

Dünnschichtchromatographische Isolierung von Flechtenstoffen und deren Identifizierung

Identification of Lichen Substances by Isolation from Thin Layer Chromatograms

Bernd Renner und Ernst Gerstner

Fachbereiche Biologie und Chemie der Universität Marburg

Z. Naturforsch. 33 c, 340–345 (1978); eingegangen am 6. Dezember 1977

Nephroma cellulosum, Lichen Acids, Eluchrom, Identification

The use of Eluchrom (Camag, Berlin) for quantitative isolation of lichen substances separated by thin layer chromatography is described. For this method only small quantities of a lichen thallus are needed (less than 0.5 g) to yield sufficient amounts of pure compounds submittable to chemical and spectroscopical identification. In the case of *Nephroma cellulosum* 0.15 g of the lichen thallus proved to be sufficient to identify 3 main compounds of lichen substances. Microhydrolysis, EI-masspectroscopy, FD-masspectroscopy and UV/VIS-spectroscopy of the isolated compounds confirmed the presence of perlitolic acid, stenosporic acid, glomelliferic acid and zeorin.

In vielen Fällen stellt sich für den Chemotaxonomen die Frage nach einer möglichst materialschonenden Analysemethode sekundärer Stoffwechselprodukte. Handelt es sich um Flechten, die ein einfaches Stoffspektrum aufweisen, z. B. höchstens zwei Inhaltsstoffe, die sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften deutlich unterscheiden, ist die „Flechtenmassenspektroskopie“ eine geeignete Methode [1]. Hierfür reichen meistens 50 ng zerkleinertes Thallusgewebe aus [1]. Bei komplizierteren Stoffspektren (drei und mehr chemisch und physikalisch sehr ähnliche Stoffe) versagt diese Methode als alleiniges Verfahren, weil die erhaltenen Massenspektren nicht interpretierbar sind. Hier muß zunächst eine Trennung des Vollextrakts in die einzelnen Komponenten erfolgen.

Grundsätzlich ist eine solche Trennung auf dünnschichtchromatographischer Grundlage möglich, doch es bleibt das Problem der Identifizierung von Substanzen, die sich aufgrund ihres Fließverhaltens in verschiedenen Fließmitteln und ihrer Detektion durch geeignete Entwicklungsverfahren nicht sicher bereits bekannten Substanzen zuordnen lassen. Abgesehen von den variierenden Parametern kann die DC kein Ersatz für die chemisch-physikalische Identifizierung einer Verbindung sein.

Unter der Voraussetzung, daß die jeweils aufgetrennte Einzelkomponente chemisch unverändert und mit maximaler Ausbeute aus der Trägerschicht extrahierbar ist, bietet die DC jedoch die Möglichkeit, aus sehr wenig Thallusmaterial (z. B. 0,15 g)

die einzelnen Substanzen eines Inhaltsstoffgemisches als Reinsubstanzen zu isolieren und diese durch verschiedene Verfahren (UV/VIS-Spektroskopie, EI- und FD-Massenspektroskopie) zu identifizieren.

Methode

0,15 g mechanisch zerkleinertes Thallusgewebe werden a) erschöpfend mit Aceton im Soxhlet-Extraktor, b) durch Beschallung der Aceton-Gewebe-Suspension mit 20 kHz (Branson Sonifier) 10 min bei –10 °C extrahiert. Beide Extrakte werden nach der Methode von Culberson [2] chromatographiert. Die Auftrennung erfolgt auf mit Kieselgel 60_{F254} beschichteten Glasplatten oder Aluminiumfolien (20 × 20 cm). Schichtdicke: 0,25 mm; Fließmittel: System C (200 ml Toluol, 30 ml Eisessig). Anlage des Chromatogramms siehe Abb. 1. Auftragsmenge: 140 µl Extrakt. / Position: Eine Verlängerung der Trennstrecke gegenüber der standardisierten Methode [2] erweist sich für eine bessere Trennung der Substanzen als zweckmäßig. Bei auftretender Schwanzbildung wird 3mal aufsteigend chromatographiert. Nach Trocknen detektiert man die getrennten Komponenten im UV-Licht bei 254 nm und bei 366 nm und entwickelt auf Teilchromatogramm 6, das von den übrigen durch einen „Graben“ getrennt ist (s. Abb. 1) die Neutralstoffe (z. B. Triterpene) durch Besprühen mit 10-prozentiger H₂SO₄ und anschließendes Erhitzen. Bei Verwendung von Aluminiumfolien kann Teilchromatogramm 6 vor der Entwicklung abgeschnitten werden. Zur Beseitigung großer Fließmittelrückstände trocknet man die Chromatogramme ca. 2 h im Luftstrom.

