

COLENZOINSÄURE, EIN NEUES DEPSIDON AUS *STEREOCAULON COLENZOI**

CECIL H FOX

Farlow Herbarium, Harvard University, Cambridge, Mass., U.S.A.

ERICH KLEIN

Forschungslaboratorium der Dragoco, Holzminden, DDR

und

SIEGFRIED HUNECK†

Institut für Biochemie der Pflanzen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin in Halle/Saale,
DDR

(Received 9 December 1969)

Zusammenfassung—*Stereocaulon colensoi* Bab. enthält Atranorin, D-Mannit, D-Arabit, Tetrahydroxyfettsäuren und Colensoinsäure (I), ein neues Depsidon.

Abstract—*Stereocaulon colensoi* Bab. contains atranorin, D-mannitol, D-arabitol, tetrahydroxy fatty acids, and colensoic acid (I), a new depsidone.

EINLEITUNG

IM RAHMEN unserer flechtendenemischen Untersuchungen analysierten wir die für Neuseeland endemische *Stereocaulon colensoi* Bab. Diese rasenbildende *Stereocaulon*-Art hat 4–9 cm hohe, aufrechte, starre und unverzweigte Pseudopodetien, deren obere Teile runzelig oder glatte Rinde besitzen und deren untere Teile ohne Rinde und mehr oder weniger holzig sind. Die Phyllocladien sind zylindrisch-coralloid, einfach oder verzweigt, die Cephalodien gestielt, keulen- oder feigenförmig, grünlich-grau und besitzen *Scytonema*- oder *Stigonema*-Algen. Die Apothecien sind endständig, 1,5–4,0 mm dick und ohne Rand. Die Schläuche führen 6–9 (13) geteilte Sporen von $50\text{--}90 \times 4\text{--}5 \mu$ Größe. Die Phyllocladien reagieren mit Kalilauge und *p*-Phenylendiamin gelb.

Vergleichsmaterial von *S. colensoi* Bab. befindet sich im Farlow Herbarium der Harvard University in Cambridge, Mass., U.S.A.

ERGEBNISSE

Die getrocknete und unter flüssigen Stickstoff gemahlene Flechte wird zunächst mit Äther und dann mit Aceton-Methanol extrahiert, wobei sich im Ätherauszug *Atranorin* ausscheidet. Die vom Atranorin befreite Lösung liefert bei Aufarbeitung (vgl. Experimenteller Teil) eine Säure, die aus Methanol-Wasser in farblosen Nadeln vom Schmp.

* 73. Mitteilung über Flechteninhaltsstoffe; 72. Mitteilung: S. HUNECK, K. SCHREIBER, G. SNATZKE und P. TRŠKA, Z. Naturforsch. (im Druck).

† Autor, an den Anfragen betreffs des chemischen Teils dieser Arbeit zu richten sind.

