© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Ber. nat.-med. Verein Innsbruck	Band 79	S. 49 – 55	Innsbruck, Okt. 1992

Chemosystematische Analysen mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) *)

von

Franz HADACEK **)

Chemotaxonomic Investigations with High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).

Synopsis: HPLC combined with UV-photodiode array detection is a powerful tool in comparative plant analysis. The different accumulation patterns of polyacetylenes, alkylbutenolides, coumarins and chromones in the underground parts of thirteen Europaean *Peucedanum* s.l. species could be demonstrated on the basis of the characteristic HPLC-retention times and UV-spectra of the single compounds. The relevance of these results for the taxonomy of *Peucedanum* is briefly discussed.

Bereits DE CANDOLLE (1816) hat darauf hingewiesen, daß im Pflanzenreich Formverwandtschaft häufig auch mit Wirkstoffverwandtschaft gekoppelt sein kann. Pflanzeninhaltsstoffe werden daher immer wieder zur Klärung systematischer Fragestellungen herangezogen.

In diesem Zusammenhang stehen hauptsächlich pflanzliche Sekundärstoffe im Mittelpunkt der Betrachtungen. Es handelt sich dabei um Verbindungen, die für Wachstum und Entwicklung der Pflanze entbehrlich, dagegen aber für den Fortbestand im Ökosystem von großer Bedeutung sein können (HARTMANN, 1985).

Peucedanum L. zählt wohl zu den taxonomisch komplexesten Gattungen innerhalb der Apiaceae-Apioideae (SOLOV'EVA et al., 1985). Die Mannigfaltigkeitszentren befinden sich in Europa, Westasien und Afrika. Die innerhalb dieses Formenkreises früher zu *Peucedanum* gezählten nordamerikanischen Arten wurden jedoch schon zu Beginn dieses Jahrhunderts von COULTER & ROSE (1900) in die eigene Gattung *Lomatium* RAFIN. ausgegliedert. Für die Zuordnung der über 100 Arten sind bis heute die am Rücken abgeflachten, am Rande breit geflügelten Früchte ausschlaggebend. Aufgrund der auffälligen Unterschiede in anderen Merkmalsbereichen (Blattschnitt, Petalenfarbe und -form, Infloreszenzaufbau etc.) wird *Peucedanum* s.l. heute allgemein zu den phyletisch stark uneinheitlichen Gattungen innerhalb der Apiaceae gezählt (FREY, 1989). An diesem Beispiel soll aufgezeigt werden, welche Beiträge vergleichend phytochemische Untersuchungen zur Taxonomie schwieriger Formenkreise liefern können.

1. Material und Methode:

13 verschiedene *Peucedanum*-Arten – auch verschiedene Herkünfte ein und derselben Species – wurden im blühenden Zustand an natürlichen Standorten aus Österreich (detaillierte Auflistung vgl. HADACEK, 1989) und angrenzenden Ländern aufgesammelt. Die unterirdischen Organe wurden mit Petrolether/Diethylethergemischen (2:1) bei Raumtemperatur etwa zwei Tage lang extrahiert.

---

*) Vortrag, gehalten im Rahmen des 5. Österreichischen Botanikertreffens in Innsbruck, 25. - 28. Mai 1989.

**) Anschrift des Verfassers: Dr. F. Hadacek, Institut für Botanik der Universität Wien, Rennweg 14, A-1030 Wien, Österreich.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Für die vergleichende Analyse der verschiedenen Arten bzw. Herkünfte wurde die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Hewlett Packard 1090 M mit UV-Diodenarraydetektor; Säule: Spherisorb S5 ODS2 250 x 4 mm Methanol/Wasser [60/40 auf 100/0] in 17 min) eingesetzt (Abb. 1). Die Detektion erfolgte bei 230 nm. Da bei dieser Wellenlänge alle im Rahmen dieser Untersuchung berücksichtigten Stoffklassen absorbieren, ist eine verläßliche Detektion aller Verbindungen gewährleistet. Die vom UV-Diodenarraydetektor simultan mitgelieferten UV-Spektren im Bereich von 200 bis 400 nm erleichtern in hohem Ausmaß die Identifizierung der nach einer charakteristischen Retentionszeit eluierten Substanzen (Abb. 2). Gerade bei Polyacetylenverbindungen können die UV-Spektren eine hohe Aussagekraft aufweisen (HADACEK et al., 1988). Für analytische HPLC-Untersuchungen reichen allgemein bereits schon Extraktmengen im µg-Bereich aus. Dies erleichtert vor allem breite, vergleichende Untersuchungen, die als Grundlage für chemotaxonomische Aussagen unentbehrlich sind.

