

Methylvirensat und 5-Chlor Methylvirensat aus Arten der Flechtengattung *Pseudocyphellaria*

Methyl-virensate and 5-Chloro-methyl-virensate from Species
of the Lichen Genus *Pseudocyphellaria*

Bernd Renner, Aino Henssen und Ernst Gerstner

Fachbereiche Biologie und Chemie der Universität Marburg

Z. Naturforsch. **33 c**, 826—830 (1978); eingegangen am 5. Mai/21. Juli, 1978

Pseudocyphellaria physciospora/granulata-group, New Depsidones, Methyl-virensate, 5-Cl Methyl-virensate

The two new lichen depsidones methyl-virensate and 5-Cl methyl-virensate were found in the lichens *Pseudocyphellaria physciospora* and *Pseudocyphellaria granulata*. Structure elucidation of the new compounds was carried out using UV/VIS-, ¹H-NMR- and EI-mass-spectroscopy. In TLC studies 5-Cl methyl-virensate may be confused with pannarin. The close relationship of the two new lichen substances to atranorin and Cl-atranorin is discussed.

Einführung

Bei der chemotaxonomischen Bearbeitung unserer südamerikanischen Aufsammlungen von *Pseudocyphellaria* schälte sich eine Gruppe von morphologisch stark variierenden, chemisch und anatomisch jedoch weitgehend übereinstimmenden Proben heraus. Die Lagerrinde der Flechten dieser Gruppe wird von periklinen, stark verschleimenden Hyphen gebildet und die Sporen sind polar-diblastisch und teils tetrablastisch. Nach einem Materialvergleich an den britischen und skandinavischen Herbarien und Gesprächen mit P. W. James, dem Monographen der taxonomisch sehr schwierigen Gattung *Pseudocyphellaria* (vgl. Galloway u. James [1]), ordnen wir die Proben den beiden Arten *Pseudocyphellaria granulata* (Bab.) Malme und *Pseudocyphellaria physciospora* (Nyl.) Malme zu. Für den Vergleich von *Ps. granulata* stand uns das Typusmaterial im Britischen Museum zur Verfügung, mit dem unsere Proben morphologisch und chemisch übereinstimmen. Von *Ps. physciospora* konnten wir authentisches, von Nylander bestimmtes Material von der Campbell Insel (Neuseeland) untersuchen; das Typusmaterial dieser Art war uns bisher nicht zugänglich. *Pseudocyphellaria granulata* unterscheidet sich von *Ps. physciospora* durch isidiös-sorediöse Aufbrüche entlang der Lobenränder. Es handelt sich möglicherweise bei den beiden Arten um ein Artenpaar. Entsprechende Artenpaare werden neuerdings vor allem von Poelt [2] für Sippen von

Parmelia herausgestellt. Der Habitus ist bei *Ps. physciospora* sehr variabel. Die Loben unserer Proben sind schmal oder breit, bräunlich, hell oder dunkelgrau. Eine ausführlichere Beschreibung erfolgt an anderer Stelle. *Pseudocyphellaria physciospora* und *Ps. granulata* gehören zur Gruppe mit faveolatem Thallus und physcioiden Sporen, d. h. Sporen mit dickem von einem Porus durchbrochenem Septum; beide Arten haben Grünalgen als Phycobionten.

Die dünnschichtchromatographische Analyse sekundärer Stoffwechselprodukte ergab ein einheitliches Stoffspektrum. Aufgrund des Fließverhaltens in drei Fließmitteln, der starken Fluoreszenz im kurzwelligen UV (366 nm) und der Farbreaktion mit 10-prozentiger Schwefelsäure wurde die Hauptkomponente, die das Gemisch zweier Stoffe darstellt, zunächst für Pannarin gehalten. Huneck *et al.* [3] geben diese Verbindung für die Flechte *Pseudocyphellaria physciospora* (Nyl.) Malme an. Unsere spektroskopischen Untersuchungen ergaben jedoch keine Anhaltspunkte für Pannarin sondern lassen auf die beiden neuen Flechtendepsidone Methylvirensat und 5-Chlor Methylvirensat schließen.

