon(ol) in 1000 g Pflanzenmaterial

Den Eichfaktor kann man wie folgt bestimmen: Von einer Verdünnungsreihe werden jeweils die Extinktionen gemessen. Wenn man die Extinktion gegen die Konzentration aufträgt, ergibt sich eine Gerade durch den Koordinatenursprung. Man kann deshalb einen Eichfaktor bestimmen bzw. aus bekannten  $\log \varepsilon$ -Werten errechnen und muss wegen der linearen Proportionalität nicht jeweils eine Eichkurve aufstellen.

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die quantitative Bestimmung beschränkten wir bewusst auf die Aglykone. Dies ist wesentlich einfacher und genauer durchzuführen als eine Erfassung der oft in grösserer Zahl in der Pflanze ursprünglich vorliegenden Glykoside. Selbstverständlich lassen sich auch mit recht erheblichem Arbeitsaufwand die einzelnen Glykoside

bestimmen, wofür die Untersuchungen von BLUNDSTONE UND CREAN<sup>19</sup> and Rhabarber ein schönes Beispiel sind.

#### *Anwendbarkeit und Genauigkeit der Methode*

Bei Konzentrationen von über 10 mg/1000 g Frischgewicht der Probe ist die quantitative Bestimmung zuverlässig. Unter 1.0 mg/1000 g ist der Fehler in der quantitativen Messung so gross, dass sich nur die Grössenordnung schätzen lässt. Qualitativ feststellbar sind noch etwa 0.01 mg/1000 g.

Der Flavon(ol)verlust der gesamten Bestimmung beträgt etwa 8–10%, was mit zugewogenen kleinen Mengen an Rutin (Quercetin-3-rhamnosylglucosid) bzw. Quercetin in Parallelbestimmungen überprüft wurde.

Mit der Methode wurde der Gehalt an Flavon(ol)en in Obst<sup>20</sup> und Gemüse<sup>21</sup> bestimmt.

#### *Hydrolyse*

Die Bestimmung der Aglykone setzt eine vollständige und möglichst verlustlose Hydrolyse der Flavon(ol)glykoside voraus. Hierzu wurden unterschiedliche Hydrolysebedingungen untersucht. Dabei ermöglichte 1%ige methanolische Schwefelsäure eine praktisch verlustlose Hydrolyse. Die Flavonol-3-glykoside, mit Ausnahme der Glucuronide, werden rasch gespalten, während manche Flavon(ol)-7-glykoside, besonders die Glucuronide, nur langsam hydrolysiert werden, wie HARBORNE<sup>22</sup> zeigen konnte. Zur Spaltung von C-Glykosiden ist unser Verfahren nicht geeignet. Daher ist es erforderlich, auf eine vollständige Hydrolyse bei unbekanntem Inhaltsstoffen und Pflanzen(teilen) zu prüfen. Hierzu werden kleine Mengen der nicht hydrolysierten Lösung I (siehe S. 435) und der hydrolysierten Lösung nach dem Neutralisieren und Einengen nebeneinander bandförmig aufgetragen, in den Fliessmitteln 15%ige Essigsäure und Chloroform-Essigsäure-Wasser (50:45:5) entwickelt und dann die Chromatogramme verglichen. In 15%iger Essigsäure weisen die Aglykone in der Regel niedrigere, die Glykoside dagegen höhere  $R_F$ -Werte auf; im zweiten Fliessmittel ist es umgekehrt.

Bei schwerer hydrolysierbaren Glykosiden kann man die Hydrolyse mit 1%iger methanolischer Schwefelsäure bei einem Verlust von etwa 5% Aglykon bis zu 5 h ausdehnen.

Bei ungespaltenen Glykosiden besteht die Gefahr, dass sie durch die viermalige Äthylazetat-Methanol-Extraktion nicht quantitativ erfasst werden. In diesem Fall ist es erforderlich, die zur Gewinnung der Aglykone hydrolysierte Lösung nicht mit Äthylazetat-Methanol (9:1) auszuschütteln, sondern die neutralisierte und eingengte Hydrolyse-Lösung in Methanol aufzunehmen und direkt aufzutragen, um etwaige ungespaltene Glykoside nicht zu übersehen.