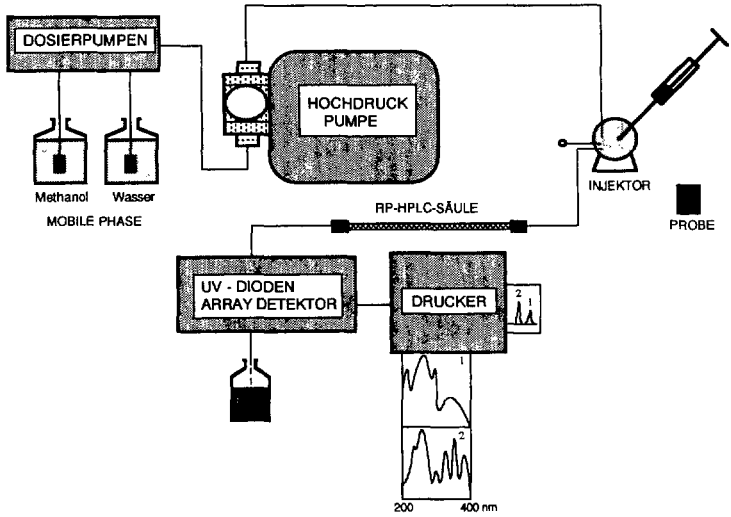


Abb. 1: Integrierte HPLC-Anlage für die optimale Analyse von Pflanzenextrakten (reversed phase [RP] = modifiziertes Kieselgel, das im Vergleich zum "normalen" Kieselgel eine mehr oder weniger umgekehrte Elutionsfolge der Einzelverbindungen sowie andere Trenneigenschaften aufweist; aufgrund der kleinen Teilchengröße des Säulenfüllmaterials (5 µm) sind Betriebsdrücke bis 200 bar notwendig; Steuerung und Meßdatenverwaltung erfolgen über einen Computer).

Eine wichtige Voraussetzung für die Auswertung von HPLC-Chromatogrammen ist jedoch das Vorhandensein einer UV-Spektrenbibliothek. Dies ist eine Datenbank, die sowohl Rententionszeiten als auch UV-Spektren von Substanzen enthält, deren Struktur durch Kernresonanz-, Massen- bzw. Infrarotspektroskopie abgesichert ist. Für die vergleichenden Analysen bei *Peucedanum* war es daher notwendig, eine entsprechende Spektrenbibliothek aufzubauen.

2. Ergebnisse und Diskussion:

Aus 13 *Peucedanum*-Arten konnten 49 verschiedene Verbindungen aus vier verschiedenen Stoffklassen isoliert und identifiziert werden (HADACEK, 1989). Eine Übersicht über die einzelnen Strukturtypen geben Abb. 3 und Abb. 4. Etwas mehr als die Hälfte der im Rahmen dieser Untersuchung identifizierten Verbindungen werden zu den Cumarinen gerechnet. Es handelt sich dabei um eine Stoffklasse mit fast 1000 bekannten Derivaten, deren Vorstufe im Rahmen des Shikimisäureweges gebildet werden (vgl. MURRAY et al., 1982). Obwohl Cumarine im Pflanzenreich relativ weit verbreitet sind, kommt es jedoch nur innerhalb der *Rutaceae* und *Apiaceae* durch Anlagerung eines Furan- oder Pyranringes zur Ausbildung einer großen Vielzahl von Derivaten. Die — wie

