

Ein Eisen(III)-Catechol-Komplex als Pilzfarbstoff**

Franz von Nussbaum, Peter Spiteller, Matthias R  th, Wolfgang Steglich,* Gerhard Wanner, Brandy Gamblin, Lorenzo Stievano und Friedrich E. Wagner

Professor Heinrich Nöth zum 70. Geburtstag gewidmet

Der Violette Schleierling [*Cortinarius violaceus* (L.: Fr.) S. F. Gray]^[1] ist ein Bl  tterpilz, der durch seine dunkelblau-violette Farbe und seinen Geruch nach Zedernholz auff  llt. Bereits Fries^[2] bezeichnete die Typusart der großen Gattung *Cortinarius* als „species nobilissima, pulcherrima“. Bemühungen, die chemische Natur des violetten Farbstoffs zu ergründen, scheiterten bisher an dessen Zersetzlichkeit und Polarität. Die tiefvioletten Wasserextrakte frischer oder gefriergetrockneter Pilze verfärben sich innerhalb weniger Minuten schmutzig-braun. Diese Zersetzung lässt sich unterdrücken, wenn man die lyophilisierten Pilze vor der Extraktion mit Wasser zunächst erschöpfend mit Methanol extrahiert. Die so erhaltene wässrige Lösung wird gefriergetrocknet und die gelösten Inhaltsstoffe nach Zusatz von 0.1proz. KOH an Sephadex LH-20 mit Methanol/Wasser (1/1) chromatographisch aufgetrennt. Auf diese Weise gelingt eine Anreicherung des hochempfindlichen Farbstoffs, der jedoch wegen starker Signalverbreiterung keine aussagekräftigen NMR-Spektren liefert. Hierfür ist paramagnetisches Eisen verantwortlich, das sowohl im Extrakt als auch im Pilz nachgewiesen werden kann. Da die Farbintensität mit dem Eisengehalt korreliert, sollte es sich bei dem violetten Farbstoff um einen Eisenkomplex handeln.

Die Ergebnisse aus energiedisperser R  ntgenspektroskopie^[3] (EDX), Atomabsorptionsspektroskopie^[4] (AAS) und der Rhodanidprobe belegen, daß *C. violaceus* auf einzigartige Weise Eisen anzureichern vermag. Der Eisengehalt des Pilzes beträgt 4.5–7.5 mg g^{−1} Trockenmasse und ist damit etwa hundertmal höher als der für Basidiomyceten ermittelte Durchschnittswert von 0.06 mg g^{−1}.^[5, 6] Nach den Mößbauer-Spektren^[7] (Abb. 1 und 2, Tabelle 1) liegt das Eisenion im Farbstoff dreiwertig vor, und das ESR-Spektrum^[8] deutet auf einen High-spin-Eisen(III)-Komplex hin.^[9] Die Spektren der gefriergetrockneten Pilze und des Wasserextrakts sind identisch.

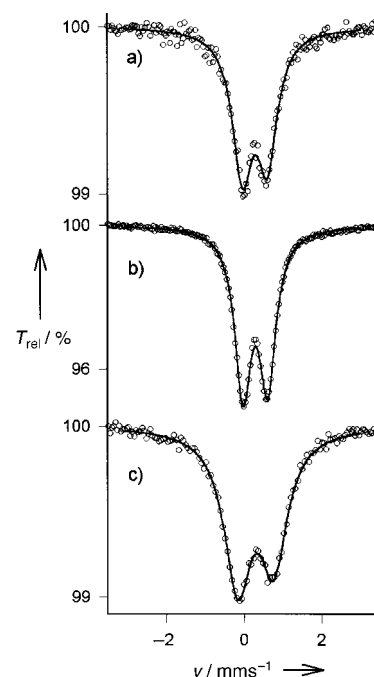


Abb. 1. Mößbauer-Spektren bei Raumtemperatur. a) Gefriergetrockneter *C. violaceus*; b) Wasserextrakt; c) synthetischer Eisen(III)- β -Dopa-Komplex (1:2) bei pH 6.2. T_{rel} = relative Transmission.

