

**Phenanthroperylenechinon-Pigmente in fossilen Crinoiden:  
Charakterisierung, Vorkommen und Diagenese**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Geologe Klaus Wolkenstein

aus Heidelberg

2005



Gutachter: Prof. Dr. Heinz Friedrich Schöler  
Prof. Dr. Heinz Falk

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2005



## Vorwort

Fossile Seelilien in der Sammlung des Geologisch-Paläontologischen Instituts der Universität Heidelberg mit einer auffallenden violetten Färbung bildeten den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Die Frage nach der Natur solcher Fossilfärbungen führte dann über Recherchearbeiten zu grundlegenden Untersuchungen von Dr. Max Blumer, durch die mein Interesse weiter bestärkt wurde. Schließlich ermöglichte mir ein Stipendium der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg eine eingehende Untersuchung.

Die vorliegende Arbeit, die in Teilen bereits veröffentlicht wurde (siehe Publikationsliste), wurde am Institut für Umwelt-Geochemie der Fakultät für Chemie und Geowissenschaften im Arbeitskreis von Prof. Heinz Friedrich Schöler durchgeführt. Ihm möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Betreuung des eigenständigen Forschungsthemas und die gewährte wissenschaftliche Freiheit bei der Bearbeitung danken. Ebenso möchte ich Prof. Heinz Falk (Universität Linz) für seine wertvollen Hinweise zur Chemie der Phenanthroperylenchinone, zahlreiche anregende Diskussionen und die Bereitstellung synthetischer Referenzproben sowie Dr. Jürgen H. Gross (Universität Heidelberg) für sein großes Interesse, die Ermöglichung umfangreicher massenspektrometrischer Messungen und seine Hilfe bei deren Auswertung herzlich danken.

Ich danke außerdem Dr. Hans Hagdorn (Muschelkalkmuseum Ingelfingen), Dr. Norbert Hauschke (Universität Halle-Wittenberg), Dr. Hans Hess (Naturhistorisches Museum Basel), Dr. Christian Neumann (Museum für Naturkunde Berlin) und Prof. Max Urlichs (Staatliches Museum für Naturkunde Stuttgart) für den Zugang zu Sammlungsmaterial bzw. für die großzügige Bereitstellung von fossilen Proben sowie Dr. Michael Diehm, Dr. Karl Neuberger (Phytoplan, Heidelberg) und Prof. Wolfgang Steglich (LMU, München) für die Bereitstellung von Referenzproben. Dr. Sabine Giesa, Herbert Hamacher und Dr. Joachim Wesener (Bayer Industry Services, Leverkusen) danke ich für FT-ICR-MS-Messungen und den Mitarbeitern der massenspektrometrischen Abteilung Norbert Nieth, Angelika Seith und Bianca Flock für die geduldige Aufnahme unzähliger Massenspektren. Des weiteren danke ich Prof. Rainer Altherr für die Ermöglichung von Dünnschliffen, Dr. Gerhard Schilling für die Ermöglichung von Kernresonanzspektren sowie Dr. Thomas Oeser und Petra Krämer für die Kristallstrukturanalyse bzw. die IR-Messung des synthetisierten Kohlenwasserstoffs. Nicht zuletzt möchte ich Gerhard Kilian für zahlreiche Hinweise zur HPLC sowie für seine Hilfe bei der Inbetriebnahme und Reparatur der HPLC-Anlage danken.



## Kurzfassung

In violett gefärbten Exemplaren der Crinoide *Liliocrinus* aus dem Oberen Jura der Schweiz wurde eine außergewöhnliche Serie von fossilen organischen Pigmenten aus der Gruppe der Phenanthroperylenchinone entdeckt. Mit den zur Zeit der Entdeckung verfügbaren analytischen Methoden konnte die genaue chemische Struktur dieser Verbindungen (Fringelite) allerdings nur unter Vorbehalt bestimmt werden. Crinoiden mit ähnlichen Färbungen wie bei *Liliocrinus* sind auch aus der Trias bekannt, wurden bislang aber nicht detailliert auf ihre organischen Inhaltsstoffe hin untersucht.

Um die Struktur und die Verbreitung der Fringelite näher zu ermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit Proben der violett gefärbten Crinoiden *Liliocrinus munsterianus* vom ursprünglichen Vorkommen der Fringelit-Pigmente sowie von *Carnallicrinus carnalli* und *Encrinus* cf. *spinosus* aus der Mittleren Trias von Deutschland bzw. Polen untersucht. Dabei wurden die Proben nach Aufschluß mit Salzsäure mit organischen Lösungsmitteln sequentiell extrahiert und die Extrakte anschließend mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und verschiedenen spektroskopischen Methoden (UV/Vis-Spektroskopie, Massenspektrometrie, Kernresonanzspektroskopie) analysiert. Durch Vergleich mit authentischen Referenzproben konnten die Pigmente schließlich als Hypericin ( $C_{30}H_{16}O_8$ ), Desmethylhypericin ( $C_{29}H_{14}O_8$ ) und Fringelit F ( $C_{28}H_{12}O_8$ ) identifiziert werden. Ein in geringen Mengen vorkommender Kohlenwasserstoff konnte als 1,2,3,4,5,6-Hexahydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylen charakterisiert werden.

Die analytischen Ergebnisse zeigen, daß es sich bei den sogenannten Fringelit-Pigmenten in Wirklichkeit um Hypericin und damit nahe verwandte Phenanthroperylenchinone handelt und daß die fossile Überlieferung dieser Pigmente viel weiter zurückreicht als bislang bekannt war. Hypericin ist vor allem durch sein Vorkommen im Johanniskraut (*Hypericum perforatum*), einer weit verbreiteten Heilpflanze, bekannt. Eine Gruppe bromierter Hypericin-derivate wurde allerdings auch in der rezenten Crinoide *Gymnocrinus richeri* gefunden. Letzteres Vorkommen läßt darauf schließen, daß es sich bei den Pigmenten der fossilen Crinoiden um nahezu original erhaltene Naturstoffe bzw. um nur gering veränderte Diageneseprodukte handelt.



## Abstract

An exceptional series of fossil organic pigments, which belong to the group of phenanthroperylene quinones, has been discovered in violet coloured specimens of the Upper Jurassic crinoid *Liliocrinus* from Switzerland. However, with the analytical methods available at the time of the discovery, the exact chemical structure of these compounds (fringelites) could be determined only tentatively. Crinoids with colourations similar to those found in *Liliocrinus* are also known from the Triassic, but have not been analysed for their organic constituents in detail until now.

In order to get further insights into the structure and distribution of the fringelites, samples of the violet coloured crinoids *Liliocrinus munsterianus* from the original locality of the fringelite pigments as well as of *Carnallicrinus carnalli* and *Encrinus* cf. *spinosus* from the Middle Triassic of Germany and Poland, respectively, were analysed in the present work. Samples were sequentially extracted with organic solvents following treatment with hydrochloric acid and extracts were subsequently analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and different spectroscopic methods (UV/Vis spectroscopy, mass spectrometry, nuclear magnetic spectroscopy). By comparison with authentic reference samples the pigments could be identified as hypericin ( $C_{30}H_{16}O_8$ ), demethylhypericin ( $C_{29}H_{14}O_8$ ) and fringelite F ( $C_{28}H_{12}O_8$ ). A hydrocarbon, present in minor amounts, could be characterized as 1,2,3,4,5,6-hexahydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene.

The analytical results show that the so-called fringelite pigments in fact are hypericin and closely related phenanthroperylene quinones and that the stratigraphic range of these pigments is much wider than previously known. Hypericin is usually known by its occurrence in the widespread medicinal plant St. John's wort (*Hypericum perforatum*). But a group of brominated hypericin derivatives has been also found in the living crinoid *Gymnocrinus richeri*. The latter occurrence suggests that the pigments of the fossil crinoids represent almost originally preserved natural products or only minor changed diagenetic products.



## Publikationen

### Artikel in Fachzeitschriften (peer-reviewed)

Wolkenstein, K., Gross, J. H., Oeser, T., Schöler, H. F. (2002): Spectroscopic characterization and crystal structure of the 1,2,3,4,5,6-hexahydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene. *Tetrahedron Letters* **43**, 1653–1655.

Wolkenstein, K., Gross, J. H., Falk, H., Schöler, H. F. (im Druck, 2005): Preservation of hypericin and related polycyclic quinone pigments in fossil crinoids. *Proceedings of the Royal Society of London B*, doi:10.1098/rspb.2005.3358.

### Konferenzbeiträge

Wolkenstein, K., Gross, J. H., Giesa, S., Schöler, H. F. (2001): 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. 34. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 4. – 7. März 2001, München.

Wolkenstein, K., Gross, J. H., Schöler, H. F. (2003): Mass spectrometric characterization of fossil pigments: Case study of a 240 million year old sea lily. 16th International Mass Spectrometric Conference, 31. August – 5. September 2003, Edinburgh.

Wolkenstein, K., Gross, J. H., Schöler, H. F. (2003): Biomarker pigments (phenanthroperylene quinones) from the Triassic crinoid *Chelocrinus carnalli*. 11th International Echinoderm Conference, 6. – 10. Oktober 2003, München.

Wolkenstein, K., Gross, J. H., Falk, H., Schöler, H. F. (2004): Erhaltung organischer Pigmente (Phenanthroperylenchinone) in fossilen Crinoiden. 74. Jahrestagung der Paläontologischen Gesellschaft, 2. – 8. Oktober 2004, Göttingen.



## Abkürzungsverzeichnis

|            |  |
|------------|--|
| DMSO       | Dimethylsulfoxid   |
| EI         | Elektronenstoß-Ionisation  |
| ESI        | Elektrospray-Ionisation  |
| FT-ICR     | Fourier-Transform Ionencyclotronresonanz                         |
| HHPP       | 1,2,3,4,5,6-Hexahydrophenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i> ]perylene |
| HPLC       | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie                         |
| IR         | Infrarot   |
| LDI        | Laserdesorptions-Ionisation                                      |
| MS         | Massenspektrometrie  |
| MS/MS      | Tandemmassenspektrometrie  |
| <i>m/z</i> | Masse zu Ladungs-Verhältnis                                      |
| NMR        | Kernresonanz   |
| p. a.      | zur Analyse  |
| PAKs       | polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe                     |
| PPC        | Phenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i> ]perylene-7,14-chinon          |
| PTFE       | Polytetrafluorethylen  |
| UV         | Ultraviolett   |
| Vis        | sichtbarer Spektralbereich                                       |



# Inhaltsverzeichnis

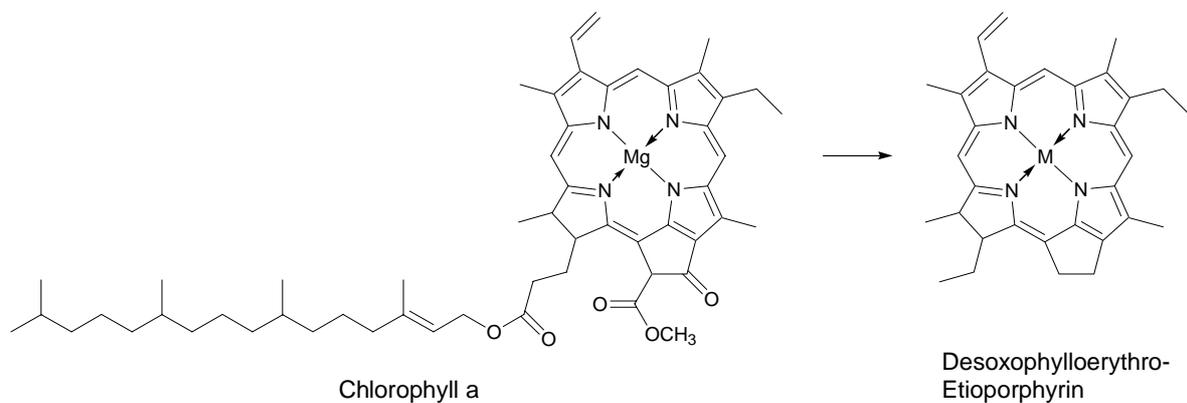
|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Organische Biomoleküle in der fossilen Überlieferung .....  | 1         |
| 1.2      | Die Fringelit-Pigmente und verwandte Kohlenwasserstoffe .....   | 1         |
| 1.3      | Aufbau und Vorkommen von Crinoiden .....  | 3         |
| 1.4      | Färbungen bei fossilen Crinoiden .....  | 6         |
| 1.5      | Pigmente in rezenten Crinoiden .....  | 7         |
| 1.6      | Salz- und Chelatbildung bei Phenanthroperylenechinonen .....  | 7         |
| 1.7      | Zielsetzung .....   | 9         |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b> .....  | <b>10</b> |
| 2.1      | Material .....  | 10        |
| 2.1.1    | Proben .....  | 10        |
| 2.1.2    | Referenzverbindungen und Präparate .....  | 13        |
| 2.1.3    | Chemikalien .....   | 14        |
| 2.2      | Synthese und Charakterisierung von 1,2,3,4,5,6-Hexahydrophenanthro[1,10,9,8-<br><i>opqra</i> ]perylene (HHPP) ..... | 14        |
| 2.3      | HPLC-Methodenentwicklung .....  | 16        |
| 2.3.1    | HPLC-Methode zur Trennung der PAKs .....  | 17        |
| 2.3.2    | HPLC-Methode zur Trennung der Phenanthroperylenechinone .....   | 18        |
| 2.4      | Untersuchung der Fossil- und Sedimentproben .....   | 19        |
| 2.4.1    | Dünnschliffuntersuchungen .....   | 19        |
| 2.4.2    | Probenaufbereitung und -extraktion .....  | 19        |
| 2.4.3    | UV/Vis-Spektroskopie .....  | 20        |
| 2.4.4    | Analytische und quantitative HPLC .....   | 20        |
| 2.4.5    | Massenspektrometrie .....   | 21        |
| 2.4.6    | Kernresonanzspektroskopie .....   | 22        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>23</b> |
| 3.1      | Synthese und Charakterisierung von HHPP .....   | 23        |
| 3.2      | HPLC-Methodenentwicklung .....  | 28        |
| 3.2.1    | HPLC-Methode zur Trennung der PAKs .....  | 28        |
| 3.2.2    | HPLC-Methode zur Trennung der Phenanthroperylenechinone .....   | 28        |
| 3.3      | Mikroskopische Untersuchung der Crinoiden .....   | 31        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.4      | Charakterisierung der fossilen Verbindungen.....                  | 32        |
| 3.4.1    | Toluolextrakte .....  | 32        |
| 3.4.2    | Methanolextrakte.....   | 35        |
| 3.4.3    | DMSO-Extrakte .....   | 43        |
| 3.5      | Quantifizierung der Verbindungen im fossilen Material .....       | 43        |
| 3.6      | Extraktionsexperimente.....                                       | 44        |
| 3.6.1    | Sequentielle Extraktion des fossilen Materials .....              | 44        |
| 3.6.2    | Sequentielle Extraktion des Modellpräparats.....                  | 45        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>   | <b>47</b> |
| 4.1      | Erhaltung des fossilen Materials .....                            | 47        |
| 4.2      | Struktur der fossilen Pigmente und Kohlenwasserstoffe .....       | 47        |
| 4.3      | Biosynthese und mögliche biologische Bedeutung der Pigmente ..... | 48        |
| 4.4      | Diagenese .....   | 49        |
| 4.5      | Vorkommen der fossilen Pigmente und Chemotaxonomie.....           | 51        |
| 4.6      | Chemische Stabilität der Pigmente .....                           | 52        |
| <b>5</b> | <b>Schlußfolgerungen.....</b>                                     | <b>54</b> |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis.....</b>                                  | <b>56</b> |
| <b>7</b> | <b>Anhang .....</b>   | <b>63</b> |
| 7.1      | Kristallographische Daten .....                                   | 63        |
| 7.2      | UV/Vis-Spektren.....  | 64        |
| 7.3      | LDI-Massenspektren .....  | 75        |
| 7.4      | Meßdaten zur quantitativen Analyse.....                           | 97        |

# 1 Einleitung

## 1.1 Organische Biomoleküle in der fossilen Überlieferung

Aus geologischen Proben ist eine Vielzahl von organischen Molekülen bekannt, die noch in wesentlichen Teilen ihrer ursprünglichen chemischen Struktur erhalten sind (Abb. 1-1). Solche Verbindungen (molekulare Fossilien) können wichtige Informationen zu ihrem biologischen Ursprung und zu den geochemischen Prozessen seit ihrer Entstehung liefern (Logan et al., 1991). Die ältesten bekannten molekularen Fossilien aus Sedimenten des Präkambriums (Brocks und Summons, 2004) ermöglichen so z. B. Einblicke in die frühe Entwicklung des Lebens, die auf andere Weise nicht zugänglich wären.



**Abb. 1-1:** Beispiel eines molekularen Fossils (Desoxophylloerythro-Etioporphyrin) und seiner vermuteten Ausgangsverbindung (Chlorophyll a) (nach Treibs, 1936). M = Kation (z. B.  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{VO}^{2+}$ ).

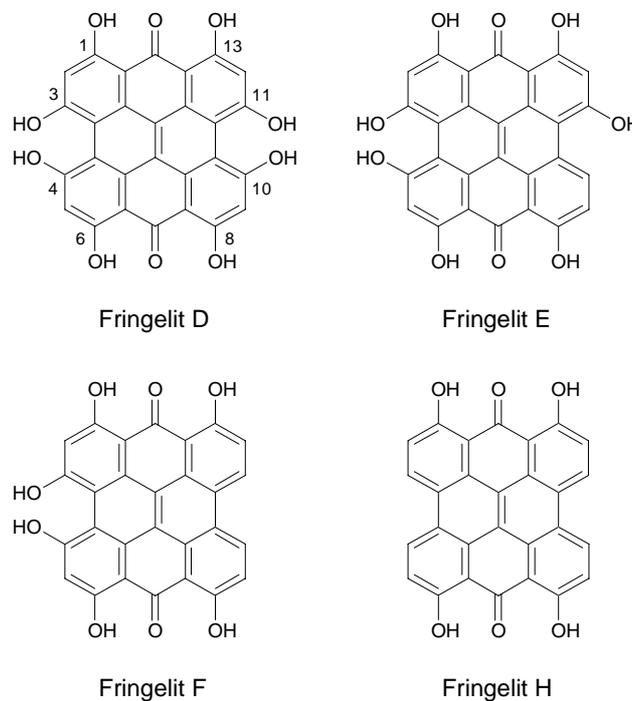
Für die Erhaltung von molekularen Fossilien sind vor allem die chemische Stabilität der Verbindung, die Art der Einbettung und der Ablauf der Diagenese von Bedeutung (Logan et al., 1991); das Erhaltungspotential ist dabei für die einzelnen Naturstoffgruppen sehr unterschiedlich. Während Nucleinsäuren, Proteine und Kohlenhydrate im allgemeinen nur ein geringes Erhaltungspotential aufweisen, ist das Erhaltungspotential bestimmter Lipide (z. B. Steroide, Hopanoide) relativ hoch. Noch größer ist das Erhaltungspotential von Biopolymeren wie z. B. Lignin und Sporopollenin (Logan et al., 1991).

## 1.2 Die Fringelit-Pigmente und verwandte Kohlenwasserstoffe

Einige molekulare Fossilien sind noch am Ort ihrer Entstehung erhalten bzw. kommen in engem Zusammenhang mit Fossilien bestimmter Organismen vor. Zu dieser Gruppe von

endogenen fossilen Verbindungen zählen auch die sogenannten Fringelit-Pigmente, die in violett gefärbten Exemplaren der jurassischen Crinoide „*Millericrinus*“ (= *Liliocrinus*) entdeckt wurden (Blumer, 1951).

Die Fringelit-Pigmente wurden (überwiegend auf der Grundlage von Absorptionsspektren) als hydroxylierte Phenanthroperylenchinone mit einer jeweils unterschiedlichen Anzahl an Hydroxygruppen beschrieben (Abb. 1-2) (Blumer, 1960, 1962a, 1965, 1976). Dabei weist Fringelit D mit acht Hydroxygruppen die größte Zahl an funktionellen Gruppen auf, während Fringelit H mit vier Hydroxygruppen das am geringsten substituierte Derivat darstellt.

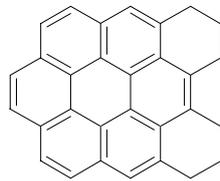


**Abb. 1-2:** Strukturformeln der Fringelit-Pigmente (nach Blumer, 1965) mit Bezifferung von Fringelit D.

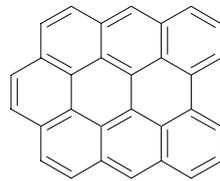
Mehrere Fringelit-Pigmente sind auch synthetisiert worden [Fringelit D (Freeman et al., 1994; Falk und Mayr, 1995), Fringelit F (Cameron und Raverty, 1976; Rodewald et al., 1977), Fringelit H (Brockmann et al., 1950)], die Strukturen der fossilen Pigmente wurden allerdings bis heute nicht bestätigt.

Neben den Pigmenten wurden in „*Millericrinus*“ in geringen Mengen verschiedene polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) gefunden (Blumer, 1962b; Thomas und Blumer, 1964) (Abb. 1-3). Unter diesen sind vor allem die Verbindungen mit acht bzw. neun Ringen von Interesse. Im Gegensatz zu den anderen festgestellten PAKs, die in fossilen

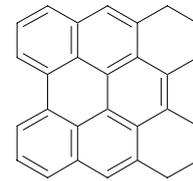
und rezenten Sedimenten weit verbreitet auftreten, wurden diese Verbindungen bisher ausschließlich in „*Millericrinus*“ gefunden. Aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft wurden sie als Transformationsprodukte der Pigmente interpretiert.



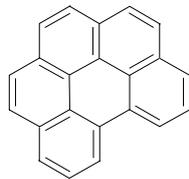
8,9,10,11,12,13-Hexahydro-dibenzo[bc,ef]coronen



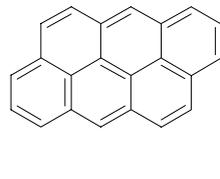
Dibenzo[bc,ef]coronen



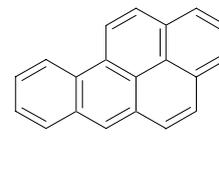
1,2,3,4,5,6-Hexahydro-phenanthro[1,10,9,8-opqra]perylene



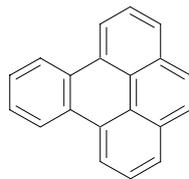
Benzo[ghi]perylene



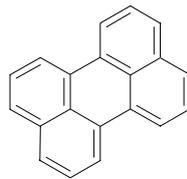
Dibenzo[def,mno]chrysen



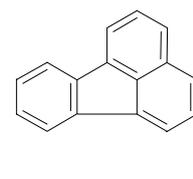
Benzo[a]pyren



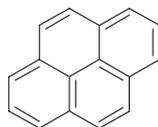
Benzo[e]pyren



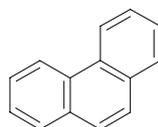
Perylen



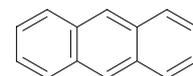
Fluoranthen



Pyren



Phenanthren



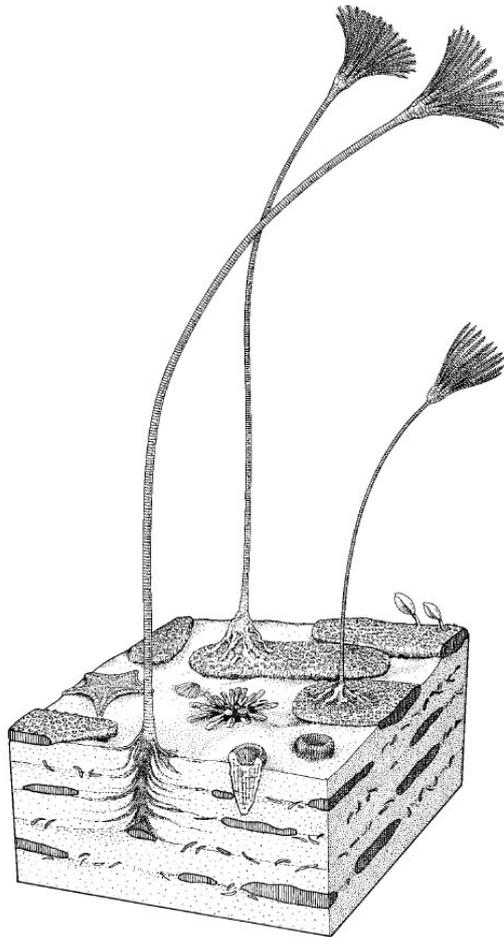
Anthracen

**Abb. 1-3:** Strukturformeln der in „*Millericrinus*“ festgestellten PAKs (nach Thomas und Blumer, 1964).

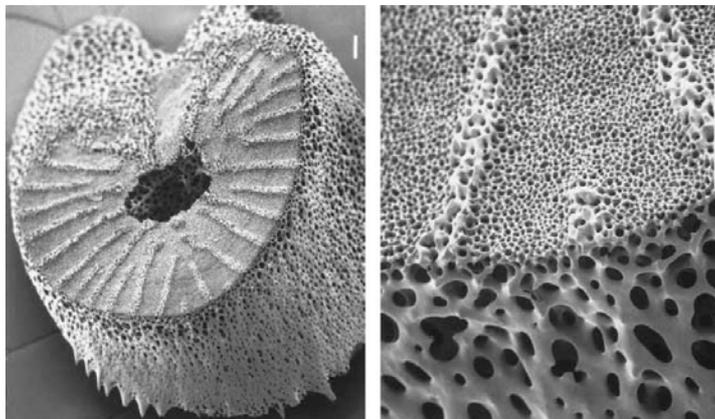
### 1.3 Aufbau und Vorkommen von Crinoiden

Crinoiden sind marine Tiere und gehören wie Seeigel und Seesterne zum Stamm der Stachelhäuter (Echinodermata). Man unterscheidet zwischen gestielten, in der Regel mit einer Wurzel oder Haftscheibe am Meeresboden verankerten Crinoiden (Seelilien) (Abb. 1-4), und frei schwimmenden Formen (Comatuliden) (Ausich et al., 1999; Hess und Ausich, 1999). Ein charakteristisches Merkmal aller Crinoiden (wie aller Echinodermen) ist das Vorkommen eines aus zahlreichen Einzelementen bestehenden Innenskeletts aus Calcit. Die

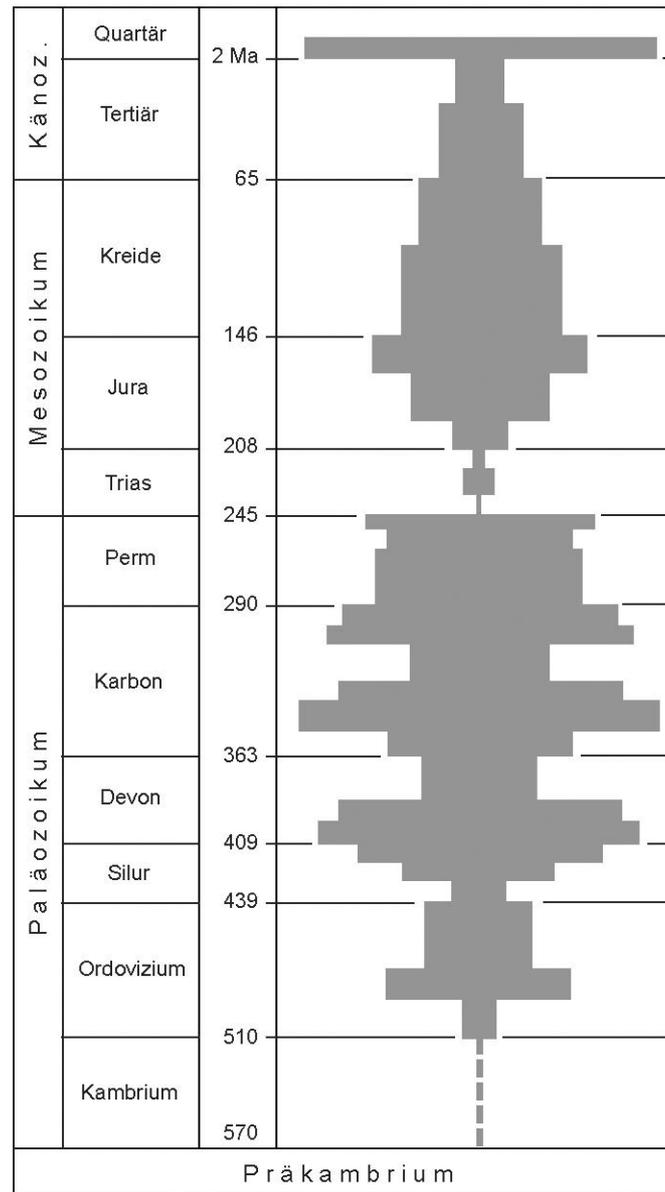
Skelettelemente weisen dabei eine stark poröse Mikrostruktur (Stereom) auf (Abb. 1-5), deren Hohlräume beim lebenden Tier mit Gewebe ausgefüllt sind (Ausich et al., 1999).



**Abb. 1-4:** Rekonstruktion der jurassischen Crinoide *Liliocrinus munsterianus* (Ausich et al., 1999).



**Abb. 1-5:** Poröse Mikrostruktur des Crinoideninnenskeletts. Rasterelektronenmikroskopaufnahme eines Skelettelements (Brachialplatte) der rezenten Crinoide *Promachocrinus kerguelensis*, Maßstab jeweils 100  $\mu\text{m}$  (Ausich et al., 1999).

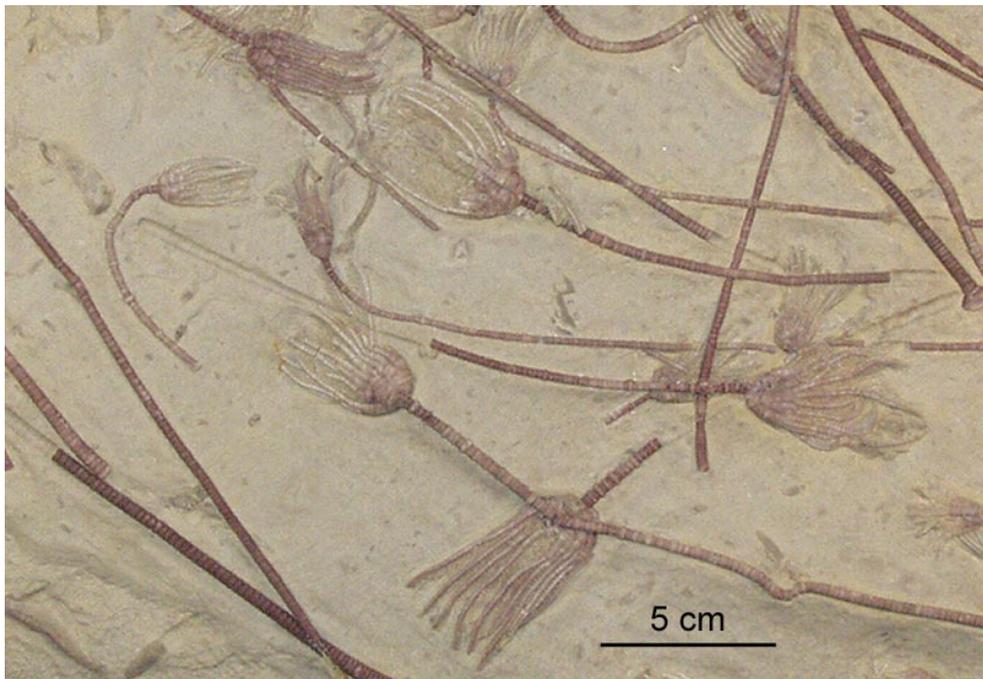


**Abb. 1-6:** Evolutionäre Entwicklung der Crinoiden basierend auf der Anzahl der Gattungen (nach Hess und Ausich, 1999). Ma = Millionen Jahre.

Aus der fossilen Überlieferung sind etwa 6000 Crinoidenarten bekannt; die frühesten davon stammen aus dem Unteren Ordovizium (Abb. 1-6). Heute kommen noch etwa 600 Arten vor, von denen etwa 80 gestielte Formen sind (Hess und Ausich, 1999). Während heutige gestielte Crinoiden fast ausnahmslos in Meerestiefen von mehr als 200 m vorkommen, treten heutige Comatuliden vor allem in flachen Schelfgewässern auf.

#### 1.4 Färbungen bei fossilen Crinoiden

Crinoiden mit einer charakteristischen purpurnen bis violetten Färbung sind bereits seit Beginn des 19. Jahrhunderts bekannt und wurden aus dem Jura (Parkinson<sup>1</sup>, 1808; Bather, 1893; Taylor, 1983; Salamon und Zatoń, 2005) wie auch aus der Trias (Jaekel, 1894; Biese, 1927; Klages, 1965; Hagdorn, 1980, 1982; Ernst und Löffler, 1993; Bielert und Bielert, 1995, 1996) beschrieben. Unter den triassischen Crinoiden ist dabei vor allem die charakteristische Färbung von *Carnallicrinus carnalli* (früher *Chelocrinus carnalli*) aus dem Unteren Muschelkalk von Freyburg/Unstrut bekannt geworden (Abb. 1-7).



**Abb. 1-7:** Vollständige Exemplare von *Carnallicrinus carnalli* mit charakteristischer violetter Färbung, Mittlere Trias, Anisium, Unterer Muschelkalk, Jena Formation, Schaumkalk, Freyburg/Unstrut, Deutschland, Sammlung Bergakademie Freiberg.

Vor den Untersuchungen Blumers wurden bereits verschiedene Versuche unternommen, um die Natur violetter Crinoidenfärbungen aufzuklären. Frühe chemische Untersuchungen ergaben aber keine Hinweise auf bestimmte organische oder anorganische Pigmente (Bather, 1893; Biese, 1927). So schreibt etwa Bather (1893): „Experiments on a few fragments, chiefly of *Apiocrinus*, have failed to extract any organic pigment such as the dusky purple „acid pentacrinin“ of Prof. Moseley. This indeed was hardly to be expected, since so complicated a chemical compound could not well be preserved by the ordinary processes of fossilisation“.

<sup>1</sup> Es handelt sich hierbei um den britischen Arzt, Apotheker und Paläontologen James Parkinson (1755–1824), dem Entdecker der später nach ihm benannten Parkinson-Krankheit.

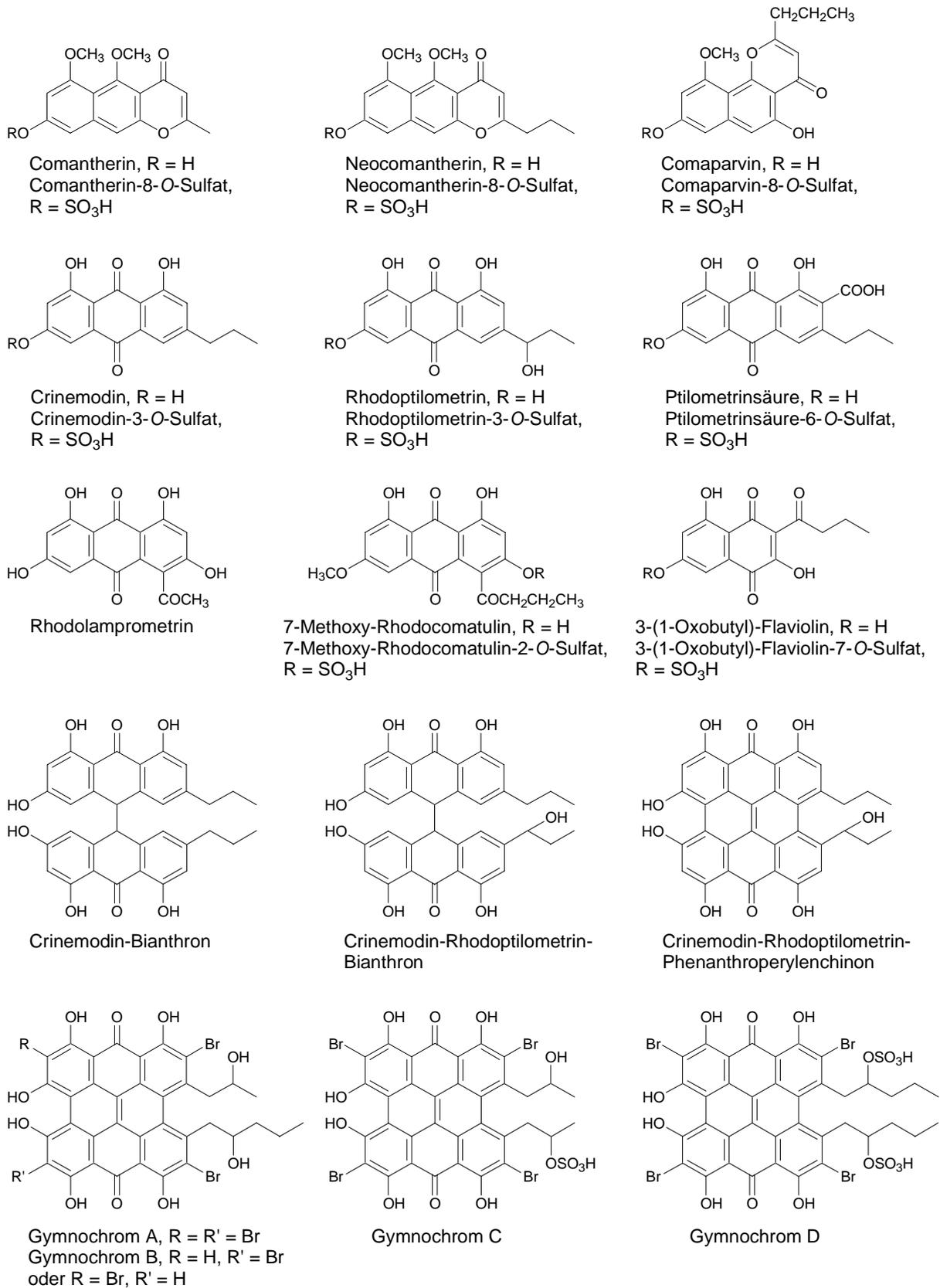
In jüngerer Zeit wurden gefärbte Fossilien auch durch UV/Vis-Reflexionsspektroskopie untersucht (Falk et al., 1994; Mayr, 1996; Falk, 1997; Falk und Mayr, 1997). Dabei konnte eine Abgrenzung von organischen und anorganischen Pigmenten vorgenommen werden. Darüber hinaus konnten Hinweise für eine größere Verbreitung der Fringelit-Pigmente in der fossilen Überlieferung gefunden werden.

### 1.5 Pigmente in rezenten Crinoiden

Rezente Crinoiden sind für ihre häufig intensiven Färbungen bekannt und wurden bereits sehr früh auf entsprechende Farbstoffe hin untersucht (Moseley, 1877). In frei schwimmenden Crinoiden wurden lineare und angulare Naphthopyrone (Francesconi, 1980; Sakuma et al., 1987), Naphthochinone (Takahashi et al., 2002), Anthrachinone (Powell und Sutherland, 1967; Powell et al., 1967; Erdman und Thomson, 1972; Bartolini et al., 1973; Takahashi et al., 2002), Bianthrone und Phenanthroperylenechinone (Rideout und Sutherland, 1985) festgestellt. Über die Pigmente von rezenten gestielten Crinoiden ist dagegen nur äußerst wenig bekannt; bemerkenswert ist jedoch das Vorkommen einer Serie von bromierten Phenanthroperylenechinonen in *Gymnocrinus richeri* (De Riccardis et al., 1991). Häufig kommen Polyketide in heutigen Crinoiden auch als Sulfatester vor (Abb. 1-8) (Rideout et al., 1979; Rideout und Sutherland, 1981; De Riccardis et al., 1991; Lee und Kim, 1995; Takahashi et al., 2002). Neben Polyketiden wurden in rezenten Crinoiden verschiedene Carotinoide festgestellt; diese kommen in den Tieren allerdings nur in geringen Mengen vor und sind für deren Färbung nicht von Bedeutung (Dimelow, 1958; Gross et al., 1975).

### 1.6 Salz- und Chelatbildung bei Phenanthroperylenechinonen

Obwohl das fossile Vorkommen bzw. die außerordentliche chemische Stabilität der Fringelit-Pigmente seit den Untersuchungen Blumers bekannt ist, wurden Untersuchungen zur chemischen Bindung der Fringelite im fossilen Material erst in jüngerer Zeit durchgeführt (Falk und Mayr, 1997). Ausgehend von den bekannten Strukturen wurde dabei Fringelit D als Modellsubstanz ausgewählt und für Experimente mit Erdalkali- und Übergangsmetallionen verwendet. Es konnte gezeigt werden, daß Fringelite *peri*-Chelate (unter Einbeziehung der Hydroxygruppen in den Positionen 1, 6, 8, 13 und der Carbonylgruppen in den Positionen 7 und 14, siehe Abb. 1-2) mit Eisen und Zink bilden können.



