



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Vergleichende phytochemische Analysen an
ausgewählten Vertretern der Gattung *Populus*“

verfasst von

Florian Ehrlich BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 832

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Botanik

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Karin Valant-Vetschera

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	- 3 -
1.1 Morphologie und Systematik.....	- 5 -
1.1.1 Salicaceae Mirbel.....	- 5 -
1.2 <i>Populus</i> Linnaeus.....	- 7 -
1.2.1 <i>Populus trichocarpa</i> Torrey and Gray ex Hook.	- 10 -
1.2.2 <i>Populus nigra</i> L.	- 11 -
1.3 Pappelknospenexkrete und die Produktion von Propolis	- 12 -
1.4 Sekundäre Metabolite	- 13 -
1.4.1 Phenole und Polyphenole der Salicaceae.....	- 14 -
1.4.1.1 Phenolische Glykoside.....	- 15 -
1.4.1.2 Phenolcarbonsäuren	- 18 -
1.4.1.3 Flavonoide	- 21 -
2. Material und Methoden.....	- 25 -
2.1 Material.....	- 25 -
2.1.1 Stecklinge.....	- 25 -
2.1.2 Herbarbelege	- 25 -
2.1.3 Exsudate von <i>P. trichocarpa</i> Klon 337/64 und 200/63	- 26 -
2.1.4 Knospenexsudate von <i>P. nigra</i>	- 26 -
2.1.5 Bee Pure Propolis Tabletten	- 26 -
2.2 Analytische Methoden	- 26 -
2.2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	- 26 -
2.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC).....	- 27 -
2.3 Präparative Aufarbeitung.....	- 28 -
2.3.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	- 30 -
2.3.2 Säulenchromatographie	- 30 -
2.3.2.1 Trockensäule	- 30 -
2.3.2.2 Säulenchromatographie mit Kieselgel (Kieselgel 60, 40-60 µm) ..	- 32 -
2.3.2.3 Säulenchromatographie mit Sephadex LH 20	- 32 -
2.3.2.4 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC).....	- 32 -
3. Ergebnisse und Diskussion	- 33 -
3.1 HPLC-Ergebnisse	- 38 -
3.1.1 <i>P. trichocarpa</i>	- 38 -
3.1.1.1 <i>P. trichocarpa</i> Klon 337/64.....	- 38 -
3.1.1.2 <i>P. trichocarpa</i> Klon 200/63	- 41 -
3.1.1.3 Stecklinge: <i>P. trichocarpa</i> 2010/66 und 101112	- 43 -
3.1.1.4 Herbarbelege	- 45 -
3.1.1.5 Vergleichende Interpretation der Ergebnisse.....	- 51 -
3.1.2 <i>Populus nigra</i>	- 52 -
3.1.3 „Bee Pure Propolis“ Tabletten	- 53 -
3.2 Dünnschichtchromatographie	- 56 -
3.2.1 Vergleichssubstanzen.....	- 57 -
3.3 Isolierte Substanzen	- 59 -
3.3.1 Piceol (4-Hydroxyacetophenon) (7)	- 60 -
3.3.2 <i>p</i> -Cumarsäurezimtsäureester (8)	- 61 -
3.3.3 Trichanthinsäure (10).....	- 62 -
4. Literaturverzeichnis	- 63 -
5. Zusammenfassung	- 71 -
6. Abstract.....	- 72 -

7. Danksagung	- 74 -
8. Lebenslauf.....	- 75 -

1. Einleitung

Pappeln sind aufgrund ihres schnellen Wachstums von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Aufgrund ihrer großen genetischen Variabilität zeigen sie eine einzigartige Vielfalt an ökologischen Interaktionen. Über 650 Pilzarten wurden auf Pappeln gefunden (OSTRY ET AL., 1988; FARR ET AL., 1989). DAVIDSON UND PRENTICE (1968) zählten mehr als 300 Insektenarten etwa auf *Populus tremuloides* Michx. Derartige biotische Interaktionen spielen eine wesentliche ökologische Rolle und sind somit auch grundlegend für die Evolution und Co-Evolution der Pflanzen. In diesen Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Umwelt sind vor allem die Produkte des Sekundärstoffwechsels involviert. Sekundäre Metabolite werden über unterschiedliche Biosynthesewege gebildet und in Substanzklassen wie etwa Terpenoide, Polyphenole oder Alkaloide zusammengefasst. Darüber hinaus können Derivate unterschiedlicher biosynthetischer Herkunft kombiniert werden, woraus zum Teil sehr komplexe Strukturen resultieren. Die Zusammensetzung der Sekundärstoffprofile kann zwischen Arten variieren, und teilweise zeigen sich sogar Unterschiede zwischen einzelnen Individuen. Die Aktivität der entsprechenden Biosynthesenzyme ist überdies organ- und gewebespezifisch und vom Entwicklungsstadium der Pflanze abhängig (WINK, 1999). Diese Faktoren sind daher bei vergleichenden chemosystematischen Untersuchungen zu berücksichtigen.

Ein spezielles Merkmal der Gattung *Populus* ist die Produktion eines klebrigen Exsudates, welches von den Schuppenblättern der Winterknospen sezerniert wird und ein lipophiles Substanzgemisch darstellt. Dieses dient dem Schutz der angelegten Blattprimordien während der Winterruhe. Die Zusammensetzung des Exsudates ist zwar zumeist artspezifisch, jedoch sind auch individuelle Unterschiede zu erwarten. Ein besonderes Merkmal dieser Knospenexsudate ist die unterschiedliche Farbe, welche von gelb bis hin zu braun oder rot/braun variieren kann (ECKENWALDER, 1996). Eine dunkelrote Färbung wurde beispielsweise beim hier untersuchten Exsudat des Klons 337/64 von *P. trichocarpa* beobachtet (Wollenweber, 1975).

Bisherige Untersuchungen an Pappelknospen ergaben das Vorkommen von Zimtäurederivaten und Flavonoiden. Diese Zusammensetzung variiert jedoch zwischen den Sektionen und auch der Arten der Gattung. So findet man in der Sektion *Populus* hauptsächlich Zimtsäurederivate und kaum Flavonoide (Wollenweber, 1975). Knospenexsudate der Sektion *Tacamahaca* hingegen zeigen ein komplexes Gemisch aus Zimtsäurederivaten, Terpenoiden und Flavonoiden mit Dihydrochalkonen (WOLLENWEBER, 1975, GREENAWAY ET AL., 1989, GREENAWAY ET AL., 1990 b).

Die Exsudate von Winterknospen der Pappeln, vor allem von *P. nigra*, sowie Substanzen aus extrafloralen Nektarien werden von Bienen im europäischen Raum gesammelt, um damit ihren gesamten Bienenstock abzudichten. Dieses Produkt wird Propolis genannt und zeigt antibakterielle, antimykotisch und antivirale Eigenschaften, mit denen Bienen ihrer Behausung einen gewissen antibiotischen Status verleihen (BANKOVA ET AL., 2000, 2002; BANKOVA, 2005; LOTFY, 2006; NAHRSTEDT, 1990). Auch der Mensch nutzt Propolis als Antiseptikum und Choleretikum, jüngst auch zur Vorbeugung oder in direkter Anwendung gegen Erkältungen und ein geschwächtes Immunsystem. Das neue Propolisprodukt „Bee Pure Propolis“ wird damit beworben, naturrein und unverändert, entsprechend dem Produkt aus dem Bienenstock, zu sein. Dieses Präparat wurde zusätzlich in der vorliegenden Arbeit untersucht und mit dem Knospenexsudat der heimischen *P. nigra*, der Hauptquelle für Propolis, verglichen.

Folgende Fragestellungen liegen dieser Arbeit zu Grunde:

- Existieren Sekundärmetabolite, die sich als chemosystematische Merkmale innerhalb der Gattung *Populus* bzw. der Sektion *Tacamahaca* als nützlich erweisen?
- Welche Metabolite sind ausschlaggebend für die tiefrote Farbe des Knospenexsudates des Klons 337/64 von *P. trichocarpa*?
- Sind die Inhaltsstoffe des naturreinen Bienenprodukts „Bee Pure Propolis“ vergleichbar mit dem Knospenexsudat der heimischen *P. nigra*?

1.1 Morphologie und Systematik

1.1.1 Salicaceae Mirbel

Die taxonomische Einordnung der Salicaceae und ihre Gattungen durchlief in der Vergangenheit viele Veränderungen. Frühe Klassifikationen vereinten die Weidengewächse aufgrund ihrer kätzchenartigen Infloreszenzen mit anderen anemophilen Familien zu den „*Amentiferae*“ (zB. ENGLER UND PRANTL, 1889). HALLIER, (1908) erkannte Gemeinsamkeiten zwischen Arten der Gattung *Populus* und *Idesia polycarpa* (Flacourtiaceae), diese wurden jedoch nicht gleich akzeptiert (GILG, 1914). MEEUSE (1975) vereinte Gemeinsamkeiten wie Anatomie, Morphologie, Phytochemie (Salicin, welches nur in Salicaceae und einigen wenigen Vertretern der Flacourtiaceae vorkommt) und Wirt-Parasiten-Beziehungen (Rostpilzgattung: *Melampsora*, Melampsoraceae) der Salicaceae und Flacourtiaceae und schlug die Zusammenführung der Salicaceae als Tribus innerhalb der Flacourtiaceae vor. Auch CRONQUIST (1981) erkannte die Verwandtschaft der beiden Familien, platzierte sie aber in verschiedenen Ordnungen. Als Hinweis auf eine Verwandtschaft zwischen den Familien wurde auch auf das Vorkommen salicoider Zähne am Blattrand von *Idesia* verwiesen (HICKEY UND WOLFE, 1975). Molekularbiologische Untersuchungen mit rbcL DNA Sequenzen zeigten eine nahe Verwandtschaft der beiden Familien innerhalb der Malpighiales und Paraphylie der Flacourtiaceae. CHASE ET AL. (2002) vereinten die Salicaceae s. str. mit vorwiegend tropisch verbreiteten Flacourtiaceae zu Salicaceae s. l. (Abbildung 1), diese Ansicht wird von der ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP III (2009) ebenfalls vertreten.

Die Lebensformen der Salicaceae s. str. sind Bäume oder Sträucher, mit ganzrandigen oder gezähnten, sommergrünen und in der Regel alternierenden Blättern mit ungeteilten Spreiten. Die meist diözischen unisexuellen Blüten bilden kätzchenartige Ähren oder ährenartige Trauben, und wachsen aus den Achseln von schuppenförmigen Deckblättern. Der oberständige Fruchtknoten entwickelt sich zu einer Kapselfrucht mit einer Vielzahl an Samen mit grundständigem Haarschopf (ECKENWALDER, 2010).

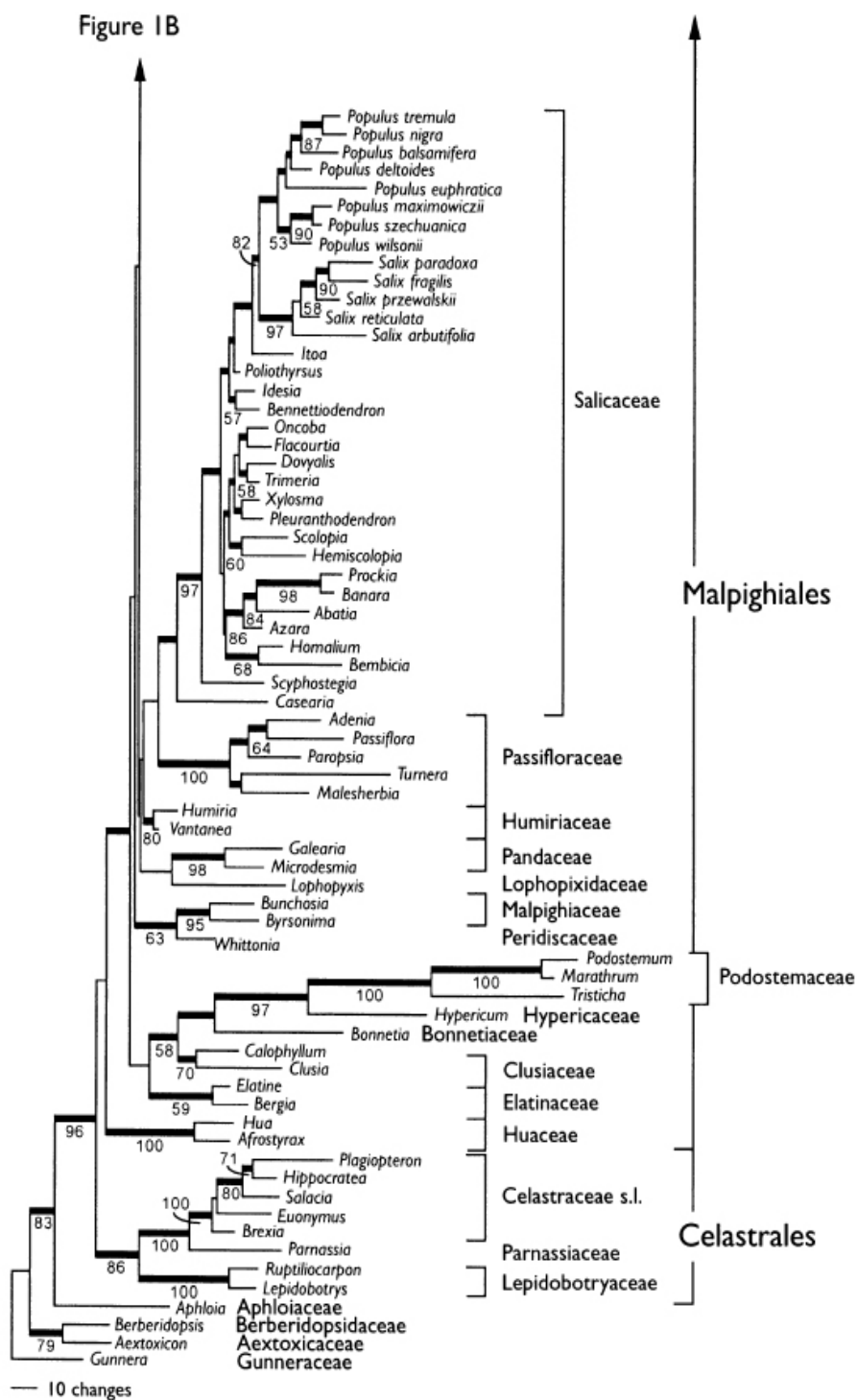


Abbildung 1: Phylogenie der Salicaceae s.l., basierend auf rbcL DNA-Sequenzanalysen (CHASE ET AL., 2002)

1.2 *Populus* Linnaeus

Die in der Regel sommergrünen (seltener halbbimmergrünen) Vertreter der Gattung *Populus* sind meist diözische Bäume, seltener Sträucher, die eine Wuchshöhe von bis zu 45 Metern erreichen können. Sie zeigen eine für Bäume eher untypische Ausbreitung durch Wurzelklone, was ein wesentlicher Vorteil für eine rasche Besiedlung neuer Gebiete und damit auch Vorteile für die Papier- und Holzindustrie im Bereich des Bepflanzungsmanagements ist. Jedoch neigen nicht alle Arten dazu Wurzelklone zu bilden. So findet man diese nur sehr selten in *P. fermontii* S. Watson, *P. deltoides* Marshall oder *P. nigra* L. (Sektion *Aigeiros*) unter natürlichen Bedingungen, sie bilden Klone eher durch erdverlegte Zweige. Das andere Extrem findet man in der Sektion *Populus* (früher *Leuce*). Ein Individuum von *P. grandidentata* Michx. oder *P. tremuloides* Michx. kann kuppelartige Wälder mit hunderten Stämmen bilden. Klone wurden auch in *P. balsamifera* L. und *P. trichocarpa* Torr. & Gray (Sektion *Tacamahaca*) gefunden. Neben einer guten Qualität des Holzes zeigen Pappeln auch das schnellste Wachstum aller temperaten Baumarten, was wohl in Zusammenhang mit ihrer Rolle als Pionierpflanzen steht (BARNES, 1966; ECKENWALDER, 1996; ECKENWALDER, 2010).

Pappeln lassen sich aufgrund ihrer generativen Merkmale sehr gut von anderen verwandten Gattungen unterscheiden. Wie viele andere anemophile Arten bilden Pappeln sowohl männliche als auch weibliche „Kätzchen“. Diese bestehen aus Einzelblüten, welche kompakte Trauben bilden. Andere temperate, diözische Baumarten mit männlichen Kätzchen (zB. Vertreter der Gattung *Quercus*) sind durch einen anderen weiblichen Infloreszenztyp charakterisiert. Verglichen mit anderen temperaten Bäumen, die weibliche „Kätzchen“ bilden, findet man nur bei Pappeln und Weiden Samen mit baumwollartigen Haaren an der parietalen Seite der Plazenta. Die männlichen und weiblichen Blüten der Pappeln besitzen keine Petalen oder Sepalen und sitzen in Achseln von Vorblättern. Diese fallen, anders als bei Weiden oder Birken, bereits während der Anthese ab. Am Blütenboden findet man einen Diskus, der die bis zu 60 Staubblätter bzw. den einzelnen Fruchtknoten umgibt. Weiden zeigen keinen

Diskus, jedoch findet man Nektarien am Blütenboden (ECKENWALDER, 1996; ECKENWALDER, 2010).

Alle Pappeln zeigen Heterophyllie, jedoch zählt *Populus heterophylla* L. zu jenen Arten der Pappeln, bei denen Heterophyllie am wenigsten stark ausgeprägt ist (ECKENWALDER, 2010). Dabei kann man zwischen heteroblastischer Blattentwicklung (Beispiele: *P. mexicana* Sarg., *P. monticola* Brandegee) und saisonaler Heterophyllie (*P. trichocarpa*) unterscheiden. Heteroblastische Blattentwicklung führt zu verschiedenen Blattformen, je nach Alter des Baumes. Somit findet man unterschiedliche Formen auf jungen und alten Individuen. Heteroblastische Blattentwicklung kommt bis zu einem bestimmten Grad in allen Pappeln vor. *P. alba* L. zeigt das auffälligste Beispiel für heteroblastische Blattentwicklung. Individuen mit saisonaler Heterophyllie bilden die „frühen Blätter“ („preformed“ oder „early leaves“) während der Wachstumsphase und überwintern diese in einem embryonischen Stadium (Größe: 5-12 mm) in Knospen, während die „späten Blätter“ („neoformed“ oder „late leaves“) noch in derselben Saison, in der sie initiiert werden, wachsen. Daraus resultieren verschiedene Triebe. Bei Kurztrieben expandieren die frühen Blätter im Frühling, was mit einer geringen internodialen Streckung einhergeht. Nach einer schnellen Reifung der Blätter wird das Wachstum eingestellt, um die nächste Gruppe früher Blätter für die folgende Saison zu initiieren. Langtriebe hingegen stoppen ihr Wachstum nicht, sondern initiieren späte Blätter, welche noch in derselben Saison wachsen. Bei Langtrieben kann die internodiale Streckung bis zu 2 cm zwischen den Blattansätzen betragen. Frühe Blätter sind somit die einzigen, die man bereits im Frühling finden kann (ECKENWALDER, 1980). Sie sind in der Regel zäher als späte Blätter und erzielen aufgrund anderer struktureller und physiologischer Eigenschaften geringere Photosyntheseraten (CRITCHFIELD, 1960; DICKMANN, 1971). Weiters findet man extraflorale Nektarien am Grund der Blattspreite, jedoch nicht auf allen Blättern. TRELEASE (1881) fand zumindest auf den ersten 6 (selten weniger) Blättern eines jeden frischen Triebes im Frühling Nektarien, später in der Saison konnte es vorkommen, dass Blätter derselben Individuen keine Nektarien mehr aufwiesen. Auch ESCALANTE-PÉREZ ET AL. (2012) fanden Nektarien vermehrt im Frühling und zeigten auch, dass junge Individuen

mehr Blattnektarien bilden als Ältere. Außerdem fanden sie zwei unterschiedliche Typen von Nektarien in der Gattung. Während *P. trichocarpa* holokrine Nektarien bildet, welche nur beim Befall von saugenden Herbivoren Nektarbildung induziert, findet man bei *P. tremula* x *P. tremuloides* merokrine Nektarien mit kontinuierlichem Nektarfluss. Diese Typen von Nektarien unterscheiden sich zusätzlich in ihrer Morphologie und Nektar-Zusammensetzung.

Die Gattung *Populus* wird aufgrund von morphologischen und auch ökologischen Merkmalen in 6 Sektionen aufgeteilt: *Abaso*, *Aigeiros*, *Leucoides*, *Populus*, *Tacamahaca* und *Turanga*. Arten einer Sektion können in Kontaktzonen frei hybridisieren, solche aus verschiedenen Sektionen hybridisieren in der Regel jedoch nicht. Ausnahmen bilden Vertreter der Sektion *Aigeiros*, wo keine Kreuzungsbarrieren gegenüber Arten, sowohl aus der Sektion *Tacamahaca* als auch aus der Sektion *Leucoides*, bestehen. Obwohl Arten dieser Sektionen in ihren vegetativen Merkmalen und Standortsansprüchen differieren, zeigen sie keine wesentlichen Unterschiede im Blütenbau oder Infloreszenztyp. Generelle Unterschiede zwischen den Sektionen ergeben sich aus der Anzahl der Karpelle, Staubblätter und Samen, ferner zwischen unifacialen und bifacialen Blättern, deren Form und Bezahnung, sowie Farbe und Formen der Winterknospen (vgl. ECKENWALDER, 1996, S. 11).