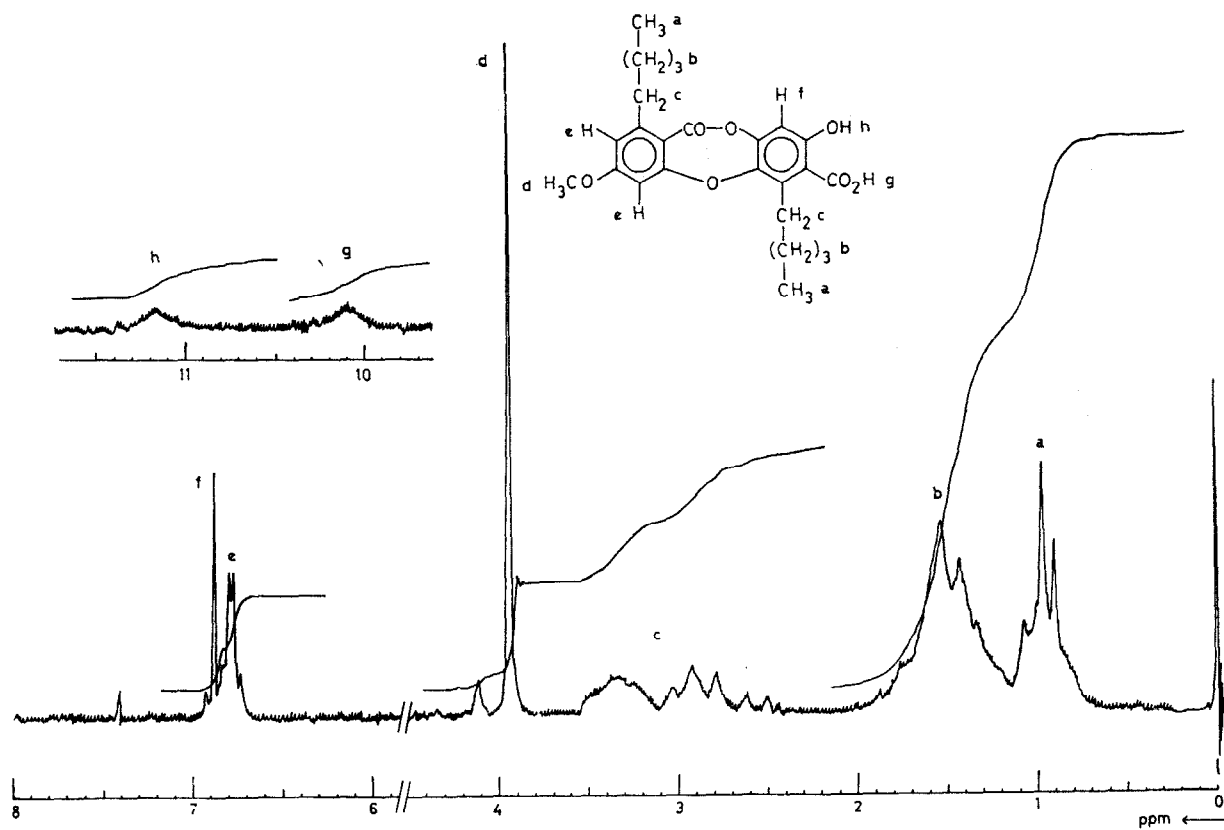
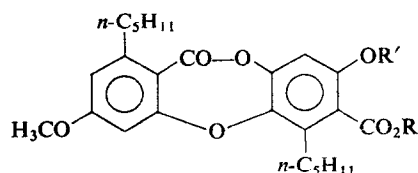


ABB. 1. 60 MHz NMR-SPEKTRUM VON COLENZOINSÄURE (I) IN CDCl_3 MIT TMS ALS STANDARD.

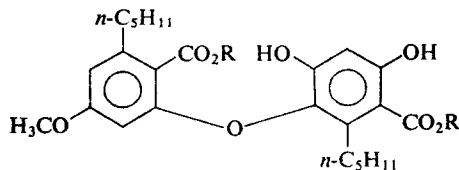
173–174° resultiert und *Colensoinsäure* (colensoic acid) genannt werden soll. Diese Säure färbt sich mit Eisenchlorid in Äthanol blauviolett und mit diazotiertem Benzidin plus Natronlauge orangerot, zeigt jedoch keine Färbung mit Natriumhypochlorit oder Gibbs' Reagens. Das u.v.-Spektrum von Colensoinsäure (I) mit Maxima bei 256 und 310 nm (in Methanol) ist typisch für Depsidone;¹ die Depsidon-Esterbrücke wird auch durch eine Carbonylbande bei 1742/cm im i.r.-Spektrum von I (in KBr) angezeigt.

Die Signale im 60 MHz NMR-Spektrum von I (Abb. 1) können nach unseren vergleichenden NMR-spektroskopischen Messungen an zahlreichen Depsiden und Depsidonen² wie folgt zugeordnet werden: das Multiplett zwischen 0,7 und 1,15 ppm entspricht laut Integration 6 H und damit zwei endständigen aliphatischen CH₃-Gruppen, ein breites Multiplett zwischen 1,15 und 2,0 ppm entspricht laut Integration 12 H und damit 6 aliphatischen CH₂—oder zwei CH₂—CH₂—CH₂-Gruppen, ein weiteres breites Multiplett zwischen 2,4 und 3,5 ppm (4 H) stammt von 2 benzyliischen CH₂-Gruppen und das Signal bei 3,93 ppm (3 H) von einer OCH₃-Gruppe. Die beiden Dubletts bei 6,74 und 6,81 ppm (je 1 H, *J* = 2,5 Hz) gehören zu zwei meta-ständigen aromatischen Protonen, während das Singulett bei 6,87 ppm (1 H) einem einzelnen aromatischen Proton entspricht. Schließlich werden bei 10,12 und 11,18 ppm noch zwei Signale beobachtet, die vom Carboxyl-H und einem phenolischem H herrühren. Unter Berücksichtigung biogenetischer Überlegungen läßt sich somit für Colensoinsäure die Depsidonstruktur I (2-OH,5'-H-Dehydroperlatolinsäure) aufstellen. Bei der Alkalischmelze von I mit KOH bei 280–300° resultiert ein Phenol, das nach Methylierung mit Diazomethan dünn-schicht- und gaschromatographisch mit Olivetoldimethyläther identisch ist; damit wird die Struktur von I endgültig bewiesen.