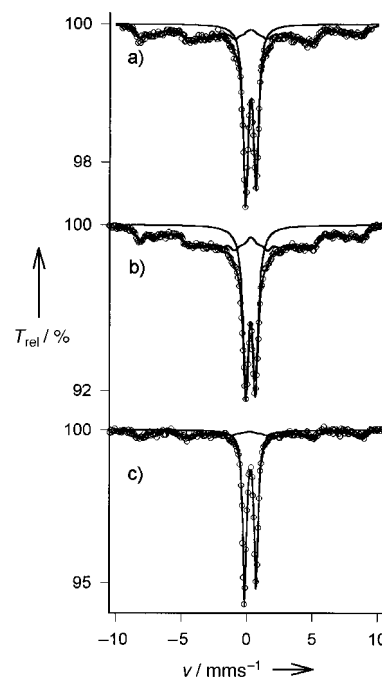


Abb. 2. Mößbauer-Spektren bei 4.2 K. a) Gefriergetrockneter *C. violaceus*; b) Wasserextrakt; c) synthetischer Eisen(III)- β -Dopa-Komplex (1:2) bei pH 6.2.

[*] Prof. Dr. W. Steglich, Dipl.-Chem. F. von Nussbaum, Dipl.-Chem. P. Spiteller, Dipl.-Chem. M. R  th
Institut für Organische Chemie der Universität
Karlstraße 23, D-80333 München
Fax: (+49) 89-5902-604
E-mail: wos@org.chemie.uni-muenchen.de

Prof. Dr. G. Wanner
Botanisches Institut der Universität
Menzinger Straße 67, D-80638 München
B. Gamblin, Dipl.-Chem. L. Stievano, Prof. Dr. F. E. Wagner
Physik-Department E15 der Technischen Universität München
James-Frank-Straße 1, D-85748 Garching

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 369) gefördert. Herrn H. Hartl danken wir für die AAS-Messungen, Herrn G. Sturm für die ESR-Spektren und Herrn Prof. Dr. M. Spiteller für ESI- und APCI-MS-Messungen.

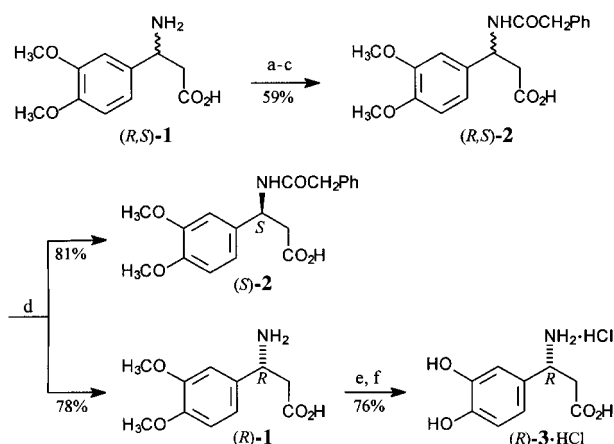
Nach Zugabe von Salzsäure zum angereicherten Farbstoff kann (*R*)- β -Dopa (*R*)-**3** als Komplexlignand identifiziert werden.^[10] Die Aminosäure lässt sich auch direkt aus dem Methanolextrakt nach chromatographischer Reinigung und Umkristallisieren analysenrein erhalten. Der Gehalt an (*R*)-**3** beträgt ca. 2% bezogen auf die Pilztrockenmasse. (*R*)- β -Dopa ist ein Naturstoff, der präparativ bisher nur als

Tabelle 1. ^{57}Fe -Mößbauer-Parameter^[22] für die Quadrupoldubletts bei Raumtemperatur und bei 4.2 K. Quadrupolaufspaltung QS ; Isomerieverschiebung IS ; Linienbreite LW .

Probe	T [K]	QS [mm s ⁻¹]	IS ^[a] [mm s ⁻¹]	LW [mm s ⁻¹]	Fläche ^[b] [%]
(a) gefriergetrockneter <i>C. violaceus</i>	4.2	0.80(1)	0.38(1)	0.45(1)	50(1)
(b) Wassereextrakt	294	0.64(1)	0.39(1)	0.62(2)	100
	294	0.74(1)	0.38(1)	0.53(1)	43(1)
	294	0.64(1)	0.40(1)	0.51(1)	100
(c) synthetischer 1:2-Fe ^{III} - β -Dopa-Komplex (pH 6)	4.2	0.89(1)	0.40(1)	0.33(1)	70(1)
	294	0.94(2)	0.41(1)	0.85(3)	100

[a] Die Isomerieverschiebungen beziehen sich auf α -Fe. [b] In den bei 4.2 K gemessenen Spektren existiert außer dem Quadrupoldublett, dessen Flächenanteil hier angegeben ist, ein magnetisch aufgespaltener Anteil mit einer Verteilung von Hyperfeinfeldern zwischen 52.5(2) und 13.5(3) T, einer effektiven Quadrupolaufspaltung von $QS = 0.02(2)$ mm s⁻¹ und einer Isomerieverschiebung von $IS = 0.38(2)$ mm s⁻¹.