Die meisten Pappelarten besitzen auf der Innenseite der Knospenschuppen eine sezernierende Schicht, die ein lipophiles Sekret produziert. Eine Ausnahme bildet *P. alba*: sie hat behaarte Knospenschuppen (WOLLENWEBER, 1975). Das Pappelsekret ist ein komplexes Stoffgemisch, bestehend aus substituierten Benzoe- und Phenolcarbonsäuren mit ihren Estern, Flavonoid-Aglyca, Terpenoiden und Kohlenwasserstoffen (ENGLISH ET AL., 1991), wobei die Zusammensetzung zwischen den Sektionen und Arten variiert (ENGLISH ET AL., 1991, 1992; GREENAWAY AND WHATLEY, 1990; WOLLENWEBER, 1975).

1.2.1 *Populus trichocarpa* Torrey and Gray ex Hook.

Populus trichocarpa, die westliche Balsampappel, zählt zur Sektion *Tacamahaca* und ist ein schnellwüchsiger Pionierbaum, der am besten in vollem Sonnenlicht wächst, und bis zu 75 Meter hoch werden kann. Die Art zeichnet sich durch eine grau-braune, tief gefurchte Borke und saisonale Heterophyllie aus. Während die Blattoberseite eine dunkelgrüne Farbe aufweist, ist die Unterseite mit einem weißen Flaum überzogen. Ihre Winterknospen sind kahl oder spärlich behaart und sezernieren ein rotes, duftendes Harz. Die Kätzchen von *P. trichocarpa* sind dicht mit Blüten bestückt, wobei männliche Blüten 30 bis 50 Stamen bilden, und weibliche Blüten aus einem 3-4 karpelligen Gynözeum bestehen (ECKENWALDER, 2010).

P. trichocarpa ist in Nordamerika heimisch. Ihre Verbreitung reicht von Alaska, inklusive verschiedener Inseln, über die Küstenregionen von Westkanada (Yukon, British Columbia und Alberta) bis in die nordwestliche USA (Dakota, Montana, Idaho, Nevada und selten in North Dakota, Wyoming, Utah und Kalifornien). Die westliche Balsampappel bevorzugt feuchte Wälder, Auböden, Flusssufer und Abhänge im subalpinen Bereich bei einer Seehöhe von 0 bis 2100 (2750) Meter. Die Art wächst auf verschiedenen Substraten, von feuchtem Sand, Schluff oder Kies bis zu nährstoffreichem Humus, Lehm und seltener Ton. Sie besitzt eine hohe Toleranz gegen Fluten, jedoch nicht gegen ständige Überschwemmung oder Brackwasser, und nur geringe Trockenheitsresistenz (NESOM, 2003).

Ihre Schnellwüchsigkeit und ihr kleines Genom, das mittlerweile vollständig sequenziert ist (TUSKAN ET AL., 2006), waren unter anderen für die Etablierung als Modellorganismus ausschlaggebend. So wird die Art heute vor allem für genetische, evolutionäre, physiologische und auch Pathogen- und Herbivoren-bezogene Untersuchungen herangezogen (ECKENWALDER, 2010).

Populus trichocarpa ist auch unter dem Namen *Populus balsamifera* var. *trichocarpa* (oder *Populus balsamifera* L. subsp. *trichocarpa*) bekannt. Diese falsche taxonomische Zuordnung beruht jedoch auf Verwechslungen mit

P. x bastata, ein Hybrid von *P. x jackii* [*P. balsamifera* x *P. deltoides*] und *P. balsamifera*, welcher ähnlich kahle oder spärlich behaarte Kapseln bildet wie *P. trichocarpa*. Jedoch besitzen beide Sippen getrennte areal-geographische Verbreitungen, und sind näher mit asiatischen Vertretern der Sektion *Tacamahaca* verwandt, als untereinander. *P. balsamifera* kann auf kühlen Standorten mit saisonaler Nässe, in offenen, nährstoffreichen Wäldern und an Sumpfgrenzen in borealen Wäldern gefunden werden, man trifft aber auch auf felsigen Hängen und Galerie Wäldern, inklusvie Tundren, auf diese Art (BRAYSHAW, 1965; ECKENWALDER, 1996; ECKENWALDER 2010).

Die westliche Balsampappel ist ein kommerziell wertvoller und ein viel genutzter Baum. Ihr Holz dient zur Kartonherstellung, als Furnierholz oder als Bauholz. Das leichte Gewicht und die helle Farbe mit feiner Textur eignet sich gut für Paletten, Boxen und Kisten. Auch in der Papierherstellung wird *Populus trichocarpa* genutzt. Außerdem findet sie Anwendung als Zierbaum und Schattenspende, und wurde in Europa als Windschutz und Alleebaum entlang von Landstraßen und Autobahnen gepflanzt (ECKENWALDER, 2010; NESOM, 2003).

1.2.2 *Populus nigra* L.

Populus nigra, die Schwarzpappel, gehört zu der Sektion *Aigeiros* und ist durch eine charakteristisch x-förmig gefurchte Borke gekennzeichnet. Die Art kann eine Höhe von bis zu 30 Metern erreichen und bildet eine ausgebreitete Krone. Ihre Laubblätter sind rhombisch und lang zugespitzt und besitzen keine Drüsen am Spreitengrund. Der Blattrand ist fein gesägt, und auch bei der Schwarzpappel findet man Heterophyllie. Die Winterknospen sind rotbraun gefärbt, klebrig und langgestreckt nach außen gebogen. Die staminate Blüten bilden zwischen 20 und 30 Staubblätter, pistillate Blüten bestehen aus einem 2 karpelligen Gynözeum (FISCHER ET AL., 2008).

Das Hauptverbreitungsgebiet von *P. nigra* erstreckt sich von Nordafrika bis zum Iran und über Türkei bis Mitteleuropa. Man findet sie jedoch auch in Chile, Argentinien und Gebieten des Himalayas (KRÜSSMANN, 1977). Die

Schwarzpappel wächst vorzugsweise an Feuchtstandorten wie Fluss- und Bachufern, zählt zu den Pioniergehölzen, und bildet in Österreich einen Bestandteil der Weichholzau (FISCHER ET AL., 2008). Die Art toleriert Überschwemmungen, und ihr Substrat kann wasser-, nährstoff- und basenreich sein. Sie wächst aber auch auf Lehm und sandigem Boden (LAGONI, 2006).

1.3 Pappelknospenexkrete und die Produktion von Propolis

Bienen sammeln verschiedene lipophile Materialien für die Produktion von Propolis, welche aus Wunden von Pflanzen austreten oder aktiv von Pflanzen abgegeben werden. Beispiele dafür sind Exsudate auf Blättern sowie extrafloralen Nektarien (BANKOVA, 2005). In der temperaten Zone der gesamten Welt nutzen Bienen vorwiegend das Knospenexsudat von Pappeln, im europäischen Raum hauptsächlich von *P. nigra*, zur Produktion von Propolis (BANKOVA ET AL., 2000). Europäische Propolis zeigt daher eine typische phenolische Zusammensetzung wie sie auch in den Exsudaten von Pappelknospen zu finden ist (BANKOVA ET AL., 2002).

Propolis ist ein natürliches Bienenprodukt. Das klebrige Material wird von Bienen als Baumaterial und als Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen genutzt. Sie besitzt eine große Bandbreite an pharmazeutischen Eigenschaften und zieht daher schon seit über 40 Jahren die Aufmerksamkeit von Chemikern und Pharmazeuten auf sich. Sie zeichnet sich durch entzündungshemmende, antimikrobielle und antioxidative Wirkung aus, sowie durch ihre Wirkung gegen Tumore und Geschwülste (BANKOVA, 2005). Propolis kann mit einem aromatischen Kleber verglichen werden, der hart und spröde wirkt wenn er kalt ist, jedoch beim Erwärmen sehr weich und klebrig wird. Außerdem kann man sie bei Hautkontakt nur sehr schwer wieder abwaschen. Es scheint, dass Propolis stark mit den Ölen und Proteinen der Haut interagiert (BURDOCK, 1998).

Genutzt wurde Propolis schon von Priestern des antiken Ägyptens und Griechenlands. Eine ausführliche Zusammenfassung der Wirkungen von Propolis

stellte LOTFY (2006) zusammen. Analysen von Propolisproben aus verschiedenen Regionen ergaben, dass die chemische Zusammensetzung von der jeweiligen geographischen Region und den dort vorkommenden Pflanzen abhängig ist (KASIoTIS, 2014; VARDAR-ÜNLÜ ET AL., 2007). In diesem Zusammenhang und abhängig vom Alter variiert auch die Farbe von Propolis von gelb-grün bis dunkelbraun (BURDOCK, 1998).

1.4 Sekundäre Metabolite

Sekundäre Metabolite sind Stoffwechselprodukte die nicht direkt im Primärstoffwechsel involviert sind (CHEN ET AL., 2009). Der Begriff „sekundäre“ Metabolite wurde eingeführt, als noch nichts über deren biologische Aktivität bekannt war (HARTMANN, 2008). Sie wurden früher als Abfall- oder Entgiftungsprodukte bezeichnet, und Begriffe wie Überschuss-Metabolismus, Degradierungs- und Speicherprodukte wurden verwendet (LUCKNER, 1990; SWAIN, 1963). Mit der Erforschung sekundärer Metabolite wurde ersichtlich, dass die Produktion dieser in der Entwicklung der Pflanzen mehrfach in verschiedenen Verwandtschaftslinien entstanden ist, und diese Inhaltsstoffe spezielle ökologische Funktionen besitzen, wie zum Beispiel Anlockung von Bestäubern oder Verteidigung gegen Herbivore. Im Gegensatz zu Stoffen aus dem Primärstoffwechsel sind sekundäre Metabolite nicht essentiell für den Photosynthese- oder Respirationsmetabolismus der Pflanzen, jedoch sind sie meist unentbehrlich für Interaktionen zwischen Pflanzen und ihrer Umwelt (LATTANZIO ET AL., 2006). Um die negative Bedeutung des Wortes „sekundär“ zu umgehen, wurden in der Vergangenheit Begriffe wie „spezialisierte Metabolite“ (ZÄHNER, 1979) „natürliche Pflanzenprodukte“ (ZENK, 1967) oder „Allelochemikalien“ (BRATTSTEN, 1979) vorgeschlagen, der Begriff hatte sich jedoch aufgrund von frühen Veröffentlichungen in Büchern gut etabliert (HADACEK, 2002). Da viele Inhaltsstoffprofile zwischen Arten variieren, kann dies zu einzigartigen Vorteilen beim Besiedeln neuer, spezieller Ökosysteme führen (CHEN ET AL., 2009).

Primäre Metabolite werden von allen Pflanzen synthetisiert und ihre Anzahl liegt wahrscheinlich unter 10.000 (PICHESKY und LEWINSOHN, 2011), wohingegen die Anzahl der sekundären Metabolite auf knapp 200.000 geschätzt wurde (DIXON und STRACK, 2003). YONEKURA-SAKAKIBARA und SAITO (2009) verweisen auf die wenigen Pflanzenarten, die bis dato untersucht wurden, was auf eine weit höhere Anzahl an sekundären Metaboliten hindeuten soll. HADACEK (2002) zitiert sogar eine Schätzung von 500.000, jedoch konnte dies in der angegebenen Literatur nicht nachvollzogen werden (MENDELSON und BALICK, 1995). Sekundäre Metabolite lassen sich aufgrund ihrer chemischen Struktur und vor allem nach ihrer biosynthetischen Herkunft gruppieren. In dieser Arbeit wird hauptsächlich auf phenolische Inhaltsstoffe eingegangen, welche über den Shikimat/Phenylpropanoid-Stoffwechselweg synthetisiert werden. Die proteinogenen, aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin sind die Ausgangsstoffe für etwa Lignin, Lignane, Flavonoide einschließlich der Anthocyane, Tannine, oder den einfacheren Produkten wie z.B. Salicylsäure oder Hydroxyzimtsäuren und deren Derivate (CHEN ET AL., 2009).

1.4.1 Phenole und Polyphenole der Salicaceae

Phenole bestehen aus einem aromatischen Ring mit einer Hydroxygruppe, während Polyphenole mehrere Hydroxygruppen aufweisen. Die Hydroxygruppen sind vielfach substituiert, es können Methylether oder Ester vorliegen. Freie Phenole kommen zumeist in glykosidierter Form in den Pflanzen vor und werden entsprechend in den Vakuolen gespeichert, wodurch die Eigentoxizität für die Pflanzen herabgesetzt wird. Ihre Biosynthese beginnt mit dem Shikimat-Stoffwechselweg. Phenylalanine Ammonium Lyase (PAL) und Tyrosin Ammonium Lyase (TAL) katalysieren die Desaminierung von Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure (Abb. 2). Die Enzyme Zimtsäure-4-Hydroxylase und 4-Cumarsäure-CoA-Ligase sind die Basis für alle weiteren Schritte in Richtung Phenole. Dabei zählt 4-Cumarsäure-CoA wahrscheinlich zum wichtigsten Verzweigungspunkt im Phenylpropanoid-Biosyntheseweg, aus ihm entstehen Flavonoide oder auch polymere Lignine (Vogt, 2010). Stoffklassen wie

phenolische Glykoside, Phenolcarbonsäuren und Flavonoide sind bekannte Vertreter dieser Gruppe von Sekundärmetaboliten und im Pflanzenreich weit verbreitet. Manche phenolische Strukturen werden über andere Stoffwechselwege synthetisiert und dementsprechend anderen Stoffklassen zugeordnet. Bakterien, Algen und Pilze biosynthetisieren vergleichbare Strukturen meist über andere Biosynthesewege (HARBORNE, 1989).

Wesentliche Funktionen der Phenole und vor allem Polyphenole wie etwa der Flavonoide umfassen z.B. Pigmentierung, UV-Schutz, Regulatoren im Wachstum, Signalstoffe, Anlockung (Bestäuber) oder Abwehr gegen Pathogene (LATTANZIO ET AL., 2006). Alle Phenole absorbieren Licht im UV-Bereich des Spektrums. Phenole und phenolische Säuren besitzen ihr Absorptionsmaximum zwischen 250–290 nm, Zimtsäuren und ihre Derivate zwischen 290–330 nm, Flavone und Flavonole absorbieren bei 250 und 350 nm, mit mehr oder weniger gleich hoher Intensität. Chalkone und Aurone absorbieren besonders stark bei 350 nm und höher und nur schwach um 250 nm. Aufgrund ihrer hohen Absorption um 250–270 nm und 350–360 nm kann man Flavonoide als UV-Blocker bezeichnen. Vor allem gegen UV-B-Strahlung (280–320 nm), welche negative Effekte auf DNA (Bildung von Thymin Dimeren) oder Proteine (Photodestruktion) ausübt und Sauerstoffradikale freisetzen kann, zeigen Flavonoide hohe Wirksamkeit (LATTANZIO ET AL., 2006).

Nachfolgend werden einige wesentliche Aspekte zu den phenolischen Stoffklassen der Salicaceae und speziell von *Populus* näher beschrieben und auf die Biosynthese im Detail eingegangen.

1.4.1.1 Phenolische Glykoside

Im weiteren Sinn bezeichnet man all jene Moleküle als phenolische Glykoside (PG) welche einen Zucker an ein phenolisches Aglykon gebunden haben. Diese Definition beinhaltet viele chemisch und biosynthetisch nicht verwandte Sekundärmetabolite. Im engeren Sinn haben PG einen Salicylalkohol, welcher mit einer Glykopyranose verestert ist, als Kernstruktur. Diese Glykoside

sind typisch für die Salicaceae und kommen häufig in Blättern etwa von Pappeln vor, ebenso in den Wurzeln und in der Borke der Salicaceae. Das einfachste PG ist Salicin, daher sollten PG am besten „Salicinoide“ genannt werden (BOECKLER ET AL., 2011). Es ist, ähnlich wie Salicortin, in allen *Populus* Arten und in vielen Vertretern der Salicaceae zu finden. Andere PG wie Grandidentatin und Salicortin findet man hingegen nur in wenigen Arten. Weitere Beispiele für in Salicaceae gefundene PG sind Deltoidin, Fragilin, Grandidentatin, Grandidentosid, Salicylglucopyranosid, α -Salicyloylsalicin, Salicyloyltremuloidin, Salidroside, Salirepin, Salireposid, Populin, Populosid, Tremulacin, Tremuloidin, Trichocarpin, Trichocarpinin und Trichocarposid (Abb. 3 A; CHEN ET AL., 2009; TSAI ET AL., 2006).

PG werden über Chorismat synthetisiert (Abb. 2). Zum einen findet man einen Isochorismat-Synthase (ICS)-abhängigen Weg, der zumindest in den Chloroplasten von *Arabidopsis* ablaufen kann, und auch in Prokaryoten zu finden ist (MÈTRAUX, 2002, TSAI ET AL., 2006; WILDERMUTH ET AL., 2001). In der Phenylalanin Ammonium Lyase (PAL)-abhängigen Biosynthese von Phenylpropanoiden wird aus Zimtsäure ein Benzoessäure Derivat gebildet und erst anschließend der Ring hydroxyliert (Abb. 2) (MÈTRAUX, 2002; ZENK, 1967). Alternativ kann Zimtsäure erst zu *o*-Cumarsäure hydroxyliert werden, welche dann einer Seitenkettenkürzung unterliegt (BOECKLER ET AL., 2011; ZENK, 1967). Ihre stark entzündungshemmende Wirkung ist bereits über 100 Jahre bekannt. PG sind wirksam in der Abwehr gegen eine Bandbreite von Herbivoren, als Schutz gegen Pathogene, abiotischen Stress und gegen UV-Strahlung (LINDROTH und HWANG, 1996).

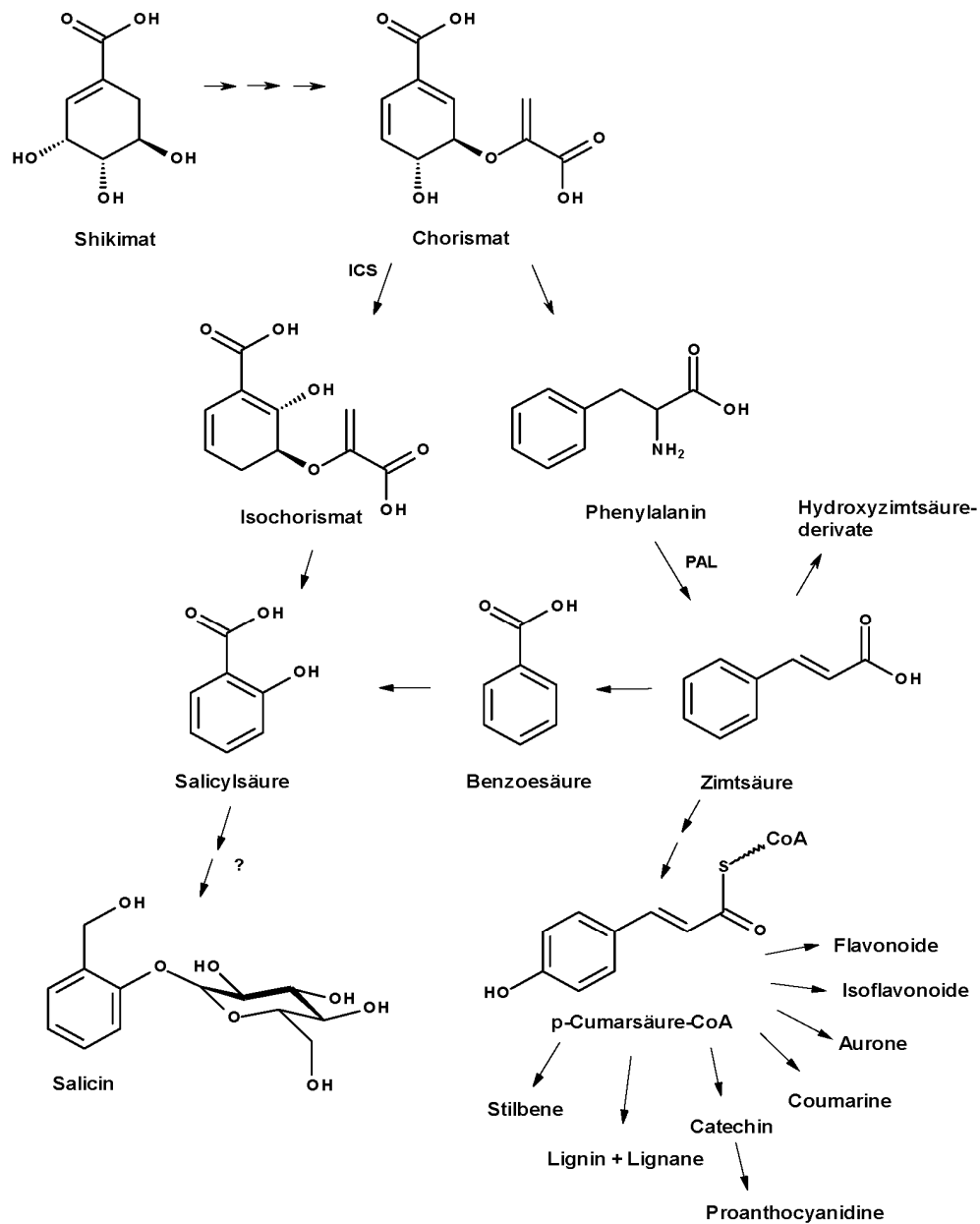


Abbildung 2: Biosynthese von phenolischen Glykosiden, ICS-abhängiger Biosyntheseweg (links), PAL-abhängiger Biosyntheseweg (rechts) und *p*-Cumarsäure-CoA als wichtige Zweigstelle im Phenylpropanoid-Stoffwechselweg. ICS: Isochorismat Synthase, PAL: Phenylalanin Ammonium Lyase (modifiziert nach TSAI ET AL., 2006 und VOGT, 2010)

1.4.1.2 Phenolcarbonsäuren

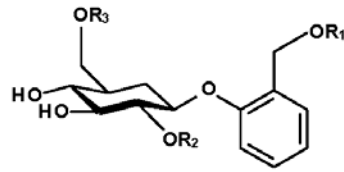
Zu den Phenolcarbonsäuren zählen Hydroxyzimtsäure- und Benzoessäure-Derivate welche aus Zimtsäure gebildet werden (Abb. 2) und zumeist mit organischen Säuren oder Zuckern verestert vorliegen (WATZL UND RECHKEMMER, 2001). Man findet sie in Blättern von Pappeln, sowie ihrer nahen Verwandten wie Weiden und Birken, aber auch in den Knospenexsudaten der Pappeln (CHEN ET AL., 2009). Lange Zeit sah man Hydroxyzimtsäuren als Zwischenprodukte der Ligninbiosynthese. HUMPHREYS und CHAPPLE (2002) zeigten, dass die Hydroxylierungen und Methylierungen an den Hydroxyzimtsäureestern und deren Aldehyden und Alkoholen, und nicht an den freien Hydroxyzimtsäuren stattfindet. NAIR ET AL. (2004) fanden eine Aldehyd-Dehydrogenase in *Arabidopsis*, welche Sinapylaldehyd und Coniferaldehyd zu ihren korrespondierenden Säuren oxidiert (Sinapyl- und Ferulasäure). Daraus lässt sich schließen, dass Hydroxyzimtsäuren keine Zwischenprodukte in der Monolignolbiosynthese, sondern vielmehr Endprodukte aus dieser sind (CHEN ET AL., 2009).