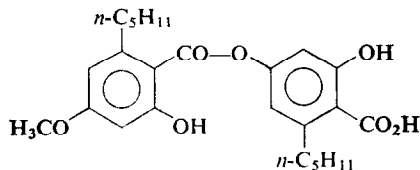
I liefert bei kurzer Einwirkung von Diazomethan Colensoinsäuremethylester (II), der im Elektronenanlagerungsmassenspektrum den geforderten Molmassenpeak von *m/e* 456 zeigt. I läßt sich mit Acetanhydrid-Schwefelsäure zur Acetylcolensoinsäure (III) acetylieren, die mit Diazomethan Acetylcolensoinsäuremethylester (IV) gibt. Das 60 MHz NMR-Spektrum von III (in CDCl₃) zeigt folgende Signale: Multiplett zwischen 0,7 und 1,15 ppm (6 H,



- (I) R = R' = H
 (II) R = CH₃, R' = H
 (III) R = H, R' = COCH₃
 (IV) R = CH₃, R' = COCH₃
 (V) R = R' = CH₃



- (VI) R = H
 (VII) R = CH₃



(VIII)

¹ S. HUNECK, Lichen Substances, *Progress in Phytochemistry*, Vol. 1, S. 223, Interscience, New York (1968).

² S. HUNECK und P. LINSCHIED, *Z. Naturforsch.* **22b**, 791 (1967).

2 \times aliphatisches CH_3), Multiplett zwischen 1,15 und 2,0 ppm (12 H, 2 \times $\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2$), Singulett bei 2,30 ppm (3 H, Acetyl- CH_3), Multiplett zwischen 2,5 und 3,3 ppm (4 H, 2 \times benzylisches CH_2), Singulett bei 3,94 ppm (3 H, OCH_3), 2 Dubletts bei 6,73 und 6,82 ppm (je 1 H, $J = 2,5$ Hz, H am C-3 und C-5), ein Singulett bei 7,06 ppm (1 H, H am C-3') und ein Signal bei 9,52 ppm (1 H, COOH). Bei längerer Einwirkung von Diazomethan auf I resultiert Methyläthercolensoinsäuremethylester (V).

Durch Hydrolyse von I mit 10-proz. Natronlauge bei Raumtemperatur wird die Esterbindung gespalten unter Bildung der Säure VI, die bei kurzer Reaktion mit Diazomethan den Methylester VII liefert.

Aus dem Aceton-Methanol-Extrakt von *S. colensoi* Bab. isolierten wir noch *D-Mannit*, *D-Arabit* und *Tetrahydroxyfettsäuren*.

