

Wolfgang Steglich \*) und Wolfgang Reiningger

Pilzpigmente, IX<sup>1)</sup>

## Anthrachinon-Pigmente aus *Dermocybe cinnabarina* (Fr.) Wünsche<sup>2)</sup>

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität München

(Eingegangen am 15. Mai 1972)

Aus *Dermocybe cinnabarina* wurden nach saurer Hydrolyse der Pigmentglykoside neben Physcion (1), Erythroglaucon (2), Fallacinal (3),  $\omega$ -O-Acetyl-fallacinal (4) und Endocrocin (5) die neuen Anthrachinon-carbonsäuren Cinnalutein (6) und Cinnarubin (7) isoliert.

Mushroom Pigments, IX<sup>1)</sup>

Anthraquinone Pigments from *Dermocybe cinnabarina*

After acid hydrolysis of the glycoside pigments from *Dermocybe cinnabarina*, physcion (1), erythroglaucon (2), fallacinal (3),  $\omega$ -O-acetylfallacinal (4), endocrocin (5), and the new anthraquinone carboxylic acids cinnalutein (6) and cinnarubin (7) were isolated.

In ihrer Arbeit über die Pigmente von *Dermocybe sanguinea* teilten Kögl und Postowsky<sup>3)</sup> mit, daß auch der Zinnoberrote Hautkopf, *D. cinnabarina* (Fr.) Wünsche, seine leuchtende Farbe Anthrachinonen verdankt. Wie spätere papierchromatographische Untersuchungen<sup>4)</sup> zeigten, besteht der Rohfarbstoff aus mehreren gelben und roten Komponenten. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die chemische Natur der Cinnabarina-Pigmente.

### A. Isolierung der Farbstoffe

Die Pigmente von *D. cinnabarina* kommen im Fruchtkörper zum größten Teil in wasserlöslicher glykosidischer Form vor. Da sich ihre Trennung als schwierig erwies, wurden zunächst die durch saure Hydrolyse erhaltenen Aglykone untersucht. Sie lassen sich durch Verteilen zwischen Essigester und Phosphatpuffer in Neutralstoffe

\*) Neue Anschrift: Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität Berlin.

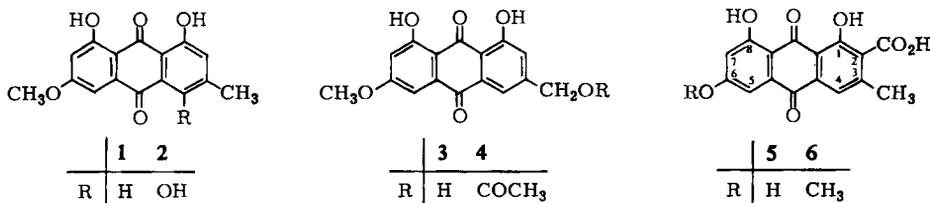
1) VIII. Mittel.: W. Steglich, E. Töpfer-Petersen, W. Reiningger, K. Gluchoff und N. Arpin, Phytochemistry, im Druck.

2) Teil der Dissertation W. Reiningger, Technische Universität München 1970.

3) F. Kögl und J. J. Postowsky, Liebigs Ann. Chem. 444, 1 (1925).

4) M. Gabriel, Thèse, Univ. Lyon 1965; I. Gruber, Z. f. Pilzk. 36, 95 (1970); D. Thoen, Les Naturalistes Belges 51–54, 148 (1970).

und Säuren zerlegen, von denen erstere bei der Chromatographie an Kieselgel ein Physcion/Erythroglaucin-Gemisch (1/2),  $\omega$ -O-Acetyl-fallac inol (4) und das Hauptpigment Fallac inol (3)<sup>5</sup> ergeben.



