

Wolfgang Steglich*) und Walter Lösel

Pilzpigmente, X¹⁾

Anthrachinon-glucoside aus *Dermocybe sanguinea* (Wulf. ex Fr.) Wünsche ²⁾

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität München

(Eingegangen am 15. Mai 1972)



Die Isolierung und Konstitutionsermittlung von Emodin-1- β -D-glucopyranosid (**1**) und Dermocybin-1- β -D-glucopyranosid (**4**) werden beschrieben. **1** und **4** sind die ersten natürlichen Anthrachinon-glucoside mit 1-ständigem Glucoserest.

Mushroom Pigments, X¹⁾

Anthraquinone Glucosides from *Dermocybe sanguinea*

The isolation and structural elucidation of emodin-1- β -D-glucopyranoside (**1**) and dermocybin-1- β -D-glucopyranoside (**4**) are described. **1** and **4** represent the first natural anthraquinone glucosides with a glucose residue at the 1-position.



Der Blutrote Hautkopf, *Dermocybe sanguinea* (Wulf. ex Fr.) Wünsche, erwies sich als Fundgrube von Anthrachinon-Pigmenten³⁾. Bei der Untersuchung der Farbstoffe wurde festgestellt, daß die Hauptmenge der Polyhydroxy-anthrachinone erst nach kurzem Kochen mit Mineralsäuren in Freiheit gesetzt wird. Wir haben nun die Pigmente ohne saure Hydrolyse aufgearbeitet und dabei zwei Anthrachinon-glucoside isoliert.

A. Isolierung der Glucoside

Für unsere Untersuchungen standen 290 g frische Fruchtkörper zur Verfügung, die zerkleinert und mehrfach mit siedendem Wasser ausgezogen wurden. Der größte Teil der Farbstoffe ging dabei in Lösung. Extraktion mit Essigester entzog der wäßrigen Phase gelbes Emodin-glucosid **1**, Ansäuern mit Eisessig und erneute Extraktion nach einer Mischfraktion rotes Dermocybin-glucosid **4**. Nach Chromatographie an Polyamid⁴⁾ wurden 0.35 g **1** (0.12%) und 0.13 g **2** (0.04%) erhalten⁵⁾. Durch Aus-

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

1) IX. Mitteil.: W. Steglich und W. Reiningger, Chem. Ber. **105**, 2922 (1972), vorstehend.

2) Teil der Dissertation W. Lösel, Technische Universität München 1968.

3) W. Steglich, W. Lösel und V. Austel, Chem. Ber. **102**, 4104 (1969), und darin zitierte Literatur.

4) L. Hörhammer in Methods in Polyphenol Chemistry, S. 93–94, Pergamon Press, Oxford 1964.

5) Die Ausbeuten sind in Wirklichkeit höher, da die Mischfraktion von 0.32 g nicht aufgetrennt wurde.

kochen des wasserextrahierten Pilzmaterials mit Äthanol konnten noch 34 mg Emodin und 11 mg Dermocybin isoliert werden. Demnach liegen im Pilz über 90% des Emodins und Dermocybins als Glucoside vor (Tab.).