Sonderdruckanforderungen an Bernd Renner, Fachbereich Biologie — Botanik, Philipps Universität Marburg, Lahmberge, 3550 Marburg.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

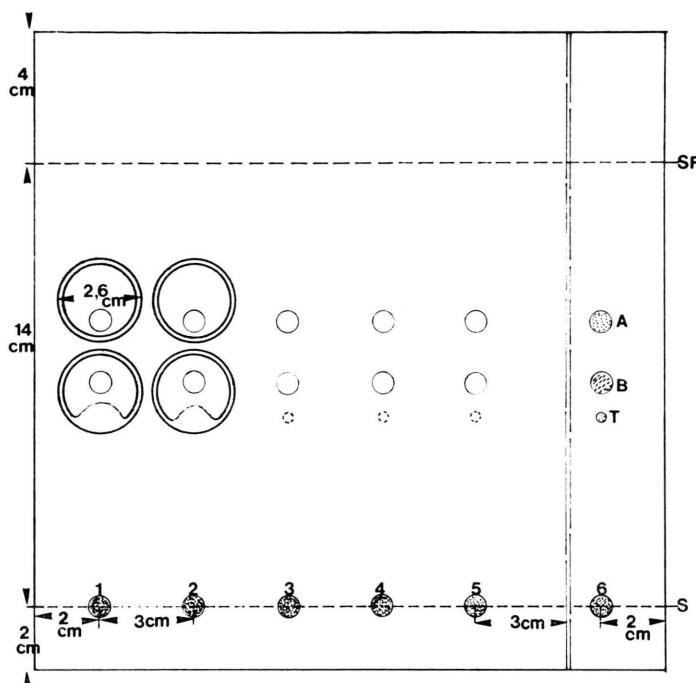


Abb. 1. Chromatogramm zur Isolierung der Flechtenstoffe A. und B.; S: Startlinie, SF: Fließmittelfront. Teilchromatogramm 6 wird zur Detektierung von T (Triterpen) mit H_2SO_4 (10prozentig) entwickelt.

Zur Elution der aufgetrennten Substanzen werden um die markierten Positionen ringförmige Gräben ausgefräst und sogenannte Elutionsköpfe aufgesetzt (s. Abb. 1). Nichtgewünschte Komponentenflecken werden mechanisch durch vorsichtiges Abkratzen entfernt. Pro Substanzfleck eluiert man mit 0,5 ml Methanol (0,5 ml/30 min) [Gerät: Eluchrom (Camag, Berlin)] und zieht das Eluens am Rotationsverdampfer schonend ab. Mehrmaliges Umkristallisieren aus Aceton liefert die Reinsubstanz (Kontrolle durch Rechromatographie). Zur Identifizierung werden herangezogen: 1. die Mikrohydrolyse in konz. H_2SO_4 [2], 2. spektralphotometrische Messungen im UV/VIS-Bereich (Gerät: Zeiss DMR 10) und 3. die Massenspektroskopie [Elektronenstoßmethode /EI-MS/ (Gerät: Varian CH 7) und Feld-desorptionsmethode /FD-MS/ (Gerät: Varian MAT 711)].