DISKUSSION

Colensoinsäure (I) stellt das Depsidonanalogon zur Perlatolinsäure (VIII) dar; beide Verbindungen sind ein neues Depsid-Depsidon-Paar. Interessanterweise fanden wir in einer Aufsammlung von *Stereocaulon ramulosum* (Swans.) Raeusch. aus Neuseeland und Jamaica neben anderen Inhaltsstoffen auch Perlatolinsäure. *Stereocaulon colensoi* Bab. ist also biogenetisch betrachtet höher entwickelt als *Stereocaulon ramulosum* (Swans.) Raeusch, da sie ein zusätzliches Enzym besitzt, das die Phenoloxidation von VIII zu I bewirkt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Aufarbeitung von S. colensoi Bab. 175,0 g getrocknete und unter Stickstoff zerkleinerte Flechte werden mit 2 l Äther 20 Stdn. extrahiert; das im Extrakt ausgeschiedene Material wird abgesaugt und liefert 2,11 g (1,2%) *Atranorin* in farblosen Prismen vom Schmp. 195–196°. Das Filtrat wird eingedampft, der nach Aufbewahren über Nacht kristalline Rückstand mit wenig Benzol verrieben, abgesaugt, zunächst aus Benzol und dann aus Methanol und Methanol-Wasser umkristallisiert: 0,91 g (0,42%) *Colensoinsäure* (I) in prismatischen Nadeln vom Schmp. 173–174° und dem R_F -Wert 0,31 (Silufol-Dünnschichtfolie, 25 Äther–0,5 Essigsäure, diazotiertes Benzidin plus Natronlauge \rightarrow rot). i.r. (in KBr): 638, 845, 860, 885, 1010, 1045, 1115, 1140, 1160, 1190, 1215, 1240, 1274, 1350, 1418, 1460, 1566, 1605, 1635, 1742 (Depsidon-CO), 2860, 2920, 2950 und 3450/cm (OH). $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_7$ (442,5), Ber. C 67,85, H 6,83; Gef. C 67,82, H 6,93.

Die vom Äther befreite Flechte wird mit einem Gemisch aus 5 Vol. Aceton und 1 Vol. Methanol 18 Stdn. extrahiert, das ausgeschiedene Produkt abgesaugt, getrocknet, mit 10 ml heißem Wasser verrieben und vom Ungelösten abgesaugt. Das Filtrat wird eingedampft und der verbleibende Sirup mit Äthanol verrieben, wobei allmählich Kristallisation eintritt. Die Kristalle werden abgesaugt und zweimal aus Äthanol umkristallisiert: 0,18 g (0,1%) *D-Mannit* in dünnen Nadeln vom Schmp. 160–161°. Die äthanolischen Mutterlaugen werden eingedampft, wobei ein Sirup resultiert, der nach mehreren Tagen durchkristallisiert. Das feste Produkt wird auf einem Tonteller abgepreßt und unter Kohlen aus Wasser umkristallisiert: 0,1 g (0,06%) *D-Arabit* in Prismen vom Schmp. 101–102°. Das in Wasser unlösliche Material der Aceton-Methanol-Extraktion wird aus Essigsäure umkristallisiert und liefert 0,35 g (0,20%) *Tetrahydroxyfettsäuren* als schwach bräunliches Pulver vom Schmp. 183–185°. Der zur Trockne eingedampfte Aceton-Methanol-Auszug wird mit wenig Äther verrieben, das ungelöste Material abgesaugt und aus Äthanol-Wasser umkristallisiert: 50 mg *D-Arabit* vom Schmp. 99–100° (Gesamtausbeute: 0,09%). Das ätherische Filtrat wird mit Sodalösung ausgeschüttelt, die wässrige Phase angesäuert, ausgeäthert, der ätherische Auszug mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand liefert nach zweimaliger Kristallisation aus Methanol 5 mg (0,003%) Nadeln vom Schmp. 142–143°, im Schmelz- und Mischschmelzpunkt identisch mit *Haematomminsäure*. Wahrscheinlich handelt es sich bei Haematomminsäure um ein Artefakt, das durch Methanolyse aus Atranorin entstanden ist.

Colensoinsäuremethylester (II). 60 mg I werden in ätherischer Lösung 1 Min. bei 0° mit einem sehr geringen Überschuß ätherischer CH_2N_2 behandelt; dann wird das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen, das verbleibende Öl in CHCl_3 über 5 g Kieselgel filtriert und das Filtrat eingedampft: farbloses Öl, das nach mehrtägigem Aufbewahren im Eisschrank kristallisiert. Das feste Produkt wird auf einem Tonteller abgepreßt, mit wenig Methanol gewaschen und aus Methanol umkristallisiert: Prismen vom Schmp. 53–55°. Im Elektronen-anlagerungsmassenspektrum (Massenspektrograph des Institutes M.v. Ardenne, 55° Verdampfer-temperatur, 60 s Exposition) Hauptspitze bei m/e 456 (Molekülmassenion). $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_7$ (456,5), Ber. C 68,40, H 7,07; Gef. C 68,38, H 7,05.