**Abb. 1-8:** Strukturformeln verschiedener Polyketidpigmente aus rezenten Crinoiden (zusammengestellt aus den Literaturstellen in Abschnitt 1.5).

Bei Fringeliten mit *bay*-Hydroxygruppen (Positionen 3, 4, 10 und 11, siehe Abb. 1-2) besteht darüber hinaus die Möglichkeit zur Bildung polymerer Salze mit Erdalkali- und Übergangsmetallen.

## 1.7 Zielsetzung

Die lebhafte violette Färbung bestimmter fossiler Crinoiden stellt innerhalb der fossilen Überlieferung eine große Ausnahme dar. Obwohl solche Färbungen bereits im 19. Jahrhundert beschrieben wurden, ist über deren Natur bislang nur äußerst wenig bekannt. Der heutige Kenntnisstand basiert vor allem auf Arbeiten von Max Blumer, die bereits in den 1960er Jahren durchgeführt wurden, durch die aber die Struktur der Pigmente einer Crinoide aus dem Jura nur unter Vorbehalt aufgeklärt werden konnte. Um nähere Informationen zu den Färbungen fossiler Crinoiden zu erhalten, sollten daher in der vorliegenden Arbeit verschiedene charakteristisch violett gefärbte Crinoiden mittels moderner Verfahren detailliert analysiert werden. Angesichts des vielschichtigen Hintergrunds der Thematik mit Aspekten aus Paläontologie und Chemie schien es dabei notwendig, die Natur der Färbungen im Rahmen eines multidisziplinären Ansatzes zu betrachten.

Durch die Untersuchung sollte vor allem geklärt werden, ob es sich bei den sogenannten Fringelit-Pigmenten tatsächlich um die in der Literatur beschriebenen Strukturen handelt und ob diese Pigmente auch in wesentlich älteren Crinoiden aus der Trias, die ähnliche violette Färbung aufweisen, vorkommen. Da die letzten chemischen Untersuchungen der fossilen Pigmente bereits mehrere Jahrzehnte zurückliegen, war es notwendig, eine modernere Methode zur Analyse der Verbindungen zu entwickeln. Durch eine Quantifizierung sollten außerdem Hinweise zur Diagenese der Verbindungen gefunden werden. Darüber hinaus sollte versucht werden, nähere Informationen zur Stabilisierung der Pigmente im fossilen Material zu ermitteln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Proben

In der vorliegenden Arbeit wurden Stielfragmente der jurassischen Crinoide *Liliocrinus munsterianus* vom ursprünglichen Vorkommen der Fringelit-Pigmente sowie der triassischen Crinoiden *Carnallicrinus carnalli*, *Encrinus* sp. cf. *E. spinosus* und *Encrinus liliiformis* von verschiedenen Fundstellen in Deutschland bzw. Polen untersucht. Das Material stammt dabei aus den Sammlungen folgender Einrichtungen: Institut für Geologische Wissenschaften und Geiseltalmuseum, Universität Halle-Wittenberg (MLU); Museum für Naturkunde Berlin (MB); Muschelkalkmuseum Ingelfingen (MHI); Naturhistorisches Museum Basel (NMB); Staatliches Museum für Naturkunde Stuttgart (SMNS).

#### *Liliocrinus munsterianus*

NMB M 8908: Isoliertes Stielfragment mit intensiver violetter Färbung, Oberer Jura, Oxfordium, Bärschwil Formation, Bärschwil, Schweiz, Probe Li 1 (Abb. 2-1).

#### *Carnallicrinus carnalli*

MLU. WOL 2005.1: Stielfragment mit deutlicher violetter Färbung in mikritischer Kalksteinmatrix, Mittlere Trias, Anisium, Unterer Muschelkalk, Jena Formation, Schaumkalk, Schleberoda bei Freyburg/Unstrut, Deutschland, Probe Ch 6 (Stielglieder) und Probe Ch 7 (Kalksteinmatrix).

MLU. WOL 2005.2: Isoliertes Stielfragment mit deutlicher violetter Färbung, Mittlere Trias, Anisium, Unterer Muschelkalk, Jena Formation, Schaumkalk, Freyburg/Unstrut, Deutschland, Probe Ch 8 (Abb. 2-2).

MLU. WOL 2005.3: Stielfragment mit sehr schwacher violetter Färbung in stark poröser Kalksteinmatrix, Mittlere Trias, Anisium, Unterer Muschelkalk, Jena Formation, Schaumkalk, Freyburg/Unstrut, Deutschland, Probe Ch 10 (Stielglieder) und Probe Ch 11 (Kalksteinmatrix).

MB. E. 533: Krone und proximaler Stiel mit deutlicher violetter Färbung in Kalksteinmatrix, Mittlere Trias, Anisium, Unterer Muschelkalk, Jena Formation, Schaumkalk, Freyburg/Unstrut, Deutschland, Probe Ch 9.



**Abb. 2-1:** *Liliocrinus munsterianus*, Stielfragment (Querschnitt), Oberer Jura, Oxfordium, Bärschwil Formation, Bärschwil, Schweiz, NMB M 8908 (Probe Li 1).



**Abb. 2-2:** *Carnallicrinus carnalli*, Stielglieder, Mittlere Trias, Anisium, Unterer Muschelkalk, Jena Formation, Schaumkalk, Freyburg/Unstrut, Deutschland, MLU. WOL 2005.2 (Probe Ch 8).



**Abb. 2-3:** *Encrinus* sp. cf. *E. spinosus*, Stielfragment (Längsschnitt) in Kalksteinmatrix, Mittlere Trias, Anisium, Unterer Muschelkalk, Górażdże, Polen, MHI 1796 (Probe En 2 und Probe En 3).

***Encrinus* sp. cf. *E. spinosus***

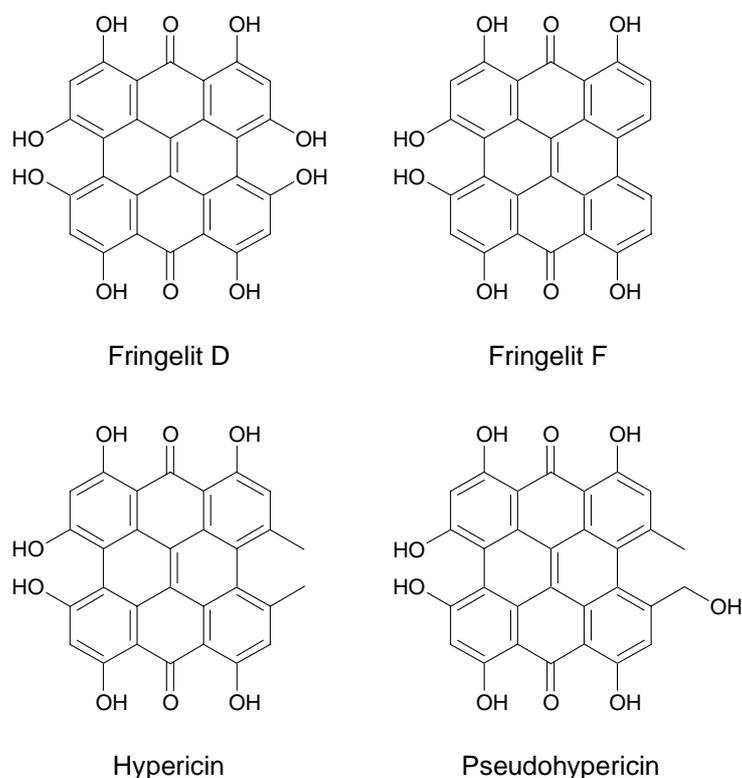
MHI 1796: Krone und proximaler Stiel mit intensiver violetter Färbung in mikritischer Kalksteinmatrix, Mittlere Trias, Anisium, Unterer Muschelkalk, Górażdże, Polen, Probe En 2 (Kalksteinmatrix) und Probe En 3 (Stielglieder) (Abb. 2-3).

***Encrinus liliiformis***

SMNS 75198: Stielfragment (proximaler Stiel) mit dunkelgrauer Färbung, Mittlere Trias, Anisium, Oberer Muschelkalk, Trochitenkalk Formation, Wollmershausen bei Crailsheim, Deutschland, Probe En 1.

### 2.1.2 Referenzverbindungen und Präparate

Als Phenanthroperylenchinon-Referenzverbindungen wurden die synthetisch zugänglichen Verbindungen Fringelit D und F sowie natürliches Hypericin und Pseudohypericin aus dem Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) verwendet (Abb. 2-4, Tab. 2-1); für ergänzende Extraktionsexperimente wurde außerdem Hypericin in Calciumcarbonat (5 mg Hypericin in 3 g Calciumcarbonat, Prof. H. Falk) eingesetzt. Phenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylen-7,14-chinon (Reinsubstanz, synthetisiert nach Falk und Vaisburg (1995), Prof. H. Falk) diente als Ausgangsverbindung zur Herstellung einer Kohlenwasserstoffreferenz (siehe Abschnitt 2.2) und ein PAK-Mischstandard (US EPA 16, Ehrenstorfer) wurde bei der HPLC-Methodenentwicklung verwendet.



**Abb. 2-4:** Strukturformeln der verwendeten Phenanthroperylenchinone.

**Tab. 2-1:** Phenanthroperylenchinon-Referenzverbindungen.

---

Fringelit D: Reinsubstanz, synthetisiert nach Falk und Mayr (1995), Prof. H. Falk

Fringelit F: Reinsubstanz, synthetisiert nach Rodewald et al. (1977)\*, Prof. W. Steglich

Hypericin aus *Hypericum perforatum*: HPLC-Standard, >99 %, Phytoplan

Pseudohypericin aus *Hypericum perforatum*: HPLC-Standard, >97 %, Phytoplan

---

\*Originalpräparat zur Diplomarbeit von G. Rodewald (Rodewald, 1974).

### 2.1.3 Chemikalien

**Tab. 2-2:** Chemikalien.

---

Aceton: p. a., Merck

Acetonitril: für die HPLC, gradient grade, CHROMASOLV, Riedel-de Haën

Chloroform-d<sub>1</sub>: für die Kernresonanzspektr., UVASOL, Deuterierungsgrad  $\geq 99,95$  %, Merck

Cyclohexan: für die Spektroskopie, UVASOL, Merck

Dimethylsulfoxid: für die Spektroskopie, UVASOL, Merck

Essigsäure: 100 %, p. a., Merck

Jodwasserstoffsäure: 57 %, p. a., Merck

Methanol: für die Spektroskopie, UVASOL, Merck

Methanol: für die HPLC, gradient grade, Baker

Methanol-d<sub>4</sub>: für die Kernresonanzspektr., UVASOL, Deuterierungsgrad  $\geq 99,95$  %, Merck

Natriumacetat-Trihydrat: p. a., Merck

Phosphor (rot): 97 %, zur Synthese, Riedel-de Haën

Salzsäure: 37 %, p. a., Merck

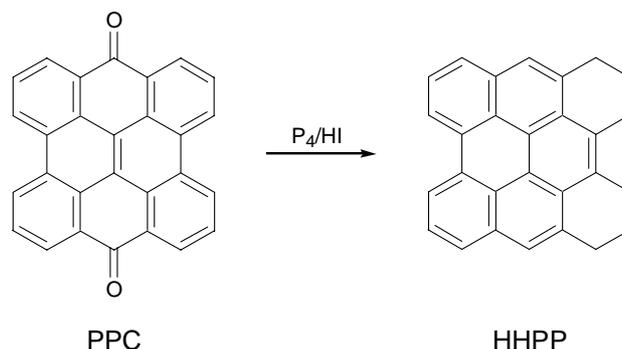
Toluol: für die Spektroskopie, UVASOL, Merck

Wasser: für die HPLC, gradient grade, Baker

---

## 2.2 Synthese und Charakterisierung von 1,2,3,4,5,6-Hexahydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene (HHPP)

HHPP diente in der vorliegenden Arbeit als Referenzverbindung und wurde nach Angaben aus der Literatur (Scholl und Meyer, 1934) durch Reduktion von Phenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene-7,14-chinon (PPC) mit rotem Phosphor und Jodwasserstoffsäure synthetisiert (Abb. 2-5). Abweichend von der ursprünglichen Arbeitsvorschrift wurde HHPP jedoch nicht durch Umkristallisation, sondern durch Photooxidation der Nebenprodukte und daran anschließende Säulenchromatographie gereinigt.



**Abb. 2-5:** Reduktion von PPC zu HHPP nach Scholl und Meyer (1934).

30 mg PPC (Falk und Vaisburg, 1995), 15 mg roter Phosphor und 0,6 ml Jodwasserstoffsäure wurden in einem versiegelten Glasrohr für 5 Stunden auf 200 °C erhitzt. Das Rohprodukt wurde dann gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht im Exsikkator getrocknet (10 Torr, Raumtemperatur). Anschließend wurde der Rückstand mit Toluol extrahiert (Ultraschallbad, 30 min) und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Die Lösung wurde unter Einfluß des Tageslichts für etwa zwei Tage stehen gelassen, bis ein Farbumschlag der anfangs grünlichblau gefärbten Lösung nach gelb festzustellen war und dann über eine Silicagelsäule (Bond Elut Si, Analytichem International) mit Toluol als Elutionsmittel chromatographiert. Verdampfen des Lösungsmittels ergab schließlich reines HHPP.

Die spektroskopischen Eigenschaften der Verbindung wurden durch UV/Vis-, FT-IR- und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie sowie durch LDI- und EI-MS bestimmt. Mit Ausnahme der FT-IR-Analyse, bei der HHPP in KBr an einem Bruker VECTOR 22 Gerät gemessen wurde, kamen dabei die gleichen Geräte zum Einsatz, die auch bei der Analyse der fossilen Verbindungen verwendet wurden. Die Schmelzpunktbestimmung wurde mit einem Heiztischmikroskop nach Kofler (Bock-Monoscop) durchgeführt.

Durch langsames Verdampfen einer Toluollösung bei Raumtemperatur konnte ein geeigneter Einkristall zur Bestimmung der Kristallstruktur erhalten werden. Um Photooxidation der Verbindung zu verhindern, wurde die Lösung unter Ausschluß von Licht in einer Argonatmosphäre aufbewahrt.

Die Röntgenreflexe von HHPP wurden mit Hilfe eines Bruker SMART APEX Diffraktometer (Mo  $K_{\alpha}$ -Strahlung, Graphitmonochromator) aufgenommen (Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg). Hierbei wurden die Daten mit den Programmen SMART und

SAINT<sup>2</sup> von Bruker gesammelt und reduziert. Die Strukturlösung der Verbindung erfolgte durch direkte Methoden mit dem Programm XS aus dem Programmpaket SHELXTL<sup>3</sup>. Die Verfeinerung der strukturellen Parameter der Kohlenstoffatome wurde anisotrop im Full-Matrix-Least-Squares-Verfahren ( $F^2$ ) mit dem Programm XL<sup>3</sup> durchgeführt. Dabei wurden alle Wasserstoffatome berechnet und in die Verfeinerung mit eingeschlossen. Die graphische Darstellung der Kristallstruktur erfolgte mit dem Programm SCHAKAL 99<sup>4</sup>.

### 2.3 HPLC-Methodenentwicklung

**Tab. 2-3:** HPLC-Geräteparameter.

|                |   |
|----------------|---|
| Datensystem    | Data System 450-MT2, Kontron Instruments                                    |
| Entgasung      | DEGASYS DG-1310 Vakuumentgaser, Uniflows                                    |
| Pumpen         | 2 serielle Doppelkolbenpumpen: HPLC Pump 420, Kontron Instruments           |
| Mischkammer    | Dynamic Mixing Chamber, Knauer  |
| Verweilvolumen | ca. 2,5 ml  |
| Injektion      | HPLC Autosampler 465, Kontron Instruments, 20 $\mu$ l<br>Injektorschleife   |
| Vorsäule       | Purospher STAR RP-18 endcapped (4 $\times$ 4 mm I.D., 5 $\mu$ m),<br>Merck  |
| Säule          | Purospher STAR RP-18 endcapped (55 $\times$ 4 mm I.D., 3 $\mu$ m),<br>Merck |
| Säulenofen     | SP8792 column heater, Spectra-Physics                                       |
| Detektor       | Detector 430 A, Kontron Instruments   |

<sup>2</sup> SMART, SAINT: Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, 2001.

<sup>3</sup> SHELXTL 6.1: Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, 2000.

<sup>4</sup> E. Keller, SCHAKAL 99: A computer program for the graphic representation of molecular and crystallographic models, Kristallographisches Institut der Universität Freiburg, Freiburg i. Br., Deutschland, 1999.

### 2.3.1 HPLC-Methode zur Trennung der PAKs

**Tab. 2-4:** HPLC-Bedingungen zur Trennung der PAKs.

|                   |  |
|-------------------|--|
| Flußrate          | 1 ml/min   |
| Mobile Phase      | A: Wasser, B: Acetonitril  |
| Programm          | Linearer Gradient von 70 % B zu 100 % B in 20 min,<br>isokratische Elution bei 100 % B für weitere 5 min |
| Temperatur        | 25 °C  |
| Injektionsvolumen | 10 µl  |
| Detektion         | UV bei 300 nm  |

#### HHPP-Standardlösungen

Ca. 0,1 mg HHPP wurden in einem 10 ml Meßkolben in Toluol gelöst (Stammlösung). Die genaue Konzentration der Lösung wurde photometrisch anhand des molaren Extinktionskoeffizienten für das Absorptionsmaximum von HHPP in Toluol bestimmt ( $\epsilon = 41200$ , siehe Abschnitt 3.1). 0,5, 1, 2 und 5 ml Stammlösung HHPP wurden mit Toluol auf jeweils 10 ml aufgefüllt. Für die HPLC-Messungen wurden die Standardlösungen im Verhältnis 1:1 mit Acetonitril verdünnt.

#### Kalibrierung und Validierung

Für alle Standardlösungen wurden jeweils drei Einzelbestimmungen durchgeführt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 10:1 und die Nachweisgrenze bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 ermittelt.

### 2.3.2 HPLC-Methode zur Trennung der Phenanthroperylenchinone

**Tab. 2-5:** HPLC-Bedingungen zur Trennung der Phenanthroperylenchinone.

|                   |   |
|-------------------|---|
| Flußrate          | 1 ml/min  |
| Mobile Phase      | A: 50 mM Natriumacetatlösung, mit Essigsäure auf pH 7,0 eingestellt, B: Methanol                      |
| Programm          | Linearer Gradient von 60 % B zu 100 % B in 20 min, isokratische Elution bei 100 % B für weitere 5 min |
| Temperatur        | 25 °C   |
| Injektionsvolumen | 10 µl   |
| Detektion         | UV bei 254 nm   |

#### Phenanthroperylenchinon-Mischstandard

Für die Methodenentwicklung wurde zunächst ein Mischstandard der zur Verfügung stehenden Phenanthroperylenchinone Fringelit D, Fringelit F, Hypericin und Pseudohypericin verwendet. Die Konzentration (in Methanol) betrug dabei jeweils etwa  $10^{-5}$  mol/l. Eine Kalibrierung anhand von Einzelverbindungen wurde nur für Fringelit F und Hypericin durchgeführt.

#### Fringelit F-Standardlösungen

Ca. 0,2 mg Fringelit F wurden in einem 10 ml Meßkolben mit Methanol gelöst (Stammlösung). Die genaue Konzentration der Lösung wurde photometrisch anhand des von Rodewald et al. (1977) ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten für das Absorptionsmaximum von Fringelit F in Methanol bestimmt ( $\epsilon = 30100$ ). 0,5, 1, 2 und 5 ml Stammlösung Fringelit F wurden mit Methanol auf jeweils 10 ml aufgefüllt.

#### Hypericin-Standardlösungen

Ca. 0,4 mg Hypericin wurden in einem 25 ml Meßkolben in Methanol gelöst (Stammlösung). Die genaue Konzentration der Lösung wurde dann photometrisch anhand des molaren Extinktionskoeffizienten für das Absorptionsmaximum von Hypericin in Methanol bestimmt ( $\epsilon = 44530$ , Angabe Phytoplan). 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 und 5 ml Stammlösung Hypericin wurden mit Methanol auf jeweils 10 ml aufgefüllt.

## **Kalibrierung und Validierung**

Für alle Standardlösungen wurden jeweils drei Einzelbestimmungen durchgeführt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 10:1 und die Nachweisgrenze bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 ermittelt.

## **2.4 Untersuchung der Fossil- und Sedimentproben**

### **2.4.1 Dünnschliffuntersuchungen**

Von geeigneten Crinoidenproben (*Liliocrinus* und *Carnallicrinus*) wurden orientierte Dünnschliffe mit einer polierten Oberfläche und einer Stärke von ca. 30 µm hergestellt und mit einem Leica 12 Pol S Polarisationsmikroskop untersucht.

### **2.4.2 Probenaufbereitung und -extraktion**

Stielfragmente der Crinoiden (0,5–5 g) wurden aus dem umgebenden Sedimentgestein herauspräpariert und ebenso wie Vergleichsproben des Sedimentgesteins gründlich mit Aceton gereinigt. Das Carbonat wurde durch tropfenweise Zugabe von 10 M Salzsäure aufgelöst, der Rückstand durch Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0, 4000 U/min, 1 h) abgetrennt, mit destilliertem Wasser säurefrei gewaschen und über Nacht im Exsikkator getrocknet (10 Torr, Raumtemperatur).

Die Rückstände wurden im Ultraschallbad (Bandelin SONOREX TK 30, 50 kHz, ca. 40 °C) sequentiell mit Toluol (3 × 5 ml), Methanol (3 × 5 ml) und DMSO (1 × 1 ml) extrahiert. Der unlösliche Rückstand wurde nach jedem Extraktionsschritt jeweils durch Zentrifugation (4000 U/min, 1 h) zurückgewonnen und vor der Extraktion mit einem weiteren Lösungsmittel im Exsikkator getrocknet. Die Extrakte wurden dann filtriert (Spritzenfilter: PTFE, 0,2 µm Porengröße, 13 mm Durchmesser, ReZist, Schleicher & Schuell) und im Stickstoffstrom auf genau 1 ml oder 10 ml eingeeengt.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit und für zusätzliche Extraktionsexperimente wurde ein Fragment der *Liliocrinus*-Probe in einem Achatmörser von Hand zu feinem Pulver gemahlen. Drei gleiche Anteile der homogenisierten Probe (jeweils 0,5 g) wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren extrahiert, während weitere 0,5 g der Probe ohne vorheriges Auflösen des Carbonats extrahiert wurden. Ein Modellpräparat (Hypericin in

Calciumcarbonat) wurde analog zu der homogenisierten *Liliocrinus*-Probe mit bzw. ohne Säurebehandlung mit Toluol, Methanol und DMSO extrahiert.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde eine Blindprobe in gleicher Weise wie die Fossil- und Sedimentproben aufbereitet. Dabei wurden alle zuvor eingesetzten Chemikalien verwendet und alle Schritte der Methode durchlaufen.

### 2.4.3 UV/Vis-Spektroskopie

Von allen Toluol-, Methanol- und DMSO-Aliquots der fossilen Proben wurden UV/Vis-Spektren (200–800 nm) mit einem Lange CADAS 100 Spektralphotometer aufgenommen. Zur Messung der relativ geringen Probenvolumina wurden Quarzglasküvetten (Halbmikroküvetten, Hellma) mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

### 2.4.4 Analytische und quantitative HPLC

Mit Hilfe der zuvor entwickelten HPLC-Methoden zur PAK-Trennung und zur Trennung von Phenanthroperylenchinonen (siehe Abschnitt 2.3) wurden alle Toluol-, Methanol- und DMSO-Aliquots analytisch und quantitativ untersucht. Dazu wurden die Toluolaliquots (100 µl der Probe) im Verhältnis 1:1 mit Acetonitril verdünnt, während die Methanol- und DMSO-Aliquots unverändert oder nach Verdünnung mit Methanol bzw. DMSO gemessen werden konnten. Aufgrund der geringen Analytkonzentrationen in den Toluolextrakten wurden die jeweils verbliebenen 900 µl der Aliquots im Stickstoffstrom um den Faktor ~30 aufkonzentriert, wie zuvor im Verhältnis 1:1 mit Acetonitril verdünnt und erneut gemessen. Durch wiederholte Chromatographie der aufkonzentrierten Toluolextrakte konnte schließlich bei jeweils einer Probe von *Liliocrinus* und *Carnallicrinus* (Li 1 und Ch 10) die Hauptverbindung isoliert werden. Dabei wurden die relevanten Fraktionen aufgesammelt und anschließend im Exsikkator getrocknet.

Die quantitative Bestimmung von Hypericin, Desmethylhypericin, Fringelit F und HHPP wurde mit Hilfe externer Standards durchgeführt. Dabei wurden die Standardlösungen von Fringelit F auch zur Quantifizierung von Desmethylhypericin verwendet. Letztere Verbindung stand nicht als Referenzverbindung zur Verfügung, zeigt aber vergleichbare Absorptionseigenschaften wie Fringelit F. Alle Verbindungen wurden anhand der Peakflächen quantifiziert. Da bei Fringelit F und Desmethylhypericin keine vollständige

Trennung erreicht werden konnte, wurde von diesen Verbindungen zunächst die Gesamtkonzentration bestimmt. Anhand der Peakhöhe konnte dann die Konzentration von Fringelit F und durch Subtraktion dieses Wertes von der Gesamtkonzentration die Konzentration von Desmethylhypericin bestimmt werden. Die Reproduzierbarkeit der Bestimmung wurde durch wiederholte Analyse ( $n = 3$ ) der homogenisierten *Liliocrinus*-Probe ermittelt.

#### 2.4.5 Massenspektrometrie

Von allen Toluol-, Methanol- und DMSO-Aliquots wurden zunächst Übersichtsspektren mittels Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (LDI-MS) aufgenommen. Zur Bestimmung exakter Massen und zur Erzeugung strukturspezifischer Fragmentierungsmuster wurden dann ausgewählte Toluolextrakte und daraus isolierte Verbindungen mit Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrometrie (EI-MS) und ausgewählte Methanolextrakte mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS), ESI-Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) und ESI-Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) untersucht. Nachfolgend sind die Geräteparameter und MS-Bedingungen für die einzelnen Methoden aufgeführt. Nähere Einzelheiten zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ionisationsverfahren sind bei Gross (2004) beschrieben.

##### **LDI-MS**

LDI-Massenspektren wurden an einem Bruker Biflex Flugzeit-Massenspektrometer mit Pulsed Ion Extraktion im Reflektormodus durchgeführt. Dabei wurden Spektren im Bereich  $m/z$  50–1000 im positiv- und negativ-Ionen Modus aufgenommen. Die Extrakte wurden auf verchromte Probenräger oder Edelstahlprobenräger aufgetragen und mit nur wenig abgeschwächtem UV-Laser bestrahlt.

##### **EI-MS**

Hoch und niedrig aufgelöste 70 eV EI-Massenspektren wurden an einem JEOL JMS-700 Sektorfeld-Massenspektrometer aufgenommen. Zur Bestimmung exakter Massen wurde eine Auflösung von  $R = 5000$  verwendet und als interner Standard Perfluorkerosin eingesetzt.

### **ESI-MS und ESI-MS/MS**

Niedrig aufgelöste ESI-Massenspektren und ESI-Tandemmassenspektren im negativ-Ionen Modus wurden an einem Finnigan TSQ 700 Tripelquadrupol-Massenspektrometer mit einem MasCom nanoESI Interface aufgenommen. Dabei wurde eine Sprayspannung von 1,0 kV verwendet und die Desolvationskapillare bei 100 °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 im Stoßquadrupol bei einem Collision-Offset von 59 V eingesetzt.

### **ESI-FT-ICR-MS**

Die Bestimmung exakter Massen wurde durch ESI-FT-ICR-MS an einem Bruker Apex III Massenspektrometer mit einem 7 T Magneten vorgenommen (Bayer Industry Services, Leverkusen). Als externer Standard wurde ein Gemisch verschiedener Perfluorcarbonsäuren verwendet.

#### **2.4.6 Kernresonanzspektroskopie**

Ausgewählte Methanolextrakte wurden im Exsikkator vollständig eingedampft und jeweils in 0,5 ml deuteriertem Methanol gelöst. Die Messungen wurden dann an einem Bruker DRX 500 Gerät bei einer Resonanzfrequenz von 500 MHz durchgeführt und die Spektren auf das Lösungsmittelsignal kalibriert. Aufgrund der sehr geringen Konzentration der Pigmente in der Probenlösung waren Meßzeiten von mehreren Stunden und eine Unterdrückung des Wassersignals notwendig.

## 3 Ergebnisse

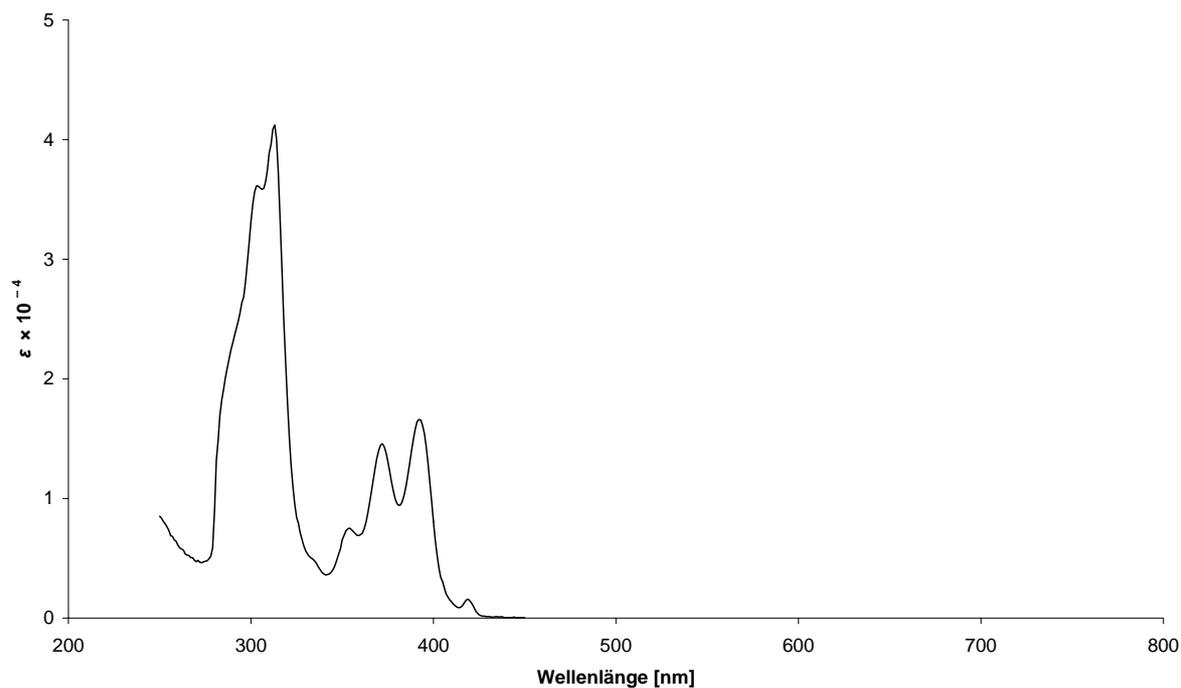
### 3.1 Synthese und Charakterisierung von HHPP

Die Synthese ergab HHPP (Ausbeute ca. 30 %) in kleinen, charakteristisch schwefelgelb gefärbten, prismatischen Kristallen, die im UV-Licht eine intensive grüne Fluoreszenz zeigen. Ein Schmelzpunkt kann nicht festgestellt werden, bei 200–205 °C beginnen die Kristalle jedoch zu sublimieren. Die Verbindung weist eine sehr geringe Löslichkeit in gängigen Lösungsmitteln auf; selbst in Toluol beträgt die maximale Löslichkeit nur ca. 0,2 mg/ml. In Cyclohexan, das verbreitet als Lösungsmittel zur Extraktion von PAKs eingesetzt wird, ist die Löslichkeit noch deutlich geringer.

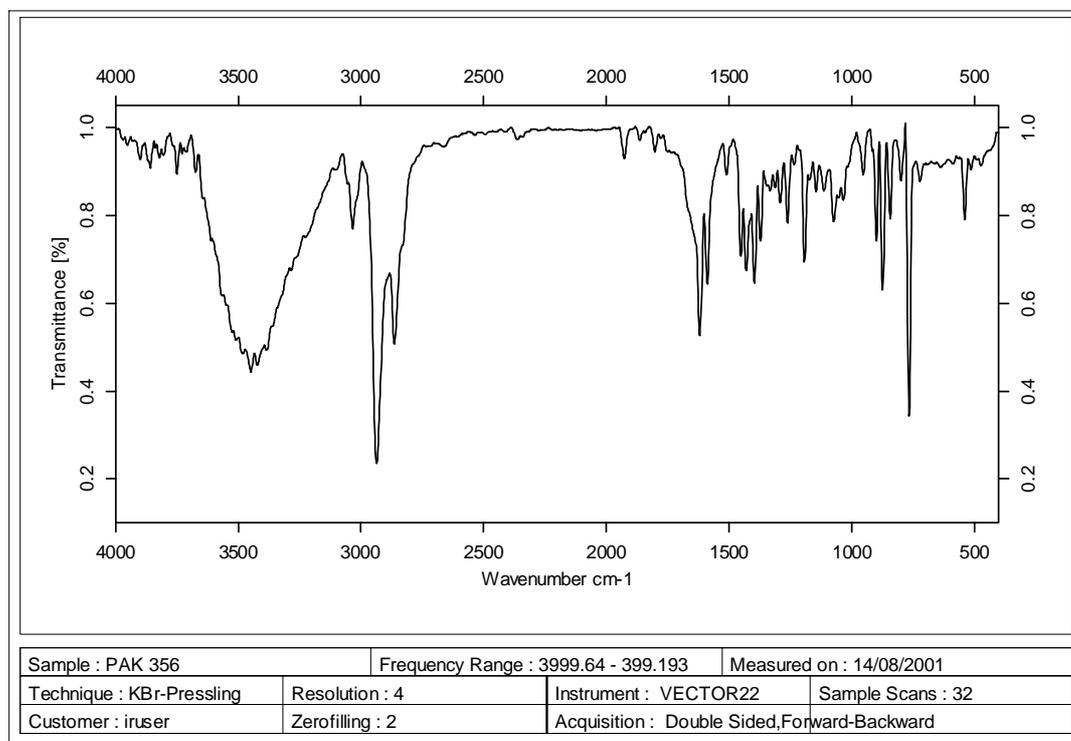
Das UV/Vis-Spektrum von HHPP (in Toluol) mit Absorptionsmaxima bei 419, 392, 372, 354, 334, 313 und 304 nm (Abb. 3-1) zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen Absorptionsspektrum von HHPP (in Benzol) (Brockmann und Dicke, 1970). Im FT-IR-Spektrum (KBr) treten charakteristische Banden bei  $\tilde{\nu} = 3034, 2936$  und  $2863 \text{ cm}^{-1}$  sowie bei  $\tilde{\nu} = 1619$  und  $1590 \text{ cm}^{-1}$  auf, die auf aromatische bzw. aliphatische (C–H)-Valenzschwingungen und auf aromatische (C=C)-Valenzschwingungen zurückgeführt werden können (Abb. 3-2).

Das Auftreten von sieben Protonen-Signalen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) belegt die symmetrische Struktur der Verbindung (Abb. 3-3). Die charakteristischen Signale im Aromatenbereich des Spektrums bei  $\delta = 8,93, 8,07, 7,94$  und  $7,81$  sowie die Signale der Methylenprotonen bei  $\delta = 3,37, 3,31$  und  $2,29$  bestätigen die vermutete Struktur. Ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von HHPP wurde aufgrund der schlechten Löslichkeit der Verbindung nicht aufgenommen.

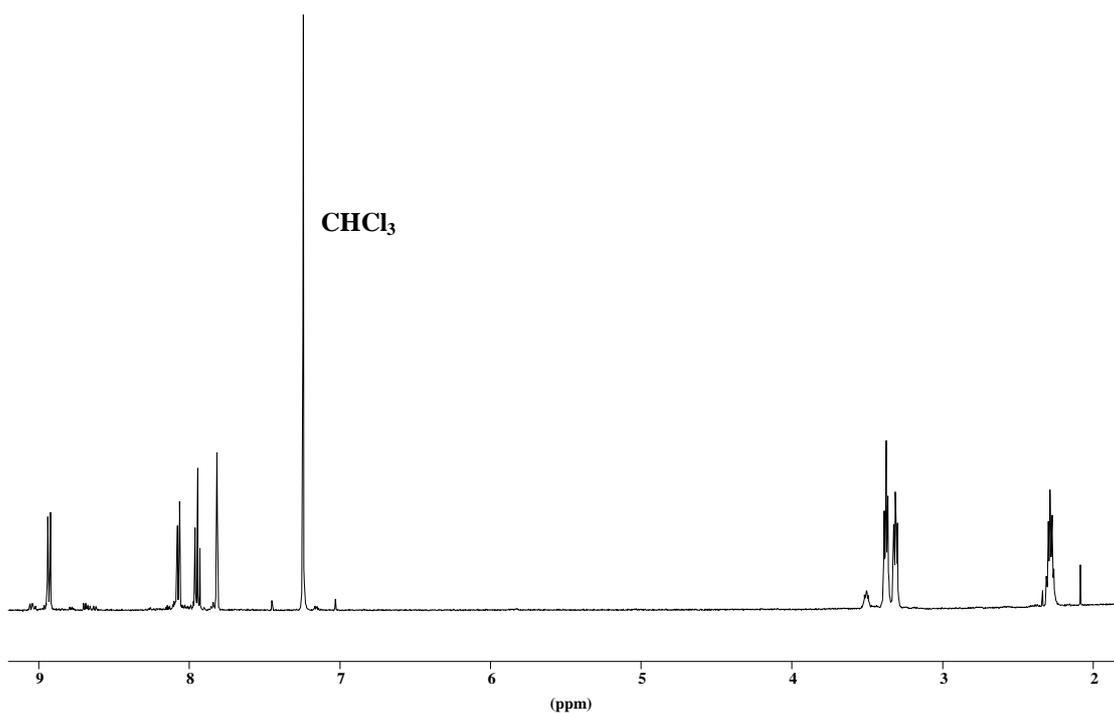
Bei der massenspektrometrischen Charakterisierung konnte im LDI-Spektrum nur das Molekülion  $\text{M}^+$  bei  $m/z$  356 und seine Isotopenpeaks festgestellt werden (Abb. 3-4). Im EI-Spektrum traten dagegen zusätzlich zum Molekülion in geringer Intensität noch einige Fragmentationen, das doppelt geladene Molekülion  $\text{M}^{2+}$  bei  $m/z$  178 und verschiedene doppelt geladene Fragmentationen auf (Abb. 3-5). Durch hochauflösende EI-MS konnten die Summenformeln für einige charakteristische Ionen bestimmt werden (Tab. 3-1).



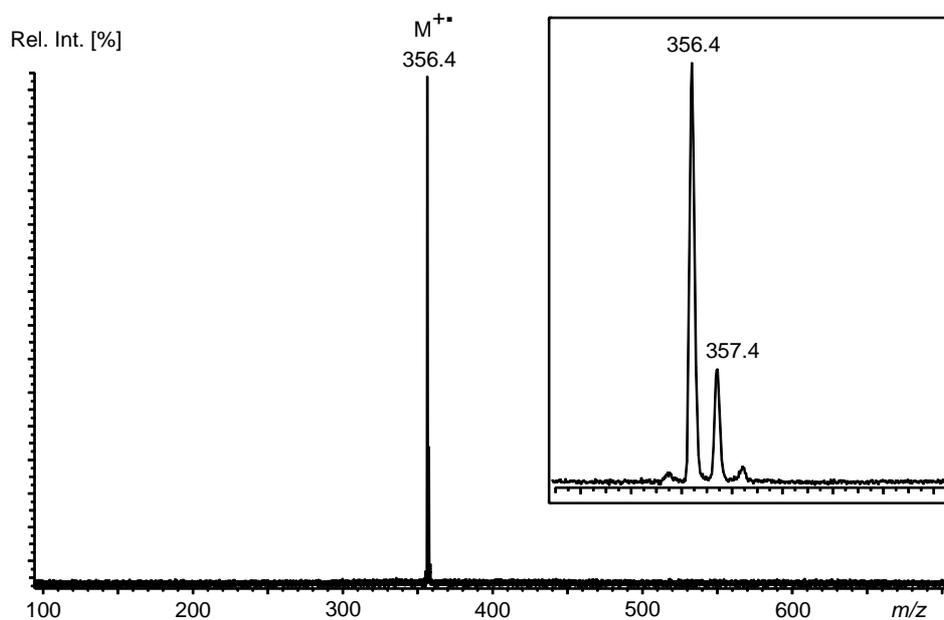
**Abb. 3-1:** UV/Vis-Spektrum von HHPP (Toluol).  $\lambda_{\text{max}}$  419 (1600), 392 (16600), 372 (14600), 354 (7500), 334 (Schulter, 4900), 313 (41200), 304 (36100) nm ( $\epsilon$ ).