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

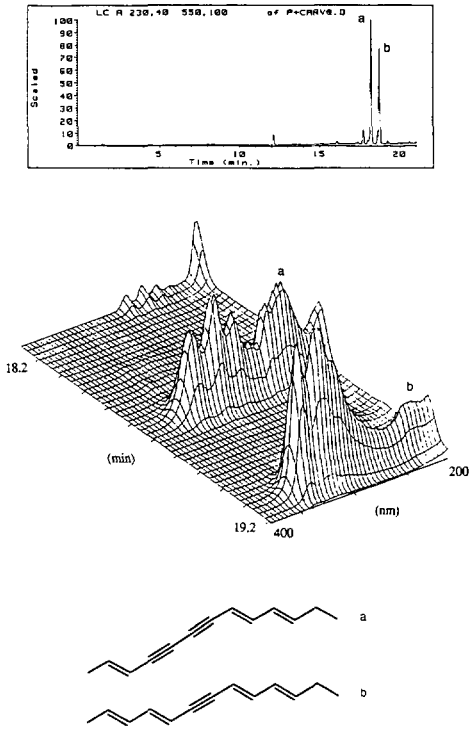


Abb. 2: Zusätzlich zu dem herkömmlichen Chromatogramm (oben) mißt der UV-Diodenarray-Detektor auch die UV-Spektren im Bereich von 200 bis 400 nm (vgl. dreidimensionale Darstellung des Chromatogramms). In vielen Fällen geben diese Spektren bereits erste Hinweise auf eine bestimmte Stoffklasse. Die einzelnen Derivate sind dann darüberhinaus durch charakteristische Retentionszeiten gekennzeichnet. In welchem Ausmaß chromophore Gruppen (konjugierte Doppel- und Dreifachbindungen) das UV-Spektrum beeinflussen können, ist gut am Beispiel der strukturell nahe verwandten Polyacetylene Trideca-en-diin-dien (a) und Trideca-dien-in-dien (b) zu sehen.

in zunehmendem Ausmaß bekannt wird (vgl. SAENGCHANTARA & WALLACE, 1986) – ebenfalls bei den *Apiacae* und *Rutaceae* verbreiteten Chromone mit einer Mehtylgruppe an Position 2 sind aus Acetateinheiten aufgebaut (vgl. HEGNAUER, 1978). Die im Rahmen des Fettsäurestoffwechsels gebildete Ölsäure konnte als Schlüsselverbindung zu den heute etwa 700 bekannten Polyacetylenderivaten identifiziert werden. Durch Anlagerung einer Pyruvateinheit an den Säurerest der Ölsäure können in der Folge auch Alkylbutenolide entstehen (vgl. BOHLMANN, 1988). Aus systematischer Sicht könnte den Butenoliden aufgrund ihres – nach dem derzeitigen Kenntnisstand – beschränkten Vorkommens auf nur zwei Gattungen innerhalb der Apiaceae eine besondere Bedeutung zukommen (HADACEK et al., 1987).

Bei chemotaxonomischen Überlegungen wird von der Tatsache ausgegangen, daß verwandte Arten auch durch ähnliche Stoffmuster gekennzeichnet sein sollten. Hier erweist sich ein Vergleich von verschiedenen Stoffklassen als vorteilhaft. Es kann nämlich durchaus vorkommen, daß zwar die Fähigkeit zur Biosynthese einer bestimmten Stoffklasse vorhanden ist, die Fähigkeit zur Akkumulation derselben aber abhanden gekommen ist und sie daher mit gängigen Nachweismethoden nicht erfaßt werden kann. Demnach kann erst nach der Analyse einer größeren Anzahl verwandter