#### *Fliessmittel*

Von besonderer Bedeutung für eine einwandfreie quantitative Trennung der Aglykone sind geeignete Fliessmittel. Hierzu wurden insgesamt siebzehn verschiedene Fliessmittel überprüft, die zum Teil in Tabelle I enthalten sind. Als besonders geeignet fanden wir das Fliessmittel S2: Die Flavon(ol)zonen waren deutlich im  $hR_F$ -Bereich von 30–85 zu sehen; mitgeschleppte Chlorophyllreste, Anthocyanine und andere Begleitstoffe liefen mit der Lösungsmittelfront und störten demzufolge nicht.

Allerdings ist bei dem Fließmittel zu beachten, dass es erst nach maximal 48 h optimale Trennungen ergibt.

### *Eichfaktoren*

Besondere Schwierigkeiten bereiten die für die quantitative Bestimmung benötigten Eichfaktoren (vgl. S. 437). Einwandfrei reine Substanzen sind in der Regel nicht zu beschaffen. Betrachtet man die in der Literatur<sup>23</sup> bisher veröffentlichten  $\log \varepsilon$ -Werte der bekannteren Flavon(ol)e, so stellt man beträchtliche Diskrepanzen fest, die beim Quercetin, das leicht zugänglich ist, vergleichsweise am geringsten sind.

Daher wurden Quercetin (Merck) und Kämpferol (Fluka) mehrfach aus Methanol-Wasser umkristallisiert und bei 155° im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Für das wasserfreie Quercetin erhielten wir in Methanol sowie in Äthanol einen Eichfaktor (0.1 mg/10 ml Methanol) von 0.790, was  $\log \varepsilon = 4.378$  entspricht, und für Kämpferol 0.765, entsprechend  $\log \varepsilon = 4.34$ . Für Isorhamnetin fanden RAO UND BOSE<sup>24</sup>  $\log \varepsilon = 4.38$  (Eichfaktor = 0.755), was unserem Wert für Quercetin entspricht. KING UND WHITE<sup>25</sup> gaben für Quercetin  $\log \varepsilon = 4.37$  an.

Soweit für andere Flavon(ol)e keine einwandfrei reinen Substanzen zur Verfügung stehen, erscheint es uns am günstigsten, aus der Literatur<sup>23</sup> einen zuverlässig erscheinenden  $\log \varepsilon$ -Wert zu entnehmen und aus ihm den benötigten Eichfaktor zu berechnen.

So verwendeten wir folgende Eichfaktoren (0.1 mg/10 ml Methanol):

		<i>log ε</i>
Kämpferol	0.765	4.34
Quercetin	0.790	4.378
Myricetin	0.705	4.35
Isorhamnetin <sup>24</sup>	0.755	4.38
Apigenin <sup>26</sup>	0.775	4.32
Luteolin <sup>27</sup>	0.800	4.36

Bei quantitativen Angaben sollte man dann neben dem verwendeten Maximum des Spektrums auch diesen Eichfaktor (bzw.  $\log \varepsilon$ -Wert) angeben!

### DANK

Die Arbeit wurde durch Sachmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und durch Lösungsmittel-Spenden des Fonds der Chemischen Industrie gefördert, wofür an dieser Stelle herzlichst gedankt sei. Den Herren ELOESSER und WÖLDECKE danken wir für fruchtbare Diskussionen.

