

Fe^{2+} in einer Konzentration von je $1,8 \cdot 10^{-3}$ -m. enthielt. Es wurde das Absorptionsspektrum des Cu^{2+} -Komplexes (Fig. 1, A) und der Mischlösung 60 Min. nach der Fe^{2+} -Zugabe gegen eine entsprechende Protein-Vergleichslösung aufgenommen.

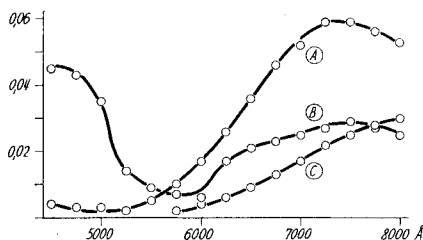


Fig. 1.

Austauschversuch: (A) Protein + Cu^{2+} ,
(B) Protein + Cu^{2+} + Fe^{2+} nach 60 Min.,
(C) Vergleichskurve von Cu^{2+} gleicher
Konzentration.

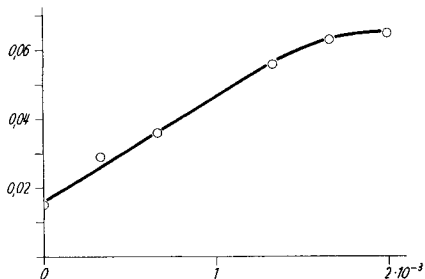


Fig. 2.

Kolorimetrische Titration der 2-proz.
Ovalbumin-Fraktion. Ordinate: Optische
Dichte des Cu^{2+} -Protein-Komplexes bei
7250 Å. Abszisse: Cu^{2+} -Totalkonzentration.

Die spektrophotometrischen Messungen wurden mit einem *Unicam*-Spektrophotometer SP 500 durchgeführt.

Herrn Prof. *H. Erlenmeyer* danken wir für das Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.

SUMMARY.

Exchange reactions on metal protein complexes have been studied. A fraction of ovalbumin has been found, the affinity of which is greater for Fe^{2+} than for Cu^{2+} . The meaning of the relative stabilities of metal protein complexes for enzymatic processes is discussed.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel.

122. Über Muscarin aus Fliegenpilzen.

2. Mitteilung über Muscarin¹⁾

von **C. H. Eugster.**

(28. III. 56.)

Die intensiven und eigentümlichen Wirkungen des Muscarins haben schon einer grossen Zahl von chemischen und pharmakologischen Untersuchungen gerufen, ohne dass es in der nun schon über 100 Jahre dauernden Erforschung dieses Naturstoffes gelungen wäre, das Muscarinrätsel zu lösen. Die folgende knappe Übersicht erwähnt die wichtigsten Arbeiten über Muscarin:

¹⁾ 1. Mitt. *C. H. Eugster & P. G. Waser*, *Experientia* **10**, 298 (1954).

1869. Darstellung von Fliegenpilz-Konzentraten durch *Schmiedeberg & Koppe*²⁾. Nachweis der Alkaloidnatur. Unlöslichkeit in Äther. Grundlegende pharmakologische Untersuchungen. Im Muscarin wurde das erste parasympatho-mimetische Erregungsgift für Kalt- und Warmblüter aufgefunden.

1875. *Harnack*³⁾ weist Cholin („Amanitin“) im Muscarinkonzentrat von *Schmiedeberg & Koppe* nach. Versuch einer Trennung mit Hilfe der Chloroaurate. Gibt Zusammensetzung $C_5H_{14}O_2N^+ \cdot AuCl_4$. Muscarin soll ein „oxydiertes“ Cholin sein. *Harnack's* Präparat enthielt vermutlich gegen 20% Muscarin.

1877. „Einführung eines Sauerstoffatoms“ ins Cholin gelang durch Oxydation mit konzentrierter Salpetersäure⁴⁾. Kristallisiertes Chloroplatinat. „Synthetisches Muscarin“ wies sehr hohe Muscarinwirkung am Froschherz auf. Annahme der Identität mit natürlichem Muscarin. Konstitution, Hydrat des Betainaldehyds: $(CH_3)_3N^+ - CH_2CH(OH)_2$.

1885. *R. Boehm*⁵⁾ zeigt, dass „synthetisches Muscarin“ eine ausgesprochene Curarewirkung besitzt, welche von Atropin nicht aufgehoben werden kann, und dass es folglich mit natürlichem Muscarin nicht identisch ist.

1886. Sibirische Fliegenpilze enthalten auch Muscarin neben einem zentral wirkenden Erregungsgift = Pilzatropin, das für die Berausungen mit Fliegenpilzen verantwortlich sei⁶⁾.

1893. Betainaldehyd hat pharmakologisch nichts zu tun mit Muscarin⁷⁾.

1893—1894. Aus Fliegenpilzen isoliertes Muscarinchloroplatinat soll doch identisch sein mit dem „Synthetischen Muscarin“ von *Schmiedeberg & Harnack*⁸⁾.

1903. Eine Fliegenpilzvergiftung ist mit einer Muscarinvergiftung nicht identisch. Neue pharmakologische Untersuchungen⁹⁾.

1907—1908. Quantitative Muscarinbestimmung mit neuer Technik am isolierten Froschherz¹⁰⁾.

1911. Versuche von *Honda*, Muscarin und Cholin über die sauren Tartrate zu trennen. Eine Anreicherung wurde erzielt¹¹⁾.

1914. *Ewins* beweist, dass „synthetisches Muscarin“ von *Schmiedeberg & Harnack* Cholinnitrit ist¹²⁾.

1922. *H. King* isoliert weitgehend reines, kristallisiertes Muscarinchloroaurat aus Fliegenpilzen¹³⁾. Bestätigt die Stabilität des Muscarins gegenüber verdünntem Alkali.

1924. Die Basen des Fliegenpilzes sollen aus Cholin bestehen. „Ein Stoff von der Zusammensetzung des Muscarins ist nicht aufzufinden“¹⁴⁾.

²⁾ *O. Schmiedeberg & R. Koppe*, Das Muscarin (Leipzig 1869).

³⁾ *E. Harnack*, Arch. exp. Path. Pharm. **4**, 168 (1875).

⁴⁾ *O. Schmiedeberg & E. Harnack*, Arch. exp. Path. Pharm. **6**, 101 (1877).

⁵⁾ *R. Boehm*, Arch. exp. Path. Pharm. **19**, 87 (1885).

⁶⁾ *M. v. Nencki*, Korrespondenzblatt für Schweizer Ärzte **16**, 361 (1886); *O. Schmiedeberg*, Arch. exp. Path. Pharm. **14**, 376 (1881); *R. Koberl*, St. Petersburg med. Wochenschrift **51**, 463 (1891); vgl. *V. A. Reko*, Magische Gifte (Encke, Stuttgart 1949), S. 123.

⁷⁾ *H. Meyer*, Ber. deutsch. Chem. Ges. **26**, 803 (1893); Darst. des Betainaldehyds: *J. Berlinerblau*, Ber. deutsch. Chem. Ges. **17**, 1139 (1884); *E. Fischer*, Ber. deutsch. Chem. Ges. **26**, 464 (1893); **27**, 165 (1894); *R. Voet*, Bull. Soc. chim. France **45**, 1016 (1929).