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

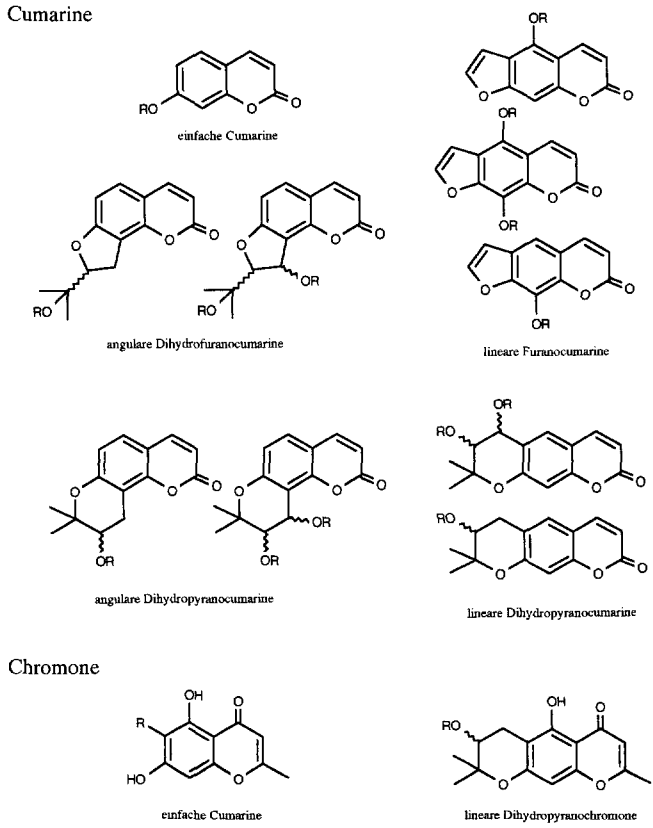


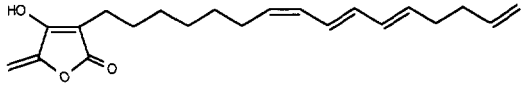
Abb. 3: Cumarine und Chromone aus *Peucedanum*.

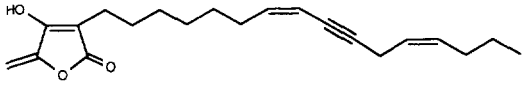
Sippen deren biogenetische Kapazität (GREGER, 1985) umrissen werden. Abb. 5 gibt eine Zusammenstellung über die Verbreitung der verschiedenen Stoffklassen in den hier untersuchten *Peucedanum*-Arten.

Die größte Mannigfaltigkeit an Inhaltsstoffen ist bei *P. austriacum* (JACQ.) KOCH und dem nahe verwandten *P. rablense* (WULFEN) KOCH zu beobachten. Neben Butenoliden und C_{13}-Acetylenen (Aethusine) werden auch lineare Dihydropyranochromone und angulare Dihydropyranocumarine akkumuliert. Im Gegensatz dazu sind bei den Artenpaaren *P. carvifolia* VILL. und *P. schottii* BESSER sowie *P. alsaticum* L. und *P. venetum* (SPRENG.) KOCH einerseits nur mehr C_{13}-Acetylene, andererseits nur mehr Alkylbutenolide zu sehen. Die Tatsache, daß bei *P. venetum* in Spuren auch ein C_{13}-Acetylen festgestellt werden konnte, könnte als ein weiterer Hinweis auf eine gemeinsame Biosynthesekapazität dieser Sippen betrachtet werden. Auch *P. arenarium* W. & K. weist durch die Akkumulation von Butenoliden Gemeinsamkeiten mit den vorhin aufgezählten Arten auf. Die Dihydropyranocumarine sind hier aber nicht vom angularen Typ, sondern vom bisher nur von wenigen Apiaceen bekannten linearen Typ. Dies würde auch für einen möglicherweise stärker abgeleiteten Charakter dieser Sippe sprechen. Überraschenderweise zeigt *P. verticillare* (L.) KOCH trotz kaum vorhandener morphologischer Ähnlichkeiten große Übereinstimmungen mit *P. austriacum*. Abgesehen von den Butenoliden und Chromonen, die hier offenbar nicht akku-

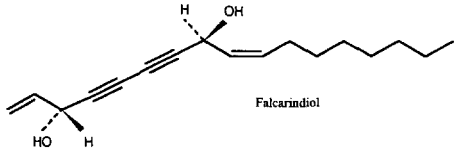
© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Alkylbutenolide



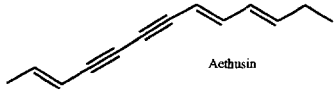


Falcarinole (C_{17}-Polyacetylene)



Falcarindiol

Aethusine (C_{13}-Polyacetylene)



Aethusin

Abb. 4: Butenolide und Polyacetylene aus *Peucedanum.*

muliert werden, sind die Polyacetylene (Aethusine und Falcarinole) und angularen Dihydropyranocumarine sogar bis auf alle Derivate identisch. Ob es sich in diesem Fallum wirkliche Verwandtschaft oder um Konvergenz handelt, kann aufgrund des derzeitigen Kenntnisstandes noch nicht eindeutig entschieden werden.

