

Untersuchung von Flechten-Inhaltsstoffen aus *Cetraria*-Herbarmaterial und eines Isländisch-Moos-Tees aus Island

ULRICH SCHIRMACHER & MANFRED HENZE

Zusammenfassung. Sekundäre Inhaltsstoffe aus Herbarmaterial von *Cetraria*-Arten sowie eines Tees aus Island werden mittels Hochleistungs-Dünnschichtchromatografie (HPTLC) aufgetrennt. In allen Proben werden *Anthrachinone* und rot fluoreszierende *Chlorophyll-Derivate* vorgefunden. Durch die für *Cetraria islandica* charakteristischen *Depsidone Fumar-* und *Protocetrarsäure* sowie die Fettsäure *Rocellsäure* werden zwei von drei Herbarproben sowie der Heil-Tee als *C. islandica* bestätigt. In diesen werden zudem Spuren von *Usninsäure* erkennbar. Eine weitere Flechte, die nach morphologischen Kriterien ebenfalls als *C. islandica* angesprochen wird, ist hinsichtlich der sekundären Inhaltsstoffe von diesen drei deutlich unterschieden. Es handelt sich um eine ökologische Rasse ohne dem *Fumar-/Protocetrarsäure*-Komplex. Sie hat das gleiche Stoffmuster wie die ebenfalls untersuchte *Cetraria aculeata*, in der keine *Depsidone*, jedoch die Fettsäure *Lichesterinsäure* vorliegt.

Einleitung. Isländisch Moos ist eine weit verbreitete Flechte, die als *Lichen islandicus* und *Muscus islandicus* in Apotheken vertrieben und wegen ihrer Heilwirkung im Deutschen Arzneibuch als DAB 9 geführt wird (STAHL & SCHILD 1981). Sie wurde schon frühzeitig als Tee verwendet gegen „hartnäckigen Husten, Auszehrung und Schwindzucht“ (MARZELL 1922; dort weitere volkstümliche Verwendungen). Die Droge wird heute noch als Muscilaginosum bei Husten und Gastroenteritiden angewandt (STAHL & SCHILD 1981). Die *Parmeliaceae Cetraria islandica* (L.) Ach. ist nicht die einzige ihrer Gattung: In Island beispielsweise sind mindestens 6 Arten bzw. Unterarten beschrieben (siehe Tabelle im Anhang). Schon FLÜCKIGER (1894) nennt Inhaltsstoffe wie die Zucker-Derivate *Lichenin* und *Dextrolichenin*, die Flechtensäuren *Cetrarsäure* und *Lichesterinsäure*, sowie *Chlorophyll*.

Problemstellung. In der vorliegenden Arbeit soll Herbarmaterial von *Cetraria islandica* aus Island und aus Deutschland (Schwarzwald) sowie ein kommerzieller Heil-Tee aus Island auf darin enthaltene sekundäre Inhaltsstoffe chromatografisch untersucht werden. Zum Vergleich wird auch *Cetraria aculeata* (Schreber) Fr. einbezogen. Als Referenzflechten werden in einem Versuch *Cladonia symphy carpia* (Flörke) Fr. und *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale eingesetzt.

Im Folgenden werden die Flechten-Inhaltsstoffe mit Aceton extrahiert und mittels hochauflösender Dünnschicht-Chromatografie (HPTLC = high performance thin layer chromatography) aufgetrennt. Die Flecken werden über ihre R_m -Werte* und Farben im sichtbarem und im UV-Licht angesprochen.

Material. Zum Vergleich steht das nachfolgend aufgelistete Flechtenmaterial zur Verfügung (Tabelle 1).

* R_m -Wert: Quotient aus Entfernung des Fleckenmittelpunktes vom Startpunkt und Entfernung der Fließmittelfront vom Startpunkt x 100

Tabelle 1: *Cetraria*-Untersuchungsmaterial, Vergleichsmaterial (*C. symphycarpia* und *Cetraria aculeata*) und Flechten-Tee; Nummerierung bzw. Bezeichnung der Extrakte (Diese werden auch für die Startflecken auf den Chromatogrammen verwendet.)