1 und 2 liegen nach dem UV-Spektrum im Verhältnis 3 : 1 vor. Auf die schwierige Trennung der Pigmente<sup>6</sup> wurde verzichtet. Die Möglichkeit, daß 4 ein während der Aufarbeitung aus 3 entstandenes Artefakt ist<sup>7</sup>, kann durch Dünnschichtchromatographie des äthanolischen Pilzextraktes ausgeschlossen werden. Danach ist das Mengenverhältnis 4/3 ursprünglich wesentlich größer als nach der sauren Hydrolyse.

Die Säurefraktion liefert beim Umkristallisieren aus Eisessig ziegelrote Mischkristalle von Cinnalutein und Cinnarubin, die sich nur schwer auftrennen lassen. Zum Erfolg führte schließlich die sorgfältige Chromatographie an Polyamid, wobei noch wenig Endocrocin (5) abgetrennt wurde. Die Trennung der Methylester gelingt durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel.

Die aus *D. cinnabarina* isolierten Pigment-Aglykone sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tab. 1. Anthraquinon-Pigmente aus *Dermocybe cinnabarina* (nach Hydrolyse mit 2n HCl)

	R <sub>F</sub> <sup>a)</sup>	Farbe <sup>b)</sup>	UV <sup>b)</sup>	NH <sub>3</sub> <sup>b)</sup>	Schmp.	Ausb. (% <sup>c)</sup>
Erythroglaucin (2)	0.62 (A)	rot	violett	tiefviolett	204°	0.01
Physcion (1)	0.61 (A)	gelb	gelb	orangerot	207°	0.03
$\omega$ -O-Acetyl-fallac inol (4)	0.55 (A)	gelb	orange gelb	orangerot	195°	0.015
Fallac inol (3)	0.25 (A)	gelb	orange	rotviolett	237°	0.12
Cinnarubin (7)	0.52 (B)	rot	violett	blauviolett	> 280° (Zers.)	0.02
Cinnalutein (6)	0.51 (B)	gelb	orange	violett	277° (Zers.)	0.03
Endocrocin (5)	0.41 (B)	gelb	orange	violett	> 315° (Zers.)	0.002

a) Kieselgel-Fertigplatten F 254, Fa. E. Merck, Darmstadt; Laufmittel Benzol/Ameisensäure-äthylester/Ameisensäure: (A) 80 : 20 : 1; (B) 13 : 5 : 2.

b) Farbe auf Dünnschichtplatten im Tages- und UV-Licht und nach Halten über NH<sub>3</sub>.

c) Isoliertes Pigment, bezogen auf frische Fruchtkörper.

## B. Struktur von Cinnalutein und Cinnarubin

Cinnalutein kristallisiert aus Eisessig in gelben Nadeln. Nach Analyse und Massenspektrum besitzt es die Summenformel C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>, ist also mit Dermolutein<sup>8)</sup> isomer. Seine Struktur wird durch die Ätherspaltung mit BBr<sub>3</sub> zum Endocrocin (5) und die

<sup>5)</sup> Bisher nur aus Flechten isoliert, vgl. R. H. Thomson, Naturally Occurring Quinones, S. 437, Academic Press, London and New York 1971.

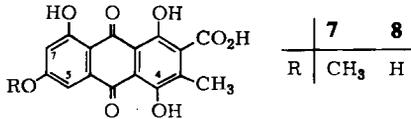
<sup>6)</sup> Vgl. J. N. Ashley, H. Raistrick und T. Richards, Biochem. J. 33, 1291 (1939); W. Steglich und W. Reiningger, Z. Naturforsch. 24b, 1196 (1969).

<sup>7)</sup> M. Piattelli und M. Giudici de Nicola [Phytochemistry 7, 1183 (1968)] isolierten 4 als Artefakt aus *Xanthoria parietina* nach Extraktion mit Aceton, das 1% Eisessig enthielt.

<sup>8)</sup> W. Steglich, W. Lösel und V. Austel, Chem. Ber. 102, 4104 (1969).

glatte Decarboxylierung mit Cu/Chinolin zum Physcion (1) bewiesen. Danach ist Cinnalutein identisch mit Endocrocioin-6-methyläther (6), was durch direkten Vergleich mit der synthetischen Verbindung<sup>9)</sup> bestätigt wird.

