

DIE VERBREITUNG DER BLAUSÄURE BEI DEN CORMOPHYTEN. 16. MITTEILUNG¹. ÜBER CYANOGENESE BEI DEN *HALORAGACEAE*

LUCIE H. FIKENSCHER und R. HEGNAUER

*Laboratorium voor Experimentele Plantensystematiek,
Schelpenkade 14a, 2313 ZT Leiden (Netherlands)*

ABSTRACT.—The cyanogenic glucoside of *Haloragis erecta* was identified with lotaustralin. Lotaustralin was not accompanied by linamarin in the material of this taxon investigated by us. Literature concerning cyanogenesis in *Haloragaceae* was reviewed (table 1), and available members of this family were investigated for the presence of cyanogenic compounds (table 2). Many species of the family seem to produce small to moderate amounts of cyanogenic glucosides, but often the hydrolyzing enzyme is only weakly active or lacks totally. Linamarase, but not emulsin, does hydrolyze the cyanogenic compounds of *Haloragaceae*.

Zu den *Haloragaceae* gehören nach Orchard (1,2,3) die Gattungen *Glischrocaryon* Endl. (= *Loudonia* Lindl.: 4 Arten in Australien), *Gonocarpus* Thunb. (= *Haloragis* p.p.: 36 Arten in Australien, Neuseeland, Indonesien und Südostasien), *Haloragis* Forst. et Forst.f. (= *Cercodia* Banks ex Murr.: 26 Arten in Australien und Neuseeland), *Haloragodendron* Orchard (= *Haloragis* p.p.: 5 Arten in Australien), *Laurembergia* Bergius (4 Arten; Südafrika, Madagaskar, Tropisch Asien und Südamerika), *Meziella* Schindl. (1 Art in Australien), *Myriophyllum* L. (etwa 50 Arten; kosmopolitisch) und *Proserpinaca* L. (2–4 Arten in Nordamerika). Gewisse Arten der Familie sind giftverdächtig; in einigen Fällen wurden blausäureabspaltende Verbindungen als toxische Bestandteile angenommen [4,5,6,7,8]. Tatsächlich konnte für eine Reihe von Sippen Cyanogenese festgestellt werden (tabelle 1), ohne dass damit die Frage der Toxizität der betreffenden Pflanzen restlos geklärt wäre (5,7). In Neuseeland ist beispielsweise die relativ stark cyanogene Sippe *Haloragis erecta* verbreitet; es ist aber nichts von einer Giftigkeit dieser Pflanze für das Vieh bekannt (9).

Im Rahmen unserer Cyanogenese-Untersuchungen haben wir uns ebenfalls mit den Haloragaceen befasst. Wir überprüften bei allen verfügbaren Sippen die Bedingungen, unter welchen Cyanogenese auftritt (tabelle 2). Ausserdem wurde die cyanogene Verbindung von *Haloragis* subsp. *erecta* als Lotaustralin erkannt.

Aus tabelle 2 ist ersichtlich, dass die meisten geprüften Haloragaceen schwach cyanogen sind, und dass zuweilen das für spontane Cyanogenese verantwortliche Enzym vollständig fehlt (*H. colensoi*). Ferner geht aus dem Verhalten von *H. colensoi* hervor, dass die cyanogenen Verbindungen von *Haloragis*-Arten nur durch Linamarase, nicht aber durch Emulsin, gespalten werden. Nachdem einmal Lotaustralin in der Familie festgestellt worden war, überprüften wir unter Verwendung von Linamarase Herbariummaterial von drei *Myriophyllum*-Arten auf Abgabe von Blausäure. Alle waren sehr schwach (aber deutlich) bis schwach cyanogen. Bei *M. brasiliense* handelt es sich um das gleiche Material, in welchem früher (11) 1.8 mg Blausäure pro kg Frischpflanze gefunden worden war. Damals (11) wurde auch *M. spicatum* (5 g frisches blühendes Kraut) mit negativem Ergebnis auf Cyanogenese geprüft. Offensichtlich sind ebenfalls in der Gattung *Myriophyllum* die glykosid-spaltenden Enzyme oft nur wenig oder überhaupt nicht aktiv. Das geht aus dem Verhalten der geprüften Herbariumpflanzen hervor; sie lieferten nach Zufügen von Linamarase mehr Blausäure als im Jahre 1958 ohne Verwendung von Enzym geprüfte Frischpflanzen.

Zur Identifikation der vorhandenen cyanogenen Verbindungen wurden zwei

¹15. Mitteilung siehe [17].

