Ranunculus fluitans Lamk. und Rheinfallschaum - Zusammenhänge, Analytik und ökotoxikologische Bedeutung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Apotheker Christian Wegner
geboren am 29. Juni 1971 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. Matthias Hamburger
2. Prof. Dr. Bernd Luckas
3. Prof. Dr. Kurt Hostettmann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2001
Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.12.2001

Jena, im Dezember 2001

Die Deutsche Bibliothek – CIP Einheitsaufnahme

ein Titelsatz für diese Publikation ist bei der
Deutschen Bibliothek erhältlich

© 2002 **Echino**Media
Verlag Dr. Kerstin Ramm, Bürgel
Untere Zense 36, 07616 Bürgel, Tel.: 03 66 92/3 55 78, Fax: 03 66 92/3 55 77,
e-Mail: kerstin.ramm@freenet.de
www.echinomedia.de

Alle Rechte vorbehalten. Jegliche Verwendung des Werkes oder einzelner Teile davon ist nur mit schriftlicher Genehmigung des Verlages gestattet.

Fotos: M. Hamburger, B. Liebermann, K. Ramm, Ch. Wegner

ISBN 3-9807629-2-0

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Ziel 9

2. Allgemeiner Teil 11

2.1. *Ranunculus fluitans* im Hochrhein bis 1970 11

2.2. *Ranunculus fluitans* im Hochrhein ab 1970 12

3. Phytochemische Untersuchungen an *Ranunculus fluitans* Lamk. 18

3.1. Systematische Einordnung 18

3.2. Botanische Beschreibung 19

3.3. Bereits durchgeführte phytochemische Untersuchungen in der Gattung *Ranunculus* und an *R. fluitans* 19

3.4. Saponine 21
3.4.1. Definition 21
3.4.2. Extraktion 24
3.4.3. Analytische Verfahren 24
3.4.4. Isolierung 27
3.4.5. Strukturaufklärung von Saponinen 27
3.4.6. Biologische Aktivitäten 30
3.4.7. Beschriebene Saponine aus Ranunculaceen 33

3.5. Glykoglycerolipide 34
3.5.1. Definition und biologische Funktion 34
3.5.2. Extraktion 35
3.5.3. Analytische Verfahren 35
3.5.4. Isolierung 36
3.5.5. Strukturaufklärung 37
3.5.6. Biologische Aktivität 38

4. Ergebnisse 40

4.1. Voruntersuchungen 40

4.2. Isolierung und Strukturaufklärung der oberflächenaktiven Prinzipien aus *R. fluitans* 41
4.2.1. Extraktion und Isolierung 41
4.2.2. Strukturaufklärung der Saponine 47
4.2.3. Strukturaufklärung der Glykoglycerolipide 49

4.3. Analytik 51
4.3.1. Probennahmeregime 52
4.3.2. Qualitativer Vergleich der Inhaltsstoffmuster der Pflanzenproben 53
4.3.3. Nachweis der Saponine in Schaumproben 54
4.3.4. Nachweis der Saponine in Wasserproben 56

4.3.5. Anreicherung der Saponine im Schaum 57
4.3.6. Quantitative Bestimmung der Saponine 58
4.3.6.1. Bestimmung der Saponine in Rheinwasserproben aus 1998 60
4.3.6.2. Bestimmung der Saponine in Rheinwasserproben aus 2000 61
4.3.6.3. Bestimmung der Saponine in Grundwasserproben 63
4.3.6.4. Bestimmung der Saponine in Pflanzenextrakten 64

4.3.7. Nachweis der Glykoglycerolipide in Schaumproben 65
4.3.8. Nachweis der Glykoglycerolipide in Wasserproben und Methode zur Quantifizierung 66
4.3.9. Quantitative Bestimmung der Glykoglycerolipide 68
4.3.10. Einfluß weiterer Tenside 69

4.4. Ökotoxikologische Relevanz 74

5. Diskussion 79

6. Experimenteller Teil 85

6.1. Allgemeine Laborgeräte und Chemikalien 85

6.2. Chemikalien 85

6.3. Chromatografische Methoden 85
-DC
-Säulenchromatografie, VLC
-LPLC
-HPLC (analytisch und präparativ)
-Gelfiltration
-Festphasenextraktion
-LC-MS
-GC
-GC-MS

6.4. Physikochemische Methoden 88
-Schmelzpunkt
-$[\alpha]_D$
-Kapillarelektrophorese
-NMR
-Schaumbildung und -stabilität

