

**Yasuhiko ASAHINA\* and Mariko NUNO\*: Note on the chromatogram of thamnolic acid and the use of Barton-Evans-Gardner's reagent for spot-detecting means**

朝比奈泰彦\*・布 万里子： タムノール酸のクロマトグラム、  
附 Barton-Evans-Gardner の試薬

1893 Zopf found in *Thamnolia vermicularis* thamnolic acid only, so that one might expect only one spot in the chromatogram of *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Schaer. emend. Y. Asahina.<sup>1)</sup> In reality acetone-extracts of almost all *Th. vermicularis* specimens give two distinct spots. For example a thin layer chromatogram of acetone extract of the specimens obtained by developing with butanol: acetone: water = 5:1:2 gave two spots. The lower one ( $R_f \approx 0.42$ ) is of thamnolic acid itself and the upper one ( $R_f \approx 0.67$ ) is, as we have proved by the comparison with authentic substance,<sup>2)</sup> due to decarboxythamnolic acid.

Many lichen species containing thamnolic acid (cf. 1-13, Fig. 1) behave themselves just the same as *Th. vermicularis*.

The occurrence of decarboxythamnolic acid, which is inconstant in some individuals except *Th. vermicularis*, may be attributed to a secondary origin (e.g. effect of weathering etc.), because any lichen depside must have at least a free carboxyl group in

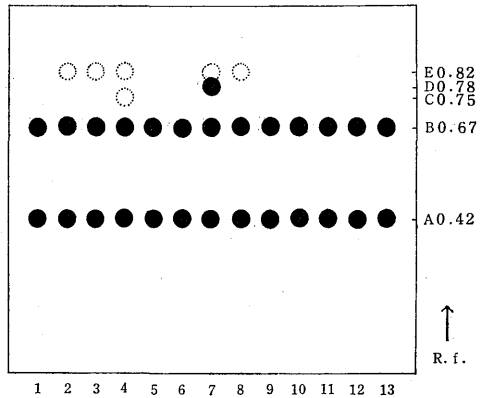


Fig. 1. Schematic figures of chromatograms of Lichen specimens containing thamnolic acid. 1). *Th. vermicularis* 2). *Us. koyana* 3). *Us. comosa* subsp. *colorans* 4). *Hem. ventosum* (Europe) 5). *Cl. digitata* 6). *Cl. theiophila* 7). *Cl. metacorallifera* v. *reagens* 8). *Cl. hitatiensis* 9). *Cl. subsquamosa* 10) *Cl. carassensis* 11). *Cl. pseudohondoensis* 12). *Cl. chondrotypha* 13). *Cl. delicata*. A: thamnolic acid; B: decarboxythamnolic acid; C: divaricatic acid; D: didymic acid; E: usnic acid.

●: bluish by B.E.G.-reagent, ○: reddish violet by B.E.G.-reagent. Developing solvent: BuOH-Acetone-H<sub>2</sub>O (5:1:2); substratum: Silicagel-G (Merck); B.E.G.-reagent (1% FeCl<sub>3</sub>+1% K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>).

\* Research Institute for Natural Resources, Shinjuku, Tokyo, Japan. 資源科学研究所.

1) Journ. Japan. Bot. **13**: 316. 1937.

2) Asahina, Shibata: Chemistry of Lichen Substances. 1954, p. 106.

the A portion.<sup>3)</sup>

In this connection we have studied the use of Barton-Evans-Gardner's reagent<sup>4)</sup> as the spot detecting means. This reagent is a mixture of equal volumes of 1% ferric chloride and potassium ferricyanide solutions prepared on demand.

According to the above mentioned authors this reagent, applied on a chromatographed substratum, "gives an instantaneous deep blue spot similar to Turnbull's blue with all phenols thus far tested. A permanent record is secured by washing the paper with dilute hydrochloric acid followed by water." This color reaction may be explained by the formation of iron phenol complex and at the same time a partial reduction of ferric to ferrous ions, which then gives the Turnbull's blue. As a large number of lichen substances are phenol derivatives, this reagent may be advantageously utilized in the lichenology.