⁸⁾ *G. Nothnagel*, Ber. deutsch. chem. Ges. **26**, 801 (1893); Arch. Pharm. **232**, 261 (1894).

⁹⁾ *E. Harmsen*, Arch. exp. Path. Pharm. **50**, 361 (1903).

¹⁰⁾ *W. Straub & H. Fühner*, Pflügers Archiv **119**, 127 (1907); Arch. exp. Path. Pharm. **59**, 179 (1908).

¹¹⁾ *J. Honda*, Arch. exp. Path. Pharm. **65**, 454 (1911).

¹²⁾ *A. J. Ewins*, Bioch. J. **8**, 209 (1914).

¹³⁾ *H. King*, J. chem. Soc. **1922**, 1743.

¹⁴⁾ *B. Guth*, Mh. Chem. **45**, 631 (1924).

1931. Grossangelegte Versuche von *Kögl* und Mitarbeitern¹⁵). Isolierung von 370 mg Muscarinreineckat aus 1250 kg Pilzen. Abbauversuche führen zu den Konstitutionsformeln I oder II.

1942 synthetisieren *Kögl & Veldstra*¹⁶) die beiden Basen I und II. Diese waren aber kaum muscarinwirksam. Erklärung durch Stereoisomerie. Erneute Isolierung von Muscarin; Chloroaurat hatte Smp. 115—117°.

1953 vermuten *Bovet* und Mitarbeiter¹⁷), dass im Muscarin eine Trialkyl-alkoxy-Gruppierung vorhanden sein könnte. In Fliegenpilzen kommt Bufotenin vor¹⁸).

Es ist offenbar nur *J. Honda*, *H. King* und *F. Kögl* gelungen, ein weitgehend reines Muscarinpräparat herzustellen. Die Schwierigkeit liegt vor allem darin, dass Fliegenpilze nur sehr wenig und in wechselnder Menge Muscarin enthalten. Es wird von grossen Mengen Cholin und anderen Basen begleitet, deren Abtrennung mit den älteren Isolierungsverfahren schwierig ist. Da für quartäre Basen vor einiger Zeit ein praktisches und wirksames Trennverfahren durch Chromatographie an Cellulosekolonnen ausgearbeitet worden ist¹⁹), war zu erwarten, dass mit einem ähnlichen Verfahren Muscarin reiner und mit besserer Ausbeute als bisher zu isolieren wäre, so dass der Einsatz untragbar grosser Mengen der nicht allzuleicht zu beschaffenden Fliegenpilze vermieden werden könnte. Es gelang tatsächlich auf diesem Wege etwa 70 % des in den Pilzen vorhandenen Muscarins nach einer fast 500 000fachen Anreicherung als kristallisiertes Chlorid zu isolieren.

Die im Spätherbst 1953 in der Nord- und Ostschweiz gesammelten Fliegenpilze wurden in frischem Zustand, meist gleichen Tags, abgeliefert und dann sofort unter Alkohol fein zerhackt. Die gewonnenen wässrig-alkoholischen Extrakte haben wir darauf in einem Dünnschichteneindampfer schonend eingedickt und den noch wasserhaltigen Sirup mittels Alkohol in leicht- und schwerlösliche Teile geschieden. Das Muscarin befand sich im alkohollöslichen Teil²⁰). Nach Eindampfen, Entfetten und Überführen in Wasser wurde mit Reineckesäure gefällt²¹) und die Reineckate in Chloride verwandelt²²).

Bei der papierchromatographischen Untersuchung dieser Rohchloride mit einer grossen Zahl von Lösungsmittelsystemen und Farb-reagentien zeigte sich, dass ein komplexes Gemisch verschiedener Basen vorlag. Mit Ninhydrin wurden etwa 12 Flecke sichtbar, andere liessen sich im UV., mit Joddampf, Dipikrylamin, Bromkresolgrün,

¹⁵) *F. Kögl, H. Duisberg & H. Erxleben*, Liebigs Ann. Chem. **489**, 156 (1931).

¹⁶) *F. Kögl & H. Veldstra*, Liebigs Ann. Chem. **552**, 1 (1942).

¹⁷) *E. F. Rogers, D. Bovet, V. G. Longo & G. B. Marini-Bettolo*, Experientia **9**, 260 (1953).

¹⁸) *Th. Wieland, W. Motzel & H. Merz*, Liebigs Ann. Chem. **581**, 10 (1953).

¹⁹) *H. Schmid, J. Kebrle & P. Karrer*, Helv. **35**, 1864 (1952).

²⁰) Von dieser Stufe an wurden die Anreicherungsschritte mit Testen an isolierten Froschherzen kontrolliert.

²¹) *F. Kögl et al.*, Liebigs Ann. Chem. **489**, 156 (1931).

²²) *J. Kapfhammer & C. Bischoff*, Z. physiol. Chem. **191**, 182 (1930).

Dragendorff'schem Reagens, Grote-Reagens usw. nachweisen. Muscarin liess sich vorerst nur mit Hilfe des Froschtestes in den Papierchromatogrammen lokalisieren. Die Zuordnung der biologischen Aktivität zu einem chemischen Farbflecken gelang erst nach ausgedehnten Testen und stärkerer Anreicherung des Muscarins. Entdeckt wurde dieses erstmals in essigsäurehaltigen Systemen mit Bromkresolgrün, in denen es als Acetat wandert und somit als Salz einer starken Base mit einer schwachen Säure einen Farbumschlag nach Blau bewirkt. Die Reaktion ist zwar wenig empfindlich, aber auf Muscarin spezifischer als andere Farbreaktionen. Zum chemischen Nachweis benutzten wir später auch Jod, *Dragendorff'sches Reagens* und Dipikrylamin (siehe exp. Teil). Keines dieser Reagentien erreicht jedoch auch nur annähernd die Empfindlichkeit des Froschtestes. Fig. 1 und 2 illustrieren die Zuweisung der froschwirksamen Substanz zu einem Flecken bestimmter Lage im Papierchromatogramm. Es ergab sich aus diesen und weiteren Versuchen, dass eine wesentliche Muscarinwirkung nur von einem einzigen Stoff hervorgerufen wird. Von den Begleitbasen isolierten wir bisher nur Cholin und Adenosin (V) in reiner Form. Das Studium anderer interessanter Stoffe wurde vorläufig zurückgestellt.

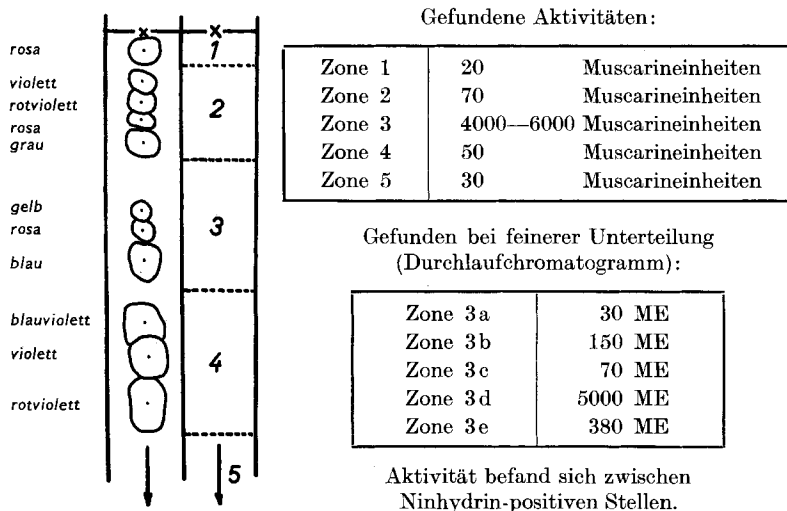


Fig. 1.