Racemat^[11] erhalten wurde. Als Ausgangsverbindung für die Synthese von (*R*)-**3** verwendeten wir die nach Rodionov et al.^[12] bequem zugängliche, racemische (*R,S*)-3-Amino-3-(3,4-dimethoxyphenyl)propansäure **1**, die sich als *N*-Phenylacetyl-Derivat **2** mit Penicillin-Acylase^[13] zur optisch reinen Säure (*R*)-**1** umsetzen ließ (Schema 1). Die Etherspaltung mit



Schema 1. Synthese von (*R*)-**3**. a) MeOH, kat. HCl, Rückfluß; b) PhCH₂COCl, CH₂Cl₂, NEt₃, kat. DMAP; c) LiOH, H₂O/MeOH (1/1); d) Penicillin-Acylase, pH 7.5, Phosphatpuffer, 25 °C, 12 h; e) 48proz. HBr, 145 °C, 4 h; f) Dowex 50 WX8. DMAP = 4-Dimethylaminopyridin.

48proz. HBr lieferte (*R*)- β -Dopa-Hydrobromid, das über einen Kationenaustauscher in das Hydrochlorid überführt wurde. Da ein Vergleich der spezifischen Drehungen von Naturstoff und Syntheseprodukt wegen schwankender Drehwerte nicht zuverlässig erschien, wurden die absolute Konfiguration und optische Reinheit des natürlichen Liganden durch GC/MS^[14] bestimmt. Dazu wurde das native β -Dopa mit Diazomethan O-methyliert und anschließend mit Moshers (*R*)-Säurechlorid^[15] acyliert. Die aus dem Naturstoff und dem Syntheseprodukt erhaltenen Derivate erwiesen sich als identisch;^[16] im Rahmen der Meßgenauigkeit ist der Naturstoff enantiomerenrein.

Im UV/Vis-Spektrum des angereicherten Farbstoffs registriert man bei pH 6.2, dem physiologischen pH-Wert des Pilzes, die für Eisen(III)-Catechol-Komplexe typische Li-

gand \rightarrow Metall-Charge-Transfer-Absorptionsbande bei $\lambda_{\text{max}} = 571$ nm. Bei pH 9.0 ist λ_{max} hypsochrom zu 487 nm verschoben. Die blaviolette Lösung verfärbt sich dabei bordeauxrot und zersetzt sich schnell. Durch Zugabe von KCN oder Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wird die Lösung entfärbt. Der Farbstoff verhält sich somit wie andere Eisen(III)-Catechol-Komplexe, bei denen das Kation-Ligand-Verhältnis vom pH-Wert abhängt. Mit steigendem pH-Wert ändert sich die Farbe von Grün (pH 3, 1:1)^[17] über Blaviolett (pH 6, 1:2) nach Bordeauxrot (pH 9, 1:3) (Abb. 3). Die für Eisen(III)-

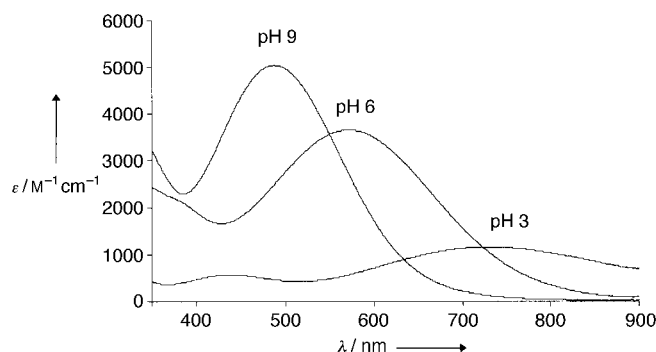
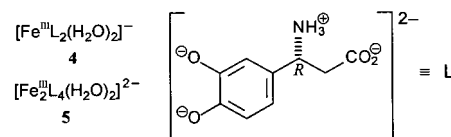


Abb. 3. UV/Vis-Spektren des synthetischen Eisen- β -Dopa-Komplexes in Wasser.