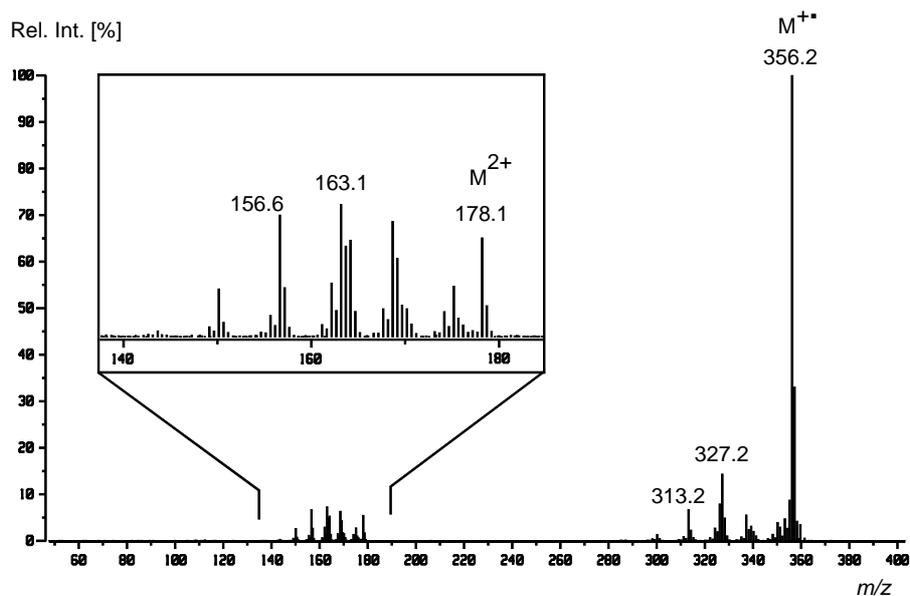
**Abb. 3-2:** FT-IR-Spektrum von HHPP (KBr).  $\tilde{\nu}$  3034, 2936, 2863, 1619, 1590, 768  $\text{cm}^{-1}$ .



**Abb. 3-3:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von HHPP (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  8,93 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 8,07 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 7,94 (dd,  $J = 7,4, 8,0$  Hz, 2H), 7,81 (s, 2H), 3,37 (t,  $J = 6,0$  Hz, 4H), 3,31 (t,  $J = 6,0$  Hz, 4H), 2,29 (q,  $J = 6,0$  Hz, 4H) ppm.



**Abb. 3-4:** LDI-Massenspektrum (positive Ionen) von HHPP. Der Ausschnitt zeigt das gespreizte Signal des Molekülions mit Isotopenpeaks.

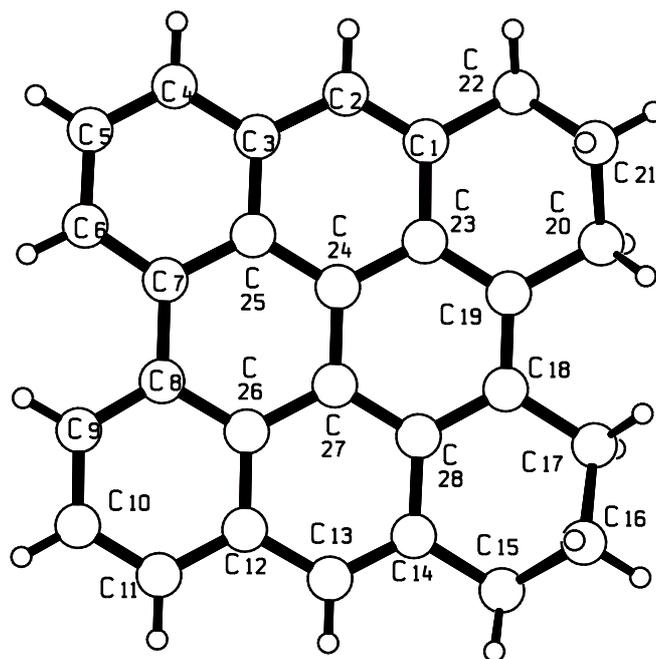


**Abb. 3-5:** 70 eV EI-Massenspektrum von HHPP. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung des Bereichs zwischen  $m/z$  140 und 180 mit doppelt geladenen Ionen.  $m/z$  (%) 356 (100)  $M^{+}$ , 355 (9), 327 (14), 313 (7), 178 (5).

**Tab. 3-1:** HR-EI-MS-Daten von HHPP.

| $m/z$ , gemessen | Ion              | Summenformel              | $m/z$ , berechnet | Fehler [ $10^{-3}$ u] |
|------------------|------------------|---------------------------|-------------------|-----------------------|
| 356,1541         | $M^{+}$          | $C_{28}H_{20}$            | 356,1565          | -2,4                  |
| 355,1469         | $[M-H]^{+}$      | $C_{28}H_{19}$            | 355,1487          | -1,8                  |
| 327,1155         | $[M-C_2H_5]^{+}$ | $C_{26}H_{15}$            | 327,1174          | -1,9                  |
| 313,1017         | $[M-C_3H_7]^{+}$ | $C_{25}H_{13}$            | 313,1017          | 0,0                   |
| 178,0768         | $M^{2+}$         | $0,5 \times C_{28}H_{20}$ | 178,0782          | -1,4                  |

Berechnung der theoretischen  $m/z$ -Werte anhand der exakten Isotopenmassen:  $^1H$ : 1,007825 u,  $^{12}C$ : 12,000000 u (Pretsch et al., 2000).



**Abb. 3-6:** Kristallstruktur von HHPP.

Die Kristallstruktur von HHPP ist nahezu planar (Abb. 3-6). Lediglich in den aliphatischen Einheiten sind die Zentralatome C16 und C21 der Trimethylengruppen in gleicher Richtung aus der aromatischen Ringebeine um jeweils  $48^\circ$  herausgedreht. Die Atome C21 und C22 in einer dieser Trimethylengruppen weisen dabei eine Lagefehlordnung (85:15 %) auf, wobei der kleinere Anteil von C21 in entgegengesetzter Richtung aus der aromatischen Ringebeine um  $46^\circ$  herausgedreht ist. Die Bindungslängen zwischen den Atomen C14, C15, C16, C17, C18 bzw. C19, C20, C21, C22, C1 liegen mit 1,501–1,529 Å im Bereich von C–C-Einfachbindungen (Tab. 3-2), während die übrigen Bindungslängen der Verbindung mit 1,350–1,464 Å im Bereich von aromatischen C–C-Bindungen liegen. Detaillierte kristallographische Daten von HHPP sind in Tab. 7-1 zusammengestellt und im Cambridge Crystallographic Data Centre unter der Nummer CCDC 171945 hinterlegt.

**Tab. 3-2:** Ausgewählte Bindungslängen von HHPP.

| Bindung | Bindungslänge [Å] | Bindung | Bindungslänge [Å] |
|---------|-------------------|---------|-------------------|
| C1–C22  | 1,502(2)          | C17–C18 | 1,5127(16)        |
| C14–C15 | 1,5006(17)        | C19–C20 | 1,5161(16)        |
| C15–C16 | 1,511(2)          | C20–C21 | 1,529(2)          |
| C16–C17 | 1,515(2)          | C21–C22 | 1,510(2)          |

## 3.2 HPLC-Methodenentwicklung

### 3.2.1 HPLC-Methode zur Trennung der PAKs

Da PAKs in Sedimenten ubiquitär verbreitet sind und zudem wegen ihrer teilweise stark krebserzeugenden Wirkung als Umweltschadstoffe bekannt sind, konnte bei der Entwicklung einer HPLC-Methode auf ein routinemäßig eingesetztes Verfahren auf der Basis eines Acetonitrilgradienten und einer C-18 Umkehrphase als Säulenmaterial zurückgegriffen werden (Poster et al., 1998). Dieses wurde dann mit Hilfe eines PAK-Mischstandards und der zuvor synthetisierten HHPP-Referenz (siehe Abschnitt 3.1) soweit modifiziert, bis alle Verbindungen aufgetrennt werden konnten. Für die Messungen war es erforderlich, die Toluolaliquots mit Acetonitril zu verdünnen, da bei der Messung unverdünnter Toluolproben eine starke Zunahme der Peakbreiten festzustellen war. Zwischen Konzentration an HHPP und gemessener Peakfläche kann ein linearer Zusammenhang festgestellt werden (Tab. 3-3).

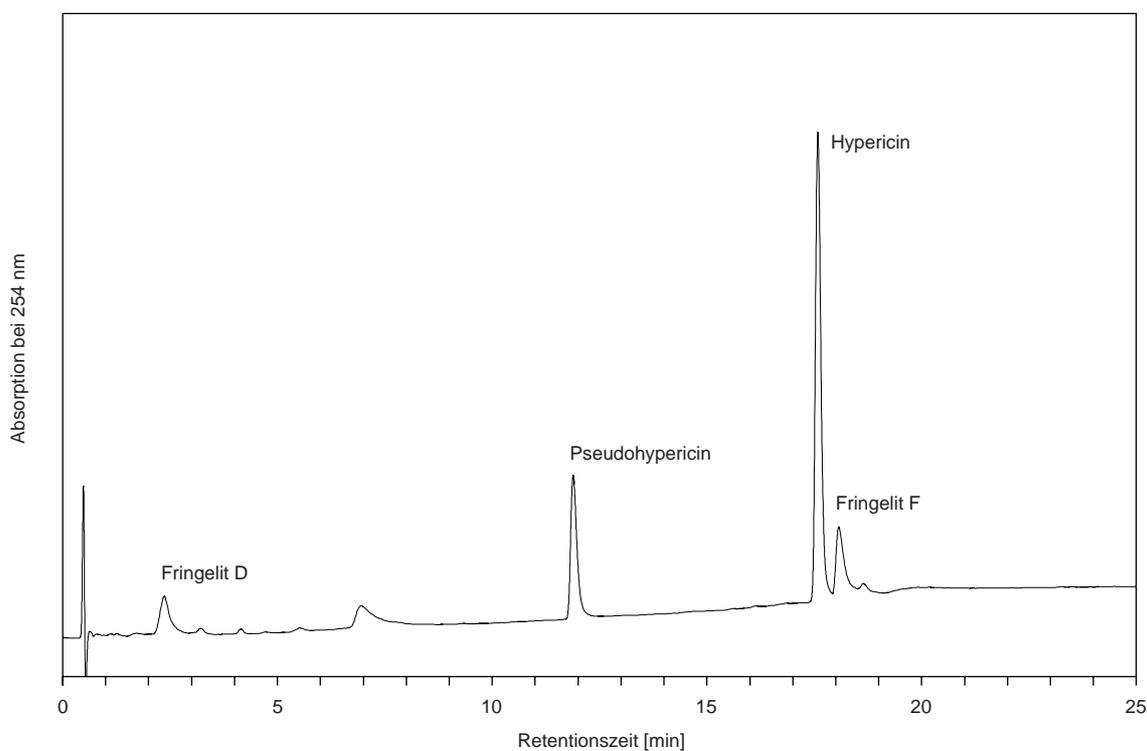
**Tab. 3-3:** Kalibrier- und Validierungsparameter der HPLC-Bestimmung von HHPP.

|                                |                       |
|--------------------------------|-----------------------|
| Kalibrierfunktion (Peakfläche) | $y = 4,5184x - 0,179$ |
| Korrelationskoeffizient        | 1,0000                |
| Nachweisgrenze                 | 0,1 µg/ml             |
| Bestimmungsgrenze              | 0,2 µg/ml             |

### 3.2.2 HPLC-Methode zur Trennung der Phenanthroperylenchinone

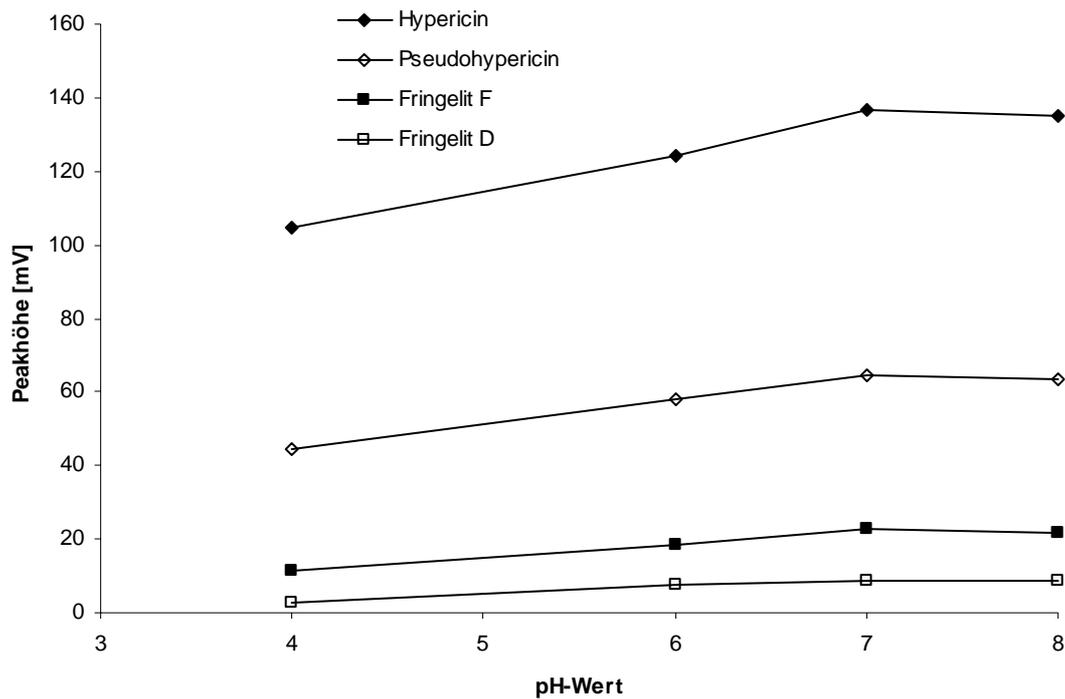
In bisherigen Untersuchungen über die Fringelit-Pigmente finden sich nahezu keine Angaben zur chromatographischen Trennung dieser Verbindungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein neues Verfahren zur Trennung verschiedener Phenanthroperylenchinone entwickelt. Anhaltspunkte boten dabei bestehende HPLC-Methoden zur Trennung der Phenanthroperylenchinone Hypericin und Pseudohypericin aus dem Johanniskraut (*Hypericum perforatum*). Diese Verbindungen sind mit den Fringeliten strukturell nahe verwandt und wurden in den letzten Jahren aufgrund ihrer pharmakologischen Bedeutung intensiv untersucht (Falk, 1999). Die Trennungen wurden im allgemeinen unter Verwendung von Gradientensystemen, bestehend aus einem Phosphatpuffer sowie Methanol und Acetonitril, im sauren pH-Bereich durchgeführt, wobei als stationäre Phasen C-18 Umkehrphasen zum Einsatz kamen (Brolis et al., 1998). Teilweise wurden Trennungen aber

auch mit Triethylammoniumacetat als Ionenpaarreagenz bei neutralem pH erreicht (Piperopoulos et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden die zur Verfügung stehenden Referenzverbindungen Fringelite D, Fringelit F, Hypericin und Pseudohypericin ebenfalls bei neutralem pH chromatographiert; abweichend von bestehenden Trennungsverfahren wurde allerdings statt Triethylammoniumacetat Natriumacetat als Ionenpaarreagenz verwendet. Um eine Trennung von Hypericin und Fringelit F, die beide sehr ähnliche chromatographische Eigenschaften zeigten, bei möglichst kurzen Retentionszeiten zu erreichen, wurde außerdem ein besonders feinkörniges Säulenmaterial (3  $\mu\text{m}$ ) verwendet. Ein typisches Chromatogramm einer solchen Trennung ist in Abb. 3-7 dargestellt.



**Abb. 3-7:** Chromatogramm eines Phenanthroperylenchinon-Mischstandards.

Bei den untersuchten Phenanthroperylenchinonen wurde eine starke Abhängigkeit der Peakform vom pH-Wert der mobilen Phase festgestellt (Abb. 3-8). Dabei zeigten alle Verbindungen bei unveränderten Retentionszeiten und Peakflächen bei einem pH 7 die größten Peakhöhen bzw. die geringsten Peakbreiten. Um eine möglichst hohe Auflösung der Verbindungen zu ermöglichen, wurden daher alle weiteren Trennungen bei diesem pH-Wert durchgeführt.



**Abb. 3-8:** Abhängigkeit der Peakhöhe (Absorption bei 254 nm) vom pH-Wert der mobilen Phase.

**Tab. 3-4:** Kalibrier- und Validierungsparameter der HPLC-Bestimmung von Fringelit F.

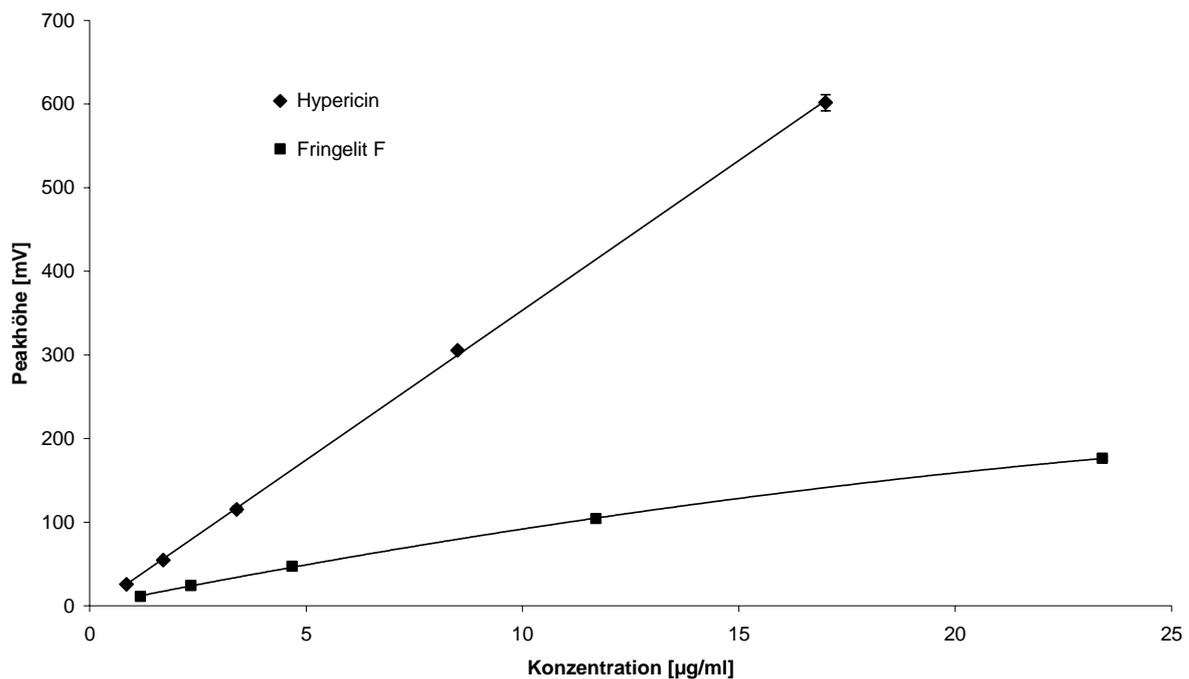
|                                      |                                     |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Kalibrierfunktion (Peakfläche)       | $y = 2,7109x - 0,2372$              |
| Korrelationskoeffizient (Peakfläche) | 1,0000                              |
| Kalibrierfunktion (Peakhöhe)         | $y = -0,1223x^2 + 10,389x + 0,1135$ |
| Korrelationskoeffizient (Peakhöhe)   | 0,9999                              |
| Nachweisgrenze                       | 0,1 µg/ml                           |
| Bestimmungsgrenze                    | 0,2 µg/ml                           |

**Tab. 3-5:** Kalibrier- und Validierungsparameter der HPLC-Bestimmung von Hypericin.

|                                |                        |
|--------------------------------|------------------------|
| Kalibrierfunktion (Peakfläche) | $y = 5,9225x - 0,7733$ |
| Korrelationskoeffizient        | 0,9999                 |
| Nachweisgrenze                 | 0,1 µg/ml              |
| Bestimmungsgrenze              | 0,2 µg/ml              |

Bei Hypericin wie auch bei Fringelit F besteht zwischen Konzentration und gemessener Peakfläche ein linearer Zusammenhang (Tab. 3-4 und Tab. 3-5). Im Unterschied dazu kann

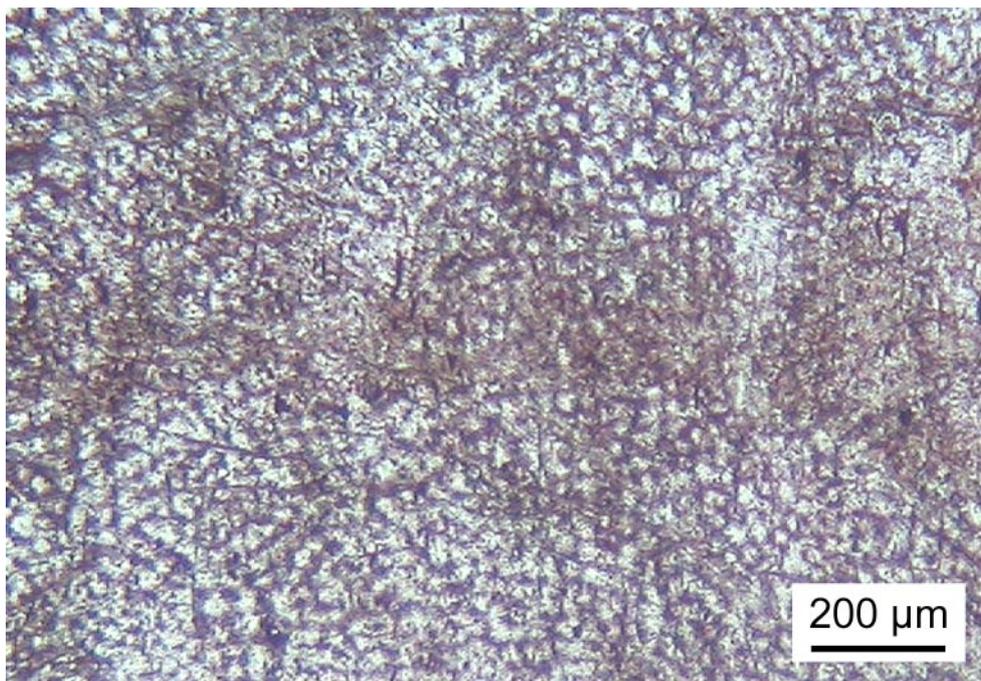
eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Peakhöhe nur bei Hypericin festgestellt werden. Bei Fringelit F nimmt mit steigender Konzentration die Peakhöhe nur unterproportional zu (Abb. 3-9) bzw. in gleichem Maße die Peakbreite zu. Dies führt bei höheren Konzentrationen und gleichbleibender Lage des Peakendes schließlich zu einer Überlagerung mit dem Hypericin-Peak. Um eine Auftrennung beider Verbindungen zu ermöglichen, mußten daher Proben mit hoher Konzentration an Fringelit F entsprechend verdünnt werden.



**Abb. 3-9:** Abhängigkeit der Peakhöhe (Absorption bei 254 nm, pH-Wert der mobilen Phase: 7,0 ) von der Konzentration der Probenlösung bei Hypericin und Fringelit F.

### 3.3 Mikroskopische Untersuchung der Crinoiden

Die Analyse der Crinoiden-Dünnschliffe (*Liliocrinus* und *Carnallicrinus*) ergab, daß die Färbung der Crinoiden durch unzählige nur wenige Mikrometer große Einschlüsse hervorgerufen wird, die fein verteilt in der Calcitmatrix der Fossilien vorkommen. Die Einschlüsse weisen dabei eine unregelmäßige Form auf und zeigen überwiegend eine intensive violette Eigenfarbe. Vor allem bei *Liliocrinus* kann festgestellt werden, daß die Einschlüsse nicht regellos in der Calcitmatrix vorkommen, sondern entlang eines gitterartigen Musters in dem Fossil angeordnet sind (Abb. 3-10).



**Abb. 3-10:** Dünnschliffaufnahme (Längsschnitt) eines Stielglieds von *Liliocrinus* (NMB M 8908) mit gitterartig angeordneten organischen Einschlüssen in der Calcitmatrix.

### 3.4 Charakterisierung der fossilen Verbindungen

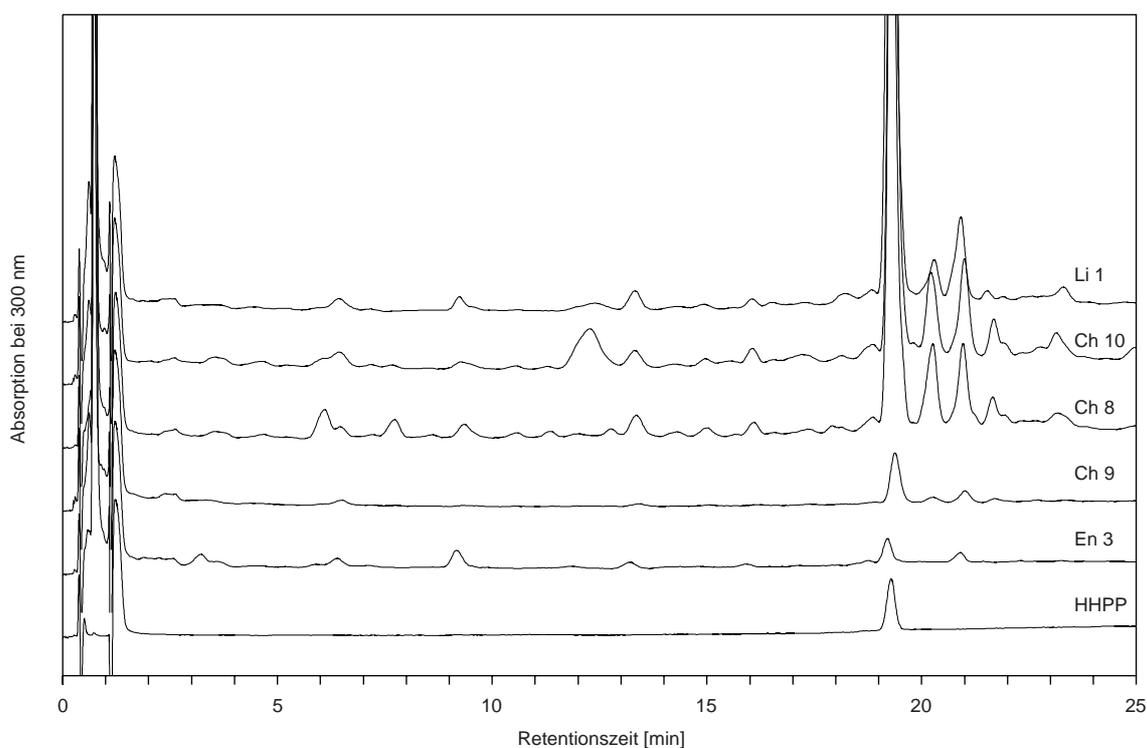
#### 3.4.1 Toluolextrakte

Mit Toluol als Lösungsmittel konnten aus den Rückständen der Crinoiden noch keine violetten Pigmentanteile herausgelöst werden. Die Toluolextrakte der untersuchten Fossil- und Sedimentproben waren überwiegend farblos bis leicht gelblich; lediglich die Proben Li 1, Ch 8 und Ch 10 zeigten eine schwache, rötliche Färbung. Die UV/Vis-Spektren der Toluolextrakte zeigten überwiegend einen relativ unspezifischen Verlauf (siehe Abschnitt 7.2); überlagert von einem hohen Untergrund zeichneten sich bei einzelnen Crinoidenproben aber teilweise die Hauptabsorptionsmaxima von HHPP (siehe Abschnitt 3.1) ab. Im sichtbaren Bereich konnten bei der Probe Ch 10 (siehe Abb. 7-19) (weniger deutlich auch bei Ch 8) charakteristische Absorptionsbanden (Absorptionsmaxima bei 542 und 503 nm) festgestellt werden<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> Es konnte kein Beleg dafür gefunden werden, daß es sich bei der zugrundeliegenden Verbindung um einen Vertreter der Phenanthroperylenechinone handelt. Anhand der LDI-Massenspektren und zusätzlicher HPLC-Messungen kann ausgeschlossen werden, daß es sich um eine der Referenzverbindungen handelt, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Bei der HPLC-Untersuchung der Toluolextrakte konnten in allen Lösungen von *Liliocrinus munsterianus*, *Carnallicrinus carnalli* und *Encrinus cf. spinosus* eine Hauptverbindung mit einer Retentionszeit von 19,3 min festgestellt werden. In den entsprechenden Lösungen der Sedimentproben und jener von *Encrinus liliiformis* konnte diese Verbindung dagegen nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Konzentration der Verbindung in den Extrakten wurden alle Toluolextrakte um den Faktor  $\sim 30$  aufkonzentriert. Bei der erneuten Messung konnten zahlreiche weitere Verbindungen in den Lösungen festgestellt (Abb. 3-11) und die Hauptverbindung aus jeweils einer Probe von *Liliocrinus* (Li 1) und *Carnallicrinus* (Ch 10) isoliert werden. Für die Referenzverbindung HHPP und die fossile Hauptverbindung wurden jeweils übereinstimmende Retentionszeiten gemessen (Abb. 3-11).



**Abb. 3-11:** Chromatogramme ausgewählter Toluolextrakte von *Liliocrinus*, *Encrinus* und *Carnallicrinus*. Aufkonzentrierte (ca.  $\times 30$ ) 1 ml Aliquots der fossilen Proben.

Analog zum Auftreten der Hauptverbindung in den Chromatogrammen konnte in den LDI-Massenspektren in allen Extrakten von *Liliocrinus munsterianus*, *Carnallicrinus carnalli* und *Encrinus cf. spinosus* ein deutlicher Peak (positive Ionen) bei  $m/z$  356 (entsprechend  $M^+$  von HHPP) festgestellt werden, der je nach Probe von kleineren Peaks bei  $m/z$  370 und 384 begleitet wurde (siehe Abschnitt 7.3). In den Sedimentproben und jener von *Encrinus liliiformis* fehlten diese Signale dagegen. Vor allem bei den Sedimentproben traten im Bereich  $m/z$  300–600 allerdings zahlreiche weitere Signale auf, die auf eine unüberschaubar

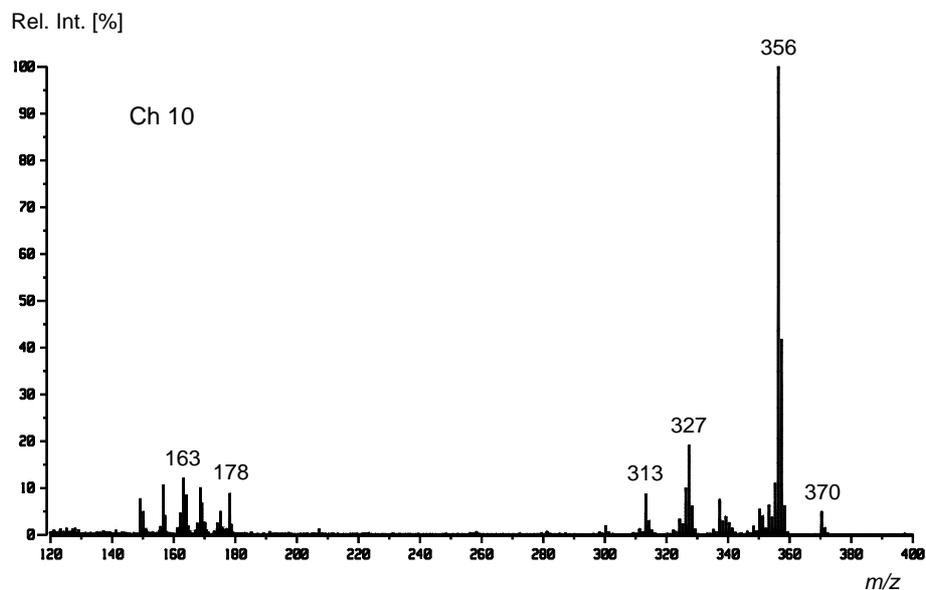
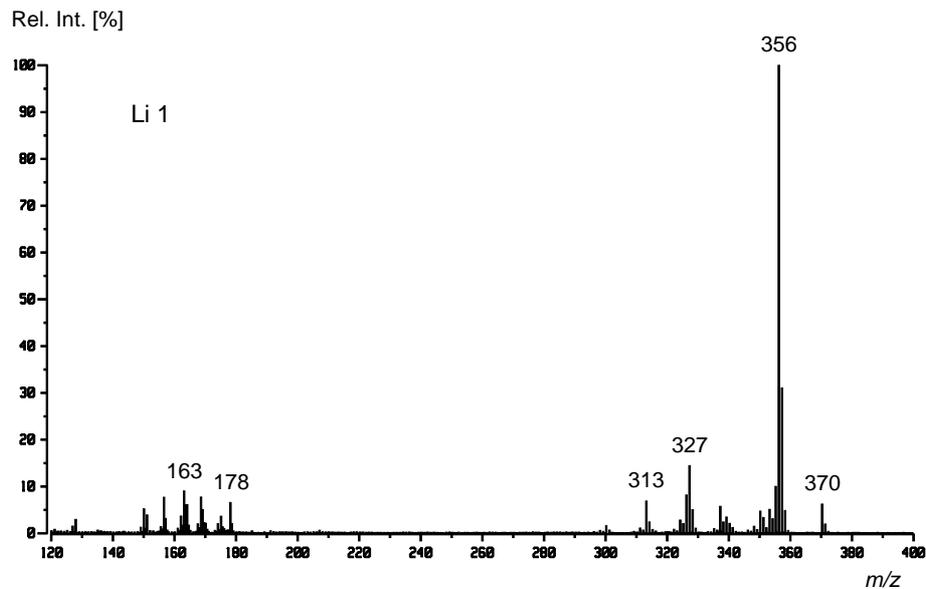
große Zahl von Verbindungen in diesen Proben schließen ließen. Im negativ-Ionen Modus konnten außer bei den Proben Li 1 und Ch 10 neben dem Hintergrundrauschen nur wenige Signale gemessen werden.

Die Bestimmung exakter Massen durch hochauflösende EI-MS (ausgewählte Proben) ermöglichte schließlich die Berechnung von Summenformeln für mehrere der festgestellten Verbindungen (Tab. 3-6). Die zuvor isolierte Hauptverbindung konnte durch direkten Vergleich der EI-Massenspektren von fossilen Proben und synthetischer Referenz eindeutig als HHPP identifiziert werden (Abb. 3-5, Abb. 3-12).

**Tab. 3-6:** HR-EI-MS-Daten ausgewählter Toluolextrakte.

| Probe | $m/z$ , gemessen | Formel                          | $m/z$ , berechnet | Fehler [ $10^{-3}$ u] |
|-------|------------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------|
| Li 1  | 356,1565         | C <sub>28</sub> H <sub>20</sub> | 356,1565          | 0,0                   |
|       | 370,1729         | C <sub>29</sub> H <sub>22</sub> | 370,1722          | +0,7                  |
| Ch 6  | 356,1570         | C <sub>28</sub> H <sub>20</sub> | 356,1565          | +0,5                  |
| Ch 8  | 356,1558         | C <sub>28</sub> H <sub>20</sub> | 356,1565          | -0,7                  |
|       | 368,1559         | C <sub>29</sub> H <sub>20</sub> | 368,1565          | -0,6                  |
|       | 370,1703         | C <sub>29</sub> H <sub>22</sub> | 370,1722          | -1,9                  |
| Ch 9  | 356,1582         | C <sub>28</sub> H <sub>20</sub> | 356,1565          | +1,7                  |
| Ch 10 | 356,1572         | C <sub>28</sub> H <sub>20</sub> | 356,1565          | +0,7                  |
|       | 368,1574         | C <sub>29</sub> H <sub>20</sub> | 368,1565          | +0,9                  |
|       | 370,1700         | C <sub>29</sub> H <sub>22</sub> | 370,1722          | -2,2                  |
|       | 382,1741         | C <sub>30</sub> H <sub>22</sub> | 382,1722          | +1,9                  |
|       | 384,1886         | C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> | 384,1878          | +0,8                  |
|       | 396,1884         | C <sub>31</sub> H <sub>24</sub> | 396,1878          | +0,6                  |

Berechnung der theoretischen  $m/z$ -Werte anhand der exakten Isotopenmassen: <sup>1</sup>H: 1,007825 u, <sup>12</sup>C: 12,000000 u (Pretsch et al., 2000).



**Abb. 3-12:** 70 eV EI-Massenspektren des isolierten Kohlenwasserstoffs aus *Liliocrinus* (Li 1) und *Carnallicrinus* (Ch 10). Das Signal bei  $m/z$  370 stammt von einem begleitenden PAK, der nicht vollständig abgetrennt werden konnte.

### 3.4.2 Methanolextrakte

Die Methanolextrakte der untersuchten Fossilproben von *Liliocrinus munsterianus*, *Carnallicrinus carnalli* und *Encrinus cf. spinosus* zeigten übereinstimmend eine mehr oder weniger deutliche rosa bis purpurne Färbung (Abb. 3-13); bei den Methanolextrakten von *Liliocrinus* war diese Färbung so intensiv, daß die Lösungen nur auf ein Aliquotvolumen von 10 ml eingengt wurden (in allen anderen Fällen 1 ml). Die Methanolextrakte der

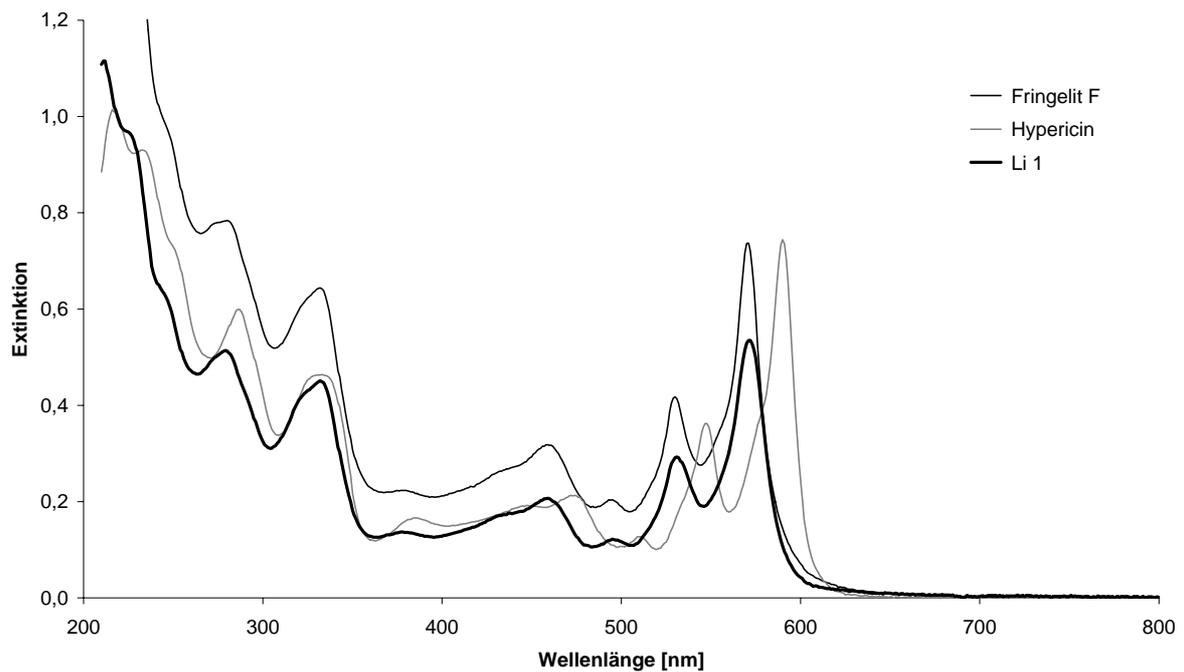
Sedimentproben und jenes von *Encrinus liliiformis* wiesen dagegen eine gelbliche Färbung auf.