Papierchromatogramm mit 25 γ Rohchloriden
(*Whatman*-Papier Nr. 1, Lösungsmittel 8).
Links Kontrollstreifen mit Ninhydrinfärbung.

Die Isolierung des Muscarins aus den Rohchloriden führten wir darauf an grossen Cellulosekolonnen mit den Lösungsmittelgemischen 7 und 15 (siehe exp. Teil) aus. Damit konnte Muscarin völlig cholinfrei und soweit rein gewonnen werden, dass es sich als kristallisiertes

Goldsalz abscheiden liess. Muscarin bildet nur mit ganz wenigen Alkaloidfällungsmitteln in Wasser schwerlösliche Salze. Die Umwandlung des Tetrachloroaurates ins Chlorid mittels Silberpulver nach *Dudley*²³⁾ oder mittels Anionenaustauschern der verschiedensten Art

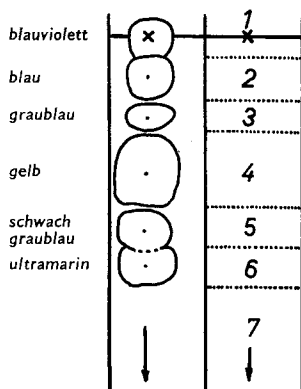


Fig. 2.

Papierchromatogramm von je 25 γ Rohchloriden
(Lösungsmittel 16, Bromkresolgrünfärbung).

Gefundene Aktivitäten:

Zone 1	Rf 0	40 ME
Zone 2	Rf 0,06	40 ME
Zone 3	Rf 0,11	40 ME
Zone 4	Rf 0,19	40 ME
Zone 5	Rf 0,26	1000 ME
Zone 6	Rf 0,31	5200 ME
Zone 7	Rf —	250 ME

war stets mit beträchtlichen Aktivitätsverlusten verbunden. Am besten eignete sich die Behandlung mit Schwefelwasserstoff. Besondere Versuche (siehe exp. Teil) beweisen, dass dabei keine Veränderung in der Molekel eintritt. Das so erhaltene, ölige Muscarinchlorid liess sich nach Trocknen im HV. erstmals kristallisieren (siehe Fig. 3).



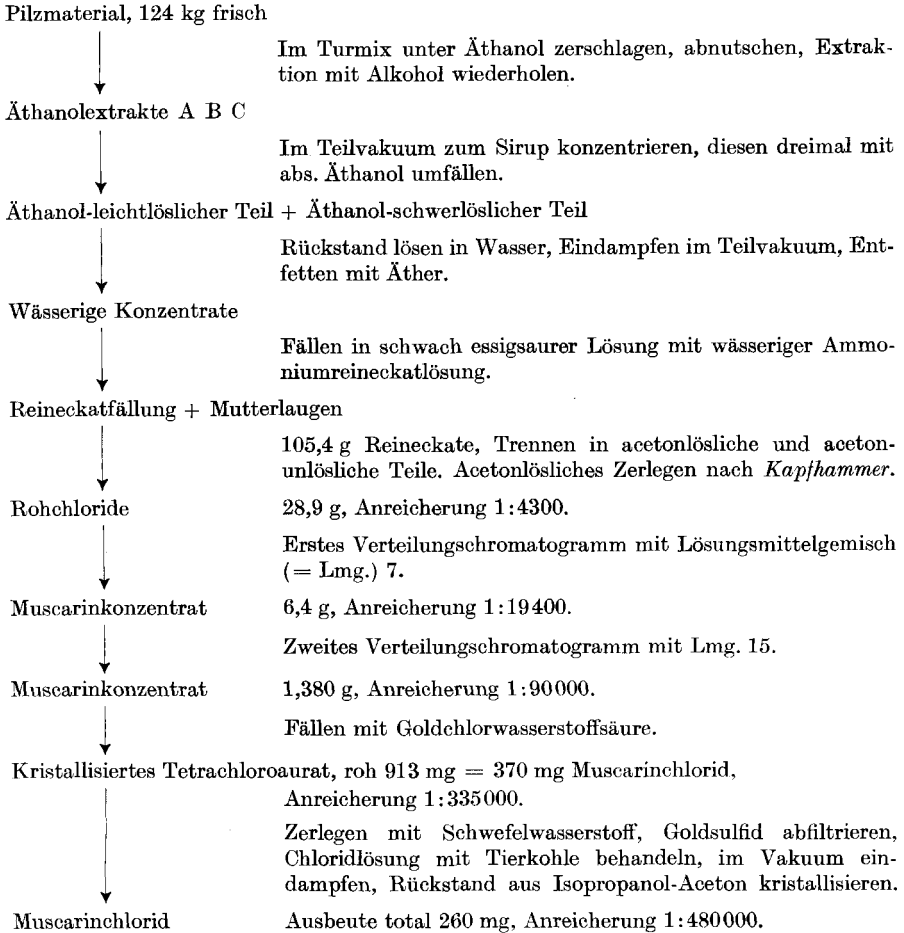
Fig. 3.

Muscarinchlorid, erste Kristallisation.

²³⁾ Biochem. J. **23**, 1071 (1929).

Eine Übersicht über den Aufarbeitungsgang gibt das folgende Schema:

Schema der Aufarbeitung.



Von den verschiedenen Bearbeitern sind durch biologische Versuche die folgenden Muscarinmengen in Fliegenpilzen festgestellt worden:

<i>Harmsen</i> ⁹⁾	0,013 %	}	bezogen auf das Pilz-Frischgewicht
<i>King</i> ¹³⁾	0,0016%		
<i>Kögl, Duisberg & Erxleben</i> ¹⁵⁾	0,0003%		
<i>Kögl & Veldstra</i> ¹⁶⁾	0,0003%		
Diese Arbeit	0,0003%		

Tatsächlich isoliert wurden von den früheren Bearbeitern jedoch nur Bruchteile dieser Mengen. Die Angabe von *Harmsen* ist sicher falsch, da sie auf der Stillstandsdosis am Froschherz von *Schmiede-*

berg beruht, während der Befund von *King* durch einen wohl möglichen schwankenden Gehalt an Muscarin, je nach Klima, Vegetationszeit, Alter und Art der Fliegenpilze, erklärt werden kann. Fliegenpilze enthalten also sehr wenig Muscarin. Nach Literaturangaben soll sich Muscarin auch in anderen Pilzen in zum Teil wesentlich grösseren Mengen finden:

Amanita pantherina (<i>DC. ex Fr.</i>) ²⁴⁾	Es wurden muscarinartig wirkende Stoffe in sehr geringer Menge durch pharmakologische Prüfung an Katzen und Froschherzen nachgewiesen.
Boletus luridus (<i>Schaeff ex Fr.</i>) ²⁴⁾	
Russula emetica (<i>Schaeff ex Fr.</i>) und andere Russulaarten ²⁵⁾ ²⁶⁾	sollen muscarinhaltig sein. Der Nachweis erfolgte durch biologische Versuche.
Inocybe-Arten ²⁷⁾	Von 33 geprüften Arten enthielten 20—26 Arten Stoffe mit sehr intensiver Muscarinwirkung. Alle Teste wurden am isolierten Froschherz durchgeführt. Besonders viel Muscarin wurde in folgenden Arten gefunden:
I. Patouillardi (<i>Bres.</i>) (s. I. lateraria <i>Ricken</i>)	0,6—0,8% ²⁷⁾ 0,36% ²⁸⁾ 0,4% ²⁹⁾
I. napipes (<i>Lange</i>)	0,3—1,6% ²⁷⁾
I. fastigiata (<i>Fr. ex Sch.</i>)	0,5—0,6% ²⁷⁾
I. hirtella (<i>Bres.</i>)	0,2—0,3% ²⁷⁾
	Alle diese Zahlen sind aber viel zu hoch, da der zur Berechnung verwendete Muscarinstandard falsch ist.
I. asterospora	wurden auf künstlichen Nährböden gezüchtet und als muscarinhaltig befunden ^{29a)} ; Nachweis?
I. rimosa	
I. Cookei	
I. umbrina	
Clitocybe rivulosa (<i>Pers. ex Fr.</i>) <i>Quél.</i> und andere Clitocybe-Arten ²⁹⁾	0,5—0,6% ^{29b)}

Da in allen Fällen nur mit angereicherten Extrakten gearbeitet wurde, bedürfen alle diese Angaben der chemischen Überprüfung. Es ist aber anzunehmen, dass aus einigen der genannten Pilze tatsächlich

²⁴⁾ *R. Boehm*, Arch. exp. Path. Pharm. **19**, 60 (1885).

²⁵⁾ *R. Kobert*, St. Petersburger med. Wochenschr. **51**, 463 (1891), zit. nach *E. Harm- sen*, Arch. exp. Path. Pharm. **50**, 361 (1903).

²⁶⁾ *W. S. Carter*, Amer. J. Physiol. **5**, 158 (1901).

²⁷⁾ *B. Wicki*, Bull. Soc. mycol. Genève **11**, 14 (1928); *Claudine Loup*, Thèse 114, Genève 1938.

²⁸⁾ *C. Fahrig*, Arch. exp. Path. Pharm. **88**, 227 (1920).

²⁹⁾ *W. Mecke*, Arch. exp. Path. Pharm. **175**, 23 (1934).

^{29a)} *Yasunari Ishida & Yoshiharu Kozu*, J. appl. Mycol. **3**, 118 (1949), zit. nach Chem. Abstr. **44**, 9522 (1950); *W. W. Ford & J. L. Sherrick*, J. Pharm. exp. Therap. **2**, 549 (1911); **4**, 321 (1913).

^{29b)} *B. Wicki & F. Loup*, Trav. Lab. Thé. exp. Genève **13**, 9, 12, 13 (1930—32); *B. Wicki*, Schweiz. Z. Pilzk. **8**, 42 (1930); **9**, 78 (1931); *B. Wicki & M. Roch*, Rev. méd. Suisse rom. **55**, 896 (1935).

Muscarin isoliert werden kann, denn es sind von mehreren dieser Pilze Vergiftungsfälle bekanntgeworden, deren Ablauf auf eine reine Muscarin-Intoxikation schliessen lässt³⁰⁾³¹⁾.

Muscarin: Salze, Eigenschaften.

Das Reineckat (erstmal von *Kögl* et al.¹⁵⁾ hergestellt) ist das in Wasser am schwersten lösliche Salz. Es kristallisiert aus Wasser-Aceton in langen, dünnen, roten Prismen (siehe Fig. 4). Smp. 181–182°.

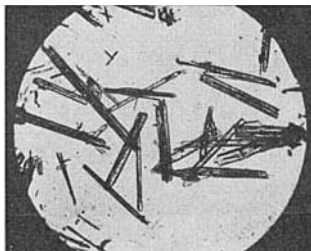


Fig. 4.

Muscarinreineckat. Maßstab 32:1.

Das Chloroaurat (Smp. 122–123°) ist in Wasser und Alkohol ziemlich gut löslich. Wir erhielten es in feinen gelben Blättchen (siehe Fig. 6) oder in kurzen dicken Prismen (siehe Fig. 5).

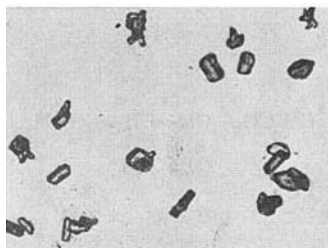


Fig. 5.

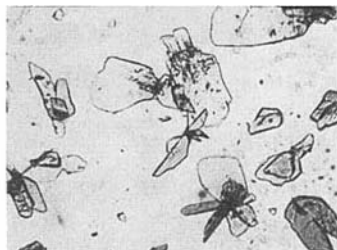


Fig. 6.

Muscarintetrachloroaurat.

Das farblose Chlorid mit Smp. 181–182° (siehe Fig. 7) ist äusserst hygroskopisch. Seine Lösung ist geschmacklos und reagiert neutral. Über seine biologische Aktivität wurde bereits berichtet³²⁾. Es löst sich in Methanol und Äthanol spielend. Isopropanol löst etwas weniger, trockenes Aceton fast gar nicht. Verdünnte Lösungen büssen ihre

³⁰⁾ Z. B. durch *Inocybe Patouillardii*: *W. Mecke*, Arch. exp. Path. Pharm. **175**, 23 (1934).

³¹⁾ Zusammenfassung: *F. Thellung*, Schweiz. Z. Pilzk. **24**, 77, 93 (1946).

³²⁾ *C. H. Eugster & P. G. Waser*, Experientia **10**, 298 (1954); *P. G. Waser*, Experientia **11**, 462 (1955).

Muscarin wurde unter milden Bedingungen mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Im Papierchromatogramm (siehe Fig. 8) lässt sich neben sehr wenig Muscarin eine neue Base mit grösserem Rf-Wert nachweisen, welche durch Verseifung wieder in Muscarin zurückverwandelt werden kann. Auch die IR.-Spektren der Muscarinsalze und Abbauprodukte zeigen klar die Anwesenheit einer OH-Gruppe in der Molekel.

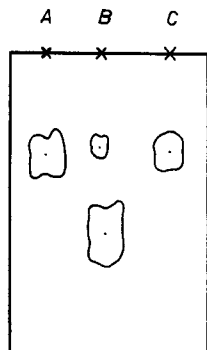


Fig. 8.