Der am häufigsten vorkommende Hydroxyzimtsäureester ist Chlorogensäure. Diese wird aus Kaffeesäure und Chinasäure gebildet und ist zumindest bei Kaffee trinkenden Personen die am meisten konsumierte Phenolcarbonsäure (WATZL ET AL., 2001). Im Knospenexsudat von *P. trichocarpa* findet sich eine große Anzahl an Phenolcarbonsäuren. Neben Zimtsäure kommt nur eine geringe Menge an *p*-Cumarsäure vor, wobei Kaffeesäure und Ferulasäure fehlen, was der typischen Zusammensetzung der Sektion *Tacamahaca* entspricht. Andere Hauptkomponenten sind 4-Hydroxyacetophenon oder Salicylsäurebenzylester (Abb. 3 B; ENGLISH ET AL., 1991).

Aus dem Knospenexsudat von *P. nigra* wurde das kristalline Material LB-1 isoliert (WOLLENWEBER ET AL., 1987) und auf ihre allergene Wirkung untersucht (ORSOLIC ET AL., 2013). LB-1 ist das stärkste Kontaktallergen aus Propolis, Hauptbestandteile sind 3-Methyl-2-Butenkaffeesäure (3,3-Dimethylallylkaffeesäure) (Abb. 3 B) und 3-Methyl-3-Butenkaffeesäure. Des weiteren findet man 2-Methyl-2-Butenkaffeesäure, β -Phenylethylkaffeesäure

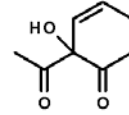
und in geringen Mengen Kaffeesäure und Benzylsäurekaffeesäureester in dem Stoffgemisch.

A

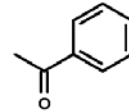


Salicin: $R_1 = R_2 = R_3 = H$

Salicortin: $R_2 = R_3 = H, R_1 =$



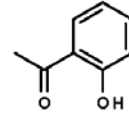
Tremuloidin: $R_1 = R_3 = H, R_2 =$



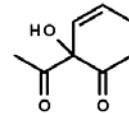
Fragilin: $R_1 = R_2 = H, R_3 =$



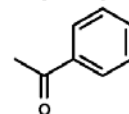
Salicyloisalicin: $R_2 = R_3 = H, R_1 =$



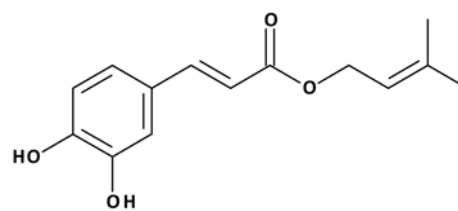
Tremulacin: $R_3 = H, R_1 =$



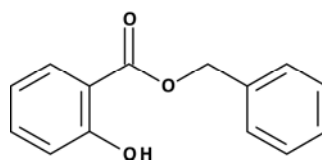
$R_2 =$



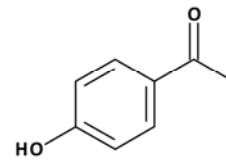
B



3,3-Dimethylallylcaffeesäure



Salicylsäurebenzylester



4-Hydroxyacetophenon (Piceol)

Abbildung 3: A: Ausgewählte Vertreter phenolischer Glykoside aus *P. trichocarpa* (nach BOECKLER ET AL., 2011) **B:** Kontaktallergen 3,3-Dimethylallylcaffeesäure aus LB-1 (WOLLENWEBER ET AL., 1987) und die Hauptkomponenten Salicylsäurebenzylester und 4-Hydroxyacetophenon aus *P. trichocarpa* (ENGLISH ET AL., 1991)

1.4.1.3 Flavonoide

Flavonoide bestehen aus zwei aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C) und bauen auf der chemischen Grundstruktur des Flavans auf. Aufgrund von strukturellen Unterschieden am Ring C werden sie in verschiedene Gruppen unterteilt (BOHM, 1998). Biosynthetisch entsteht zuerst ein Chalkon, welches durch eine Chalkon-Synthase aus *p*-Cumarsäure-CoA und 3 Molekülen Malonyl-CoA gebildet wird (Abb. 4; WINKEL-SHIRLEY, 2001). Pinocembrin-Chalkon und Eriodictyol-Chalkon werden in Pappeln wahrscheinlich aus Zimtsäure-CoA bzw. aus Kaffeesäure-CoA gebildet (MORREEL ET AL., 2006). Abbildung 4 zeigt die Biosynthese von Flavonoiden mit repräsentativen Vertretern in Pappeln. Isoflavone und Anthocyane werden hier nicht besprochen.

Flavonoide sind vor allem als rote, blaue und purpurne Pigmente der Pflanzen bekannt. Sie sind außerdem für weiße oder seltener gelbe Blütenfarben verantwortlich. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Reproduktion, indem sowohl Bestäuber als auch Verbreiter der Diasporen angelockt werden. Neben dem bereits erwähnten UV-Schutz (siehe Phenole) spielen Flavonoide eine wesentliche Rolle als Signalstoffe zwischen Pflanzen und Mikroben im Wurzelbereich, in der Verteidigung gegen mikrobielle Pathogene und Pilze sowie in der Abschreckung von potentiellen Herbivoren (ALCERITO ET AL., 2001, WINKEL-SHIRLEY, 2001). RYAN ET AL. (2001) zeigten in *Arabidopsis*, dass UV-Licht die Produktion von mehrfach hydroxylierten Flavonolen induziert. Da mehrfache Hydroxylierungen keinen Effekt auf die UV-Absorption, aber eine höhere antioxidative Wirkung besitzen, spielen zumindest Flavonole wahrscheinlich eine wichtige Rolle in UV-Stress-initiierten Reaktionen (RYAN ET AL., 2001). Ebenso sind viele Flavonoide von phytomedizinischer Bedeutung, z.B. als Schutz gegen kardiovaskuläre Erkrankungen und verschiedene Formen von Krebs (GONZÁLES-MOLINA ET AL., 2010).

Flavonoide der lipophilen Knospenexsudate von Pappelarten wurden bereits von WOLLENWEBER (1975) eingehender untersucht, und die Stoffprofile chemosystematisch interpretiert (Tab. 1). Darauf folgten einige Forschungsarbeiten an verschiedenen Pappelarten, hauptsächlich GC-MS

Untersuchungen, die neben Flavonoiden auch andere phenolische Verbindungen in den Knospenexsudaten aufzeigten (ENGLISH ET AL., 1991, 1992; GREENAWAY ET AL., 1987, 1988a,b, 1989, 1990a,b,c, GREENAWAY AND WHATLEY, 1990). GREENAWAY ET AL. (1990b) bewiesen des Weiteren den hybridogenen Ursprung von *P. x jackii* aus *P. deltoides* und *P. balsamifera* anhand der Flavonoid-Zusammensetzung des Knospenexsudates. In Pappeln liegt ein gattungsspezifisches Grundmuster an Flavonoiden vor. Chrysin, Galangin und Pinocembrin sind praktisch ubiquitär in der Gattung, sehr häufig findet man auch Tectochrysin, Izalpinin, Pinostrobin, Galangin-3-methylether und Pinobanksin-3-acetat (P 20). Charakteristisch sind ebenfalls das 2',4',6'-Trihydroxychalkon und sein 4'-Methylether. Die Flavonoide des Grundmusters sowie die Dihydrochalkone tragen ähnliche Substituenten, Variation entsteht fast ausschließlich durch Änderung des Oxidationszustandes am Heterozyklus (WOLLENWEBER, 1975).

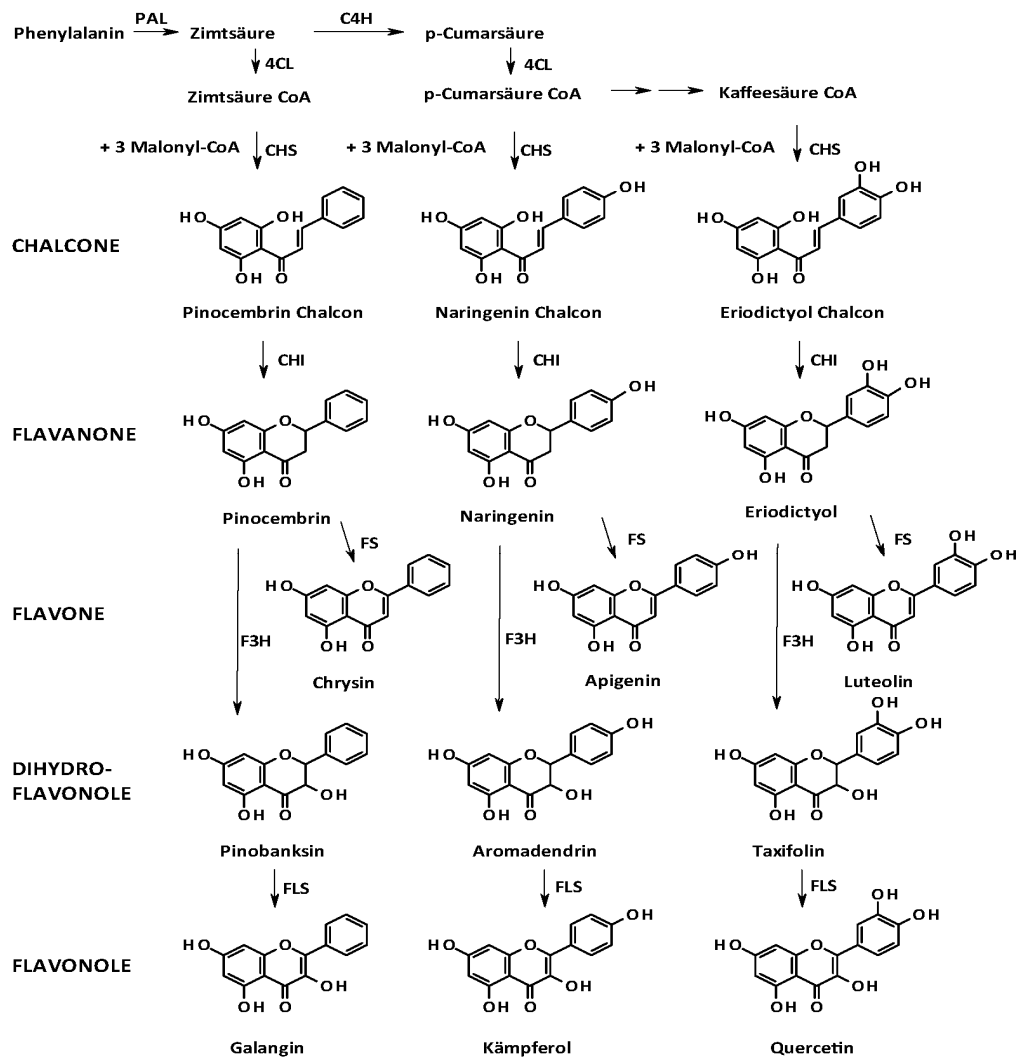


Abbildung 4: Biosynthese von Flavonoiden in Pappel. PAL: Phenylalanin Ammonium Lyase, C4H: Zimtsäure 4-Hydroxylase, 4CL: 4-Cumarsäure CoA Ligase, CHS: Chalkon Synthase, CHI: Chalkon Isomerase, FS: Flavon Synthase, F3H: Flavonoid 3'-Hydroxylase, FLS: Flavonol Synthase (modifiziert nach MORREEL ET AL., 2006).

Tabelle 1: Substanzklassen im Knospenexsudat der *Populus* Sektionen

Sektion	Art	Substanzklassen in den Knospenexsudaten	
<i>Populus</i> (früher <i>Leuce</i>)		Zimtsäurederivate, wenig/keine Flavonoide	Wollenweber, 1975
	<i>P. tremula</i>	wenig Flavonoide (des Grundmusters)	Wollenweber, 1975
	<i>P. grandidentata</i>	Flavone (Apigenin), als einzige Pappelspezies Myricetin	Wollenweber, 1975
<i>Leucooides</i>		Heterogene phenolische Exsudate	Wollenweber, 1975
	<i>P. lasiocarpa</i>	Keine Pappel-charakteristischen Flavonoide; Lasiocarpine	Greenaway et al., 1988
<i>Aigeiros</i>		Flavanone, Flavonole, Flavone und Chalkone	English et al., 1992
	<i>P. deltoides</i>	Flavone und Flavanone (vor allem Galangin und Pinocembrin)	Greenaway et al., 1990a
	<i>P. nigra</i>	Flavanone, Flavonole und Flavone	Wollenweber, 1975
<i>Tacamahaca</i>		Dihydrochalkone, Terpenoide, Zimtsäurederivate; Kaffeesäure und Ferulasäure fehlen	English et al., 1991
	<i>P. trichocarpa</i>	Flavonoide des Grundmusters fehlen	Wollenweber, 1975
	<i>P. balsamifera</i>	Dihydrochalkone, Terpenoide, substituierte Benzoe- und Phenolsäuren, Chalkone, Flavone und Flavanone	Greenaway et al., 1989

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Stecklinge

Stecklinge von *P. trichocarpa* **2010/66** und **101112** wurden kultiviert, die Knospen vor dem Austreiben geerntet und zur weiteren Untersuchung mit Aceton abgespült.

Herkunft: US: California: Lassen County: Mill Creek: Circle S Ranch. Riverbank on edge of creek. Salix. 1,466 m. 40°21'42.9"N, 121°30'27"W. Tree 6m x 4m North California Edinburgh Expedition (2009) 11. 20 Sep 2009

2.1.2 Herbarbelege

Von *P. trichocarpa* wurden 4 **Herbarbelege** vergleichend untersucht (Tab. 2). Bei HB 4 waren die jungen Blätter bereits entwickelt, die Knospenschuppen jedoch noch erhalten.

Tabelle 2: Herbarbelege von *P. trichocarpa*

Bez.	Herkunft	Sammler	Jahr	Sammlung	Anm.
HB 1	Cascade Mountains, Washington. Upper valley of the Nesqually.	Allen, O. D. 310	1897	WU 0079118	
HB 2			1897	WU 0079119	
HB 3	Washington. W. Klickitat County. Bottom lands along the Columbia River	Suksdorf, W. N. s.n.	1883	WU 0079116	
HB 4	Watson Lake 60°07'N 128°48'W	Gillet, J. M. 3082	1949	WU 0079117	junge Blätter bereits entwickelt

2.1.3 Exsudate von *P. trichocarpa* Klon 337/64 und 200/63

Präparative Trennungen wurden mit dem Knospenexsudat von *P. trichocarpa* Klon **337/64** durchgeführt. Ein weiterer Klon **200/63** wurde mituntersucht. Die Knospen stammen aus der Klonsammlung des Forschungsinstituts für Pappelwirtschaft in Hann, Münden, und wurden bereits von E. WOLLENWEBER (1975) mit Aceton abgespült. Das Exsudat wies nach Verdunsten des Acetons eine ölige bis feste Konsistenz auf.

2.1.4 Knospenexsudate von *P. nigra*

Knospen von *P. nigra* wurden am 21. Mai 2013 im botanischen Garten der Universität Wien gesammelt und zur Untersuchung mit Aceton abgespült.

2.1.5 Bee Pure Propolis Tabletten

Die Tabletten stammen von der Firma Hedera d.o.o., 21311 Stobrec, Kroatien und werden in Österreich von der Firma Hedera Vertriebs GmbH vertrieben. Die Firma wirbt damit, das Bienenprodukt erstmals wie es in der Natur vorkommt, anzubieten. 4 Kapseln beinhalten 1080 mg Propolis und 520 mg Blütenpollen, daher wurden die Kapseln aufgebrochen, der Inhalt in MeOH gelöst und vor der Untersuchung mit der HPLC filtriert.

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Zur Untersuchung der Gesamtextrakte und zur Kontrolle der Fraktionen aus den verschiedenen Trennschritten wurden HPLC-Messungen durchgeführt. Das hohe Trennvermögen der Hochdruckflüssigchromatographie erlaubt es meist, Stoffgemische in einzelne Komponenten aufzutrennen. Die Detektion von den UV-aktiven Substanzen erfolgte bei 230 nm mit einem UV-Photodiodenarraydetektor. Zusätzlich werden UV-Spektren der Daten aufgenommen. Diese können anschließend zusammen mit der Retentionszeit mit

einer Datenbank verglichen werden, und so Hinweise auf Substanzklassen liefern bzw. zur Identifikation des Stoffes führen. Reinstoffe wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL und Gesamtextrakte mit 10 mg/mL gemessen.

2.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Gesamtextrakte, die verschiedenen Fraktionen der Trennungen sowie die Rein- und Vergleichsstoffe wurden dünnschichtchromatographisch (DC Kieselgel 60 F₂₅₄ Glasplatten von Merck und Aluplatten von Macherey-Nagel, 0,2 mm Schichtdicke) analysiert. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Toluol, Dioxan und Essigsäure (90:25:5) als Laufmittel 1 (LM1), und Petrolether (PE), Dichlormethan, Ethylacetat (EtOAc) und Methanol (MeOH) (50:25:25:5) als Laufmittel 2 (LM2) verwendet. Substanzen mit Chromophor konnten unter UV-Licht, bei 254 nm durch eine Löschung der Fluoreszenz des Indikators und bei 364 nm durch Eigenfluoreszenz der Stoffe, detektiert werden.

Die Platten wurden anschließend mit Anisaldehyd-Sprühreagenz nach KREBS ET AL. (1967) (85 mL MeOH, 10 mL Eisessig, 8 mL Schwefelsäure, 0,5 mL Anisaldehyd) besprüht und erhitzt um Stoffe mit oder ohne Chromophor zu detektieren. Naturstoffreagenz A (Diphenylborsäure- β -aminoethylester Komplex) wurde verwendet, um Flavonoide aufgrund der resultierenden Farbgebung zu unterscheiden.

Technische Parameter:

Gerät:	Agilent 1100 Series
Stationäre Phase:	Hypersil BDS C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m
Mobile Phase:	Gemisch aus Methanol (HPLC-Grade) und wässrigem Puffer, 15 mM Tetrabutylammoniumhydroxid und 1.5 mM o-Phosphorsäure (REISCH ET AL., 1990). Der Gradient ist in Tabelle 3 angeführt.
Flussrate:	0,8 mL/min
Injektionsvolumen:	10 μ L

Tabelle 3: Elutionsgradient der HPLC

Zeit (min.)	MeOH (%)
0.1	55
17	90
20	100
28	100

2.3 Präparative Aufarbeitung

Die präparativen Schritte zur Auftrennung des Exsudates und Isolierung von Reinstoffen sind in Abbildung 5 ersichtlich. Nach allen präparativen Schritten wurden die Fraktionen am Rotavapor bei 35°C eingeeengt, das Gewicht bestimmt, in MeOH p.A. gelöst und chromatographisch (DC, HPLC) untersucht.