TABELLE 1. Cyanogenese bei den *Haloragaceae*. Eine Literaturzusammenfassung.

| Jahr | Autor | Cyanogene Sippe ¹ | Bemerkungen | Richtiger Sippenname nach Orchard ² (1,3) |
|------|----------------------|---|---|--|
| 1913 | Mirande (10) | <i>Haloragis alata</i> Jacq. (= <i>Cercodia erecta</i> Murr.) | Ganzpflanze | <i>H. erecta</i> (Banks ex Murr.) |
| 1929 | Anonymous (4) | <i>Haloragis</i> spec. indet. | 6 Muster waren cyanogen | Eiehl. subsp. <i>erecta</i> |
| 1942 | Hurst (5) | <i>Haloragis</i> spec. indet. | trockene Pflanzen aus der Gegend von Cobar: 0.017% HCN | --- |
| 1956 | Gardner-Bennetts (6) | <i>Haloragis</i> cf. <i>heterophylla</i> Brongn. | trockene Pflanzen aus der Gegend von Narellan: 0.019% HCN | --- |
| 1958 | Hegnauer (11) | <i>Louduonia roei</i> (Fendl.) Schltdl. | Pflanze toxisch und cyanogen | <i>Glischrocaryon roei</i> Endl. |
| 1974 | Gibbs (12) | <i>Myriophyllum brasiliense</i> Camb. <i>Haloragis alata</i> | 1.8 mg HCN/kg Frischpflanze Blätter | <i>M. aquaticum</i> (Vellozo) Verdcourt <i>H. erecta</i> (Banks ex Murr.) |
| | | <i>H. erecta</i> | Keimpflanzen | Eiehl. subsp. <i>erecta</i> |
| | | <i>H. micrantha</i> | Keimpflanzen, Blätter | Eiehl. subsp. <i>erecta</i> |
| | | <i>H. tetragyna</i> | beblätterte Stengel | <i>Gonocarpus micranthus</i> Thunb. |
| | | <i>Louduonia roei</i> | beblätterte Stengel | <i>Gonocarpus tetragyna</i> Labill. |
| | | <i>Myriophyllum proserpinacoides</i> | Ganzpflanze | <i>Glischrocaryon roei</i> Endl. |
| | | <i>M. tenellum</i> | Ganzpflanze (zweifelhafte Reaktion: Guignard-Test + Emulsion) | <i>M. aquaticum</i> (Vellozo) Verdcourt <i>M. tenellum</i> Bigel |
| 1975 | Aplin [8] | <i>Glischrocaryon aureum</i> (Lindl.) Orchard <i>G. roei</i> Endl. | Ganzpflanze, Blüten Ganzpflanze | --- |

¹Durch die Verfasser verwendete Namen.²Im Falle von *Myriophyllum tenellum* nach Scoggan [13].

TABELLE 2. Prüfung der Haloragaceen auf Cyanogenese.

| Ausführungsdatum | Geprüftes Material | Stippe und Herbarnummer | Ort und Datum des Einsammelns | Feigl-Anger-Probel | |
|------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| | | | | ohne Enzym | + Emulsin ² + Linamarase |
| 8. 5. 1978 | Droge ¹ , ca 1 g | <i>Gonocarpus tetragynus</i> Labillard.: 27759 | S. E., Australien; 13. 12. 1978 | — | — |
| 15. 7. 1979 | Keimpflanzen | <i>Haloragis erecta</i> (Banks ex Murr.) Eichl.: 27950 | Gewächshaus; 15. 7. 1979 | — | (+) |
| 9. 11. 1979 | Blätter von Herbarpflanze; ca 100 mg | <i>Gonocarpus tetragynus</i> : 27739 | — | — | 0 |
| 9. 11. 1979 | Droge; ca 1 g | <i>Haloragidendron</i> spec. indet.: 27725 | Unbekannt ⁴ | — | 0 |
| 9. 11. 1979 | Blätter von Herbarpflanze; ca 1 g | <i>Haloragis erecta</i> subsp. <i>erecta</i> : 27741 | Auckland, Neuseeland; Okt.-Nov. 1977 | — | — |
| 9. 11. 1979 | Droge; ca 2 g | <i>Haloragis erecta</i> : 27741 | — | — | ++ |
| Oktober 1980 | Frische Blätter; ca 1 g | <i>Haloragis erecta</i> : 27950 | Oktober 1980 | — | ++ |
| Oktober 1980 | Droge; ca 500 mg | <i>Haloragis erecta</i> : 27741 | — | — | + |
| 31. 3. 1981 | Keimpflanzen | <i>Haloragis colensoi</i> Skottsb.: 28383 | Gewächshaus | — | + |
| 7. 4. 1981 | Droge; ca 2 g | <i>Gonocarpus tetragynus</i> : 27739 | — | 0 | 0 |
| 7. 4. 1981 | Herbarpflanze; ca 100 mg | <i>Myriophyllum verticillatum</i> L.: 9951 + 14905 | Aardam, N.L.; 26. 6. 1961 | — | (+) |
| 7. 4. 1981 | Herbarpflanze; ca 100 mg | <i>Myriophyllum sibiricum</i> L.: 17785 | Pavia, Italia; 10. 9. 1969 | — | — |
| 7. 4. 1981 | Herbarpflanze; ca 100 mg | <i>Myriophyllum brasiliense</i> Camb.: 9944 | Leiden, N.L.; 15. 6. 1955 | — | — |
| 7. 4. 1981 | Droge; ca 1 g | <i>Haloragidendron</i> spec. indet.: 27725 | — | — | ++ |