Papierchromatographischer Nachweis der Hydroxylgruppe im Muscarin:

A 25 γ Muscarin Rf 0,36

B 25 γ O-Acetylmuscarin Rf 0,50

C 25 γ verseiftes O-Acetylmuscarin

Lösungsmittelgemisch 14, Entwickler Jod

Das zweite Sauerstoffatom in der Molekel glaubten *Kögl* et al. in einer Aldehydgruppe festgestellt zu haben, da ihre Muscarinchloridlösungen (aus Reineckat hergestellt) mit Fuchsin-schwefliger Säure und mit Benzolsulfohydroxamsäure die für Aldehyde typischen Farbreaktionen zeigten. Unser krist. Muscarinchlorid zeigte auch unter mehrfach abgeänderten Bedingungen keine Aldehydreaktionen nach *Schiff* und nach *Angeli-Rimini*. Es reduzierte weder alkalische Silberdiamminlösung noch Triphenyltetrazoliumchlorid in Hydrogencarbonat. 2,4-Dinitrophenylhydrazin war ohne jede Einwirkung auf Muscarinchlorid oder Normuscarin.

Reduktionsversuche mit Pt/H₂ in Alkohol misslangen, es wurde kein Wasserstoff aufgenommen. Mit Borhydrid in Methanol reagierte Muscarintetrachloroaurat rasch unter Abscheidung von Metall; in der Reaktionslösung liess sich aber unveränderte Muscarinbase nachweisen (Papierchromatogramm, krist. Reineckat, krist. Chloroaurat).

Da diesem Versuch entgegengehalten werden kann, dass Schwermetalle die Selbstzersetzung der Borhydride katalytisch beschleunigen, wurde der Versuch mit Muscarinchlorid wiederholt. Das Resultat blieb dasselbe.

Schliesslich konnten weder im UV. noch im IR. die charakteristischen Absorptionsbanden einer Carbonylgruppe aufgefunden werden.

Im Muscarin kommt somit keine Aldehydgruppe vor. Da gewisse Acetale mit einer quaternären Ammoniumgruppierung in der Molekel eine sehr starke Muscarinwirkung aufweisen³³), muss auch beim Muscarin eine acetalartige Gruppe in Erwägung gezogen werden. Normale Acetale werden durch einige der genannten Versuche jedoch ausgeschlossen. Immerhin sind auch sehr säurestabile Acetale bekannt; so konnte die Verbindung III nicht hydrolysiert werden³⁴). Sie war allerdings im Froschtest überhaupt nicht muscarinwirksam.

Das Kohlenstoffgerüst des Muscarins wurde von *Kögl* et al. aus dem Ergebnis eines *Hofmann*'schen Abbaus abgeleitet, welcher bei einem Einsatz von 23 mg Muscarinbase (aus Reineckat) als Reaktionsprodukte Trimethylamin (gefasst als Chloraurat, Ausbeute 38,5%) und eine Säure (reines Produkt 1 mg) ergeben hatte. Die Säure wurde als kristallisierter p-Phenyl-phenacylester analysiert, und nach einem Vergleich mit synthetischen Substanzen (es sind 22 Isomere möglich) wurde ihr die Struktur einer α, β -Dihydroxyvaleriansäure (IV) zugewiesen.

Diese Ergebnisse wurden von *Kögl* folgendermassen interpretiert: Die Carboxylgruppe entsteht aus der Aldehydgruppe durch Oxydation, und gleichzeitig wird Trimethylamin abgespalten. – Der Eintritt der Hydroxygruppe ist durch die Hydrolyse eines intermediär entstehenden Epoxydes erklärbar³⁵).

Wir haben den erwähnten *Hofmann*'schen Abbau wiederholt (Schütteln in der Kälte mit Silberoxyd) und ihn mehrfach variiert (siehe exp. Teil).

In keinem Fall konnten wir Trimethylamin oder eine Säure von der Art einer Dihydroxyvaleriansäure auffinden. Es sei allerdings erwähnt, dass Cholin unter analogen Bedingungen auch nur Spuren von Trimethylamin lieferte. Muscarinhydroxyd allein oder in Gegenwart von Silberoxyd blieb auch bei stundenlangem Kochen weitgehend unverändert und wurde vom Silberoxyd nur langsam abgebaut, wobei Spuren von flüchtigen Basen entstanden, deren Natur noch nicht bekannt ist. Diese Versuche schliessen zugleich Strukturen vom Typus der Trialkylalkoxyammoniumbasen¹⁷) aus, welche unter den genannten Bedingungen leicht in t-Amine und in Aldehyde zerfallen³⁶).

³³) *E. Fourneau, D. Bovet, F. Bovet & G. Montézin*, Bull. Soc. Chim. biol. France **26**, 516 (1944).

³⁴) Diese Substanz wurde von *P. Karrer & J. Kébrle* in anderem Zusammenhang hergestellt.

³⁵) Siehe die Arbeiten von *E. Späth* und Mitarbeitern, Ber. deutsch. chem. Ges. **66**, 591 (1933); **74**, 599 (1941); s. a. *C. E. Wilson & H. J. Lucas*, J. Amer. chem. Soc. **58**, 2396 (1936).

³⁶) *J. Meisenheimer*, Liebigs Ann. Chem. **397**, 273 (1913).

Bei der Chromsäureoxydation konnte unter den flüchtigen Säuren nur Essigsäure entdeckt werden³⁷⁾, während Propionsäure, welche papierchromatographisch leicht zu identifizieren ist und aus einer Substanz der Formel I oder II hätte entstehen müssen, auch nicht in Spuren nachgewiesen werden konnte.

Der Autor dankt dem *Schweizerischen Nationalfonds* für einen Beitrag an die Kosten dieser Untersuchung und PD. Dr. P. G. Waser für die pharmakologischen Teste.

Experimenteller Teil.

Vorbemerkung: Die verwendeten Lösungsmittel wurden (mit Ausnahme des Äthanols) jeweils vor Gebrauch destilliert: Methanol über Weinsäure, Äther über $\text{SnCl}_2 + \text{KOH}$; das Wasser wurde in Glas destilliert. — Die Smp. sind nicht korrigiert.

1. Extraktion und Konzentration. Die im folgenden beschriebene Aufarbeitung bezieht sich auf die Portion I von 13,3 kg.

Sofort nach Eingang wurden die Fliegenpilze unter 95-proz. Äthanol mit einer hochoptimierten Hackmaschine innerhalb kürzester Zeit zu einem dünnen Brei zerschlagen. Nach Stehenlassen während einiger Std. nutschte und presste man ab (\rightarrow 26 l Alkohol-extrakt I-A). Der Filtrückstand wurde ein zweites und drittes Mal mit 95-proz. Alkohol extrahiert (\rightarrow Alkoholextrakte I-B und I-C). Die durch das *Muscarufin*, den roten Farbstoff der Hüte, prachtvoll rot gefärbten Extrakte (im Durchlicht mehr bräunlich/grün) veränderten sich, wohl infolge von Oxydationsprozessen, ziemlich rasch und wurden bräunlich. Wir konzentrierten die Lösungen mit einem Dünnschichten-Eindampfer³⁸⁾ im Teilvakuum so, dass die Temperatur der abfließenden Flüssigkeit 22—24° nicht überschritt. Das stark trübe Konzentrat schäumte stark. pH der Lösung 6,1—6,2; total 5,5 l. Hierauf konzentrierte man bei 12 mm unter Stickstoff (Badtemperatur nicht über 40°) unter Zusatz von Laurylalkohol als Antischaummittel, zu einem eben noch giessbaren Sirup. Diesen liessen wir in einem dünnen Strahl unter sehr starkem Rühren mit einem Vibromischer in 2 l abs. Äthanol einfließen. An den Wänden setzte sich sofort ein bräunlicher Niederschlag ab. Nach Absitzenlassen wurde die klare, gelbe, fluoreszierende Alkohollösung abdekantiert und im Wasserstrahlvakuum unter Stickstoff zum Sirup eingedampft (Konzentrat I-1). Die genannte Alkoholfällung wurde in 200 ml Wasser gelöst und wieder in gleicher Art in 2 l abs. Alkohol gefällt, woraus man das Konzentrat I-2 erhielt und nach erneuter gleicher Fällung das Konzentrat I-3.