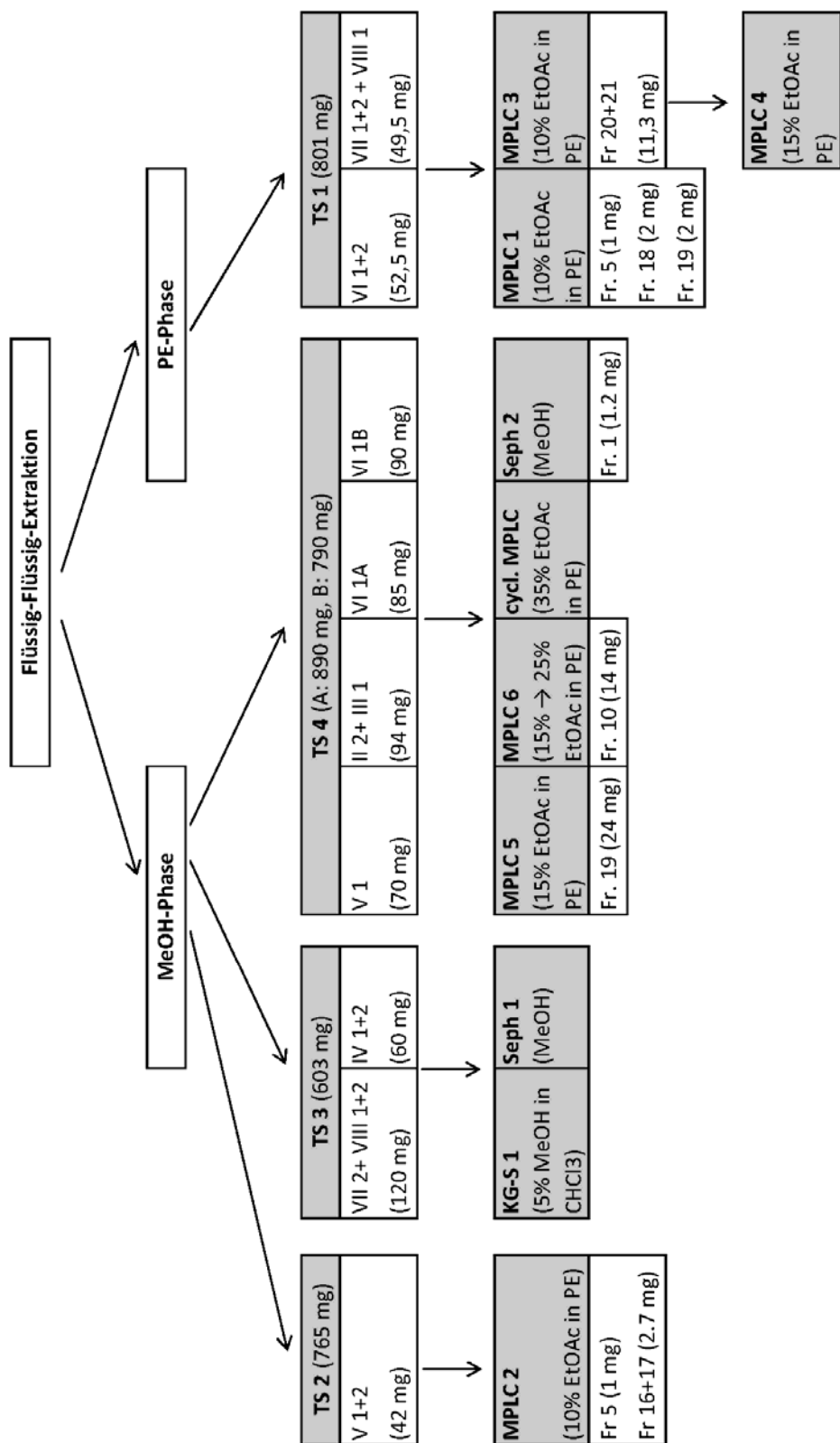


Abbildung 5: Präparative Arbeitsschritte, TS: Trockensäule, Eluenten: EtOAc, PE, MeOH, CHCl₃ (Chloroform), vgl. Tab. 4, MPLC: Mitteldrucksäulenchromatographie, cycl. MPLC: cyclische Mitteldrucksäulenchromatographie, KG-S: Kieselgelsäule (Kieselgel 0,04-0,063 mm), Seph: Sephadexsäule, Fr: Fraktion der jeweiligen Trennmethode

2.3.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Das Knospenexsudat von *P. trichocarpa* 337/64 wurden mit Methanol und 2% Diethylether in Petrolether ausgeschüttelt. Beide Phasen wurden am Rotavapor bei 35°C getrocknet, abgewogen (MeOH Phasen: 3,57 g; PE Phasen: 1,81 g), und in MeOH (10 mg/mL) gelöst.

2.3.2 Säulenchromatographie

2.3.2.1 Trockensäule

Die Phasen wurden mit Lösungsmittel steigender Polarität (Tab. 4) über Kieselgelsäulen vorgetrennt. Das Kieselgel (55 g Kieselgel 60, Korngröße 0.2–0.5 mm) wurde dafür trocken in eine Säule (Säulenlänge 60 cm, d = 1,7 cm) eingefüllt. Die Proben wurden auf 5 g Kieselgel aufgetragen, getrocknet und auf das Kieselgelbett der Säule übertragen. Anschließend wurde mit dem Laufmittel aufgefüllt und eluiert. Teile der PE-Phase wurde in Trockensäule 1 (TS 1), der MeOH-Phase in den Trockensäulen 2-4 (TS 2–4) vorgetrennt. Die Säule wurde jeweils mit 100 mL Laufmittel zunehmender Polarität eluiert (I, II, III ... siehe Tab. 4) und in 50 mL Fraktionen wieder aufgefangen, woraus sich für jedes Laufmittelgemisch 2 Fraktionen ergaben (I 1, I 2, II 1, II 2, III 1, ...). Bei Trockensäule 4 wurden 2 Säulen nebeneinander simultan eluiert, ähnliche Fraktionen vereinigt, nicht vereinigte Fraktionen zusätzlich mit A und B benannt (Bsp. VI 1 A, Abb. 5).

Tabelle 4: Laufmittelgemisch der Trockensäulen, in Vol %

TS 1 + 2	PE	EtOAc	MeOH
I	100	-	-
II	90	10	-
III	80	20	-
IV	70	30	-
V	60	40	-
VI	50	50	-
VII	30	70	-
VIII	10	90	-
IX	0	100	-
X	-	100	-
XI	-	-	100

TS 3	PE	EtOAc	MeOH
I	80	20	-
II	70	30	-
III	60	40	-
IV	55	45	-
V	50	50	-
VI	45	55	-
VII	30	70	-
VIII	10	90	-
IX	10	90	-
X	-	-	100

TS 4	PE	EtOAc	MeOH
I	80	20	-
II	75	25	-
III	70	30	-
IV	65	35	-
V	60	40	-
VI	50	50	-
VII	-	100	-
VIII	-	-	100

2.3.2.2 Säulenchromatographie mit Kieselgel (Kieselgel 60, 40-60 µm)

Die Fraktionen VII 2, VIII 1 und VIII 2 der TS 3 wurden vereinigt und über eine Kieselgelsäule getrennt. Um Luftblasen zu verhindern, wurde das Kieselgel, im Gegensatz zur Trockensäule, im Laufmittel aufgeschlämmt und mit diesem in die Säule eingefüllt. Als Eluent wurden 5% MeOH in Chloroform verwendet (Abb. 5).

2.3.2.3 Säulenchromatographie mit Sephadex LH 20

Sephadex LH 20 erlaubt die Trennung von Molekülen nach ihrer Größe. Die Fraktionen IV 1 und IV 2 und die Fraktion VI 1 B wurden über eine Sephadexsäule getrennt (Säulenlänge 50 cm, d= 3 cm) (Abb. 5).

2.3.2.4 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC)

Die Fraktionen der Trockensäulen wurden über eine präparativ über eine MPLC weiter aufgetrennt. Sie bietet auf Grund der kleineren Korngröße (40-60 µm) eine bessere Trennleistung als Trockensäulenchromatographie, benötigt dafür aber einen höheren Druck. Die Probenaufgabe erfolgte mit Stickstoff. Das Laufmittel wurden je nach Polarität der Stoffgemische gewählt. Der Fluss wurde manuell zwischen 5 und 20 mL/min bei einem Arbeitsdruck von 1-2 bar geregelt. Bei Fraktion VI 1 A wurde die MPLC erst cyclisch eingestellt und nach 2 Durchgängen eluiert. Die Fraktionen VI 1 und 2, die Fraktionen VII 1, VII 2 und VIII 1 der Trockensäule 1, Fraktionen V 1 und V 2 der TS 2 sowie die Fraktionen II 2 und III 1 der TS 4 wurden jeweils vereinigt, und, wie auch Fraktion V 1 der TS 4, über MPLC weiter aufgetrennt (Abb. 5).

Technische Angaben:

Säule: Lobar Fertigsäule, Größe B (310-25), LiChroprep Si60, (40-60 µm)
Pumpe: Büchi Pump Module C-601, Büchi Pump Controller C-610
Detektor: Teledyn Isco, UA-6, UV/VIS Detector, 254 oder 280 nm
Laufmittel: Gemische aus Ethylacetat/Petrolether

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Knospenexsudat von *P. trichocarpa* Klon 337/64 auf seine Inhaltsstoffe untersucht und mit jenen von unterschiedlichen Herkunft (Stecklinge: 2010/66, 101112; Herbarbelege: HB 1-4) sowie einem weiteren Klon 200/63 verglichen. Das Knospenexsudat von *P. nigra*, welches von den Bienen zu Propolis verarbeitet wird, wurde außerdem mit der chemischen Zusammensetzung von kommerziellen Propolis Tabletten der Firma Hedera Vertriebs GmbH, 1190 Wien, verglichen. Zunächst wurden die Exsudatprofile in Hinblick auf Flavonoide analysiert, weil deren Vorkommen aufgrund früherer Studien (WOLLENWEBER, 1975) gut belegt ist (Abb. 6). Dabei erwiesen sich unterschiedlich substituierte Derivate als gute chemosystematische Merkmale innerhalb der Gattung *Populus*. Spätere GC-MS Studien zeigten überdies, dass auch die Verbreitung der Zimtsäurederivate (Abb. 7) und Dihydrochalkone (Abb. 6) gut mit den verwandtschaftlichen Verhältnissen innerhalb der Gattung korreliert (GREENAWAY ET AL., 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurden die chemischen Profile der Exsudate mittels HPLC und Dünnschichtchromatographie vergleichend analysiert und die Ergebnisse mit den bisher bekannten Literaturdaten verglichen. Dabei erwies sich die Dünnschichtchromatographie als deutlich weniger gut auflösend, weshalb vor allem die HPLC-Ergebnisse zur Interpretation der Profile herangezogen wurden. Da die vorkommenden Flavonoide bereits weitgehend bekannt waren (Abb. 6) (WOLLENWEBER, 1975, WOLLENWEBER ET AL., 1987, GREENAWAY ET AL., 1989), wurden vor allem Phenylpropanderivate, welche keine Übereinstimmung mit Verbindungen aus der HPLC-Datenbank ergaben, isoliert und deren Struktur aufgeklärt. So konnten die vier Derivate Zimtsäure (**6**), Piceol (**7**), Trichanthinsäure (**10**) sowie *p*-Cumarsäurezimtsäureester (**12**) als Reinstoffe isoliert (Abb. 7, A) und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Chemie der Universität Wien durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie strukturell aufgeklärt werden. Im Nachfolgenden werden die HPLC-Ergebnisse nach einzelnen Arten getrennt dargestellt und vergleichend diskutiert. Die DC

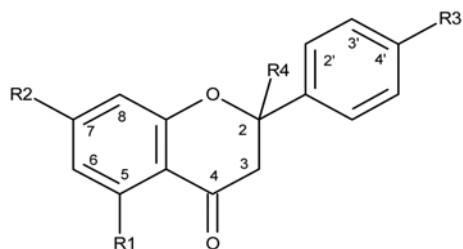
Ergebnisse und Daten zu den isolierten Verbindungen werden abschließend kurz diskutiert.

Trichanthinsäure (**10**) (Abb 7, A) ist eine neue Verbindung für Knospenexsudate von *P. trichocarpa*. Diese Verbindung besteht aus *p*-Cumarsäure, welche mit (2*E*,6*E*,10*E*)-2,6,10-trimethyl-dodeca-2,6,10-triensäure verestert ist. Der Säureanteil besteht aus Isopentenyleinheiten und lässt aufgrund von struktureller Ähnlichkeit mit Farnesylsäure den Schluss zu, dass Enzyme des Terpenoidstoffwechsels an der Biosynthese beteiligt sind. Bezüglich der Namensgebung für diese neue Verbindung ergaben sich allerdings einige Probleme. So wurde der Name Trichanthin für zwei Schwefelamid-Derivate, welche aus *Glycosmis trichanthera* (Rutaceae) isoliert wurden, gewählt (VAJRODAYA ET AL., 1997) und auch in der Literatur weiter verwendet (z.B. HOFER UND GREGER, 2000). Andererseits gibt es eine strukturell entsprechende Verbindung zur Trichanthinsäure (**10**), welche aus *Bonamia trichantha* (Convolvulaceae) isoliert und Trichanthin B genannt wurde (HUSSEIN ET AL. 2005). Der einzige Unterschied zwischen Trichanthin B und Trichanthinsäure ist die Substitution am C-24. Trichanthin B ist an dieser Position mit einer Methylgruppe substituiert und Trichanthinsäure entsprechend mit einer Carboxygruppe. Aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten und des bereits publizierten und in der Literatur verankerten Trivialnamens Trichanthin B (vgl. EICH, 2008) erscheint daher die Wahl des Namens Trichanthinsäure für die neue Verbindung gerechtfertigt.

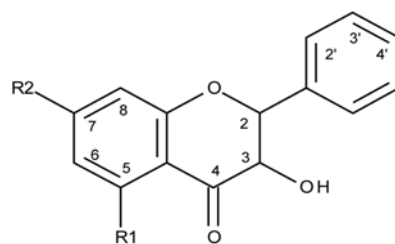
Die Kombination von Phenylpropanen mit Bausteinen des Terpenoidstoffwechsels in *P. nigra* Proben und Propolis, einem Bienenprodukt aus diesen Pappelknospen, ist nicht ungewöhnlich. So wurden bereits mehrere Derivate nachgewiesen, welche mit Isopren-Einheiten verestert sind. Beispiele sind vor allem Ester der Kaffeesäure: Isopent-3-Enylkaffeesäure, 3,3-Dimethylallylkaffeesäure oder 2-Methyl-2-Butenylkaffeesäure (GREENAWAY ET AL., 1988b; YANG ET AL., 2011). In *P. trichocarpa* hingegen scheinen vorwiegend Zimtsäure mit anderen Säuren zu verestern, wie etwa Zimtsäurebenzoesäureester, Zimtsäure-4-Hydroxybenzoesäureester oder

Zimtsäurezimtsäureester. Ebenso liegt auch die *p*-Cumarsäure als Ester vor: Zimtsäure-4-Cumarsäureester, Benzylcumarsäureester oder 1-Phenylethyl-4-Cumarsäureester (GREENAWAY ET AL., 1989). Demnach passt das Vorkommen von Trichanthinsäure (**10**) gut zum Biosynthesepotential der Knospendrüsen.

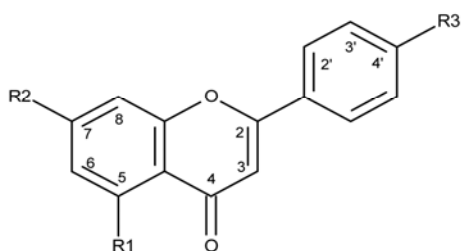
Im Nachfolgenden werden die HPLC-Ergebnisse nach einzelnen Arten getrennt dargestellt und vergleichend diskutiert. Als Ergänzung wird noch kurz auf die DC-Ergebnisse eingegangen und deren Relevanz beurteilt. Analytische Daten zu den isolierten Verbindungen sind im Anhang angeführt.



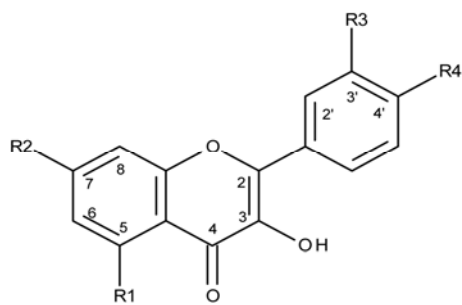
Flavanone: R1, R2, R3: OH; R4: H = Naringenin
 R1, R2: OH; R3, R4: H = Pinocembrin
 R1, R4: OH; R2: OCH3; R3: H = 2,5-diOH-7-Me-Flavanon



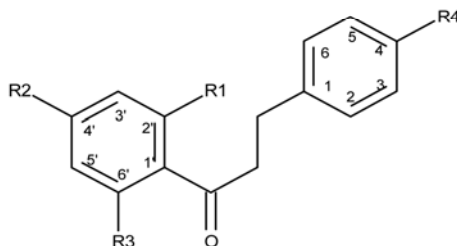
Flavanonole: R1, R2: OH = Pinobanksin



Flavone: R1, R2: OH, R3: H = Chrysin
 R1, R2, R3: OH = Apigenin



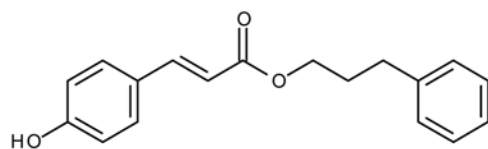
Flavonole: R1, R2: OH; R3, R4: H = Galangin
 R1, R2, R4: OH; R3: H = Kämpferol
 R1, R2, R3, R4: OH = Quercetin



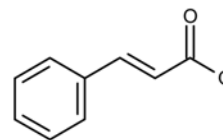
Dihydrochalkone: R1, R3: OH; R2: H; R4: OCH3 = 2',6'-diOH-4'-Me-Dihydrochalkon
 R1, R2, R3: OH; R4: H = 2',4',6'-triOH-Dihydrochalkon
 R1, R2, R3: OH; R4: OCH3 = 2',4',6'-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon
 R1, R3, R4: OH; R2: OCH3 = 2',6',4'-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon
 R1, R3: OH; R2, R4: OCH3 = 2',6'-diOH-4',4'-diOMe-Dihydrochalkon

Abbildung 6: Flavonoide aus *P. trichocarpa* und *P. nigra* (nach WOLLENWEBER, 1975, WOLLENWEBER ET AL., 1987 und GREENAWAY ET AL., 1989)

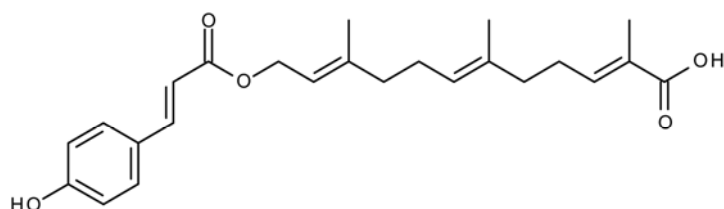
A



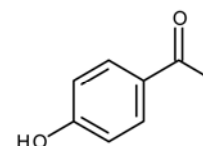
p-Cumarsäurezimtsäureester (11)



Zimtsäure (6)

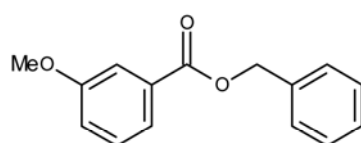


Trichanthinsäure (10)

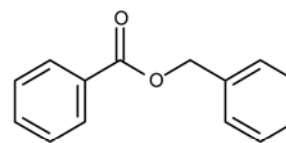


Piceol (7)

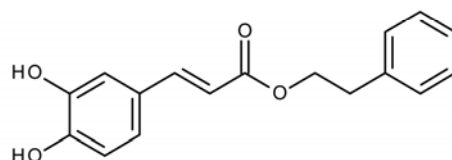
B



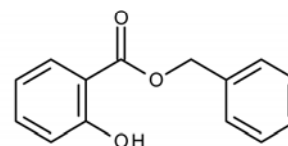
3-OMe-Phenylmethylbenzoessäure (8)



Benzylbenzoat (2)



β-Phenylethylkaffeesäure (CAPE) (13)



Salicylsäurebenzylester (9)

Abbildung 7: Zimtsäurederivate aus *Populus* **A:** isolierte Strukturen aus *P. trichocarpa* Klon 337/64 **B:** Benzylbenzoat aus *P. trichocarpa*, Substanzen der Grundausrüstung von *P. trichocarpa*: 3-OMe-Phenylmethylbenzoessäure und Salicylsäurebenzylester und β-Phenylethylkaffeesäure aus *P. nigra* (nach GREENAWAY ET AL., 1988b, GREENAWAY ET AL., 1989)

3.1 HPLC-Ergebnisse

3.1.1 *P. trichocarpa*

Im Knospenexsudat von *P. trichocarpa* wurden vor allem Phenylpropane als Hauptkomponenten detektiert, während Flavonoide aus unterschiedlichen Stoffklassen nur in geringeren Mengen vorkommen. Die entsprechenden HPLC-Profile unterschiedlicher Herkünfte (Abb. 8-11) wurden vergleichend analysiert und im Nachfolgenden eingehender beschrieben. Die Ergebnisse aller untersuchter Herkünfte werden abschließend diskutiert und sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

3.1.1.1 *P. trichocarpa* Klon 337/64

Das Stoffprofil dieses Klons besteht vorwiegend aus Zimtsäurederivaten. Demnach zählen Piceol (**7**) zusammen mit *p*-Cumarsäure (**3**), Trichanthinsäure (**10**) und Benzylbenzoat (**2**) zu den Hauptkomponenten, sowie ein nicht identifizierter Metabolit (**44**). 3-OMe-Phenylmethylbenzoesäure (**8**) und das Flavonol Galangin (**31**) erscheinen bei der gleichen Retentionszeit, so auch *p*-Cumarsäurezimtsäureester (**11**) und ein weiteres Derivat, bei dem es sich wahrscheinlich um Naringenin-7,4'-diMe (**22***) handelt. Kleinere Peaks im HPLC-Profil entsprechen Kämpferol (**32**), Apigenin (**28**), Chrysin (**26**) und Salicylsäurebenzylester (**9**). Ein weiteres Flavanon, welches bis jetzt noch nicht in *P. trichocarpa* detektiert wurde, konnte als Naringenin-4'-Me (**21**) identifiziert werden (Tab. 5, Abb. 8, A).

