

Phenolische Verbindungen einiger Flechten aus der Familie Physciaceae

Siegfried HUNECK & Jürgen SCHMIDT

Zusammenfassung: HUNECK, S. & SCHMIDT, J. 2006. Phenolische Verbindungen einiger Flechten aus der Familie Physciaceae. – Herzogia 19: 199–203.

In sechs Physciaceen werden mittels HPLC-ESI-MS/MS folgende phenolische Flechtenstoffe nachgewiesen: *Phaeophyscia orbicularis*: Atranorin (1), β -Orcinolcarbonsäuremethylester (6), *Physcia adscendens*: 1, 6, Chloratranorin (2), 5-Hydroxyatranorin (3, neu), Norbaeomycessäure (4), 3'-Demethylatranorin (5, neu), *Physcia aipolia*: 1, 2, 3, 4, 5 und 6, *Physcia caesia*: 1, 5 und 6, *Physcia stellaris*: 1, 2, 4, 5 und 6, *Physcia tenella*: 1, 2, 4, 5 und 6.

Abstract: HUNECK, S. & SCHMIDT, J. 2006. Phenolic compounds from some lichens of the family Physciaceae. – Herzogia 19: 199–203.

The following lichen substances were detected in six species of Physciaceae by HPLC-ESI-MS/MS: *Phaeophyscia orbicularis*: atranorin (1), methyl β -orcinolcarboxylate (6), *Physcia adscendens*: 1, 6, chloroatranorin (2), 5-hydroxyatranorin (3, new), norbaeomycesic acid (4), 3'-demethylatranorin (5, new), *Physcia aipolia*: 1, 2, 3, 4, 5 and 6, *Physcia caesia*: 1, 4 and 5, *Physcia stellaris*: 1, 2, 4, 5 and 6, *Physcia tenella*: 1, 2, 4, 5 and 6.

Key words: Lichenized Ascomycetes, *Phaeophyscia orbicularis*, *Physcia adscendens*, *Physcia aipolia*, *Physcia caesia*, *Physcia stellaris*, *Physcia tenella*, phenolic compounds, HPLC-ESI-MS/MS.

Einleitung

Die Kombination von hochaufgelöster Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) in Verbindung mit tandem-massenspektrometrischen Methoden (MS/MS) hat sich für die Analyse von Flechtenstoffen, insbesondere jenen, die nur in geringen Konzentrationen vorliegen, als sehr nützlich erwiesen (HUNECK et al. 2004). Wir haben mittels dieser Methode sechs Arten aus der Familie der Physciaceae untersucht und berichten nachstehend über die Ergebnisse. In der Literatur werden für die analysierten Arten folgende phenolische Inhaltsstoffe angegeben: *Phaeophyscia orbicularis*: keine Phenole (CULBERSON 1970) bzw. Skyrin (CULBERSON et al. 1977), *Physcia adscendens*: Atranorin (CULBERSON 1969, 1970, CULBERSON et al. 1977), *Physcia aipolia*: Atranorin (CULBERSON 1969, 1970, CULBERSON et al. 1977), *Physcia caesia*: Atranorin (CULBERSON 1969, 1970, CULBERSON et al. 1977), *Physcia tenella*: Atranorin (CULBERSON 1969, 1970).

Material und Methoden

Die untersuchten Flechtenproben wurden von S. H. gesammelt und bestimmt. Die Belege befinden sich in B.

Phaeophyscia orbicularis (Neck.) Moberg: Sachsen-Anhalt, Mansfelder Land, auf *Sambucus nigra* am Süßen See bei Seeburg, Februar 2006; Rinde K+ schwach gelb. 0,1 g.

Physcia adscendens (Fr.) H.Olivier: Sachsen-Anhalt, Mansfelder Land, auf *Sambucus nigra* am Südufer des ehemaligen Salzigen Sees bei Röblingen am See, Februar 2005; Rinde K+ gelb. 1,5 g.

Physcia aipolia (Ehrh. ex Humb.) Fűrnr.: Italien, Südtirol, auf *Larix decidua* bei Schabs, Juli 2003; Rinde K+ gelb, 0,5 g.

Physcia caesia (Hoffm.) Fűrnr.: Sachsen-Anhalt, Landkreis Sangerhausen, auf Gartenmauer aus Ziegelsteinen in Hainrode, April 2004; Rinde K+ gelb. 2,0 g.

Physcia stellaris (L.) Nyl.: Sachsen-Anhalt, Mansfelder Land, auf abgestorbenem Strauch oberhalb vom Süßen See bei Seeburg, April 2004; Rinde K+ gelb. 0,2 g.