Die Konzentrate wurden mit wenig Wasser verrührt und einzeln in Scheidetrichtern mit viel Äther oder Äther-Benzol-Gemischen mehrmals vorsichtig ausgeschüttelt. Es traten sehr leicht schwer trennbare Emulsionen auf. Die Ätherextrakte³⁹⁾ wurden jeweils mit wenig Wasser gewaschen und die wässrigen Teile vereinigt. So erhielt man fast klare, gelbliche Lösungen. Die Abtrennung der Fettstoffe gelang auch durch Zentrifugieren, jedoch emulgierte die abgetrennte Fettschicht wieder sehr leicht.

Nach Entfernen des gelösten Äthers durch Absaugen erhielten wir das „vorgereinigte wässrige Konzentrat“, dem aliquote Teile zur pharmakologischen Austestung entnommen wurden. Es ergab sich, dass die Hauptmenge des Muscarins durch die erste Alkoholextraktion gewonnen wurde, dass aber auch noch in den 2. und 3. Auszügen beträchtliche Mengen „Muscarin“ enthalten waren (siehe Tabelle). Der nach den Fällungen zurückbleibende alkoholunlösliche (aber wasserleichtlösliche) Teil enthielt nur noch Spuren von Muscarin. Um auch diese noch zu gewinnen, wurden die sämtlichen vereinigten äthanolunlöslichen Teile in der genannten Weise dreimal in 3 l abs. Methanol eingerührt und die so erhaltenen methanolunlöslichen Teile nach dem Eindampfen und Lösen in wenig Wasser nochmals in 3 l Äthanol eingerührt. Nach dem Eindampfen der

³⁷⁾ Nach der Technik von C. F. Garbers, H. Schmid & P. Karrer, Helv. 37, 1336 (1954), modifiziert von J. H. Lister, C. H. Eugster & P. Karrer, Helv. 38, 221 (1955).

³⁸⁾ Labortyp der *Luwa AG.*, Zürich.

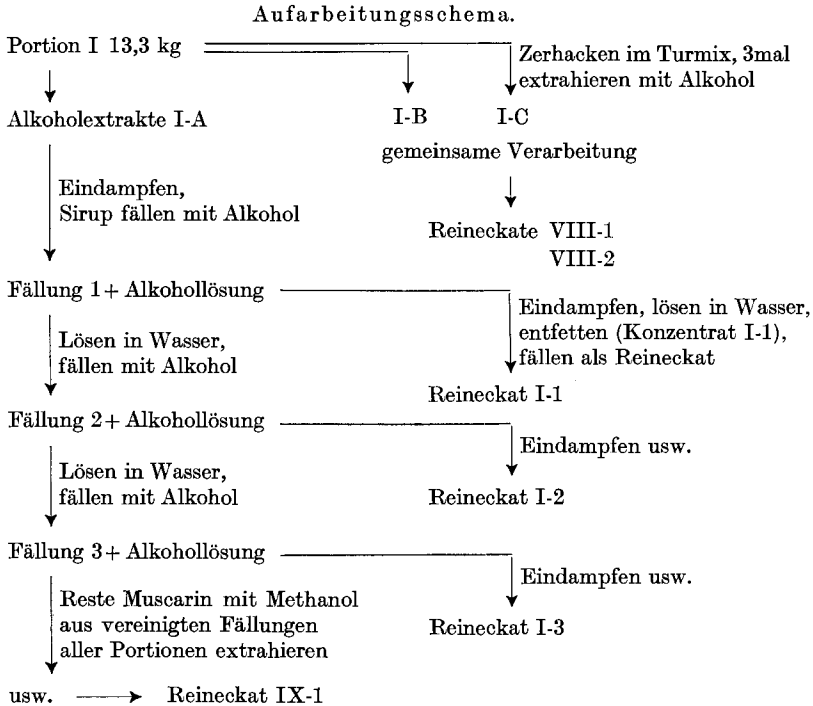
³⁹⁾ Diese Ätherextrakte enthielten nur äusserst geringe Mengen an basischen Stoffen.

Alkohollösung und Aufnahmen des Rückstandes in Wasser erhielten wir nochmals etwas Muscarin (Lösung IX-1).

Die „wässrigen Konzentrate“ wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder in gefrorenem Zustand aufbewahrt.

In gleicher Weise wurden insgesamt 124 kg Pilze in 7 Portionen aufgearbeitet (II-1, -2, -3, bis VII-1, -2, -3).

Die Alkoholextrakte B und C wurden alle zusammen in einem Ansatz verarbeitet (VIII-1, -2).



2. Reineckatfällung. 50 g reines Ammoniumreineckat wurden in 1 l Wasser und 9 ml Eisessig längere Zeit mit einem Vibromischer verrührt. Die filtrierte Lösung wurde hierauf portionsweise zu den wässrigen Konzentraten gegeben, bis die überstehenden Lösungen deutlich rot waren und bis ein weiterer Zusatz keine Fällung mehr erzeugte. (Der Verbrauch betrug z. B. bei I-1 240 ml.) Darauf setzte man noch 50 ml der Reineckelösung zu und bewahrte etwa 2 Std. bei 0° auf. Es wurde darauf geachtet, dass die Fällungen mit möglichst wenig verdünnten Lösungen vorgenommen wurden. Meist waren die Niederschläge gut filtrierbar. Nach dem Abnutschen wurde mit wenig Eiswasser ausgewaschen und dann im Vakuum über NaOH getrocknet. Ausbeuten siehe Tabelle. Zur Kontrolle wurden einige Reineckatniederschläge nach *Kapfhammer & Bischoff*⁴⁰⁾ mit eingestellten Silbersulfat- und Bariumchloridlösungen zerlegt, wobei peinlich darauf geachtet wurde, dass die Testlösungen keine Spur von Ba²⁺ enthielten⁴¹⁾. Es ergab sich, dass durch die Fällung der grösste Teil des Muscarins abgeschieden wurde. Beispiel:

⁴⁰⁾ *J. Kapfhammer & C. Bischoff*, Z. physiol. Chem. **191**, 182 (1930); s. a. *P. Karrer & H. Schmid*, Helv. **29**, 1862 (1946).

⁴¹⁾ Zugabe von etwas überschüssiger Na₂SO₄-Lösung, Eindampfen im Vakuum. Lösen des Rückstandes in Alkohol, filtrieren. Eindampfen im Vakuum. Lösen des Rückstandes in einer gemessenen Menge Wasser.