1) *Cetraria islandica*, Julur (Akureyri, Island) 30.06.2013, leg.: U. Schirmacher ②



2) *Cetraria islandica*, Fjallagrös, Firma heilsa (Reykjavik, Island), gekauft Juli 2013, leg.: U. Schirmacher ①



3) *Cetraria islandica*, Kaltenbronn (Schwarzwald, Deutschland) 24. 11.2013, leg.: U. Schirmacher



4) *Cetraria aculeata*, Traiser Steinberg bei Münzenberg (Wetterau, Deutschland), 24.11.2013, leg: M. Henze



5) *Cetraria islandica*, gerebelte Thalli (iceland moss Tee, Firma Íslenk hollusta, Island), 2012**

C.s.) *Cladonia symphycarpia* (Flörke) Fr.**
(Norstictinsäure, Atranorin)

F.c.) *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale (Protocetrarsäure)

** Das Originalmaterial von *Cladonia symphycarpia* wurde von D. Teuber (PLANTAGO, 35394 Gießen), der iceland moss Tee von S. und E. Golf (35444 Biebertal) zur Verfügung gestellt.

Methoden. Die Aufarbeitung erfolgt nach der zu Kurszwecken im Mittelhessischen Lichenologischen Arbeitskreis Gießen eingesetzten Vorschrift (HENZE 2013). Auf die Extraktion von 15 mg trockenes Material mit 0,3 ml Aceton folgt ein Zentrifugationsschritt. Die Extrakte werden auf hochauflösende Kieselgel-Dünnschichtplatten (HPTLC, 5 x 5 cm mit Fluoreszenzindikator 254 nm s; siehe auch SCHUMM 2002) auf 5 Startflecken aufgetragen. Die Reihenfolge der aufgetragenen Flechten-Extrakte ist in den Fotografien eingetragen. Die Chromatografie wird horizontal in eigens gebauten Kammern durchgeführt (M. Henze). Eluiert wird mit den Laufmitteln A (Toluol-Dioxan-Eisessig, 180:45:5), B' (Cyclohexan-methyl tert.-Butylether-Ameisensäure, 130:100:20) oder C (Toluol-Eisessig, 200:30) (siehe auch ORANGE & al. 2001).

Die fotografische Dokumentation der unbehandelten Dünnschichtplatten erfolgt im kurzwelligem (254 nm) und im langwelligem UV-Licht (365 nm), die der mit 10%iger Schwefelsäure und anschließender Erhitzung auf 110°C nachbehandelten Dünnschichtplatten geschieht im UV-Licht (365 nm). [Chromatografische Daten siehe ORANGE & al., 2001; HUNECK & YOSHIMURA 1996]