Die UV/Vis-Messungen der Methanolextrakte ergaben für die rosa gefärbten Lösungen durchgehend sehr ähnliche Spektren mit charakteristischen Absorptionsbanden. Die Absorptionsmaxima lagen im sichtbaren Wellenlängenbereich jeweils bei 571, 530, 495, 458 nm und im UV-Bereich bei 332 und 279 nm (siehe Abschnitt 7.2). Die gelblich gefärbten Lösungen der Sedimentproben und von *Encrinus liliiformis* zeigten dagegen keine charakteristischen Absorptionsbanden, sondern eine kontinuierlich zu längeren Wellenlängen hin abnehmende Absorption (Abschnitt 7.2). Durch Vergleich der Absorptionsbanden der rosa gefärbten Lösungen mit den entsprechenden Banden der Phenanthroperylenechinon-Referenzen konnte auf eine enge Verwandtschaft der fossilen Pigmente zu dieser Stoffgruppe geschlossen werden (Abb. 3-14). Dabei zeigten die Spektren der fossilen Pigmente vor allem im Vergleich zu Fringelit F (Absorptionsmaxima bei 571, 530, 495, 458, 332, 280 nm) eine große Übereinstimmung. Eine eindeutige Bestimmung war allerdings nicht möglich, da die Absorptionsspektren verschiedener Phenanthroperylenechinone sich nur geringfügig unterscheiden oder wie im Fall von Hypericin und Pseudohypericin sogar nahezu identisch sind.

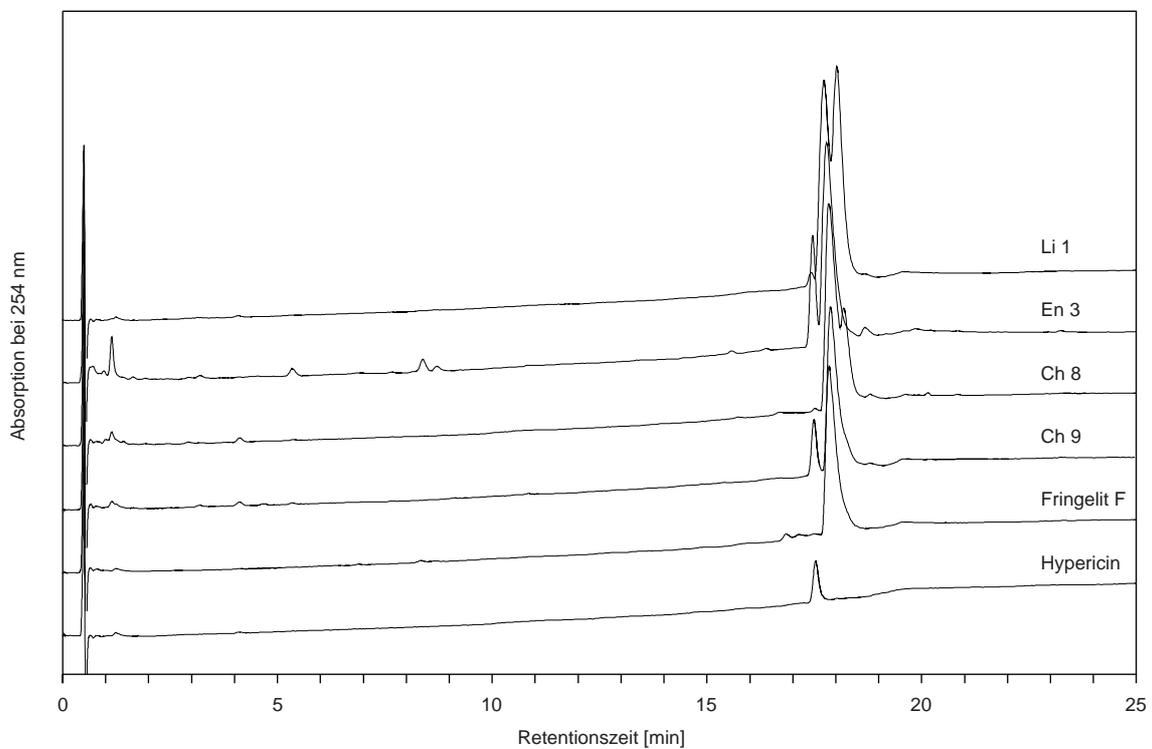
Bei der HPLC-Untersuchung der Methanolextrakte mit der zuvor entwickelten Methode zur Trennung verschiedener Phenanthroperylenechinone konnten in den rosa gefärbten Lösungen im wesentlichen drei verschiedene Verbindungen festgestellt werden (Abb. 3-15), wobei allerdings aufgrund sehr ähnlicher chromatographischer Eigenschaften (Retentionszeiten: 17,5, 17,8, 18,1 min) eine vollständige Auftrennung (Basislinientrennung) nicht möglich war. In den entsprechenden Lösungen der Sedimentproben und jener von *Encrinus liliiformis* konnten diese Verbindungen nicht nachgewiesen werden. Die Messung der Referenzverbindungen ergab jeweils übereinstimmende Retentionszeiten für Hypericin und die fossile Verbindung mit der kürzesten Retentionszeit sowie für Fringelit F und die darauf folgende fossile Verbindung (Abb. 3-15).



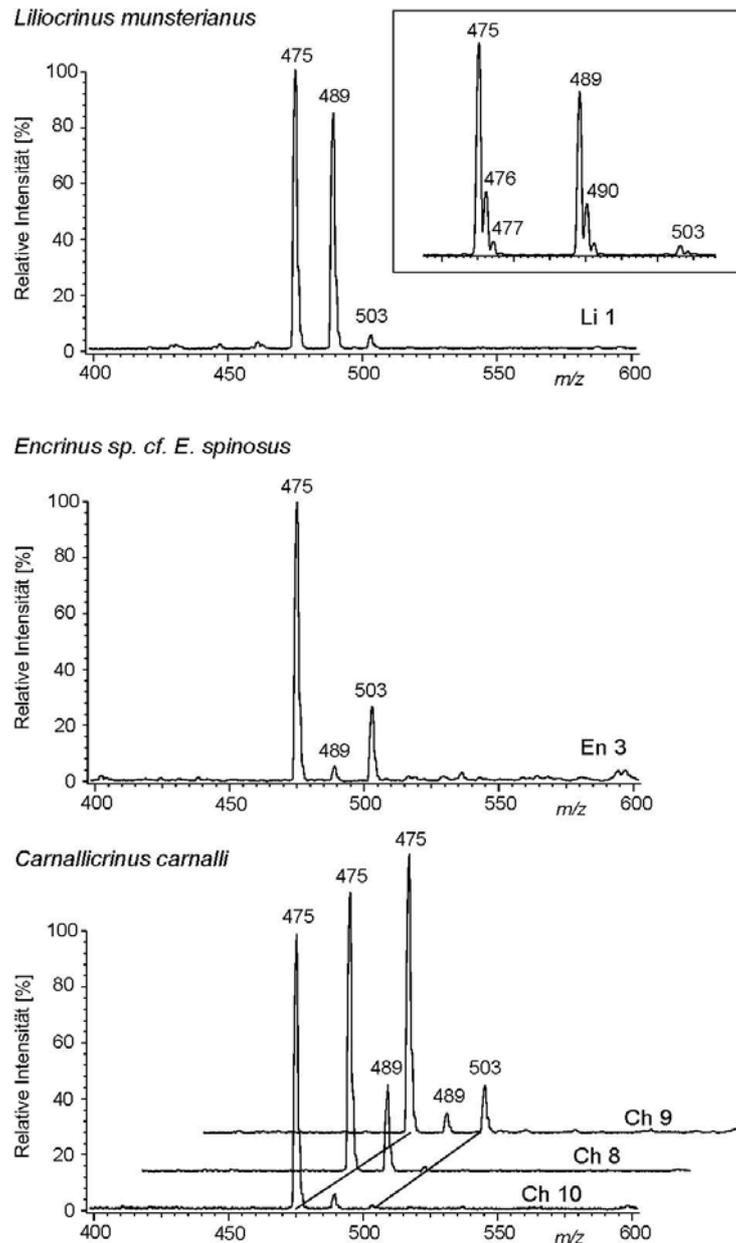
**Abb. 3-13:** Methanolextrakt von *Liliocrinus*.



**Abb. 3-14:** UV/Vis-Spektrum eines Methanolextrakts von *Liliocrinus* (Probe Li 1) und Vergleichsspektren von Fringelit F und Hypericin in Methanol.



**Abb. 3-15:** Chromatogramme ausgewählter Methanolextrakte von *Liliocrinus*, *Encrinus* und *Carnallicrinus* sowie Standards der Referenzverbindungen Fringelit F und Hypericin. Probe Li 1, 10 ml Aliquot; Probe En 3, 1 ml Aliquot; Probe Ch 8, 1 ml Aliquot 1:1 mit Methanol verdünnt; Probe Ch 9, 1 ml Aliquot.



**Abb. 3-16:** ESI-Massenspektren (negative Ionen) ausgewählter Methanolextrakte von *Liliocrinus*, *Encrinus* und *Carnallicrinus*.

Anhand der LDI-Massenspektren der Methanolextrakte konnten die Befunde aus den HPLC-Untersuchungen weiter unterstützt werden. Bei allen rosa gefärbten Lösungen trat im negativ-Ionen Modus ein Basispeak bei  $m/z$  475 (entsprechend  $[M-H]^-$  von Fringelit F) auf, der je nach Probe von kleineren Peaks bei  $m/z$  489 und 503 (letzterer entsprechend  $[M-H]^-$  von Hypericin) begleitet wurde (siehe Abschnitt 7.3). Durch ergänzende Messungen ausgewählter Proben mit ESI-MS im negativ-Ionen Modus konnten übereinstimmende Ergebnisse erhalten werden (Abb. 3-16). Im positiv-Ionen Modus traten in den LDI-Massenspektren vor allem bei

den Crinoidenproben einige zusätzliche Signale auf. Eine Zuordnung zu bestimmten Verbindungen war im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich.

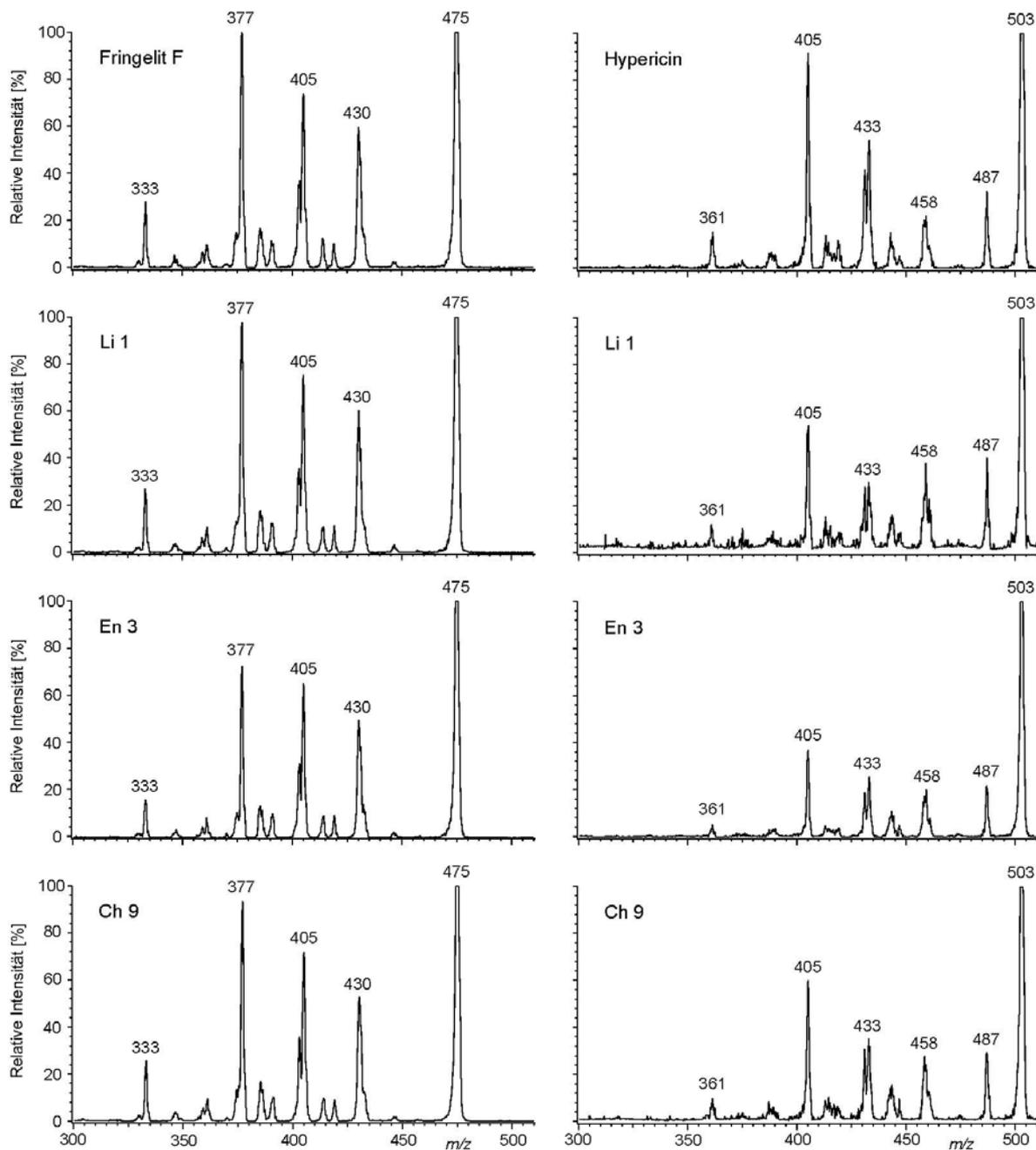
Für eine eindeutige Identifizierung der Pigmente wurden einzelne Proben zusätzlich mit ESI-FT-ICR-MS und ESI-MS/MS untersucht, wodurch die Bestimmung exakter Massen (Tab. 3-7) ermöglicht wurde und strukturspezifische Fragmentierungsmuster (Abb. 3-17 und Abb. 3-18) erzeugt werden konnten. Anhand der ermittelten Summenformeln und durch direkten Vergleich mit den Tandemmassenspektren der Referenzverbindungen konnten die Hauptverbindungen der Methanolextrakte schließlich als Fringelit F, Desmethylhypericin und Hypericin bestimmt werden.

**Tab. 3-7:** ESI-FT-ICR-MS-Daten ausgewählter Methanolextrakte.

| Probe | <i>m/z</i> , gemessen | Formel   | <i>m/z</i> , berechnet | Fehler [ $10^{-3}$ u] |
|-------|-----------------------|--|------------------------|-----------------------|
| Li 1  | 475,04583             | C <sub>28</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> | 475,04594              | -0,11                 |
|       | 489,06141             | C <sub>29</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub> | 489,06159              | -0,18                 |
|       | 503,07728             | C <sub>30</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> | 503,07724              | +0,04                 |
| Ch 8  | 475,04536             | C <sub>28</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> | 475,04594              | -0,58                 |
|       | 489,06133             | C <sub>29</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub> | 489,06159              | -0,26                 |
|       | 503,07723             | C <sub>30</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> | 503,07724              | -0,01                 |
| Ch 9  | 475,04507             | C <sub>28</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> | 475,04594              | -0,87                 |
|       | 489,06121             | C <sub>29</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub> | 489,06159              | -0,38                 |
|       | 503,07670             | C <sub>30</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> | 503,07724              | -0,54                 |

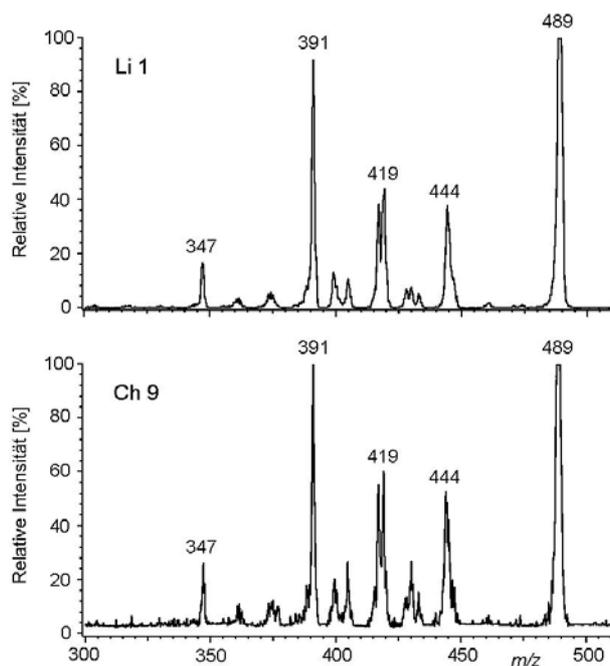
Die theoretischen *m/z*-Werte beziehen sich auf das [M-H]<sup>-</sup>-Ion einschließlich des Elektrons; Berechnung anhand der exakten Isotopenmassen: <sup>1</sup>H: 1,007825 u, <sup>12</sup>C: 12,000000 u, <sup>16</sup>O: 15,994915 u; Elektronenmasse für Anion: 0,000548 u (Pretsch et al., 2000).

Alle drei Verbindungen zeigten bei den ESI-MS/MS-Experimenten ein sehr ähnliches Verhalten und ergaben vergleichbare Fragmentierungsmuster mit entsprechend zu den jeweiligen Vorläuferionen um *m/z* 14 verschobenen Signalen. Mit 59 eV war jedoch eine relativ hohe Stoßenergie erforderlich, um eine erkennbare Fragmentierung der Ionen zu erreichen. Außerdem konnten unterhalb des dargestellten Massenbereichs keine weiteren Fragmentationen beobachtet werden. Analog zu den Ergebnissen von bisher untersuchten Phenanthroperylenechinonen (Piperopoulos et al., 1997) lassen sich die Fragmentierungen



**Abb. 3-17:** ESI-Tandemmassenspektren (negative Ionen) der Referenzverbindungen Fringelit F und Hypericin sowie der fossilen Pigmente aus *Liliocrinus*, *Encrinus* und *Carnallicrinus*.

durch Tautomerie und Gerüstumlagerung vor Abspaltung von Keten ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ),  $\text{CO}_2$  und  $\text{CO}$  (Tab. 3-8) plausibel erklären. Eine Abspaltung von Methan ( $\text{CH}_4$ ), wie sie bei Hypericin festzustellen ist, fehlt bei Fringelit F aber auch bei Desmethylhypericin.



**Abb. 3-18:** ESI-Tandemmassenspektren (negative Ionen) von Desmethylhypericin aus *Liliocrinus* und *Carnallicrinus*.

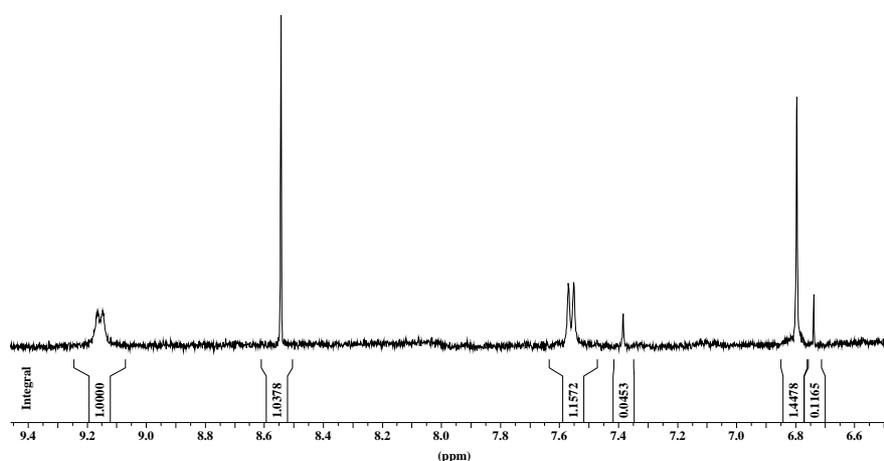
**Tab. 3-8:** Zuordnung der ESI-MS/MS-Signale.

| <i>m/z</i>         | Ion                       |
|--------------------|---------------------------|
| Fringelit F        |                           |
| 475                | $[M-H]^-$                 |
| 430                | $[M-H-CO_2-H]^-$          |
| 405                | $[M-H-CH_2CO-CO]^-$       |
| 377                | $[M-H-CH_2CO-2CO]^-$      |
| 333                | $[M-H-CH_2CO-2CO-CO_2]^-$ |
| Desmethylhypericin |                           |
| 489                | $[M-H]^-$                 |
| 444                | $[M-H-CO_2-H]^-$          |
| 419                | $[M-H-CH_2CO-CO]^-$       |
| 391                | $[M-H-CH_2CO-2CO]^-$      |
| 347                | $[M-H-CH_2CO-2CO-CO_2]^-$ |

**Tab. 3-8:** Fortsetzung.

| <i>m/z</i> | Ion  |
|------------|--|
| Hypericin  |  |
| 503        | [M-H] <sup>-</sup>   |
| 487        | [M-H-CH <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>                        |
| 458        | [M-H-CO <sub>2</sub> -H] <sup>-</sup>                      |
| 433        | [M-H-CH <sub>2</sub> CO-CO] <sup>-</sup>                   |
| 405        | [M-H-CH <sub>2</sub> CO-2CO] <sup>-</sup>                  |
| 361        | [M-H-CH <sub>2</sub> CO-2CO-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> |

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren, die von ausgewählten Methanolextrakten aufgenommen wurden, konnten nur eingeschränkt interpretiert werden. Da aufgrund der geringen Probenmengen nur Gesamtextrakte und nicht wie sonst üblich Einzelverbindungen untersucht werden konnten, war eine eindeutige Zuordnung von Signalen zu bestimmten Verbindungen sehr schwierig und gelang nur in Fällen mit einer überschaubaren Anzahl von Signalen im relevanten Meßbereich. Ein Beispiel einer solchen Messung ist in Abb. 3-19 dargestellt. Durch Vergleich mit Literaturwerten (Cameron und Raverty, 1976; Rodewald et al., 1977) gelang es, die Signale im Aromatenbereich des Spektrums Fringelit F bzw. Hypericin zuzuordnen. Die charakteristischen Signale mit einer chemischen Verschiebung von 9,15 (Dublett), 7,56 (Dublett) und 6,80 (Dublett) entsprechen den zu erwartenden Signalen für Fringelit F, während die beiden Singulett-Signale mit einer Verschiebung von 7,38 und 6,74 jenen von Hypericin entsprechen.



**Abb. 3-19:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (Ausschnitt) eines Methanolextrakts von *Carnallicrinus* (Ch 9) (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD).  $\delta$  9,15\* (d,  $J = 9,9$  Hz), 8,54 (s), 7,56\* (d,  $J = 8,8$  Hz), 7,38\*\* (s), 6,80\* (s), 6,74\*\* (s), 2,80\*\* (s); \*Fringelit F, \*\*Hypericin.

### 3.4.3 DMSO-Extrakte

Mit DMSO als Lösungsmittel konnten trotz der vorangegangenen Extraktionsschritte mit Toluol und Methanol bei allen untersuchten Proben noch beträchtliche zusätzliche Mengen an organischem Material extrahiert werden. Diese Substanzmengen waren bei den meisten Proben so groß, daß die Lösungen für die UV/Vis- und HPLC-Messungen stark verdünnt werden mußten. Die (verdünnten) Lösungen zeigten überwiegend eine bräunliche Färbung; bei den Lösungen der gefärbten Crinoidenproben war zusätzlich ein rosa Farbton erkennbar. Die UV/Vis-Messungen der DMSO-Extrakte ergaben im allgemeinen ähnliche Spektren wie die UV/Vis-Messungen der entsprechenden Methanolextrakte (siehe Abschnitt 7.2), bei den Extrakten der gefärbten Crinoidenproben war der Untergrund allerdings durchgehend höher und die Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich des Spektrums je nach Probe um 8–16 nm bathochrom verschoben.

Bei der HPLC-Untersuchung der DMSO-Extrakte, die unter den gleichen Bedingungen wie die Messung der Methanolextrakte durchgeführt wurde, zeigte sich, daß durch DMSO bei den Proben der gefärbten Crinoiden weitere Mengen der bereits in den Methanolextrakten festgestellten Pigmente Fringelit F, Desmethylhypericin und Hypericin extrahiert wurden. Auch bei den LDI-Massenspektren (negative Ionen) dieser Extrakte waren wieder deutliche Signale bei  $m/z$  475, 489 und 503 festzustellen (siehe Abschnitt 7.3). Im positiv-Ionen Modus konnten vor allem bei den Sedimentproben zahlreiche weitere Signale festgestellt werden. Angesichts der unüberschaubaren Informationsfülle war eine detaillierte Interpretation dieser Signale im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich.

## 3.5 Quantifizierung der Verbindungen im fossilen Material

Anhand der externen Kalibrierungen von HHPP, Fringelit F und Hypericin konnte eine Quantifizierung der fossilen Verbindungen in den Toluol-, Methanol- und DMSO-Aliquots vorgenommen werden (Tab. 7-2). Dabei wurden die Standardlösungen von Fringelit F auch für die Quantifizierung von Desmethylhypericin verwendet. Die auf dieser Grundlage ermittelten Konzentrationen im fossilen Material sind in Tab. 3-9 dargestellt. Die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung wurde durch wiederholte Analyse ( $n = 3$ ) einer homogenisierten Probe von *Liliocrinus* bestimmt (siehe Abschnitt 3.6.1). Die dabei ermittelte relative Standardabweichung lag für alle quantifizierten Verbindungen im Bereich von 2–3 %.

**Tab. 3-9:** Pigment- und Kohlenwasserstoffkonzentrationen in *Liliocrinus*, *Encrinus* und *Carnallicrinus* ( $\mu\text{g/g}$  Fossil).

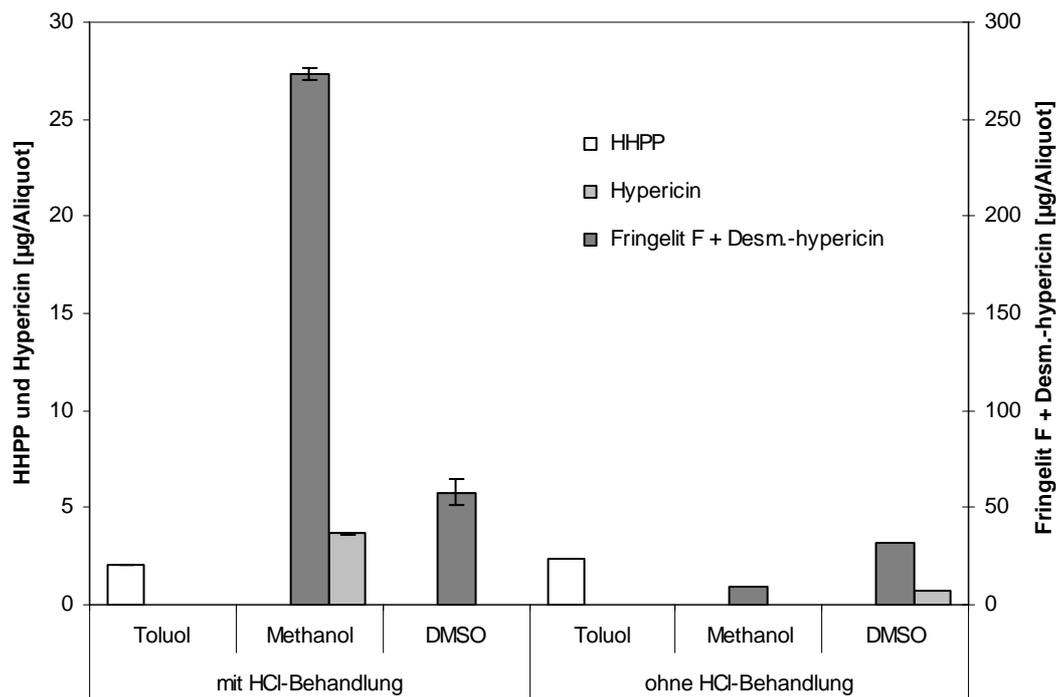
| Probe  | Hypericin | Desmethyl-<br>hypericin | Fringelit F | HHPP  |
|--|-----------|-------------------------|-------------|-------|
| <i>Liliocrinus munsterianus</i> ,<br>Oberer Jura               |           |                         |             |       |
| Li 1   | 5,0       | 175,5                   | 289,5       | 1,5   |
| <i>Encrinus</i> sp. cf. <i>E. spinosus</i> ,<br>Mittlere Trias |           |                         |             |       |
| En 3   | 2,5*      | <1,2*                   | 18,8*       | <0,5* |
| <i>Carnallicrinus carnalli</i> ,<br>Mittlere Trias             |           |                         |             |       |
| Ch 9   | 1,7       | 1,5                     | 27,3        | <0,8  |
| Ch 8   | <0,2      | 3,0                     | 26,0        | 0,5   |
| Ch 10  | <0,1      | <0,4                    | 6,6         | 0,4   |

\*Die tatsächlichen Konzentrationen der Verbindungen im Fossil liegen bei Probe En 3 etwa um den Faktor 2 über den angegebenen Werten, da hier umgebender Kalkstein nicht vollständig abgetrennt werden konnte.

### 3.6 Extraktionsexperimente

#### 3.6.1 Sequentielle Extraktion des fossilen Materials

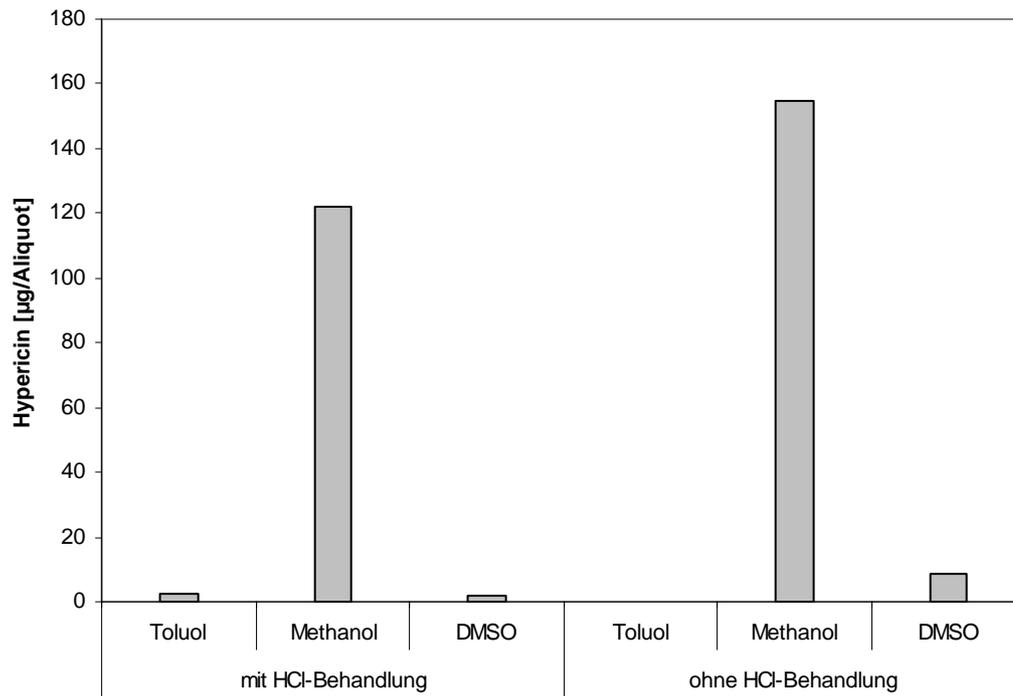
Mit einer im Mörser homogenisierten Probe von *Liliocrinus* konnte der Einfluß der Carbonatmatrix auf das Extraktionsverhalten getestet werden. Dabei wurde durch quantitative HPLC-Untersuchung der einzelnen Toluol-, Methanol- und DMSO-Extrakte bestimmt, wie stark sich eine vorherige Probenbehandlung mit Salzsäure auf die extrahierten Mengen der untersuchten Verbindungen auswirkt. Während sich HHPP und andere PAKs unabhängig davon, ob das Carbonat vorher aufgelöst wurde oder nicht, in gleichen Mengen extrahieren ließen, traten bei der Extraktion der Pigmente je nach Behandlung erhebliche Unterschiede auf (Abb. 3-20).



**Abb. 3-20:** HHPP, Fringelit F + Desmethylhypericin und Hypericin in Toluol-, Methanol- und DMSO-Extrakten von *Liliocrinus* (NMB M 8908). Sequentielle Extraktion von 0,5 g gemörserter Probe nach HCl-Behandlung (n = 3) bzw. ohne HCl-Behandlung.

### 3.6.2 Sequentielle Extraktion des Modellpräparats

Bei der Extraktion des Modellpräparats (5 mg Hypericin in 3 g Calciumcarbonat) unter gleichen Bedingungen wie bei den fossilen Proben zeigte sich, daß Hypericin im Gegensatz zu den fossilen Pigmenten unabhängig von der Anwesenheit einer Carbonatmatrix in vergleichbaren Mengen extrahiert werden kann (Abb. 3-21). Die Wiederfindung betrug dabei 38 % (Extraktion nach vorheriger HCl-Behandlung) bzw. 49 % (Extraktion ohne vorherige HCl-Behandlung). Bemerkenswert ist, daß bei vorheriger Behandlung des Modellpräparats mit Salzsäure ein kleiner Anteil Hypericin bereits mit Toluol extrahiert werden kann, während dies bei direkter Extraktion des Modellpräparats und bei der Extraktion der fossilen Pigmente nicht möglich ist.



**Abb. 3-21:** Hypericin in Toluol-, Methanol- und DMSO-Extrakten des Modellpräparats. Sequentielle Extraktion von 0,2 g Probe nach bzw. ohne HCl-Behandlung.

## 4 Diskussion

### 4.1 Erhaltung des fossilen Materials

Die violette Eigenfarbe der Crinoiden wird, wie bei bereits früher bei *Liliocrinus* festgestellt wurde (Blumer, 1951), durch außerordentlich kleine (nur wenige Mikrometer große) gefärbte Einschlüsse hervorgerufen, die fein verteilt im ungefärbten Calcit der Fossilien eingelagert sind. Ergänzend kann beobachtet werden, daß diese Einschlüsse teilweise entlang eines gitterartigen Musters in der Calcitmatrix angeordnet sind. Letzteres Merkmal wird in der ursprünglichen Beschreibung nicht erwähnt, ist aber von zentraler Bedeutung, da Crinoiden zu einem Großteil aus einem gitterartigen Innenskelett (Stereom) aus Calcit bestehen, dessen mikroskopische Poren beim lebenden Tier mit Gewebe ausgefüllt sind (siehe Abschnitt 1.3). Man kann daher annehmen, daß es sich bei den Einschlüssen der fossilen Crinoiden um organisches Material handelt, das noch in den ursprünglichen Strukturen der Crinoiden erhalten ist (In-situ-Erhaltung) und hier durch Ausfällung von Calcitzement eingeschlossen wurde. Daraus kann geschlossen werden, daß eine frühe Zementation neben anderen Einflüssen sicher ein wichtiger Faktor für die Erhaltung von organischem Material in Crinoiden ist.

### 4.2 Struktur der fossilen Pigmente und Kohlenwasserstoffe

Wie die analytischen Ergebnisse zeigen, handelt es sich bei den fossilen Pigmenten in *Liliocrinus munsterianus*, *Carnallicrinus carnalli* und *Encrinus* cf. *spinosus* um eine Serie von Hexahydroxyphenanthroperylenchinonen: Hypericin ( $C_{30}H_{16}O_8$ ), Desmethylhypericin ( $C_{29}H_{14}O_8$ ) und Fringelit F ( $C_{28}H_{12}O_8$ ). Damit kann eindeutig festgestellt werden, daß es sich bei den von *Liliocrinus* bekannten Fringelit-Pigmenten mit Ausnahme von Fringelit F nicht um die bisher beschriebenen Strukturen (siehe Abb. 1-2) handelt. In Wirklichkeit handelt es sich bei Blumers „Fringelit D“ um Hypericin und bei „Fringelit E“ um Desmethylhypericin (die geänderten Strukturen wurden unter Vorbehalt auch von Blumer (1971) beschrieben, jedoch in einer späteren Arbeit (Blumer, 1976) wieder revidiert); Fringelit H, das mutmaßliche Hauptpigment von *Liliocrinus* (Thomas und Blumer, 1964; Blumer, 1965), konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden, obwohl sein Vorkommen aufgrund seiner Löslichkeit in DMSO (Falk et al., 1992) zumindest in den DMSO-Extrakten zu erwarten gewesen wäre. Aufgrund der neuen Ergebnisse und um Verwechslungen mit den

ursprünglichen Fringelit-Strukturen zu vermeiden, sollte die Bezeichnung „Fringelite“ nicht mehr für diese Gruppe fossiler Pigmente verwendet werden.

Unter den Kohlenwasserstoffen konnte in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Blumer, 1962b; Thomas und Blumer, 1964) die Hauptverbindung von *Liliocrinus* als HHPP ( $C_{28}H_{20}$ ) identifiziert und darüber hinaus auch in *Carnallicrinus carnalli* und *Encrinus* cf. *spinus* nachgewiesen werden. Weitere, bisher nicht beschriebene PAKs, konnten massenspektrometrisch durch ihre Summenformeln charakterisiert werden, darunter auch zwei Verbindungen, bei denen es sich vermutlich um die entsprechenden PAK-Grundkörper ( $C_{29}H_{22}$ ,  $C_{30}H_{24}$ ) von Desmethylhypericin und Hypericin handelt. Verschiedene akzessorische PAKs, die von Blumer in geringer Konzentration ( $<0,1$  ppm) bei *Liliocrinus* festgestellt wurden (siehe Abb. 1-3), konnten hingegen (vermutlich aufgrund zu kleiner Probenmengen) bei keiner der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Crinoiden nachgewiesen werden.

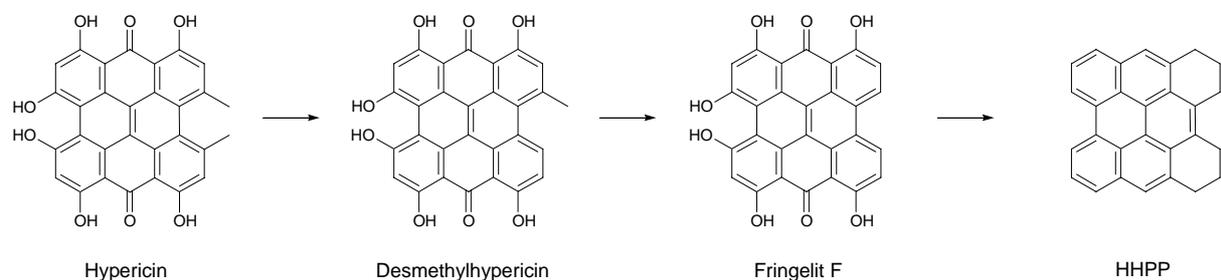
### 4.3 Biosynthese und mögliche biologische Bedeutung der Pigmente

Hypericin ist normalerweise durch sein Vorkommen im Johanniskraut (*Hypericum perforatum*), einer weit verbreiteten Heilpflanze, bekannt und wurde in jüngster Zeit wegen seiner Bedeutung als pharmakologisch wirksamer Substanz intensiv erforscht (Falk, 1999). Verwandte Anthrachinone, Bianthrone und Phenanthroperylenchinone kommen aber auch in rezenten Crinoiden vor und eine Gruppe bromierter Hypericinderivate wurde sogar in der gestielten Crinoide *Gymnocrinus richeri* gefunden (siehe Abschnitt 1.5). Es kann daher angenommen werden, daß die überlieferten Pigmente im fossilen Material noch nahezu in ihrer ursprünglichen Struktur vorliegen und daß folglich Pigmente vom Hypericin-Typ im Mesozoikum ehemals analog zu den oben genannten Polyketidverbindungen über den Acetat-Malonat-Biosyntheseweg gebildet wurden (Einzelheiten zur Biosynthese von aromatischen Polyketiden sind z. B. bei Shen (2000) zu finden). Da Polyketidpigmente in heutigen Crinoiden häufig auch als Sulfatester vorkommen (siehe Abb. 1-8) und für einzelne Vertreter dieser Verbindungen eine fraßabwehrende Wirkung gegenüber Fischen festgestellt wurde (Rideout et al., 1979; Takahashi et al., 2002), kann darüber hinaus vermutet werden, daß die fossilen Pigmente ursprünglich eine ähnliche Bedeutung für die mesozoischen Crinoiden hatten. Obwohl durch die vorliegende Untersuchung das Vorkommen von Polyketidpigmenten bislang nur für wenige fossile Crinoiden sicher belegt werden kann,

erscheint ein allgemeines Fehlen einer chemischen Verteidigung bei mesozoischen Crinoiden, wie es von McClintock et al. (1999) vermutet wurde, eher unwahrscheinlich.