¹Beobachtungszeit nicht einheitlich, 40-72 Stunden. — = nicht ausgeführt; 0 = negativ; (+) = Spuren (ca 1 µg HCN); += Probe schwach positiv (2-4 µg HCN); +++ = Probe positiv (5-10 µg HCN).

²Erst während der Isolation von Lofaustralin wurde erkannt, dass bei den Haloragaceen Emulsin keine Wirkung auf die cyanogenen Verbindungen hat. In dieser Kolonne erwähnte Cyanogenese beruht auf pflanzeneigenem Enzym.

³Droge bedeutet getrocknete Pflanzen; entsprechendes Herbariummaterial vorhanden.

⁴Erhalten von Herrn J. R. Jensen.

⁵Nach Orehard (!) synonym mit *H. erecta*.

⁶Synonym mit *M. aquaticum* (Vellozo) Verdcourt [3].

Herkünfte von *Haloragis erecta* verwendet. Die eine bestand aus getrockneten beblätterten Zweigen von nichtblühenden Pflanzen, welche in Neuseeland eingesammelt worden waren. Die zweite Probe bestand aus frischen nichtblühenden Pflanzen, welche aus Samen aufgezogen worden waren. Beide Muster waren mit oder ohne Zufügung von Emulsin schwach cyanogen, was darauf hinwies, dass Emulsin keinen Einfluss auf die Cyanogenese hatte. Prüfung von konzentrierten Alkoholextrakten zeigte, dass die vorhandenen cyanogenen Glykoside durch Emulsin nicht gespalten werden; Linamarase spaltete dagegen schnell. Aus 25 g trockenen Blättern des Musters von Neuseeland konnten 35 mg weitgehend gereinigtes Glykosid gewonnen werden. Mit chromatographischen Methoden (Papier-, Dünnschicht- und Gaschromatographie) liess sich nur eine cyanogene Verbindung nachweisen. Sie wurde anhand von Rf-Werten, Retentionszeit und der Spaltprodukte HCN, Glucose und Methyläthylketon (Dinitrophenylhydrazon) und aufgrund des Verhaltens gegen Emulsin und Linamarase mit Lotaustralin identifiziert. Im Rohglucosidpräparat aus 140 g Frischpflanze (zweite Herkunft) konnte ebenfalls ausschliesslich Lotaustralin nachgewiesen werden. Bei *Haloragis erecta* wird demnach Lotaustralin nicht von Linamarin begleitet. Damit ist nachgewiesen, dass die Valin-Isoleucin-Gruppe (14) der cyanogenen Verbindungen ebenfalls bei den Haloragaceen vorkommt. Da allgemein nahe Verwandtschaft zwischen Onagraceen und Haloragaceen angenommen wird, wäre es keineswegs erstaunlich, wenn die cyanogenen Onagraceen (= Oenotheraceen) (15) Glykoside der Linamarin-Lotaustralin-Gruppe bilden würden. Trotz vielen Bemühungen ist es uns bisher nicht gelungen cyanogene Vertreter der *Onagraceae* zu erhalten; alle durch uns untersuchten Vertreter dieser Familie waren nicht cyanogen.

MATERIAL UND METHODEN

VERSUCHSPFLANZEN.—Alles verwendete Pflanzenmaterial (tabelle 2) wurde im Herbarium unseres Institutes belegt: LEP-Nummern.

CYANOGENESE-TEST.—Ausgeführt wie bereits verschiedentlich beschrieben (16).

VERGLEICHSSUBSTANZEN.—Zwei aus *Linum usitatissimum* bereitete Glucosidpräparate mit unterschiedlichem Linamarin-Lotaustralin-Verhältnis; (a) 77:23 (aus erwachsenen Pflanzen); (b) 41:59 (aus Keimpflanzen).