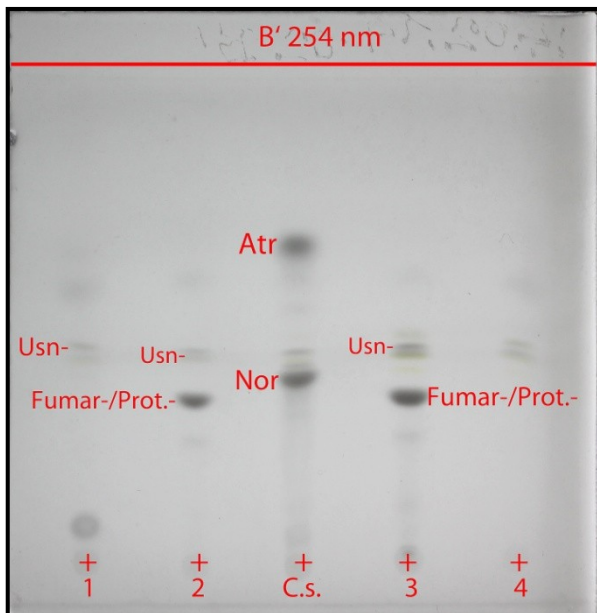


Abb. 1: Eindimensionale Trennung sekundärer Inhaltsstoffe auf Kieselgelmateriale mit Fluoreszenzindikator (254 nm) von *Cetraria*-Arten und *C. symphy carpia* (Vergleichsmaterial). Entwicklung mit dem Laufmittel B' (siehe Methoden) und Betrachtung unter kurzwelligem UV. Die Lage der Substanzen (Abkürzungen im Anhang) wird durch Fluoreszenzlöschung erkennbar.

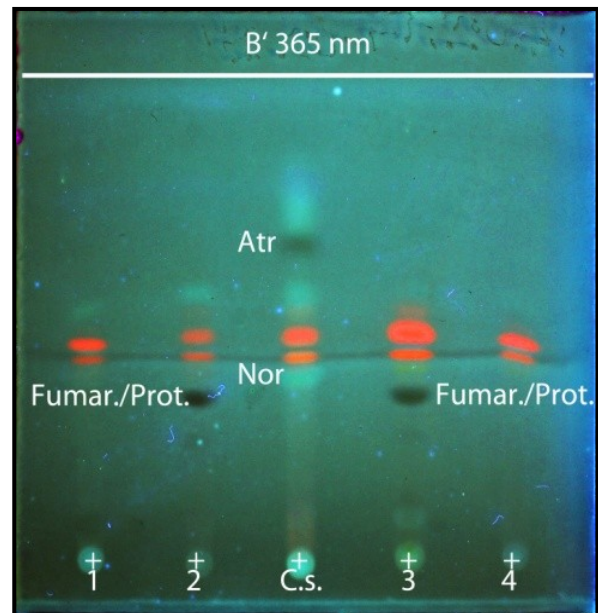


Abb. 2: Fluoreszierende sekundäre Inhaltsstoffe von *Cetraria*-Arten und *C. symphy carpia* (Vergleichsmaterial) derselben HPTLC von Abb. 1. Betrachtung unter langwelligem UV. Die Substanzen (Abkürzungen im Anhang) mit Eigen-Fluoreszenz werden erkennbar.

Ergebnisse und Diskussion. Um zu klären, ob das *C. islandica*-Material zutreffend bestimmt ist, werden die Fleckenmuster der Extrakte auf Übereinstimmungen hinsichtlich bekannter Substanzen überprüft. Dazu werden die Extrakte hochauflösender Chromatografie (HPTLC) unterzogen und die Laufstrecken der Substanzflecken mit aus der Literatur bekannten Werten (Rm-Werte: ORANGE & al. 2001) verglichen. Das Ergebnis dieses Vergleichs (hier nicht detailliert) führt zur Substanz-Bezeichnung, die in die Fotografien eingetragen wird.

Um die Identität der als „*Cetraria islandica*“ bezeichneten Proben sicherzustellen, werden auf drei hochauflösenden Dünnschichtchromatogrammen (HPTLCs) die Extrakte 1, 2, C.s., 3 und 4 (von links nach rechts) aufgetragen und mit A, B' oder C eluiert. Hier werden nur die mit dem Laufmittel B' entwickelten Dünnschichten abgebildet, da diese die Ergebnisse klar belegen. Zunächst wird im kurzwelligen UV (254 nm) fotografiert (Abbildung 1), anschließend im langwelligen UV-Licht (365 nm) (Abb. 2).