Einige Flavonoide, welche E. WOLLENWEBER (1975) im Exsudat identifizierte, konnten nicht detektiert werden. Dazu zählen Apigenin-7,4'-diMe, Galangin-7-Me, Kämpferol-4'-Me (**33**), Quercetin (**34**), und Pinobanksin-3-acetat (**36**) (WOLLENWEBER, 1975; WOLLENWEBER ET AL., 1987). Jedoch haben ENGLISH ET AL. (1991) diese Derivate in ihren *P. trichocarpa* Knospenexsudaten nicht beschrieben. Pinobanksin Derivate, welche an der C-3 Position verestert sind, wurden von diesen Autoren in Arten der Sektion *Aigeiros* gefunden. Arten der

Sektion *Tacamahaca* scheinen die entsprechende Enzymaktivität, um Phenol- oder Flavonoidringe an der Position 3 zu methylieren oder zu verestern, nicht zu besitzen, während die Sektion *Aigeiros* diese wohl aufweist (GREENAWAY ET AL., 1990 b). Es ist möglich, dass einige der Flavonoide, wie zum Beispiel Apigenin-4'-Me oder Kämpferol-4'-Me, im Exsudat in geringen Konzentrationen vorkommen, jedoch unter den größeren Mengen an Zimtsäurederivaten schwer zu detektieren sind (Tab. 5, Abb. 8, A).

Ebenso konnte eine große Anzahl an substituierten Benzoessäuren mit ihren Estern, wie sie ENGLISH ET AL. (1991) mit Hilfe von GC-MS Untersuchungen fanden, nicht detektiert werden. Dabei handelt es sich unter anderem um 1-Phenylethylbenzoat, verschiedene Benzylbenzoate und 2-Phenylethanol. Auch 1-Phenylethanol und sein Ester 1-Phenylethyl-4-cumarsäureester konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Der Klon 337/64 weist mehr Flavonoide auf als die restlichen Proben von *P. trichocarpa* (vgl. WOLLENWEBER, 1975). Galangin (**31**) und Chrysin (**26**) konnten nur in dieser Probe detektiert werden. Das Fehlen bestimmter Flavonole wie Quercetin (**34**) könnte Hinweis darauf geben, dass sich instabilere Substanzen, wie Flavonole mit einem hoch hydroxylierten B-Ring in dem beinahe 40 Jahre alten Exsudat-Präparat bereits umgebaut haben (vgl. MAINI ET AL., 2012; MAKRIS AND ROSSITER, 2000; ZENEKEVICH ET AL., 2007).

Nach ENGLISH ET AL. (1991) erwiesen sich die Akkumulation mehrerer Dihydrochalkone als charakteristisches Merkmal der Sektion *Tacamahaca*. Im Klon 337/64 konnten allerdings 2',4',6'-triOH-4-OMe-Dihydrochalkon (**41**), 2',6',4'-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon (**42**) und 2',6'-diOH-4,4'-diOMe-Dihydrochalkon (**42**) (ENGLISH ET AL., 1991) sowie das 2',6'-diOH-4'-OMe-Dihydrochalkon (P22) (**38**) (WOLLENWEBER, 1975) jedoch nicht detektiert werden. Das Fehlen der typischen Dihydrochalkone und das vermehrte Auftreten von Flavonoiden könnte seine Ursache etwa in einer Fehlbestimmung des Klons oder einem Beschriftungsfehler haben. Da nur mehr das Exsudat vorhanden ist, kann der Klon nicht mehr nachbestimmt werden. Die fehlenden Dihydrochalkone können aber auch Hinweis auf einen Abbau der Substanzen durch mehrfachen Gebrauch

(Erwärmen, Lösen in einem Lösungsmittel, weiteres Erwärmen zum Abdampfen des Lösungsmittels, erneutes Einfrieren) geben. Das Knospenexsudat kann aus diesen Gründen nicht mehr für vergleichende chemosystematische Untersuchungen herangezogen werden.

Abschließend soll noch auf die auffallende Rotfärbung des Knospenexsudats dieses Klons näher eingegangen werden. Diese wird offenbar von Metaboliten verursacht, welche jedoch mit HPLC und DC schwierig zu trennen sind. Das HPLC Profil zeigt ab der 15. Minute eine ansteigende Basislinie, ab der 20. Minute ist ein UV-Spektren-Vergleich in dem Gemisch aus Stoffen nur bei Trichanthinsäure (**10**) möglich (Abb. 8, A). Nach Trennversuchen über Kieselgelsäulen und MPLC zeigen rotgefärbte Fraktionen stets diesen Anstieg der Grundlinie ohne einen eindeutigen Peak. Auch NMR-Messungen dieser Fraktionen ergaben keine Hinweise auf die Struktur. Im photometrischen Versuch absorbierten die rot wirkenden Komponenten das Licht nur bei 200 nm. Auch eine saure Hydrolyse ergab keine Farbveränderung, womit Flavonoide und Anthocyane als verursachendes Prinzip der roten Farbe ausgeschlossen werden können. Eine mögliche Erklärung wäre der sogenannte „ π stacking“ Effekt, eine nicht kovalente Interaktion zwischen Aromaten. KUMAR ET AL. (2010) berichten von UV-VIS-, Fluoreszenz- und H-NMR spektroskopischen Methoden, um diesen Effekt nachzuweisen, was aber hier nicht nachverfolgt werden konnte.

Die unbekannten Substanzen besitzen amphiphile Eigenschaften. Die Säule der HPLC (Reversed-Phase) interagiert mit lipophilen Metaboliten, daher kommen die hydrophileren Verbindungen am Anfang des Chromatogramms. Die farbgebenden Metaboliten erscheinen am Ende, was auf lipophile Substanzen hinweisen würde. Die rotgefärbten Fraktionen wurden jedoch stets am Ende von Trennversuchen über Trockensäulen oder MPLC, das heißt mit hydrophilen Lösungsmitteln (vgl. Tab. 4), aufgefangen. In der Literatur wird auf die Färbung von Knospenexsudaten nur einmal eingegangen. Dabei soll es sich um die beiden Chalkone von Pinostrobin und Pinocembrin handeln, welche die ausschlaggebenden Komponenten für die Farbgebung der Knospenexsudate in *P. nigra* var. *italica* sind (vgl. WOLLENWEBER UND EGGER, 1971).

3.1.1.2 *P. trichocarpa* Klon 200/63

Das HPLC-Profilbild des Klons 200/63 zeigt weniger Substanzen im Vergleich zu jenem von Klon 337/64 (Abb. 8, B). Auch hier sind Piceol (**7**), das unbekannte Derivat (**44**) und mehrere Derivate mit gleicher Retentionszeit, darunter 2',6'-diOH-4'-Me-Dihydrochalkon (**38**) und Benzylbenzoat (**2**), die Hauptkomponenten im Profilbild. Zimtsäure (**6**) findet man nur in sehr geringer Konzentration, so auch zwei Dihydrochalkonderivate, welche auf Grund ihrer Retentionszeiten und UV-Spektren mit 2',6',4-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon (**42***) und 2',6'-diOH-4,4'-diOMe-Dihydrochalkon (**43***) entsprechen. Zwei weitere Derivate konnten wie in *P. trichocarpa* 337/64 als 3-OMe-Phenylmethylbenzoesäure (**8**) und Salicylsäurebenzylester (**9**) identifiziert werden. Der Klon 200/63 ist sehr arm an Flavonoiden. Nach WOLLENWEBER (1975) sollte neben 2',6'-diOH-4'-OMe-Dihydrochalkon (**38**) nur Kämpferol-4'-Me (**24**) vorkommen, was aber hier nicht nachgewiesen werden konnte (Tab. 5, Abb. 8, B).

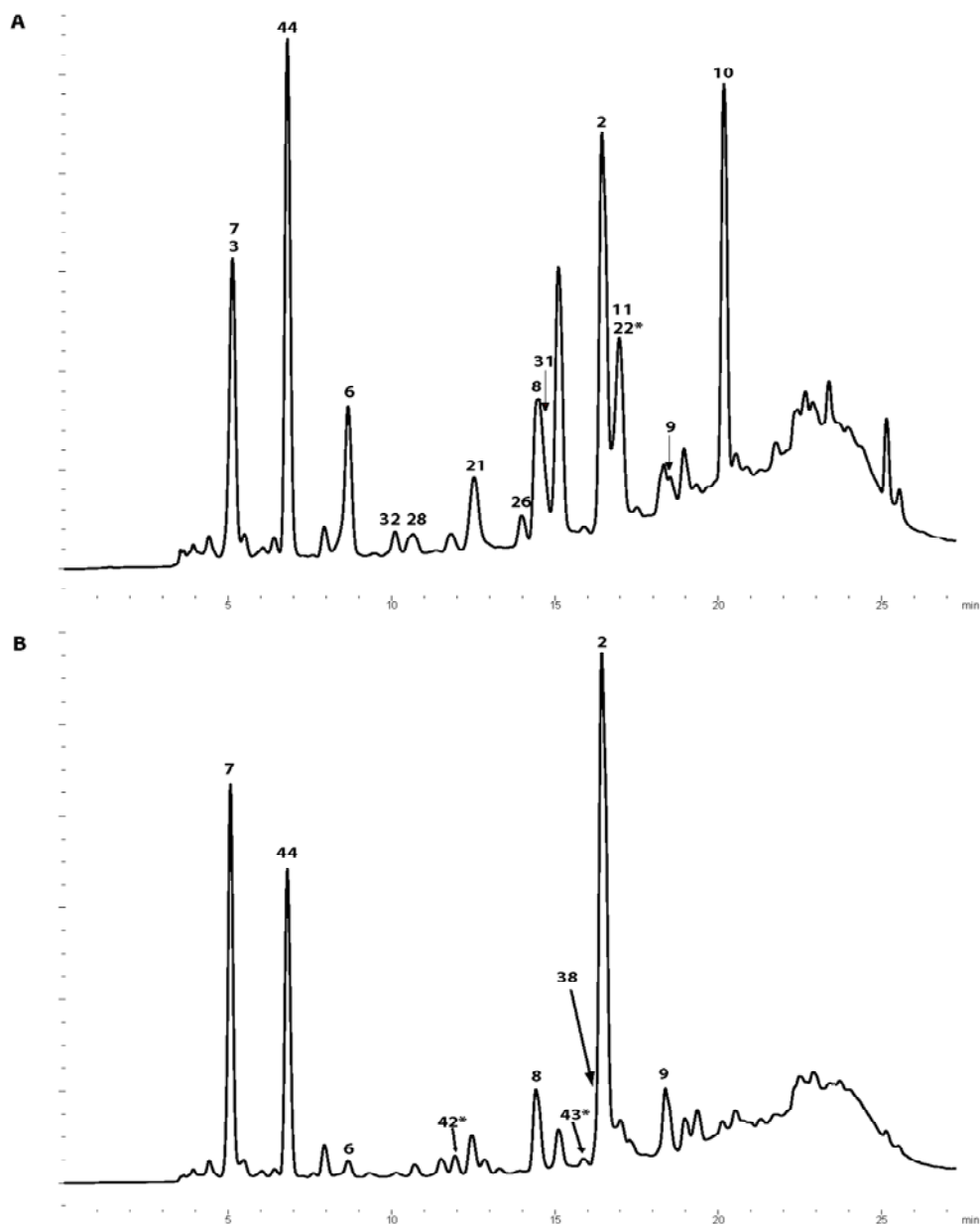


Abbildung 8: HPLC Profile der *P. trichocarpa* Klon-Exsudate 337/64 (A) und 200/63 (B); 2: Benzylbenzoat, 3: *p*-Cumarsäure, 6: Zimtsäure, 7: Piceol, 8: 3-OMe-Phenylmethylbenzoesäure, 9: Salicylsäurebenzylester, 10: Trichanthinsäure, 11: *p*-Cumarsäurezimtsäureester, 21: Nar-4'-Me, 22: Nar-7,4'-Me, 26: Chrysin, 28: Apigenin, 31: Galangin, 32: Kämpferol, 38: 2',6'-diOH-4'-OMe-Dihydrochalkon (P 22), 42: 2',6',4-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon, 43: 2',6',4-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon, 44: nicht identifiziert

3.1.1.3 Stecklinge: *P. trichocarpa* 2010/66 und 101112

Die Exsudate der nordamerikanischen Stecklinge unterscheiden sich kaum in ihrer Zusammensetzung, jedoch in Bezug auf die Konzentrationen der einzelnen Stoffe (Abb. 9). Die Substanzen der Grundausrüstung: Zimtsäure (**6**), Piceol (**7**), 3-OMe-Phenylmethylbenzoesäure (**8**) und Salicylsäurebenzylester (**9**) wurden wie in den Klonen 337/64 und 200/63 detektiert. Ein unbekannter Metabolit (**44**), der nicht mit Hilfe von NMR-Spektroskopie identifiziert werden konnte, zeigt ein identisches UV-Spektrum mit Benzylbenzoat (**2**). Da der Metabolit hydrophiler als Benzylbenzoat ist, handelt es sich womöglich um eines der Hydroxybenzylbenzoat-Derivate, welche ENGLISH ET AL. (1991) identifiziert haben. Benzylbenzoat (**2**) konnte nur im Exsudat von 101112 (Abb. 9, A) eindeutig festgestellt werden, in der Probe von 2010/66 (Abb. 9, B) taucht ein Metabolit (**2***) mit einem fast identischen UV Spektrum bei der entsprechenden Retentionszeit auf. Dieser Peak wird jedoch von mehreren Substanzen gebildet, was eine eindeutige Detektion unmöglich macht. Das Flavon Chrysin (**26**) konnte nur im Exsudat von 101112 detektiert werden.

Das Stoffprofil der Stecklinge 2010/66 und 101112 stimmt durch den hohen Anteil an Dihydrochalkonen weitgehend mit dem Profil für die Sektion *Tacamahaca* überein (ENGLISH ET AL., 1991). 2',4',6'-triOH-Dihydrochalkon (**39**) und 2',4',6'-triOH-4-OMe-Dihydrochalkon (**41**) konnten detektiert werden. Retentionszeiten und UV-Spektren deuten auch auf das Vorkommen von 2',6',4'-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon (**42***) und 2',6'-diOH-4,4'-diOMe-Dihydrochalkon (**43***) (Tab. 5, Abb. 9).

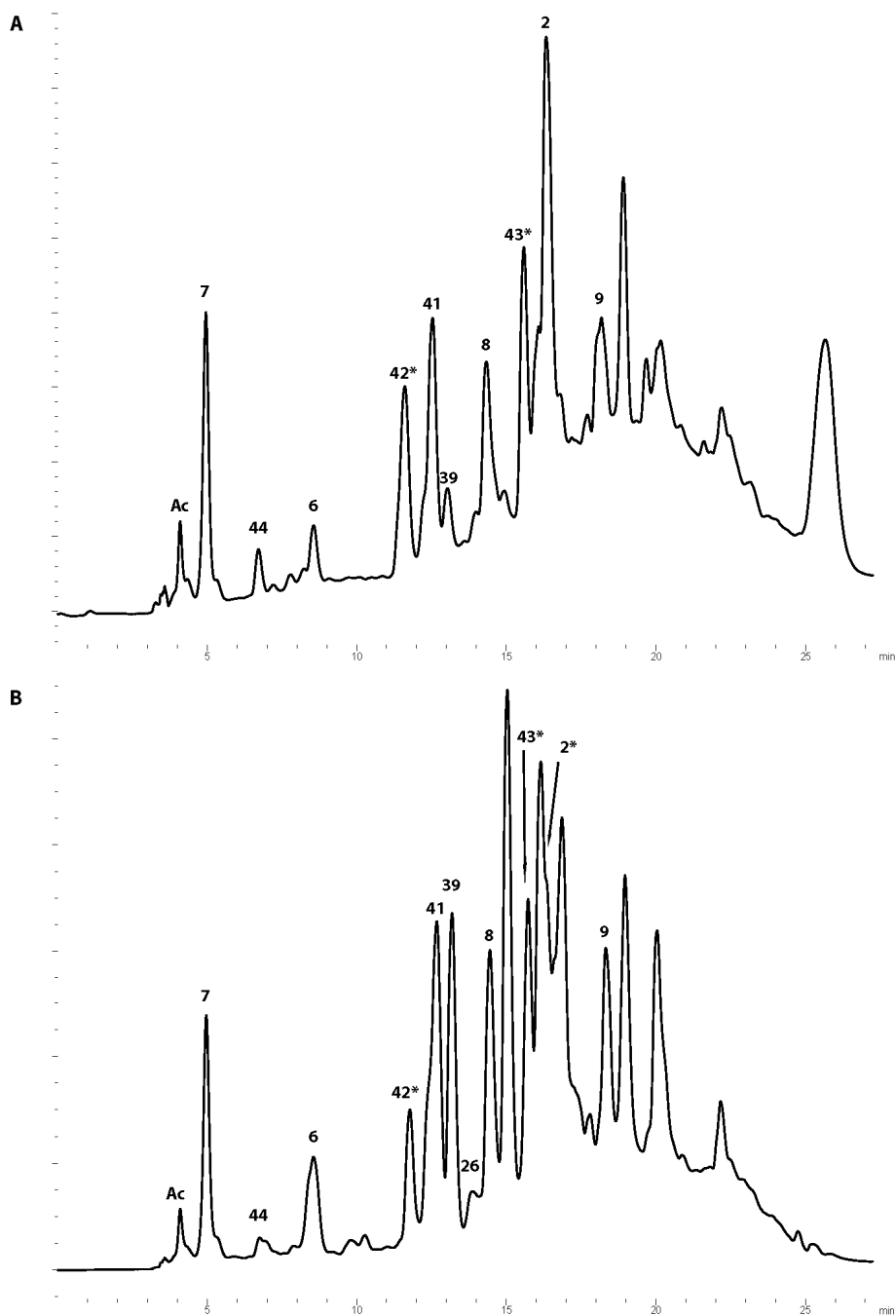


Abbildung 9: HPLC-Profile der Stecklinge von *P. trichocarpa* 2010/66 (A) und 101112 (B); Ac: Aceton, 2: Benzylbenzoat, 6: Zimtsäure, 7: Piceol, 8: 3-Ome-Phenylmethylbenzoesäure, 9: Salicylsäurebenzylester, 26: Chrysin, 39: 2',4',6'-triOH-Dihydrochalkon, 41: 2',4',6'-triOH-4-OMe-Dihydrochalkon, 42: 2',6',4-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon, 43: 2',6'-diOH-4,4'-diOMe-Dihydrochalkon, 44: nicht identifiziert

3.1.1.4 Herbarbelege

Die Knospenexsudate der Herbarbelege sind von einem hohen Anteil an Substanzen geprägt, die ähnlich wie in Klon 337/64 zu einem Anstieg der Basislinie im HPLC-Profilbild führen. Die Exsudate der Herbarbelege HB 1 - HB 3 besitzen in Lösung (MeOH) eine rote Färbung, jedoch heller als die des Klons 337/64, die sich bei schwächeren Konzentrationen erst orange, dann gelblich färben. Das Knospenexsudat von HB 4 zeigt ebenfalls eine schwach rötliche Färbung, diese wird bei geringeren Konzentrationen jedoch rosa.

HB 1 und HB 2

Die Stoffprofile der Knospenexsudate beider Herbarbelege HB 1 und HB 2 unterscheiden sich nicht in ihrer Zusammensetzung und nur gering in ihren Konzentrationen. Die Derivate Piceol (**7**), 3-OMe-Phenylmethylbenzoesäure (**8**) und Salicylsäurebenzylester (**9**) des Grundgerüsts zählen zu den Hauptkomponenten im HPLC Profil. Zimtsäure (**6**) findet man nur in geringer Konzentration. Naringenin-7,4'-diMe (**22***) und Pinocembrin-7-Me (**24***), und der unbekannte Metabolit (**44***) konnten in beiden Fällen nicht eindeutig detektiert werden. Apigenin (**28**) und Kämpferol (**32**) sind die einzigen Flavonoide die mit Sicherheit detektiert werden konnten (Tab. 5, Abb. 10).