Material

Die Herbarabkürzungen entsprechen dem „Index Herbariorum“ (Staflou [4]).
Pannaria rubiginosa (Thunb.) Del. Portugal, Madeira, Portela, 1975 Henssen 22500 c (MB). — *Pseudocyphellaria granulata* (Bab.) Malme. Argentinien, Tierra del Fuego, Ushuaia, 1973 Henssen &

Sonderdruckanforderungen an B. Renner, Fachbereich Biologie-Botanik der Universität Marburg, Lahnberge, D-3550 Marburg.

Vobis 24351 a und 24399 a (MB); Prov. Neuquén, Lago Lacar, 1973 Henssen u. Vobis 24571 a (MB). — Chile, Pro. Llanquihue, Lago Todo los Santos, 1973 Henssen u. Vobis 24287 j und 24292 c (MB). — *Pseudocyphellaria physciospora* (Nyl.) Malme Argentinien, Prov. Neuquén, Lago Currhuc, 1973 Henssen u. Vobis 24583 b (MB); Prov. Rio Negro, Lago Nahuel Huapi, 1973 Henssen u. Vobis 24601 c, 24613 b (MB) und 1934 E. u. A. Ljungner 1356 (S); Prov. Santa Cruz, Lago Argentino, 1973 Henssen u. Vobis 24484 j und 24485 e (MB). — Chile, Prov. Llanquihue, Lago Todo los Santos, 1973 Henssen u. Vobis 24287 k, 24306 f und 1974 Redon 03066 (MB); Patagonia Occid., Rio Aysén, 1897 Dusén (S, UPS). — Neuseeland, Campbell Insel, 1874 Filhol (UPS).

Methode

Die dünnschichtchromatographische Isolierung von Flechtenstoffen und deren spektroskopische Identifizierung folgt dem Verfahren von Renner und Gerstner [5]. Das ^1H -NMR-Spektrum wurde mit einem Varian XL/100-Gerät mit Nicolet-Computer aufgenommen. Die Vollextrakte der mit Aceton erschöpfend extrahierten Flechtenthalli wurden nach der Methode von Culberson [6] chromatographiert (Fließmittel A, B und C). Die Auftrennung erfolgte auf mit Kieselgel 60_{F254} beschichteten Glasplatten (20 × 20 cm, Schichtdicke: 0,25 mm). Zur Trennung der beiden neuen Depsidone bewährte sich das neue Fließmittel E (68 ml Essigsäureäthylester, 100 ml Chloroform, 12 ml Aceton).

Ergebnisse und Diskussion

In Fließmittel C (200 ml Toluol, 30 ml Eisessig) trennt der Vollextrakt aller Flechten der *Pseudocyphellaria physciospora/granulata*-Gruppe einheitlich in sechs Komponenten auf (Fig. 1 B). Bei den Komponenten 1, 2 und 3 handelt es sich um Depsidone des Stictinsäure-Komplexes, Komponente 4 ist ein Triterpen mit der Molmasse 442. Komponente 5 wurde als Norstictinsäure identifiziert. Komponente 6 erscheint als ein Substanzfleck ($R_f=0,74$), der im UV-Bereich bei 336 nm intensiv hellblau fluoresziert und nach Behandeln mit 10-prozentiger Schwefelsäure und anschließendem Erhitzen auf 110 °C eine schmutzigbraune Farb-reaktion zeigt. In Fließmittel E trennt sich Kom-

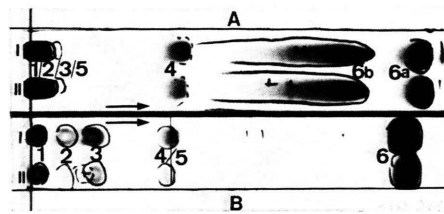


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramme des Vollextrakts von *Ps. physciospora* (I) und *Ps. granulata* (II) (Laufrichtung: siehe Pfeil; Trennstrecke: 10 cm). A Fließmittel E (Komponente 6 in 6a und 6b getrennt). B Fließmittel C (Komponente 6 als ein Substanzfleck).



