

Über die Farb- und Fluoreszenzstoffe des Grünblättrigen Schwefelkopfes (*Hypholoma fasciculare*, Agaricales)¹⁾

Jean-Louis Fiasson*, Katia Gluchoff-Fiasson* und Wolfgang Steglich**

Département de Biologie végétale, Laboratoire de Mycologie associé au C. N. R. S.,
Université Claude Bernard (Lyon I), 43, boulevard du 11 Novembre 1918,
F-69621 Villeurbanne*, und

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,
Max-Planck-Str. 1, D-5300 Bonn**

Eingegangen am 31. Mai 1976

Die Fruchtkörper von *Hypholoma fasciculare* enthalten ein Gemisch der gelben Hypholomine A und B (7, 8) und der unter UV-Licht blau fluoreszierenden Fasciculine A und B (14, 15). Die Verbindungen werden als Permethylderivate 5, 6, 12 und 13 charakterisiert. Sie können biogenetisch als Kondensationsprodukte von Dehydrohispidin (19) mit Styryl- oder Arylpyronen aufgefaßt werden.

Pigments and Fluorescent Compounds from *Hypholoma fasciculare* (Agaricales)¹⁾

Fruiting bodies of *H. fasciculare* ("Sulfur Tuft") contain a mixture of the yellow hypholomines A and B (7, 8) and the colourless fasciculines A and B (14, 15), the latter showing blue fluorescence under u. v. light. The compounds are characterized as permethyl derivatives 5, 6, 12, and 13. Biogenetically they may be regarded as condensation products of dehydrohispidine (19) with styryl- or arylpyrones.

Die lebhaft schwefelgelben Fruchtkörper des grünblättrigen Schwefelkopfes [*Hypholoma fasciculare* (Huds. ex Fr.) Kummer] findet man fast das ganze Jahr hindurch in Büscheln an Baumstümpfen und Wurzeln. Unter der UV-Lampe zeigen vor allem die Lamellen des Pilzes eine intensiv zitronengelbe Fluoreszenz. Die chemische Natur der für diese Farbeffekte verantwortlichen Substanzen ist bisher unbekannt²⁾.

A. Isolierung der Farb- und Fluoreszenzstoffe

Wie wir fanden, lassen sich die Farbstoffe am besten gewinnen, wenn man die zerkleinerten, tiefgefrorenen oder gefriergetrockneten Fruchtkörper mit Essigester extrahiert. Die Lösung zeigt im DC zwei gelbe Hauptfarbstoffe, Hypholomin A und B (HA, HB), die jeweils von den im UV-Licht blau fluoreszierenden farblosen Fasciculinen A und B

¹⁾ Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons 33; 32. Mitteil.: N. Arpin, J. Favre-Bonvin und S. Thivend, C. R. Acad. Sci., Ser. D 282, 997 (1976). Pilzpigmente, XXVI. Mitteil.; XXV. Mitteil.: H. Schwarz, V. Pasupathy und W. Steglich, Org. Mass Spectrom. 11, 472 (1976).

²⁾ Chromatographische Voruntersuchungen: M. Gabriel, Bull. Soc. Myc. Fr. 75, 159 (1959).

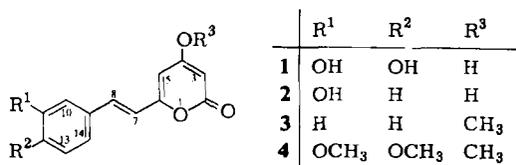
(FA, FB) begleitet werden³⁾. Versuche, diese Verbindungen säulenchromatographisch zu trennen, brachten nur mit acetyliertem Polyamid einen gewissen Erfolg. Man erreicht dabei die Auftrennung in zwei Mischfraktionen HA/FA und HB/FB, die aber infolge der zur Elution erforderlichen großen Lösungsmittelmengen noch viele Verunreinigungen enthalten. Die Trennung der Komponenten gelang schließlich unter großen Verlusten durch zweimalige präparative DC an Kieselgel mit dem oben beschriebenen Laufmittelsystem³⁾. Alle Versuche, die so gewonnenen Verbindungen durch Kristallisation analysenrein zu erhalten, blieben erfolglos.

Deshalb wurden mit Diazomethan die kristallisierten Permethyl ether HA-Me, HB-Me, FA-Me und FB-Me dargestellt. Sie können von verschiedenen Nebenprodukten der Methylierung dadurch unterschieden werden, daß sie auf der DC-Platte die gleiche Farbe und Fluoreszenz aufweisen wie die Ausgangsverbindungen. Zur Gewinnung größerer Mengen wurden die durch Chromatographie erhaltenen Mischfraktionen HA/FA bzw. HB/FB methyliert und die Permethyl derivate anschließend durch DC getrennt.

Wie wir am Beispiel des HA-Me fanden, lassen sich die Permethyl derivate mit BBr₃ nicht wieder zu den Ausgangsverbindungen spalten. Versuche, die Farbstoffe mit (Chlormethyl)methylether/Triethylamin zu methoxymethylieren und die geschützten Derivate nach Trennung durch DC acidolytisch zurückzuspalten, gelangen zwar, waren aber für die Reindarstellung der Komponenten zu verlustreich.

B. Konstitution der Hypholomine

In Form und Lage des langwelligen UV-Maximums (in Methanol) zeigen HA ($\lambda_{\max} = 375$ nm) und HB ($\lambda_{\max} = 382.5$ nm) große Ähnlichkeit mit Hispidin (1)^{4,5)} ($\lambda_{\max} = 373$ nm). Beim Peracetylderivat von HA ist das Maximum bei 363 nm gleich strukturiert wie das von Desmethoxyyangonin (3)⁶⁾ ($\lambda_{\max} = 345$ nm).



Auch das IR-Spektrum (KBr) von HA-Me mit Banden bei 1729 (Lacton-CO), 1638, 1553, 1511 und 965 cm⁻¹ (*trans*-CH=CH) spricht für das Vorhandensein eines Styrylpyron-Systems^{7,8)}. Verbindungen dieses Typs, wie 1 und Bismoryangonin (2), kommen in den verwandten Blätterpilzgattungen *Gymnopilus*^{9,10)} und *Pholiota*¹¹⁾ vor.