#### 4.4 Diagenese

Das Vorkommen einer Vergesellschaftung von nahe verwandten Phenanthroperylenchinonen und PAKs, wie sie bei den gefärbten Crinoiden festzustellen ist, wäre in einem heutigen Lebewesen nicht zu erwarten, da bei der Biosynthese von Naturstoffen im allgemeinen spezifische Verbindungen und nicht Serien von Verbindungen gebildet werden. Es verwundert daher nicht, daß bisher alle diese Verbindungen mit Ausnahme von Hypericin ausschließlich in fossilen Crinoiden gefunden wurden. Das gemeinsame Vorkommen der Verbindungen spricht somit viel eher für eine diagenetische Bildung von Desmethylhypericin, Fringelit F und den begleitenden PAKs als für eine Bildung durch Biosynthese. Das Vorkommen von Desmethylhypericin als Zwischenglied zwischen Hypericin und Fringelit F deutet auf eine schrittweise Abspaltung von Methylgruppen mit Hypericin als Ausgangsverbindung und Fringelit F als vorläufigem Endprodukt. Da zudem zahlreiche PAKs als diagenetische Produkte von natürlichen Vorläuferverbindungen interpretiert wurden (Neilson und Hynning, 1998; Simoneit, 1998) und insbesondere Perylen als Produkt von Perylenchinonen vermutet wurde (Jiang et al., 2000), erscheint eine analoge Umwandlung von Fringelit F zu HHPP ebenfalls plausibel. Basierend auf der In-situ-Erhaltung von Hypericin und seinen wahrscheinlichen Abbauprodukten kann somit der in Abb. 4-1 dargestellte Diagenesepfad vermutet werden.



Abbau von Hypericin wahrscheinlich erscheinen. Die Gesamtpigmentkonzentration von *Liliocrinus* (siehe Tab. 3-9) entspricht in etwa den Ergebnissen aus früheren Bestimmungen, die durch semiquantitative Analyse von Kilogrammengen fossilen Materials erhalten wurden (Blumer, 1960). Vergleicht man diese Konzentrationen mit jenen der übrigen untersuchten Crinoiden, so fällt auf, daß die Pigmentkonzentrationen der Jura-Crinotide *Liliocrinus* um etwa eine Größenordnung über jenen der Trias-Crinoiden *Carnallicrinus* und *Encrinus* liegen, was auf einen Zusammenhang des Abbaus an organischem Material mit dem geologischen Alter der Fossilien schließen läßt. Die zum Teil erheblichen Unterschiede der Pigmentkonzentrationen unter den Trias-Crinoiden können wiederum im Zusammenhang mit der Art des umgebenden Sedimentgesteins und dessen Diagenese interpretiert werden. Die deutlich gefärbten *Carnallicrinus*-Proben (Ch 8, Ch 9) stammen aus einer Mikrofazies mit mikritischen Kalksteinen, während die nur schwach gefärbte Probe (Ch 10) aus einer Mikrofazies mit stark porösen Kalksteinen stammt. Diese Verhältnisse können auch verallgemeinert werden, da Exemplare aus der Umgebung von Freyburg mit deutlichen Färbungen überwiegend in mikritischen Kalksteinen erhalten sind, während Exemplare mit blasser Färbung in porösen Kalksteinen vorkommen. Da letztere Kalksteine durch Lösungsvorgänge stark alteriert wurden, kann davon ausgegangen werden, daß die relativ geringen Pigmentkonzentrationen der hier eingebetteten Crinoiden ein Ergebnis dieser diagenetischen Vorgänge sind. Das Fehlen von Färbungen bei *Carnallicrinus* von anderen Fundstellen (Engelking, 1952) ist vermutlich ebenfalls auf diagenetische Faktoren zurückzuführen.

Betrachtet man die relativen Mengen der einzelnen Verbindungen, können weitere Hinweise festgestellt werden, die den oben beschriebenen Diagenesepfad unterstützen. Fringelit F, das Endprodukt des vermuteten Demethylierungsprozesses, tritt in allen analysierten Crinoidenproben als Hauptverbindung auf, während Desmethylhypericin in größeren Konzentrationen nur in der geologisch jüngsten Crinotide (*Liliocrinus*) nachgewiesen werden konnte; Hypericin schließlich kommt sowohl in der jurassischen als auch den triassischen Crinoiden in relativ geringen Konzentrationen vor. Vergleichbar zu den Pigmentanteilen korreliert auch das Verhältnis von HHPP zu Fringelit F mit dem Grad der diagenetischen Veränderungen (abgeleitet vom geologischen Alter der Fossilien und der Art des umgebenden Gesteins). Es fällt allerdings auf, daß im Gegensatz zu den beträchtlichen Unterschieden bei den Pigmentkonzentrationen HHPP in allen Crinoidenproben in vergleichbar geringen Konzentrationen vorkommt. Da man jedoch in den geologisch älteren Crinoiden aus der Trias deutlich höhere Konzentrationen an HHPP als bei der jurassischen Crinotide erwarten würde,

kann man daraus ableiten, daß HHPP nicht das Endprodukt des diagenetischen Abbaus darstellt und neben dem beschriebenen Diageneseppfad noch weitere Reaktionen eine Rolle gespielt haben müssen.

#### 4.5 Vorkommen der fossilen Pigmente und Chemotaxonomie

Das gemeinsame Vorkommen von Hypericin, Desmethylhypericin und Fringelit F in den triassischen Crinoiden *Carnallicrinus carnalli* (Deutschland) und *Encrinus cf. spinosus* (Polen) sowie der jurassischen *Liliocrinus munsterianus* (Schweiz) zeigt, daß diese Pigmente sowohl zeitlich als auch geographisch viel weiter verbreitet sind als bisher bekannt war. Auch das gemeinsame Vorkommen der Pigmente in unterschiedlichen Crinoidengruppen (*C. carnalli* und *E. spinosus* werden zur Ordnung Encrinida gestellt, während *L. munsterianus* zur Ordnung Millericrinida gerechnet wird) (Abb. 4-2) läßt auf eine ursprünglich weite Verbreitung der Pigmente schließen. Betrachtet man einzelne Arten der Ordnung Encrinida, fällt allerdings auf, daß innerhalb der Ordnung große Unterschiede im Vorkommen der fossilen Pigmente bestehen. Während in der untersuchten Probe von *Encrinus cf. spinosus* Phenanthroperylenechinone in relativ hohen Konzentrationen vorkommen, können in der Probe der nahe verwandten Art *Encrinus liliiformis* keinerlei Spuren dieser Verbindungen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse können auch verallgemeinert werden, da weitere gefärbte Exemplare von *E. spinosus* vorliegen und von *E. liliiformis*, trotz umfangreichen Sammlungsmaterials, keine vergleichbar gefärbten Exemplare bekannt sind. Andere Vertreter der Ordnung Encrinida wie z. B. *Chelocrinus schlotheimi* (Hagdorn, 1982) und *Chelocrinus nov. sp.* (Ernst und Löffler, 1993) zeigen hingegen ähnliche Färbungen wie *Carnallicrinus carnalli*. Zusammenfassend kann für die Ordnung Encrinida festgestellt werden, daß das Vorkommen von Färbungen vermutlich artspezifisch ist und somit auch für chemotaxonomische Betrachtungen verwendet werden kann. Bei der Anwendung besteht allerdings eine wesentliche Einschränkung in der starken Abhängigkeit der Farberhaltung von diagenetischen Faktoren (siehe Abschnitt 4.4). Negativbefunde für eine Art können daher nur als gesichert angesehen werden, wenn vom gleichen Vorkommen auch gefärbte Exemplare einer anderen Crinoidenart bekannt sind.



(vermutlich  $\text{Ca}^{2+}$ ). Eine Bildung von polymeren Salzen wie bei Fringelit D, das bisher als fossiles Pigment vermutet wurde, ist bei Hypericin, Desmethylhypericin und Fringelit F allerdings nicht möglich, da diese Verbindungen im Unterschied zu Fringelit D nur eine stark saure *bay*-Hydroxygruppe aufweisen.

Die Ergebnisse der Extraktion des Modellpräparats zeigen, daß eine bloße Adsorption der fossilen Phenanthroperylenchinon-Pigmente an die Carbonatmatrix als Erklärung für deren starke Bindung ausgeschlossen werden kann. Es wird allerdings vermutet, daß die bei den fossilen Proben vorhandene komplexe organische Matrix von Bedeutung für die Stabilisierung der Pigmente ist, da im Gegensatz zum Modellpräparat bei den fossilen Proben in keinem Fall Phenanthroperylenchinon-Pigmente in den Toluolfractionen nachgewiesen werden konnten.

## 5 Schlußfolgerungen

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, daß violette Färbungen der fossilen Crinoiden *Liliocrinus munsterianus* (Oberer Jura), *Carnallicrinus carnalli* (Mittlere Trias) und *Encrinus* cf. *spinosus* (Mittlere Trias) durch Einschlüsse des organischen Naturstoffs Hypericin sowie nahe verwandter Derivate hervorgerufen werden. Dabei handelt es sich um nahezu original erhaltene Pigmente bzw. um nur gering veränderte Diageneseprodukte, wie aus der In-situ-Erhaltung der Verbindungen und aufgrund des Vorkommens von ähnlichen Hypericinderivaten in heutigen Crinoiden geschlossen werden kann. Bei den Pigmenten der Trias-Crinoiden handelt es sich darüber hinaus um die ältesten Vertreter polyzyklischer Chinone überhaupt. Die einzigen anderen fossilen polyzyklischen Chinone sind die Quincyt-Pigmente, die in den sedimentären Ablagerungen eines eozänen Sees gefunden wurden (Prowse et al., 1991).

Das gemeinsame Auftreten der Pigmente in fossilen Crinoiden, die aus unterschiedlichen geologischen Zeitaltern stammen, unterschiedlicher geographischer Herkunft sind und verschiedenen Crinoidengruppen angehören, zeigt, daß es sich bei dem Vorkommen dieser Pigmente nicht um ein lokales Phänomen, sondern um ein verbreitetes Merkmal handelt. Da in den Crinoiden die gleiche charakteristische Vergesellschaftung von nahe verwandten Pigmenten und PAKs gefunden wurde, wird außerdem vermutet, daß der daraus abgeleitete Diagenesepfad einen allgemeinen Reaktionsweg für den Abbau von Hypericin in fossilen Crinoiden darstellt. Aus chemischer Sicht wäre ein solcher Reaktionsweg äußerst bemerkenswert, da eine Abspaltung von Methylgruppen von einem Aromatengerüst aufgrund der hohen Stabilität der relevanten C–C-Bindungen nur sehr schwer möglich ist. Ähnliche Reaktionen wurden jedoch schon für Methylaromaten in Erdöl beschrieben (Behar et al., 1999), so daß eine Demethylierung von Hypericin am ehesten über einen natürlichen thermalen Cracking-Prozeß vorstellbar ist.

Aufgrund des seltenen Vorkommens von fossilen Crinoiden mit Farberhaltung, die nur in begrenztem Umfang für chemische, materialverbrauchende Untersuchungen zur Verfügung stehen, konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur exemplarisch Proben untersucht werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß gut erhaltene fossile Crinoiden wichtige Informationen zum Vorkommen und zur Diagenese von endogenen Biomolekülen in der fossilen Überlieferung liefern können. Vor allem charakteristisch violett gefärbte Crinoiden sollten als potentielle Quelle für molekulare Informationen angesehen werden. Um die

---

stratigraphische Reichweite der Phenanthroperylenechinone und deren chemotaxonomische Bedeutung noch genauer bestimmen zu können, sollte in zukünftigen Arbeiten noch umfangreicheres Material gefärbter Crinoiden aus verschiedenen Erdzeitaltern untersucht werden. Für vergleichende Untersuchungen wären auch Analysen von heutigen gestielten Crinoiden von großem Interesse.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ausich, W. I., Brett, C. E., Hess, H., Simms, M. J. (1999): Crinoid form and function. In *Fossil Crinoids* (Hrsg. Hess, H., Ausich, W. I., Brett, C. E., Simms, M. J.), 3–30. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bartolini, G. L., Erdman, T. R., Scheuer, P. J. (1973): Anthraquinone pigments from the crinoid *Comanthus bennetti*. *Tetrahedron* **29**, 3699–3702.
- Bather, F. A. (1893): The Crinoidea of Gotland. Part I. The Crinoidea Inadunata. *Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar* **25**, 1–200.
- Behar, F., Budzinski, H., Vandenbroucke, M., Tang, Y. (1999): Methane generation from oil cracking: Kinetics of 9-methylphenanthrene cracking and comparison with other pure compounds and oil fractions. *Energy & Fuels* **13**, 471–481.
- Bielert, U., Bielert, F. (1995): Encriniden aus dem Bereich der Basiskonglomeratbänke des Unteren Muschelkalks von Weißenborn (Süd-niedersachsen). *Der Aufschluß* **46**, 23–31.
- Bielert, U., Bielert, F. (1996): Verschüttet im Konglomerat – *Encrinus robustus* Assmann aus dem Unteren Muschelkalk aus Nord-West-Thüringen. *Der Aufschluß* **47**, 301–306.
- Biese, W. (1927): Ueber die Encriniten des unteren Muschelkalkes von Mitteldeutschland. *Abhandlungen der Preußischen Geologischen Landesanstalt, Neue Folge* **103**, 1–119.
- Blumer, M. (1951): Fossile Kohlenwasserstoffe und Farbstoffe in Kalksteinen. *Mikrochemie* **36/37**, 1048–1055.
- Blumer, M. (1960): Pigments of a fossil echinoderm. *Nature* **188**, 1100–1101.
- Blumer, M. (1962a): The organic chemistry of a fossil—I The structure of the fringelite-pigments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **26**, 225–227.
- Blumer, M. (1962b): The organic chemistry of a fossil—II Some rare polynuclear hydrocarbons. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **26**, 228–230.
- Blumer, M. (1965): Organic pigments: Their long-term fate. *Science* **149**, 722–726.

- Blumer, M. (1971): Persönliche Mitteilung. In *Naturally Occurring Quinones*, 2. Aufl. (Thomson, R. H.), 594–596. Academic Press, London.
- Blumer, M. (1976): Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific American* **234**(3), 34–45.
- Brockmann, H., Dicke, F. (1970): Die Konstitution des Dibenzo[*a.o*]perylene-photooxides. *Chemische Berichte* **103**, 7–16.
- Brockmann, H., Neeff, R., Mühlmann, E. (1950): Zur Synthese hypericinähnlicher Oxy-naphthodianthrone, I. Mitteilung. *Chemische Berichte* **83**, 467–483.
- Brocks, J. J., Summons, R. E. (2004): Sedimentary hydrocarbons, biomarkers for early life. In *Treatise on Geochemistry*, Bd. 8 (Hrsg. Schlesinger, W. H.), 63–115. Elsevier, Oxford.
- Brolis, M., Gabetta, B., Fuzzati, N., Pace, R., Panzeri, F., Peterlongo, F. (1998): Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *Journal of Chromatography A* **825**, 9–16.
- Cameron, D. W., Raverty, W. D. (1976): Pseudohypericin and other phenanthroperylene quinones. *Australian Journal of Chemistry* **29**, 1523–1533.
- De Riccardis, F., Iorizzi, M., Minale, L., Riccio, R., Richer de Forges, B., Debitus, C. (1991): The gymnochromes: Novel marine brominated phenanthroperylenequinone pigments from the stalked crinoid *Gymnocrinus richeri*. *Journal of Organic Chemistry* **56**, 6781–6787.
- Dimelow, E. J. (1958): Pigments present in arms and pinnules of the crinoid *Antedon bifida* (Pennant). *Nature* **182**, 812.
- Engelking, R. (1952): Über einen Fund von *Encrinus carnalli* aus dem Unteren Muschelkalk von Leimen. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte* **1952**, 277–288.

- Erdman, T. R., Thomson, R. H. (1972): Naturally occurring quinones. XXI Anthraquinones in the crinoids *Heterometra savignii* and *Lamprometra klunzingeri*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1972**, 1291–1292.
- Ernst, R., Löffler, T. (1993): Crinoiden aus dem Unteren Muschelkalk (Anis) Südniedersachsens. In *Muschelkalk. Schöntaler Tagung 1991* (Hrsg. Hagdorn, H., Seilacher, A.), 223–233. Goldschneck, Korb.
- Falk, H. (1997): Fringelite. Auch die Vorzeit war bunt. *Fossilien* **14**, 89–93.
- Falk, H. (1999): Vom Photosensibilisator Hypericin zum Photorezeptor Stentorin – die Chemie der Phenanthroperylenechinone. *Angewandte Chemie* **111**, 3306–3326.
- Falk, H., Mayr, E. (1995): Synthesis and properties of fringelite D (1,3,4,6,8,10,11,13-octahydroxy-phenanthro[1,10,9,8,*o,p,q,r,a*]perylene-7,14-dione). *Monatshefte für Chemie* **126**, 699–710.
- Falk, H., Mayr, E. (1997): Concerning *bay* salt and *peri* chelate formation of hydroxyphenanthroperylene quinones (fringelites). *Monatshefte für Chemie* **128**, 353–360.
- Falk, H., Mayr, E., Richter, A. E. (1994): Simple diffuse reflectance UV-Vis spectroscopic determination of organic pigments (fringelites) in fossils. *Mikrochimica Acta* **117**, 1–5.
- Falk, H., Meyer, J., Oberreiter, M. (1992): Deprotonation and protonation of hydroxyphenanthroperylenes. *Monatshefte für Chemie* **123**, 277–284.
- Falk, H., Vaisburg, A. F. (1995): Concerning the absorption and emission properties of phenanthro[1,10,9,8,*o,p,q,r,a*]perylene-7,14-dione. *Monatshefte für Chemie* **126**, 361–364.
- Francesconi, K. A. (1980): Pigments of some echinoderms collected from Western Australian waters. *Australian Journal of Chemistry* **33**, 2781–2784.
- Freeman, D., Frolow, F., Kapinus, E., Lavie, D., Lavie, G., Meruelo, D., Mazur, Y. (1994): Acidic properties of hypericin and its octahydroxy analogue in the ground and excited states. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 891–892.

- Gross, J., Carmon, M., Lifshitz, A., Sklarz, B. (1975): Carotenoids of the invertebrates of the Red Sea (Eilat shore). Carotenoids of the crinoid *Lamprometra klunzingeri* (Echinodermata). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **52**, 459–464.
- Gross, J. H. (2004): *Mass Spectrometry – A Textbook*. Springer, Berlin.
- Hagdorn, H. (1980): *Chelocrinus schlotheimi* (Quenstedt) aus dem Oberen Muschelkalk. *Der Aufschluß* **31**, 498–503.
- Hagdorn, H. (1982): *Chelocrinus schlotheimi* (Quenstedt) 1835 aus dem Oberen Muschelkalk (mo1, Anisium) von Nordwestdeutschland. *Veröffentlichungen aus dem Naturkunde-Museum Bielefeld* **4**, 5–33.
- Hagdorn, H. (2004): *Cassianocrinus varians* (Münster, 1841) aus der Cassian-Formation (Trias, Oberladin/Unterkarn) der Dolomiten – ein Bindeglied zwischen Encrinidae und Traumatocrinidae (Crinoidea, Articulata). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, Serie A* **105**, 231–255.
- Hess, H., Ausich, W. I. (1999): Introduction. In *Fossil Crinoids* (Hrsg. Hess, H., Ausich, W. I., Brett, C. E., Simms, M. J.), XIII–XV. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jaekel, O. (1894): Platte mit *Encrinus carnalli* Beyr. *Sitzungs-Berichte der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin* **1894**, 155–162.
- Jiang, C., Alexander, R., Kagi, R. I., Murray, A. P. (2000): Origin of perylene in ancient sediments and its geological significance. *Organic Geochemistry* **31**, 1545–1559.
- Klages, O. (1965): Violett gefärbte Seelilien. *Der Aufschluß* **16**, 307–309.
- Lee, N. K., Kim, Y. H. (1995): New cytotoxic anthraquinones from the crinoid *Ptilometra*: 1'-deoxyrhodoptilometrins-6-O-sulfate and rhodoptilometrins-6-O-sulfate. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **16**, 1011–1013.
- Logan, G. A., Collins, M. J., Eglinton, G. (1991): Preservation of organic biomolecules. In *Taphonomy: Releasing the Data Locked in the Fossil Record* (Hrsg. Allison, P. A., Briggs, D. E. G.), 1–24. Plenum Press, New York.

- Mayr, E. (1996): Studien zu den natürlich vorkommenden Hydroxyphenanthroperylenchinonen Fringelit D, Stentorin und Blepharismin. Dissertation, Universität Linz.
- McClintock, J. B., Baker, B. J., Baumiller, T. K., Messing, C. G. (1999): Lack of chemical defense in two species of stalked crinoids: Support for the predation hypothesis for mesozoic bathymetric restriction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **232**, 1–7.
- Moseley, H. N. (1877): On the colouring matters of various animals, and especially of deep-sea forms, dredged by H.M.S. Challenger. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **17**, 1–23.
- Neilson, A. H., Hynning, P.-Å. (1998): PAHs: Products of chemical and biochemical transformation of alicyclic precursors. In *The Handbook of Environmental Chemistry*, Bd. 3 I (Hrsg. Neilson, A. H.), 223–269. Springer, Berlin.
- Parkinson, J. (1808): *Organic Remains of a Former World*, Bd. II. Sherwood, Neely and Jones, London.
- Piperopoulos, G., Lotz, R., Wixforth, A., Schmierer, T., Zeller, K.-P. (1997): Determination of naphthodianthrones in plant extracts from *Hypericum perforatum* L. by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **695**, 309–316.
- Poster, D. L., Sander, L. C., Wise, S. A. (1998): Chromatographic methods of analysis for the determination of PAHs in environmental samples. In *The Handbook of Environmental Chemistry*, Bd. 3 I (Hrsg. Neilson, A. H.), 77–135. Springer, Berlin.
- Powell, V. H., Sutherland, M. D. (1967): Pigments of marine animals. VI Anthraquinoid pigments of the crinoids *Ptilometra australis* Wilton and *Tropiometra afra* Hartlaub. *Australian Journal of Chemistry* **20**, 541–553.
- Powell, V. H., Sutherland, M. D., Wells, J. W. (1967): Pigments of marine animals. V Rubrocomatulins monomethyl ether, an anthraquinoid pigment of the *Comatula* genus of crinoids. *Australian Journal of Chemistry* **20**, 535–540.
- Pretsch, E., Bühlmann, P., Affolter, C. (2000): *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*, 3. Aufl. Springer, Berlin.

- Prowse, W. G., Arnot, K. I., Recka, J. A., Thomson, R. H., Maxwell, J. R. (1991): The quincyite pigments: Fossil quinones in an Eocene clay mineral. *Tetrahedron* **47**, 1095–1108.
- Rideout, J. A., Smith, N. B., Sutherland, M. D. (1979): Chemical defense of crinoids by polyketide sulphates. *Experientia* **35**, 1273–1274.
- Rideout, J. A., Sutherland, M. D. (1981): Pigments of marine animals. XIV Polyketide sulfates from the crinoid *Comatula pectinata*. *Australian Journal of Chemistry* **34**, 2385–2392.
- Rideout, J. A., Sutherland, M. D. (1985): Pigments of marine animals. XV Bianthrone and related polyketides from *Lamprometra palmata gyges* and other species of crinoids. *Australian Journal of Chemistry* **38**, 793–808.
- Rodewald, G. (1974): Untersuchungen über natürliche Hydroxyanthrachinone und ihre alkalische Kondensation zu dimeren Farbstoffen. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin.
- Rodewald, G., Arnold, R., Griesler, J., Steglich, W. (1977): Synthese von Hypericin und verwandten *meso*-Naphthodianthronen durch alkalische Dimerisierung von Hydroxyanthrachinonen. *Angewandte Chemie* **89**, 56–57.
- Sakuma, Y., Tanaka, J., Higa, T. (1987): New naphthopyrone pigments from the crinoid *Comanthus parvicirrus*. *Australian Journal of Chemistry* **40**, 1613–1616.
- Salamon, M. A., Zatoń, M. (2005): First record of the Jurassic millericrinid *Pomatocrinus mespiliformis* (von Schlotheim, 1820) from Poland. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte* **2005**, 301–320.
- Scholl, R., Meyer, K. (1934): Der blaue aromatische Grundkohlenwasserstoff des *meso*-Naphtho-dianthrons und seine Überführung durch Maleinsäure-anhydrid in Anthro-dianthren. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **67**, 1236–1238.
- Shen, B. (2000): Biosynthesis of aromatic polyketides. In *Topics in Current Chemistry*, Bd. 209 (Hrsg. Leeper, F. J., Vederas, J. C.), 1–51. Springer, Berlin.
- Simoneit, B. R. T. (1998): Biomarker PAHs in the environment. In *The Handbook of Environmental Chemistry*, Bd. 3 I (Hrsg. Neilson, A. H.), 175–221. Springer, Berlin.

- Takahashi, D., Maoka, T., Tsushima, M., Fujitani, K., Kozuka, M., Matsuno, T., Shingu, T. (2002): New quinone sulfates from the crinoids *Tropiometra afra macrodiscus* and *Oxycomanthus japonicus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **50**, 1609–1612.
- Taylor, P. D. (1983): *Ailsacrinus* gen. nov., an aberrant millericrinid from the Middle Jurassic of Britain. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Geology Series* **37**(2), 37–77.
- Thomas, D. W., Blumer, M. (1964): The organic chemistry of a fossil—III. The hydrocarbons and their geochemistry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **28**, 1467–1477.
- Treibs, A. (1936): Chlorophyll- und Häminderivate in organischen Mineralstoffen. *Angewandte Chemie* **49**, 682–686.

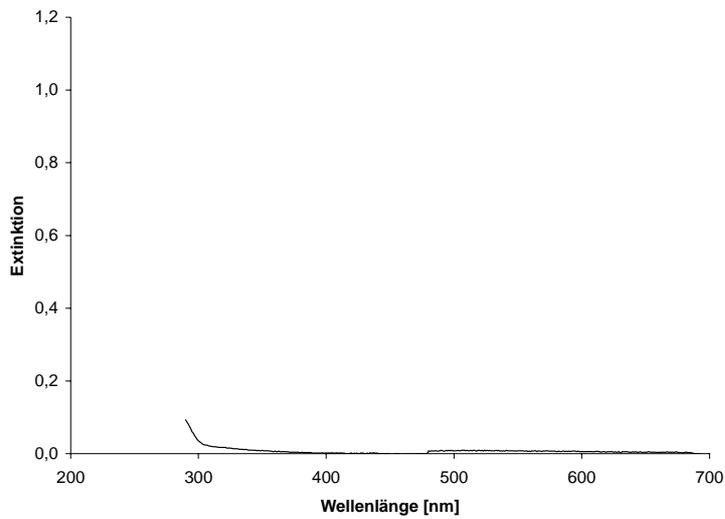
## 7 Anhang

### 7.1 Kristallographische Daten

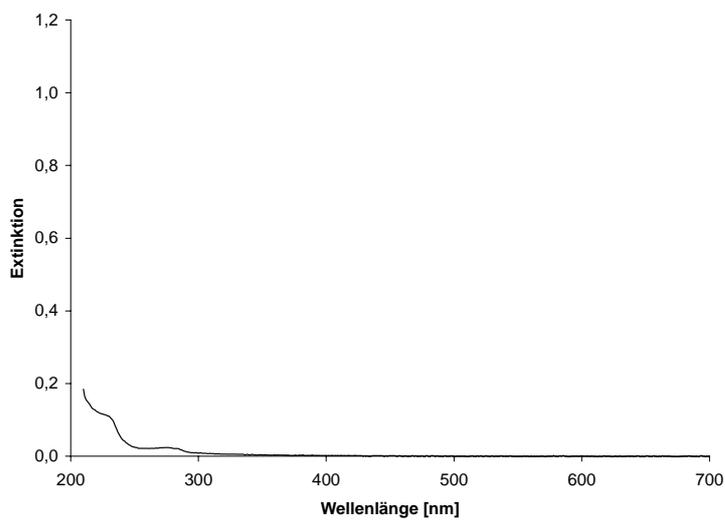
**Tab. 7-1:** Kristallographische Daten von HHPP.

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| Summenformel  | C <sub>28</sub> H <sub>20</sub>    |
| Molekülmasse [g/mol]                                      | 356,44                             |
| Kristallgröße [mm]  | 0,5 × 0,3 × 0,3                    |
| Kristallfarbe   | gelb                               |
| Kristallform  | Fragment                           |
| Raumgruppe  | <i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i> |
| <i>a</i> [Å]  | 10,2633(10)                        |
| <i>b</i> [Å]  | 14,1275(14)                        |
| <i>c</i> [Å]  | 12,0121(12)                        |
| $\beta$ [°]   | 101,045(2)                         |
| <i>V</i> [Å <sup>3</sup> ]                                | 1709,4(3)                          |
| <i>D</i> <sub>calc</sub> [g/cm <sup>3</sup> ]             | 1,39                               |
| <i>Z</i>  | 4                                  |
| Temperatur [K]  | 295                                |
| <i>h</i> <sub>min</sub> / <i>h</i> <sub>max</sub>         | −13 / 13                           |
| <i>k</i> <sub>min</sub> / <i>k</i> <sub>max</sub>         | −13 / 18                           |
| <i>l</i> <sub>min</sub> / <i>l</i> <sub>max</sub>         | −15 / 13                           |
| $\theta$ range [°]  | 2,0–28,2                           |
| <i>R</i> <sub>int</sub>                                   | 0,018                              |
| gemessene Reflexe   | 10119                              |
| unabhängige Reflexe                                       | 3871                               |
| beobachtete Reflexe [ <i>I</i> > 2 $\sigma$ ( <i>I</i> )] | 3078                               |
| Variablen   | 261                                |
| ( $\Delta$ / $\sigma$ ) <sub>max</sub>                    | <0,001                             |
| <i>R</i>  | 0,053                              |
| <i>R</i> <sub>w</sub>                                     | 0,148                              |
| <i>S</i>  | 1,05                               |
| ( $\Delta\rho$ ) <sub>max</sub> [e Å <sup>−3</sup> ]      | 0,23                               |
| ( $\Delta\rho$ ) <sub>min</sub> [e Å <sup>−3</sup> ]      | −0,31                              |

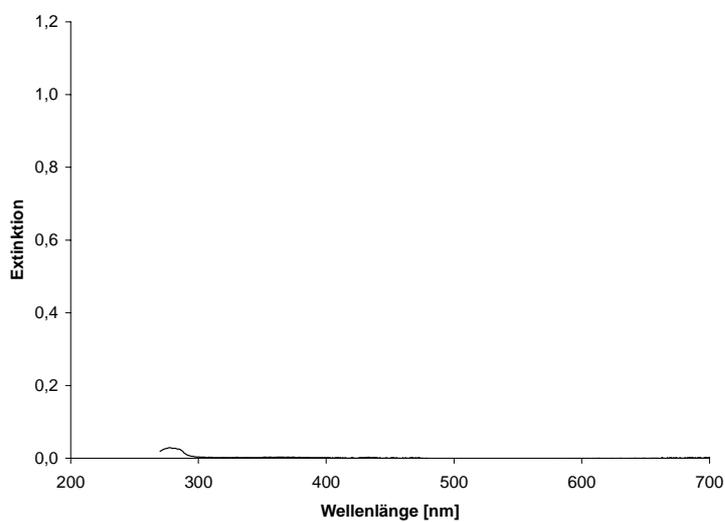
## 7.2 UV/Vis-Spektren



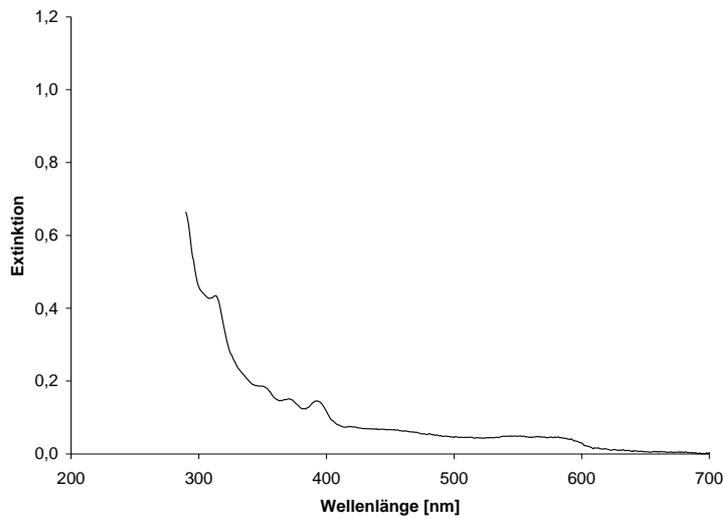
**Abb. 7-1:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt Blank, 1 ml Aliquot.



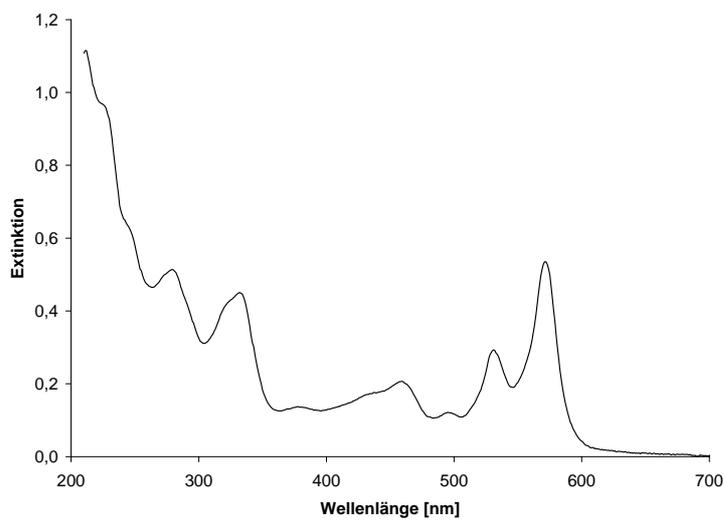
**Abb. 7-2:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt Blank, 1 ml Aliquot.



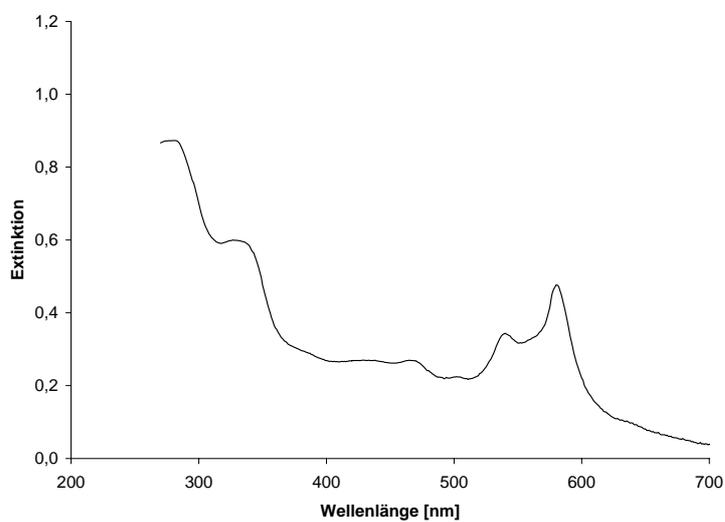
**Abb. 7-3:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt Blank, 1 ml Aliquot.



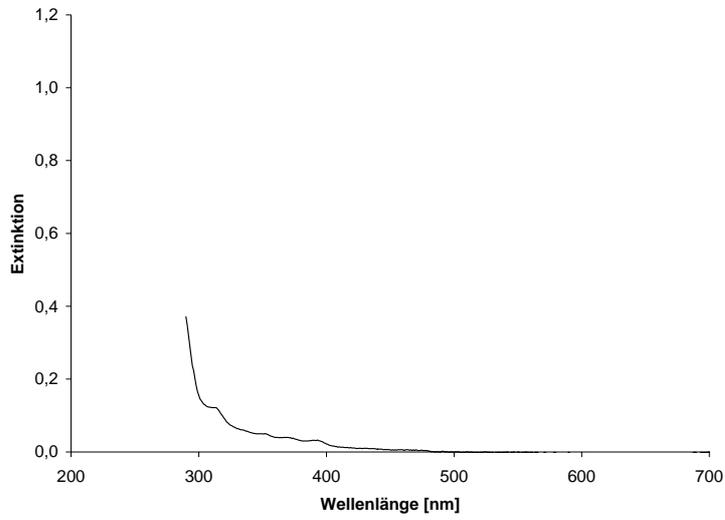
**Abb. 7-4:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt Li 1, 1 ml Aliquot, Absorptionsmaxima: 393, 370, 313 nm.



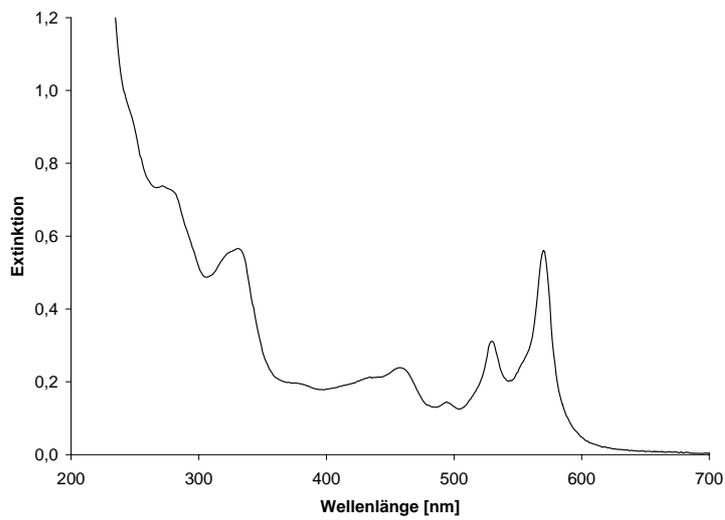
**Abb. 7-5:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt Li 1, 10 ml Aliquot 1:1 mit Methanol verdünnt, Absorptionsmaxima: 571, 531, 495, 459, 332, 279 nm.



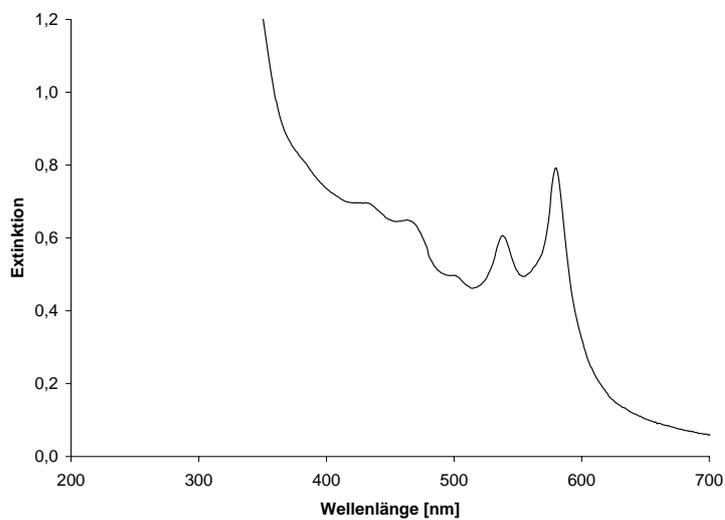
**Abb. 7-6:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt Li 1, 1 ml Aliquot 1:9 mit DMSO verdünnt, Absorptionsmaxima: 580, 540 nm.



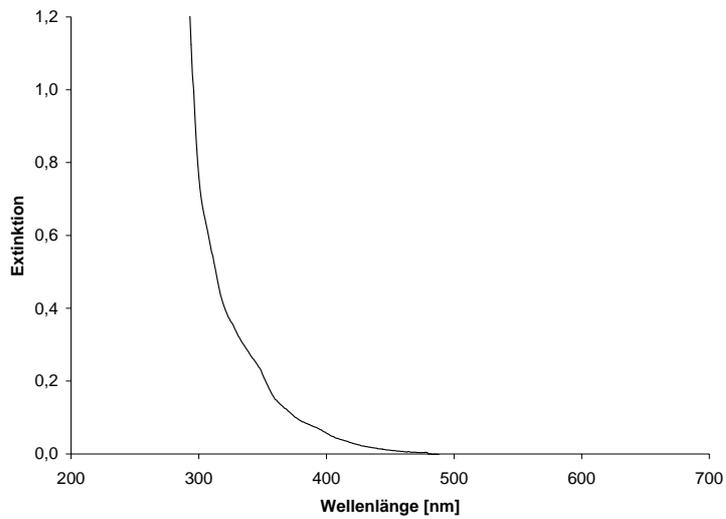
**Abb. 7-7:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt Ch 6.



