

Phytochemische Untersuchungen an westeuropäischen Lasallia-Arten

Phytochemical Investigations on Western European Lasallia Species

Birgit Posner\*, Guido Benno Feige\* und Siegfried Huneck\*\*

\* Botanisches Institut der Universität-Gesamthochschule Essen, Fachbereich 9, Postfach 10 37 64, D-4300 Essen, Bundesrepublik Deutschland
\*\* Institut für Biochemie der Pflanzen der Akademie der Wissenschaften der DDR, Weinberg, DDR-4050 Halle/Saale

Herrn Prof. Dr. H. Reznik, Köln, in Dankbarkeit gewidmet.

Z. Naturforsch. 45c, 161 – 165 (1990); received November 12/23, 1989

Lasallia, Lichen Substances, Anthraquinones, Skyrin

The secondary product pattern of 38 specimens of Lasallia brisantium (Zsch.) Llano, L. hispanica (Frey) Sancho & Crespo and L. pustulata (L.) Mérat were investigated by HPLC. According to previous publications gyrophoric acid, lecanoric acid and umbilicic acid were detected. Additionally two further unknown depsides were found. The presence of the anthraquinone skyrin, new to Lasallia, was shown for L. hispanica and L. pustulata. Skyrin is not equally distributed within the thalli but mainly concentrated in the umbilicus. In L. hispanica skyrin is located in the epihymenium, too. A correlation between secondary product pattern and thallus size or light supply does not exist.

Einleitung

Die Flechtenfamilie Umbilicariaceae umfaßt die Gattungen Lasallia und Umbilicaria. Charakteristisch für die Gattung Lasallia sind die pustulate Thallusmorphologie, Sporenmerkmale (1–2 große Sporen pro Ascus in Lasallia im Gegensatz zu 8 kleinen Sporen pro Ascus in Umbilicaria), die Abwesenheit von Rhizinomorphen und das Fehlen der vegetativen Reproduktion durch Thallosporen [1–4].

Die Gattung ist in Europa westlich des 18. Längengrades durch drei Arten, L. brisantium (Zsch.) Llano, L. hispanica (Frey) Sancho & Crespo und L. pustulata (L.) Mérat vertreten. Die bisher bekannten Inhaltsstoffe dieser Arten sind in Tab. I aufgeführt.

Tab. I. Bisher bekannte Flechtenstoffe in L. brisantium, L. hispanica und L. pustulata.

Table with 3 columns: Art, Flechtenstoff, Literatur. Rows list species (L. brisantium, L. hispanica, L. pustulata) and their associated lichen substances and literature references.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. B. Feige.
Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/90/0300–0161 \$ 01.30/0

Frühere Untersuchungen [5, 6] haben gezeigt, daß die Phytochemie von L. brisantium, L. hispanica und L. pustulata differenzierter ist als bisher angenommen. Ziel der vorliegenden Arbeit soll daher eine nähere Untersuchung der Inhaltsstoffe dieser drei Arten mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie sein. Außerdem werden Untersuchungen zur Lokalisation der Inhaltsstoffe im Thallus für L. hispanica erstmalig vorgelegt.

Material und Methoden

Belegproben des untersuchten Flechtenmaterials werden unter den Nummern 434, 435, 436, 502, 511, 548, 597, 666, 695, 801, 982, 1252, 1544, 1622, 1650, 2488, 2742, 3188, 3414, 4254, 4278, 4279,

4280, 4281 (ESS), 33–83, 33–83 a, 192 (GZU), QLA 1, Q4 B(2) (MAF), 730, 4469, 10152, 10718, 10904, 15669 (POELT) und 7552/1 (WITT-



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 digitalized 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.

MANN) in den angegebenen Herbarien aufbewahrt. Zusätzlich stand Typusmaterial von *L. brigantium* (BERN 1345) und *L. hispanica* (BERN 7868) zur Verfügung.

Zur HPLC-Analytik vgl. [7]. Identifizierung und quantitative Bestimmung der Flechtensubstanzen erfolgten durch Vergleich von Retentionszeiten, UV-Spektren in Methanol und Cochromatographie mit authentischen Reinsubstanzen (Dr. S. Huneck, Halle, und Prof. Dr. I. Kitagawa, Osaka) sowie durch Vergleich mit Extrakten aus *L. papulosa* (L.) Ach. (ESS 3361) und *Phaeophyscia erythrocardia* (Ach.) Moberg (ESS 4902). Quantitative Daten werden als prozentualer Anteil am Trockengewicht (% TG) angegeben. Für die Substanzen RT 17 und RT 18 war eine Kalibrierung nicht möglich. Die Quantifizierung dieser Flechtensubstanzen erfolgte anhand der Daten von Gyrophorsäure.