Dopamin^[18] und Eisen(III)-Catechol-Komplexe^[19, 20] beschriebenen UV/Vis-Spektren für verschiedene pH-Werte stimmen mit denen unseres Farbstoffs überein. Demnach ist der Farbstoff des Violetten Schleierlings ein 1:2-Komplex. Ob eine ein- oder zweikernige Spezies (**4** oder **5**, Schema 2) vorliegt, kann nicht entschieden werden. Die bekannte



Schema 2. Vorschläge für die in *Cortinarius violaceus* bei pH 6.2 vorliegende, blaviolette 1:2-Eisen(III)- β -Dopa-Komplexspezies.

Struktur^[21] eines 1:2-Eisen(III)-Catechol-Komplexes im Kristall ist zweikernig, und das Mößbauer-Spektrum dieser Verbindung^[21] stimmt gut mit dem des Pilzfarbstoffs überein.^[22] Weder durch massenspektrometrische Methoden noch durch chiroptische Messungen konnten nähere Einblicke in die Struktur des natürlichen Komplexes erhalten werden. Die Analogie des Farbstoffs zu einer Eisentinte ist unübersehbar. Farbstoffe dieses Typs wurden in der Natur bisher noch nicht gefunden.^[23, 24]

Experimentelles

Isolierung von (*R*)-**3**: Pulverisierte, gefriergetrocknete Fruchtkörper (12.7 g) von *C. violaceus* (gesammelt im September 1996 in einem Fichtenforst bei Gilching, Oberbayern) werden in CH₂Cl₂ (200 mL) 2 d entfettet und anschließend erschöpfend mit MeOH extrahiert. Nach dem Einengen der Extrakte wird der Rückstand (5.1 g) an einer Sephadex-LH-20-Säule (40 \times 8 cm) mit MeOH chromatographisch aufgetrennt. Man erhält eine noch stark mit Zuckern verunreinigte Rohfraktion, aus der

durch fraktionierende Umkristallisation aus wasserfreiem MeOH analysenreines (*R*)-**3** gewonnen wird. Ausbeute: 41 mg (0.3 % der Trockenmasse).

Isolierung von (*R*)-**3**-HCl: Die MeOH-Extrakte (siehe Isolierung von (*R*)-**3**) werden auf eine Kationenaustauschersäule (Dowex 50 WX8, H⁺-Form) gegeben. Man spült zunächst mit H₂O (300 mL) und eluiert anschließend den Liganden mit 4N HCl (100 mL). Feinreinigung an Dowex 50 WX8 liefert (*R*)-**3**·HCl als beigefarbenen, hygroskopischen Schaum. Ausbeute: 0.27 g (2 % der Trockenmasse).

Anreicherung des blauvioletten Pilzfarbstoffs: Die nach der MeOH-Extraktion verbleibenden Pilzrückstände werden unter Argon 20 min bei 25 °C mit H₂O (200 mL) extrahiert. Die tiefblauviolette Lösung wird gefriergetrocknet, anschließend in wenig H₂O aufgenommen und mehrfach an Sephadex LH-20 mit H₂O/MeOH/0.1proz. KOH (25/25/1) chromatographisch gereinigt. Ausb. 15 mg (0.1 % der Trockenmasse).

Eingegangen am 23. Juni 1998 [Z 12032]

Stichwörter: Aminosäuren • Eisen • Farbstoffe • Mößbauer-Spektroskopie • Strukturaufklärung