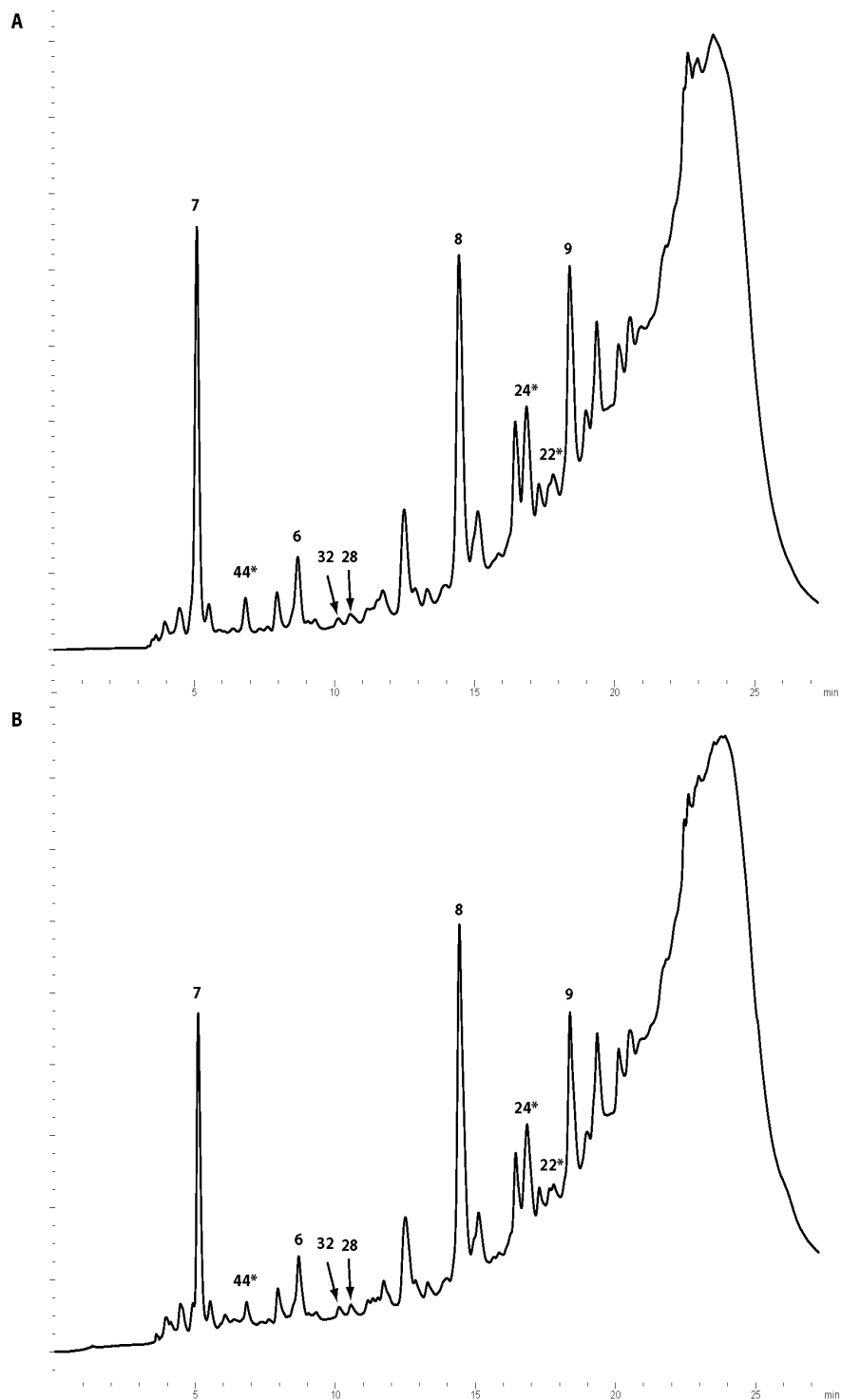


Abbildung 10: HPLC-Profile der Herbarbelege von *P. trichocarpa*: HB 1 (A) und HB 2 (B); 6: Zimtsäure, 7: Piceol, 8: 3-OMe-Phenylmethylbenzoesäure, 9: Salicylsäurebenzylester, 22: Naringenin-7,4'-diMe, 24: Pinocembrin-7-Me, 28: Apigenin, 32: Kämpferol, 44: nicht identifiziert

HB 3

Das Stoffprofil des Knospenexsudates von HB 3 zeigt dieselbe Zusammensetzung wie die Knospenexsudate von HB 1 und HB 2. Die Stoffe der Grundausrüstung (**6-9**) und das unbekannte Derivat (**44**) liegen auch in den 130 Jahren alten Proben vor. Auch hier konnten kaum Flavonoide detektiert werden. UV-Spektren und Retentionszeiten deuten wie in HB 1 und HB 2 auf Naringenin-7,4'-diMe (**22***) und Pinocembrin-7-Me (**24***) (Tab. 2, Abb. 11, A).

HB 4

Das Stoffprofil des Knospenexsudates von HB 4 unterscheidet sich stark in seiner Stoffzusammensetzung von allen anderen untersuchten Knospenexsudaten aus *P. trichocarpa*. Im HPLC-Profilbild findet man *p*-Cumarsäure (**3**) und Zimtsäure (**6**), ihre Derivate der Grundausrüstung für *P. trichocarpa* (**7-9**) fehlen jedoch. Dafür ist das HPLC-Bild von Flavonoiden geprägt (Abb. 11, B). Die Flavone Chrysin (**26**) und Apigenin (**28**) wurden detektiert. Flavonole sind durch Galangin (**31**), Kämpferol (**32**) und Quercetin (**34**) vertreten, Flavanonole durch Pinobanksin (**36**) und Pinobanksin-3-acetat (**37**). Im Gegensatz zu den Knospenexsudate der anderen Herkunft, bei denen das Vorkommen von Flavanonen vermutet werden, wurden hier Pinocembrin (**24**), Pinocembrin-7-Me (**24**), Naringenin (**20**) und ein Metabolit, bei dem es sich wahrscheinlich um Naringenin-4'-Me (**21***) handelt, detektiert. Einige Dihydrochalkone wie etwa 2',6'-diOH-4'-Me-Dihydrochalkon (**38**), 2', 4', 6'-triOH-Dihydrochalkon (**39**), 2',6',4'-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon (**42**) und 2',6'-diOH-4,4'-diOMe-Dihydrochalkon (**43**) konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Tab. 2, Abb. 11, B).

Das Vorkommen von Zimtsäure, *p*-Cumarsäure und Dihydrochalkonen ist typisch für die Sektion *Tacamahaca*. 3-substituierte Phenylpropansäuren wie Kaffeesäure und Ferulasäure und auch Flavanone, vor allem Pinobanksin (**36**) und ihre 3-substituierten Derivate (Pinobanksin-3-methylether und Pinobanksin-3-acetat (**37***) fehlen in der Sektion *Tacamahaca*, sind jedoch in *P. deltoides*,

Sektion *Aigeiros*, zu finden (GREENAWAY ET AL., 1989; GREENAWAY ET AL., 1990a). Arten der Sektion *Tacamahaca* scheinen die entsprechende Enzymaktivität, um Phenol- oder Flavonoidringe an der Position 3 zu methylieren oder zu verestern, nicht zu besitzen, während die Sektion *Aigeiros* diese wohl aufweist. Die intersektionelle Hybride *P. x jackii* besitzt sowohl diese Fähigkeit aus der Sektion *Aigeiros* sowie die Tendenz Dihydrochalkone zu bilden, wie es für *P. trichocarpa* und *P. balsamifera* in der Sektion *Tacamahaca* typisch ist (GREENAWAY ET AL., 1990b). Auf Grund der chemischen Unterschiede wurde die Bestimmung des Beleges überprüft. Es handelt sich wahrscheinlich um *Populus x jackii*, eine Hybride aus *P. balsamifera* und *P. deltoides*, welche aufgrund falsch bestimmter Herbarbelege in der Vergangenheit zu falschen Bestimmungen von *P. trichocarpa* führte (ECKENWALDER, 2010).

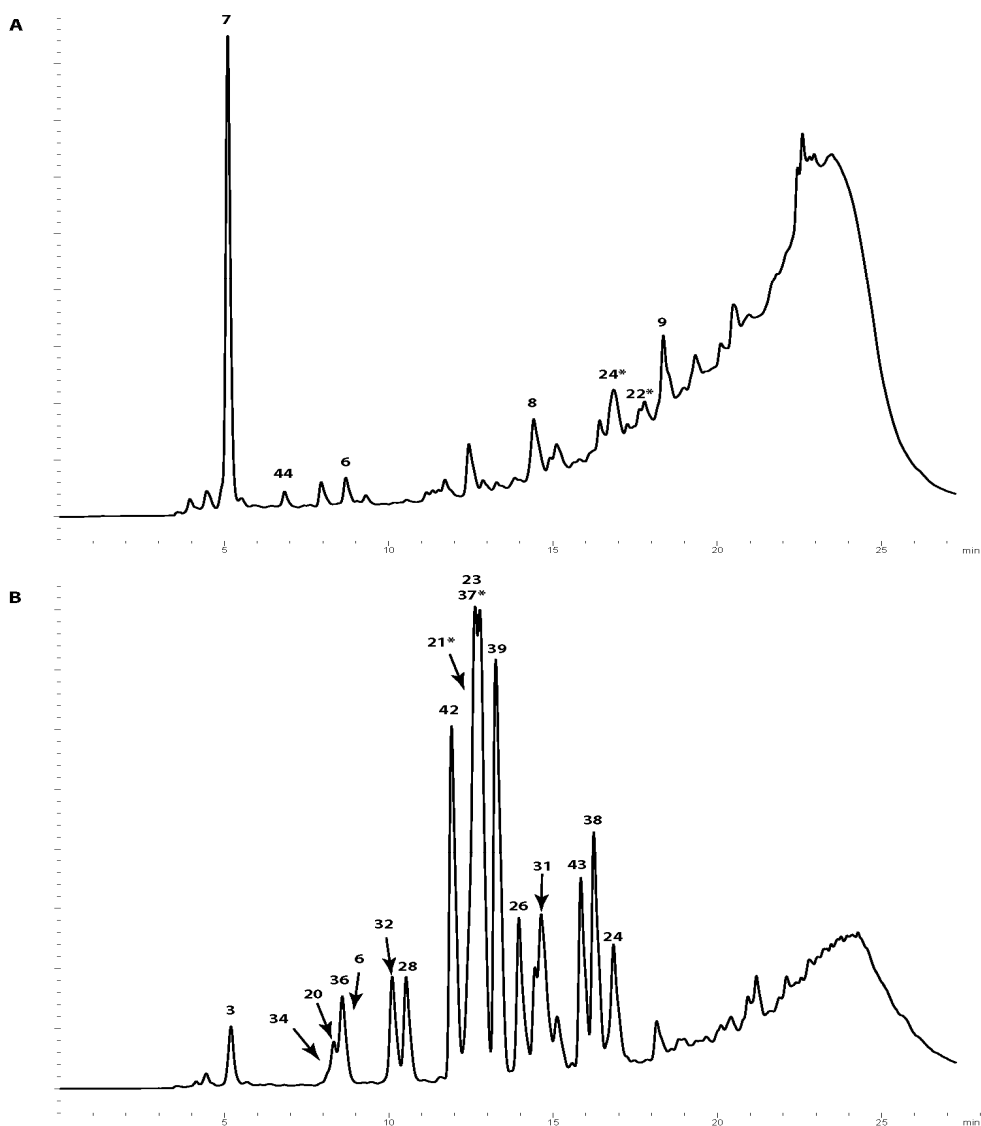


Abbildung 11: HPLC-Profile der Herbarbelege von *P. trichocarpa*: HB 3 (A) und HB 4 (B). **3:** *p*-Cumarsäure, **6:** Zimtsäure, **7:** Piceol, **8:** 3-OMe-phenylmethyl-benzoesäure, **9:** Salicylsäurebenzylester, **20:** Naringenin, **21:** Nar-4'-Me, **22:** Nar-4'-Me, **23:** Nar-7,4'-diMe, **24:** Pinocembrin-7-Me, **26:** Chrysin, **28:** Apigenin, **31:** Galangin, **32:** Kämpferol, **34:** Quercetin, **36:** Pinobanksin, **37:** Pinobanksin-3-acetat, **39:** 2',4',6'-triOH-Dihydrochalkon, **42:** 2',6',4-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon, **43:** 2',6'-diOH-4,4'-diOMe-Dihydrochalkon, **44:** nicht identifiziert

Tabelle 5: Vergleichende Analyse der Knospensexsudate unterschiedlicher Herkunft von *Populus trichocarpa*

Gruppe	Nr.	Semisyst. Name	Klone		Stecklinge		Herbarbelege				Literatur	
			337/64	200/63	2010/66	101112	HB 1	HB 2	HB 3	HB 4	<i>P. trich</i>	1* 2*/3*
Hydroxyzimtsäure- derivate	2	Benzylbenzoat	x	x							x	
	3	<i>p</i> -Cumarsäure	x	x							x	
	6	Zimtsäure	x	x	x	x	x	x	x	x		/x
	7	Piceol			x	x	x	x	x	x	x	
	8	3-OMe-Phenylmethylbenzoesäure	x	x	x	x	x	x	x	x		
	9	Salicylsäurebenzylester	x	x	x	x	x	x	x	x		/x
	10	Trichanthinsäure	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
	11	<i>p</i> -Cumarsäurezimtsäureester	x									
	20	Naringenin								x		
	21	Nar-4'-Me	x							?		
	22	Nar-7,4'-diMe	x				x	x	x	x		
Flavone	23	Pinocembrin								x		
	24	Pinocembrin-7-Me					x	x	x	x		
	26	Chrysin	x			x				x	x	
	28	Apigenin	x				x	x		x	x	
	29	Ap-4'-Me										x
	31	Galangin	x							x	x/x	
	32	Kämpferol	x							x		
	33	Ka-4'-Me					x	x			x	x
Flavanone	34	Quercetin								x	x	
	36	Pinobanksin								x		
Dihydrochalkone	37	Pinobanksin-3-acetat								?		x
	38	2',6'-diOH-4'-OMe-Dihydrochalkon (P22)		x						x		x
	39	2',4',6'-triOH-Dihydrochalkon			x	x				x		
	41	2',4',6'-triOH-4-OMe-Dihydrochalkon			x	x				x	x	
	42	2',6',4-triOH-4'-OMe-Dihydrochalkon		?	?	?				x	x	
	43	2',6'-diOH-4,4'-diOMe-Dihydrochalkon		?	?	?				x	x	

Detektion beruht auf Retentionszeit- und UV-VIS-Vergleich der HPLC Chromatogramme. x: eindeutige Übereinstimmung, ? : vermutete Substanz mit passender Retentionszeit aber nicht vollständiger UV-VIS Übereinstimmung. Literaturvergleich: 1*: English et al., 1991, 2*: Wollenweber, 1975, 3*: Wollenweber et al., 1987.

3.1.1.5 Vergleichende Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen unterschiedlicher Herkünfte und Klone von *P. trichocarpa* ist vergleichend in Tabelle 5 zusammengefasst, für die Strukturformeln wird auf Abbildung 5 verwiesen. Die im HPLC-Profil mengenmäßig dominierenden Phenylpropane waren durchgehend Piceol (**7**), Salicylsäurebenzylester (**9**) und Zimtsäure (**6**), was sich mit früheren Befunden deckt (ENGLISH ET AL., 1991). Gemeinsam mit der kürzlich isolierten 3-Methoxyphenylmethylbenzoesäure (**8**) (FRANSCHITZ A., 2012), erweisen sich somit diese Phenylpropane als Grundausstattung des Knospenexsudats von *P. trichocarpa* in allen untersuchten Proben. Sowohl in den abgespülten Exsudaten der Stecklinge, als auch in den älteren Klon-Exsudaten (337/64; WOLLENWEBER, 1975), sowie in Exsudaten von über 100 Jahre alten Herbaraufsammlungen HB 1, HB 2 und HB 3 konnten diese Derivate detektiert werden. Benzylbenzoat (**2**) war nur in den beiden Klonexsudaten 337/64 und 200/63 nachweisbar, jedoch nicht in jenen der Herbarbelege. Das Phenylpropanderivat *p*-Cumarsäure (**3**) konnte einzig im Knospenexsudat des Klons 337/64 gemeinsam mit Trichanthinsäure (**10**) und *p*-Cumarsäurezimtsäureester (**11**) nachgewiesen werden. Demgegenüber weicht das HPLC-Profil des Herbarbeleges HB 4 deutlich von den übrigen Proben ab.

Flavonoide kommen in den Knospenexsudaten nur vereinzelt bis gar nicht vor, und es lässt sich diesbezüglich auch kein Verteilungsmuster erkennen. So ist das Flavon Chrysin nur in einem von beiden Klonen (200/63), des Weiteren in einem Steckling (101112) sowie einem Herbarbeleg (HB 4) nachweisbar. In den Knospenexsudaten der Herbaraufsammlungen wurden mit Ausnahme des Herbarbelegs von Gillett (HB 4) nur vier (HB 1 und HB 2) bzw. 2 (HB 3) Flavonoide gefunden (Tab. 5). Die für die Sektion *Tacamahaca* typischen Dihydrochalkone konnten ebenfalls nicht in allen Proben festgestellt werden. Der Klon 337/64 und die Herbarbelege HB 1-3 weisen keine Dihydrochalkone im Knospenexsudat auf. Der Klon 200/63 und die Stecklinge 2010/66 und 101112 zeigen Anzeichen für das Vorkommen dieser Stoffgruppe. Der Beleg HB 4 zeigt die typischen Dihydrochalkone der Sektion *Tacamahaca* (Tab. 5). Über die Gründe, warum

Flavonoide und Dihydrochalkone nicht in allen Proben detektiert werden konnten, kann aufgrund der derzeitigen Untersuchungen keine Aussage getroffen werden. Dazu ist das Vergleichsmaterial auch zu heterogen. Vertiefende Untersuchungen sowohl an Herbarbelegen und Stecklingen sind erforderlich, um Akkumulationstendenzen herauszuarbeiten, welche chemosystematisch bedeutsam sein könnten. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erscheinen die Phenylpropane sowie eingeschränkt auch die Dihydrochalkone gute Kandidaten für chemische Merkmale zu sein. Vergleiche mit Arten aus anderen Sektionen könnten Aufschluss darüber geben, ob sich die Phenylpropanderivate der Grundausrüstung auch innerhalb der Gattung als chemosystematisch relevant erweisen.

3.1.2 *Populus nigra*

Das Knospenexsudat von *P. nigra* setzt sich überwiegend aus Kaffeesäure (**1**), *p*-Cumarsäure (**3**), Ferulasäure (**4**), Isoferulasäure (**5**) und dem Kontaktallergen 3,3-Dimethylallylkaffeesäure (**15**) zusammen. Letztere Verbindung weist den Peak zur selben Retentionszeit wie β -Phenylethylkaffeesäure (CAPE) (**13***) auf (Abb. 12, A). Nach früheren Arbeiten kommen auch geringe Mengen an Zimtsäure (**6**) vor (DUDONNÉ ET AL., 2011, GREENAWAY ET AL., 1990c; ISIDOROV AND VINOGOROVA, 2003; RUBIOLO ET AL., 2013;). Diese Verbindung konnte hier zwar nicht detektiert werden, dafür aber ihr Derivat *trans*-Zimtsäure-*trans*-isoferulasäureester (**12**) (Tab. 6).

Im HPLC-Profilbild von *P. nigra* fallen die Flavanone Pinocembrin (**23**) und Pinobanksin-3-acetat (**37***) als Hauptkomponenten auf. Pinobanksin (**36**) und die Flavone Galangin (**31***) und Chrysin (**26**) sind in relativ hoher Konzentration zu finden (Abb. 12, A; Tab 6). GREENAWAY ET AL. (1990c) zeigten, dass sich Varietäten von *P. nigra* hinsichtlich ihrer Exsudatzusammensetzung unterscheiden. Die Zusammensetzung der untersuchten Probe entspricht zum Teil der dort beschriebenen *P. nigra* var. *betulifolia*, jedoch konnte das Pinostrobinchalkon (2',6'-diOH-4'-Me-Chalkon) und das Pinocembrinchalkon (4',6'-diOH-Chalkon)

hier nicht detektiert werden (vgl. GREENAWAY ET AL., 1990c). Chrysin-7-Me (**27**) ist häufig Bestandteil im Knospenexsudat von *P. nigra*, kommt aber nicht durchgehend in dieser Art vor (vgl. RUBIOLO ET AL. 2012, GREENAWAY ET AL., 1990c). WOLLENWEBER (1975) detektierte es hingegen in allen 8 untersuchten Proben. Das ungewöhnlich substituierte Flavanon 2,5-diOH-7-OMe-Flavon (**25**) (P4) (WOLLENWEBER, 1975) konnte hier nicht detektiert werden.

3.1.3 „Bee Pure Propolis“ Tabletten

Das HPLC-Profilbild der Propolis Tabletten ist mit jenem von *Populus nigra* weitgehend identisch (Abb. 12, B). Allerdings fehlt das Flavon Chrysin-7-Me. Ein Metabolit, dessen Retentionzeit bei Minute 11.98 liegt und dessen UV-Spektrum Ähnlichkeit mit Lasiocarpin B aufweist konnte nicht mit Sicherheit identifiziert werden. Das Fehlen von Chrysin-7-Me erscheint aber nicht so wesentlich, da das Vorkommen dieser Verbindung in *P. nigra* Proben unterschiedlicher Herkünfte schwankend ist.

Durch die Ähnlichkeit der Probe mit *P. nigra* kann die Aussage der Firma Hedera, ihr Produkt sei so wie Propolis in der Natur vorkommt, durchaus bestätigt werden. Jedoch sollte der Metabolit bei Minute 11.98 noch identifiziert werden. Es handelt sich mit Sicherheit nicht um Lasiocarpin B, die beiden Stoffe haben nicht die gleiche Retentionszeit und wurden deshalb nicht im HPLC-Profilbild markiert.