Die restlichen 5 Arten lassen zu den bisher genannten bezüglich ihrer Stoffmuster kaum Beziehungen erkennen. Der heterogene Charakter dieser Gattung tritt schon bei der Typusart, *P. officinale* L., zutage. Ihr Stoffmuster läßt sich kaum mit den anderen untersuchten Arten in Einklang bringen. In diesem Sinne hat bereits PIMENOV (1987) angeregt, die unmittelbar nächst verwandten Arten von *P. officinale* bei *Peucedanum* zu belassen und die restlichen in eine Reihe kleinerer, mehr auf natürlichen Verwandtschaftsbeziehungen basierenden Gattungen zu stellen. *P. ostruthium*(L.) KOCH und *P. palustre* (L.) MOENCH zeigen, abgesehen von der Akkumulation der innerhalb der Apiaceen relativ weit verbreiteten linearen Furanocumarine, kaum Ähnlichkeiten zu *P. officinale.* Beide Arten wurden jedoch schon mehrmals von verschiedenen Autoren in eigene Gattungen gestellt (CALESTANI, 1905; THELLUNG, 1925 - 26; LEUTE, 1966). Weiters ist bei *P.cervaria* (L.) LAPEYR. und *P. oreoselinum* (L.) MOENCH, die beide aufgrund morphologischerÄhnlichkeiten gemeinsam in der Sektion *Oreoselinum* (ADANS.) RCHB. (vgl. THELLUNG,1925 - 26) gestellt worden sind, nicht jene Übereinstimmung zu beobachten, die z.B. bei den ebenfalls in eigenen Sektionen vereinigten Artenpaaren *P. austriacum* und *P. rablense, P. carvifolia* und *P. schottii* sowie *P. alsaticum* und *P. venetum* durchaus vorhanden ist. *P. oreoselinum* unterscheidet sich durch die Akkumulation einer eigenen Serie von angularen Dihydrofuranocumarinen deutlich von allen anderen hier behandelten Arten. Die in der letztgenannten Art nur schwach akkumulierten C_{17}-Polyacetylene (Falcarinole) dominieren in *P. cervaria.* Dafür konnten die angularen Dihydrofuranocumarine hier nicht nachgewiesen werden.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

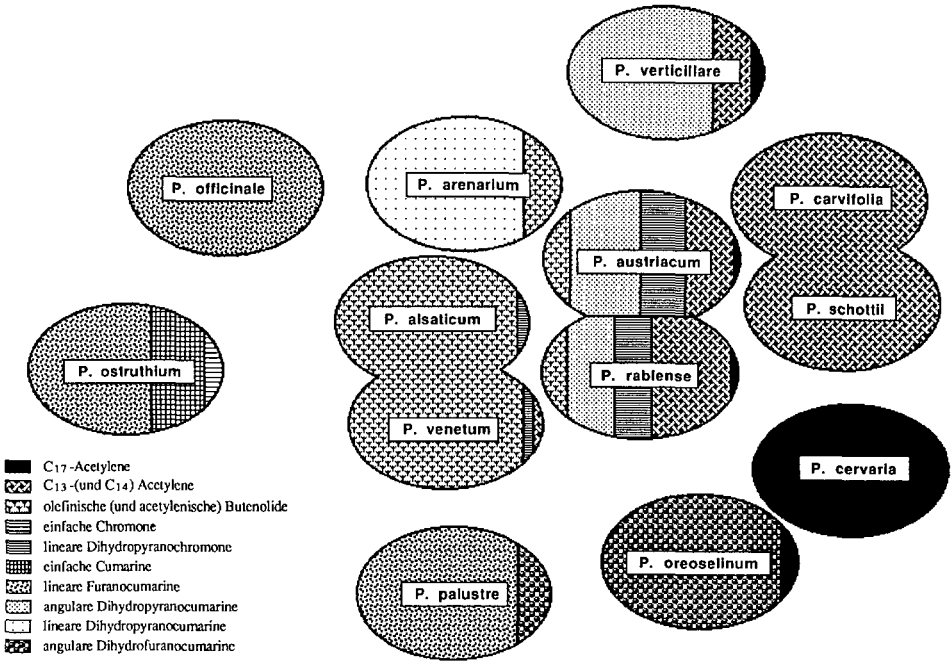


Abb. 5: Akkumulationstendenzen von Polyacetylenen, Butenoliden, Chromonen und Cumarinen in den unterirdischen Organen der 13 untersuchten *Peucedanum*-Arten.