- [1] Die bisweilen als *Cortinarius violaceus* und *C. hercynicus* unterschiedenen Sippen stimmen pigmentchemisch überein. Zur Systematik der weitverbreiteten Art: T. E. Brandrud, *Nord. J. Bot.* **1983**, 3, 577–592.
- [2] E. Fries, *Monographia Hymenomycetum Suecicae*, Vol. II (Hrsg.: C. A. Leffler), Uppsala, **1863**, S. 46.
- [3] EDX (allgemeines): Schnitte gefriergetrockneter Fruchtkörper wurden auf Leit-Tabs (W. Plannet GmbH) montiert, mit Kohle bedampft und im Hitachi-S-4100-Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop untersucht. Der Elementnachweis erfolgte mit einem EDX-Detektor mit ultradünnem Fenster (Noran Instruments) entweder im Spot- oder Mapping-Modus.
- [4] AAS (allgemeines): Der Fe-Gehalt wurde bei 248.30 nm (Perkin-Elmer 1100B) bestimmt. Als Stammlösung wurde eine FeCl₃-Lösung (Titrisol, Merck) verwendet.
- [5] G. Tyler, *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1980**, 74, 41–49.
- [6] Außergewöhnlich viel Eisen enthalten auch der Falsche Pfefferling (*Hygrophoropsis aurantiaca*) und der Sandröhrling (*Suillus variegatus*) mit 1–3 mg g⁻¹ Trockenmasse: M. Lupper, Dissertation, Universität Würzburg, **1988**.
- [7] ⁵⁷Fe-Mößbauer-Spektren (allgemeines): Die Spektren wurden mit einer ⁵⁷Co-Quelle in Rh gemessen. Quelle und Absorber hatten dieselbe Temperatur. Das mit einem Kr-Proportionalzähler zum Nachweis der 14.4-keV- γ -Strahlung ausgestattete Spektrometer hatte einen sinusförmigen Geschwindigkeitsverlauf.
- [8] Charakteristisches Festkörper-ESR-Signal bei $g = 4.26$ ($\Delta h = 9.4$ mT). Siehe auch: H. Oubrahim, J.-M. Richard, D. Cantin-Esnault, F. Seigle-Murandi, F. Trécourt, *J. Chromatogr. A* **1997**, 758, 145–157.
- [9] a) B. F. Anderson, D. A. Buckingham, G. B. Robertson, J. Webb, *Nature* **1976**, 262, 722–724; b) L. Burlamacchi, A. Lai, M. Moduzzi, G. Saba, *J. Magn. Reson.* **1983**, 55, 39–50.
- [10] (*R*)-**3**: Schmp. 194 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -12.1$ ($c = 0.5$ in 6N HCl); R_f : 0.45 (*n*BuOH/EtOH/AcOH/H₂O 4/1/1/1); IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3400$ (br), 3043 (s), 1608 (m), 1571 (s, CO₂), 1531 (s), 1466 (s), 1392 (s), 1361 (m), 1281 (m), 1250 (s), 1197 (w), 1173 (m), 1126 (m), 1042 (w), 986 (w), 948 (w), 929 (w), 868 (w), 818 (w), 792 (w), 775 (w), 696 (w), 650 (w), 595 (w), 573 (w), 460 cm⁻¹ (w); ¹H-NMR (600 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 2.30$ (dd, $J = 16.1, 3.9$ Hz, 1H; CH^aH^b), 2.41 (dd, $J = 16.0, 10.0$ Hz, 1H; CH^aH^b), 4.14 (dd, $J = 9.6, 3.8$ Hz, 1H; ArCHN), 6.65 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H; 6-H), 6.69 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H; 5-H), 6.83 (s, 1H; 2-H); ¹³C-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 40.83$ (CH₂), 51.90 (ArCHN), 114.81 (C-2), 115.75 (C-5), 117.94 (C-6), 130.27 (C-1), 145.59 (C-4), 145.61 (C-3), 173.68 (CO₂H); EI-MS (Zersetzung, 70 eV): m/z (%): 180 (7) [*M* – NH₃]⁺, 136 (100) [*M* – NH₃ – CO₂]⁺; FAB-MS (Glycerin): m/z (%): 198 (45) [*M* + H]⁺, 181 (56), 171 (100), 153 (58), 136 (35); ESI-MS: m/z (%): 220 (8) [*M* + Na]⁺, 198 (34) [*M* + H]⁺, 181 (100), 171 (5), 163 (4), 139 (61); ESI-HR-MS: ber. für C₉H₁₂NO₄: 198.0766; gef.: 198.0767; Elementaranalyse: ber. für C₉H₁₁NO₄ · ½ H₂O: C 53.20, H 5.79, N 6.89; gef.: C 53.29, H 5.74, N 7.02. – Tris(trimethylsilyl)-(*R*)- β -Dopa: GC: $R_f = 2105$; GC/MS (70 eV): m/z (%): 413 (8) [*M*]⁺, 398 (2) [*M* – CH₃]⁺, 396 (2) [*M* – NH₃]⁺, 381 (1), 282 (100) [*M* – CH₂CO₂Si(CH₃)₃]⁺, 268 (5), 210 (6), 194 (5), 167 (3), 147 (3), 117 (3), 75 (20) [HOSi(CH₃)₂]⁺, 73 (49) [Si(CH₃)₃]⁺; HR-GC/MS: ber. für C₁₈H₃₅NSi₃O₄: 413.1874, gef.: 413.1889.
- [11] T. Posner, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1912**, 389, 1–120.
- [12] W. M. Rodionov, E. A. Postovskaja, *J. Am. Chem. Soc.* **1929**, 51, 841–847.