³⁾ Kieselgel-Fertigplatten F₂₅₄, Fa. Merck, Darmstadt; Laufmittel: Benzol/Ameisensäure-ethylester/Ameisensäure (5:4:2 Vol.); HA: R_F 0.42, hellgelb, UV lebhaft gelb; HB: 0.32, goldgelb, UV ockergelb; FA: 0.38; FB: 0.28; beide farblos, UV blau.

⁴⁾ R. L. Edwards, D. G. Lewis und D. V. Wilson, J. Chem. Soc. 1961, 4995.

⁵⁾ J. D. Bu'Lock, P. R. Leeming und H. G. Smith, J. Chem. Soc. 1962, 2085.

⁶⁾ I. Chmielewska, J. Ciślak, K. Górczynska, B. Kontnik und K. Pitakowska, Tetrahedron 4, 36 (1958).

⁷⁾ R. Hänsel, H. Rimpler und L. Langhammer, Z. Anal. Chem. 218, 349 (1966).

⁸⁾ R. L. Edwards und I. Mir, J. Chem. Soc. C 1967, 411.

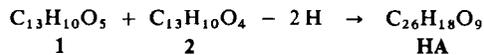
⁹⁾ G. M. Hatfield und L. R. Brady, Lloydia 31, 225 (1968); 34, 260 (1971).

¹⁰⁾ M.-P. Dangy-Caye und N. Arpin, Travaux mycologiques dédiés à R. Kühner, Bull. Soc. Linn. Lyon 1974, 109.

¹¹⁾ L. R. Brady und R.-G. Benedict, J. Pharm. Sci. 61, 318 (1972).

Nach den hochaufgelösten Massenspektren haben **HA-Me** und **HB-Me** die Summenformeln $C_{30}H_{26}O_9$ und $C_{31}H_{28}O_{10}$. Charakteristisch ist die von den Molekül-Ionen $m/e = 530$ und 560 ausgehende CO_2 -Abspaltung, die zu Basispeaks $m/e = 486$ und 516 führt¹²⁾. Im Spektrum des peracetylierten **HA** treten neben dem schwachen Molekül-Ion $m/e = 642$ prominente Ionen bei $m/e = 598$ ($M^+ - 44$), 556 , 514 , 472 und 430 auf. Die vier konsekutiven Ketenabspaltungen sprechen für das Vorhandensein von vier phenolischen oder enolischen Hydroxygruppen, womit sich für **HA** die Summenformel $C_{26}H_{18}O_9$ ergibt. **HB** besitzt nach der Zusammensetzung von **HB-Me** eine zusätzliche OH-Gruppe und damit die Formel $C_{26}H_{18}O_{10}$.

Macht man die biogenetisch plausible Annahme, daß die *Hypholoma*-Farbstoffe durch oxidative Dimerisierung von Styrylpyronen gebildet werden, so kommt man zur Formel von **HA** nach dem Schema:



HB entsteht entsprechend aus zwei Molekülen Hispidin (1).

Wie aus den 1H -NMR-Spektren (Tab.) hervorgeht, sind bei der Dimerisierung folgende strukturelle Veränderungen gegenüber den Monomeren erfolgt:

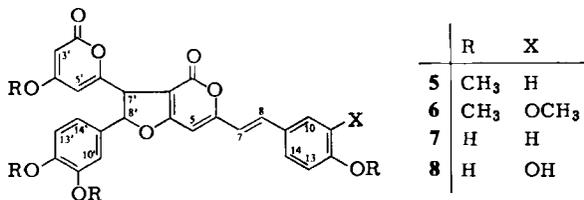
1. Eine der beiden *trans*-CH=CH-Gruppen verschwindet und liefert dafür ein System CH-CH ($\delta = 4.36$ und 5.91 ppm, $J = 6.5$ Hz).

2. 3-H eines der beiden Pyronringe geht verloren. Das verbleibende 5-H gibt ein Singulett bei $\delta = 6.19$ ppm.

3. Die Signale eines Benzolkerns fallen als Multipllett bei $\delta = 6.9$ ppm zusammen, während der andere die üblichen Aufspaltungsmuster der Aromatenprotonen von 2 bzw. 1 behalten hat.

4. Bei der Dimerisierung verschwindet eine OH-Gruppe, denn **HA** liefert nur einen Tetramethylether und ein Tetraacetat, **HB** einen Pentamethylether.

Danach haben sich die Hydroxygruppe und C-3 eines der Pyronringe unter Verlust von zwei H an die olefinische Doppelbindung des zweiten Moleküls addiert. Berücksichtigt man, daß im 1H -NMR-Spektrum von **HA-Me** der *p*-Hydroxyphenyl-Rest die für Styrylpyrone charakteristische AA'BB'-Aufspaltung zeigt, und daß bei der katalytischen Hydrierung mit Palladium/Kohle der Dihydrofuranring hydrogenolytisch geöffnet wird (s. u.), so kommt man für **HA-Me** und **HB-Me** zu den Formeln **5** und **6**. Sie enthalten noch ein Styrylpyron-Chromophor, so daß die UV- und IR-Spektren der Verbindungen gut zu erklären sind. Die *Hypholomine* sind optisch aktiv. Der Verlauf der CD-Kurve von **5** ist aus der Abb. zu ersehen.



¹²⁾ Eine Diskussion der Massenspektren erfolgt in einer späteren Mitteilung.