At first we have reexamined the paper partition chromatography of catechol, gallic acid, hydroquinone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -naphthol, phloroglucinol, pyrogallol, resorcinol and vanillin, which was tested by Barton et alia. Using water saturated with CO<sub>2</sub> as developing solvent and ferric chloride + ferricyanide solution as spot detecting agent, we confirmed the formation of blue coloured spots. By the way we have found that more distinct spots are obtained by spraying first with ferricyanide solution alone and then with alcoholic ferric chloride solution. Among 3 isomeric monohydroxy-benzoic acids, which were tested in parallel, the spot of salicylic acid (o-hydroxy-benzoic acid) was coloured reddish violet, whereas those of m- and p-hydroxy-benzoic acids are coloured pale sordid ochraceous. This diversity of salicylic acid may be explained by its ortho-standing hydroxy-group, which has the tendency to the chelation, so that it gives a more stable iron complex salt than those of ordinary phenols. Also by the thin layer chromatography developed on the silicagel substratum the above mentioned substances gave just the same results.

As a larger number of lichen acids belong to o-hydroxy-carboxylic acid, it may be expected that the spot color of their chromatograms detected by the use of B.E.G. reagent are reddish violet.

In fact following lichen acids fulfilled the above expectation: alectoronic

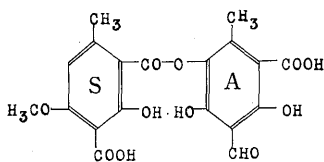
---

3) Asahina, Shibata: Chemistry of Lichen Substances, 1954, p. 54.

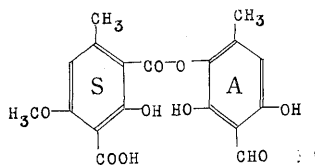
4) G.M. Barton, R.S. Evans and J.A.F. Gardner: Nature, August 9, 1952.

acid, anziaic acid, atranorin, baeomycesic acid, barbatic acid, barbatolic acid,  $\alpha$ -collatolic acid, dendroidin, diffractaic acid, divaricatic acid, endocrocin, evernic acid, erythrin, fumarprotocetraric acid, galbinic acid, gyrophoric acid, grayanic acid, hyascic acid, homosekikaic acid\*, lecanoric acid, lobaric acid, loxodic acid, lichexanthone, norstictic acid, olivetoric acid, microphyllic acid, perlatolic acid, physodic acid, physodalic acid, protocetraric acid, psoromic acid, salacinic acid, sekikaic acid\*, squamatic acid, stictic acid, tenuiorin, and usnic acid.

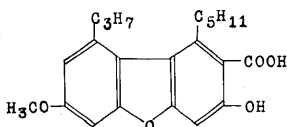
In the thin layer chromatography lichen acids marked with \* give ambiguous spots (partly blue, partly reddish) by the reagent of Barton et alia.



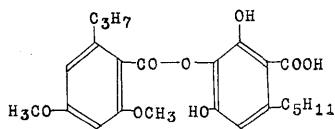
Thamnolic acid



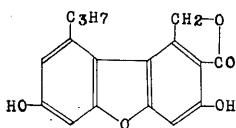
Decarboxythamnolic acid



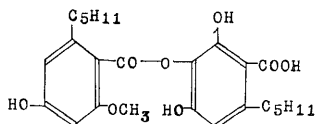
Didymic acid



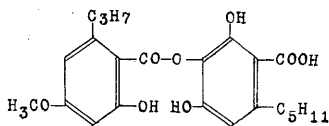
merochlorophaeic acid <sup>5)</sup>



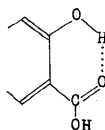
Strepsillin



Cryptochlorophaeic acid <sup>6)</sup>



Ramalinolic acid



Chelation by the hydrogen bond

5) 6) Private communication of Prof. S. Shibata.

On the other hand chromatograms of the following lichen acids are colored blue by the reagent of Barton et alia: thamnolic acid, hypothamnolic acid, ramalinolic acid, cryptochlorophaeic acid, merochlorophaeic acid, didymic acid, strepsilin, an unknown substance associated with lichexanthone in *Parmelia formosana* and an unknown substance associated with physodic acid in *Parmelia physodes*; *Parmelia furfuracea* etc.

As from the structure of either thamnolic or of hypothamnolic or of ramalinolic acid may be seen, these acids possess beside the o-hydroxycarboxylic acid group susceptible to the chelate formation, there is one more hydroxy group in each molecule, which gives rise to a blue coloured iron complex compound. In the case of didymic acid perhaps the amyl side chain may hinder the approach of carboxylic group to the o-hydroxy group and prevents the chelation, so that it behaves itself like a free phenolic group. The carboxyl group of strepsilin forms from the beginning a lactone and gives little influence on the neighbouring hydroxyl.