VERWENDETE LAUFMITTEL.—(a) MeCOEt-Me₂CO-H₂O=15:5:3; (b) CHCl₃ (wassergesättigt)-MeOH=2:1; (c) MeCOEt-EtOAc-HCOOH-H₂O=5:3:2:1; (d) Ligroin (88-108°; B.D.H.)-EtOAc=67:33.

REINIGUNG DER ROHEXTRAKTE.—Präparative Papierchromatographie: Whatman 3MM; (a); 24 cm aufsteigend. Präparative Dünnschichtchromatographie: Kieselgel 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ (Merck), 0.8 mm dick; (b); 17 cm aufsteigend.

CHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE DER GLUCOSIDPRÄPARATE.—Papierchromatographie: Whatman 20; (a), (c). Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck); (b). Alufolien Cellulose (Merck): (a).

CHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE DER DINITROPHENYLHYDRAZONE.—Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck): (d).

GASCHROMATOGRAPHIE.—Gerät: Perkin Elmer 3020B FID. Kapillare SE-52 Säule; 32 m lang, 0.3 mm interner Durchmesser. Silylierung: 1 bis 2 mg Glucosid+100 μ l Tri-Syl/BSA formula D (Pierce); 18 h, 50°. Trägergas: N₂; 3 ml/min. Temperatur: Isotherm, 220°.

DANKSAGUNG

Herrn Dr. S. R. Jensen, Inst. of Organic Chemistry, Techn. University of Denmark, Lyngby, sind wir für Überlassung der getrockneten Pflanzen von Australien und Neuseeland zu grossem Dank verpflichtet. Frau Els Schlatmann danken wir für sorgfältige Wartung von Versuchspflanzen und Frau Helen de Vos für Hilfe bei den gaschromatographischen Arbeiten. Ferner danken wir der Direktion der Botanischen Gärten der Universität Utrecht für ein Samenmuster von *Haloragis erecta*.

Received 27 April 1981

ERWÄHNTE LITERATUR

1. A. E. Orchard, "Taxonomic revisions in the family Haloragaceae. I. The genera *Haloragis*, *Haloragodendron*, *Glischrocaryon*, *Meziella* and *Gonocarpus*", *Bulletin of the Auckland Institute and Museum*, Number 10 (1975), 299 pp.
2. A. E. Orchard, "Taxonomic revisions in the family Haloragaceae. II. Further notes on *Haloragis*, *Haloragodendron* and *Gonocarpus*", *Nuytsia* 2, 126-144 (1977).

3. A. E. Orchard, "Myriophyllum (Haloragaceae) in Australia. I. New Zealand: A revision of the genus and a synopsis of the family", *Brunonia* **2**, 247-287 (1979).
4. Anon., The Poison Plants Committee, *J. Council Sci. Ind. Res. Common Wealth of Australia*, **2**, 40-48 (1929).
5. Evelyn Hurst, "The poison plants of New South Wales", The Snelling Printing Works Pty. Ltd., Sydney (1942).
6. C. A. Gardner and H. W. Bennetts, "The toxic plants of Western Australia", West Australian Newspapers Ltd., Periodicals Division, Perth (1956).
7. S. L. Everist, "Poisonous plants of Australia", Angus and Robertson (Publishers) Pty. Ltd., Sydney (1974).
8. T. E. H. Aplin, "Cyanogenetic plants of Western Australia", Western Australian Dept. Agriculture, Bulletin 3967, William C. Brown Government Printer, Western Australia (1975).
9. H. E. Connor, "The poisonous plants of New Zealand", 2nd revised edition, N. Z. Dept. Sci. Ind. Res. Bull. 99, Government Printer, Wellington (1977).
10. M. Mirande, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **75**, 434 (1913).
11. R. Hegnauer, *Pharm. Weekblad*, **93**, 801 (1958).
12. R. D. Gibbs, "Chemotaxonomy of Flowering Plants", Vol. 3, p. 1481, McGill-Queen's University Press, Montreal and London (1974).
13. H. J. Scoggan, "The Flora of Canada", Part 4, 1145-1147, National Museum of Natural Sciences, Ottawa (1979).
14. R. Hegnauer, "Cyanogenic compounds as systematic markers in Tracheophyta", *Plant Syst. Evol.*, Suppl. 1, 191-209 (1977).
15. R. Hegnauer, "Chemotaxonomie der Pflanzen", Band 5, S. 225, Birkhäuser Verlag, Basel and Stuttgart (1969).
16. Lucie H. Fikenscher und R. Hegnauer, *Pharm. Weekblad*, **112**, 11 (1977).
17. Lucie H. Fikenscher, R. Hegnauer und H. W. L. Ruijgrok, "Neue Beobachtungen zur Cyanogenese bei den Rosaceen", *Planta Medica*, **41**, 313 (1981).