



Nachweis eines Fringelit-Typ Farbstoffs in fossilen Seelilien der Art *Chelocrinus carnalli* mittels LR- und HR-ESI-MS, ESI-MS/MS und LDI-TOF-MS

Klaus Wolkenstein¹⁾, Jürgen H. Gross²⁾, Sabine Giesa³⁾ und Heinz F. Schöler¹⁾

¹⁾ Institut für Umwelt-Geochemie der Universität, Im Neuenheimer Feld 236, D-69120 Heidelberg

²⁾ Organisch-Chemisches Institut der Universität, Im Neuenheimer Feld 270, D-69120 Heidelberg

³⁾ Institut für Analytische Chemie der Universität, Linnéstraße 3, D-04103 Leipzig

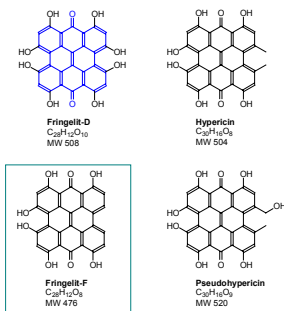


Interesse geweckt.....

In den vor 235–240 Millionen Jahren gebildeten Sedimenten des Unteren Muschelkalks lassen sich fossile Seelilien [1–3] der Art *Chelocrinus carnalli* finden (Freyburg/Unstrut, Deutschland), die eine deutliche violett-braune Färbung aufweisen (Abb. rechts). Basierend auf den Arbeiten Blumers [4–10], der aus 140–150 Millionen Jahren alten Seelilien der Gattung *Millerocrinus* Farbstoffe isolierte, die er *Fringelite* nannte [4], darf man Farbstoffe des Fringelit-Typs in zahlreichen Fossilien erwarten [11]. Jedenfalls kommen ähnliche Farbstoffe auch in den heute lebenden Seelilien vor. Seelilien (*Crinoiden*) gehören wie Seeigel und Seesterne zum Tierstamm der Stachelhäuter (*Echinodermen*) [1].

Strukturen.....

Fringelite ebenso wie Hypericin-derivate aus dem Johanniskraut, (*Hypericum perforatum*) gehören in die Gruppe der Phenanthroperylenchinone, deren Grundkörper auch als meso-Naphthodithion bezeichnet wird.



Chelocrinus carnalli.....



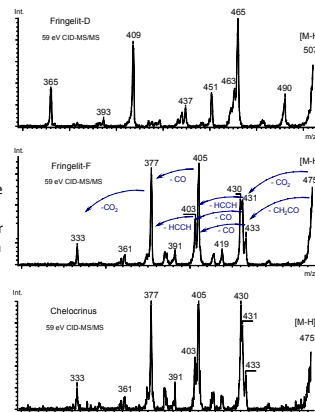
Krone von *Chelocrinus carnalli* mit ausgebreiteten Armen ohne Stiel. Institut für Geo- und Paläontologie der Univ. Heidelberg. Abb. annähernd natürliche Größe.

Vorgehensweise.....

Der Farbstoff aus gefärbten Teilen des fossilen *Chelocrinus*-Kalkgerüsts kann nach Auflösen des Kalksteins mit Salzsäure durch Extraktion des Rückstands mit organischen Lösungsmitteln angereichert werden. Dabei zeigt der Farbstoff eine extrem geringe Löslichkeit in gängigen organischen Lösungsmitteln. Aus 1 g fossilen Materials aus dem Stiel der Seelilie läßt sich ca. 1 ml von $< 10^{-5}$ M Farbstofflösung erhalten. Zur Analyse der leicht violett-braunen Lösungen bieten sich daher neben der UV-VIS-Spektroskopie noch die LDI-TOF-MS und die ESI-MS an. Lösungen des Farbstoffs in Tetrahydrofuran, Ethanol und Acetonitril ergaben konsistente Resultate im negativ-Ionen ESI-MS. Die Optimierung der ESI-MS mit Hypericin- und Pseudohypericin-Standard erlaubt schließlich MS/MS und HR-ESI-Messungen. Die Konstitution von Fringelit-F und Pseudohypericin sind durch synthetische Arbeiten abgesichert [12,13]. Auch liegen negativ-ionen ESI-MS/MS-Spektren der Hypericine als Referenz vor [14].

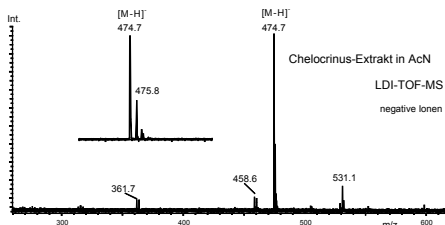
ESI-MS/MS.....