Tab.: ¹H-NMR-Daten von Hispidin-trimethylether (4), HA-Me (5), HB-Me (6), 9, 10, 11, FA-Me (12), FB-Me (13), 16 und 17
(in CDCl₃, TMS als innerer Standard, δ-Werte)

| | 4 | 5 | 6 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 16 ^{a)} | 17 |
|--------------------|---------|-------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|------------|------------|----------------------|------------|
| 3-H | d 5.45 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 5-H | d 5.90 | s 6.19 | s 6.15 | s 5.97 | s 5.78 | s 5.90 | s 6.55 | s 6.57 | s 6.27 | s 6.46 |
| 7-H | d 7.40 | d 7.61 | d 7.55 | { AA'BB' } zentriert | { AA'BB' } zentriert | t 2.88 | — | — | — | — |
| 8-H | d 6.45 | d 6.59 | d 6.52 | { 2.89 } zentriert | { 2.63 } zentriert | t 2.69 | — | — | — | — |
| 10-H | d 7.01 | { AA'BB' } | { m ^{b)} } | { AA'BB' } | { AA'BB' } | { AA'BB' } | { AA'BB' } | d 7.35 | d 7.38 | d 7.25 |
| 11-H | — | { 6.97 } | { 6.83 } | { 6.83 } | { 6.74 } | { 6.84 } | { 6.96 } | — | — | — |
| 13-H | d 6.86 | { 7.53 } | { 7.11 } | { 7.11 } | { 6.98 } | { 7.06 } | { 7.81 } | d 6.93 | d 7.02 | d 6.89 |
| 14-H | dd 7.04 | — | — | — | — | — | — | dd 7.45 | dd 7.40 | dd 7.36 |
| 3'-H | — | d 5.51 | d 5.46 | d 5.46 | d 5.38 | d 5.42 | d 5.46 | d 5.46 | d 5.51 | d 5.41 |
| 5'-H | — | d 6.03 | d 5.98 | d 5.95 | d 6.21 | d 6.02 | d 5.99 | d 5.99 | d 6.12 | d 6.04 |
| 7'-H | — | d 4.36 | d 4.32 | d 4.35 | t 4.52 | dd 4.31 | d 4.34 | d 4.34 | m 4.51 | m 4.34 |
| 8'-H | — | d 5.91 | d 5.87 | d 5.84 | d 3.34 | dd 3.27 u. 3.37 | d 5.89 | d 5.89 | m 3.43 ^{c)} | m ca. 3.34 |
| 10''-H | — | { m 6.90 – 6.95 } | { m 6.88 } | { m 6.87 } | { m 6.70 } | { m 6.72 } | { m 6.88 } | { m 6.88 } | { m 6.78 } | { m 6.72 } |
| 13''-H | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 14''-H | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| CH ₃ O | 3.80 | 3.83 | 3.78 | 2 × 3.78 | 4 × 3.72 | 3.78 | 3.78 | 3.77 | 2 × 3.74 | 3.78 |
| | 3.88 | 3.87 | 3 × 3.86 | 2 × 3.87 | — | 3.79 | 3 × 3.87 | 2 × 3.86 | 3.82 | 3.81 |
| | 3.90 | 2 × 3.93 | 3.91 | — | — | 3.83 | — | 2 × 3.93 | 3.86 | 3.82 |
| CH ₃ CO | — | — | — | — | — | 3.84 | — | — | 3.88 | 2 × 3.93 |
| | — | — | — | — | — | 2.29 | — | — | — | 2.33 |

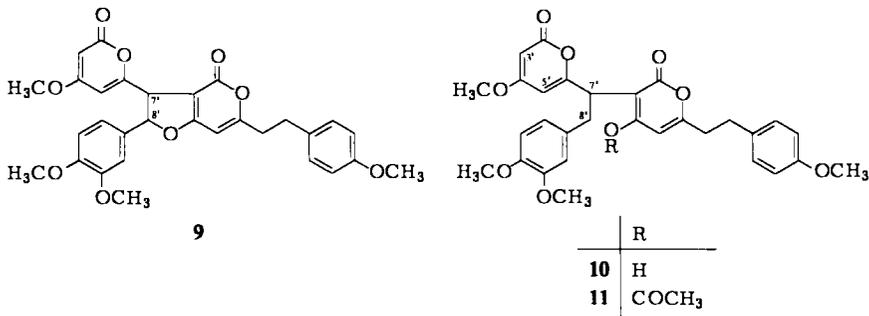
^{a)} In CD₃OD.

^{b)} Signale nicht klar zuzuordnen.

^{c)} Teilweise durch CH₃OH-Signal verdeckt.

Kopplungen: $J_{3,5} = J_{3,5'} = 2$ Hz; $J_{7,8} = 16$; $J_{10,11} = J_{13,14} = 9$; $J_{10,14} = 2$; $J_{7,8'} = 6.5$; bei 10: $J_{7,8'} = 8.5$; bei 11: $J_{7,8} = 8$; $J_{AB} = 15$; $J_{AX} = 9.5$; $J_{BX} = 7$.

Bei der katalytischen Hydrierung von **5** mit Palladium/Kohle entstehen zwei Hauptprodukte, die auf Kieselgelplatten leicht voneinander zu trennen sind. Die weniger polare Verbindung ist ein Dihydroderivat **9** ($M^+ : m/e = 532$), in dem nach dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die olefinische Doppelbindung hydriert worden ist. Im Spektrum der zweiten Verbindung **10** ($M^+ : m/e = 534$) sind die beiden typischen 6.5-Hz-Dubletts der 7'- und 8'-Protonen verschwunden, dafür treten 8.5-Hz-Tripletts und -Dubletts im Intensitätsverhältnis 1 : 2 bei $\delta = 4.52$ und 3.34 auf. **10** liefert ein Monoacetat **11**, so daß bei der Hydrierung eine Hydroxygruppe entstanden sein muß. Diese Befunde sind nur mit einer Hydrogenolyse des Dihydrofuranringes zu erklären, dessen Ringsauerstoff benzylständig zum Arylsubstituenten gebunden sein muß.



Die Verschiebung der δ -Werte der Pyronprotonen 3'- und 5'-H beim Übergang **9** \rightarrow **10** gestattet keine eindeutige Aussage über die Stereochemie am Dihydrofuranring. $\Delta\delta$ beträgt für 3'-H -0.08 und für 5'-H $+0.26$ ppm. Da ein *cis*-ständiger Arylrest beide Protonen abschirmen sollte^{13, 14}), erscheint eine *trans*-Anordnung der Substituenten wahrscheinlicher. Die Ableitung der Stereochemie aufgrund der vicinalen Kopplungskonstanten $J_{7',8'}$ ist nicht möglich¹⁴). Auch die Bestimmung der absoluten Konfiguration muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Für die Hypholomine A und B ergeben sich damit die Formeln **7** und **8**. Das zugrundeliegende System eines 2,3-Dihydro-4H-furo[3,2-c]pyran-4-ons wurde bisher noch nicht in Naturstoffen angetroffen.