Fig. 2. UV/VIS-Absorptionsspektrum von Komponente 6a (in abs. Methanol; Konz.: ca. 0,1 mg/ml).

ponente 6 in die Komponenten 6a und 6b auf (Fig. 1 A).

Komponente 6a zeigt im UV/VIS-Bereich ein für Depsidone charakteristisches Absorptionsspektrum (Fig. 2). Es besitzt Maxima bei 242 und 310 nm, Minima bei 226 und 294 nm. Auffällig ist daher die Ähnlichkeit mit den Maxima (240/308 nm) und Minima (225/289 nm), die Aghoramurthy *et al.* [7] für das Depsidon Virensäure angeben.

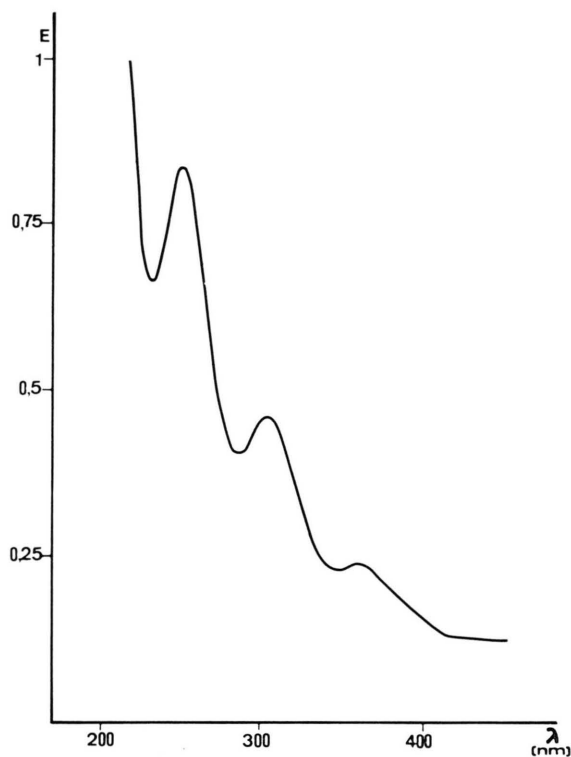


Fig. 3. UV/VIS-Absorptionsspektrum von Komponente **6b** (in abs. Methanol; Konz.: ca. 0,1 mg/ml).

Im EI-Massenspektrum erhielten wir für Komponente **6a** folgende Fragmente (Fig. 4):

- a) m/e 372 $C_{19}H_{16}O_8$ (\cong Molmassenpeak)
- b) m/e 340 $C_{18}H_{12}O_7$
- c) m/e 313 $C_{17}H_{13}O_6$
- d) m/e 312 $C_{12}H_{12}O_6$

- e) m/e 285 $C_{16}H_{13}O_5$
- f) m/e 284 $C_{16}H_{12}O_5$
- g) m/e 272 $C_{15}H_{12}O_5$
- h) m/e 258 $C_{14}H_{10}O_5$
- i) m/e 245 ? ? ?
- j) m/e 217 ? ? ?
- k) m/e 194 $C_{10}H_{10}O_5$
- l) m/e 179 $C_9H_7O_4$
- m) m/e 177 $C_9H_5O_4$
- n) m/e 152 $C_8H_8O_3$
- o) m/e 151 $C_8H_7O_3$

Nicht eindeutig zuzuordnen sind die Fragmente bei m/e 245 und 217. Fragment b) entsteht aus Fragment a) offensichtlich unter Verlust von CH_3OH (Masse 32), Fragment c) unter Verlust von $COOCH_3$ (Masse 59). Diese Beobachtung macht eine Carbonsäureesterfunktion in *ortho*-Stellung zu einer OH-Gruppe wahrscheinlich. Die Fragmente l) und m) entsprechen dem Oxonium-Ion des A-Teils der Komponente **6a**. Die Massendifferenz 2 ($= 2H$) zwischen beiden Fragmenten läßt eine Aldehydgruppe in *ortho*-Stellung zu einer OH-Gruppe vermuten.