Skyrin wurde aus *L. pustulata* (WITTMANN 7552/1) isoliert: Etwa 45 g gereinigte, schon vorisolierte Nabelbereiche wurden pulverisiert und bei Raumtemperatur 2 h mit 2 l Aceton extrahiert. Der filtrierte Extrakt wurde auf ca. 50 ml eingengt und auf Kieselgelsäulen (Kieselgel 60, Merck) mit Petrolether (40–60):Isopropanol:Chloroform:Wasser (90:10:70:0,3) vorgereinigt. Eine orangerote Fraktion wurde aufgefangen und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und mittels präparativer HPLC weiter gereinigt:

Bedingungen: Pumpe: ERC HPLC PUMP 64, Druck: 2,9 MPa, Flußrate 5 ml/min, Laufmittel: Methanol (100%), Säule: Nucleosil 7C<sub>8</sub> (Macherey & Nagel, Düren), 250 × 16 mm, Aufgabevolumen: 0,5 ml = ca. 1,2 mg Substanz, Detektor: UVIKON 720 LC, Wellenlänge der Detektion: 260 nm. Die aufgefangenen Fraktionen wurden zur Trockne eingengt und der Rückstand gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 20 mg einer tief orangeroten Substanz.

Massenspektrometrische Untersuchungen (Gerät: MAT 711 (Varian), Ionisierungsenergie: 80 eV, 280 °C) wurden von Prof. Dr. Ch. Leuckert an der Technischen Universität Berlin, Inst. f. Org. Chemie, Massenspektrometrische Abteilung, Leitung Dr. G. Holzmann, durchgeführt. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen erfolgten nach der Standardmethode von Culbertson und Kristinsson [5].

Untersuchungen zur Lokalisierung der Inhaltsstoffe im Thallus wurden anhand größerer Aufsammlungen von *L. pustulata* (WITTMANN 7552/1, 40 Thalli mit unterschiedlichem Durchmesser) und *L. hispanica* (ESS 4254, 20 Thalli mit einem Durchmesser von 3,5 cm) durchgeführt.

Thalli mit einem Durchmesser bis zu 3,5 cm wurden in eine Nabelsektion (ca. 1 cm Durchmesser) und eine jüngere Randsektion (Thallusrest) geteilt. Größere Thalli (bis zu 12 cm im Durchmesser) wurden in drei Teile geteilt, die Nabelsektion (1–2 cm im Durchmesser), die mittlere Sektion (von der Nabelregion bis maximal 2 cm gegen den Rand) und die Randsektion.

Die Beziehung zwischen Exposition und Akkumulation von Sekundärstoffen wurde anhand von 20 möglichst gleich entwickelten Thalli (WITTMANN 7552/1, ca. 3,5 cm im Durchmesser) untersucht. Je 10 Thalli wurden aus besonders schattiger oder aber stark besonnener Exposition entnommen.

## Ergebnisse und Diskussion

Das Inhaltsstoffmuster von 22 Aufsammlungen von *L. pustulata* erwies sich im Hinblick auf fünf Flechtensubstanzen als einheitlich. Zusätzlich zur Hauptkomponente Gyrophorsäure (6% TG) wurden Lecanorsäure (0,3% TG), Spuren von Umbilicarsäure (<0,1% TG) und zwei weitere unbekannte Substanzen nachgewiesen, die nach ihrer Retentionszeit im folgenden als RT 17 (<0,1% TG) und RT 18 (0,2% TG) bezeichnet werden. Anhand der UV-Spektren (Fig. 1), die Absorptionsmaxima bei ca. 252 und 304 nm (RT 17) und ca. 246, 266 und 306 nm (RT 18) aufwiesen, waren RT 17 und RT 18 als Depside zu klassifizieren. Eine weitere Identifizierung dieser Substanzen war nicht möglich. RT 17 und RT 18 sind innerhalb der Umbilicariaceae weit verbreitet. Das Vorkommen ist früheren Arbeiten zu entnehmen [7, 8].