Im kurzwelligen UV werden durch Fluoreszenzlöschung dunkle Flecken sichtbar: die Referenz-Substanzen *Norstictinsäure* und *Atranorin* aus *Cladonia symphy carpia*, sowie *Fumarprotocetrarsäure* und *Protocetrarsäure* in den Extrakten 2 und 3. Letztere überlagern sich wegen ihrer recht ähnlichen Laufeigenschaften, werden daher im Folgenden als Komplex *Fumarsäure/Protocetrarsäure* bezeichnet. Dieser Komplex, kommt nicht in den Extrakten 1 und 4 vor. *Usninsäure* ist als schwacher, manchmal grüner Fleck in allen Extrakten sichtbar. (Abkürzungen s.u.)

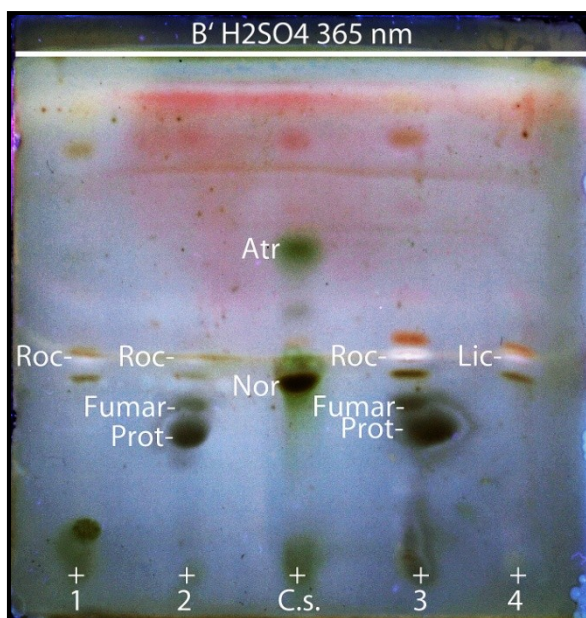


Abb. 3: Sekundäre Inhaltsstoffe von *Cetraria*-Arten und *C. symphy carpia* (Vergleichsmaterial) auf derselben HPTLC wie in Abb. 1 bzw. 2 nach Tauchen in Schwefelsäure und Hitzebehandlung sowie anschließender Betrachtung bei 365 nm. Die Fettsäuren *Rocell*- und *Lichesterinsäure* sind als opake Flecken (Abkürzungen im Anhang) sichtbar.

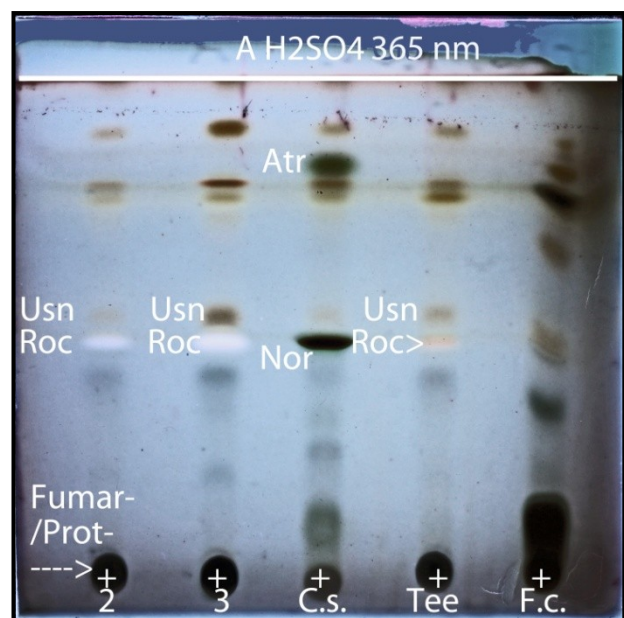


Abb. 4: Sekundäre Inhaltsstoffe der Flechten in einem Tee (iceland moss Tee, 5), von *Cetraria*-Arten (2, 3) sowie von *C. symphy carpia* und *F. caperata* (Vergleichsmaterial) aufgetrennt auf einer HPTLC, die schwefelsäurebehandelt, erhitzt und bei 365 nm fotografiert wird. Im Heil-Tee (Tee, 5) treten *Fumarprotocetrarsäure* und *Protocetrarsäure* als dunkle Flecken, *Usninsäure* als graugrünlichgrauer Fleck und die Fettsäure *Rocell*säure als opaker Fleck auf. (Abkürzungen im Anhang).