6.5. Chemische Methoden 89
-Hydrolyse
-Methanolyse
-Zuckerderivatisierung für CE
-Proteinbestimmung

6.6. Pflanzenmaterial und Umweltproben 90

6.7. Extraktion und Isolierung 92

6.8. Physikalische Daten der isolierten Verbindungen 93

6.9. Analytik der Umweltproben 100

6.9.1. Saponinanalytik 100
6.9.2. Analytik der Glykoglycerolipide 103
6.9.3. Tensidanalytik 104

6.10. Durchführung der Bioassays 105

7. Summary 109

8. Glossar 112

9. Liste der verwendeten Literatur 114

10. Liste der Veröffentlichungen 119

1. Arbeitshypothese und Ziel

Seit Anfang der siebziger Jahre bildet sich unterhalb des Rheinfalls von Schaffhausen, Schweiz, regelmäßig während der Sommermonate (Juni bis September) ein Schaumteppich. Stabile Schaumfahnen sind auch einige Kilometer unterhalb des Rheinfalles noch zu beobachten. Abgesehen von der verständlichen Verunsicherung der Bevölkerung wirkt diese Erscheinung in einer Gegend mit hoher touristischer Attraktivität sehr störend (Fig. 1.1.). Regelmäßige Anfragen aus der Bevölkerung an die zuständigen Umweltämter und reges Interesse auch überregionaler Medien belegen diese Tatsache.

Untersuchungen des Phänomens durch die Kantonalen Laboratorien von Schaffhausen und Zürich ließen die Vermutung aufkommen, daß die Schaumbildung nicht wie zunächst angenommen durch synthetische Tenside aus Industrie- und Haushaltsabwässern, sondern durch Inhaltsstoffe des seit dem gleichen Zeitpunkt stark proliferierenden Flutenden Hahnenfußes (*Ranunculus fluitans* Lamk., Ranunculaceae) verursacht wird. Obwohl die ersten Untersuchungen in dieser Richtung bereits Mitte der siebziger Jahre durchgeführt wurden, konnte mit den damals angewandten Methoden kein eindeutiger Zusammenhang nachgewiesen werden.

Fig. 1.1. Der Rheinfall von Schaffhausen (links), Schaumfahnen ca. 2 km unterhalb des Rheinfalles an der Brücke Nohl (rechts).

Trotzdem sprachen einige Überlegungen für eine Herkunft zumindest eines Teiles der oberflächenaktiven Prinzipien, die zu dieser massiven Schaumbildung führen, aus dem Flutenden Hahnenfuß.

Bis zum Ende der sechziger Jahre war *R. fluitans* eine im Hochrhein zwar regelmäßig, jedoch nicht in Massenvorkommen erscheinende Pflanze. Diese Situation änderte sich zu diesem Zeitpunkt grundsätzlich. Eine nahezu explosive Vermehrung der Pflanze im Hochrhein zwischen Bodensee und Schaffhausen fiel zeitlich zusammen mit dem ersten Auftreten der

Schaumfahnen. Weiterhin findet die Schaumbildung lediglich im Sommer statt, parallel zur Entwicklung der Biomasse des Flutenden Hahnenfußes.

Ein zweites Argument leitet sich von chemotaxonomischen Überlegungen ab. Im Pflanzenreich sind oberflächenaktive Naturstoffe, wie z.B. Saponine, relativ weit verbreitet. Das Vorkommen von Saponinen wird als charakteristisches Merkmal der Familie der Hahnenfußgewächse betrachtet (Hegnauer, 1990). Trotzdem ist die Anzahl der aus Ranunculaceen isolierten Saponinstrukturen in Anbetracht der Größe der Familie mit ca. 2500 Arten überraschend klein. In der Gattung *Ranunculus* wurden Saponine bisher lediglich aus *R. ficaria* isoliert (Figurkin und Firgurkina, 1976). Dagegen finden sich keine Hinweise auf oberflächenaktive Naturstoffe aus weiteren im Hochrhein in relevanten Größenordnungen vorkommenden Pflanzen, wie verschiedene *Potamogeton*-Arten (Hegnauer, 1990).

Vor diesem Hintergrund wurden für die vorliegende Arbeit folgende Fragen im Sinne von Arbeitshypothesen formuliert:

1. Kommen in *R. fluitans* oberflächenaktive Naturstoffe, wie z.B. Saponine, vor? Gibt es jahreszeitliche Veränderungen des Inhaltsstoffmusters der Pflanze?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen den mutmaßlich in *R. fluitans* vorkommenden oberflächenaktiven Prinzipien und dem regelmäßigen Auftreten des Schaumes? Sind diese Stoffe im Wasser und im Schaum nachweisbar? In welchen Konzentrationen liegen diese Stoffe vor? Gibt es jahreszeitliche Schwankungen, die mit dem Auftreten des Schaumes in Zusammenhang zu bringen sind?
3. Welche Aussagen können über die ökotoxikologische Relevanz der *Ranunculus*-Inhaltsstoffe getroffen werden?

Über die systematische Bearbeitung der dargelegten Probleme soll im folgenden berichtet werden. Mit den nunmehr vorliegenden Fakten und Daten ist es möglich, eine Reihe der seit ca. dreißig Jahren mehr oder weniger intensiv diskutierten Fragen zu beantworten. Trotzdem soll bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß es sich bei der vorliegenden Problematik um ein äußerst komplexes Geschehen handelt, auf das viele Faktoren Einfluß haben.