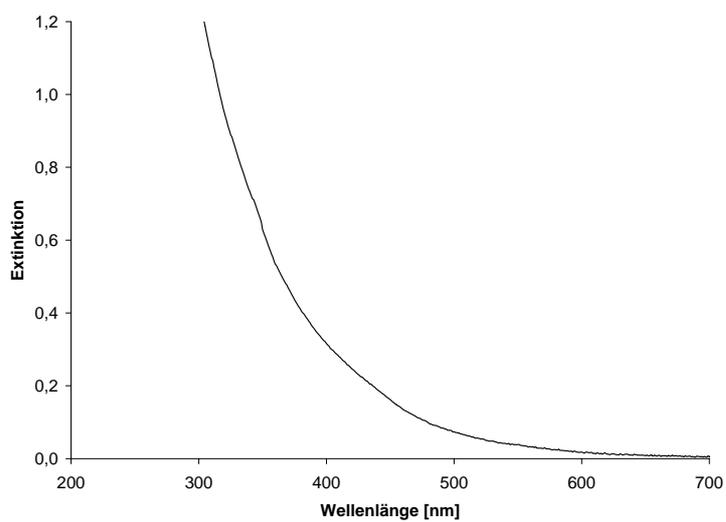
**Abb. 7-8:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt Ch 6,  
Absorptionsmaxima: 570, 530, 494,  
457, 330, 271 nm.



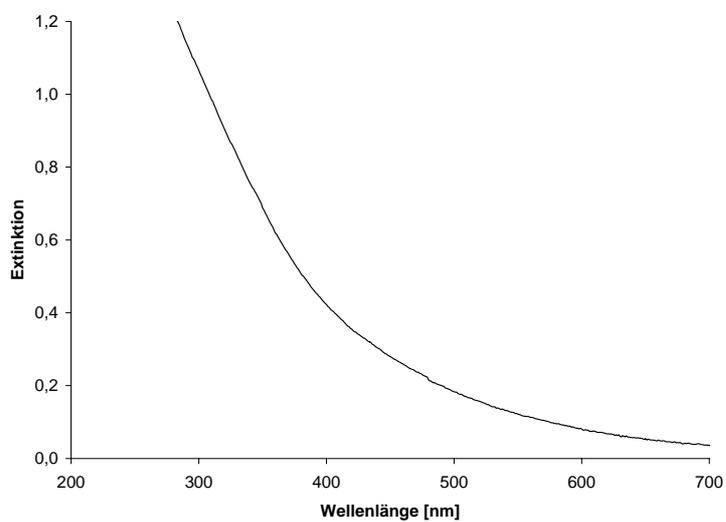
**Abb. 7-9:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt Ch 6,  
Absorptionsmaxima: 580, 538 nm.



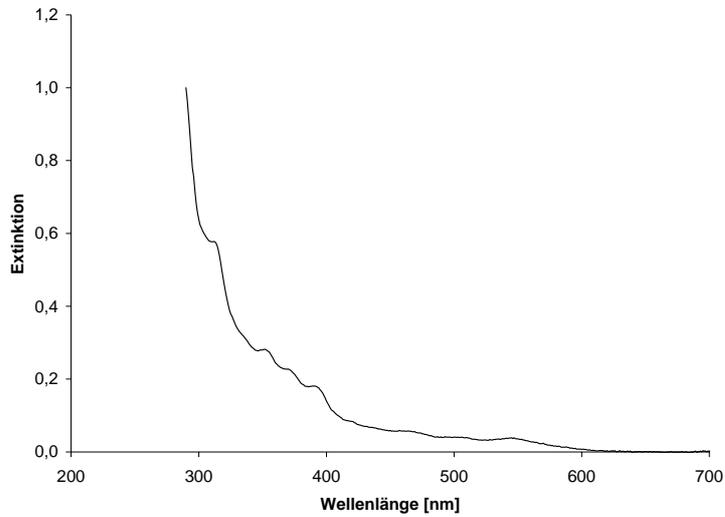
**Abb. 7-10:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt Ch 7, 1 ml Aliquot.



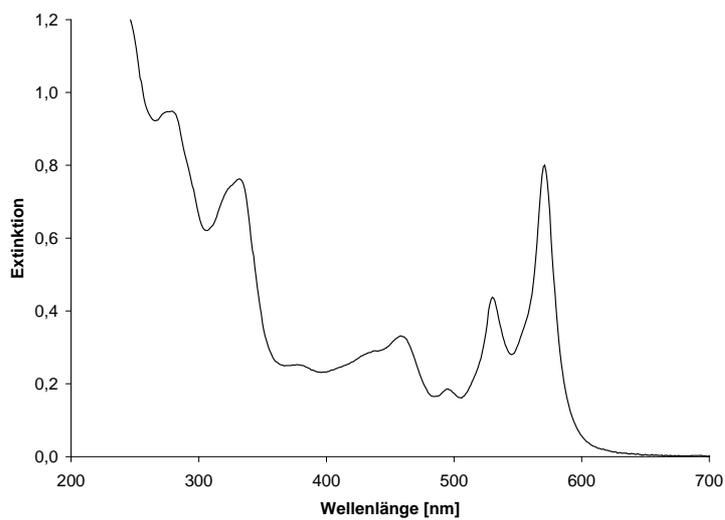
**Abb. 7-11:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt Ch 7, 1 ml Aliquot.



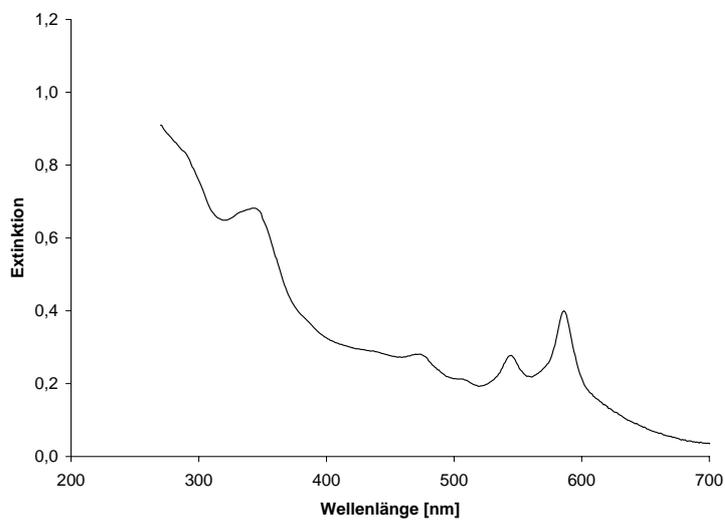
**Abb. 7-12:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt Ch 7, 1 ml Aliquot 1:4 mit DMSO verdünnt.



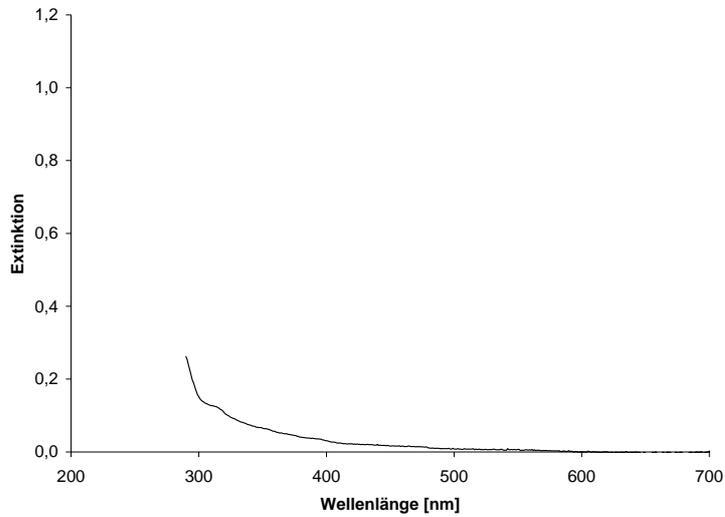
**Abb. 7-13:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt Ch 8, 1 ml Aliquot, Absorptionsmaxima: 390, 351, 312 nm.



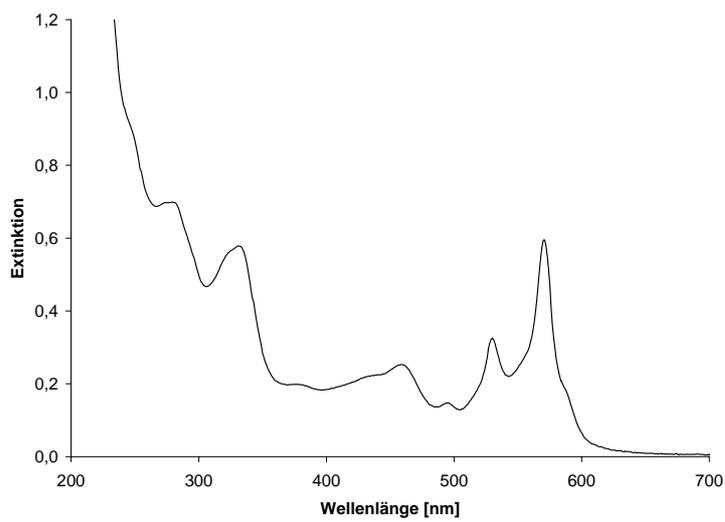
**Abb. 7-14:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt Ch 8, 1 ml Aliquot 1:1 mit Methanol verdünnt, Absorptionsmaxima: 571, 530, 495, 458, 332, 279 nm.



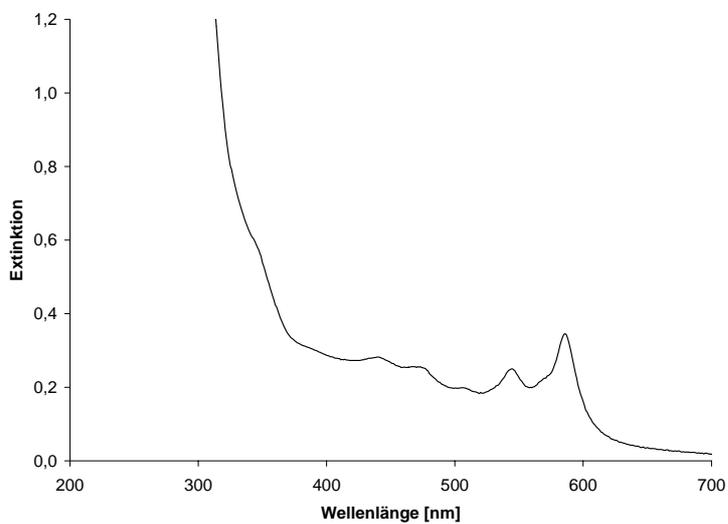
**Abb. 7-15:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt Ch 8, 1 ml Aliquot 1:4 mit DMSO verdünnt, Absorptionsmaxima: 586, 545 nm.



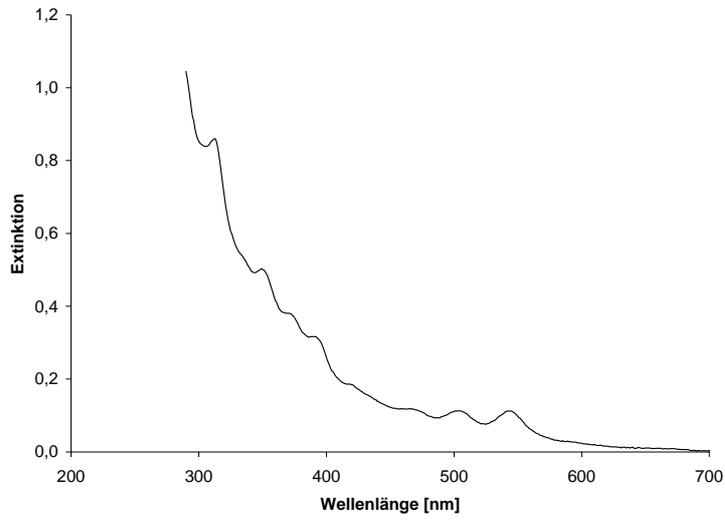
**Abb. 7-16:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt Ch 9, 1 ml Aliquot.



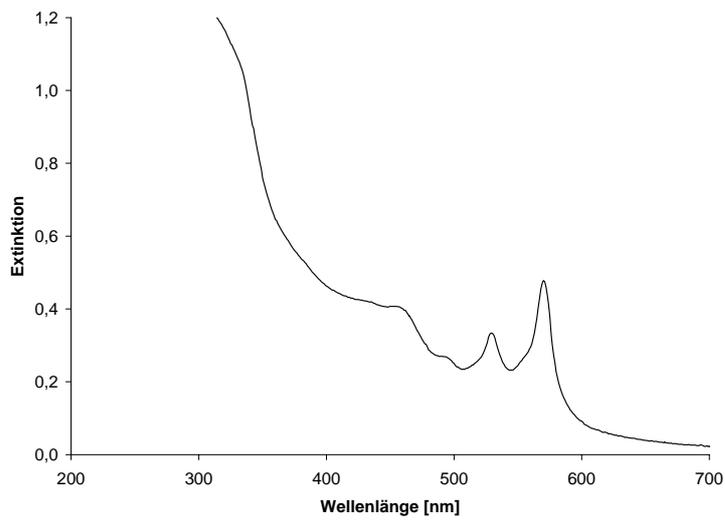
**Abb. 7-17:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt Ch 9, 1 ml Aliquot, Absorptionsmaxima: 570, 530, 495, 458, 331, 279 nm.



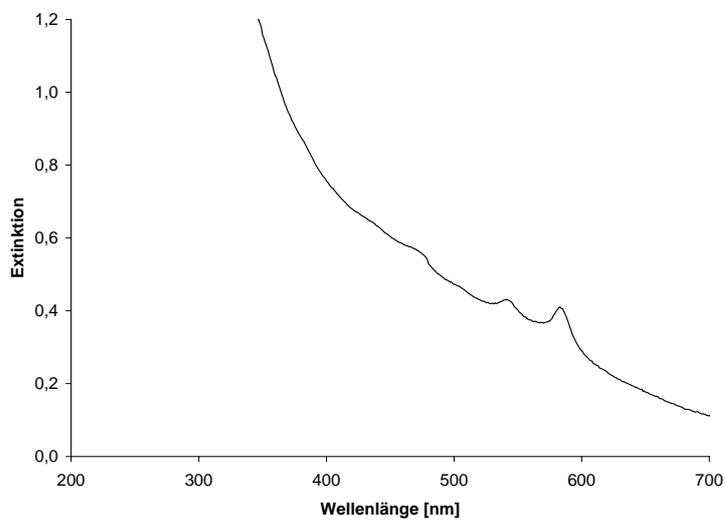
**Abb. 7-18:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt Ch 9, 1 ml Aliquot, Absorptionsmaxima: 586, 544 nm.



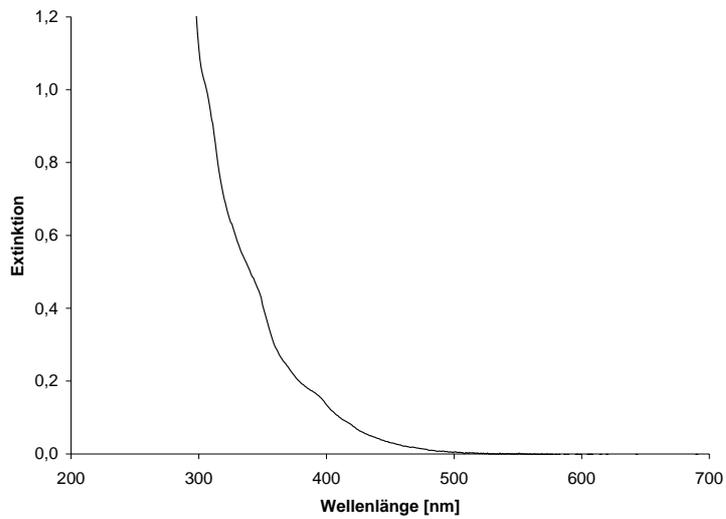
**Abb. 7-19:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt Ch 10, 1 ml Aliquot, Absorptionsmaxima: 542, 503, 389, 349, 312 nm.



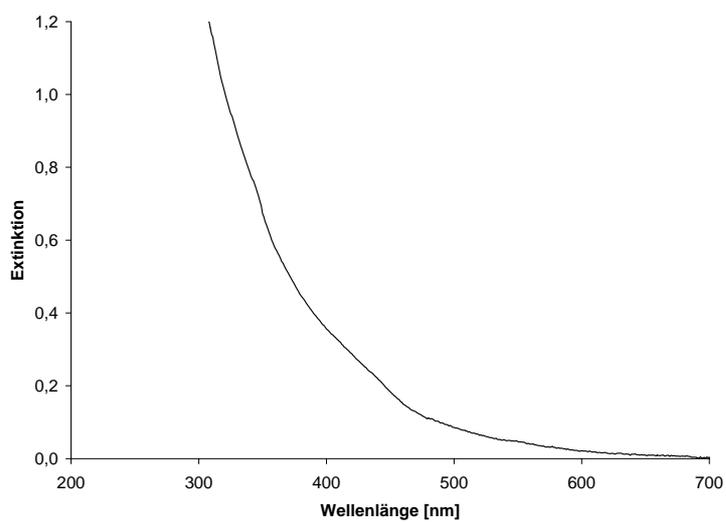
**Abb. 7-20:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt Ch 10, 1 ml Aliquot, Absorptionsmaxima: 570, 529 nm.



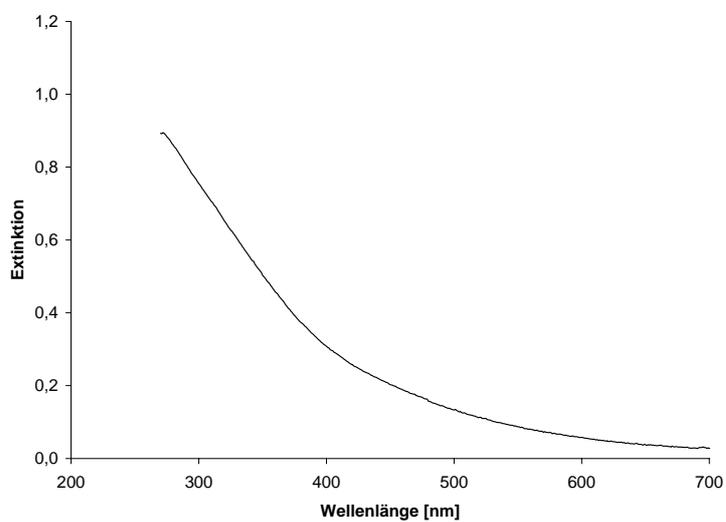
**Abb. 7-21:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt Ch 10, 1 ml Aliquot 1:9 mit DMSO verdünnt, Absorptionsmaxima: 583, 541 nm.



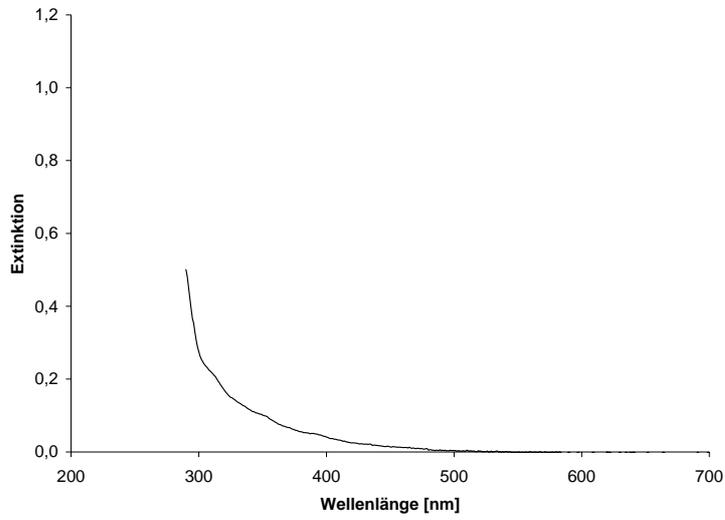
**Abb. 7-22:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt Ch 11, 1 ml Aliquot.



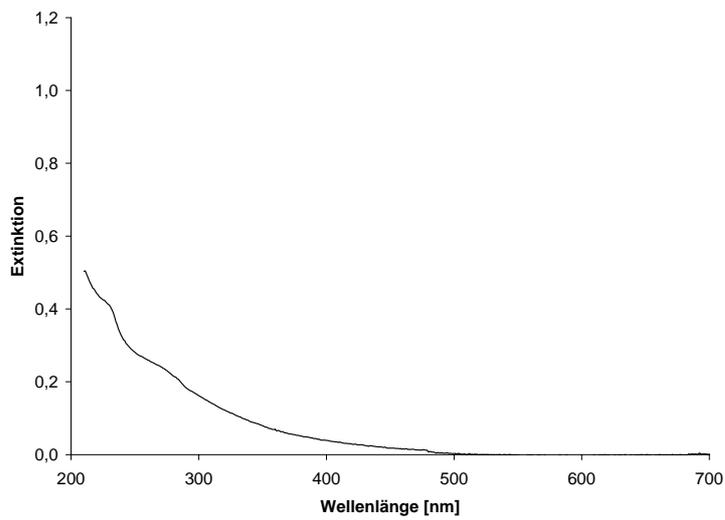
**Abb. 7-23:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt Ch 11, 1 ml Aliquot.



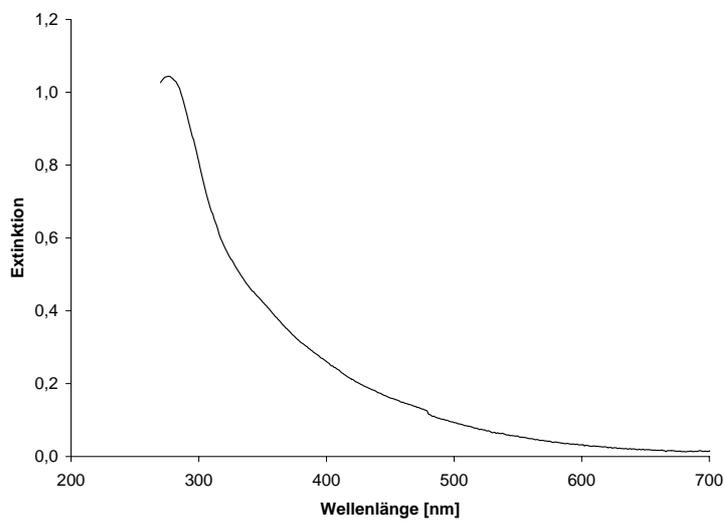
**Abb. 7-24:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt Ch 11, 1 ml Aliquot 1:9 mit DMSO verdünnt.



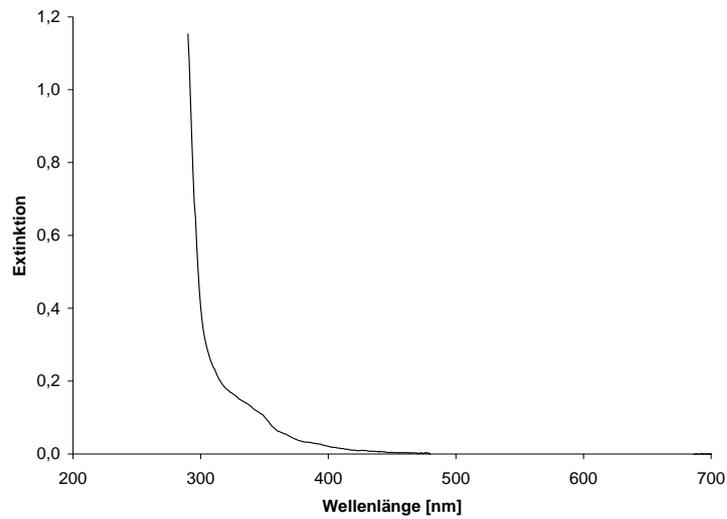
**Abb. 7-25:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt En 1, 1 ml Aliquot.



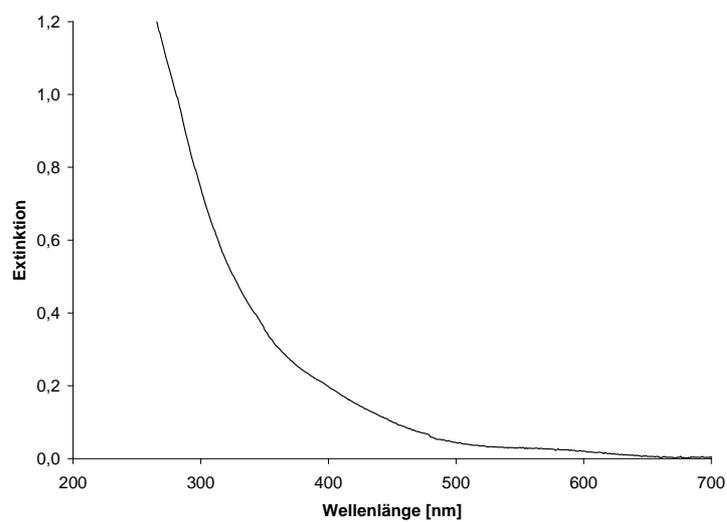
**Abb. 7-26:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt En 1, 1 ml Aliquot.



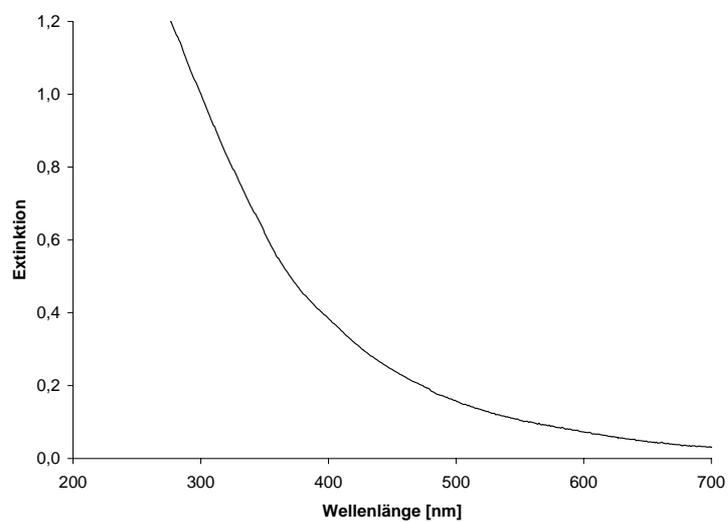
**Abb. 7-27:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt En 1, 1 ml Aliquot.



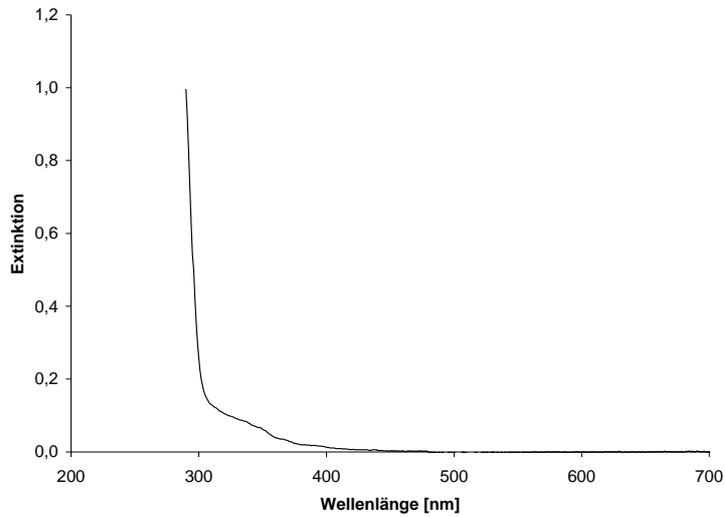
**Abb. 7-28:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt En 2, 1 ml Aliquot.



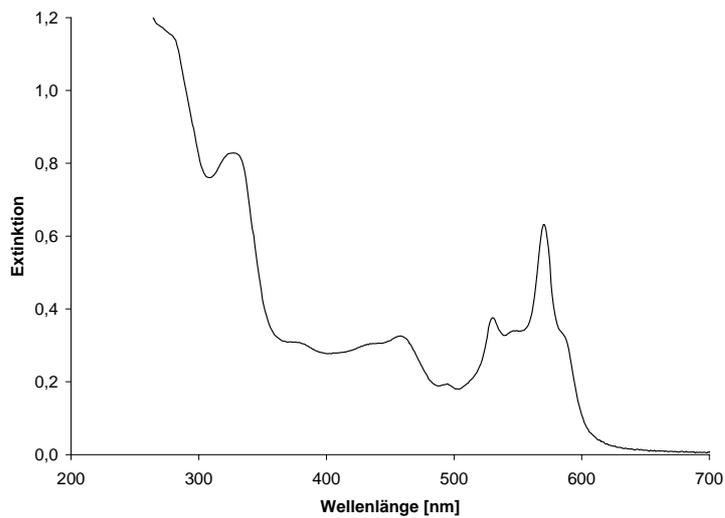
**Abb. 7-29:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt En 2, 1 ml Aliquot.



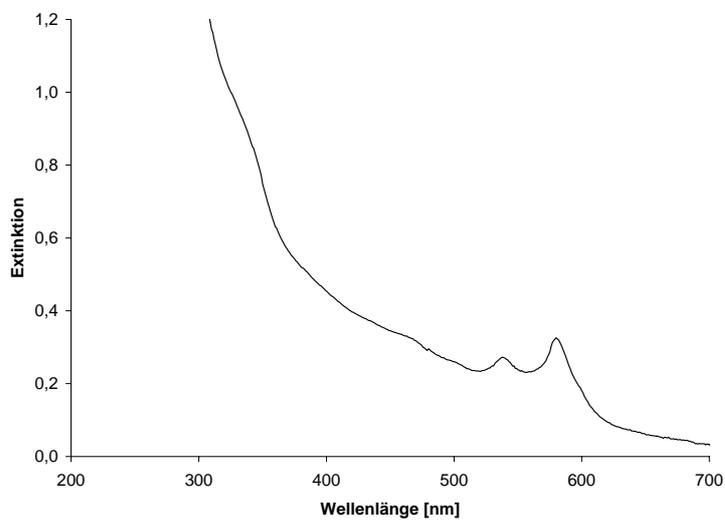
**Abb. 7-30:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt En 2, 1 ml Aliquot 1:4 mit DMSO verdünnt.



**Abb. 7-31:** UV/Vis-Spektrum von Toluolextrakt En 3, 1 ml Aliquot.

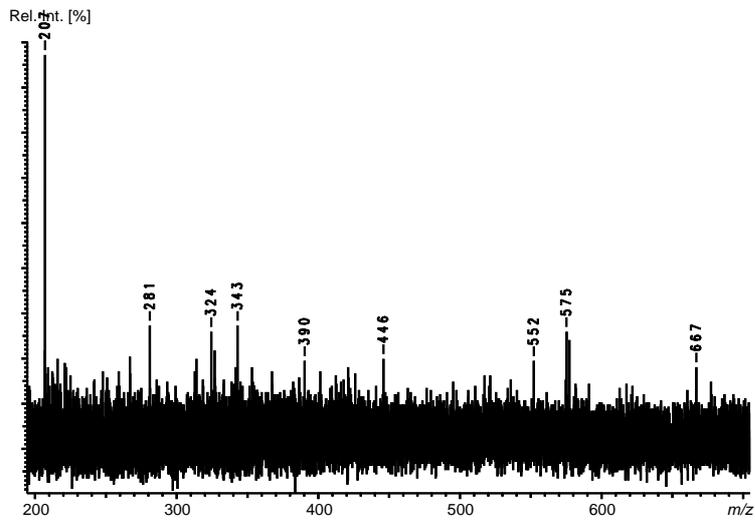


**Abb. 7-32:** UV/Vis-Spektrum von Methanolextrakt En 3, 1 ml Aliquot, Absorptionsmaxima: 570, 530, 495, 458, 327 nm.

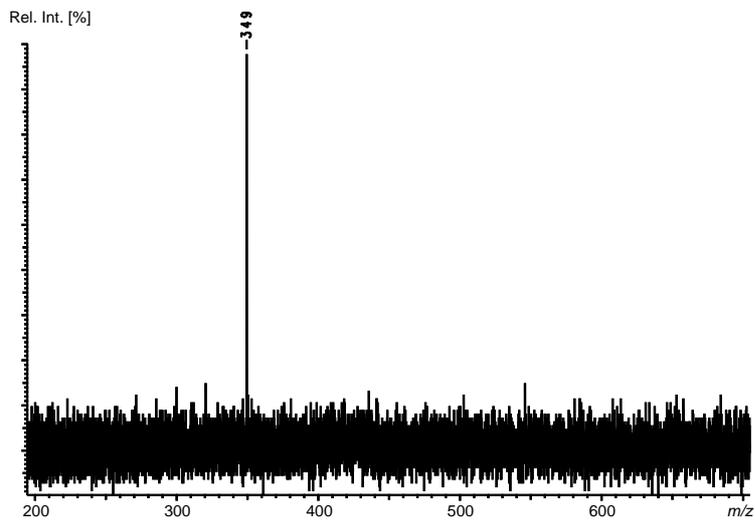


**Abb. 7-33:** UV/Vis-Spektrum von DMSO-Extrakt En 3, 1 ml Aliquot 1:1 mit DMSO verdünnt, Absorptionsmaxima: 580, 538 nm.

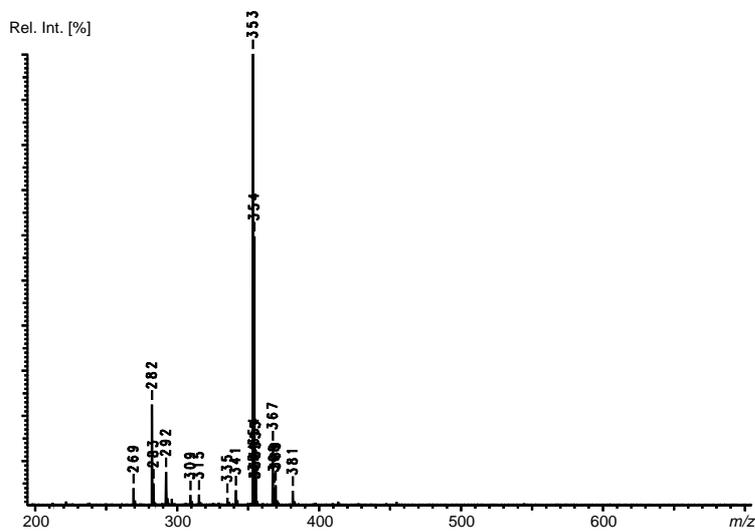
### 7.3 LDI-Massenspektren



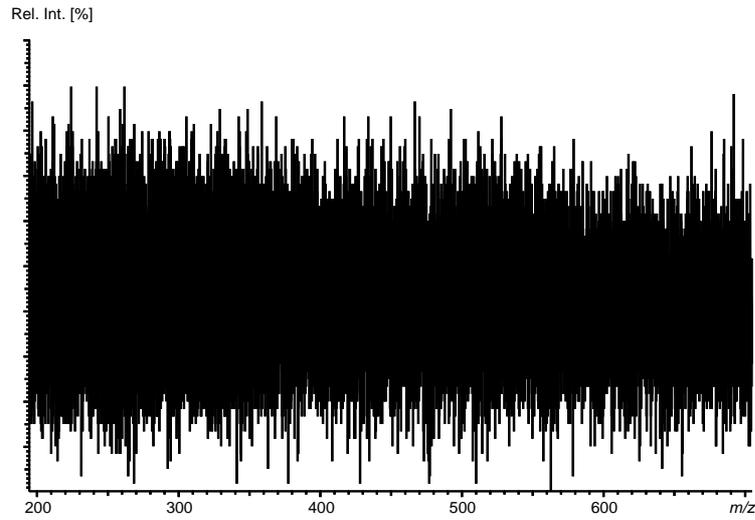
**Abb. 7-34:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Blank, positive Ionen.



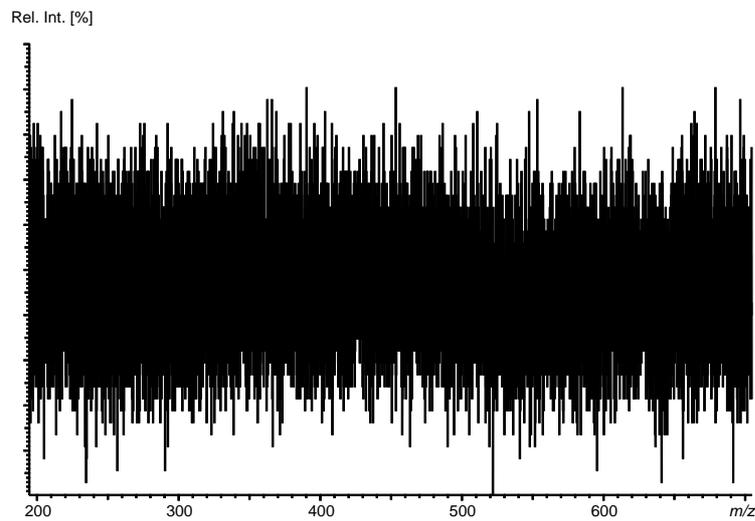
**Abb. 7-35:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Blank, positive Ionen.



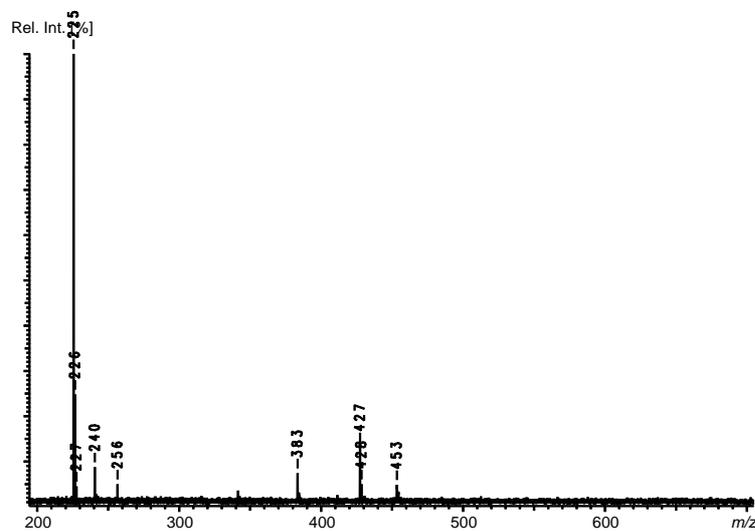
**Abb. 7-36:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Blank, positive Ionen.



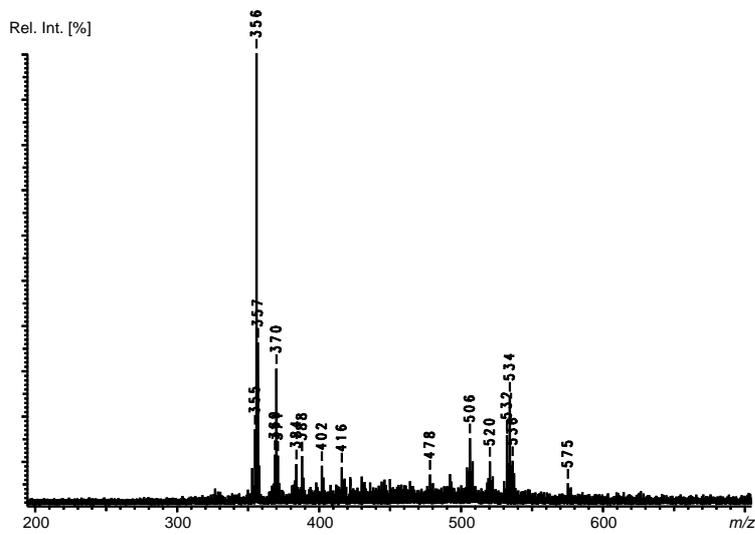
**Abb. 7-37:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Blank, negative Ionen.



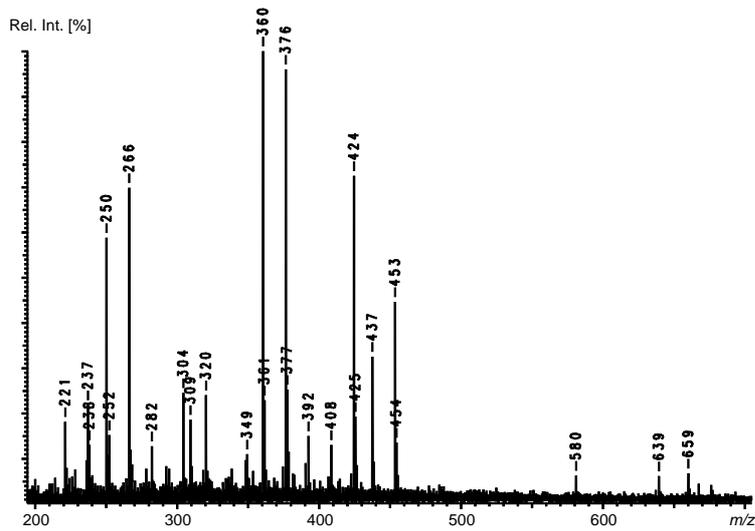
**Abb. 7-38:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Blank, negative Ionen.