Komponente **6b** besitzt ebenfalls Depsidoncharakter. Das Absorptionsspektrum im UV/VIS-Bereich (Fig. 3) zeigt Maxima bei 253,304 und 363 nm, Minima bei 234,284 und 345 nm. Das EI-Massenspektrum liefert 12 charakteristische Fragmentpaare (Fig. 5):

- a) m/e 406/408 $C_{19}H_{16}O_8Cl$ (\cong Molmassenpeak)
- b) m/e 374/376 $C_{18}H_{12}O_7Cl$
- c) m/e 347/349 $C_{17}H_{13}O_6Cl$

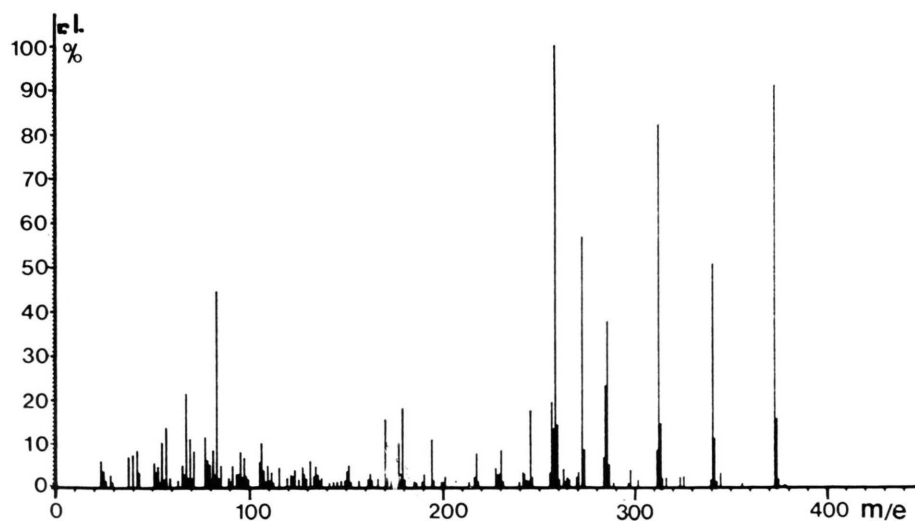


Fig. 4. EI-Massenspektrum von Komponente **6a** (220 °C, 70 eV).

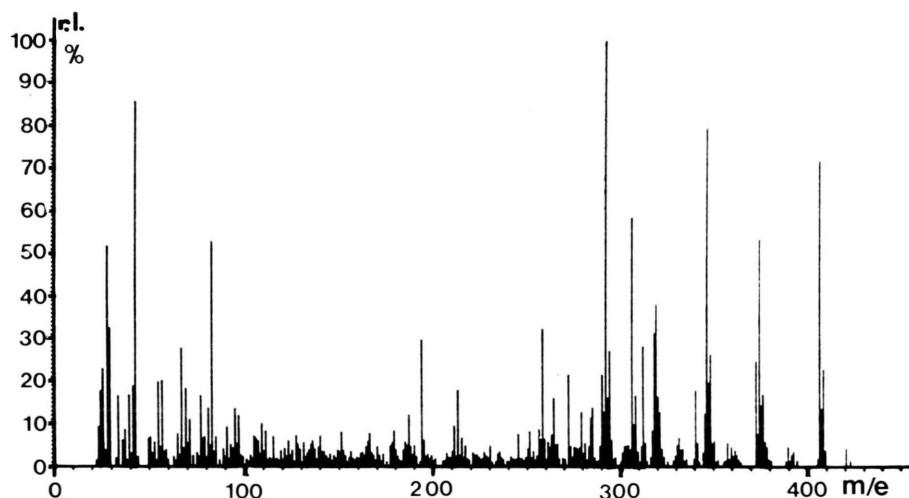


Fig. 5. EI-Massenspektrum von Komponente **6b** (230 °C, 70 eV).