C. Konstitution der Fasciculine

Nach den hochaufgelösten Massenspektren besitzen die permethylierten Fasciculine A und B die Summenformeln $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_9$ und $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$, enthalten also C_2H_2 weniger als die entsprechenden Hypholomin-Derivate. Wie bei diesen treten intensive $M^+ - \text{CO}_2$ -Ionen auf, und vom $M^+ - \text{CO}_2$ -Ion des peracetylierten FB gehen fünf konsekutive Kettenabspaltungen aus.

Vergleicht man die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren mit denen von **5** und **6** (Tab.), so stimmen die Signale weitgehend miteinander überein. Aus dem Fehlen des AB-Quartetts der *trans*-Doppelbindung und der Verschiebung des 5-H-Singulett um ca. 0.4 ppm nach

¹³) Vgl. z. B. S. P. Pappas, B. C. Pappas und J. E. Blackwell jr., J. Org. Chem. **32**, 3066 (1967); D. C. Kleinfelter, ebenda **32**, 3526 (1967).

¹⁴) M. Gregson, W. D. Ollis, B. T. Redman, I. O. Sutherland und H. H. Dietrichs, Chem. Commun. **1968**, 1394; E. Schmid, Gy. Fráter, H.-J. Hansen und H. Schmid, Helv. Chim. Acta **55**, 1625 (1972), und in beiden Arbeiten zitierte Literatur.

tieferem Feld folgen für FA-Me und FB-Me die Formeln 12 und 13 und für die Fasciculine A und B entsprechend 14 und 15. Daß bei der Permethylierung keine Veränderung des Grundgerüsts eingetreten ist, lehrt ein Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 13 und 15 in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$ (s. exp. Teil). Auffällig ist, daß gegenüber den Spektren in CDCl_3 das Signal von 5-H um ca. 0.4 ppm nach tieferem Feld verschoben ist. Nach dem Verlauf der CD-Kurven (Abb.) stimmen Fasciculine und Hypholomine in ihrer Stereochemie überein.

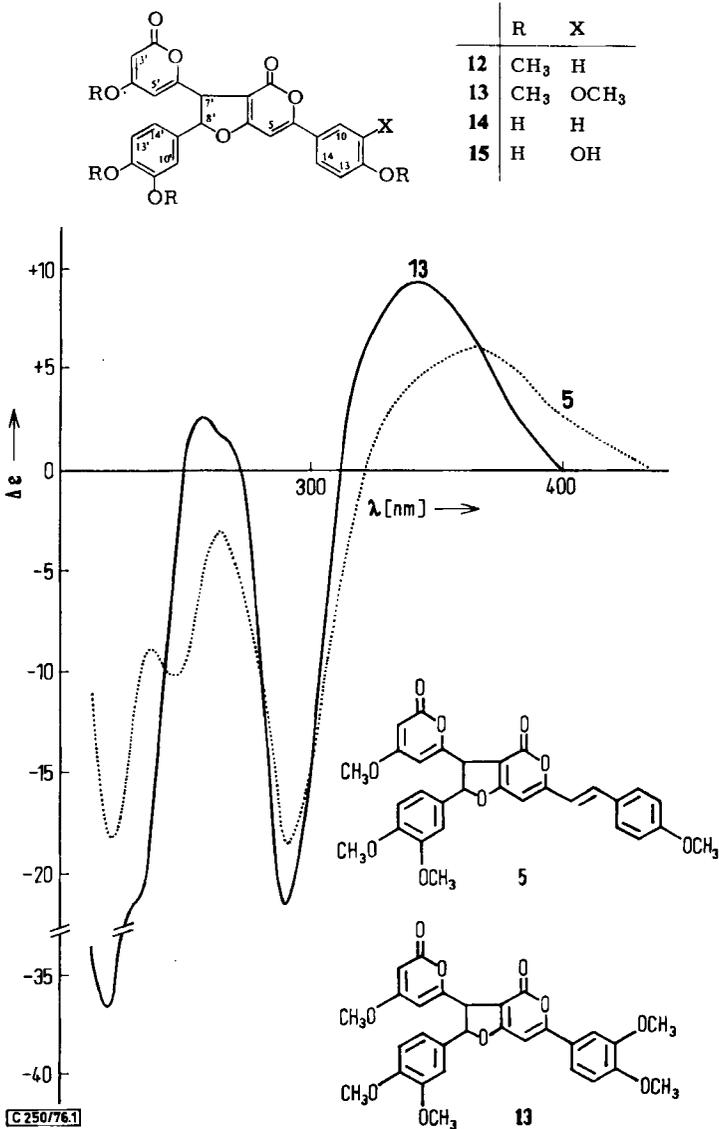
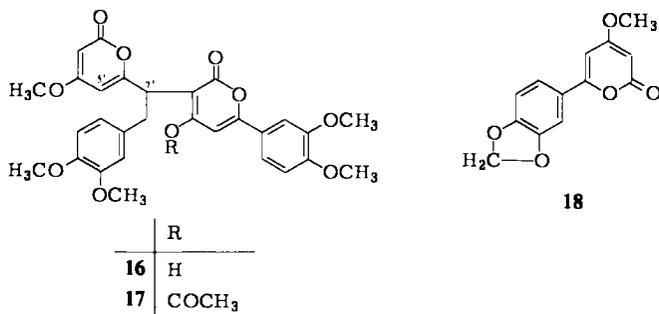


Abb.: CD-Spektren von HA-Me, 5 (.....) und FB-Me 13 (—) in Methanol

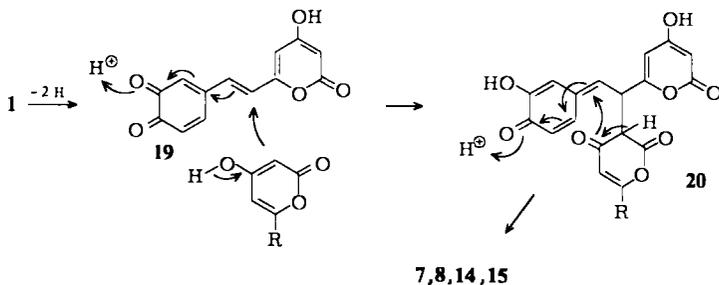
Die katalytische Hydrierung von **13** mit Palladium/Kohle liefert als Hauptprodukt ein Dihydroderivat **16**, bei dem nach dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Tab.) und der Bildung eines Monoacetats **17** wie bei **10** Hydrogenolyse des Dihydrofuranringes eingetreten ist. Strahlt man beim Multiplett des 7'-Protons ($\delta = 4.51$ ppm) ein, so wird die Verbreiterung des 5'-H-Signals aufgehoben und dieses zum scharfen 2-Hz-Dublett. Der Nachweis der Allylkopplung zwischen 5'- und 7'-H ist ein weiterer Beweis für die Anordnung der Substituenten am Dihydrofuranring.