#### 摘 要

ムシゴケ *Thamnolia vermicularis* は Zopf の研究でタムノール酸のみを含むことになっているが多数の標本のクロマトグラムを作ってみると常に 2ヶ所にスポットが現われることに気がついた。その内 Rf 0.42 のものはタムノール酸自身によるものであるが上の方の Rf 0.67 のスポットはデカルボタムノール酸であることが判明した。タムノール酸を含有する他属の地衣にも同一現象が見られる (Fig. 1, 2-13 参照) が標本によっては Rf 0.42 のみを与えるものもある。元来地衣中に出現するデプシド類は S 部と A 部から成り A 部には遊離の COOH を有するのが原則であるからここに問題となったデカルボタムノール酸は始めに生成したタムノール酸から風化作用によって CO<sub>2</sub> を失ったものであろう。又上記の実験に関連して Barton-Evans-Gardner 試薬をクロマトグラムのスポット検出に使用してみた。この試薬は過クロール鉄とフェリシヤン加里の混合液で単一フェノール類に遭遇すると藍色を呈すると称せられて居る。所がサリチル酸の様にオルト・オキシ・カルボン酸では其スポットは赤紫色で藍色を呈しない。これは互に隣接する OH と COOH とが Chelation をなし特殊の鉄錯塩を構成する為と解釈される。従って多数の地衣酸のクロマトグラムをこの試薬で処理した所少数の例外を除き殆どすべてが赤紫色のスポットを与える。この例外に入る地衣酸はタムノール酸、ヒポタムノール酸、ラマリノール酸、ヂヂム酸、ストレプジリン、クリプトクロロフェア酸、メロクロロフェア酸および一二的構造不明の物質であるが、これ等一群の物質の内その構造の知られているものでは或種のものにはチェレーションに関与するオルトオキシ基の

外に今一つの OH があるし又チヂム酸では OH は一箇であるが隣接する  $C_6H_{11}$  基の為に COOH が OH に近接するのを妨害されているものと解釈され、又ストレブジリンでは COOH は始からラクトン環を形成し隣りの OH に影響を与えることは極めて僅小である為と想像される。

○ミカン科における先行倍数性の可能性 (前川文夫) Fumio MAEKAWA: Probable major polyploidy in Rutaceae.

ミカン科は独特の油点を持つ点で特異な存在であるが、一方ほとんど分離する蒴果 (たとえばコクサギ) を結ぶ点や、コクサギ型の移行型葉序を持つ点では旧態を温存している。その染色体数は科の中では、半数で 9 かその 2 倍の 18 が多い。これは一見 9 を基本数とするかにみえる。Smith-White 氏が、豪洲産の数科の染色体数と分類とを論じた論文で、この科にふれたときにも (Gold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology 24: 275-276, 1956), 9 を基本と考え、これから一方へは減数して  $\rightarrow 8 \rightarrow 7$  となり、一方へは centromere の増加による増数を考えて  $\rightarrow 11 \rightarrow 12$  と増加したものが古くにでき、これらに倍数化が惹き起されたのが中新世以前で、これが generic ploidy に当るとした。それから改めて減数や増数が起こり、再び中新世以後にこの新しい減数化や増数化の上に、次の倍数化が生じて specific ploidy となったとする。倍数化と減数化とがくりかえし交代して生起するとの見解は、私のいう進化の二段階に当るもので、期せずして一致したのは大変興味があるが、氏をしてここまで持って来させたものは、この科の中の豪洲特産の連 (Boroniae) に、次表で示すような見事な逐次的な一連番号ともいえる染色体数であったと思われる。

表 1 今までに染色体数のわかった Trib. Boroniae の属  
(from Smith-White)

n	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	28	32	36
属の数	2	2	10	—	5	1	2	12	—	16	1	10	2	—	2	3	5

よくみるとその中で 10 と 15 とが欠けていることについては Smith-White 氏もかく触れている。

ところで私にはこの欠け方が大変暗示的である。10 と 15 と今一つ 20 と合わせると、これは多心皮類で明らかにした、5—10—15—20 の先行倍数性に当りはしないかという暗示である。それぞれ 10 や 15 や 20 から減数が起こっているとみられるからであり、こういう数の組合せは偶然としては余りに著るしいから、先行倍数性の示す数を持つ属は、すでに減数して減びてしまったのであると考えたい。