- d) m/e 346/348 $C_{17}H_{12}O_6Cl$
- e) m/e 319/321 $C_{16}H_{13}O_5Cl$
- f) m/e 318/320 $C_{16}H_{12}O_5Cl$
- g) m/e 306/308 $C_{15}H_{12}O_5Cl$
- h) m/e 292/294 $C_{14}H_{10}O_5Cl$
- i) m/e 290/292 $C_{15}H_{12}O_4Cl$
- j) m/e 264/266 $C_{13}H_{10}O_4Cl$
- k) m/e 213/215 $C_9H_6O_4Cl$
- l) m/e 211/213 $C_9H_4O_4Cl$

Zusätzlich treten mit allerdings geringer Intensität die Fragmente a) bis k) der Komponente **6a** auf.

In den Intensitäten der Fragmentpaare a) bis l) von Komponente **6b** kommt das Verhältnis der natürlichen Chlorisotope ^{35}Cl und ^{37}Cl von 3:1 deutlich zum Ausdruck. Da wie erwähnt auch die Fragmente a) bis k) von Komponente **6a** im Massenspektrum von **6b** auftreten, liegt es nahe anzunehmen, daß **6b** ein chloriertes Derivat von **6a** darstellt. Die Fragmentpaare k) und l) von Komponente **6b** sind dem Oxonium-Ion des A-Teils zuzuordnen. Sie sind identisch mit den Fragmenten, welche Elix *et al.* [8] für das Oxonium-Ion des A-Teils von Pannarin ermittelten.

Weitere Informationen zur Struktur von Komponente **6b** erhielten wir aus dem 1H -NMR-Spektrum. Resonanzsignale liegen bei: $\delta = 10,26$, 9,68, 3,79, 2,22, 2,18 und 2,11 ppm. Das Singulett bei 10,26 ppm ist charakteristisch für das nur schwach abgeschirmte Proton der aromatischen Aldehydgruppe (Fig. 6). Die Höhe der Integrationslinie von 4 mm in diesem Bereich, die der darunterlie-

genden Fläche proportional ist, entspricht somit einem Proton. Lage sowie Breite des Singulett bei 9,68 ppm zeigen eine zur Aldehydgruppe orthoständige OH-Gruppe an, welche mit letzterer unter Ausbildung eines 5-Ringes teilweise chelatisiert. Das Singulett bei 3,79 ppm dokumentiert eine veresterte Methylgruppe; die Höhe der Integrationslinie entspricht deutlich drei Protonen. Die Höhe der für die drei Singulett bei 2,22, 2,18 und 2,11 ppm gemeinsamen Integrationslinie weist auf insgesamt 9 Protonen hin, die entsprechend der Lage der Signale drei aromatischen Methylgruppen zugehören. Nicht bestätigt wird im NMR-Spektrum die zur veresterten Methylgruppe orthoständige OH-Gruppe, obwohl diese aufgrund der massenspektroskopischen Befunde zu fordern ist. Wahrscheinlich ist das Proton dieser OH-Gruppe infolge des Austausches mit dem Lösungsmittel DMSO, welcher schneller abläuft als es der NMR-Zeitskala entspricht, nicht darstellbar.

Nach Vergleich aller spektroskopischen Daten schlagen wir als Struktur für Komponente **6a** Methylvirensat, für Komponente **6b** 5-Chlor Methylvirensat vor (Fig. 6). Diese beiden Flechtensstoffe stellen damit die depsidonanalogen Verbindungen zu Atranorin und Chloratranorin dar (Fig. 6).