Der Arylpiron-Chromophor von **12** ($\lambda_{\text{max}} = 342.5, 278.5$ nm) und **13** ($\lambda_{\text{max}} = 344, 280$ nm) stimmt gut mit dem von 4-Methoxyparacotoin (**18**, $\lambda_{\text{max}} = 336, 272$ nm)¹⁵⁾ überein.

D. Zur Biogenese der Hypholoma-Verbindungen

Die Formeln der Hypholomine und Fasciculine lassen sich nach einem einheitlichen Biogeneschema ableiten, das vom Dehydrohispidin (**19**) ausgeht. Durch Anlagerung eines Styryl- oder Arylpyrone mit seinem nucleophilen Zentrum C-3 an die durch den Chinonring aktivierte olefinische Doppelbindung entstehen Chinonmethide **20**, die sich dann unter intramolekularer Addition der Pyron-Hydroxygruppe zu den Hypholominen **7, 8** bzw. Fasciculinen **14, 15** stabilisieren:



Der erste Schritt ist eine vinyloge Variante der Addition von *o*-Chinonen an CH-acide Verbindungen¹⁶⁻¹⁸⁾. Kürzlich wurde von uns aus *Phellinus pomaceus* 3,14'-Bispidinyl

¹⁵⁾ W. B. Mors, O. R. Gottlieb und C. Djerassi, J. Am. Chem. Soc. **79**, 4507 (1957).

¹⁶⁾ H.-W. Wanzlick, Angew. Chem. **76**, 313 (1964); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **3**, 401 (1964).

¹⁷⁾ H.-W. Wanzlick, R. Gritzky und H. Heidepriem, Chem. Ber. **96**, 305 (1963).

¹⁸⁾ W. M. Horspool, Q. Rev., Chem. Soc. **23**, 204 (1969).

isoliert, das durch direkte Addition des Pyron-C-3 an den Chinonring von **19** entstanden sein muß¹⁹⁾. Die Stabilisierung der Chinonmethide **20** unter Bildung des Dihydrofuranringes ist durch Beispiele aus der Ligninchemie belegt²⁰⁾.

Das Biogeneschema macht deutlich, daß *Hypholoma fasciculare* sowohl zur Bildung von Styrylpyronen als auch von Arylpyronen befähigt ist. Verbindungen des letzteren Typs wurden bisher noch nicht aus Pilzen isoliert. Sie kommen aber in Holz und Rinde der Lauraceen-Gattung *Aniba* vor²¹⁾, z. T. gemeinsam mit Styrylpyronen²²⁾.

Wie eine umfassende chemotaxonomische Untersuchung der Blätterpilzgattungen *Pholiota*, *Flammula*, *Gymnopilus* u. a. ergab, sind Farbstoffe vom Hypholomin- und Fasciculin-Typ in diesem Verwandtschaftskreis weiter verbreitet²³⁾. Interessanterweise kommen diese Verbindungen auch bei Baumpilzen (*Polypores*) vor, von denen die Gattungen *Phellinus*, *Mucronoporus* und *Inonotus* genauer untersucht wurden²⁴⁾. Aus *Phellinus robustus*, var. *robiniae* wurde Hypholomin B isoliert, dessen Pentamethylether nach Kochromatographie sowie UV-, MS- und ¹H-NMR-Vergleich mit **6** identisch war. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Kürze von der französischen Arbeitsgruppe publiziert.

Wir danken Herrn *J. Favre-Bonvin*, Lyon, für die Aufnahme der zahlreichen MS- und NMR-Spektren und Herrn *E. Kirmayer*, Bonn, für die CD-Spektren. Herrn *J. Bernillon*, Lyon, sei für seine technische Hilfe, Herrn *R. Mottet* in Fa. Société Rhône-Poulenc, Lyon-Feyzin, für wertvolle Ratschläge auf dem NMR-Gebiet gedankt. Melle *M. Noailly*, Marseille, sind wir für die Aufnahme der 250-MHz-Spektren zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil

UV-Spektren (in Methanol): Beckman-DB; die relative Extinktion (optische Dichte), „E_{rel}“, ist in Klammern angegeben. — IR-Spektren (in KBr): Perkin-Elmer 137 (Intensitätsangaben in Klammern: sst = sehr stark, st = stark, m = mittel, w = schwach, sh = Schulter). — ¹H-NMR-Spektren (in CDCl₃, wenn nicht anders angegeben): Varian HA 100 und Cameca 250 MHz (11, 14 – 17). — Massenspektren: AEI MS-9, Direkteinführung der Proben bei 190°C und 70 eV. — CD (in Methanol): Dichrographie Jouan-Roussel III bei 20°C.

Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert. — Für die Säulenchromatographie wurden verwendet: Kieselgel G, Fa. Merck, Darmstadt, Korngröße 0.063–0.200 mm und Polyamid SC 6-AC, Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren, Korngröße 0.16 mm; präparative Schichtchromatographie (präp. SC): Kieselgel G 60, Merck; DC: Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄, Merck. Fließmittelsysteme: A: Benzol/Ameisensäure-ethylester/Ameisensäure (5 : 4 : 2 Vol.); B: Essigester/Chloroform (1 : 1); C: Essigester/Chloroform (1 : 3); D: 2.5% Methanol und 6% Ethanol in Benzol/Chloroform (1 : 1); E: 3% Methanol und 9% Ethanol in Benzol/Chloroform (1 : 1). *H. fasciculare* wurde im Oktober 1973 im Bois du Val d'Azergues, 69-F, gesammelt.