Bei 9 Aufsammlungen von *L. pustulata* (ESS 502, ESS 548, ESS 666, ESS 801, ESS 982, ESS 1650, ESS 2488, ESS 3188 und WITTMANN 7552/1) wurde eine zusätzliche Substanz nachgewiesen, die eine Gelbfärbung des Extraktes bewirkte. Aufgrund des UV-Spektrums mit Maxima bei 254 (log  $\epsilon$  0,54), 296 (log  $\epsilon$  2,1) und 453 nm (log  $\epsilon$  0,84) konnte die Substanz als Anthrachinon identifiziert werden. Gegenüberstellung der Retentionszeiten

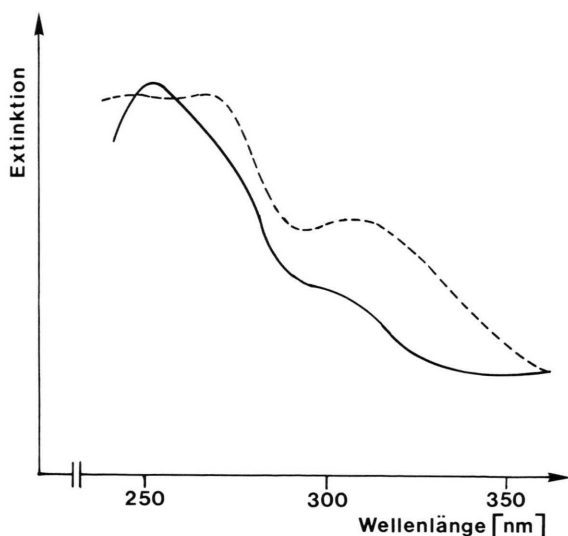


Fig. 1. UV-Spektrum der unbekannten Depside RT 17 und RT 18. — = RT 17, ---- = RT 18.

der unbekannten Substanz und Cochromatographie mit den Anthrachinonen 7-Chloremodin und Valsarin, die als Inhaltsstoffe der Gattung *Lasallia* bekannt sind [9–11], ergab keine Übereinstimmung. Die Substanz wurde daraufhin isoliert. Das Massenspektrum zeigte signifikante Peaks bei  $m/z$  538 und  $m/z$  269. Die Daten aus UV- und Massenspektrometrie deuteten auf eine dimere Verbindung vom Anthrachinontyp mit der Bruttoformel  $C_{30}H_{18}O_{10}$  hin. Die Molmasse stimmte mit der von Skyrin (Fig. 2) überein. Auch der dünnschichtchromatographische Vergleich mit

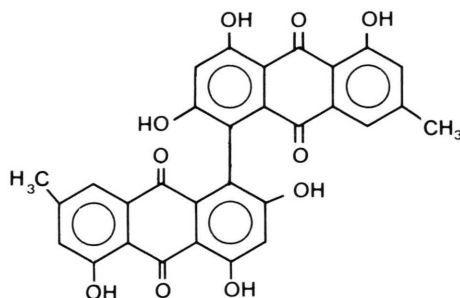


Fig. 2. Skyrin.

authentischem Skyrin ergab völlige Übereinstimmung. Die Identität der unbekannten Substanz als Skyrin wurde zusätzlich durch hochdruckflüssigkeitschromatographischen Vergleich mit einem Extrakt aus *Phaeophyscia erythrocardia* (Ach.) Moberg (ESS 4902) bestätigt.

Das unregelmäßige Vorkommen des Skyrins in nur 9 von insgesamt 22 untersuchten Proben gab Anlaß zu weiteren Studien anhand einer größeren Aufsammlung aus Österreich (WITTMANN 7552/1). Das dimere Anthrachinon war in 29 von insgesamt 40 untersuchten Thalli enthalten (70%). Die Untersuchung verschiedener Thallussektionen (Tab. II) zeigte eine ungleichmäßige Verteilung des Skyrins. Die Substanz ist vorwiegend in der Nabelsektion im Nabel und in der unteren Rinde abgelagert. Das Vorkommen des Skyrins ist nicht von der Thallusgröße abhängig. Die Substanz wurde in Thalli mit Durchmessern von 2–12 cm nachgewiesen.

Tab. II. Konzentrationen von Gyrophorsäure, Lecanorsäure, Umbilicarsäure, Skyrin, RT 17 und RT 18 in Sektionen von *L. pustulata* von verschiedenem Thallusdurchmesser: 2–3 cm (3 Thalli), 3,5–4 cm (9 Thalli), 7–8 cm (5 Thalli), 9–12 cm (3 Thalli). N = Nabelsektion, M = mittlere Sektion, R = Randsektion,  $\pm$  = % TG < 0,1, (2) = Inhaltsstoff in 2 Thalli enthalten.