Physcia tenella (Scop.) DC.: Sachsen-Anhalt, Saalkreis, Langenbogen, Salza-Tal, auf Dach aus Teerpappe einer Gartenlaube, April 2005; Rinde K+ gelb. 1,5 g.

Extrakte: Die lufttrockenen zerkleinerten Flechten wurden dreimal mit je 2 ml siedendem Chloroform extrahiert, die filtrierten Extrakte vereinigt und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur verdampft. Der Rückstand wurde mittels HPLC-ESI-MS/MS analysiert.

HPLC-ESI-MS/MS: Die Elektrospray (ESI)-Massenspektren negativer Ionen und die CID („Collision-Induced Dissociation“-)Spektren wurden an einem Finnigan MAT TSQ 7000 Instrument, gekoppelt mit einer Surveyor Mikro-HPLC (Thermo Finnigan) und Photodiodearraydetektor (PDA) aufgenommen. Aufnahmebedingungen Massenspektrometer: Elektrosprayspannung 4,0 kV; Kapillartemperatur 220 °C; Spraygas Stickstoff. HPLC: RP 18-Säule (5µm, 1×100 mm, Ultrasep); Gradientensystem von H₂O : CH₃CN 80 : 20 (jede Komponente mit 0,2 % Essigsäure) auf 10 : 90 in 15 min, dann 15 min isokratisch; Flussrate 70 µl/min. Die CID-Massenspektren der [M-H]⁻-Ionen der Flechtenstoffe wurden mit folgenden Kollisionsenergien aufgenommen: Atranorin, Chloratranorin, Norbaeomycessäure, 3'-Demethylatranorin und β-Orcinolcarbonsäuremethylester 15 eV, 5-Hydroxyatranorin 20 eV; Stoßgas Argon, Kollisionszellendruck 1,8×10⁻³ Torr. Alle Massenspektren wurden durch Mittelung und Untergrundsabtraktion erhalten.

CID-Massenspektren der detektierten Flechtenstoffe (*m/z*, relative Intensität):

Atranorin (**1**): *m/z* 373 ([M-H]⁻, 14), 195 (**a**, 100), 177 (**b**, 91), 163 (18).

Chloratranorin (**2**): *m/z* 407 (³⁵Cl, [M-H]⁻, 30, 331 (8), 211 (**b**, 100), 195 (**a**, 37), 163 (4); *m/z* 409 (³⁷Cl, [M-H]⁻, 29), 333 (7), 213 (**b**, 100), 195 (**a**, 31), 163 (6).

5-Hydroxyatranorin (**3**). *m/z* 389 ([M-H]⁻, 2), 357 ([M-H-MeOH]⁻, 3), 195 (**a**, 26), 193 (**b**, 100), 163 (24), 149 (3).

Norbaeomycessäure (**4**): *m/z* 359 ([M-H]⁻, 22), 195 (25), 181 (**a**, 100), 177 (**b**, 9).

3'-Demethylatranorin (**5**): *m/z* 359 ([M-H]⁻, 10) 181 (**a**₁, 100), 177 (**b**, 92), 149 ([a₁-MeOH]⁻, 16).

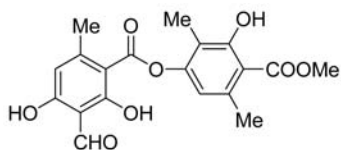
β-Orcinolcarbonsäuremethylester (**6**): *m/z* 195 ([M-H]⁻, 2), 163 ([M-H-MeOH]⁻, 100), 119 (6).

Ergebnisse und Diskussion

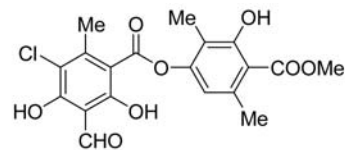
Die in den analysierten Flechtenproben detektierten phenolischen Verbindungen sind in Tab. 1 mit den entsprechenden Retentionszeiten der Mikro-HPLC aufgelistet. Die Strukturformeln der Verbindungen sind im Abb. 1 wiedergegeben.

Tab. 1: In *Phaeophyscia orbicularis*, *Physcia adscendens*, *P. aipolia*, *P. caesia*, *P. stellaris* und *P. tenella* gefundene phenolische Inhaltsstoffe (RT = Retentionszeit; ++++ sehr viel, +++ viel, ++ gut nachweisbar, + wenig, - nicht nachweisbar).