Versuch zur Isolierung der Farb- und Fluoreszenzstoffe: 0.5 kg Fruchtkörper wurden gefriergetrocknet und in einem Mixer unter Essigester zerkleinert. Man wiederholte die Extraktion mehrfach, filtrierte und dampfte die goldgelben Extrakte i. Vak. ein. Ein Teil des Rückstands

¹⁹⁾ *M. Klaar* und *W. Steglich*, Chem. Ber. **110**, 1058 (1977), nachstehend.

²⁰⁾ Vgl. z. B. *K. Freudenberg*, Fortschr. Chem. Org. Naturst. **20**, 41 (1962).

²¹⁾ Zusammenfassung: *W. B. Mors*, *M. Taveira Magalhães* und *O. R. Gottlieb*, Fortschr. Chem. Org. Naturst. **20**, 132 (1962).

²²⁾ *O. R. Gottlieb* und *W. B. Mors*, J. Org. Chem. **24**, 17 (1959).

²³⁾ *K. Gluchoff-Fiasson*, Thèse, Lyon, in Vorbereitung.

²⁴⁾ *J.-L. Fiasson*, Thèse, Lyon, in Vorbereitung.

wurde in möglichst wenig Methanol aufgenommen und durch präp. SC, System A, aufgetrennt. Die vier Hauptbanden wurden noch feucht von den Platten gekratzt und in einem Gemisch von Wasser/Essigester aufgenommen. Man wusch die organische Phase mehrfach mit Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte ein. Mehrfache Wiederholung der präp. SC lieferte die Komponenten in sehr geringen Mengen und noch verunreinigt mit farblosen Begleitstoffen.

Hypoholomin A (HA, 7): UV: λ_{\max} ($E_{\text{rel.}}$) = 375 (1), 288 (0.71), 276 nm (0.69). – MS: m/e = 430 ($M^+ - 44$), 414, 404, 362, 320, 310. – DC (System A): R_F = 0.42, hellgelb, UV lebhaft gelb. – Ausb. \approx 7 mg.

Hypoholomin B (HB, 8): UV: λ_{\max} ($E_{\text{rel.}}$) = 382.5 (1), 275 (0.69), 259 nm (0.72). – DC (System A): R_F = 0.32, goldgelb, UV ockergelb. – Ausb. \approx 3 mg.

Fasciculin A (FA, 14): UV: λ_{\max} ($E_{\text{rel.}}$) = 349 (1), 285 nm (0.81). – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ Aceton): δ = 4.29 (d, J = 6 Hz) [7'-H]; 5.30 (d, J = 2 Hz) [3'-H]; 5.89 (d, J = 6 Hz) [8'-H]; 6.24 (d, J = 2 Hz) [5'-H]; 6.83 (s) [5-H]; 6.84–6.94 (m) [10', 13', 14'-H]; 6.97 und 7.84 ppm (jeweils „d.“, J = 9 Hz) [11-, 13-H bzw. 10-, 14-H]. – DC (System A): R_F = 0.38, farblos, UV blau. – Ausb. \approx 1 mg.

Fasciculin B (FB, 15): UV: λ_{\max} ($E_{\text{rel.}}$) = 357 (1), 286 nm (0.72). – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ Aceton): δ = 4.34 (d, J = 6 Hz) [7'-H]; 5.36 (d, J = 2 Hz) [3'-H]; 5.93 (d, J = 6 Hz) [8'-H]; 6.17 (d, J = 2 Hz) [5'-H]; 6.84 (s) [5-H]; 6.88–6.98 (m) [10', 13', 14'-H]; 6.97 (d, J = 8.5 Hz) [13-H]; 7.42 (dd, J = 8.5 und 2 Hz) [14-H]; 7.45 ppm (d, J = 2 Hz) [10-H]. – DC (System A): R_F = 0.28, farblos, UV blau. – Ausb. \approx 9 mg.

Gewinnung der Permethylderivate 5, 6, 12 und 13: 24 kg tiefgefrorene Fruchtkörper wurden unter Essigester in einem Mixer zerkleinert. Die Extrakte wurden filtriert und nach Trocknen i. Vak. eingedampft. Man nahm den Rückstand in möglichst wenig Methanol auf, verdünnte mit Benzol auf das Fünffache und chromatographierte in fünf Portionen auf einer Polyamid-Säule (60 cm \times 6 cm). Das Chromatogramm wurde mit jeweils 4–5 Liter 15% Methanol in Benzol entwickelt und anschließend mit der gleichen Lösungsmittelmenge die Mischfraktion HA/FA eluiert. Setzt man die Elution mit 35% Methanol in Benzol fort, so wird langsam die Mischfraktion HB/FB von der Säule gewaschen. Beide Mischfraktionen waren noch stark mit farblosen Begleitstoffen verunreinigt. Nach der spektrophotometrischen Gehaltsbestimmung betrug die Ausbeute an Farb- und Fluoreszenzstoffen, bezogen auf die Ausgangslösung, 25%.

Die Mischfraktionen HA/FA bzw. HB/FB wurden eingedampft, in möglichst wenig Methanol aufgenommen und in jeweils fünf Portionen mit überschüssigem gasförmigen Diazomethan behandelt. Nach einigen min wurde eingedampft und der Rückstand durch wiederholte präp. SC (System C) getrennt. Anschließend wurden die Permethylderivate durch Chromatographie an einer Kieselgel-G-Säule (Eluent: 4% Methanol in Benzol) gereinigt. Nach der spektrophotometrischen Bestimmung entspricht ihre Gesamtmenge ca. 25% der vor der Methylierung vorhandenen Verbindungen. Die Permethylether kristallisierten beim Abkühlen ihrer methanolischen Lösungen aus.