Es fällt auf, daß mit 59 eV eine relativ hohe Stoßenergie benötigt wird, um überhaupt eine nennenswerte Fragmentierung der Ionen zu erreichen. Kleinere Fragmentationen werden nicht mehr beobachtet. Schon hier zeigt sich die große Stabilität des Grundgerüsts. Auch bei den ESI-MS/MS-Spektren der [M-H]⁻-Ionen von *Chelocrinus*-Extrakt und Fringelit-F besteht eine sehr gute Übereinstimmung. Abgesehen von der natürlich unterschiedlichen Vorläufermasse zeigen ähnliche Verbindungen wie z.B. Fringelit-D auch ein klar anderes Fragmentierungsverhalten. Die Fragmentierungen lassen sich durch Tautomerie und Gerüstumlagerung vor der Eliminierung von Keten, CO, Ethin und CO₂ plausibel erklären [14]. Ein Beweis für die postulierten Zerfallsreaktionen steht noch aus, ist aber nicht das vorrangige Ziel dieser Untersuchungen.



Screening mit LDI-TOF-MS.....

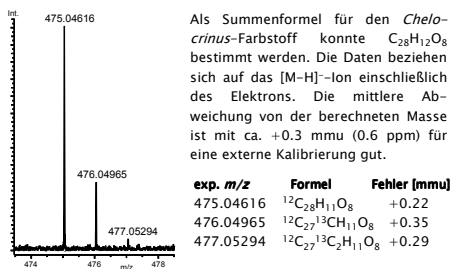
Die LDI-TOF-MS wurde vor allem zu Beginn des Projekts zum Screening auf die Anwesenheit photoaktiver organischer Verbindungen eingesetzt. Ein Signal, das aus dem Extrakt von *Chelocrinus carnalli* im negativ-Ionen Modus bei m/z 475 reproduzierbar erhalten werden konnte, führte auf die richtige Spur. Diese Komponente des Extrakts lag in erstaunlich hohem Reinheitsgrad vor.



TOF-MS experimentell.....

Die LDI-TOF-Messungen wurden an einem Bruker Biflex TOF-Massenspektrometer mit Pulsed Ion Extraction im Reflektor-Modus durchgeführt. Es wurden Spektren im positiv- und negativ-Ionen Modus aufgenommen. Die Extrakte wurden dazu auf einen verschroten Probenträger aufgetragen und mit nur wenig abgeschwächtem UV-Laser bestrahlt.

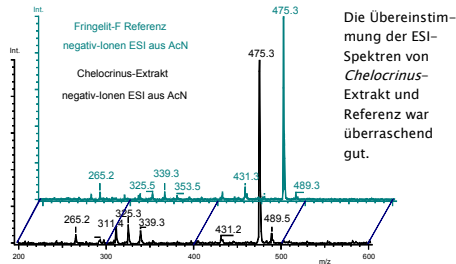
ESI-FTICR-MS.....



FTICR-MS experimentell.....

Die HR-ESI-Messungen wurden an einem Bruker APEX II FTICR-Massenspektrometer mit einem 7 Tesla Magneten vorgenommen. Für den Bereich m/z 200–3500 wurden 256 k Datenpunkte in 0.2359 s/Scan aufgenommen und 30–40 Scans akkumuliert. Die RF-Amplitude betrug 400 Hz. Die ESI-Bedingungen waren vom TSQ700 problemlos auf die Analytica ESI-Quelle übertragbar. Die Temperatur des Trockengases war 100 °C, der N_2 -Strom wurde dafür optimiert.

ESI-MS.....



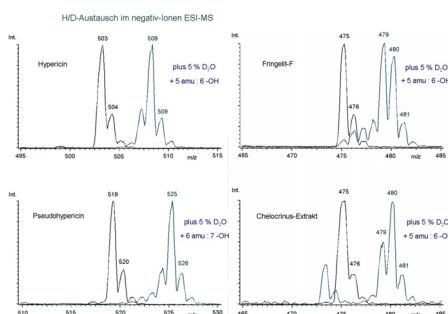
LR-ESI-MS und ESI-MS/MS experimentell.....