Tab. Anthrachinon-glucoside aus *Dermocybe sanguinea*

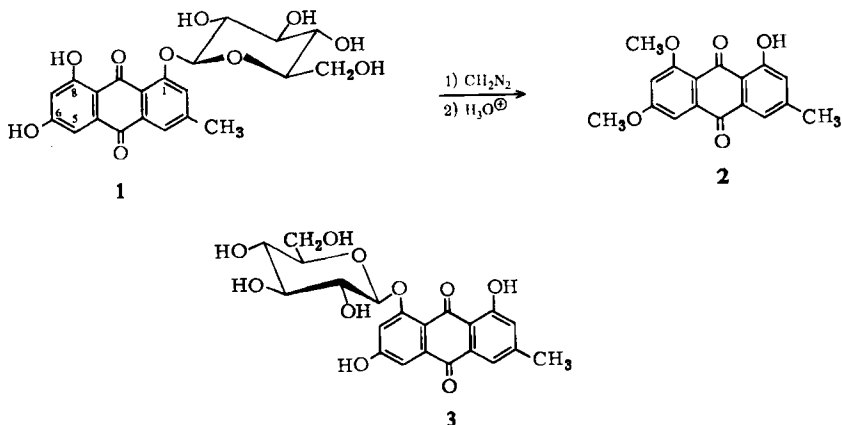
	Schmp.	$R_F^a)$	Farbe ^{b)}	UV ^{b)}	NH ₃ ^{b)}
Emodin-1- β -D-glucopyranosid (1)	210–211°	0.25	gelb	gelb	rosa
Dermocybin-1- β -D-glucopyranosid (4)	228–230°	0.11	rot	dunkel	violett

a) Kieselgel-Fertigplatten GF 254, Fa. E. Merck, Darmstadt; Laufmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1, v/v/v).

b) Farbe auf Dünnschichtplatten im Tages- und UV-Licht sowie nach Halten über NH₃.

B. Struktur des Emodin-glucosids

Das Emodin-glucosid **1** wird durch saure Hydrolyse oder β -Glucosidase in Emodin und D-Glucose gespalten, α -Glucosidase ist ohne Einwirkung. Die Acetylierung liefert ein Hexaacetat, das nach dem Massenspektrum die Summenformel C₃₃H₃₂O₁₆ besitzt. Die Verbindung zeigt im NMR-Spektrum eine weitgehende Übereinstimmung der Zuckerprotonen-Signale mit denen von synthetisch hergestelltem Phycion-8- β -D-glucopyranosid-pentaacetat (6,7). Zur Feststellung der Lage des Zuckerrestes wurde das Glucosid nach Methylierung mit Diazomethan sauer hydrolysiert. Neben wenig Emodin und Spuren Questin⁸⁾ entstanden dabei Phycion und Emodin-6,8-dimethyläther (α -Methyl-phycion) (**2**)^{8,9)}. **2** erwies sich in jeder Beziehung als identisch mit einem durch Decarboxylierung von synthetischem Endocrocin-6,8-dimethyläther¹⁰⁾ hergestellten Vergleichspräparat. Damit ist für das Glucosid die Struktur eines Emodin-1- β -D-glucopyranosids (**1**) bewiesen.



6) L. Hörhammer, L. Farkas, H. Wagner und I. Sedat, Magyar Kémiai Folyóirat **70**, 303 (1964), C. A. **62**, 1732 (1965).

7) W. Steglich und W. Lösel, Tetrahedron [London] **25**, 4391 (1969).

8) A. Mahmoodian und C. E. Stickings, Biochem. J. **92**, 369 (1964).

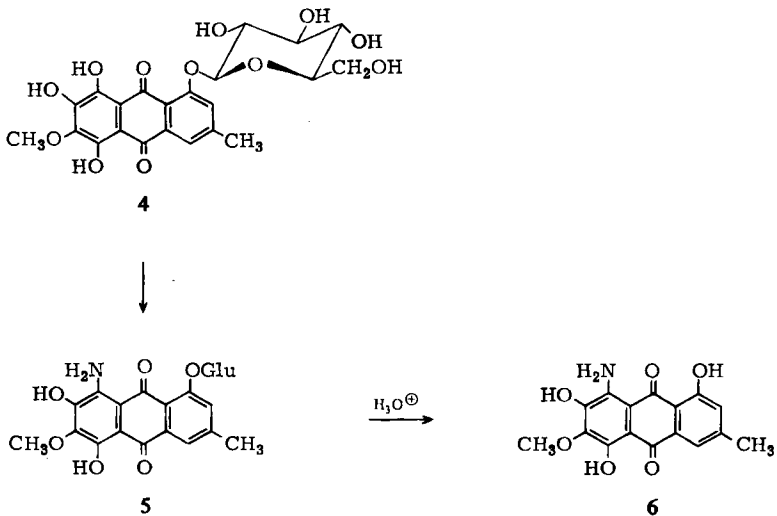
9) O. Hesse, J. prakt. Chem. **57**, 409 (1898).