Ergebnisse

Die Eignung der beschriebenen Methode wird am Beispiel der Inhaltsstoffanalyse von *Nephroma cellulosum* (*Sm.*) Arch.* demonstriert. Der Unter-

* Die untersuchte Aufsammlung von *Nephroma cellulosum* ist nicht mit dem Typusexemplar dieser Flechte verglichen worden.

suchung liegen mehrere Proben einer Aufsammlung von *Nephroma cellulosum* aus Chile zugrunde (Provinz Malleco, Parque National de Contulmo, wechselgrüner südchilenischer Wald zw. 300–400 m ü.M. auf *Nothofagus obliqua*; 1973 leg. A. Henssen et al. Nr. 24269c), die im Marburger Kryptogamenherbar (MB) aufbewahrt werden.

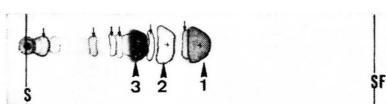


Abb. 2. Chromatogramm der Inhaltsstoffe von *Nephroma cellulosum* (Trennstrecke: 10 cm; Fließmittel: 200 ml Toluol, 30 ml Eisessig).

Im Dünnsschichtchromatogramm (Laufstrecke 10 cm) trennt sich das Gemisch der Inhaltsstoffe von *Nephroma cellulosum* in neun Komponenten auf (s. Abb. 2). Zur Identifizierung wurden die 3 Hauptkomponenten des Gemisches (1–3) ausgewählt. Komponente 1 zeigt im UV/VIS-Bereich das für Depside typische Absorptionsspektrum (s. Abb. 3 a). Es besitzt Maxima bei 210, 267,5 und 304 nm, Minima bei 243 und 286 nm. Im EI-Massenspek-

trum treten folgende Fragmente auf (s. Abb. 6 a) :

- a) m/e 194 $C_{12}H_{18}O_2$
- b) m/e 220 $C_{13}H_{16}O_3$
- c) m/e 221 $C_{13}H_{17}O_3$
- d) m/e 124 $C_7H_8O_2$
- e) m/e 138 $C_8H_{10}O_2$
- f) m/e 151 $C_8H_7O_3$
- g) m/e 180 $C_{11}H_{16}O_2$
- h) m/e 166 $C_{10}H_{14}O_2$
- i) m/e 192 $C_{11}H_{12}O_3$
- j) m/e 193 $C_{11}H_{13}O_3$.

Die Fragmente a) – g) machen das Vorkommen von Perlatolinsäure wahrscheinlich, während die Fragmente h) – j) nicht zuzuordnen sind. Ein Molmassenpeak von Komponente **1** ist mittels der EI-MS auch bei Variation der Verdampfungstemperatur (185°C , 200°C , 240°C) nicht zugänglich. Die FD-MS ergibt jedoch zwei Molpeaks und zwar bei m/e 416 und m/e 444. Daß der Molpeak bei m/e 416 nicht aus der Fragmentierung der Komponente mit der Molmasse 444 resultiert, erhellt daraus, daß bei verschiedenen Feldstärken Peak m/e 416 und Peak m/e 444 abwechselnd mit der relativen Intensität (rel. Int.) von 100% auftreten. Komponente **1** ist daher nicht einheitlich, sondern stellt ein Gemisch zweier Substanzen dar. Der Molpeak bei m/e 444 ist der Perlatolinsäure zuzuordnen ($C_{25}H_{32}O_7$), der bei m/e 416 vermutlich der Stenosporinsäure ($C_{23}H_{28}O_7$), ein Befund, der auch mit den Fragmenten h) – j) im Einklang stünde. Die Fragmente

◀
Abb. 3 a. UV/VIS-Absorptionsspektrum der Komponente **1** des Substanzgemisches von *Nephroma cellulosum* (in abs. Äthanol; Konz.: ca. 0,1 mg/ml);
b. UV/VIS-Absorptionsspektrum von Komponente **2** (in abs. Äthanol; Konz.: ca. 0,1 mg/ml).