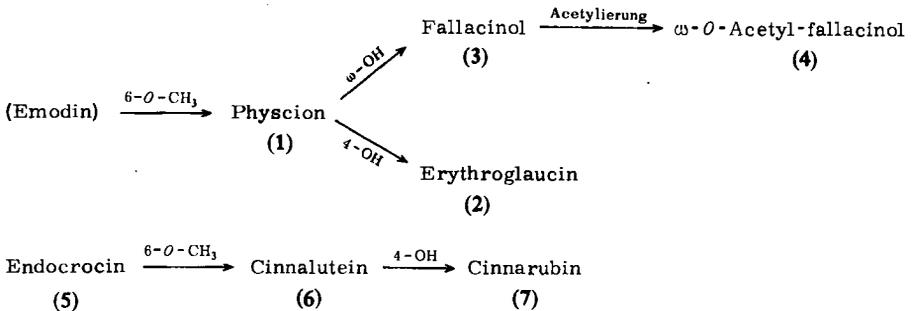
Das leuchtend rote Cinnarubin enthält nach Analyse und Massenspektrum ein Sauerstoffatom mehr als 6, mit dem es in Lösungseigenschaften und chromatographischem Verhalten fast völlig übereinstimmt. Das langwellige Absorptionsmaximum bei 490 nm (in Äthanol) und das Fehlen von Banden für nicht chelatisierte CO-Gruppen im IR sprechen für das Vorliegen einer zusätzlichen Hydroxygruppe in  $\alpha$ -Stellung. Da im NMR-Spektrum des Per-trimethylsilyläthers die typischen 2.5-Hz-Dubletts der Aromatenprotonen 5-H und 7-H vorhanden sind, muß die zusätzliche OH-Gruppe an C-4 sitzen. Dies wird durch Demethylierung zum Nor-dermorubin (8)<sup>8)</sup> und Decarboxylierung zum Erythroglaucin (2) bewiesen. Cinnarubin besitzt demnach die Struktur 7.



Das Pigmentpaar 6/7 ist ein weiteres Beispiel für die weitgehende Übereinstimmung des Chromatographie- und Kristallisierungsverhaltens von Anthrachinonen des Emodin-Typs und ihren 4-Hydroxy-Derivaten. Ähnliche Trennprobleme bieten 1/2<sup>5)</sup>, Dermolutein/Dermorubin<sup>8)</sup> und 5-Chlor-dermolutein/5-Chlor-dermorubin<sup>8)</sup>. Dagegen sind die 5-Hydroxy-Verbindungen Xanthorin<sup>10)</sup> und Clavorubin<sup>11)</sup> leicht von Physcion und Endocrocioin zu trennen.

### C. Diskussion

Die aus *D. cinnabarina* isolierten Aglykone stehen zueinander in enger biogenetischer Beziehung:



Nach Markierungsversuchen an *D. sanguinea* und *D. semisanguinea* ist anzunehmen, daß sich die neutralen Pigmente nicht vom Endocrocioin (5) ableiten<sup>12,13)</sup>. Ein Ver-

9) *W. Steglich* und *W. Reiningger*, Chem. Commun. 1970, 178.

10) *W. Steglich*, *W. Lösel* und *W. Reiningger*, Tetrahedron Letters [London] 1967, 4719.

11) *B. Franck* und *T. Reschke*, Chem. Ber. 93, 347 (1960).

12) *W. Steglich*, *R. Arnold*, *W. Lösel* und *W. Reiningger*, Chem. Commun. 1972, 102.