10) W. Steglich und W. Reininger, Chem. Commun. **1970**, 178.

1 unterscheidet sich im Schmp. und chromatographischen Verhalten¹¹⁾ von einem aus höheren Pflanzen (*Rheum*^{12,13}, *Rhamnus purshiana*¹⁴⁾) isolierten Emodin- β -D-glucopyranosid vom Schmp. 189–190°, dessen Zuckerrest nach der Synthese von *Mühlemann*¹⁵⁾ nur in 1- oder 8-Stellung sitzen kann. Nach unserem Strukturbeweis für 1 muß das Glucosid aus höheren Pflanzen die Struktur eines Emodin-8- β -D-glucopyranosids (3) besitzen. Dies wurde unabhängig durch eine NMR-spektroskopische Untersuchung bewiesen⁷⁾.

C. Struktur des Dermocybin-glucosids

Das Dermocybin-glucosid 4 wird von Mineralsäuren oder β -Glucosidase, nicht jedoch von α -Glucosidase, in Dermocybin³⁾ und D-Glucose gespalten. Mit Acetanhydrid/Natriumacetat liefert es ein Heptaacetat, dessen Zuckerprotonen-Signale im NMR-Spektrum mit denen des 1-Hexaacetats übereinstimmen. Zur Bestimmung der Stellung des Zuckerrestes wurde 4 mit wäßrigem Ammoniak bei Raumtemperatur umgesetzt. Dabei entsteht das Desoxy-aminogluosid 5, das ohne Isolierung zum bekannten 8-Amino-8-desoxy-dermocybin (6)³⁾ hydrolysiert wurde.



Da für den leichten Austausch der Hydroxygruppe gegen NH_2 das 5.7.8-Trihydroxy-System des Dermocybins frei vorliegen muß³⁾, kann der Zuckerrest nur in 1-Stellung sitzen. Damit ist für das Pigment die Struktur eines Dermocybin-1- β -D-glucopyranosids (4) bewiesen. Sie folgt unabhängig auch aus den „Acylierungs-Verschiebungen“ der Aromatenprotonen im NMR-Spektrum⁷⁾.

- 11) Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Wagner, München, für den chromatographischen Vergleich der beiden Glucoside.
 12) O. E. Schultz und G. Mayer, *Arzneimittel-Forsch.* **6**, 334 (1956).
 13) H. Wagner, L. Hörhammer und L. Farkas, *Z. Naturforsch.* **18b**, 89 (1963).
 14) L. Hörhammer, G. Bittner und H. P. Hörhammer jr., *Naturwissenschaften* **51**, 310 (1964).
 15) H. Mühlemann, *Pharmaceutica Acta Helv.* **24**, 315 (1949).

Die Isolierung von Anthrachinon-glucosiden aus *D. sanguinea* zeigt, daß Ausnahmen von der Regel möglich sind, wonach Pilze keine Phenole glucosidieren^{16, 17)}. Im Unterschied zu den aus höheren Pflanzen isolierten Anthrachinon-glucosiden tritt dabei der Glucosyl-Rest nicht in 8-, sondern in 1-Stellung ein.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Die UV-Spektren wurden in Äthanol unter Zusatz einer Spur Salzsäure bzw. eines Tropfens 1 *n* NaOH mit einem Beckman DK2 aufgenommen, die IR-Spektren mit einem Perkin-Elmer-Gerät Modell 21.