Pharmakologisch am Froschherz bestimmte Muscarinmengen.

Fraktion	Muscarin vor der Fällung	Muscarin im Reineckat	Muscarin in den Mutterlaugen
I-1	22,8 mg	24,8 mg	0,6 mg
I-2	4,4 mg		0,9 mg
I-3	2,8 mg		1,0 mg

Die Versuche waren natürlich in diesem Stadium der Reinheit nicht genau. In den Fraktionen 2 und 3 konnten hie und da Wirkungen beobachtet werden, welche von Atropin nicht aufgehoben werden konnten. Diese toxischen Stoffe schienen besonders in den späteren Alkoholfraktionen vorzukommen und machten sich bei den Testen durch Herzschädigungen und Tachyphyllaxie bemerkbar. Es könnte sich wohl um Toxine handeln (siehe *Harmsen*⁴²⁾).

Ausbeuten an Reineckaten und pharmakologisch bestimmte Muscarinmengen⁴³⁾.

Fraktion	Muscarinbase im wässrigen Konzentrat, mg	Ausbeute an getrocknetem Reineckat, g
I-1	22	10,30
I-2	4	1,50
I-3	3	0,75
II-1	25	4,25
II-2	43 ?	4,75
II-3	9 ?	1,65
III-1	22	4,10
III-2	8	3,20
III-3	8	2,75
IV-1	30	4,30
IV-2	4	1,70
IV-3	2	0,90
V-1	33	6,65
V-2	13	?
V-3	4	?
VI-1	54	10,15
VI-2	13	3,90
VI-3	2	1,30
VII-1	42	8,65
VII-2	13	3,50
VII-3	5	2,25
VIII-1	29	7,10
VIII-2	7	6,50
IX-1	2	1,50
Rest-Reineckate	—	13,75 (darin V-2 und V-3)
Total	397 mg	105,40 g

⁴²⁾ *E. Harmsen*, Arch. exp. Path. Pharm. 50, 361 (1903).

Die Mutterlaugen der Reineckatfällungen schieden beim Stehen im Eisschrank noch etwas schwerlösliches Salz aus, welches abgenutscht wurde (Rest-Reineckate).

3. Papierchromatographie. Gut bewährte *Lösungsmittelgemische* sind die folgenden:

Lmg. 7: n-Butanol 160 — Pyridin 32 — Wasser 50

Lmg. 8: n-Butanol 160 — Pyridin 60 — Wasser 80

Lmg. 14: sek.-Butanol 150 — Äthanol abs. 50 — Eisessig 10 — Wasser 50

Lmg. 15: n-Butanol äquiliert mit 50 ml NH_3 (1 Teil konz. NH_3 + 9 Teile Wasser)

Lmg. 16: sek.-Butanol 150 — Äthanol 95-proz. 50 — NH_3 verd. 50 (1 Teil konz. NH_3 + 9 Teile Wasser)

Farbreagentien: Jod⁴⁴), 0,25-proz. in Alkohol. — Dipikrylamin, 0,2-proz. in 50-proz. Aceton⁴⁵). — Bromkresolgrün, 0,2-proz. in Alkohol, mit 2-n. NaOH eben auf Grün eingestellt. — *Dragendorff'sches Reagens*⁴⁶).

Papier: Whatman Nr. 1.

Reines Muscarin kann mit Jod bis ca. 6 γ sichtbar gemacht werden. Günstig sind 10—15 γ . Die braunen Flecken verblassen bald, können aber nach erneutem Besprühen wieder sichtbar gemacht werden. Die Flecken sind mit dem Lmg. 16 stabiler als mit Lmg. 14.

Dragendorff'sches Reagens gibt mit Muscarin einen erst nach dem Verdunsten des Essigesters erscheinenden rötlichen Flecken. 6 γ können noch bequem nachgewiesen werden. Die Flecken sind sehr stabil.

Bromkresolgrün spricht noch bei ca. 9 γ Muscarin deutlich an (Lmg. 16). Günstig ist eine Menge von 15—20 γ . Dieses Reagens bewährte sich wegen seiner höheren Spezifität besonders bei der Untersuchung der noch sehr unreinen Muscarinkonzentrate. Verschiedene andere Indikatoren von ähnlichem Umschlagsgebiet waren entweder weniger empfindlich oder überhaupt nicht geeignet.

Muscarin reagiert nicht mit Ninhydrin, noch fluoresziert es im UV.-Licht verschiedener Wellenlänge.

Für reines Muscarinchlorid fanden wir folgende Rf-Werte (aufsteigende Technik):

Lmg. 14	0,37—0,40 (Basenfleck)	0,20	(Säurefleck)
Lmg. 16	0,26—0,29 (Base)	0,16—0,18	(Säure)
Lmg. 15	0,13—0,14 (Base)	0,07—0,08	(Säure)

Die Rf-Werte variieren immer etwas mit der Temperatur, Laufzeit, Alter des Lösungsmittels und aufgetragener Menge.

4. Präparative Auftrennung. Die vereinigten Reineckate R-1 (47,80 g) wurden mit reinem Aceton unter Erwärmen und Rühren so oft extrahiert, bis die Extrakte nicht mehr rot gefärbt waren. Der acetonunlösliche, braungraue Rückstand wog 14,7 g. Die Acetonlösung (1 l) wurde darauf in einem Vierhalskolben mit *Hershberg*-Rührer, Rückflusskühler und zwei Tropftrichtern auf 30—35° erwärmt. Dazu tropften wir eine heisse Lösung von 12,5 g Silbersulfat in 1 l Wasser rasch unter starkem Rühren zu. Eine abfiltrierte Probe war dann fast farblos. Hierauf tropfte man 40,1 ml 1-m. BaCl_2 -Lösung wieder unter heftigem Rühren zu. Temperatur der Lösung 40—45°. Nach dem Abnutschen und Nachwaschen mit wässrigem Aceton wurde das klare, blassgelbe Filtrat im Vakuum unter N_2 zur Trockene eingedampft. Den Rückstand digerierte man dreimal mit abs. Äthanol in der Wärme und filtrierte vom Unlöslichen ab. Nach Eindampfen und Trocknen im Hochvakuum wog die zähe, bräunliche Masse 12,9 g („Rohchloride“).

1 kg Cellulosepulver (*Whatman*, Standard Grade) wurde trocken in ein Glasrohr mit Hahn eingestampft (Papiersäule 5×125 cm) und darauf einige Tage mit Lmg. 7 vorge-

⁴³) Berechnet nach dem *Kögl'schen* Standard: 1 g Muscarinbase = $184 \cdot 10^6$ ME.

⁴⁴) *G. Brante*, *Nature* **163**, 651 (1949).

⁴⁵) *K.-B. Augustinsson & M. Grahn*, *Acta chem. scand.* **7**, 906 (1953).