Hypoholomin-A-tetramethylether (HA-Me, 5): Ausb. 64 mg, sehr feine, verfilzte, blaßgelbe Nadeln, Schmp. 155–158°C. – DC (System B): R_F = 0.59, sehr blaß gelb, UV grüngelb. – UV: λ_{\max} ($E_{\text{rel.}}$) = 375 (1), 289 (sh, 0.74), 275 nm (0.78). – CD: $[\Theta]_{440} = 0$; $[\Theta]_{365} = +20328$; $[\Theta]_{323} = 0$; $[\Theta]_{290} = -62140$; $[\Theta]_{245} = -34650$; $[\Theta]_{222} = -60950$. – IR: 3450 (m, breit), 2924 (w), 1729 (st), 1638 (m), 1601 (m), 1553 (st), 1511 (m), 1450 (m), 1410 (m), 1353 (w), 1325 (w), 1298 (w), 1251 (st), 1168 (m), 1137 (m), 1115 (w), 1024 (m), 993 (w), 965 (w), 949 (w), 855 (w), 814 (m, breit), 756 cm^{-1} (w). – MS: $M^+ m/e$ = 530.1568 (7%, ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_9$, 530.1577); 486 (100, $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_7$), 471 (2.5), 406 (4), 405 (3, $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{O}_6$), 330 (4), 328 (3).

$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_9 \cdot 1/2 \text{CH}_3\text{OH}$ (546.2) Ber. C 67.01 H 5.17 Gef. C 66.80 H 5.06

Hypholomin-B-pentamethylether (HB-Me, 6): Ausb. 33 mg, feine gelbe Nadeln, Schmp. 140 bis 143°C. — DC (System B): $R_F = 0.52$, gelb, UV gelbgrün. — UV: $\lambda_{\max}(E_{\text{rel}}) = 378(1), 271(0.84), 255 \text{ nm}(0.86)$. — IR: 3400 (m, breit), 2903 (m), 1721 (st), 1643 (m), 1596 (w), 1560 (st), 1512 (st), 1449 (m), 1409 (m), 1323 (w), 1257 (st, breit), 1157 (w), 1138 (st, breit), 1022 (st), 990 (w), 943 (w), 873 (w), 812 (m, breit), 763 cm^{-1} (w, breit). — $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{Aceton}$): $\delta = 4.41$ (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$) [7'-H]; 5.49 (d, $J = 2 \text{ Hz}$) [3'-H]; 5.96 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$) [8'-H]; 6.10 (d, $J = 2 \text{ Hz}$) [5'-H]; 6.40 ppm (s) [5-H]; Multipletts der Aromaten- und Olefinprotonen im Aromatenbereich. — MS: $M^+ m/e = 560.1683$ (9%, ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$ 560.1682), 516 (100, $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{O}_8$), 501 (8), 436 (6), 435 (5, $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_7$), 379 (2), 378 (3), 368 (4), 360 (1), 328 (6).

Fasciculin-A-tetramethylether (FA-Me, 12): Ausb. 50 mg, feine blaßgelbe Körnchen, Schmp. 110–112°C. — DC (System B): $R_F = 0.55$, farblos, UV blau. — UV: $\lambda_{\max}(E_{\text{rel}}) = 342.5(1), 278.5(0.85), 254.5 \text{ nm}(0.74)$. — IR: 3400 (m, breit), 2913 (w), 1722 (st), 1643 (w), 1629 (w), 1605 (w), 1565 (st), 1513 (st), 1450 (m), 1408 (m), 1375 (w), 1300 (w), 1258 (st), 1206 (w), 1178 (m), 1143 (m), 1026 (st), 992 (w), 940 (w), 839 (w), 811 (m, breit), 757 cm^{-1} (w, breit). — MS: $M^+ m/e = 504.1420$ (61%, ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_9$ 504.1420), 489 (4), 488 (2), 474 (2), 460 (100, $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_7$), 445 (20), 430 (3), 429 (6), 417 (5), 406 (6), 405 (6), 399 (3), 389 (3), 380 (61), 379 (37), 351 (9), 335 (6), 328 (29), 323 (9), 322 (8), 300 (9), 295 (7), 279 (22).

Fasciculin-B-pentamethylether (FB-Me, 13): Ausb. 178 mg, feine elfenbeinfarbene Nadeln, Schmp. 140–145°C. — $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3.7^\circ$ ($c = 0.2$ in Methanol). — DC (System B): $R_F = 0.49$, farblos, UV blau. — UV: $\lambda_{\max}(\lg \epsilon) = 344(4.37), 280 \text{ nm}(4.25)$. — CD: $[\Theta]_{400} = 0$; $[\Theta]_{343} = +31150$; $[\Theta]_{312} = 0$; $[\Theta]_{290} = -72070$; $[\Theta]_{269} = 0$; $[\Theta]_{263} = +5610$; $[\Theta]_{256} = +8280$; $[\Theta]_{249} = 0$; $[\Theta]_{232} = -56600$; $[\Theta]_{218} = -121740$. — IR: 3400 (m, breit), 2911 (w), 1723 (st), 1647 (w), 1623 (m), 1569 (st), 1519 (st), 1454 (m), 1411 (m), 1376 (w), 1328 (w), 1302 (w), 1271 (st), 1239 (st), 1205 (w), 1167 (sh), 1140 (st), 1021 (st), 989 (w), 950 (m), 939 (sh), 884 (w, breit), 850 (w, breit), 815 (m, breit), 761 cm^{-1} (w, breit). — $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{Aceton}$): $\delta = 3.81, 3.86, 3.89$ (jeweils s, OCH_3); 3.82 (s, 2OCH_3); 4.42 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$) [7'-H]; 5.49 (d, $J = 2 \text{ Hz}$) [3'-H]; 5.98 (d, $J = 6 \text{ Hz}$) [8'-H]; 6.12 (d, $J = 2 \text{ Hz}$) [5'-H]; 6.93 (s) [5-H]; 6.97 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$) [13-H]; 7.53 (dd, $J = 8.5$ und 2 Hz) [14-H]; 7.51 ppm (s) [10-H]. — MS: $M^+ m/e = 534.1526$ (75%, ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ 534.1505), 519 (3), 518 (4), 504 (4), 490 (100, $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{O}_8$), 475 (11), 460 (4), 459 (5), 447 (3), 436 (5), 435 (5), 429 (2), 419 (2), 410 (100), 409 (54, $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_7$), 381 (7), 365 (3), 353 (9), 352 (6), 330 (3), 328 (36), 325 (4), 309 (4).