Im langwelligen UV sind die dunklen Flecken ebenfalls sichtbar. Es kommen fluoreszierende hinzu, u.a. rote *Chlorophyll-Derivate* (Abb. 2).

Werden die HPTLCs in 10% Schwefelsäure getaucht und dann bei 110°C erhitzt, so entstehen oftmals farbige Reaktionsprodukte, die im sichtbaren Licht erkennbar und zur weiteren Identifizierung hinzugezogen werden können. Bei Anregung mit UV-Licht (365 nm) ergibt sich der Aspekt der folgenden Abbildung. (Abb. 3)

Die milchig-weißen Flecken sind Fettsäuren: Im Fall der *C. islandica*-Extrakte (1, 2, 3) handelt es sich um die Fettsäure *Rocellsäure*. Im Fall des *C. aculeata*-Extrakts (4) muß *Lichesterinsäure* vorliegen. Wegen der nur geringfügig unterschiedlichen Rm-Werte dieser beiden Fettsäuren, können diese hier nur im Kontext mit Literaturangaben auseinandergehalten werden. Diese belegen, dass in *C. aculeata* die *Rocellsäure* durch *Lichesterinsäure* ersetzt ist (siehe Tabelle im Anhang).

Fumarprotocetrarsäure und *Protocetrarsäure*, die meistens als überdeckende Flecken entwickelt werden (Abb. 1 und 2; *Fumar-/Protocetrarsäure*-Komplex), sind nach Schwefelsäurebehandlung klar als zwei getrennte Flecken auszumachen (Abb. 3). Diese *Depsidone* treten in den *C. islandica*-Extrakten 2 und 3, nicht aber im *C. islandica*- 1 und *C. aculeata*-Extrakt 4 auf.

Aufgrund des fehlenden *Fumar-/Protocetrarsäure*-Komplexes in Extrakt 1 [*Cetraria islandica*, Julur (Akureyri, Island)], der hierin dem Extrakt 4 [*Cetraria aculeata*] gleicht, dürfte es sich bei Extrakt 1 um eine Unter-Art von *C. islandica* handeln.

Ein weiterer Versuch ist der Untersuchung des Heil-Tees 5 gewidmet, mit der Frage, ob in diesem tatsächlich *Cetraria islandica* enthalten ist. Aufgetragen werden daher im Folgenden zwei als *C. islandica* ausgewiesene Proben 2 und 3 sowie die Extrakte der Referenzflechten C.s. und F.c. (*C. symphyocarpia* bzw. *F. caperata*). (Abb. 4) Hier ist ausschließlich eine schwefelsäurebehandelte Dünnschichtplatte dargestellt, die fotografisch im Licht einer UV-Lampe (365 nm) wiedergegeben wird (Abb. 5)

Die schwefelsäurebehandelte und nacherhitzte HPTLC läßt den *Fumar-/Protocetrarsäure*-Komplex sowie *Rocellsäure* in den beiden *C. islandica*-Extrakten aber auch in dem Heil-Tee 5 im UV-Licht (Abb. 4) erkennen. Damit wird *C. islandica* als Komponente des Tees bestätigt.

Meist rotbraun gefärbte Substanzen, die z.T. wenig unterhalb von *Atranorin* oder oberhalb von diesem wandern (Abb. 4), bedürfen gesonderter Identifizierung. Es mag sich dabei um die von BOUSTIE & al. (2011) sowie STEPANENKO & al. (2002) beschriebenen *Anthrachinone* („Red-Quinone-like“ substances bzw. dem „*Islandoquinone*“) handeln.