Für LR-ESI-MS und ESI-MS/MS wurde ein Finnigan TSQ700 Triplequadrupol-Massenspektrometer eingesetzt. Die Extrakte in DMSO:MeOH = 1:4, Ethanol, Acetonitril oder THF wurden mit einer Spritzenpumpe bei 2–4 μ l/min in die fused Silica-Spraykapillare dosiert. Bei Sprayspannungen von 4,7–5,3 kV wurde der Spray mit 35–40 psi Stickstoff unterstützt. Die Desolvationskapillare war auf 150–200 °C beheizt. Die Spektren wurden durch Mittelung von 10–20 Scans bei 10 s/Scan von m/z 50–1000 erhalten. Für MS/MS-Messungen wurde Argon mit 0,9 mtorr in der Stoßkammer bei einem Collision-Offset von 59 V eingesetzt. Zur Verstärkung der Signale im negativ-Ionen Modus um eine Größenordnung konnten 3 % Piperidin zugesetzt werden.

Lesevergnügen.....

- [1] G. Glodowski, <http://senckenberg.uni-frankfurt.de/expo/9605.htm>.
- [2] H.-J. Peter, <http://www.uni-muenster.de/Rektorat/museum/d2mugsm4.htm>.
- [3] H. Hagdorn in *Trias – Eine ganz andere Welt*, Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, 1999, S. 321–330.
- [4] M. Blumer, *Mikrochemie* **36/37**, 1048–1055 (1951).
- [5] M. Blumer, *Nature* **188**, 1100–1101 (1960).
- [6] M. Blumer, *Geochim. Cosmochim. Acta* **26**, 225–227 (1962).
- [7] M. Blumer, *Geochim. Cosmochim. Acta* **26**, 228–230 (1962).
- [8] D. W. Thomas, M. Blumer, *Geochim. Cosmochim. Acta* **28**, 1467–1477 (1964).
- [9] M. Blumer, *Science* **149**, 722–726 (1965).
- [10] M. Blumer, *Sci. Am.* **234(3)**, 34–45 (1976).
- [11] H. Falk, *Angew. Chem.* **111**, 3306–3326 (1999).
- [12] D. W. Cameron, W. D. Raverty, *Aust. J. Chem.* **29**, 1523–1533 (1976).
- [13] G. Rodewald, R. Arnold, J. Griesler, W. Steglich, *Angew. Chem.* **89**, 56–57 (1977).
- [14] G. Piperopoulos, R. Lotz, A. Wixforth, T. Schmierer, K.-P. Zeller, *J. Chromatogr. B* **695**, 309–316 (1997).

H/D-Austausch im ESI-MS.....



Der H/D-Austausch erlaubt die Bestimmung der Anzahl acider H-Atome und damit der im Molekül vorhandenen OH-Gruppen auf effektive Weise. Beim H/D-Austausch wurden 5 % D₂O zugegeben und ohne Base oder mit Pyridin gearbeitet. Auch wenn eine quantitative Verschiebung des Signals um den theoretischen Wert nicht erreicht werden konnte, so ist der erzielte Effekt doch für den Zweck ausreichend. Auch von den deuterierten Vorläufern wurden MS/MS-Spektren verglichen: sie sind ebenfalls identisch.

Essenz.....

Nach der Extraktion des Farbstoffs aus der fossilen Seelilie konnte dieser zunächst als organisches Pigment identifiziert werden. Hinweise auf den Fringelit-Typ u.a. aus UV/VIS-Spektren und LDI-TOF-MS führten zu einer optimierten Isolierung aus dem Fossil. So wurden ESI-MS, die Bestimmung der Summenformel $C_{28}H_{12}O_8$ mittels ESI-FTICR-MS und MS/MS-Experimente möglich. Der H/D-Austausch erlaubte eine Bestimmung der Zahl der OH-Gruppen und die Eingrenzung auf die Isomeren von Fringelit-F. Dank eines synthetischen Fringelit-F Standards konnte dieser eindeutig als der fossile Farbstoff in *Chelocrinus carnalli* charakterisiert werden. Neben den MS-Daten hoffen wir auch NMR-Spektren nach einer weiteren Anreicherung zu erhalten.

Dank an.....

Herrn Dr. N. Hauschke (Universität Halle) sind wir für die fossilen Proben von *Chelocrinus carnalli*, Herrn Prof. H. Falk (Universität Linz) für die Probe des synthetischen Fringelit-D, Herrn Dr. M. Diehm (Phytoplan, Heidelberg) für die Hypericin- und Pseudohypericin-Standards und Herrn Prof. W. Steglich (LMU, München) für die großzügige Überlassung der synthetischen Fringelit-F Referenz zu großem Dank verpflichtet.