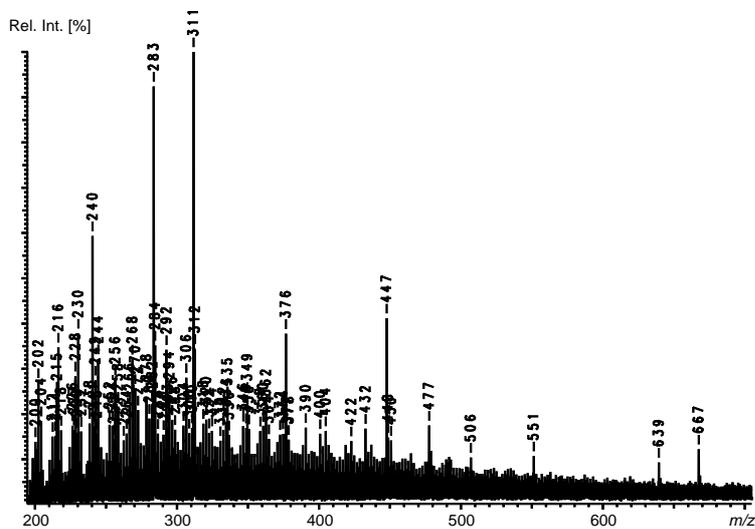
**Abb. 7-39:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Blank, negative Ionen.



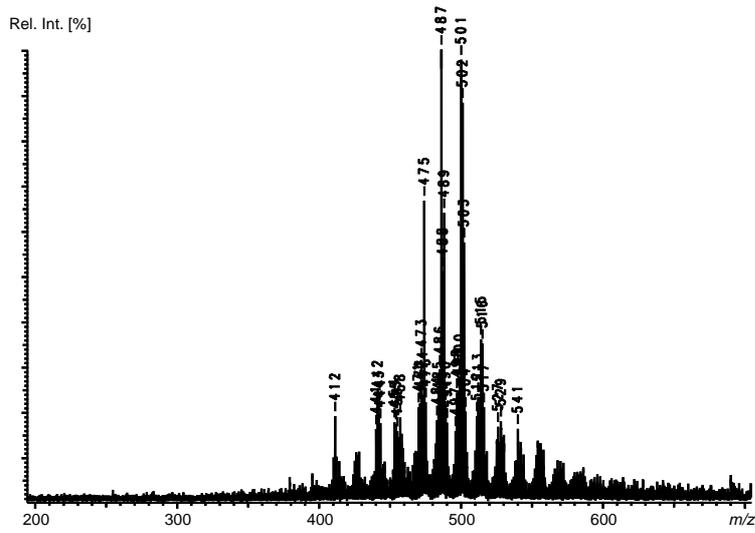
**Abb. 7-40:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Li 1, positive Ionen.



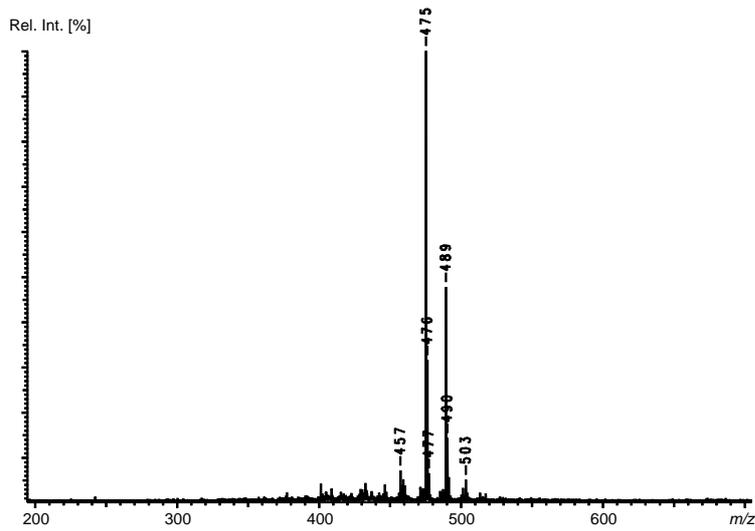
**Abb. 7-41:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Li 1, positive Ionen.



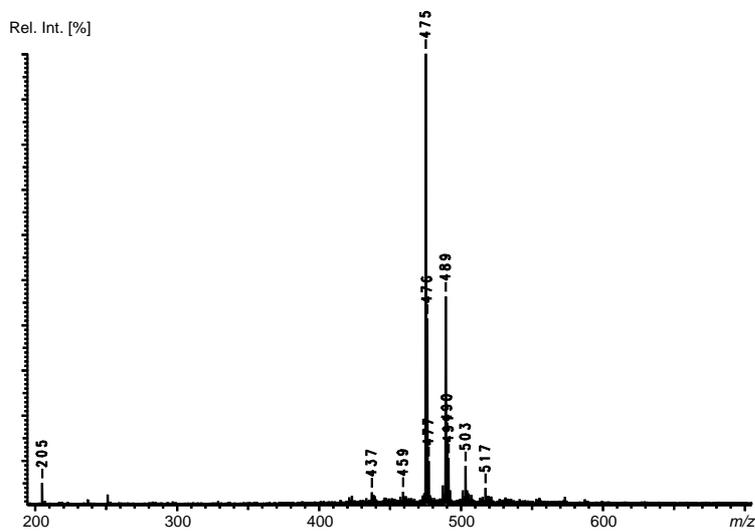
**Abb. 7-42:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Li 1, positive Ionen.



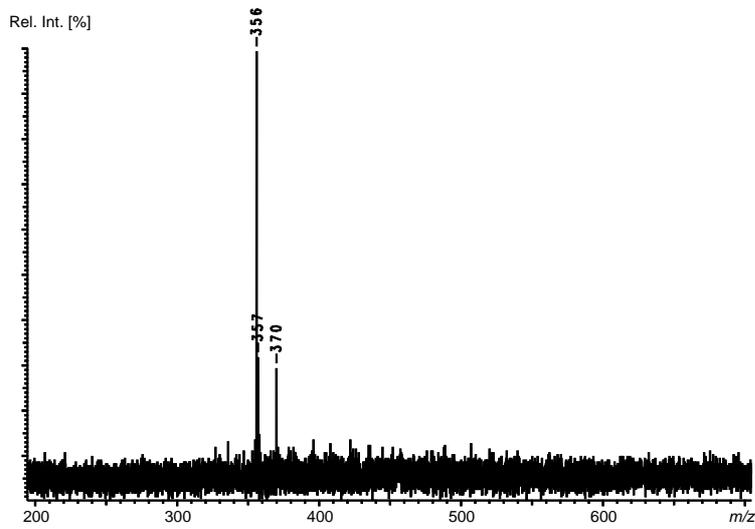
**Abb. 7-43:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Li 1, negative Ionen.



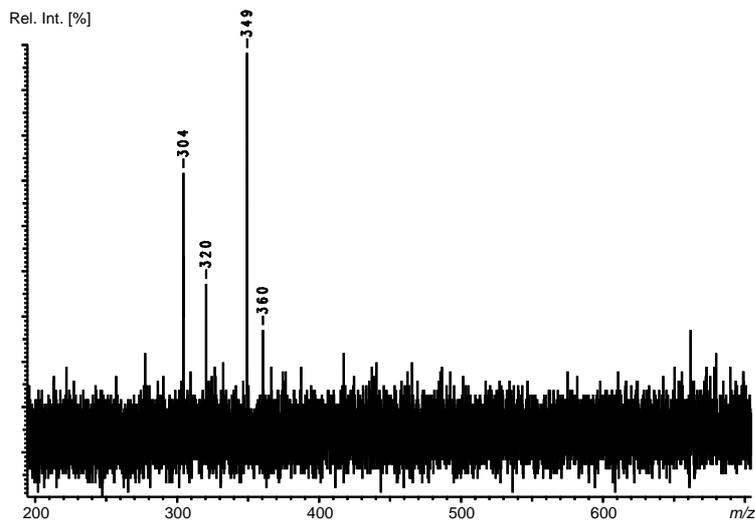
**Abb. 7-44:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Li 1, negative Ionen.



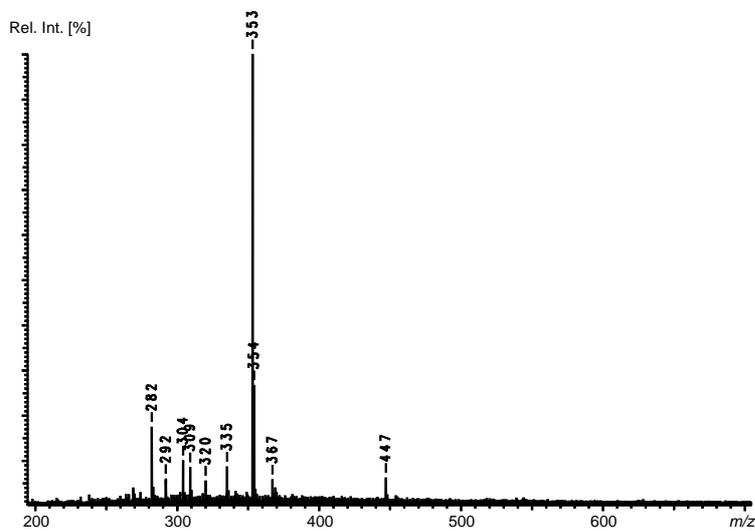
**Abb. 7-45:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Li 1, negative Ionen.



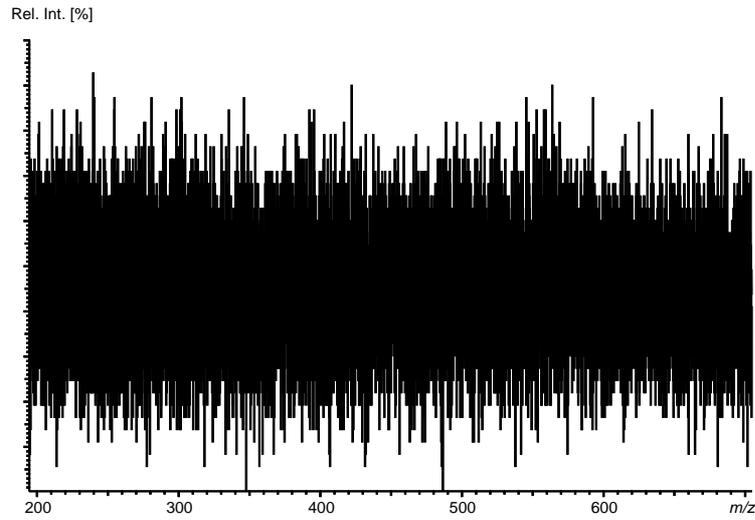
**Abb. 7-46:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 6, positive Ionen.



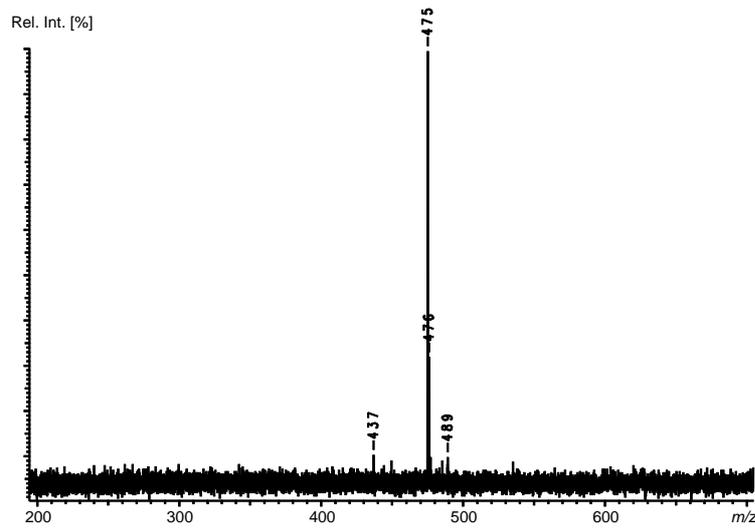
**Abb. 7-47:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 6, positive Ionen.



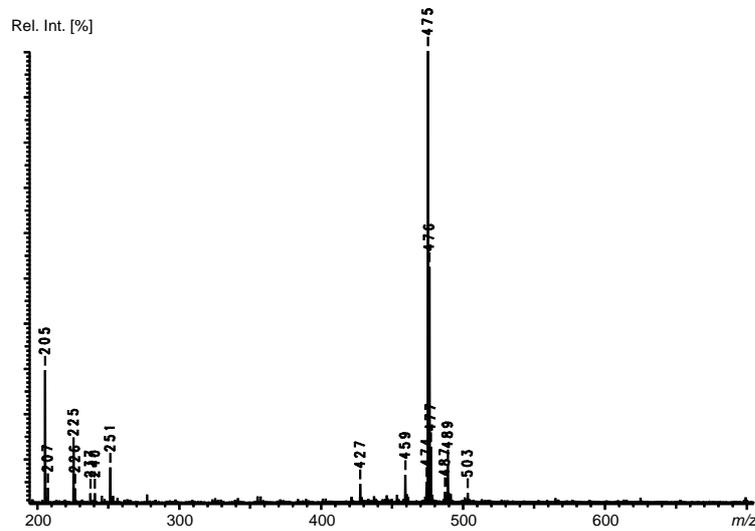
**Abb. 7-48:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 6, positive Ionen.



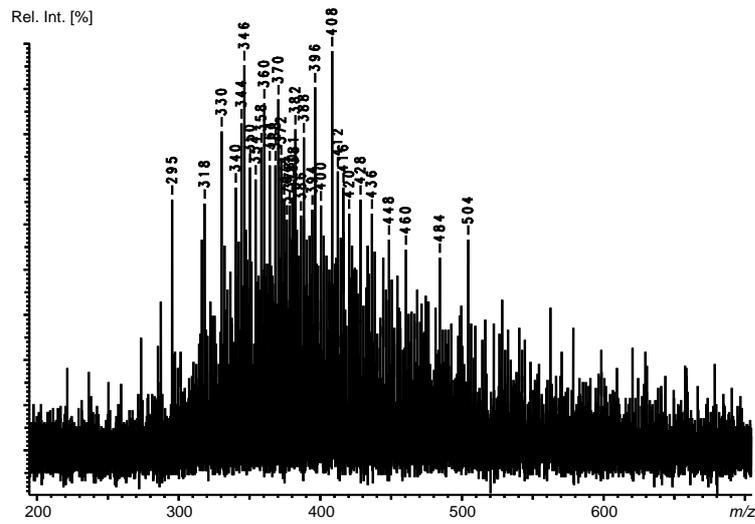
**Abb. 7-49:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 6, negative Ionen.



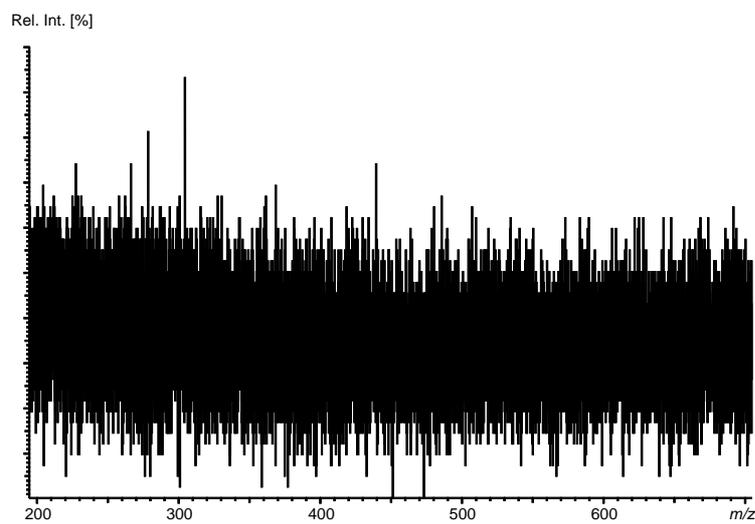
**Abb. 7-50:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 6, negative Ionen.



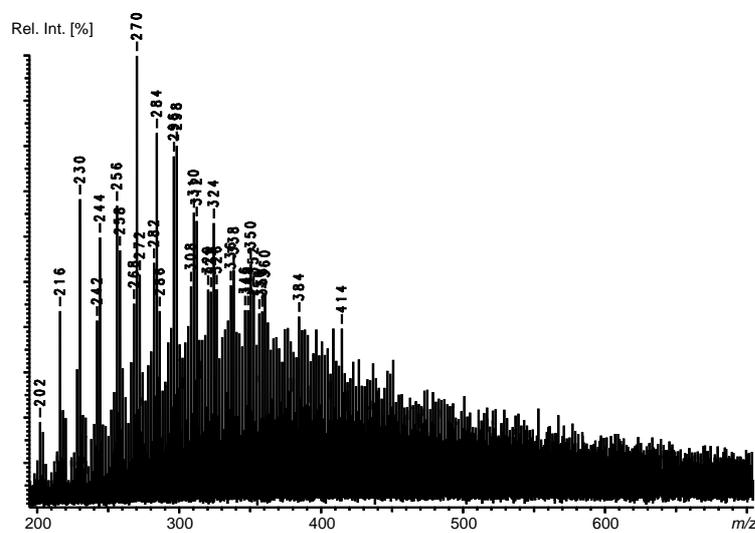
**Abb. 7-51:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 6, negative Ionen.



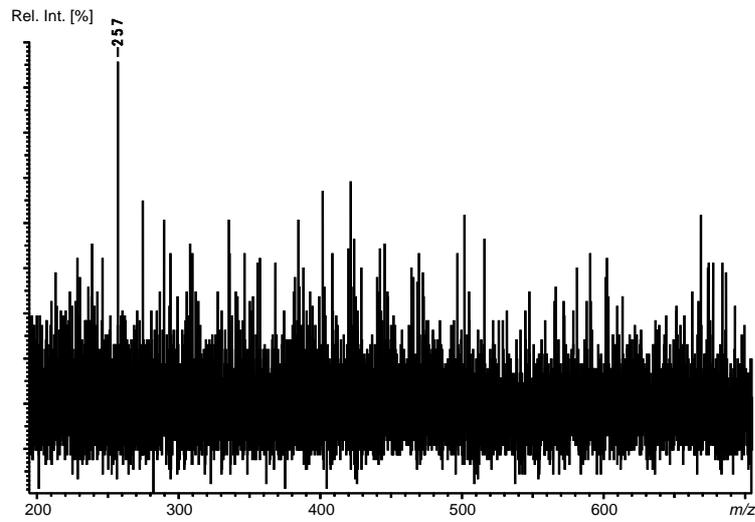
**Abb. 7-52:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 7, positive Ionen.



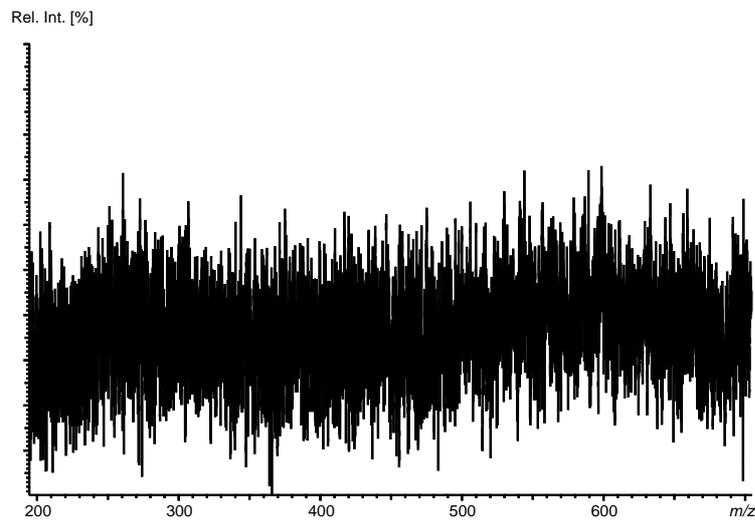
**Abb. 7-53:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 7, positive Ionen.



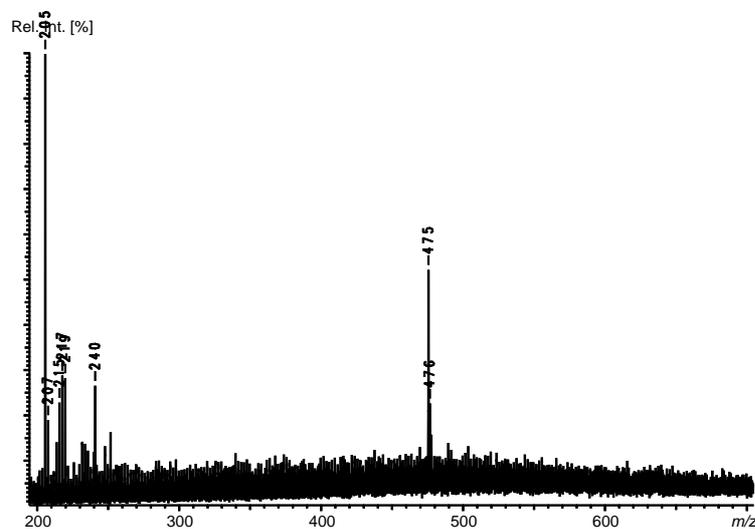
**Abb. 7-54:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 7, positive Ionen.



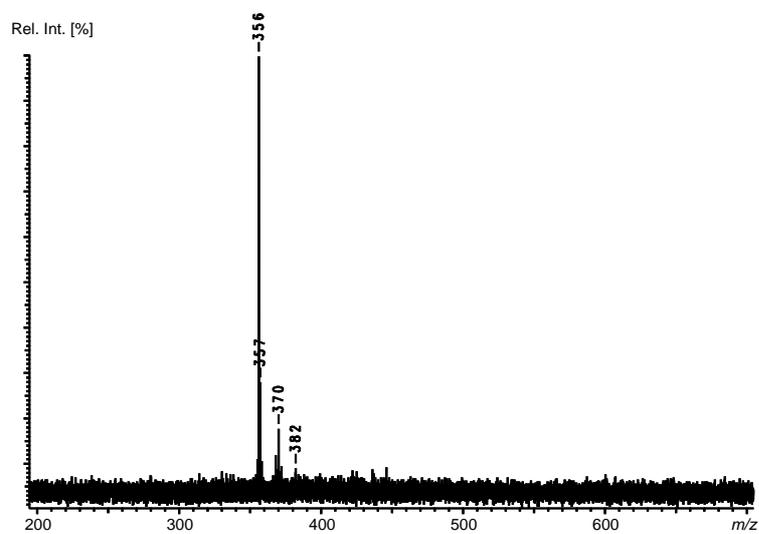
**Abb. 7-55:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 7, negative Ionen.



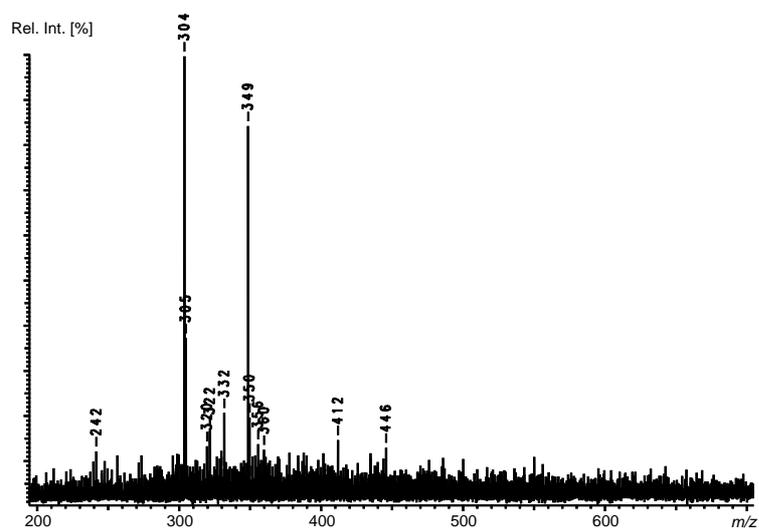
**Abb. 7-56:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 7, negative Ionen.



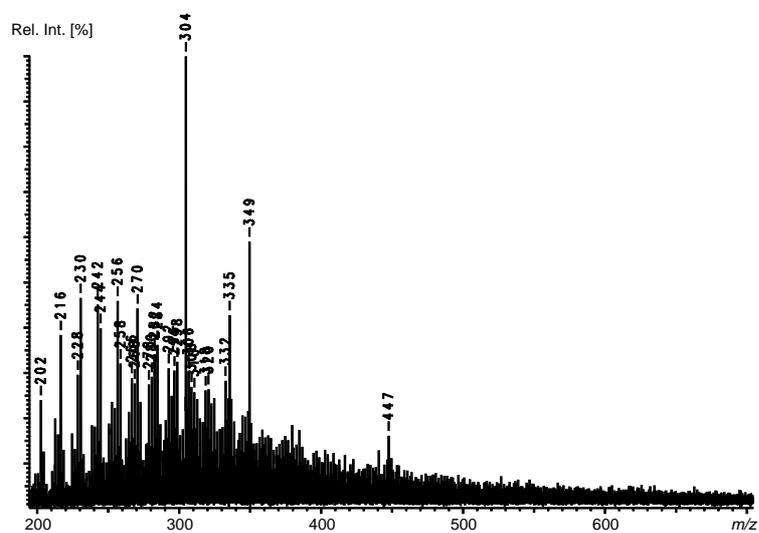
**Abb. 7-57:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 7, negative Ionen.



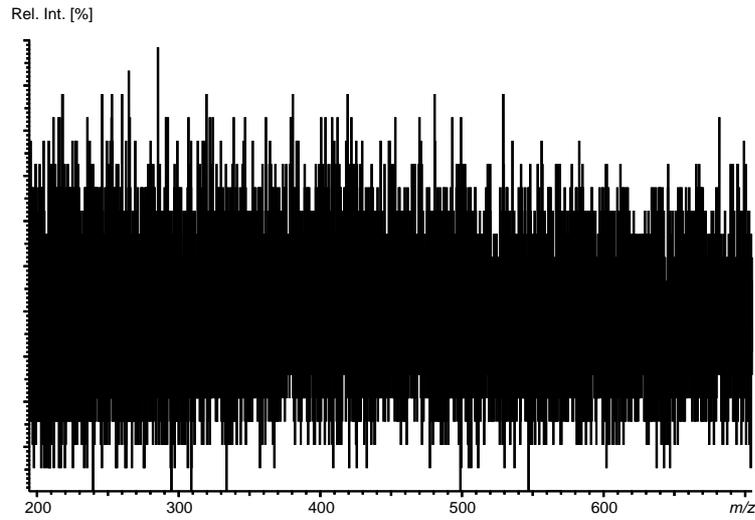
**Abb. 7-58:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 8, positive Ionen.



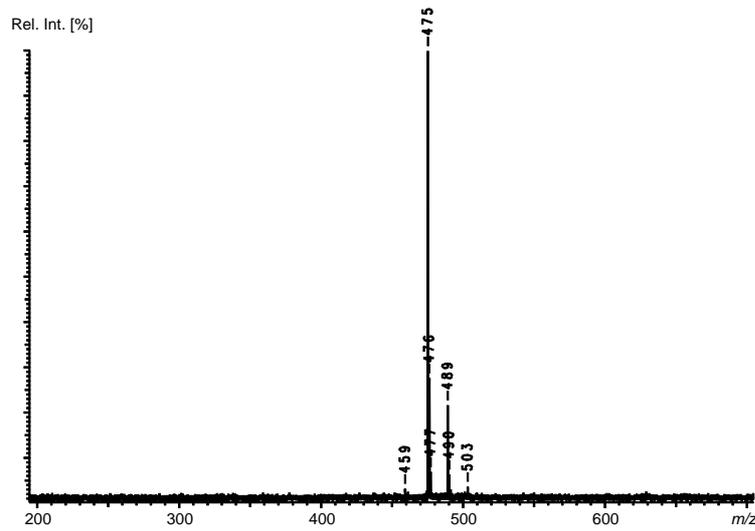
**Abb. 7-59:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 8, positive Ionen.



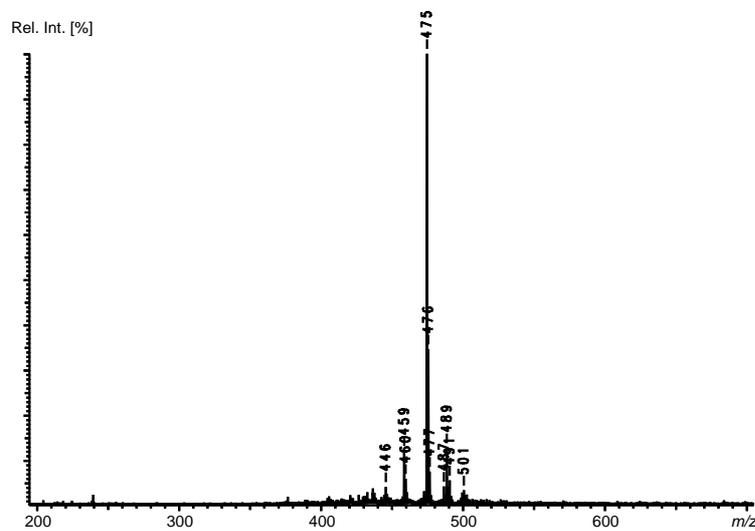
**Abb. 7-60:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 8, positive Ionen.



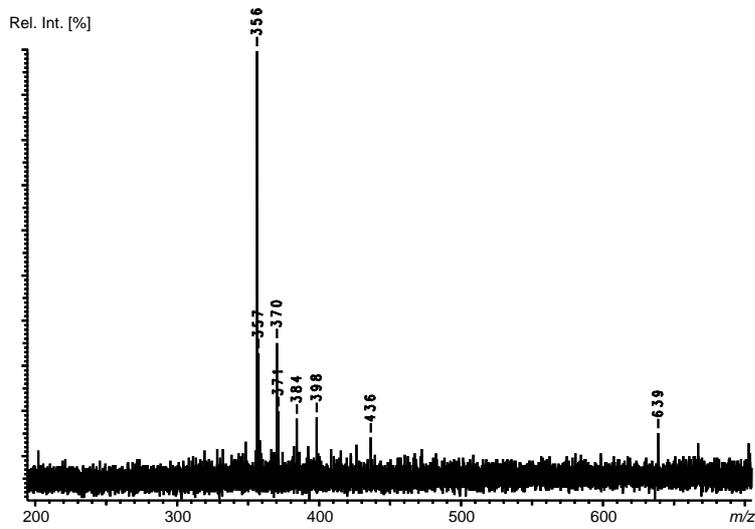
**Abb. 7-61:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 8, negative Ionen.



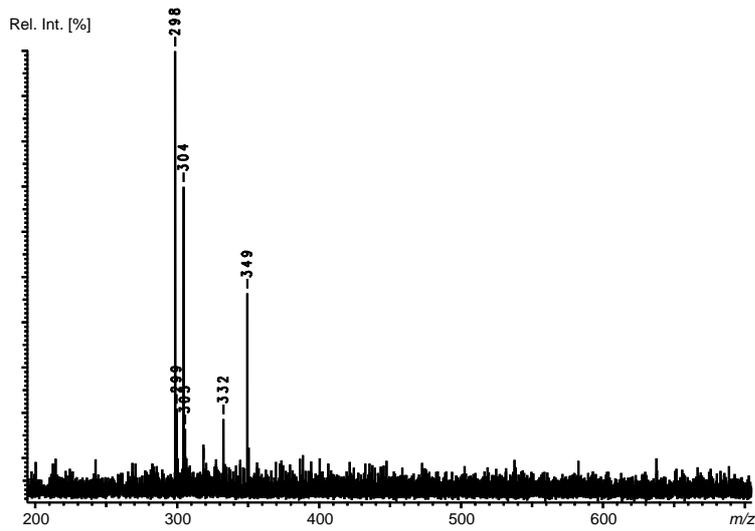
**Abb. 7-62:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 8, negative Ionen.



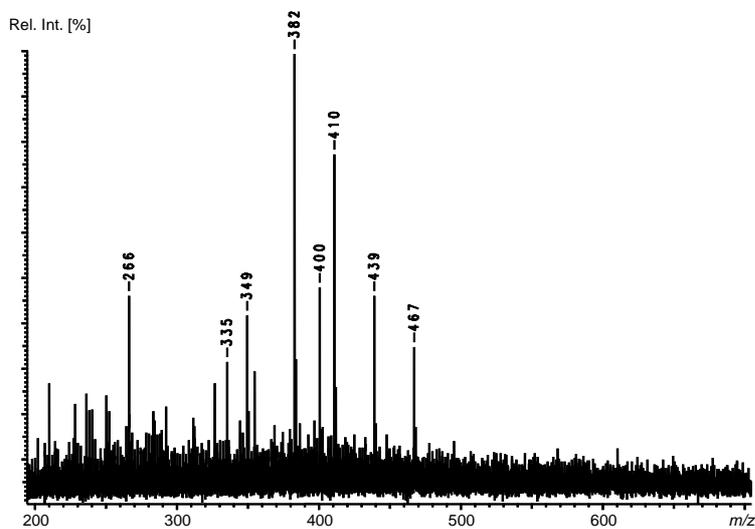
**Abb. 7-63:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 8, negative Ionen.



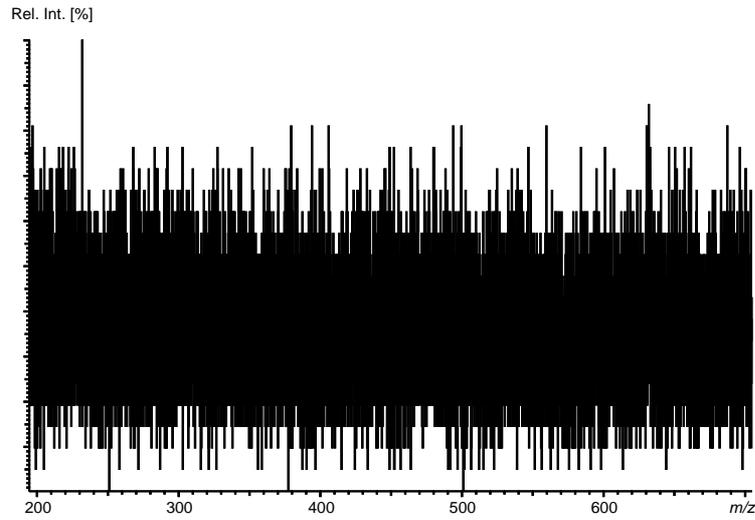
**Abb. 7-64:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 9, positive Ionen.



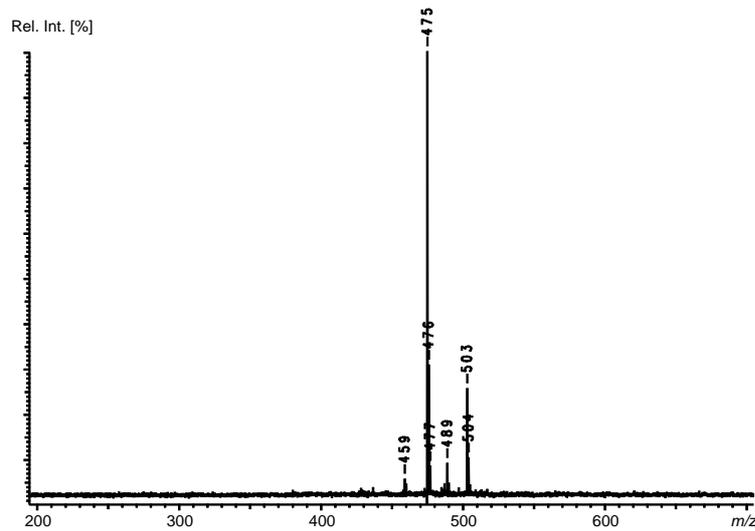
**Abb. 7-65:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 9, positive Ionen.



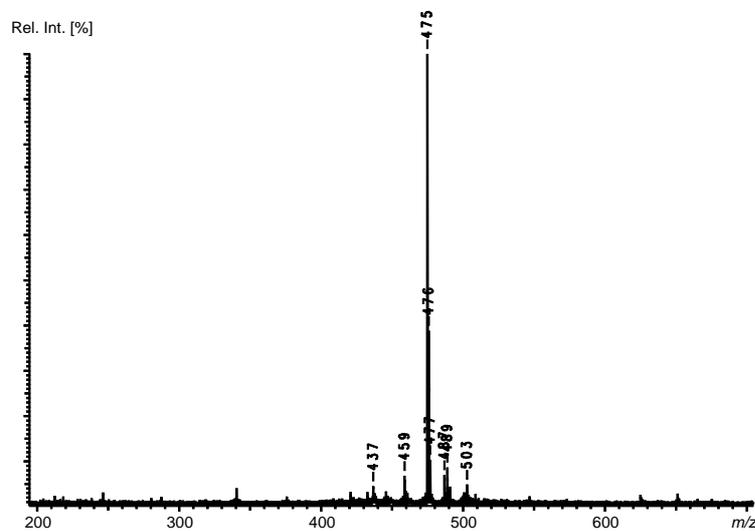
**Abb. 7-66:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 9, positive Ionen.



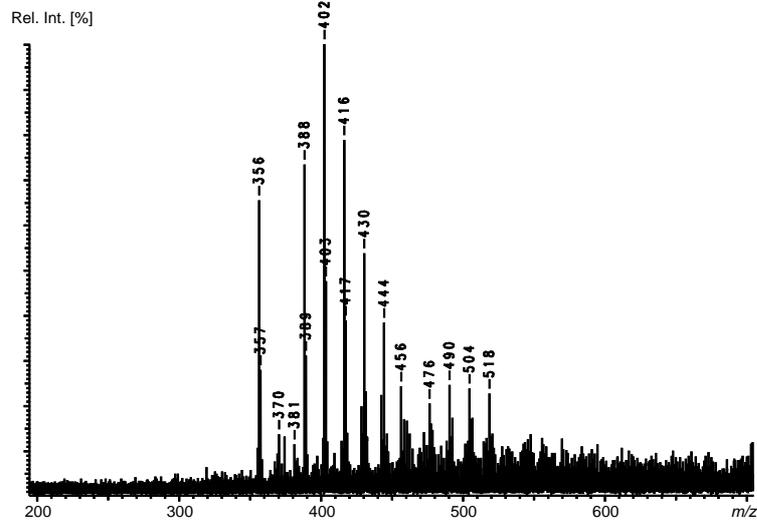
**Abb. 7-67:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 9, negative Ionen.



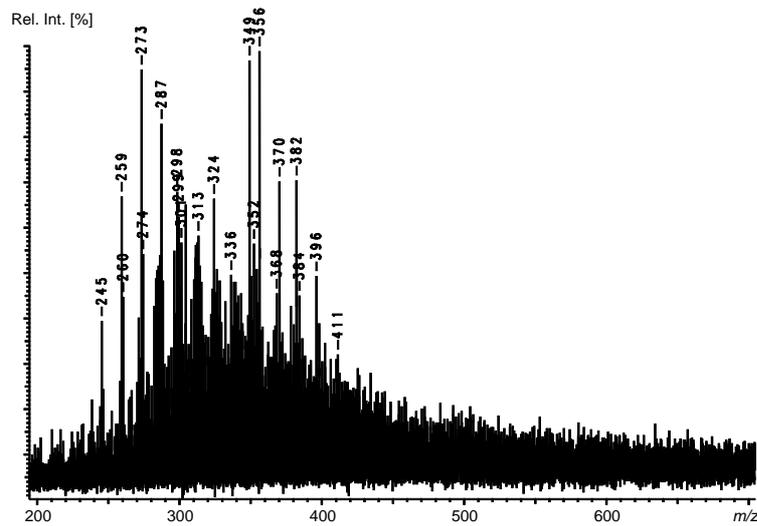
**Abb. 7-68:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 9, negative Ionen.