Zur Kontrolle extrahierten und untersuchten wir das Depsidon Pannarin aus *Pannaria rubiginosa* (Thunb.) Del. Die erhaltenen spektroskopischen Daten dieses Depsidons stimmen mit den von

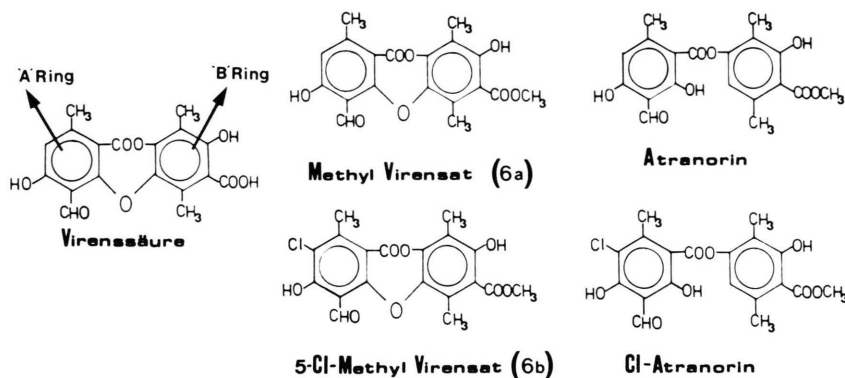


Fig. 6. Gegenüberstellung der Strukturformeln von Virensäure, Methylvirensat (**6 a**) und 5-Chlor Methylvirensat (**6 b**) (beide von Virensäure ableitbar), sowie Atranorin und Cl-Atranorin (den zu **6 a** und **6 b** analogen Depsiden).

Elix *et al.* [8] angegebenen vollkommen überein. Bei den dünnschichtchromatographischen Experimenten (Fließmittel C und E) zeigt Pannarin im Gegensatz zu 5-Chlor Methylvirensat ($R_f = 0,74$) einen etwas größeren R_f -Wert (0,78). Ferner entsteht bei Behandeln mit Schwefelsäure im Falle von Pannarin ein deutlich dunkelblauer Farbfleck, während 5-Chlor Methylvirensat schmutzig graubraun in Erscheinung tritt. Beiden Depsidonen gemeinsam ist jedoch die starke Fluoreszenz im kurzwelligen UV bei 366 nm.

Diese Arbeit wurde durch eine Forschungshilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Für Diskussionsbeiträge zum chemischen bzw. taxonomischen Teil der Arbeit danken wir Herrn Dr. W. Grahn (Fachbereich Chemie, Universität Marburg) und Herrn P. W. James (British Museum of Natural History, London).

Anmerkung der Verfasser: Wie uns nach Einreichen dieser Arbeit zum Druck bekannt wurde, ist die Isolierung und Strukturaufklärung von 5-Chlor Methylvirensat aus *Pseudocyphellaria physciospora* bereits 1977 von Maas *et al.* beschrieben worden (Canad. J. Chem. **55**, 2839 (1977)).

- [1] D. J. Galloway u. P. W. James, Lichenologist **9**, 95–105 (1977).
- [2] S. Huneck, J. Redon u. W. Quilhot, Hattori Bot. Lab. **37**, 539–562 (1973).
- [3] J. Poelt, Ber. dtsch. bot. Ges. N. F. **4**, 187–198 (1970).
- [4] F. A. Stafleu, Index Herbariorum Part I, Oosthoek, Scheltema u. Holkema publ., Utrecht 1974.
- [5] B. Renner u. E. Gerstner, Naturforsch. **33 c**, 440 (1978).
- [6] C. F. Culberson, Chromatogr. **72**, 113–125 (1972).
- [7] K. Aghoramurthy, K. G. Sarma u. T. R. Seshadri, Tetrahedron **12**, 173–177 (1961).
- [8] J. A. Elix, D. A. Jackmann u. M. V. Sargent, J. Chem. Soc. Chem. Commun. **1974**, 892.