Isolierung der Glucoside: 290 g frische Fruchtkörper von *Dermocybe sanguinea* wurden in heißem Wasser mit einem Mixer zerkleinert und mehrfach mit siedendem Wasser extrahiert. Nach dem Abkühlen gab man die vereinigten Auszüge (ca. 2 l) durch ein Filter und schüttelte sie wiederholt mit Essigester aus. Eindampfen der mehrmals mit Wasser gewaschenen und über Natriumsulfat getrockneten Extrakte gab einen Rückstand, der nach Lösen in 60proz. Äthanol durch Filtration über eine kurze Polyamidsäule (Fa. Macherey und Nagel, Düren) gereinigt wurde. Nach Eindampfen kristallisierte man das Emodin-1-β-D-glucopyranosid (1) aus wäbr. Äthanol um. Ausb. 0.354 g hellgelbe, feine Nadeln vom Schmp. 210–211°.

IR (KBr): 3400, 1667 (sh), 1630, 1603/cm.

UV (Äthanol): λ_{max} 428 nm (ε 7600), 285 (20200), 267 (14300), 253 (15900); (+NaOH): 498 (6200), 309 (16400), 272 (13500), 267 (11700), 258 (13200), 242 (13200).

C₂₁H₂₀O₁₀·1/2 H₂O (441.4) Ber. C 57.30 H 4.81 Gef. C 57.71 H 5.04

Nach Abtrennung von 1 wurde der Originalextrakt mit Eisessig angesäuert, wobei die Farbe von Rot nach Gelb umschlug. Erneutes Ausschütteln mit kleinen Portionen Essigester lieferte 0.317 g eines Gemisches von restlichem 1 und etwas Dermocybin-1-β-D-glucopyranosid (4). Während der letzten Extraktion schied sich der größte Teil von 4 in roten Flöckchen ab, die sich an der Phasengrenze ansammelten. Es wurde abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und nach Lösen in wäbr. Äthanol über Polyamid filtriert. Nach Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser 0.127 g feine, hellrot leuchtende, verfilzte Nadeln vom Schmp. 228–230°.

IR (KBr): 3424, 1618, 1592/cm.

UV (Äthanol): λ_{max} 515 nm (ε 6400 sh), 482 (10200), 387 (4200 sh), 268 (28200), 263 (28100); (+NaOH): 553 (17300), 517 (16700), 294 (19200), 268 (15700), 261 (15500), 256 (16200), 249 (18800), 245 (20500), 241 (20000).

C₂₂H₂₂O₁₂ (478.4) Ber. C 55.23 H 4.64 Gef. C 54.67 H 4.67

Der nach der Extraktion mit Wasser verbleibende Pilzrückstand wurde mit Äthanol ausgezogen und die Lösung nach der Ionenaustauscher-Methode³⁾ aufgearbeitet. Nach Umkristallisation aus Eisessig resultierten 34 mg Emodin und 11 mg Dermocybin.

Spaltung der Glucoside 1 und 4

a) *Mit Säuren*: 50 mg Glucosid 1 oder 4 wurden mit 20 ccm *Kiliani*-Gemisch (Eisessig/Wasser/konz. Salzsäure 7:12:2) 1 Stde. auf 100° erhitzt. Nach dem Erkalten verdünnte man mit 40 ccm Wasser, dampfte i. Vak. auf 40 ccm ein und extrahierte das Aglykon mit

¹⁶⁾ J. B. Pridham, *Phytochemistry* 3, 493 (1964).

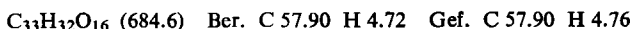
¹⁷⁾ S. M. Hopkinson, *Quart. Reviews* 23, 98 (1969).