13) *W. Steglich*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 124 (1972).

gleich der weiteren Umwandlungen von 1 und 5 bei *D. sanguinea* und *D. cinnabarina* zeigt interessante Unterschiede: *D. sanguinea*<sup>8)</sup> hydroxyliert 1 in 5-Stellung, *D. cinnabarina* dagegen ausschließlich in 4-Stellung oder an der C-Methylgruppe. 5 wird jeweils spezifisch an der 8- bzw. 6-OH-Gruppe methyliert, worauf sich bei beiden Pilzen eine Hydroxylierung der 4-Position anschließt. Ein Fütterungsversuch mit [2,4-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]Emodin-6-β-D-glucopyranosid<sup>12)</sup> ergab, daß es von *D. cinnabarina* mit hoher Ausbeute in 3 eingebaut wird.

*D. cinnabarina* weicht im Pigmentspektrum von allen anderen bisher untersuchten Dermocyben ab, so daß ihre taxonomische Sonderstellung innerhalb der Gattung gerechtfertigt erscheint<sup>4)</sup>.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die großzügige Förderung dieser Arbeit. Fräulein *H. Pflaumer* gilt unser Dank für die Durchführung der radioaktiven Analysen.

### Beschreibung der Versuche

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten F 254, bei präparativen Trennungen Kieselgel G nach *Stahl*, beides Fa. E. Merck, Darmstadt, benutzt. Lösungsmittelsystem: Benzol/Ameisensäure-äthylester/Ameisensäure (80 : 20 : 1). Die Aufnahme der UV-Spektren in Methanol unter Zusatz einer Spur Salzsäure bzw. eines Tropfens 1*n* NaOH erfolgte mit einem Beckman DK 2. Die IR-Spektren wurden mit einem Gerät Modell 21 von Perkin-Elmer, die NMR-Spektren mit einem Varian A-60 und die Massenspektren mit einem MS 9 von AEI über ein Direkteinlaßsystem bei 70 eV aufgenommen.

*Isolierung der Aglykone aus Dermocybe cinnabarina*: 295 g frische Fruchtkörper von *D. cinnabarina*<sup>14)</sup> wurden unter Äthanol mit einem Mixer zerkleinert. Nach kurzem Aufkochen saugte man die tieforangefarbene Lösung über Celite ab und wiederholte die Extraktion, bis die Lösung nahezu farblos blieb. Die Extrakte wurden eingedampft und der schmierige braune Rückstand (9.3 g) mit mehreren Portionen heißem Wasser ausgezogen, bis kein Farbstoff mehr in Lösung ging. Dabei wurden die Schmierer jeweils abzentrifugiert. Nun säuerte man die wäbr. Lösung mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 3 an und extrahierte erschöpfend mit Essigester. Eindampfen der Extrakte, aus denen beim Stehenlassen ein rotes Glykosid auskristallisierte, lieferte 2.3 g rohe Anthrachinonglykoside. Sie wurden 2 Std. mit 50 ccm 2*n* HCl unter Rückfluß gekocht. Dabei fielen die Aglykone aus: Ausb. nach Trocknen 1.2 g.

Man löste das Aglykongemisch in 0.5 l Essigester und schüttelte es mehrmals mit kleinen Portionen Phosphatpuffer (5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3 H<sub>2</sub>O und 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 100 ccm dest. Wasser) aus. Eindampfen der getrockneten Essigesterlösung ergab 0.775 g neutrale Pigmente, starkes Ansäuern der Pufferlösung mit Salzsäure, Ausschütteln mit Essigester und Eindampfen der getrockneten Extrakte 0.162 g Säuren.

Die neutralen Pigmente wurden an einer Kieselgelsäule (80 × 1.5 cm) mit Benzol unter Zusatz steigender Mengen Essigester getrennt. Als erste Fraktion wurden 0.110 g Phycion/Erythroglaucin-Gemisch (1/2) eluiert, gefolgt von 40 mg ω-O-Acetyl-fallacinol (4) und 0.356 g Fallacinol (3). Die Identität der Pigmente wurde durch IR-Vergleich und Mischschmp. mit den authentischen Verbindungen gesichert. 4 wurde durch 2stdg. Kochen von 50 mg 3 in 5 ccm Eisessig unter Zusatz eines Tropfens konz. Schwefelsäure hergestellt<sup>7)</sup>. Ausb. 25 mg, aus Benzol gelbe Nadeln vom Schmp. 192–195° (Lit.<sup>7)</sup>: 195–196°).