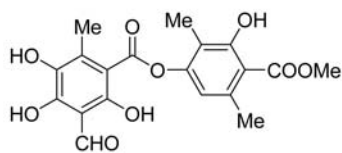
Verbindung	RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	<i>Physcia adscendens</i>	<i>Physcia aipolia</i>	<i>Physcia caesia</i>	<i>Physcia stellaris</i>	<i>Physcia tenella</i>
5-Hydroxyatranorin (3)	9.54	389	-	+++	+	-	-	-
β-Orcinolcarbonsäuremethylester (6)	10.13	195	+	+++	+	++	++	+
Norbaeomycessäure (4)	13.53	359	-	+	+	-	+	+
3'-Demethylatranorin (5)	15.34	359	-	++	++	++	+	+
Atranorin (1)	17.22	373	+++	++++	++++	+++	+++	++++
Chloratranorin (2)	18.12	407/409	-	++	+++	-	++	++

**1**

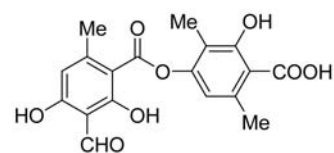
Atranorin

**2**

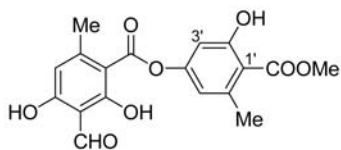
Chloratranorin

**3**

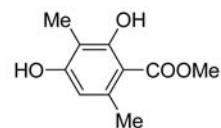
5-Hydroxyatranorin

**4**

Norbaeomycessäure

**5**

3'-Demethylatranorin

**6**

β-Orcinolcarbonsäuremethylester

Abb. 1: Strukturformeln der in den analysierten Proben gefundenen phenolischen Verbindungen.

Atranorin (**1**) und Chloratranorin (**2**) wurden mittels HPLC-ESI-MS/MS der [M-H]⁻-Ionen bei *m/z* bzw. 407 (³⁵Cl) und 409 (³⁷Cl) und Hochauflösungsmessungen des Extraktes identifiziert (Abb. 2). Analog zu HISERODT et al. (2000), die die Identifizierung beider Verbindungen im Extrakt von *Evernia prunastri* beschrieben haben, wurden **1** und **2** an Hand der Fragmentionen **a** (*m/z* 195) und **b** (**1**: *m/z* 177, **2**: *m/z* 211/213) identifiziert.

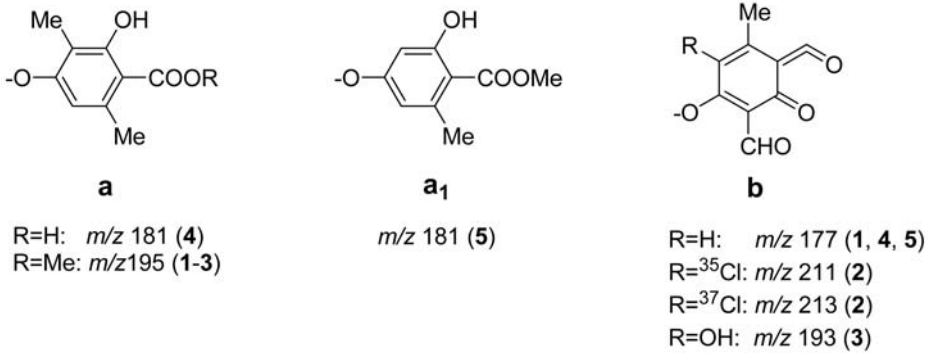


Abb. 2: Massenspektrometrische Fragmentierung der [M–H][–]-Ionen der Verbindungen 1–5.

In Analogie zum Atranorin zeigt das CID-Massenspektrum des [M–H][–]-Ions von Verbindung **3** (m/z 389) ein Schlüsselion **a** bei m/z 195. Die Verschiebung von m/z 177 zu m/z 193 (Basispeak) zeigt eine zusätzliche Hydroxygruppe am C-5 an. 5-Hydroxyatranorin (**3**) konnte auch durch Hochauflösungsmessungen bestätigt werden (m/z 389,0881, theoretischer Wert für C₁₉H₁₇O₉[–] 389,0878).

Das CID-Massenspektrum von m/z 359 ([M–H][–], RT = 13.53 min) zeigt Peaks bei m/z 181 (**a**) und 177 (**b**). Ein Vergleich mit einer authentischen Probe zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit Norbaeomycessäure (**4**), die von ELIX et al. (2000) in *Hypotrachyna orientalis* (Hale) Hale aus Neukaledonien gefunden wurde.

Die zweite Verbindung mit einem [M–H][–]-Peak bei m/z 359 (RT = 15.34 min) zeigt im CID-MS Fragmentationen bei m/z 181 (**a₁**), 177 (**b**) und 149 ([**a₁**–MeOH][–]), die auf das Vorliegen eines im A-Teil demethylierten Atranorins hinweisen, wobei biosynthetische Überlegungen für 3'-Demethylatranorin (**5**) sprechen (Abb. 2).