In dieser Untersuchung konnte das Herbarmaterial der Firma heilsa, Island, (2), als auch das aus dem Schwarzwald, Deutschland, (3), sowie der Heil-Tee der Fa. Islensk hollusta, Island, (5), durch die Akkumulation der sekundären Inhaltsstoffe *Fumar-/Protocetrarsäure*, *Rocellsäure* als *Cetraria islandica* bestätigt werden. Spuren von *Anthrachinonen*, *Chlorophyllen* sowie *Usninsäure* sind ebenfalls detektierbar. Der Extrakt aus *Cetraria aculeata* (4) zeigt deutliche Übereinstimmungen mit dem Extrakt des *Cetraria*-Thallus [1 Akureyri, Island] hinsichtlich des Fehlens der *Depsidone* *Fumar-* und *Protocetrarsäure* und des Vorkommens der Fettsäure *Rocellsäure*. Es handelt sich um eine ökologische Rasse, wie sie KRISTINSSON (1969) beschreibt. Aufgrund morphologischer Ähnlichkeit (u.a. kräuselige Thallusstruktur) handelt es sich um *C. islandica* ssp. *crispiformis* (Räs.) Kärnefelt (mündl. U. Kirschbaum). Das Fehlen der *Depsidone* bestätigt die Unterart, für die hier erstmals chemische Marker aufgezeigt werden.

Danksagung. Wir danken E. und S. Golf, Biebertal, für die Überlassung eines *C. islandica*-Tees aus Island und Ulrich Kirschbaum, Wismar, für die Nachbestimmung der *Fumar-/Protocetrarsäure*-defizienten *C. islandica*.

Literatur

- BOUSTIE, J., TOMASI, S. & GRUBE, M. 2011. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source, *Phytochem. Rev.* 10: 287-307.
- FLÜCKIGER, F. A. 1894. *Pharmacognosie*, R. Gaertner's Verlagbuchhandlung, Hermann Heyfelder SW, Schönefelderstraße.
- HENZE, M. 2013. *Flechtenstoffe - Identifizierung mittels HPTLC*.
- HUNECK, S. & YOSHIMURA, I. 1996. *Identification of Lichen Substances*, Springer Vg., Berlin-Heidelberg-New York.
- KRISTINSSON, H. 1969. Chemical and morphological variation in the *Cetraria islandica* complex in Iceland. *Bryologist* 72(3): 344-357.
- MARZELL, H. & WAGNER C. A. 1992. Buchdruckerei A.-G., Freiburg in Baden.
- ORANGE, A., P., JAMES W. & WHITE, F. J. 2001. *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*, British Lichen Society.
- SCHUMM, F., 2002. Dünnschichtchromatogramme – Auch für den Amateur möglich. *Aktuelle Lichenologische Mitteilungen*, Neue Folge Nr. 9, 8-22.
- STAHL, E. & SCHILD, W. 1981. *Pharmazeutische Biologie*, 4 Drogenanalysen: Inhaltsstoffe und Isolierungen, Gustav Fischer, Stuttgart-New York.
- STEPANENKO, L. S., KRIVOSHCHEKOVA O. E. & SKIRINA I. F. 2002. Functions of phenolic secondary metabolites in lichens from far east Russia, *Symbiosis* 32: 119-131.

Abkürzungen:

Atr = Atranorin

Fumar. = Fumarprotocetrarsäure HPTLC = high performance thin layer chromatography

Lic = Lichesterinsäure

Nor = Norstictinsäure

PCR = Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion

Prot. = Protocetrarsäure

Roc = Rocellsäure

Usn = Usninsäure

ULRICH SCHIRMACHER
Herrengut 15
76532 Baden Baden
Deutschland
ulrich_schirmacher@web.de

MANFRED HENZE
Tannenweg 45
35440 Linden
Deutschland
manfred.henze@gen.bio.uni-giessen.de