Acetylcolensoinsäure (III). Aus 0,1 g I und 1 ml eines Gemisches aus 5 ml Acetanhydrid und 1 Tropfen konz. H_2SO_4 in 5 Std. bei 20° . Nach Verdünnen mit Wasser, Absaugen des Niederschlages, Trocknen bei 20° und Kristallisation aus Methanol-Wasser Plättchen vom Schmp. $150\text{--}151^\circ$, die mit FeCl_3 keine Färbung geben. I.r. (in KBr): 735, 834, 884, 903, 1009, 1050, 1085, 1108, 1140, 1162, 1185, 1200, 1245, 1284, 1334, 1363, 1424, 1558, 1605, 1695, 1742 (Depsidon-CO), 1780 (Acetyl-CO) und $3450/\text{cm}$ (OH). $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_8$ (484,5), Ber. C 66,92, H 6,66; Gef. C 66,95, H 6,68.

Acetylcolensoinsäuremethylester (IV). Aus 40 mg III in Äther mit ätherischer CH_2N_2 in 1 Min. bei 20° . Nach üblicher Aufarbeitung und Kristallisation aus Methanol-Wasser Plättchen vom Schmp. $68\text{--}70^\circ$. $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_8$ (498,6), Ber. C 67,45, H 6,87; Gef. C 67,41, H 6,89.

Methyläthercolensoinsäuremethylester (V). 0,1 g I werden in 20 ml Äther und 2 Tropfen Methanol mit überschüssiger ätherischer CH_2N_2 3 Tage bei 20° aufbewahrt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand in 3 ml Benzol über 4 g Al_2O_3 (Akt. II, Neutral) chromatographiert. 50 ml Benzol eluieren ein Öl, das nach fünftägigem Aufbewahren bei Raumtemperatur kristallisiert. Nach Kristallisation aus wenig Methanol perlmuttglänzende Plättchen, die sich plötzlich in Prismen vom Schmp. $87\text{--}88^\circ$ unwandeln. $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_7$ (470,5), Ber. C 68,92, H 7,28; Gef. C 68,89, H 7,26.

Alkalische Hydrolyse der Colensoinsäure. 0,1 g I werden bei Raumtemperatur mit 3 ml wässriger 10-proz. Natronlauge versetzt: die Säure geht zunächst in Lösung, dann scheiden sich nach etwa 3–4 Min. Kristalle aus, die nach etwa 10 Min. erneut in Lösung gehen. Nach insgesamt 30 Min. Aufbewahren wird mit 10-proz. H_2SO_4 angesäuert, ausgeäthert, die ätherische Lösung mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft: das hinterbleibende Öl wird in wenig Methanol aufgenommen und mit Wasser bis zur Trübung versetzt. Nach Aufbewahren über Nacht haben sich Kristalle ausgeschieden, die aus Methanol-Wasser umgelöst werden: fadendünne Nadeln von VI vom Schmp. $164\text{--}165^\circ$ (Zersetzung unter Gasentwicklung), die sich mit FeCl_3 in wässrigem Äthanol blauviolett und mit NaClO ebenfalls blauviolett (sehr schnell verblassend) färben. $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_8$ (460,5), Ber. C 65,20, H 7,00; Gef. C 65,18, H 7,03.

VI liefert bei kurzer Behandlung mit ätherischer CH_2N_2 bei 0° den Methyl ester VII vom Schmp. $85\text{--}87^\circ$.

Anmerkung—Herrn Prof. Dr. I. M. Lamb, Farlow Herbarium, Harvard University, Cambridge, Mass., U.S.A. danken wir für die Überlassung und Bestimmung verschiedener Flechtenproben und die Diagnose von *S. colensoi* Bab. und Herrn Dr. R. Tümmeler, Forschungsinstitut M. v. Ardenne, Dresden-Wießer Hirsch, für die Aufnahme des Massenspektrums. Ganz besonderen Dank schulden wir Herrn Dr. D. Galloway, University of Otago, Neuseeland, der in einer speziellen, mühsamen und gefährlichen Expedition die Flechte in den neuseeländischen Alpen für uns sammelte. Ferner danken wir Herrn S. Jänicke vom Institut für Biochemie der Pflanzen für die Aufnahme von Gaschromatogrammen.