<sup>14)</sup> Gesammelt im Herbst 1968 im Weiher Buchet (Mühlthal) zwischen Gauting und Leutstetten bei München.

0.100 g der sauren Pigmente wurden in 10 ccm konz. Schwefelsäure gelöst und unter Rühren zu 50 ccm eisgekühltem absol. Methanol gegeben. Nach 30 Min. gab man die Lösung in 100 ccm Eiswasser, schüttelte die Pigmente mit Essigester aus, wusch die organische Phase bis zur neutralen Reaktion mit Wasser und extrahierte die unumgesetzten Säuren mit Phosphatpuffer (s. o.). Die Essigesterlösung wurde getrocknet, eingengt und der Rückstand auf Kieselgelplatten chromatographiert. Infolge der geringen  $R_F$ -Unterschiede konnte dabei nur eine geringe Substanzmenge pro Platte aufgetrennt werden. Die roten Zonen lieferten 25 mg Cinnarubin-methylester ( $R_F$  0.59), die gelben 50 mg Cinnalutein-methylester ( $R_F$  0.57).

Die von der Veresterung zurückgewonnenen Säuren wurden mit dem Rest der Säurefraktion in Essigester auf eine gleichmäßig beschickte Polyamid-Säule (100 × 3 cm) gebracht und langsam (1 ccm/5 Min.) mit Essigester/Eisessig (97 : 3, v/v) eluiert<sup>15</sup>). Cinnalutein (6) trennte sich dabei als schnellerlaufendes gelbes Band allmählich vom roten Cinnarubin (7) ab. Ausbeuten nach Umkristallisieren aus Eisessig: 40 mg 6 und 25 mg 7. Elution einer weiteren gelben Zone mit Methanol/Eisessig (97 : 3, v/v) und Umkristallisieren aus 50proz. wäbr. Eisessig und Essigester/Chloroform (1 : 1) lieferte 6 mg Endocrocin (5).

*Cinnalutein (6)*: Gelbe Nadeln aus Eisessig, Schmp. 277° (Zers.). — IR (KBr): 1705 (s), 1670 (w), 1605/cm (ss). — UV (Methanol): 434 nm ( $\epsilon$  11000), 286 (16600), 264 (16200), 251 (16000), 223 (28000); (+ NaOH): 507 (8000), 311 (12000), 257 (24200), 239 (24000), 228 (22000). — Massenspektrum:  $m/e$  328 (43%) [ $M^+$ ]; 311 (20%), 310 (100%), 284 (26%), 282 (10%).

$C_{17}H_{12}O_7$  (328.3) Ber. C 62.19 H 3.69 Gef. C 61.77 H 3.80

*Bis-trimethylsilyläther-trimethylsilylester*<sup>16</sup>): NMR ( $CCl_4$ ):  $\delta$  = 2.37 ppm (s) [3]; 3.87 (s) [3]; 6.55, 7.30 jeweils d ( $J$  = 2.5 Hz) [2]; 7.65 (s) [1].

*Cinnalutein-methylester*: Goldglänzende Blättchen aus Benzol, Schmp. 225°. Bildet sich auch bei kurzer Einwirkung von Diazomethan auf 5 oder 6. — IR (KBr): 1720 (s), 1680 (w), 1620/cm (ss).

$C_{18}H_{14}O_7$  (342.3) Ber. C 63.15 H 4.12 Gef. C 62.85 H 4.52

*Demethylierung von 6 zu 5*: 5 mg 6 wurden in 50 ccm absol. Methylenchlorid mit 0.5 ccm  $BBr_3$  1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Nach Zugabe von 5 ccm Wasser extrahierte man mit Essigester, trocknete und chromatographierte auf Kieselgel-Platten (Laufmittel: Benzol/Ameisensäure-äthylester/Ameisensäure 13 : 5 : 2). Neben unverändertem 6 wurde 5 isoliert, das im Massenspektrum und chromatographischen Verhalten mit einer authentischen Probe übereinstimmte.