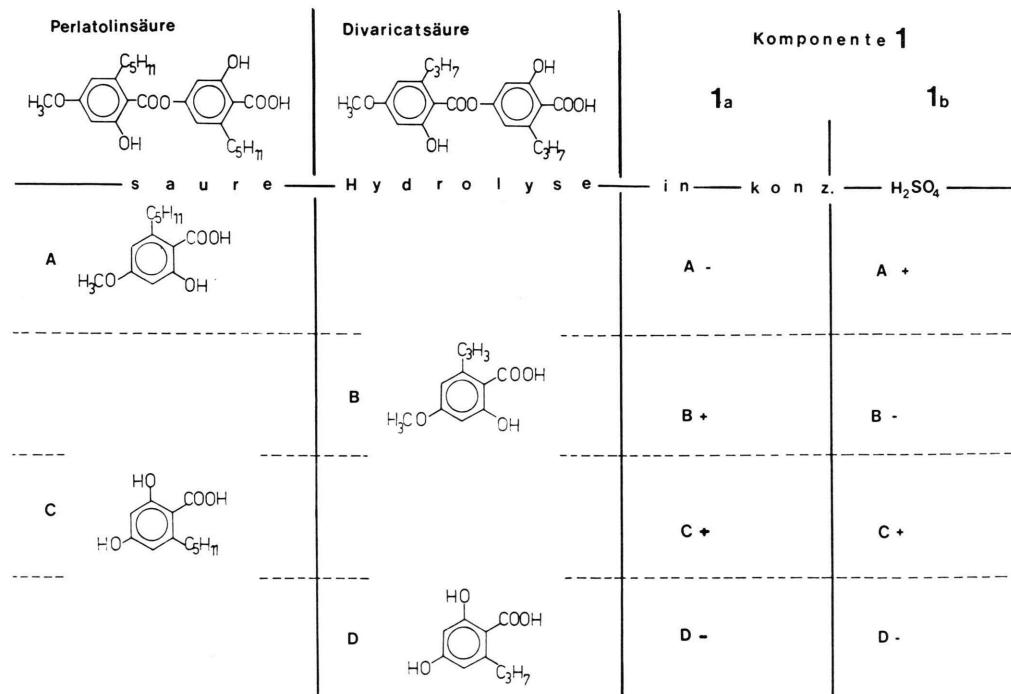
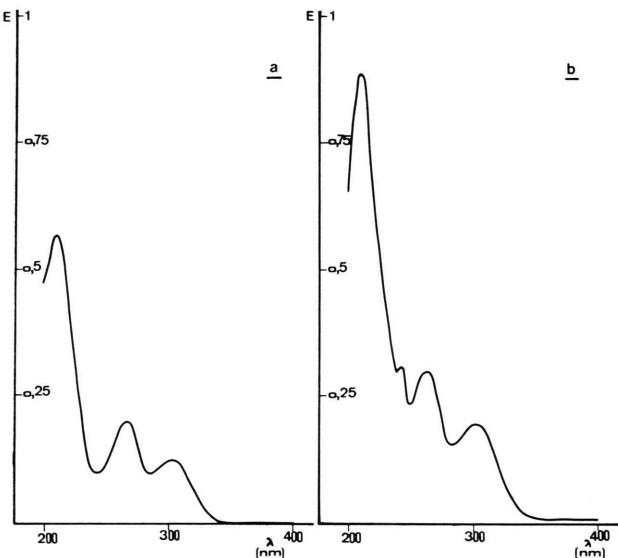


Abb. 4. Ergebnis der sauren Hydrolyse von Komponente **1** (**1a**, **1b**) im Vergleich zu den Referenzsubstanzen Perlatolinsäure (aus *Cladonia impexa* Harm. isoliert) und Divaricatsäure (aus *Evernia divaricata* (L.) Ach. isoliert).

d) – g) sind eventuell beiden Komponenten gemeinsam. Auch die Hydrolyseprodukte der sauren Hydrolyse von Komponente **1** stützen die massenspektroskopischen Ergebnisse (s. Abb. 4). Zugleich wird im Dünnsschichtchromatogramm durch Verlängerung der Trennstrecke die Uneinheitlichkeit von Komponente **1** bewiesen (s. Abb. 5).