Die Hinweise, die sich im Rahmen dieser Studie ergeben haben, reichen jedoch bei weitem noch nicht für eine grundlegende Revision der komplexen Gattung *Peucedanum* aus. Obwohl ein Großteil derjenigen Arten, die die Grundlage für frühere Bearbeitungen gebildet haben, berücksichtigt worden ist, handelt es sich hier nur um einen Bruchteil dieser großen Gattung. Die erhaltenen Ergebnisse geben aber Berechtigung zu der Annahme, daß die Untersuchung weiterer, aus dem Mediterrangebiet und Westasien stammender Sippen durchaus neue Erkenntnisse über die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse in diesem Formenkreis liefern könnte.

Dank: Diese Arbeit wurde vor allem durch die finanzielle Unterstützung der Hochschuljubiläumsstiftung der Stadt Wien und durch den Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt 5840) in diesem Ausmaß ermöglicht.

3. Literatur:

BOHLMANN, F. (1988): Naturally-Occuring Acetylenes. — In: J. LAM, H. BRETELER, T. ARNASON & L. HANSEN (Eds.): Chemistry and Biology of Naturally-Occuring Acetylenes and Related Compounds, p. 1 - 21. Elsevier, Amsterdam — Oxford.

CALESTANI, V. (1905): Conspectus specierum europaearum generis Peucedani. — Bull. Soc. bot. Ital., 1905: 193 -201.

COULTER, J.M., J.N. ROSE (1900): Monograph of the North american Umbelliferae. — Contr. U.S. Natl. Herb., **7:** 1 - 263.

DE CANDOLLE, A.P. (1816): Essai sur les propriétés médicales des plantes. Crochard, Paris.

FREY, R. (1989): Taxonomische Revision der Gattung Peucedanum: Sektion Peucedanum & Sektion Palimbioidea (Umbelliferae). — Candollea, **44:** 257 - 327.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

HADACEK, F. (1989): Vergleichende phytochemische Untersuchungen in der Gattung *Peucedanum* (Apiaceae-Apioideae). – Stapfia, Linz, **18:** 1 - 186.

HADACEK, F., H. GREGER, M. GRENZ, F. BOHLMANN (1987): Olefinic and acetylenic butenolides from *Peucedanum alsaticum.* – Phytochemistry, *26:* 1527 - 1529.

HADACEK, F., A. WERNER, H. GREGER, (1988): Computerized HPLC-diode array screening on characteristic acetylene patterns within Peucedanum (Umbelliferae-Apioideae). – In: J. LAM, H. BRETELER, T. ARNASON & L. HANSEN (Eds.): Chemistry and Biology of Naturally-Occuring Acetylenes and Related Compunds, p. 107 - 114, Elsevier, Amsterdam – Oxford.

HARTMANN, T. (1985): Prinzipien des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. – Pl. Syst. Evol., *150:* 15 - 34.

HEGNAUER, R. (1978): Phytochemie und Klassifikation der Umbelliferen, eine Neubewertung im Lichte der seit 1972 bekannt gewordenen phytochemischen Tatsachen.- In: A.-M. CAUWET-MARC & J. CARBONNIER (Eds.): Les Ombellifères, Perpignan 1977, p. 355 - 364.

LEUTE, G.-H. (1966): Die Gattungen *Imperatoria* L. und *Tommasinia* BERTOL. (Apiaceae). – Ann. Naturhist. Mus. Wien, **69:** 69 - 73.

MURRAY, R.D.H., J. MENDEZ, S.A. BROWN (1982): The Natural Coumarins. Occurence, Chemistry and Biochemistry. John Wiley & Sons, Chicester, New York.

SAENGCHANTARA, S.T., T.W. WALLACE (1986): Chromanols, chromanones and chromones. – Nat. Prod. Rep., **5:** 465 - 475.

SOLOV'EVA, N.M., M.G. PIMENOV, M.G. VASILÉVA, N.M. ZIGAREVA, V.D. TURKOV, (1985): Karyotaxonomic study of some species of *Peucedanum.* – Pl. Syst. Evol., **151:** 89 - 101.

THELLUNG, A. (1925-26): Umbelliferae. – In: G. HEGI: Illustrierte Flora von Mitteleuropa, p. 936 - 1537, J.F. Lehmanns, München.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte des naturwissenschaftlichen-medizinischen Verein Innsbruck

Jahr/Year: 1992

Band/Volume: 79

Autor(en)/Author(s): Hadacek Franz

Artikel/Article: Chemosystematische Analysen mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). 49-55