Der in mehreren Flechten gefundene β-Orcinolcarbonsäuremethylester (**6**, [M–H][–]-Peak bei m/z 195) (HUNECK & YOSHIMURA 1996, HUNECK 2001, MARANTE et al. 2003) wurde ebenfalls im Vergleich mit einer Referenzprobe identifiziert.

In der Literatur (z. B. WIRTH 1995: 715) werden alle *Phaeophyscia*-Arten ohne Atranorin (mittels TLC geprüft) angegeben (Gattungsmerkmal), während wir Atranorin in *Phaeophyscia orbicularis* aus Mitteldeutschland nachweisen konnten. Möglicherweise existieren Chemovarietäten. Bemerkenswert ist das Fehlen von Chloratranorin in *Physcia caesia*. In den anderen *Physcia*-Arten ist Chloratranorin ein Begleitstoff von Atranorin. Norbaeomycessäure wurde bisher nur in *Hypotrachyna orientalis* nachgewiesen (ELIX et al. 2000). 5-Hydroxyatranorin kommt lediglich in *Physcia adscendens* und *P. aipolia* vor, 3'-Demethylatranorin dagegen in allen untersuchten *Physcia*-Arten. β-Orcinolcarbonsäuremethylester konnte in der Familie der Physciaceae erstmals detektiert werden.

Bei der hohen Empfindlichkeit der HPLC-MS-Methode ist die Einheitlichkeit des untersuchten Flechtenmaterials wichtig. Zum einen wachsen *Physcia*-Arten oft dicht nebeneinander und zum anderen können Fremdsoredien unter Umständen Inhaltsstoffe enthalten, die in der entsprechenden Art nicht vorkommen: dies trifft insbesondere auf die in der Tabelle mit + (wenig) ausgewiesenen Verbindungen zu.

Dank

Wir danken Frau Christine Kuhnt (Halle/Saale) für die HPLC-ESI-MS/MS-Messungen, Herrn Prof. Dr. J. A. Elix (Canberra) für Literaturhinweise und eine Probe von Norbaeomycessäure und Herrn Dr. H. Sipman (Berlin-Dahlem) für eine Probe von β -Orcinolcarbonsäuremethylester aus der Sammlung von S. H. Das Vorliegen von *Phaeophyscia orbicularis* wurde dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. H. Mayrhofer (Graz) bestätigt.

Literatur

- CULBERSON, C. F. 1969. Chemical and botanical guide to lichen products. – Chapel Hill: University North Carolina Press.
- CULBERSON, C. F. 1970. Supplement to “Chemical and botanical guide to lichen products“. – *Bryologist* **73**: 177–377.
- CULBERSON, C. F., CULBERSON, W. L. & JOHNSON, A. 1977. Second supplement to “Chemical and botanical guide to lichen products“. – St. Louis: American Bryological and Lichenological Society.
- ELIX J. A., GRIFFIN, F. K. & LOUWHOFF, S. H. J. 2000. Norbaeomycesic acid, a new depside from the lichen *Hypotrachyna orientalis*. – *Australasian Lichenology* **46**: 25–28.
- HISERODT, R. D., SWIJTER, D. F. & MUSSINAN, C. J. 2000. Identification of atranorin and related potential allergens in oakmoss by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using negative ion atmospheric pressure chemical ionization. – *J. Chromatogr. A* **888**: 103–111.
- HUNECK, S. 2001. New results on the chemistry of lichen substances. – *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.* **81**: 1–276.
- HUNECK S. & YOSHIMURA, I. 1996. Identification of lichen substances. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- HUNECK, S., FEIGE, G. B. & SCHMIDT, J. 2004. Chemie von *Cladonia furcata* und *Cladonia rangiformis*. – *Herzogia* **17**: 51–58.
- MARANTE, F. J. T., CASTELLANO, A. G., ROSAS, F. E., AGUIAR, J. Q. & BARRERA, J. B. 2003. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. – *J. Chem. Ecol.* **29**: 2049–2071.
- WIRTH, V. 1995. Die Flechten Baden-Württembergs. 2. Auflage. – Stuttgart: Ulmer.

Manuskript angenommen: 26. April 2006.

Anschriften der Verfasser

Siegfried Huneck, Fliederweg 34 a, D-06179 Langenbogen/SK, Deutschland.
E-Mail: shuneck@gmx.de

Jürgen Schmidt, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Weinberg 3, D-06120 Halle/Saale, Deutschland. E-Mail: jschmidt@ipb-halle.de