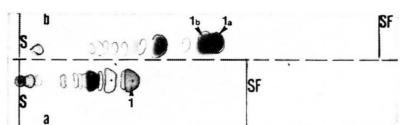


Abb. 5 a. Chromatogramm wie in Abb. 2. b. Chromatogramm nach Verlängerung der Trennstrecke auf 16 cm; Komponente **1** trennt in **1a** und **1b** auf.

Komponente **2** besitzt wie Komponente **1a** und **1b** ebenfalls deutlichen Depsidcharakter. Das Absorptionsspektrum im UV/VIS-Bereich (s. Abb. 3 b)

zeigt Maxima bei 212, 265 und 304 nm sowie zusätzlich bei 243 nm, Minima beobachtet man bei 240 und 250 nm, außerdem bei 284 nm. Das EI-Massenspektrum liefert 7 Fragmente (s. Abb. 6 b) :

- a) m/e 235 $C_{13}H_{15}O_4$
- b) m/e 234 $C_{13}H_{14}O_4$
- c) m/e 206 $C_{12}H_{14}O_3$
- d) m/e 164 $C_9H_8O_3$
- e) m/e 150 $C_8H_6O_3$
- f) m/e 135 $C_7H_7O_2$
- g) m/e 124 $C_7H_8O_2$.

Die spektralphotometrischen und massenspektroskopischen Daten von Komponente **2** sind identisch mit denen der Glomellifersäure (Renner, Gerstner, unveröffentlicht). Im Einklang mit diesen Befunden steht das Ergebnis der sauren Hydrolyse (s. Abb. 7).

Bei Komponente **3**, einem Neutralstoff, sprechen Verhalten bei der chromatographischen Trennung und Massenspektrum [5] für die Verbindung Zeorin. Charakteristisch sind der Molmassenpeak