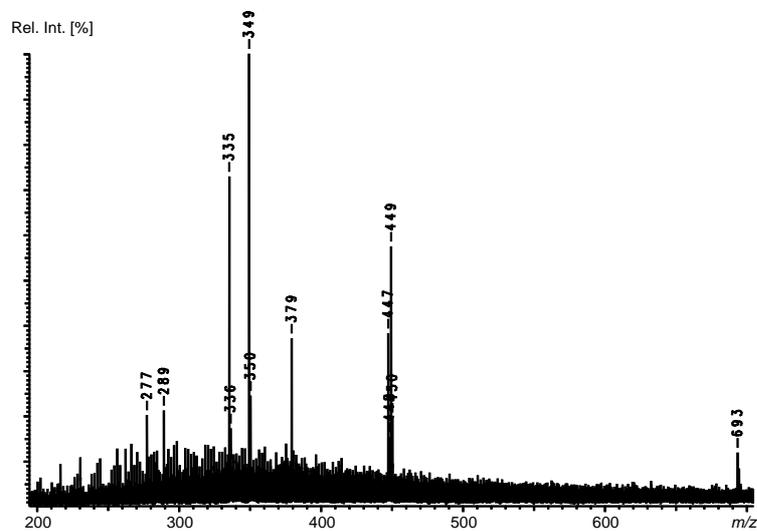
**Abb. 7-69:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 9, negative Ionen.



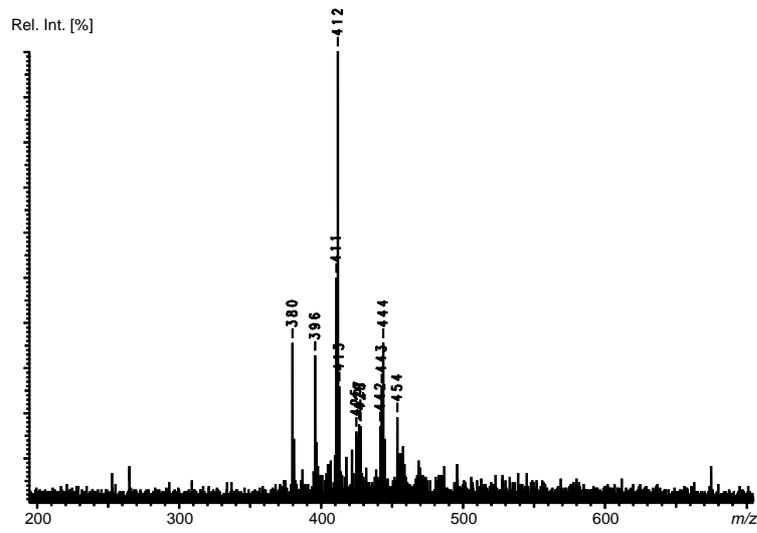
**Abb. 7-70:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 10, positive Ionen.



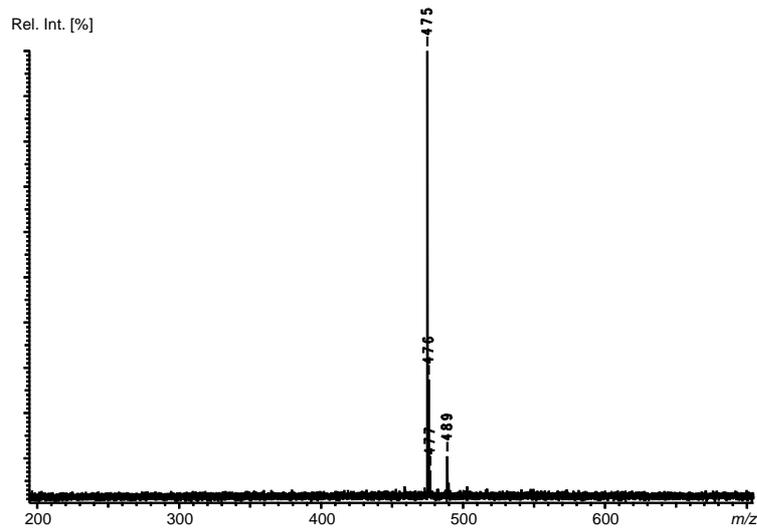
**Abb. 7-71:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 10, positive Ionen.



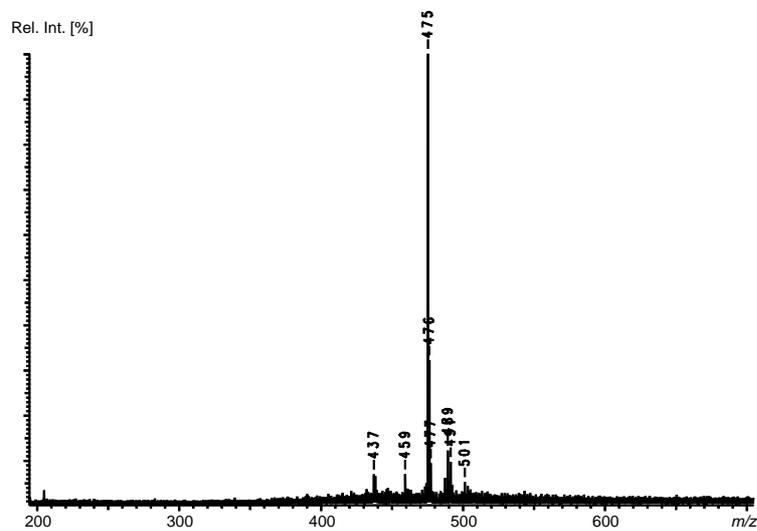
**Abb. 7-72:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 10, positive Ionen.



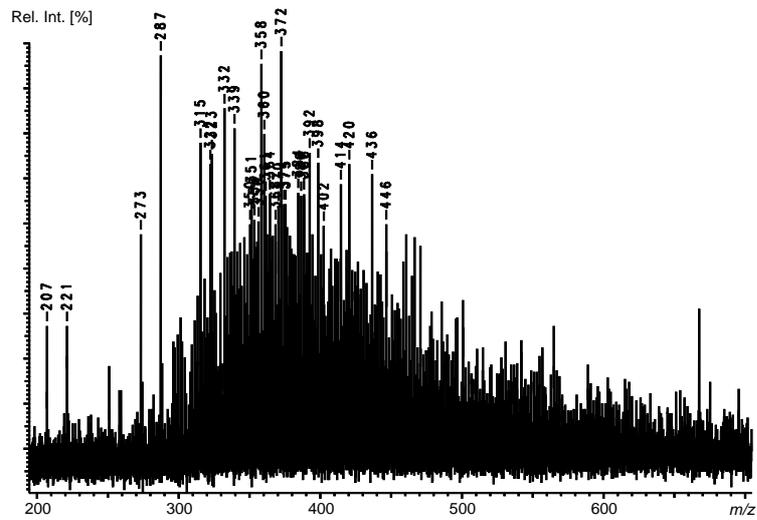
**Abb. 7-73:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 10, negative Ionen.



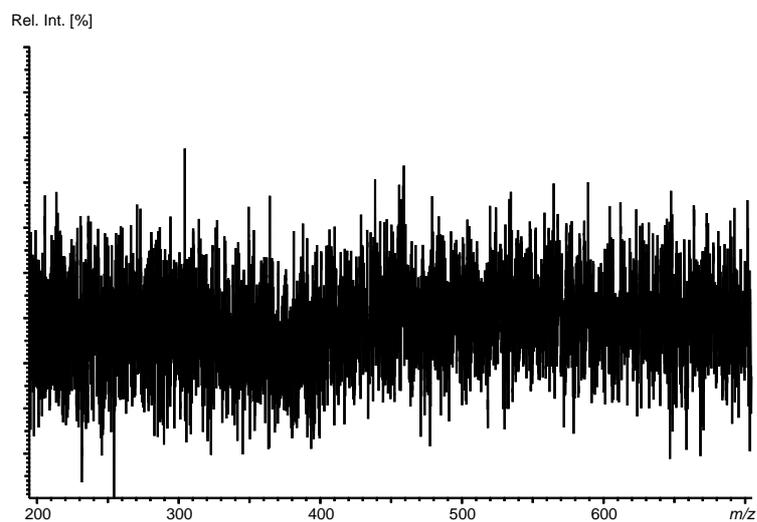
**Abb. 7-74:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 10, negative Ionen.



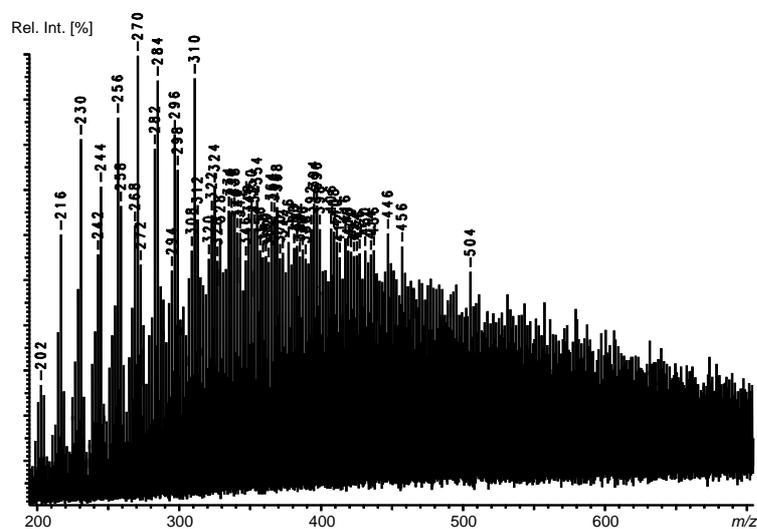
**Abb. 7-75:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 10, negative Ionen.



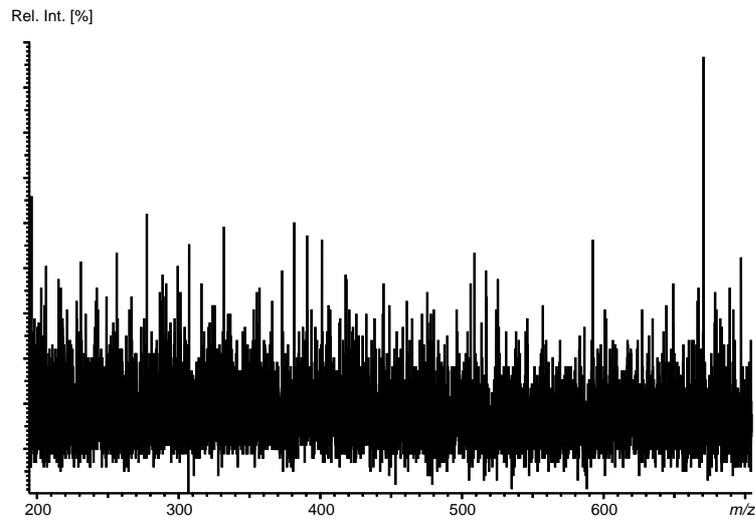
**Abb. 7-76:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 11, positive Ionen.



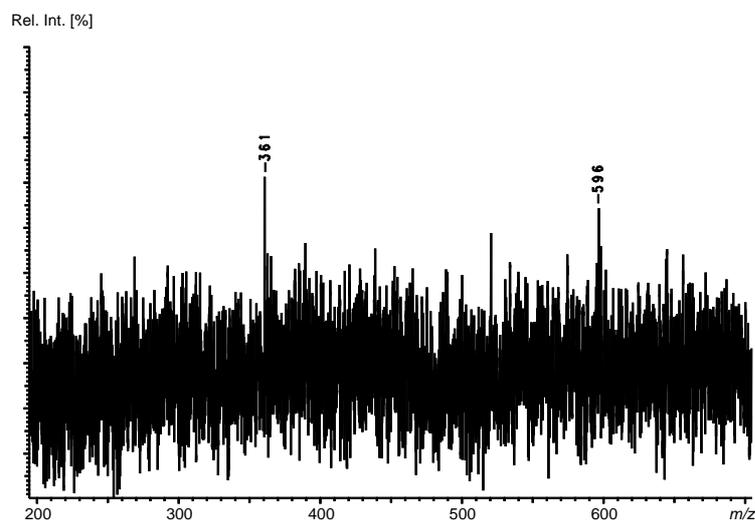
**Abb. 7-77:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 11, positive Ionen.



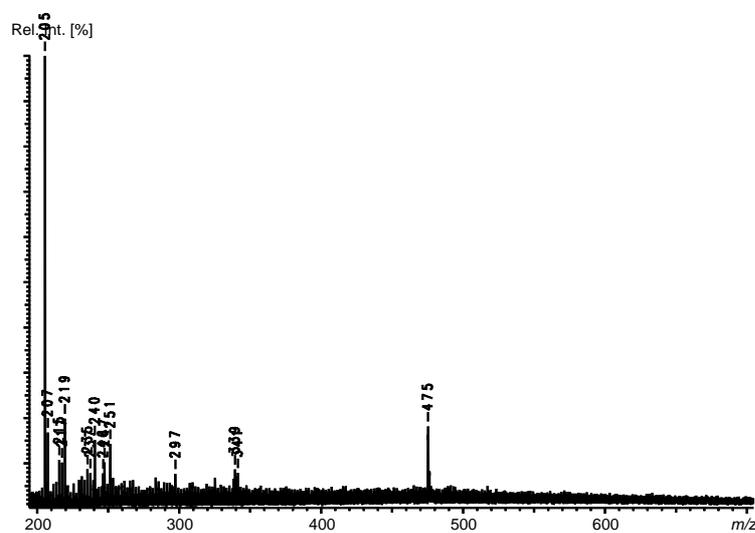
**Abb. 7-78:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 11, positive Ionen.



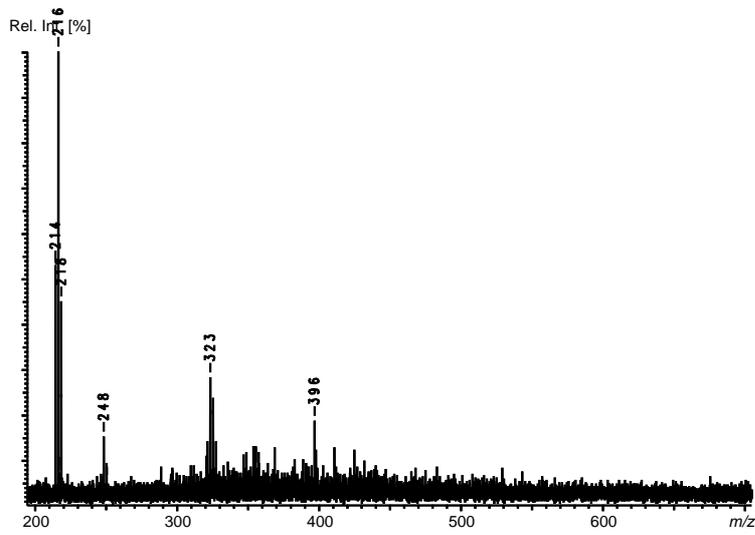
**Abb. 7-79:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt Ch 11, negative Ionen.



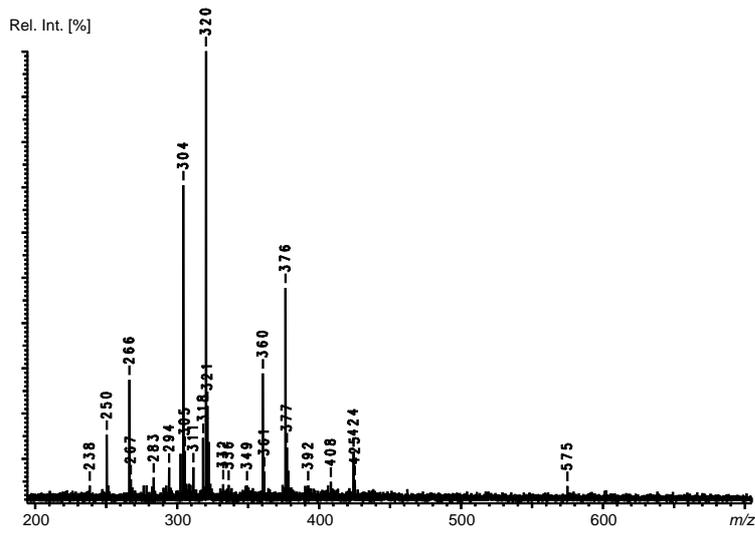
**Abb. 7-80:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt Ch 11, negative Ionen.



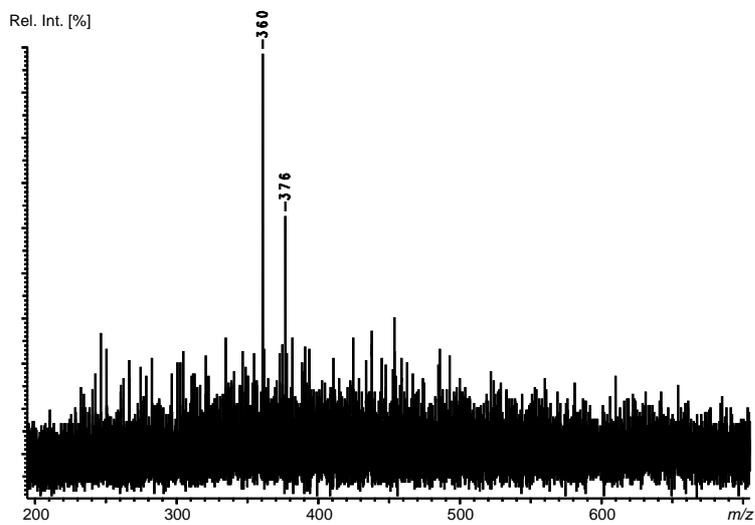
**Abb. 7-81:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt Ch 11, negative Ionen.



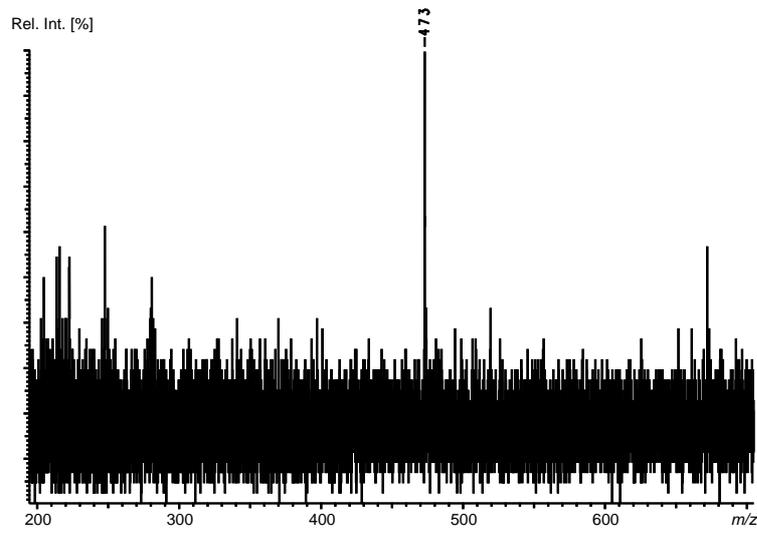
**Abb. 7-82:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt En 1, positive Ionen.



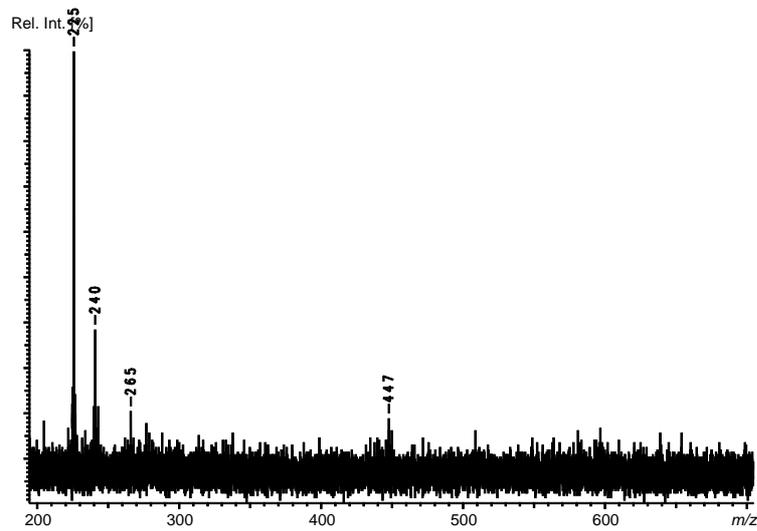
**Abb. 7-83:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt En 1, positive Ionen.



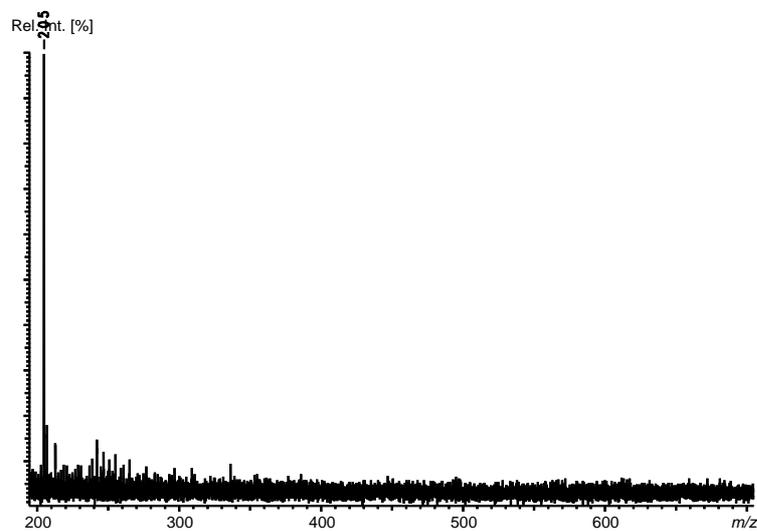
**Abb. 7-84:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt En 1, positive Ionen.



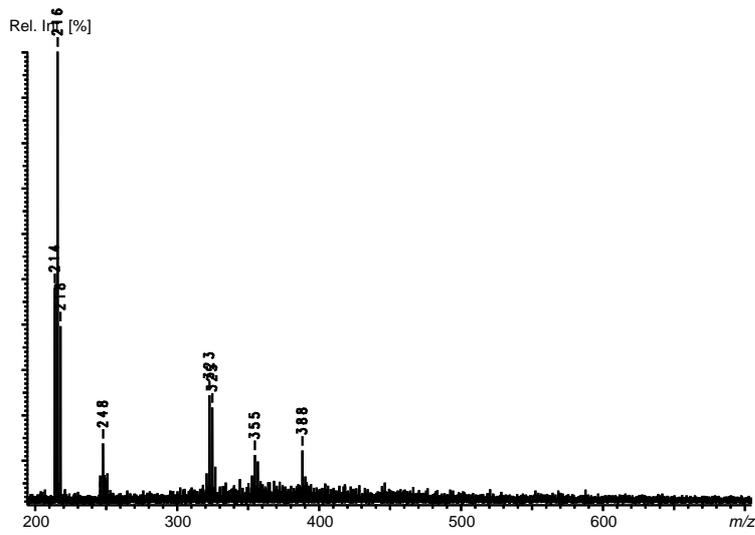
**Abb. 7-85:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt En 1, negative Ionen.



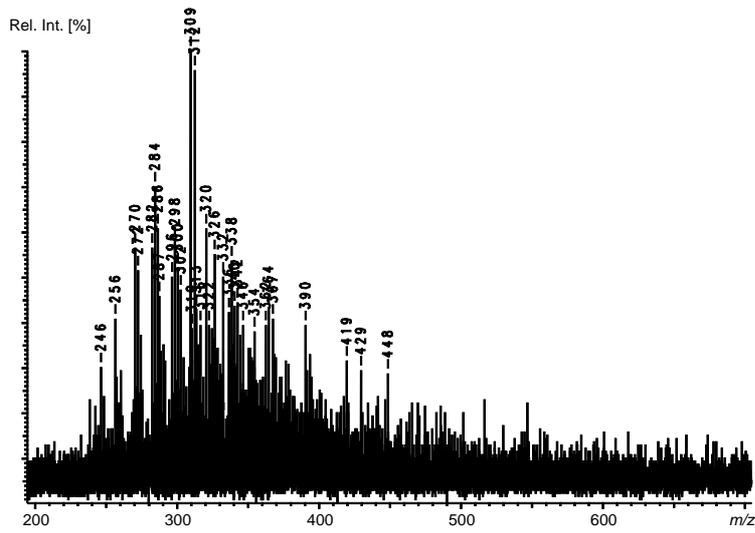
**Abb. 7-86:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt En 1, negative Ionen.



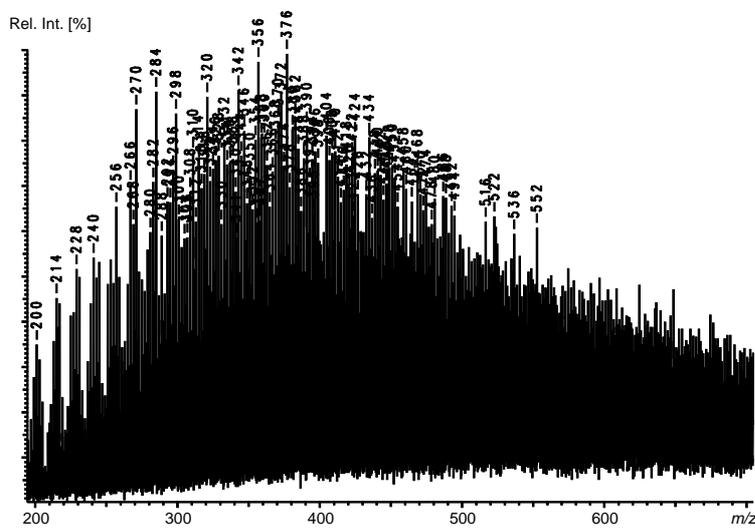
**Abb. 7-87:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt En 1, negative Ionen.



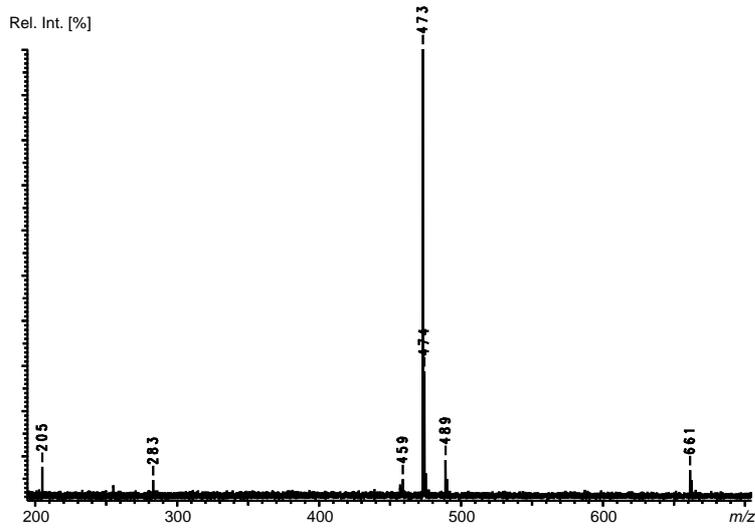
**Abb. 7-88:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt En 2, positive Ionen.



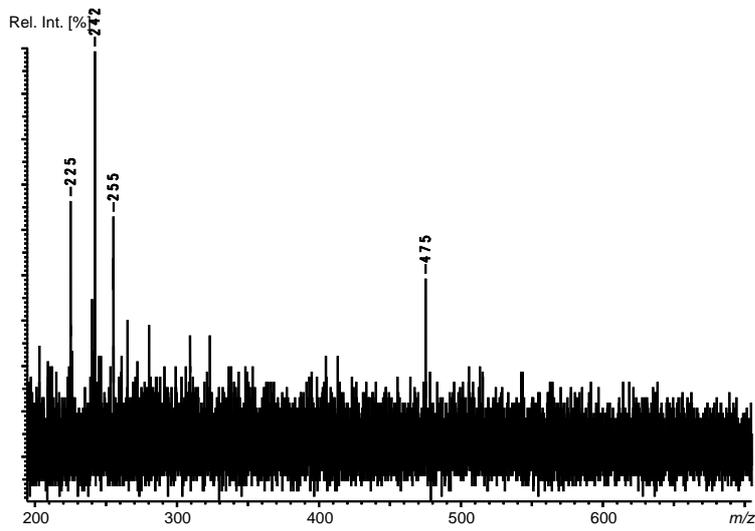
**Abb. 7-89:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt En 2, positive Ionen.



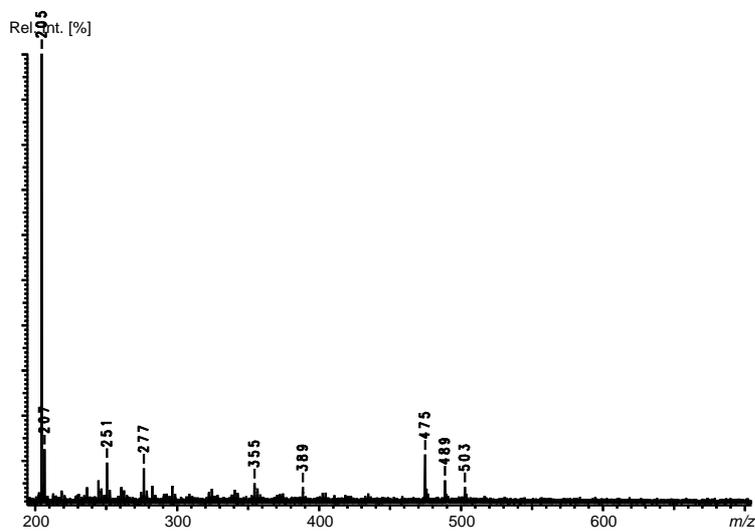
**Abb. 7-90:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt En 2, positive Ionen.



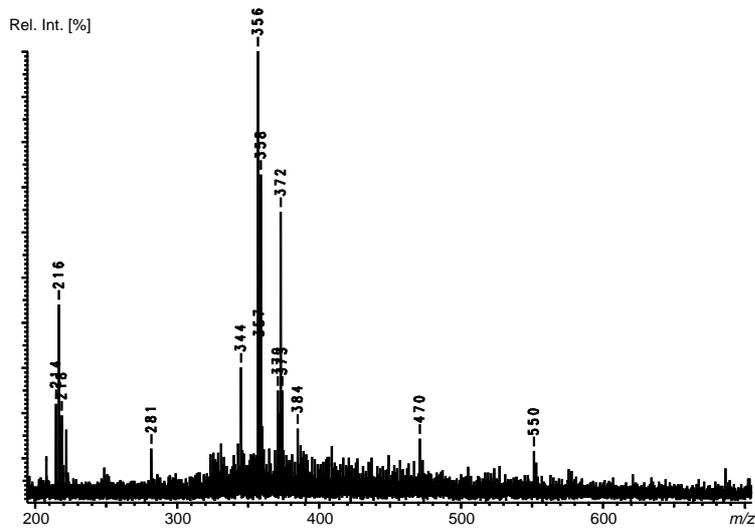
**Abb. 7-91:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt En 2, negative Ionen.



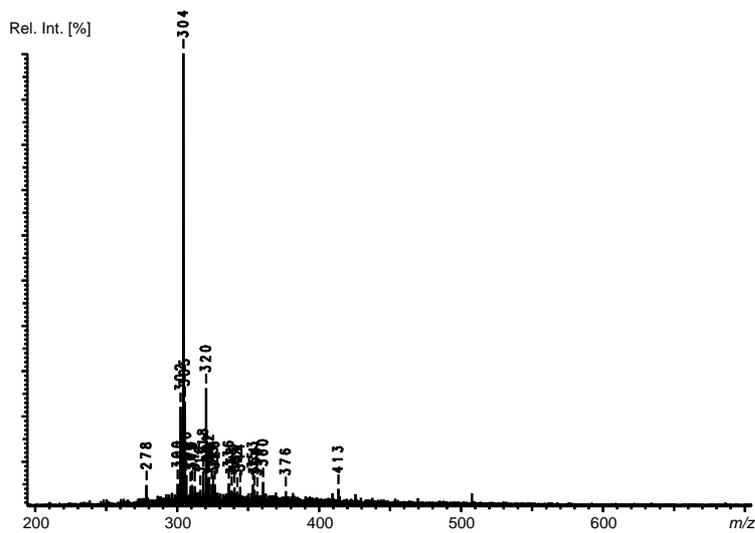
**Abb. 7-92:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt En 2, negative Ionen.



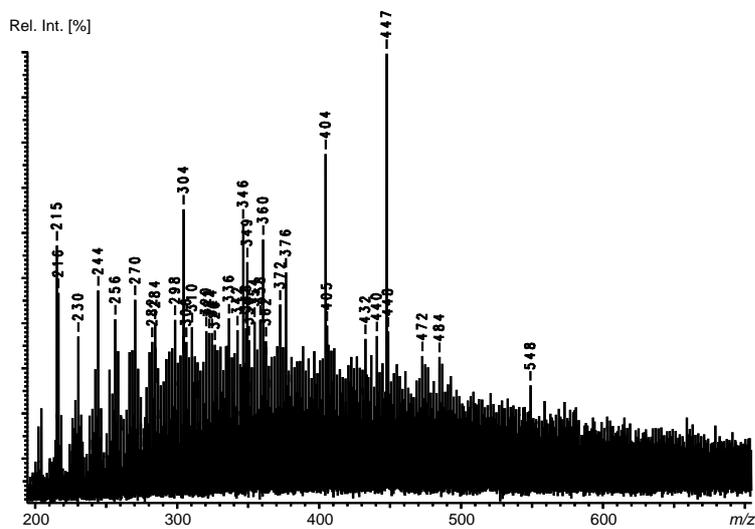
**Abb. 7-93:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt En 2, negative Ionen.



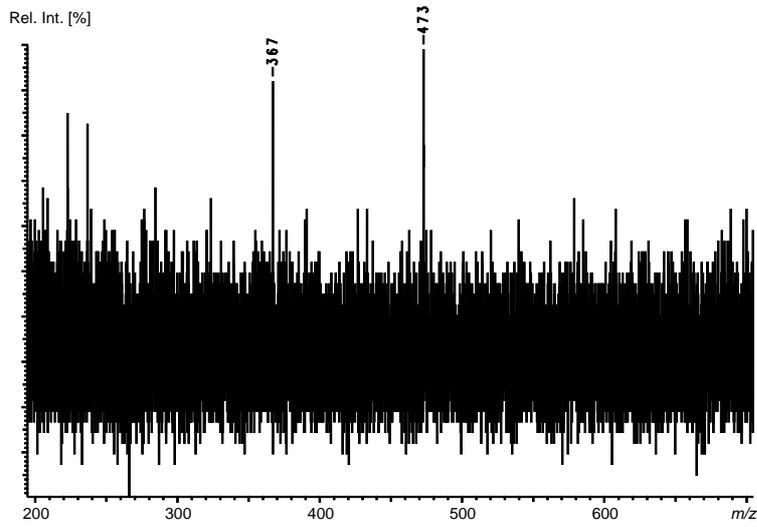
**Abb. 7-94:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt En 3, positive Ionen.



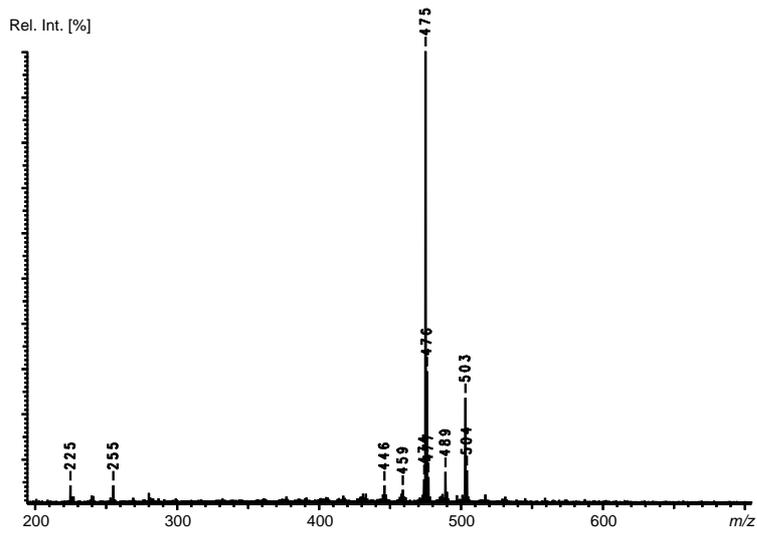
**Abb. 7-95:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt En 3, positive Ionen.



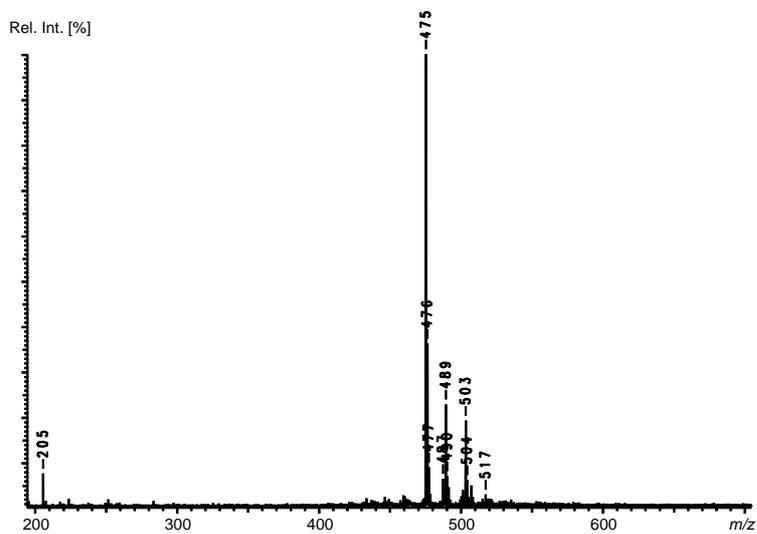
**Abb. 7-96:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt En 3, positive Ionen.



**Abb. 7-97:** LDI-Massenspektrum von Toluolextrakt En 3, negative Ionen.



**Abb. 7-98:** LDI-Massenspektrum von Methanolextrakt En 3, negative Ionen.



**Abb. 7-99:** LDI-Massenspektrum von DMSO-Extrakt En 3, negative Ionen.

## 7.4 Meßdaten zur quantitativen Analyse

**Tab. 7-2:** Meßdaten zur quantitativen Analyse der Fossilproben.

| Probe | Proben-<br>menge<br>[g] | Proben-<br>rückstd.<br>[mg] | HHPP               | Fringelit F      |                  |                  | Desmethyl-<br>hypericin |                  | Hypericin        |  |
|-------|-------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------|------------------|--|
|       |                         |                             | [µg/Al.]           | [µg/Aliquot]     |                  |                  |                         | [µg/Aliquot]     | [µg/Aliquot]     |  |
|       |                         |                             | Toluol-<br>Extrakt | MeOH-<br>Extrakt | DMSO-<br>Extrakt | MeOH-<br>Extrakt | DMSO-<br>Extrakt        | MeOH-<br>Extrakt | DMSO-<br>Extrakt |  |
| Blank | –                       | –                           | n. n.              | n. n.            | n. n.            | n. n.            | n. n.                   | n. n.            | n. n.            |  |
| Li 1  | 0,6151                  | 5,5                         | 0,95               | 149,48           | 28,62            | 102,86           | 5,07                    | 3,08             | n. b.            |  |
| Ch 6  | 5,0131                  | 4,1*                        | 0,27*              | 14,53*           | 7,37*            | n. n.            | n. n.                   | n. n.            | n. n.            |  |
| Ch 7  | 3,3693                  | 38,0                        | n. n.              | n. n.            | n. n.            | n. n.            | n. n.                   | n. n.            | n. n.            |  |
| Ch 8  | 1,9822                  | 2,4                         | 0,96               | 30,30            | 21,32            | 5,89             | n. n.                   | n. n.            | n. n.            |  |
| Ch 9  | 0,5399                  | 0,1                         | n. b.              | 11,49            | 3,25             | 0,79             | n. n.                   | 0,92             | n. b.            |  |
| Ch 10 | 3,1760                  | 1,0                         | 1,39               | 8,22             | 12,74            | n. n.            | n. n.                   | n. n.            | n. n.            |  |
| Ch 11 | 3,1500                  | 21,0                        | n. n.              | n. n.            | n. n.            | n. n.            | n. n.                   | n. n.            | n. n.            |  |
| En 1  | 0,5130                  | 3,8                         | n. n.              | n. n.            | n. n.            | n. n.            | n. n.                   | n. n.            | n. n.            |  |
| En 2  | 3,0676                  | 199,3                       | n. n.              | n. n.            | n. n.            | n. n.            | n. n.                   | n. n.            | n. n.            |  |
| En 3  | 0,9985                  | 31,1                        | n. n.              | 15,91            | 2,89             | n. n.            | n. n.                   | 2,20             | 0,31             |  |

n. n.: nicht nachweisbar (bezogen auf HPLC-Messungen der nicht aufkonzentrierten Aliquots)

n. b.: nicht bestimmbar (bezogen auf HPLC-Messungen der nicht aufkonzentrierten Aliquots)

\*Die tatsächlichen Werte liegen bei Probe Ch 6 etwa um den Faktor 2 über den angegebenen Werten, da bei der Aufarbeitung Teile des Probenrückstands verlorengegangen sind.