- [13] a) V. A. Soloshonok, N. A. Fokina, A. V. Rybakova, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, A. E. Sorochinsky, V. P. Kukhar, M. V. Savchenko, V. K. Švedas, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 7, 1601–1610; b) G. Cardillo, L. Gentilucci, A. Tolomelli, C. Tomasini, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2351–2353.
- [14] Als Säule wurde eine Fused-Silica-Kapillarsäule (DB-5ms, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m; J & W) verwendet. Injektortemperatur: 280 °C; Temperaturprogramm: 3 min isotherm bei 50 °C, dann in 2 min auf 100 °C, anschließend mit 3 K min⁻¹ auf 300 °C, 10 min isotherm bei 300 °C. Es wurden jeweils 0.5–1.5 μ L einer 1–2proz. Lösung (m/v) eingespritzt. Die Kováts-Indices R_i wurden durch Koinjektion von 0.2 μ L einer Mischung aus unverzweigten Alkanen (C₁₀–C₃₆) bestimmt.
- [15] A. J. Dale, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1969**, 34, 2543–2549.
- [16] Konfigurationsbestimmung durch GC/MS: Natürliches (*R*)-**3** (1 mg) wurde bei 25 °C mit MeOH (1 mL) und 5proz. CH₂N₂-Lösung in Diethylether (2 mL) versetzt. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel im Ar-Strom entfernt und der Rückstand nach Zugabe von Mosher's (*R*)-Säurechlorid (10 μ L) 12 h bei 25 °C aufbewahrt. Vor der GC/MS-Analyse wurde MeOH (50 μ L) zugefügt. 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-(3,3,3-trifluor-2-methoxy-2-phenylpropionylamino)propansäuremethylester: (2*S*,3*R*)-Derivat: GC: $R_i = 2684$; GC/EI-MS (70 eV): m/z (%): 455 (10) [*M*]⁺, 382 (8), 238 (45), 223 (83), 189 (38), 181 (100), 164 (33), 105 (23), 91 (13), 77 (19). – (2*S*,3*S*)-Derivat: GC: $R_i = 2709$.
- [17] U. El-Ayaan, E. Herlinger, R. F. Jameson, W. F. Linert, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 2813–2818.
- [18] C. Gerard, H. Chehhal, R. P. Hugel, *Polyhedron* **1994**, 13, 591–597.
- [19] R. C. Hider, A. R. Mohd-Nor, J. Silver, I. E. G. Morrison, L. V. C. Rees, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1981**, 609–622.
- [20] A. Avdeef, S. R. Sofen, T. L. Bregante, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 5362–5370.
- [21] V. A. Grillo, G. R. Hanson, D. Wang, T. W. Hambley, L. R. Gahan, K. S. Murray, B. Moubaraki, C. J. Hawkins, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 3568–3576.
- [22] In den Mößbauer-Spektren nativer Proben bei 4.2 K registriert man neben dem Quadrupoldublett einen breiten, durch magnetische Hyperfeinaufspaltung bedingten Untergrund. Die magnetische Komponente ist Eisenhydroxiden zuzuordnen und nimmt mit der Alterung der Pilze zu. Die Unterschiede der Quadrupoldubletts in Linienbreite und Quadrupolaufspaltung bei 4.2 K werden auf solche Eisenhydroxidanteile zurückgeführt, die bei 4.2 K noch nicht magnetisch geordnet sind. Bei Raumtemperatur kommt es durch Überlagerung des Dubletts ungeordneter Eisenhydroxide mit dem Quadrupoldublett des Eisen(III)-Catechol-Komplexes zu stark verbreiterten Mößbauer-Spektren. Der größere Lamb-Mößbauer-Faktor von Eisenhydroxiden gegenüber den Eisen-Catechol-Komplexen führt besonders bei den natürlichen Proben bei Raumtemperatur zu einer Überrepräsentation der Eisenhydroxide.
- [23] Ein brauner Anthranoid-Eisenkomplex wurde aus Flechten der Gattung *Cladonia* isoliert: L. Alagna, T. Prosperi, A. A. G. Tomlinson, H. Kjøsen, F. Mo, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1036, 71–77.
- [24] a) „Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals“: *Metal ions in biological systems*, Vol. 35 (Hrsg.: A. Sigel, H. Sigel), Dekker, New York, **1998**; b) B. F. Matzanke, G. Müller-Matzanke, K. N. Raymond in *Iron Carriers and Iron Proteins, Physical Bioinorganic Chemistry Series*, Vol. 5 (Hrsg.: T. M. Loehr), VCH, Weinheim, **1989**, S. 1–122.