$\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{10} \cdot 1/2 \text{CH}_3\text{OH}$ (550.2) Ber. C 64.34 H 5.13 Gef. C 64.30 H 5.02

Versuch zur Spaltung von Hypholomin-A-tetramethylether mit Bortribromid: 0.3 mg **5** in 3 ml Methylenchlorid wurden mit 0.07 ml BBr_3 7 h bei 20°C stehengelassen. Nach Zugabe von Eisstückchen extrahierte man mit Essigester. Die Lösung zeigte im DC (System A) kein **5** mehr, jedoch verschiedene Flecken mit goldgelber oder orangefarbener Fluoreszenz. **7** kann höchstens in Spuren entstanden sein.

Darstellung der Peracetate von 7 und 15: Jeweils 2.5 mg **7** bzw. 1.4 mg **15**, durch DC aus dem Pilzrohextrakt erhalten, wurden in 1 ml Eisessig und 1 ml Acetanhydrid mit einer Spur Perchlorsäure versetzt. Man ließ 30 min bei 40°C stehen, versetzte das Gemisch mit Eisstückchen und extrahierte mit Essigester. Präp. SC (System C) ergab die Peracetate.

Hypholomin-A-tetraacetat: Ausb. 0.5 mg. — DC (System B): $R_F = 0.66$, blaßgelb, UV blaugrün. — UV: $\lambda_{\max}(E_{\text{rel}}) = 380$ (sh, 0.8), 363 (1), 348 (sh, 0.87), 302 (0.6), 293 (0.6), 264 nm (0.7). — MS: $M^+ m/e = 642$ (4%), $M^+ - \text{CO}_2$ 598.1450 (57, ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$ 598.1474), 556 (63), 514 (50), 472 (80), 430 (67, $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{O}_7$), 404 (40), 362 (100).

Fasciculin-B-pentaacetat: Ausb. 0.3 mg. — DC (System B): $R_F = 0.57$, farblos, UV blau. — UV: $\lambda_{\max}(E_{\text{rel}}) = 333(1), 272 \text{ nm}(0.7)$. — MS: $m/e = 630$ ($M^+ - 44$), 588, 546, 504, 462, 420.

Hydrierung von Hypholomin-A-tetramethylether: Zu 20 mg **5** in 10 ml absol. Ethanol gab man eine Spatelspitze 10proz. Palladium/Kohle-Katalysator und rührte unter Wasserstoff 150 min bei 20°C. Die nach Abfiltrieren des Katalysators erhaltene Lösung zeigte im DC praktisch nur zwei fluoreszierende Flecke (System C). Man trennte die schneller laufende Zone von **9** durch präp. SC (System C) ab und reinigte die nur wenig gelaufene Zone (**10**) durch Rechromatographie mit System D.

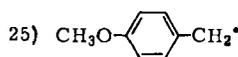
Dihydrohypholomin-A-tetramethylether (9): DC (System B): $R_F = 0.59$, farblos, UV blau. – UV: λ_{\max} ($E_{\text{rel.}}$) = 284 (1), 279 nm (sh, 0.96). – MS: $M^+ m/e = 532.1733$ (3%, ber. für $C_{30}H_{28}O_9$, 532.1732), 488 (11), 411 (2), 408 (2), 367 (15, $M^+ - 44 - A^{25}$), 259 (9), 185 (15), 125 (18), 121 (65, B^{25}), 86 (65), 84 (100).

Tetrahydrohypholomin-A-tetramethylether (10): DC (System B): $R_F = 0.1$, (System D): 0.40, farblos, UV blau. – UV: λ_{\max} ($E_{\text{rel.}}$) = 284 (1), 279 nm (0.96). – MS: $M^+ m/e = 534, 490$ (intensiv!), 476, 462.

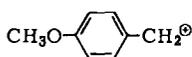
Mono-O-acetyl-tetrahydrohypholomin-A-tetramethylether (11): **10** lieferte nach dem bei 7 beschriebenen Verfahren ein einheitliches Produkt. DC (System B): $R_F = 0.53$, farblos, UV blau. – UV: λ_{\max} ($E_{\text{rel.}}$) = 284 (1), 279 nm (sh, 0.95). – MS: $m/e = 490$ (11%, $M^+ - 44 - C_2H_2O$), 413 (12, $M^+ - C_2H_2O - A^{25}$), 151 (75, C^{25}), 121 (100, B^{25}).

Dihydrofasciculin-B-pentamethylether (16): 50 mg **13** wurden in 25 ml absol. Ethanol suspendiert und, wie bei **5** beschrieben, 8 h bei 20°C hydriert. Das Filtrat zeigte im DC (System E) neben unverändertem **13** drei farblose, blau fluoreszierende Flecken, von denen der mit niedrigstem R_F stark überwog. Präp. SC (System E) lieferte **16** als farbloses Öl. DC (System E): $R_F = 0.35$, farblos, UV blau. – UV: λ_{\max} ($E_{\text{rel.}}$) = 332 (1), 310 (sh, 0.85), 285 (1.1), 252 nm (0.97). – MS: $m/e = 492$ ($M - 44$).

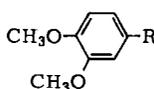
Mono-O-acetyl-dihydrofasciculin-B-pentamethylether (17): Aus **16** wie oben beschrieben. Im DC (System B) zeigte das Rohprodukt sehr geringe Mengen eines Begleiters mit geringfügig kleinerem R_F , der die gleichen UV- und MS-Spektren wie **17** lieferte (Stereoisomeres?). – DC (System B): $R_F = 0.26$, farblos, UV blau. – UV: λ_{\max} ($E_{\text{rel.}}$) = 355.5 (1), 281 (0.79), 263 nm (0.74). – MS: $M^+ m/e = 578.1788$ (1.5%, ber. für $C_{31}H_{30}O_{11}$, 578.1810), 550 (1), 536 (1), 506 (2), 492 (23, $M^+ - CO_2 - C_2H_2O$), 435 (5), 385 (17, $M^+ - C_2H_2O - D^{25}$), 300 (6), 165 (54, E^{25}), 151 (77, C^{25}), 125 (15), 44 (100).



A



B

C: R = CH_2^{\oplus} D: R = CH_2^{\oplus} E: R = CO^{\oplus}

[250/76]