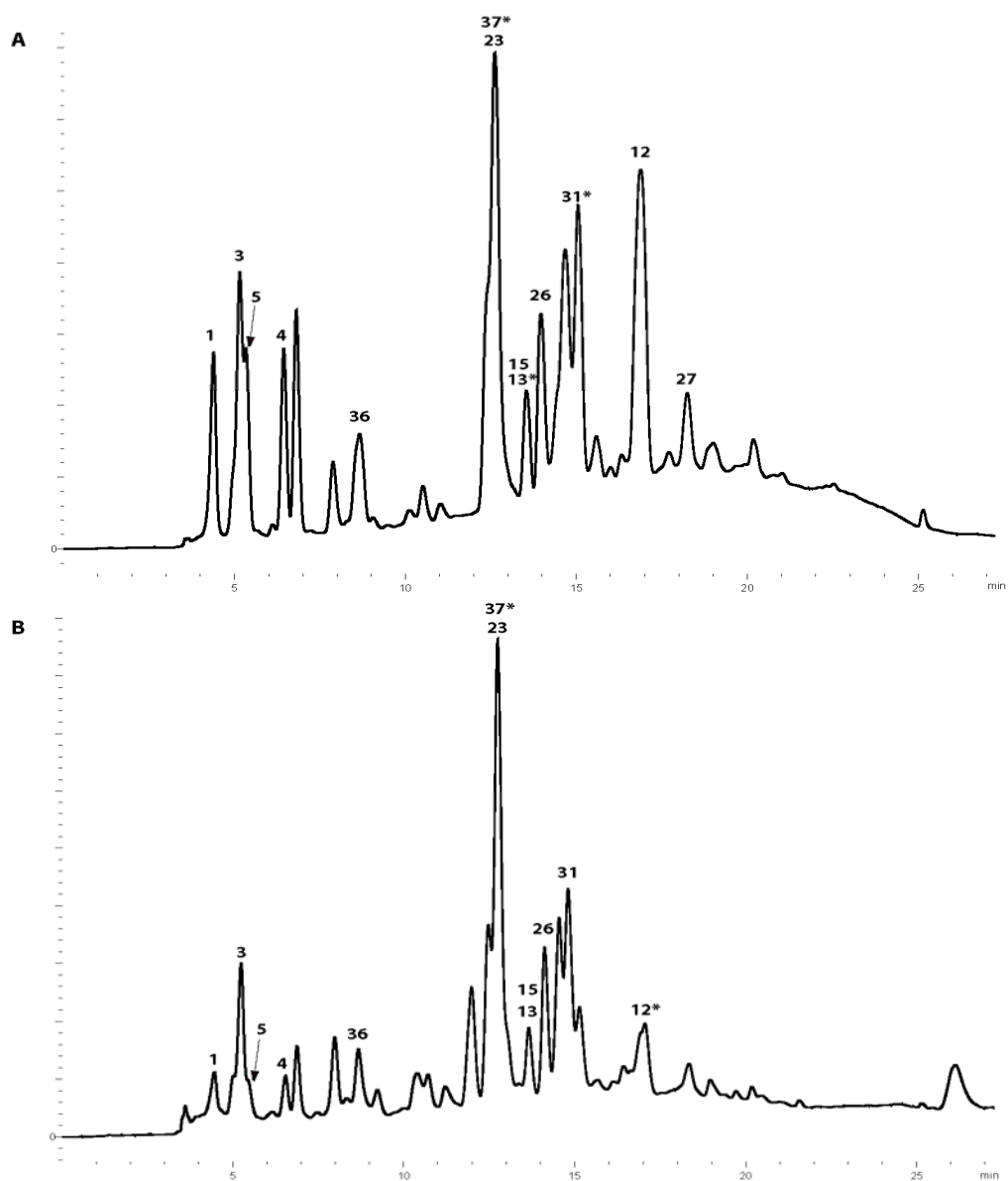


Abbildung 12: HPLC-Profil von *P. nigra* (A) und „Bee Pure Propolis“ Tabletten der Firma Hedera (B); 1: Kaffeesäure, 3: *p*-Cumarsäure, 4: Ferulasäure, 5: Isoferulasäure, 12: *trans*-Zimtsäure-*trans*-isoferulasäureester, 13: β -Phenylethylkaffeesäure, 15: 3,3-Dimethylallylkaffeesäure, 23: Nar-7,4'-diMe, 26: Chrysin, 27: Chry-7-Me, 31: Galangin, 36: Pinbanksin, 37: Pinobanksin-3-acetat

Tabelle 6: Vergleichende Analyse des Knospenexsudats von *Populus nigra* mit Propolis-Tabletten und Literaturdaten

Gruppe	Nr.	semisyst. Name	<i>P. nigra</i>	Literatur		Propolis	Literatur
				1*/2*	3*		4*
Hydroxyzimtsäure-derivate	1	Kaffeensäure	x		x	x	x
	3	<i>p</i> -Cumarsäure	x		x	x	x
	4	Ferulasäure	x		x	x	x
	5	Isoferulasäure	x		x	x	
	6	Zimtsäure			x		
	12	<i>trans</i> -Zimtsäure- <i>trans</i> -isoferulasäureester	x			x	
	13	β -Phenylethylkaffeensäure (CAPE)	?			x	x
Flavanone	15	3,3-Dimethylallylkaffeensäure	x		x	x	
	20	Naringenin					x
	23	Pinocembrin	x		x/x	x	x
	24	Pinocembrin-7-Me			x/x		
	25	2,5-diOH-7-Me-Flavanon (P4)			x/x		
Flavone	26	Chrysin	x		x/x	x	x
	27	Chry-7-Me	x		x/x		
	28	Apigenin			/x		
Flavonole	31	Galangin	?		x/x	x	x
	32	Kämpferol					x
	34	Quercetin			x/x		x
	35	Quer-7-Me			x/x		
Flavanonole	36	Pinobanksin	x			x	x
	37	Pinobanksin-3-acetat (P20)	?			?	x

Detektion beruht auf Retentionszeit- und UV-VIS-Vergleich der HPLC Chromatogramme. x: eindeutige Übereinstimmung, ?: vermutete Substanz mit passender Retentionszeit aber nicht vollständiger UV-VIS Übereinstimmung, Propolis: „Bee Pure Propolis“ Tabletten der Firma Hedera, Literaturvergleich: 1*: Wollenweber et al., 1987, 2*: Wollenweber, 1975, 3*: English et al., 1991, 4*: Kasiotis, 2014

3.2 Dünnschichtchromatographie

Diese Methode wurde zur vergleichenden co-chromatographischen Erfassung der Exsudatprofile mit Testsubstanzen (Tab. 7) verwendet. Wesentlicher war ihre Anwendung zur Überprüfung aufgetrennter Fraktionen nach präparativen Trennschritten. Abbildung 13 gibt ein Beispiel für die Anwendung dieser Methode. Interessanterweise sind Flavonoide in den Knospenexsudaten nach Entwicklung der DC Platte kaum bzw. nicht detektierbar, vermutlich weil sie in geringen Mengen vorkommen. Daher sind sie zumeist erst nach Auftrennen über Kieselgelsäulen in den Fraktionen als blau fluoreszierende Spots erkennbar. Nach Besprühen der entwickelten DC Platte mit Anisaldehyd Sprühreagenz und anschließendem Erhitzen (Abb. 13, C) wird eine violette Bande im oberen Viertel der DC Platte sichtbar, welche wahrscheinlich von Terpenoiden gebildet wird.

Das Knospenexsudat von *P. trichocarpa* ergibt nach Entwicklung der DC Platte einen bestimmten Fingerabdruck. Dieser wird unter anderen von den Substanzen der Grundausrüstung (vgl. Tab. 5): Zimtsäure (**6**), Piceol (**7**), 3-OMe-Phenylmethylbenzoesäure (**8**) und Salicylsäurebenzylester (**9**) gebildet (Abb. 13). Die DC Profile der Knospenexsudate HB 1 und HB 2 sind mit dem Klon 337/64 fast ident, auch der Beleg HB 3 zeigt ein ähnliches Stoffprofil. Die Substanzen der Grundausrüstung sind auch hier vorhanden. Das Knospenexsudat von HB 4 weist jedoch ein davon abweichendes Profil auf. Demnach sind auf der DC mehr Flavonoide und weniger Zimtsäurederivate detektierbar, und die Substanzen der Grundausrüstung fehlen. Wie schon in 3.1.1.4 erwähnt wurde, handelt es sich hier nicht um *P. trichocarpa* sondern um *P. x jackii* (*P. balsamifera* x *P. deltoides*).

Der in dieser Arbeit isolierte Metabolit Trichanthinsäure färbt sich nach Besprühen mit Anisaldehyd Sprühreagenz (Abb. 13, C) dunkel (violett). Nur in Klon 337/64 ist bei gleichem R_f-Wert eine Verfärbung erkennbar. In den Knospenexsudaten von HB 1-4 ergeben sich keine Hinweise auf Vorliegen dieser Substanz.

Im Knospenexsudat von *P. nigra* sind ebenfalls nur wenige Flavonoide erkennbar, was auch hier an geringen Konzentrationen, im Vergleich zu den Zimtsäurederivaten, liegen kann. Kaffeesäure (**1**), *trans*-Zimtsäure-*trans*-isoferulasäureester (**12**) und 3,3-Dimethylallylkaffeesäure (**15**) sind zu erkennen. Die DC gibt Hinweise auf das Vorkommen von Pinocembrin-7-Me (**24**), was in der HPLC nicht bestätigt werden konnte. Die mituntersuchten Propolis Tabletten stimmen dünnschichtchromatographisch gut mit dem Profil der Knospen von *P. nigra* überein.

Die Dünnschichtchromatographie kombiniert mit UV Detektion und Sprühreagenzien eignet sich zur Überprüfung von Fraktionen welche über Kieselgelsäulen aufgetrennt wurden. Ein Vorteil liegt durchaus darin, dass man viele Proben auf einmal und in kurzer Zeit entwickeln kann. Im Vergleich zur HPLC ist die DC jedoch eher ungenau, was man am Beispiel der Knospenexsudate gut erkennen kann. Viele Substanzen sind schwierig aufzutrennen, weisen den selben Rf-Wert auf, und sind daher kaum zu identifizieren.

3.2.1 Vergleichssubstanzen

Tabelle 7: Vergleichssubstanzen der DC

1	Kaffeesäure	21	Naringenin-4'-Me
6	Zimtsäure	22	Naringenin-7,4'-Me
7	Piceol	23	Pinocembrin
8	3-OMe-Phenylmethylbenzoesäure	24	Pinocembrin-7-Me
9	Salicylsäurebenzylester	26	Chrysin
10	Trichanthinsäure	28	Apigenin
11	<i>p</i> -Cumarsäurezimtsäureester	29	Apigenin-4'-Me
12	<i>trans</i> -Zimtsäure- <i>trans</i> -isoferulasäureester	32	Kämpferol
13	β -Phenylethylkaffeesäureester	33	Kämpferol-4'-Me
14	β -Phenylethylzimtsäureester	34	Quercetin
15	3,3-Dimethylallylkaffeesäureester	35	Quercetin-7-Me
16	LB 2	36	Pinobanksin
17	LB 3	37	Pinobanksin-3-acetat
18	C-10-homologes LB 1	38	2',6'-diOH-4'-Me-Dihydrochalkon
19	C-15-homologes LB 1	39	2', 4', 6'-triOH-Dihydrochalkon
20	Naringenin		

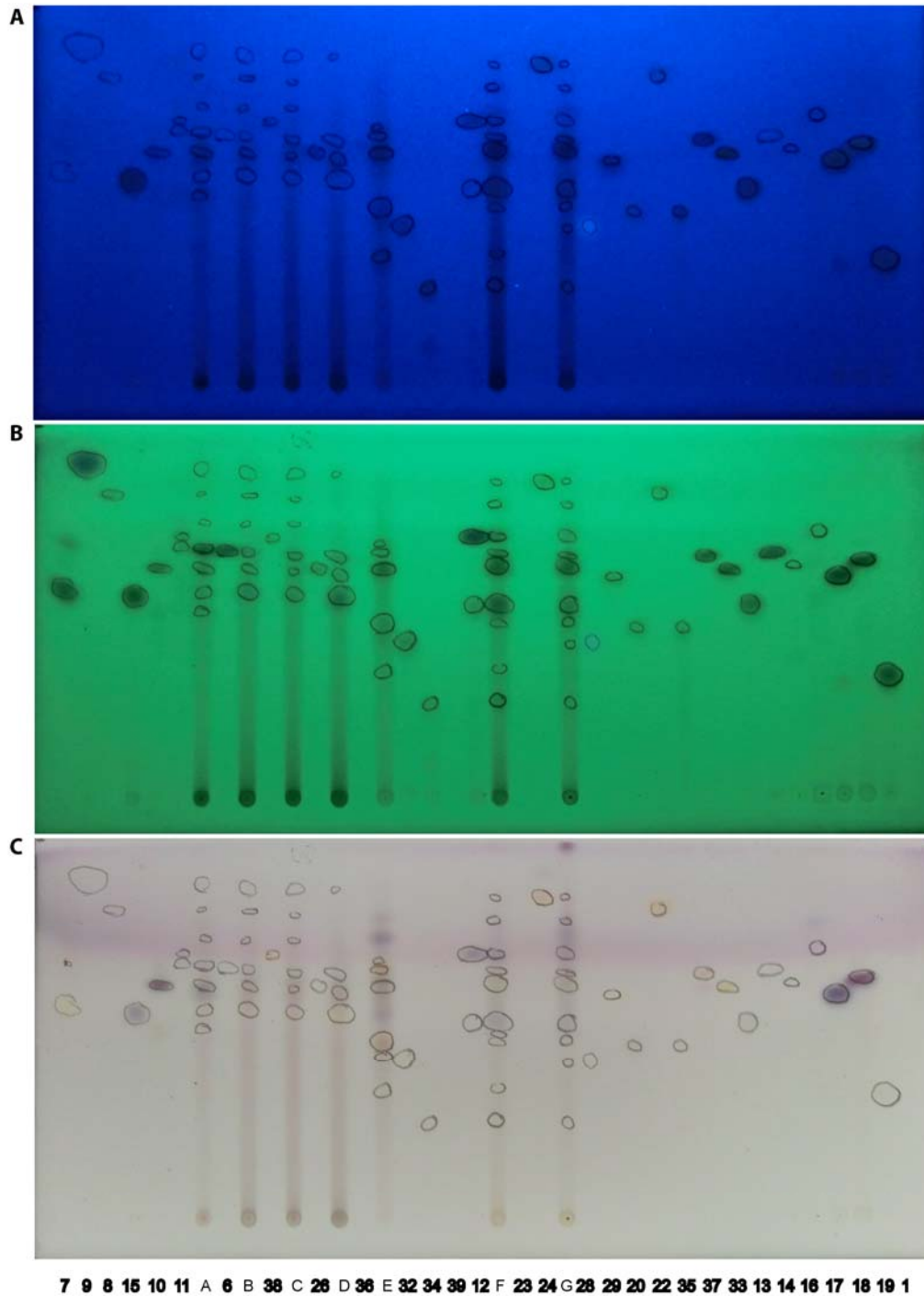
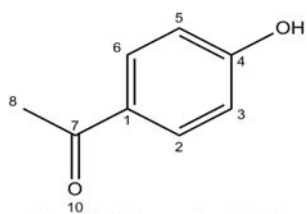
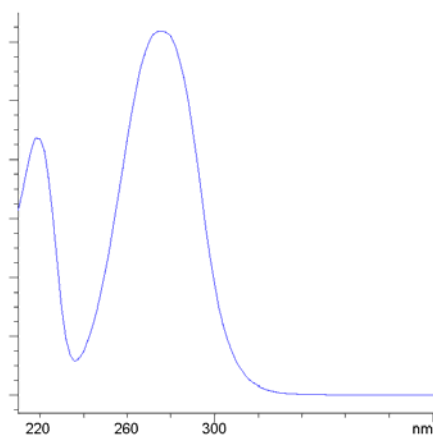


Abbildung 13: Dünnschichtchromatographie der Knospenexsudate und Vergleichssubstanzen, UV-VIS Detektion bei 254 nm (**A**), 364 nm (**B**) und nach Behandlung mit Anisaldehyd Sprühreagenz (**C**); Vergleichssubstanzen siehe Tabelle 7, A: *P. trichocarpa* 337/64, B: HB 1, C: HB 2, D: HB 3, E: HB 4, F: *P. nigra*, G: „Bee Pure Propolis“

3.3 Isolierte Substanzen

Isolierte Substanzen wurden mit ihrer Struktur, chemischer Formel, Molekulargewicht sowie exakter Masse, ihrem UV-Spektrum in MeOH und den NMR-Daten abgebildet.

3.3.1 Piceol (4-Hydroxyacetophenon) (7)



Chemical Formula: $C_8H_8O_2$

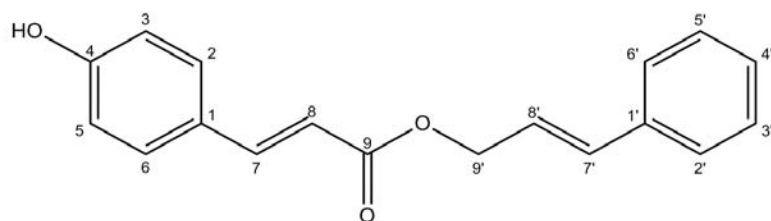
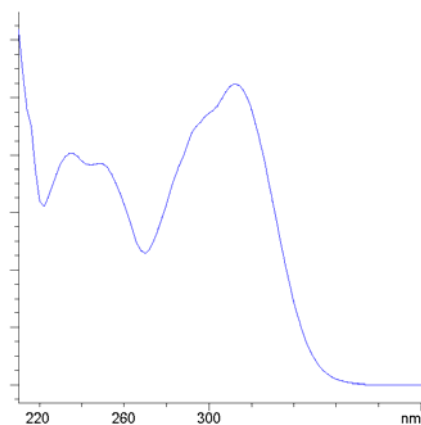
Exact Mass: 136,05

Molecular Weight: 136,15

MS OK

Atomnummer	^{13}C	1H
1	130.48	-
2	130.97	7.91 (8.7)
3	115.29	6.89(8.7)
4	160.01	-
5	115.29	6.89(8.7)
6	130.97	7.91(8.7)
7	197.02	-
8	26.33	2.56

3.3.2 *p*-Cumarsäurezimtsäureester (8)



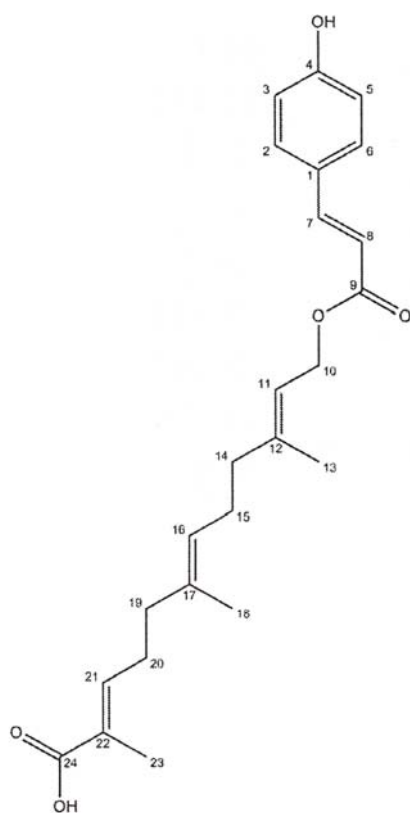
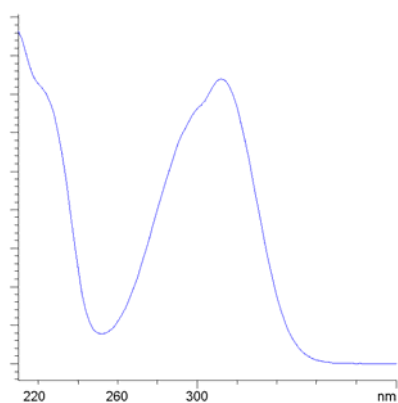
Chemical Formula: C₁₈H₁₆O₃

Exact Mass: 280,11

Molecular Weight: 280,32

Atomnummer	¹³ C	¹ H	Atomnummer	¹³ C	¹ H
1	127.34	-	1'	136.27	-
2	130.01	7.44	2'	126.63	7.41
3	115.86	6.85	3'	128.60	7.33
4	157.57	-	4'	128.04	7.26
5	115.86	6.85	5'	128.60	7.33
6	130.01	7.44	6'	126.63	7.41
7	144.7	7.68(15.94)	7'	134.13	6.71(15.84)
8	115.44	6.35(15.94)	8'	123.39	6.36
9	167.1	-	9'	65.04	4.87

3.3.3 Trichanthinsäure (10)



Atomnummer	¹³ C	¹ H
1	127.26	-
2	129.92	7.41 (8.6)
3	115.88	6.84 (8.6)
4	157.65	-
5	115.88	6.84 (8.6)
6	129.92	7.41 (8.6)
7	144.45	7.62 (15.5)
8	115.59	6.29 (15.6)
9	167.57	-
10	61.39	4.72 (7.3)

4. Literaturverzeichnis

- Alcerito, T., Barbo F. E., Negri G., Santos D. Y .A. C., Meda C. I., Claudia M., Young M., Chavez D. and Blatt C. T. T., 2001. Foliar Epicuticular Wax of *Arrabidaea brachypoda*: Flavonoids and Antifungal Activity. *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 677–683.
- Angiosperm Phylogeny Group III, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG III, *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 105–121.
- Asakawa, Y., Takemoto T., Wollenweber E. and Aratani T., 1977. Lasiocarpin A, B and C, three novel phenolic triglycerides from *Populus lasiocarpa*. *Phytochemistry* 16, 1791-1795.
- Bankova, V. B., DeCastro S. L. and Marcucci M. C., 2000. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. *Apidologie* 31, 3–15.
- Bankova V., Popova M., Bogdanov S. and Sabatini A. G., 2002. Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Naturforschung* 57c, 530–533.
- Bankova, V., 2005. Recent Trends and Important Developments in Propolis Research. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 2, 29–32.
- Barnes, B. V., 1966. The Clonal Growth Habitat of American Aspens. *Ecology* 47, 439–447.
- Brattsten, L. B., 1979. Biochemical Defense Mechanisms in Herbivores against Plant Allelochemicals. In: *Herbivores. Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. 199–270, Rosenthal, G. A. and Janzen, D. H., Eds., Academic Press, New York.
- Brayshaw, T. C., 1965. The Status of the Black Cottonwood (*Populus trichocarpa* Torrey and Gray). *Canad. Field-naturalist* 79, 91–95.
- Boeckler, G. A., Gershenzon J. and Unsicker S. B., 2011. Phenolic Glycosides of the Salicaceae and their Role as Anti-herbivore Defense. *Phytochemistry* 72, 1497–1509.
- Bohm, B. A., 1998. *Introduction to Flavonoids. Chemistry and Biochemistry of Organic Natural Products* 2, CRC Press.
- Burdock, G. A., 1998. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food and Chemical Toxicology* 36, 347–363.