Konzentration (in % TG)	Thallusdurchmesser									
	2–3 cm		3,5–4 cm		7–8 cm			9–12 cm		
	N	R	N	R	N	M	R	N	M	R
Gyrophorsäure	6,5	6,5	6,5	6,8	6	6	6	4	5	6
Lecanorsäure	0,1	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2
Skyrin	0,1	–	0,2	–	0,1	–	–	0,4	–	–
	(2)		(5)		(4)			(3)		
Umbilicarsäure	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
RT 17	$\pm$	0,2	$\pm$	0,2	$\pm$	$\pm$	0,1	$\pm$	$\pm$	0,1
RT 18	0,2	0,4	0,2	0,4	0,1	0,2	0,4	$\pm$	0,1	0,3

Das unregelmäßige Vorkommen des Anthrachinons ist auch nicht auf das Lichtangebot am Standort (Exposition) zurückzuführen. Die Untersuchung von 20 Thalli, die aus unterschiedlicher Exposition gesammelt wurden, ergab, daß weder die Anreicherung von Skyrin im Nabel, noch das uneinheitliche Vorkommen von der Exposition beeinflusst werden (Tab. III).

Im Gegensatz zu Skyrin sind Gyrophorsäure, Lecanorsäure, Umbilicarsäure und RT 17 und RT 18 in allen untersuchten Thalli enthalten. In der Randsektion ist die Konzentration der Depside meist geringfügig höher als in der Nabelsektion.

Im Hinblick auf die Ergebnisse bei *L. pustulata* wurden die beiden Arten *L. brisantium* und *L. hispanica*, die außer *L. pustulata* im westlichen Europa verbreitet sind, untersucht.

Das Inhaltsstoffmuster von 9 Aufsammlungen von *L. hispanica* erwies sich als identisch mit dem von *L. pustulata*. Zusätzlich zur Hauptkomponente Gyrophorsäure (7% TG) wurden Lecanorsäure (0,3% TG), Spuren von Umbilicarsäure (<0,1% TG), RT 17 (<0,1% TG), RT 18 (0,2% TG) und Skyrin nachgewiesen.

Die Untersuchung von Thallussegmenten anhand von 20 Thalli (Durchmesser 3,5 cm) aus Spanien (ESS 4254) zeigte eine Zunahme der Depsidkonzentration von der Nabelsektion zur Randsektion (Tab. IV). Skyrin war in allen Thalli enthalten. Wie auch bei *L. pustulata* wird die Substanz vorwiegend in der Nabelsektion im Nabel und in der unteren Rinde abgelagert. Zusätzlich konnte Skyrin in den Apothecien (ESS 4254) nachgewiesen werden. Histochemische Untersuchungen mit Kaliumhydroxid ergaben eine Lokalisation im Epithymenium.

Tab. III. Konzentrationen von Gyrophorsäure, Lecanorsäure, Umbilicarsäure, Skyrin, RT 17 und RT 18 in Thalli von *L. pustulata* unterschiedlicher Exposition. N = Nabelsektion, R = Randsektion,  $\pm$  = % TG <0,1, (2) = Inhaltsstoff in 2 Thalli enthalten. Jeweils 10 Thalli.

Konzentration (in % TG) von	Exposition			
	Sonne		Schatten	
	N	R	N	R
Gyrophorsäure	5,6	6,3	7,0	7,2
Lecanorsäure	0,2	0,3	0,2	0,3
Skyrin	0,2 (7)	—	0,3 (7)	0,1 (1)
Umbilicarsäure	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
RT 17	$\pm$	0,1	0,1	0,3
RT 18	0,1	0,4	0,1	0,3

Tab. IV. Konzentration von Gyrophorsäure, Lecanorsäure, Umbilicarsäure, Skyrin, RT 17 und RT 18 in Thalli von *L. hispanica*. N = Nabelsektion, R = Randsektion,  $\pm$  = % TG <0,1, (2) = Inhaltsstoff in 2 Thalli enthalten, 20 Thalli.

Konzentration (in % TG) von	N	R
Gyrophorsäure	5,2	7,0
Lecanorsäure	0,1	0,3
Skyrin	0,7 (20)	0,1 (2)
Umbilicarsäure	$\pm$	$\pm$
RT 17	$\pm$	0,1
RT 18	0,1	0,2

Inhaltsstoffe von 6 untersuchten Aufsammlungen von *L. brisantium* sind Gyrophorsäure (8% TG), Lecanorsäure (0,2% TG), Spuren von Umbilicarsäure (<0,1% TG), RT 17 (<0,1% TG) und RT 18 (0,3% TG). Im Gegensatz zu *L. pustulata* und *L. hispanica* wurden keine Anthrachinone gefunden. Untersuchungen von Thallussektionen waren aus Materialmangel nicht möglich.