*Decarboxylierung von 6 zu 1*: 5 mg 6 wurden in 2 ccm Chinolin mit einer Spur Cu-Pulver 5 Min. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen goß man auf 10 ccm konz. Salzsäure und extrahierte den Farbstoff mehrmals mit Methylenchlorid/Äther (1 : 2). Waschen des Extraktes mit 2  $n$  HCl und Wasser, Trocknen und Eindampfen lieferte 1 in quantitativer Ausb.; Identifizierung durch Schmp. 206°, IR-Spektrum und chromatographisches Verhalten.

*Cinnarubin (7)*: Rote Nadeln aus Eisessig, Schmp. >290° (Zers.). — IR (KBr): 1715 (s), 1595/cm (ss). — UV (Methanol): 490 nm ( $\epsilon$  14500), 296 (11200), 276 (18200), 255 (18600), 233 (38000); (+ NaOH): 582 (sh, 10500), 546 (14800), 320 (11500), 245 (36000). — Massenspektrum:  $m/e$  344 (45%) [ $M^+$ ]; 327 (20%), 326 (100%), 300 (15%), 298 (22%).

$C_{17}H_{12}O_8$  (344.3) Ber. C 59.30 H 3.54 Gef. C 58.91 H 4.14

<sup>15</sup>) Inzwischen wurde gefunden, daß sich sowohl 6/7 als auch Dermolutein/Dermorubin<sup>8</sup>) wesentlich bequemer auf acetyliertem Polyamid 6-Ac (Fa. Macherey und Nagel, Düren) trennen lassen (Eluent: Methanol).

<sup>16</sup>) Nach der Vorschrift von A. C. Waiss, Jr., R. E. Lundin und D. J. Stern, Tetrahedron Letters [London] 1964, 513, dargestellt.

*Tris-trimethylsilyläther-trimethylsilylester*<sup>16)</sup>: NMR (CCl<sub>4</sub>):  $\delta$  = 2.12 ppm (s) [3]; 3.87 (s) [3]; 6.48, 7.20 jeweils d ( $J$  = 2.5 Hz) [2].

Die Demethylierung und Decarboxylierung von 7 wurden wie bei 6 beschrieben durchgeführt. Dabei entstanden Nordermorubin (8)<sup>8)</sup> bzw. Erythroglaucin (2), identisch mit authentischen Proben, in den IR-Spektren und Massenspektren sowie im Chromatogramm.

*Cinnarubin-methylester*: Kupferglänzende Blättchen aus Benzol, Schmp. 236°. Bildet sich auch bei kurzer Einwirkung von Diazomethan auf 7. — IR (KBr): 1730 (s), 1605/cm (ss).

C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub> (358.3) Ber. C 60.36 H 3.94 Gef. C 59.86 H 4.31

*Verfütterung von [2.4-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]Emodin-6- $\beta$ -D-glucopyranosid an Dermocybe cinnabarina*: Fünf jungen Fruchtkörpern von *D. cinnabarina* wurden am natürlichen Standort jeweils 0.2 ccm einer wäßrig-äthanolischen Lösung von [2.4-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]Emodin-6- $\beta$ -D-glucopyranosid<sup>12)</sup> injiziert (Gesamtmenge: 0.15 mg;  $8 \times 10^4$  tpm). Nach drei Tagen wurden die Pilze (10 g) geerntet und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die Trennung der Pigmente erfolgte dünnschichtchromatographisch. Dabei konnte kein Emodin mehr nachgewiesen werden. Man erhielt 20 mg Fallacinol (3), das mit 30 mg inaktivem Pigment verdünnt wurde. Nach Umkristallisieren bis zur konstanten Aktivität betrug die spezif. Akt. 600 tpm/mg (durch Verbrennungsanalyse bestimmt).

[168/72]