- Chase, M. W., Zmarzty S., Dolores Lledó M., Wurdack K. J., Swensen S. M. and Fay M. F., 2002. When in Doubt, Put It in Flacourtiaceae: A Molecular Phylogenetic Analysis Based on Plastid *rbcL* DNA. *Kew Bulletin* 57, 141–181.
- Chen, F., Liu C., Tschaplinski T. and Zhao N., 2009. Genomics of Secondary Metabolism in *Populus*: Interaction with Biotic and Abiotic Environments. *Critical reviews in Plant Science* 28, 375–392.
- Critchfield, W. B., 1960. Leaf Dimorphism in *Populus trichocarpa*. *American Journal of Botany* 47, 699–711.
- Cronquist, A., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. NY: Columbia University Press.
- Davidson, A. G., and Prentice R. M., 1968. Insects and diseases. In: Growth and utilization of poplars in Canada. Ministry of Forestry and Rural Development, Ottawa, ON. 116-144.
- Dickmann, D. I., 1971. Photosynthesis and Respiration by developing Leaves of Cottonwood (*Populus deltoides* Bartr.). *Botanical Gazette* 132, 253–259.
- Dixon, R. A. and Strack D., 2003. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. *Phytochemistry* 62, 815–816.
- Dudonné, S., Poupard P., Coutiere P., Woillez M., Richard T., Mérillon J. M., and Vitrac X., 2011. Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 4527-4536.
- Eckenwalder, J. E., 1980. Foliar Heteromorphism in *Populus* (Salicaceae), a Source of Confusion in the Taxonomy of Tertiary Leaf Remains. *Systematic Botany* 5, 366–383.
- Eckenwalder, J. E., 1996. Systematics and evolution of *Populus*. In: *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation*. Part I, Chapter 1. Edited by R.F. Stettler, H. D.
- Eckenwalder, J. E., 2010. *Populus*, Sp. Pl. 2: 1034. 1753; Gen. Pl. Ed. 5, 456. 1754. In: *Flora of North America: Volume 7: Magnoliophyta: Salicaceae to Brassicaceae*. Part I, Chapter 1.
- Eich, E., 2008. Phenylalanine-derived metabolites/Phenylpropanoids, in: *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites: Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance*. Springer-Verlag Berlinheideberg 2008.

- Engler A. und Prantl K., 1889. Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten; Teil 3 Abteilung 1; Verlag von Wilhem Engelmann.
- English, S., Greenaway W. and Whatley F. R., 1991. Analysis of Phenolics of *Populus trichocarpa* bud exsudate by GC-MS. *Phytochemistry*, 30, 531–533.
- English S., Greenaway W. and Whatley F. R., 1992. Analysis of Phenolics in the bud exudates of *Populus deltoids*, *P. fermentii*, *P. sargentii* and *P. wislizenii* by GC-MS. *Phytochemistry*, 31, 1255–1260.
- Escalante-Pérez, M., Jaborsky M., Lautner S., Fromm J., Müller T., Dittrich M., Kunert M., Boland W., Hedrich R. and Ache P., 2012. Poplar Extrafloral Nectaries: Two Types, Two Strategies of Indirect Defenses against Herbivores. *Plant Physiology* 159, 1176–1191.
- Farr, D. F., Bills G. F., Cnamuris G. P. and Rossman A. Y., 1989. Fungi on plants and plant products. The US APS Press, St. Paul, MN.
- Fischer, M. A., Oswald K. und Adler W., 2008. Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol; 3. Auflage; Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, Linz.
- Franschitz, A., 2012. Vergleichende phytochemische Untersuchungen an Pappel-Arten mit Schwerpunkt *Populus trichocarpa*. Bakkalaureatsarbeit, Universität Wien.
- Gilg, A., 1914. Zur Frage der Verwandtschaft der Salicaceae mit den Flacourtiaceae, *Botanisches Jahrbuch für Systematik* 50, 424–434.
- Greenaway, W., Scaysbrook T. and Whatley F. R., 1987. The Analysis of Bud Exudate of *Populus x euramericana*, and Propolis, by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Proceedings of the Royal Society of London* 232, 249–272.
- Greenaway, W. T., Scaysbrook T. and Whatley F. R., 1988a. Phenolic Analysis of Bud Exudate of *Populus lasiocarpa* by GC/MS. *Phytochemistry* 27, 3513–3515.
- Greenaway, W., Wollenweber E., Scaybrook T. and Whatley F. R., 1988b. Esters of caffeic acid with aliphatic alcohols in bud exudate of *Populus nigra*. *Zeitschrift für Naturforschung* 43c, 795-798.
- Greenaway, W. T., May J. and Whatley F. R., 1989. Flavonoid Aglycones identified by Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Bud Exudate of *Populus balsamifera*. *Journal of Chromatography* 472, 393–400.
- Greenaway, W., English S. and Whatley F. R., 1990a. Phenolic Composition of Bud Exudates of *Populus deltoides*. *Zeitschrift für Naturforschung* 45c, 587–593.

- Greenaway, W., Davidson C. G., Scaysbrook T., May J. and Whatley F. R., 1990b. Hybrid Origin of *Populus x jackii* confirmed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of its Bud Exudate. *Zeitschrift für Naturforschung* 45c, 594–598.
- Greenaway, W., English S. and Whatley F. R., 1990c. Variation in bud exudate composition of *Populus nigra* assessed by gas chromatography-mass spectrometry. *Zeitschrift für Naturforschung* 45, 931-936.
- Greenaway, W. and Whatley F. R., 1990. Analysis of Phenolics of Bud Exudate of *Populus angustifolia* by GC-MS. *Phytochemistry*, 29, 2551–2554.
- González-Molina, E., Domínguez-Perles R., Moreno D. A. and Gracia-Viguera C., 2010. Natural Bioactive Compounds of Citrus limon for Food and Health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 327–345.
- Hadacek, F., 2002. Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Science* 21, 273–322.
- Harborne, J. B. 1989. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 1, Plant Phenolics, Dey P. M. and Harborne J. B. (Eds.), Academic Press, London, 1.
- Hallier, H., 1908: Über Juliana, eine Terebinthaceen-Gattung mit Cupula, und die wahren Stammeltern der Kätzchenblütler. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* II, 23, 81–265.
- Hartmann, T., 2008. The Lost Origin of Chemical Ecology in the late 19th Century. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105, 4541–4546.
- Hickey L. J. and Wolfe J. A., 1975. The Bases of Angiosperm Phylogeny: Vegetative Morphology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62, 3, The Bases of Angiosperm.
- Hofer, O. and Greger H., 2000. Sulfur-Containing Amides from *Glycosmis* Species (Rutaceae). In: *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/ Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Founded by L. Zechmeister, SpringerChemistry.
- Humphreys, J. M. and Chapple C., 2002. Rewriting the Lignin Roadmap. *Current opinion in plant biology* 5, 224–229.
- Hussein, A. A., Olmedo D. A., Vasquez Y., Coley P. D., Solis P. N. and Gupta M. P., 2005. New Cytotoxic Cinnamic Acid Derivates from Leaves of *Bonomia trichantha*. *Revista Latinoamericana de Química* 33, 90–95.
- Isidorov, V. A. and Vinogorova V. T., 2003. GC-MS analysis of compounds extracted from buds of *Populus balsamifera* and *Populus nigra*. *Zeitschrift für Naturforschung* 58c, 355-360.

- Kasiotis, K. M., 2014. Propolis non-volatile constituents: a review. *Hygeia Journal for Drugs and Medicines* 6, 111–121.
- Krüssmann, G., 1977. *Handbuch der Laubgehölze*, Band II. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg.
- Kumar, N. S., Gujrati M. D., and Wilson J. N., 2010. Evidence of preferential π -stacking: a study of intermolecular and intramolecular charge transfer complexes. *Chemical Communications* 46, 5464-5466.
- Lagoni, N., 2006. Beiträge zur Schwarzpappel. LWF Wissen. Bayrische Landesanstalt für Wald- und Forstwirtschaft (LWF), Freising.
- Lattanzio, V., Lattanzio V. M. T. and Cardinali A., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Phytochemistry: Advances in research* 2006, 23–67.
- Levinson, H. Z., 1972. Zur Evolution und Biosynthese der terpenoiden Pheromone und Hormone. *Naturwissenschaften* 59, 477-484.
- Lindroth, R. L. and Hwang S.-Y., 1996. Diversity, Redundancy and Multiplicity in Chemical Defense Systems of Aspen. *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions. Recent Advances in Phytochemistry* 30, 25–54.
- Lotfy, M., 2006. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 7, 22–31.
- Luckner, M., 1990. *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals*. Springer-Verlag, Berlin.
- Maini, S., Hodgson H. L. and Krol E. S., 2012. The UVA and aqueous stability of flavonoids is dependent on B-ring substitution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(28), 6966-6976.
- Makris, D. P. and Rossiter J. T., 2000. Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (Quercetin 3-Orhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3830–3838.
- Meeuse, A. D. J., 1975. Taxonomic relationships of Salicaceae and Flacourtiaceae their bearing on interpretative floral morphology and dilleniid phylogeny. *Acta Botanica Neerlandica* 24, 437–457.
- Mendelsohn, R. and Balick M. J., 1995. The value of Undiscovered Pharmaceuticals in Tropical Forests. *Economic Botany* 49, 223–228.
- Métraux, J-P., 2002. Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends in Plant Science* 7, 332–334.

- Morreel, K., Goeminne G., Storme V., Sterck L., Ralph J., Coppieters W., Breyne P., Steenackers M., Georges M., Messens E. and Boerjan W., 2006. Genetical Metabolomics of Flavonoid Biosynthesis in *Populus*: a case study. The Plant Journal 47, 224–237.
- Nahrstedt, A. N., 1990. Nutzung pflanzlicher Sekundärstoffe von Tier und Mensch. Deutsche Apotheker Zeitung – 130. Jahrgang 40, 2155-2161.
- Nair, R. B., Bastress K. L., Ruegger M. O., Denault J. W. and Chapple C., 2004. The *Arabidopsis thaliana* Reduced Epidermal Fluorescence1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. Plant Cell 16, 544–554.
- Nesom, G., 2003. Plant Guide: Black cottonwood *Populus balsamifera* L. ssp. *trichocarpa* (Torr. & Gray ex Hook.) Brayshaw. The Natural Resources Conservation Service, USDA, http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs_pobat.pdf (24. Juni. 2014).
- Orsolic N., Skuric J., Dikic D. and Stanic G., 2014. Inhibitory effect of a propolis on Di-n-Propyl Disulfide or n-Hexyl salicylate-induced skin irritation, oxidative stress and inflammatory responses in mice. Fitoterapia 93, 18–30.
- Ostry, M. E., Wilson L. F., McNabb Jr. H. S and Moore L. M., 1988. A guide to insect disease and animal pests of poplars. U.S. Departement Of Agriculture (Washington, DC), Agricultural Handbook S. 677.
- Pichersky, E. and Lewinsohn E., 2011. Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. Annual Review of Plant Biology 62, 549–566.
- Ryan K. G., Swinny E. E., Markham K. R. and Winefield C., 2001. Flavonoid and UV photoprotection in *Arabidopsis mutants*. Zeitschrift für Naturforschung 56c, 745–754.
- Rodríguez-Concepción, M., and Boronat A., 2013. Isoprenoid biosynthesis in prokaryotic organisms. In: Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms, 1-16. Springer New York.
- Rohmer, M., 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. Natural product reports 16, 565-574.
- Rubiolo, P., Casetta C., Cagliero C., Brevard H., Sgorbini B. and Bicchi C., 2012. *Populus nigra* L. bud absolute: a case study for a strategy of analysis of natural complex substances. Analytical and Bioanalytical Chemistry 405, 1223–1235.
- Swain, T. (Ed.), 1963. Chemical Plant Taxonomy. Academic Press, London.

- Trelease, W. M., 1881. The Foliar Nectar Glands of *Populus*. Botanical Gazette 6, 284–290.
- Tsai, C.-J., Hardin S. A., Tschaplinski T. J., Lindroth R. L. and Yuan Y., 2006. Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in *Populus*. New Phytologist 172, 47–62.
- Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R. R., Bhalerao R. P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G. L., Cooper D., Coutinho P. M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroove S., Déjardin A., Depamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehlting J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjärvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Lepié J. C., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson D. R., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland K., Rouzé P., Ryaboy D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai C. J., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y. and Rokhsar D., 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science 313, 1596–1604.
- Vadar-Ünlü G., Silici S. and Ünlü M., 2007. Composition and in vitro antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis. World Journal of Microbiology & Biotechnology 24, 1011–1017.
- Vajrodaya S., Bacher M., Greger H. and Hofer O., 1997. Organ-specific chemical differences in *Glycosmis trichanthera*. Phytochemistry 48, 897–902.
- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid Biosynthesis. Molecular Plant 3, 2–20.
- Watzl, B. und Rechkemmer G., 2001. Basiswissen aktualisiert: Phenolsäuren. Ernährungs-Umschau 48, 413–416.
- Wildermuth M. C., Dewdney J., Wu G. and Ausubel F. M., 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature 414, 562–565.
- Wink, M., 1999. Function of secondary metabolites. In: Function of secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Annual Plant reviews 3.
- Winkel-Shirley, B., 2001. Flavonoid Biosynthesis. A colourful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. Plant Physiology 126, 485–493.

- Wollenweber, E., und Egger K., 1971. Die lipophilen Flavonoide des Knospenöls von *Populus nigra*. *Phytochemistry* 10, 225-226.
- Wollenweber, E., 1975. Flavonoidmuster als systematisches Merkmal der Gattung *Populus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 3, 35–45.
- Wollenweber E., Asakawa Y., Schillo D., Lehmann U. and Weigel H., 1987. A novel caffeic acid derivate and other constituents of *Populus* bud excretion and propolis (bee glue). *Zeitschrift für Naturforschung* 42c, 1030–1034.
- Yang, H., Dong Y., Du H., Shi H., Peng Y. and Li X., 2011. Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. *Molecules* 16, 3444-3455.
- Yonekura-Sakakibara K. and Saito K., 2009. Functional genomics for plant natural product biosynthesis. *Natural products Reports* 26, 1466–1487.
- Zähner, H., 1979. What are secondary metabolites? *Folia Microbiologica* 24, 435–443.
- Zenk, M., 1967. Biochemie und Physiologie sekundärer Pflanzenstoffe. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 80, 573–591.
- Zenkevich, I. G., Eshchenko A. Y., Makarova S. V., Vitenberg A. G., Dobryakov Y. G. and Utsal V. A., 2007. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygenat ambient temperature. *Molecules* 12, 654-72.

5. Zusammenfassung

Beinahe alle Arten der Gattung *Populus* produzieren ein lipophiles Exsudat, welches auf der Innenseite der Knospenschuppen sezerniert wird. Diese Exsudate werden unter anderen von Bienen zur Produktion von Propolis gesammelt. Im Rahmen der vorliegenden Masterarbeit wurden vergleichende chemosystematische Analysen an Knospensexsudaten von *P. trichocarpa* (*Populus* sect. *Tacamahaca*) durchgeführt. Hauptobjekt war das Exsudat von Klon 337/64. Dieses wurde mit jenen von unterschiedlichen Herkunft (Stecklinge: 2010/66, 101112; Herbarbelege: HB 1-4) sowie einem weiteren Klon 200/63 verglichen. Vier Zimtsäurederivate konnten isoliert und strukturell aufgeklärt werden: Zimtsäure (**6**), 4-Hydroxyacetophenon (**7**), *p*-Cumarsäurezimtsäureester (**11**) und ein bis dato unbekannter Ester der *p*-Cumarsäure und (2*E*,6*E*,10*E*)-2,6,10-trimethyl-dodeca-2,6,10-triensäure für welchen der Trivialname Trichanthinsäure (**10**) gewählt wurde. Zimtsäure (**6**), 4-Hydroxyacetophenon (**7**), Salicylsäurebenzylester (**9**) und 3-OMe-Phenylmethylbenzoesäure (**8**) konnten in allen untersuchten Akzessionen detektiert werden und erweisen sich somit als chemosystematisch bedeutsame Merkmale für *P. trichocarpa*. Dihydrochalkone, welche von GREENAWAY ET AL. (1989) als typische Stoffausstattung für die Sektion *Tacamahaca* betrachtet wurden, konnten nicht in jeder Probe nachgewiesen werden. Daher ist ihr Vorkommen von eingeschränkter Aussagekraft. Innerhalb der Sektion *Tacamahaca* bedarf es weiterer Untersuchungen zur Abklärung der chemosystematischen Bedeutung von spezifischen Exsudatprofilen.

Die für die tiefrote Farbe des Exsudates von Klon 337/64 ausschlaggebenden Substanzen konnten nicht als Reinstoffe isoliert und strukturell identifiziert werden. Sie besitzen amphiphile Eigenschaften und sind sowohl über Säulenchromatographie, Dünnschichtchromatographie als auch über HPLC nur schwer zu trennen. Das Knospensexsudat des Herbarbeleges WU 0079117 zeigte eine andere phenolische Zusammensetzung als die restlichen Proben und wurde nach kritischer Bestimmung mit einschlägigen Florenwerken dem Hybrid *P. x jackii* zugeordnet.

Zusätzlich wurde ein kommerzielles Propolisprodukt („Bee Pure Propolis“) auf seine chemische Zusammensetzung untersucht und mit dem Knospenexsudat von *P. nigra*, aus welchem Propolis von den Bienen gewonnen wird, verglichen. Sowohl DC- als auch HPLC- Ergebnisse zeigen kaum Unterschiede in deren Zusammensetzung, womit dieses Produkt in seiner Zusammensetzung weitgehend natürlichem Propolis entspricht.

6. Abstract

Almost all species of the genus *Populus* produce resin like exudates on the inside of their bud scales. These exudates, among others, are used by bees to produce bee-glue called propolis. In the present work, the exudate of *P. trichocarpa* (*Populus* sect. *Tacamahaca*) clone 337/64 was investigated and compared with exudates of different origins (cuttings: 2010/66, 101112; herbarium specimen: HB 1-4) and a further clone 200/63. Four cinnamic acid derivatives were isolated and structurally identified: cinnamic acid (**6**), 4-hydroxy acetophenone (**7**), *p*-cumaroyl cinnamate (**11**) and an unknown further ester of *p*-cumaric acid and (2*E*,6*E*,10*E*)-2,6,10-trimethyl-dodeca-2,6,10-trienoic acid, for which the trivial name trichanthinic acid (**10**) is proposed. Four compounds seem to be chemosystemically significant for *P. trichocarpa*: cinnamic acid (**6**), 4-hydroxy acetophenone (**7**), salicyl benzoate (**9**) and 3-OMe-phenylmethyl-benzoic acid (**8**). Dihydrochalcones, suggested to be typical for section *Tacamahaca* (GREENAWAY ET AL., 1989), were not found in all samples studied. Thus, the accumulation of these compounds is of limited significance, and further comparative phytochemical studies should be conducted for members of this section.

The clone exudate 337/64 of the North American poplar *P. trichocarpa* shows a dark red colour. Compounds thought to be responsible for this colour could not be isolated and structurally characterised. These compounds exhibited amphiphilic properties and thus were difficult to be separated by thin layer chromatography and HPLC. The herbarium specimen WU 0079117, collected

from Gillet in 1949, showed an untypical composition of its exudate profile, and subsequent revision indicated the sample to correspond to the hybrid *P. x jackii*. Furthermore, a commercially available propolis product („Bee Pure Propolis“) was phytochemically compared with a bud exudate of *P. nigra*, a source of natural propolis. Both TLC and HPLC revealed only slight differences between plant samples and product, indicating that the analysed product corresponds largely to natural propolis.

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Ao. Univ.-Prof. Dr. Karin Valant-Vetschera für das Vertrauen, mich mit diesem Projekt zu betrauen, für die Unterstützung anfallender Probleme und auch für ihre Geduld während dieses Projekts, bedanken. Sie ließ mir bei der Masterarbeit freie Hand, stand aber jederzeit für jegliche Fragen bereit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Johann Schinnerl, der mich geduldig beim Erlernen der praktischen Arbeit unterstützte und mich durch kritische Betrachtungen dazu anregte, Methoden zu verfeinern.

Ein großes Dank geht an meine Familie, die durch moralische und finanzielle Unterstützung dieses Studium ermöglicht haben, und immer an mich geglaubt haben. An dieser Stelle soll auch all meinen Freunden für deren motivierende Worte und die schönen Stunden während dieses Studiums gedankt werden.

Danke an alle weiteren Kollegen die an dieser Arbeit beteiligt waren und nicht namentlich erwähnt werden.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ehrlich Florian
Geburtsdatum: 18.03.1986

Ausbildung

1992 – 1996	Volksschule Bodensdorf
1996 – 2000	PG/PRG Perrau, Villach
2000 – 2005	Kärntner Tourismusschule Warmbad Villach
2006 – 2010	Studium Biologie
2010 – 2015	Studium Schwerpunkt Botanik
2013	Botanische Exkursion nach Thailand mit Ao. Univ.- Prof. Dr. Christian Puff, Universität Wien
2013 – 2015	Masterthese: „Vergleichende phytochemische Analysen an ausgewählten Vertretern der Gattung <i>Populus</i> “