Im Gegensatz zur Gattung Umbilicaria besteht bei der Gattung *Lasallia* eine klare Tendenz zur Anthrachinonsynthese. Das Vorkommen von Anthrachinonen ist von folgenden Arten bekannt: *L. asiae-orientalis* Asah., Struktur unbekannt [12]; *L. capensis* (Frey) Llano, 7-Chloremodin [13]; *L. hispanica* (Frey) Crespo & Sancho, Skyrin (vorliegende Untersuchung); *L. mayebarae* (Sato) Asah., Struktur unbekannt [12]; *L. membranacea* (Laur.) Llano, 7-Chloremodin, Valsarin [13]; *L. papulosa* (Ach.) Llano, 7-Chloremodin, Valsarin [9, 11], var. *laceratula* (Vain.) Llano, 7-Chloremodin [13], var. *rubiginosa* Pers., 7-Chloremodin, Valsarin [9–12, 14]; *L. pertusa* (Rass.) Llano, Struktur unbekannt [13]; *L. pustulata* (L.) Méral, Skyrin (vorliegende Untersuchung); *L. rossica* Dombr., 7-Chloremodin, Valsarin [13].

In *L. brisantium* (Zsch.) Llano, *L. pennsylvanica* (Hoffm.) Llano mit der var. *caucasica* (Lojka) und *L. sinensis* Vej sind Anthrachinone bisher nicht bekannt.

*L. dilacerata* Frey und *L. glauca* (Stizenb.) Llano sind bisher phytochemisch nicht untersucht worden.

#### Danksagung

Wir danken Dr. K. Ammann (Bern), Prof. Dr. J. Poelt (Graz) und Dr. L. G. Sancho (Madrid) für

das zur Verfügung gestellte Flechtenmaterial. Zu ganz besonderem Dank sind wir Dr. H. Wittmann verpflichtet, der extra für diese Publikation eine Sammelreise unternommen hat. Prof. Dr. I. Kitagawa (Osaka) danken wir für das Überlassen der Flechtensubstanz 7-Chloremodin (AO-1). Ganz

besonders herzlich danken wir auch Herrn Prof. Dr. Ch. Leuckert, Dr. G. Holzmann, Frau Ostwald und Frau Braun für die großzügige Unterstützung bei der Massenspektrometrie, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

- [1] E. Frey, *Khumbu Himal* **6** (3), 387 (1977).
- [2] G. Hasenhüttl und J. Poelt, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **91**, 275 (1978).
- [3] H. Krog und T. D. V. Swinscow, *Nord. J. Bot.* **6** (1), 75 (1986).
- [4] L. G. Sancho und A. Crespo, *Lichenologist* **21** (1), 45 (1989).
- [5] Ch. F. Culberson und H. Kristinsson, *J. Chromatogr.* **46**, 85 (1970).
- [6] M. Geyer, Diss., Essen 1985.
- [7] G. B. Feige, B. Posner und M. Geyer, *Herzogia* **7**, 649 (1987).
- [8] B. Ewich, Examensarbeit, Essen 1985.
- [9] G. Bohmann, *Acta Chem. Scand.* **23**, 2241 (1969).
- [10] L. H. Briggs, D. R. Castaing, A. N. Denyer, E. F. Orgias und C. W. Small, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1972**, 1464.
- [11] C. H. Fox, W. S. G. Maass und T. P. Forrest, *Tetrahedron Lett.* **12**, 919 (1969).
- [12] Y. Asahina, *J. Jap. Bot.* **35** (4), 97 (1960).
- [13] B. Posner und G. B. Feige, in Vorbereitung.
- [14] Ch. F. Culberson und W. L. Culberson, *Lloydia* **21** (3), 189 (1958).
- [15] L. G. Sancho, Diss., Univ. Complutense, Madrid 1986.
- [16] C. H. Fox und K. Mosbach, *Acta Chem. Scand.* **21**, 2327 (1967).
- [17] H. Krog, *Bryologist* **76**, 550 (1973).
- [18] E. Lisicka, *Biol. Pr.* **4** (26), 152 (1980).
- [19] D. Hess, *Planta* **52**, 65 (1958).
- [20] W. Zopf, Gustav Fischer, Jena 1907.