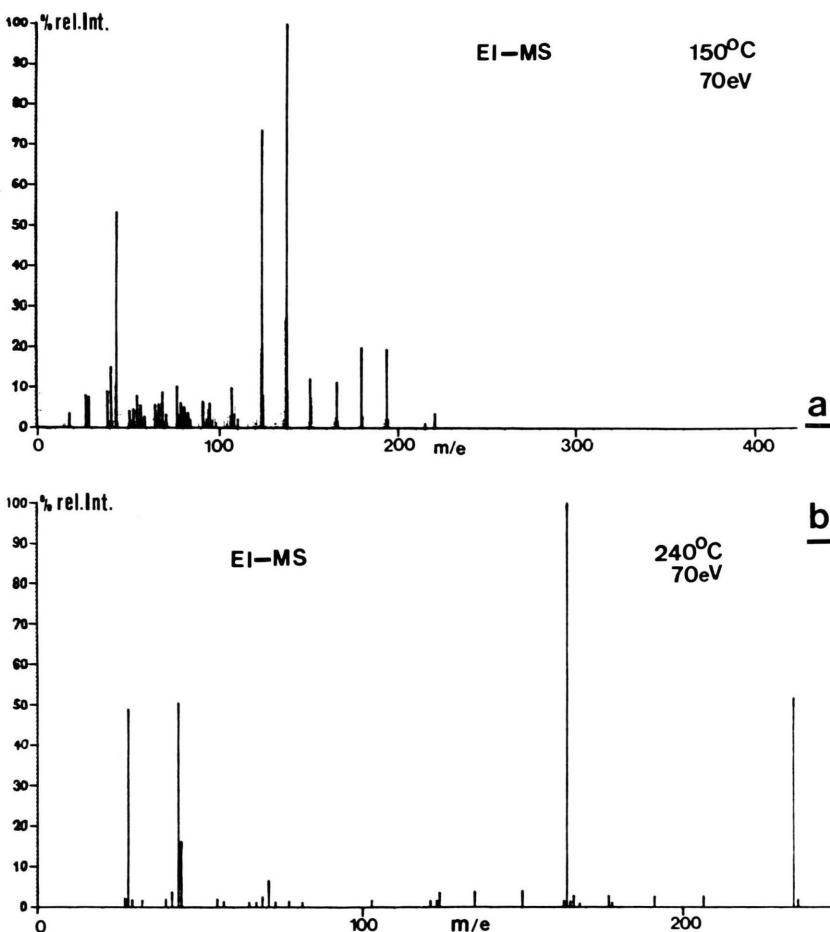


Abb. 6 a. EI-Massenspektrum von Komponente **1** aus *Nephroma cellosum*;
b. EI-Massenspektrum von Komponente **2**.

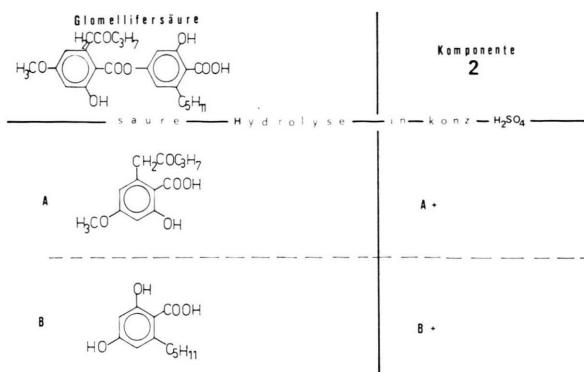


Abb. 7. Ergebnis der sauren Hydrolyse von Komponente 2 im Vergleich zur Referenzsubstanz Glomellifersäure (aus *Parmelia loxodes* Nyl. syn. *Parmelia glomellifera* Nyl.) [3, 4] extrahiert.

bei m/e 444 und die folgenden Fragmente (s. auch Markierungen in Abb. 8):

- | | | |
|--------------|--------------|----------------|
| a) m/e 426 | d) m/e 190 | g) m/e 149 |
| b) m/e 207 | e) m/e 189 | h) m/e 135 |
| c) m/e 191 | f) m/e 161 | i) m/e 121 . |

An der Identifizierung weiterer Inhaltsstoffe von *Nephroma cellulosum* wird zur Zeit gearbeitet. Als Komponente 4 konnte inzwischen ein gelbes Pigment mit Depsidcharakter isoliert werden.

Diskussion

Die beschriebene Methode erlaubt es, an relativ kleinen Thallusproben von Flechten Inhaltsstoffanalysen durchzuführen. Die einzelnen Komponenten eines komplexen Stoffgemisches können durch

Elution mit dem Eluchrom direkt von der DC-Platte isoliert werden. Die Trennung des Stoffgemisches ist damit einfach und nahezu verlustfrei durchführbar. Bei Substanzen, deren Trennung in dem jeweils verwendeten Fließmittel (z. B. 200 ml Toluol/30 ml Eisessig) nur unbefriedigend verläuft, muß durch Variation des Fließmittels sowie der Trennschicht oder Trennschichtunterlage (z. B. Kieselgel 60 auf Glasplatten, Aluminiumfolien oder HPTCL-Platten) der zur Isolierung notwendige R_f -Wertunterschied erreicht werden.

Bei den Operationen, die zur Reinsubstanz führen, muß mit Sicherheit eine chemische Veränderung der zu isolierenden Substanz ausgeschlossen werden. Es empfiehlt sich daher, bereits den Vollextrakt auf verschiedene Weise herzustellen. Wir wählten die Extraktion mit Aceton im Soxhlet-Extraktor und mit Ultraschall. Letzteres Verfahren wurde unter dem Aspekt einer schonenden Alternative durchgeführt, schonend deshalb, weil hier die bei hohen Temperaturen möglichen Fragmentationen und Reaktionen der Fragmente mit dem Fließmittel auszuschließen sind. Im Falle von *Nephroma cellulosum* führten jedoch beide Extraktionsverfahren zu denselben Ergebnissen, die Extraktion im Soxhlet verursachte keine chemischen Veränderungen der Inhaltsstoffe.