### ZUSAMMENFASSUNG

Die mitgeteilte Methode ermöglicht es, Flavonole und Flavone in Nutzpflanzen und Lebensmitteln in Konzentrationen bis zu 10 mg/1000 g Frischsubstanz exakt quantitativ zu bestimmen. Die zerkleinerten Pflanzenteile werden mit Methanol erschöpfend extrahiert, die Extrakte mit Petroläther (Sdp. 40–70°) ausgezogen und anschliessend mit Hilfe einer Polyamid-Säule gereinigt. Danach erfolgt eine Hydro-

lyse der Glykoside mit 1%iger methanolischer Schwefelsäure und ein qualitativer dünnschichtchromatographischer Nachweis der enthaltenen Aglykone. Eine für quantitative Arbeiten ausreichende Trennung der Flavon(ol)e wird nach strichförmigem Auftragen auf Cellulose-Platten in Chloroform–Ameisensäure–Wasser (50:45:5) erzielt. Die abgelösten Substanzen können dann photometrisch bestimmt werden.

## LITERATUR

- 1 W. HEIMANN, K. HERRMANN UND G. FEUCHT, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 145 (1971) 199.
- 2 W.-G. BERGER UND K. HERRMANN, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 146 (1971) 266.
- 3 J. B. HARBORNE, *J. Chromatogr.*, 2 (1959) 581.
- 4 T. A. GEISSMAN, *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, Pergamon, Oxford, London, New York, Paris, 1962.
- 5 J. B. HARBORNE, *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, New York, 1964.
- 6 J. B. HARBORNE, *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, Academic Press, London, New York, 1967.
- 7 K. HERRMANN, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 144 (1970) 191.
- 8 T. J. MABRY, K. R. MARKHAM UND M. B. THOMAS, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970.
- 9 M. WORKMAN, *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 83 (1963) 149.
- 10 J. R. L. WALKER, *N.Z. J. Sci.*, 7 (1964) 585.
- 11 G. B. SAMORODOVA-BIANKI, *Sov. Plant Physiol. (Engl. Transl.)*, 12 (1965) 180.
- 12 G. A. LUKOVNIKOVA, *Appl. Biochem. Mikrobiol. USSR (Engl. Transl.)*, 1 (1965) 458.
- 13 G. B. SAMORODOVA-BIANKI UND N. T. KULIKOVA, *Sov. Plant Physiol. (Engl. Transl.)*, 13 (1966) 639.
- 14 K. S. SZOTYORI UND E. W. JURICS, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 135 (1967) 192.
- 15 A. D. MORTON, *J. Food Technol.*, 3 (1968) 269.
- 16 M. FLANZY UND M. BOURZEIX, *Qual. Plant. Mater. Veg.*, 16 (1968) 297.
- 17 YU. G. SKORIKOVA UND E. P. LYASHENKO, *Tr. Krasnodar. Nauch-Issled. Inst. Pishch. Prom.*, 5 (1968) 154; *Food Sci. Technol. Abstr.*, 3 (1971) 11 H 1680.
- 18 M. A. BOKUCHAVA, G. G. VALUIKO, M. S. UL'YANOVA UND Z. SH. STURUA, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 7 (1971) 503.
- 19 H. A. W. BLUNDSTONE UND D. E. C. CREAN, *The Pigment of Red Fruits*, Report Fruit Veg. Preserv. Res. Ass., Chipping Campden, 1966.
- 20 W. WILDANGER UND K. HERRMANN, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 151 (1973) im Druck.
- 21 W. WILDANGER, *Dissertation*, Technische Universität Hannover, 1972.
- 22 J. B. HARBORNE, *Phytochemistry*, 4 (1965) 107.
- 23 *Organic Electronic Spectral Data*, III–VII (1956–1965).
- 24 K. V. RAO UND P. K. BOSE, *J. Indian Chem. Soc.*, 36 (1959) 358.
- 25 H. G. C. KING UND T. WHITE, *J. Chem. Soc. (London)*, (1957) 3901.
- 26 W. BAKER, A. C. M. FINCH, W. D. OLLIS UND K. W. ROBINSON, *J. Chem. Soc. (London)*, (1963) 1477.
- 27 M. ARITOMI, *Chem. Pharm. Bull.*, 12 (1964) 841.