3 Portionen Methylchlorid/Äther (1 : 2, v/v). Nach üblicher Entfernung der Salzsäure mittels Silberacetat und Fällung der überschüssigen Ag-Ionen mit H₂S wurde die filtrierte Lösung eingedampft. Es hinterblieb ein Sirup, der sich nach chromatographischem Vergleich, Farbreaktion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure¹⁸⁾ und optischer Drehung als reine D-Glucose erwies; Ausb. jeweils ca. 15 mg.

b) Mit β -Glucosidase: 4 mg Glucosid **1** oder **4** und 10 mg β -Glucosidase (roh, EC 6110, Worthington Biochem. Corp.) wurden in 1 ccm Acetatpuffer (pH 5) 24 Stdn. bei 30° gehalten. Danach ergab die Dünnschichtchromatographie, daß **1** völlig und **4** zum größten Teil gespalten war. Bei entsprechenden Versuchen mit α -Glucosidase (pH 6.5) oder ohne Enzym war chromatographisch kein Aglykon nachzuweisen.

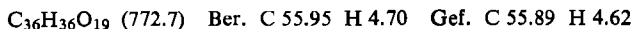
Bestimmung der Stellung des Glucosylrestes: 57 mg **1** wurden in Methanol mit überschüss. äther. Diazomethan 25 Min. stehengelassen. Nach Zugabe von etwas Eisessig dampfte man ein und erhitzte den Rückstand 10 Min. mit 20 ccm 15proz. Salzsäure unter Rückfluß. Die Aglykone wurden wie üblich isoliert und durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G getrennt (Laufmittel: Benzol/Ameisensäure-äthylester/Ameisensäure 160 : 40 : 1). Ausbeuten: 6 mg Phycion, Schmp. 205° (Benzol); 4 mg Emodin, Schmp. 255° (Benzol); 22 mg Emodin-6,8-dimethyläther (**2**), Schmp. 208–209° (Eisessig), (Lit.⁸⁾: 208–210°; Spuren Questin. Alle Verbindungen waren nach Schmp. und IR-Spektrum mit authentischen Vergleichssubstanzen identisch.

Emodin-1- β -D-glucopyranosid-hexaacetat: 79 mg **1** wurden mit 100 mg wasserfreiem Natriumacetat in 30 ccm Acetanhydrid 90 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abziehen des Lösungsmittels verteilte man zwischen Wasser und Chloroform, schüttelte die organische Phase mehrmals mit Wasser aus und dampfte sie nach Trocknen über Natriumsulfat i. Vak. ein. Aus Eisessig 91 mg grünlichgelbe Nadeln, Schmp. 240–241°; $[\alpha]_{22}^{578}$: –53.0°; $[\alpha]_{22}^{546}$: –49.7° (*c* = 0.7 in CHCl₃). – IR (KBr): 1754, 1672, 1597/cm. – NMR vgl. I. c. 7).



*Reaktion von **4** mit wäßr. Ammoniak:* 5 mg **4** wurden in 3 ccm konz. wäßr. Ammoniak 12 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Nach schwachem Ansäuern schüttelte man das Amino-desoxyglucosid **5** mit Essigester aus. Es zeigte im Dünnschichtchromatogramm einen einheitlichen violettroten Fleck und wurde ohne weitere Charakterisierung durch kurzes Erhitzen mit 15proz. Salzsäure hydrolysiert. Das Aglykon (2.5 mg) erwies sich nach Laufverhalten, UV- und Massenspektrum als identisch mit 8-Amino-8-desoxy-dermocybin (**6**)³.

Dermocybin-1- β -D-glucopyranosid-heptaacetat: Aus 50 mg **4** mit 60 mg Natriumacetat und 40 ccm Acetanhydrid wie beim Emodin-glucosid beschrieben. Aus Äthanol 74 mg gelblich-braune Kristalle vom Schmp. 199°; $[\alpha]_{22}^{578}$: –84.0°; $[\alpha]_{22}^{546}$: –84.0° (*c* = 1 in CHCl₃). – IR (KBr): 1776, 1739, 1681, 1593, 1573/cm (sh). – NMR vgl. I. c. 7).



¹⁸⁾ E. Guillaux und S. Beaugirand, Bull. Soc. chim. France 1965, 261.