Eine mögliche Derivatisierung der isolierten Flechtenstoffe durch Bestandteile des Fließmittels konnten wir in unseren Experimenten ausschließen. Sie tritt vor allem dann ein, wenn man Flechtenstoffe isoliert, die in mehreren Fließmitteln unterschiedlicher Zusammensetzung chromatographiert wurden.

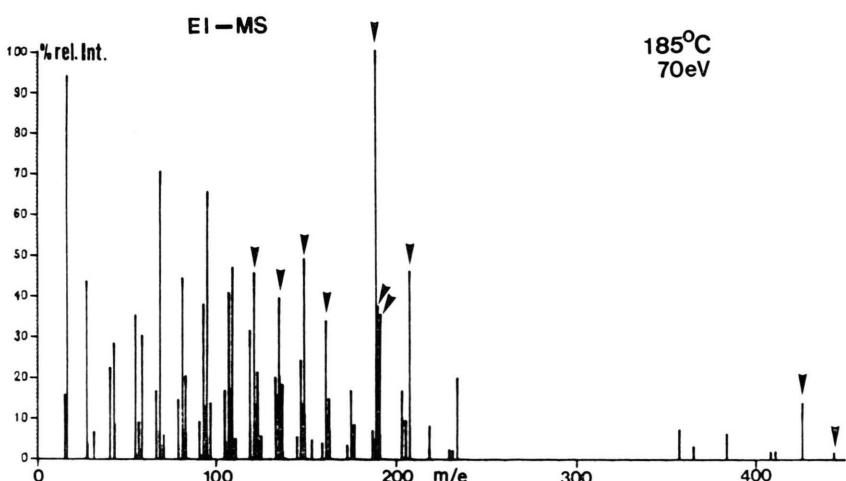


Abb. 8 a. Chromatogramm wie in Abb. 2; b. EI-Massenspektrum von Komponente 3 (=Zoerin). Wegen einer geringfügigen Verunreinigung von Komponente 3 an Glomellifersäure sind die für Komponente 3 charakteristischen Peaks durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Grenze der hier beschriebenen Methode zur Identifizierung von Flechtenstoffen ist erreicht, wenn man eine isolierte Substanz nicht allein durch EI-, FD-Massenspektroskopie, UV/VIS-Spektroskopie sowie saurer Hydrolyse und Methylierung mit Diazomethan (CH_2N_2) charakterisieren und beschreiben kann. Für weitere chemische Derivatisierungen und NMR-spektroskopische Untersuchungen sind die dünnenschichtchromatographisch isolierten Mengen eines unbekannten Flechtenstoffes auch bei hoher Ausbeute zu gering. Inhaltsstoffe, die nur in sehr niedriger Konzentration im untersuchten Flechten-

thallus enthalten sind, können unter den beschriebenen Bedingungen gar nicht erfaßt werden.

Diese Arbeit wurde durch eine Forschungsbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Frau Prof. Dr. A. Henssen ermöglicht. Die Beihilfe unterstützt das Projekt einer chemotaxonomischen Bearbeitung südamerikanischer Flechten. Frau Prof. Dr. A. Henssen danken wir für die Überlassung wichtiger Flechtenproben aus dem Marburger Referenzherbar, Herrn Dr. K. Steinbach (Fachbereich Chemie) für die Aufnahme der Massenspektren.

- [1] J. Santesson, *Arkiv Kemi* **30**, 363–377 (1969).
- [2] C. F. Culberson, *J. Chromatogr.* **72**, 113–125 (1972).
- [3] T. L. Esslinger, *The Bryol.* **76**, 306–309 (1973).
- [4] C. F. Culberson u. T. L. Esslinger, *The Bryol.* **79**, 42–46 (1976).
- [5] R. Nourish u. R. W. A. Oliver, *Lichenology: Progress and Problems* (D. H. Brown, D. L. Hawksworth, R. H. Bailey, eds.), p. 185–214, Academic Press, London, New York, San Francisco 1976.