⁴⁶) Nach *H. Thies & F. W. Reuther*, *Naturwissenschaften* **1954**, 230.

waschen. Dann reicherte man, um ein Ausfallen der Substanz zu vermeiden, stufenweise mit methanolhaltigem Lmg. 7 an⁴⁷⁾:

5 ml Methanol-Lmg. 7	1:20
5 ml Methanol-Lmg. 7	2:20
5 ml Methanol-Lmg. 7	3:20
5 ml Methanol-Lmg. 7	4:20
5 ml Methanol-Lmg. 7	5:20

Vor der Zugabe der neuen Mischung wurde jeweils das Einsickern der vorhergehenden abgewartet. Hierauf lösten wir 11,9 g Rohchloride in 50 ml Methanol und verdünnten mit 200 ml Lmg. 7. Die Lösung wurde auf die Cellulosesäule gebracht und nach dem Einsickern wieder stufenweise der Methanolgehalt vermindert:

4 ml Methanol-Lmg. 7	4:20
3 ml Methanol-Lmg. 7	3:20
2 ml Methanol-Lmg. 7	2:20

Dann füllte man mit reinem Lmg. 7 auf.

Bei konstantem Lösungsmittelniveau und möglichst gleichbleibender Tropfgeschwindigkeit fingen wir mit Hilfe eines automatischen Sammlers Fraktionen zu 1000 Tropfen auf (~ 36 ml). Das Chromatogramm lief 10 Tage ununterbrochen. Mit einer UV.-Lampe konnten mehrere fluoreszierende Zonen beobachtet werden. Eine breite, sehr intensiv grünlich-gelb fluoreszierende konnte als Leitsubstanz dienen, da erfahrungsgemäss das (nicht fluoreszierende) Muscarin dicht aufgeschlossen durch die Säule wanderte.

Im UV.-Licht wurden bei den einzelnen Fraktionen folgende Fluoreszenzen beobachtet:

Fraktionen 1 bis 30	keine.
Fraktionen 31 bis ca. 40	intensiv blau, scharfer Beginn, allmählich schwächer werdend.
40	nur noch schwach grünlich.
Fraktionen 41 bis 52	weisslich grau, allmählich in Blassgrau übergehend.
Fraktionen 60 bis 73	anfangs gelblich grau, dann graugelb, maximal zwischen 63 und 73. Scharfes Ende bei 73.
Fraktionen 75 bis 82	blaugrau.
Fraktionen 83 bis 100	hell blaugrau, allmählich in Gelblichgrau übergehend.
Fraktionen 101 bis 118	sehr intensiv gelbgrün, maximal bei 106 bis 115.
Fraktionen 119 bis 148	blass blaugrau.
Fraktionen 149 bis Ende	schwach blaugrau.

In der Säule blieben sehr langsam wandernde, fluoreszierende Zonen. Diese wurden mit Methanol eluiert.

Den einzelnen Fraktionen wurden aliquote Teile entnommen und diese papierchromatographisch mit dem Lmg. 15 untersucht. Sprühmittel Bromkresolgrün. Die muscarinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum unter Stickstoff zur Trockene gebracht. (Die Hauptmenge des Muscarins befand sich zwischen der 113. bis 145. Fraktion.) Man erhielt 2,3 g unangenehm riechendes, braunes Öl. Dieses wurde in 10 ml Methanol gelöst und mit 50 ml Lmg. 15 verdünnt (klare, rotbraune Lösung). Darauf chromatographierten wir an einer Säule von 700 g Cellulose, welche mit dem Lmg. 15 sorgfältig klimatisiert worden war. Stufenweise Anreicherung:

2 ml Methanol-Lmg. 15	1:29
2 ml Methanol-Lmg. 15	2:28
2 ml Methanol-Lmg. 15	3:27
2 ml Methanol-Lmg. 15	4:26
2 ml Methanol-Lmg. 15	5:25

⁴⁷⁾ Methode *H. Schmid, J. Kehrle & P. Karrer, Helv. 35, 1875 (1952).*

Hierauf wurde das Muscarinkonzentrat aufgetragen und nach dem Einsickern der Methanolgehalt vermindert:

1 ml Methanol-Lmg. 15	4:26
1 ml Methanol-Lmg. 15	3:27
1 ml Methanol-Lmg. 15	2:28
1 ml Methanol-Lmg. 15	1:29
Reines Lmg. 15	

Es wurden 220 Fraktionen zu 1000 Tropfen aufgefangen.

Im UV.-Licht erschien am oberen Ende der Säule eine breite, intensiv türkis fluoreszierende Zone, welche mit Methanol eluiert wurde.

Die einzelnen Fraktionen wurden mit Lmg. 14 geprüft. Nach Vereinigung der muscarinhaltigen Fraktionen und Eindampfen im Vakuum erhielten wir 0,80 g Konzentrat. Dieses war noch stark mit Ammonchlorid verunreinigt. Ein pharmakologischer Test ergab die Anwesenheit von 110 mg Muscarinbase.

In gleicher Weise wurden die Reineckate R_2 und R_3 aufgearbeitet (58,0 g). Sie ergaben 12,4 g acetonunlöslichen Rückstand und 16 g Rohchloride. Deren erstes Chromatogramm mit Lmg. 7 lieferte 4,0 g, das zweite mit Lmg. 15 0,75 g Muscarinkonzentrat. Daraus wurde mit abs. Alkohol 0,25 g Ammonchlorid abgeschieden. Die Reineckate R_2 und R_3 waren stärker verunreinigt.

Aus mehreren Fraktionen der Verteilungschromatogramme mit dem Lmg. 7 kristallisierte beim Stehen im Kühlraum eine schwach gelbliche Substanz in prächtigen, zu Kugeln vereinigten Nadelbüscheln aus. Man kristallisierte zweimal aus heissem Wasser (Norit!) und dann noch zweimal aus wasserhaltigem Butanol um. Nach 3 Std. Trocknen bei 80° und 0,02 Torr Smp. 228—230°. Keine Smp.-Depression im Gemisch mit Adenosin (V).

$C_{10}H_{13}O_4N_5$	Ber. C 44,94	H 4,90	N 26,21%
(267,25)	Gef. „ 44,86	„ 4,81	„ 26,02%

Absorptionsspektrum in Wasser: λ_{\max} 260 μ ϵ 15400; λ_{\min} 227 μ ϵ 2300. Keine Verschiebung in verdünnter Natronlauge.

Papierchromatographisch konnte kein Unterschied zu authentischem Adenosin festgestellt werden.

Das mit heisser, gesättigter, wässriger Pikrinsäurelösung hergestellte Pikrat schmolz nach dem Umkristallisieren aus Wasser bei 190—192°; keine Smp.-Depression mit Adenosinipikrat.

Die vorhandene Gesamtmenge Adenosin dürfte einige Gramm betragen.

Möglicherweise ist Adenosin während der Aufarbeitung durch hydrolytische Prozesse aus Nucleinsäuren entstanden. Es ist aber wahrscheinlicher, dass es in den Fliegenpilzen frei vorkommt. Es sei darauf verwiesen, dass Adenosin auch im Gift der Puffotter in beträchtlicher Menge frei vorkommt⁴⁸⁾ und für den starken Blutdruckabfall nach dem Biss verantwortlich gemacht wird. Ein ähnlicher Stoff, das antibiotisch wirksame Nebularin (VI), wurde aus dem Pilz *Clitocybe nebularis* (*Batsch ex Fr.*) isoliert⁴⁹⁾.

5. Muscarin-tetrachloraurat. Von einer sehr grossen Zahl von geprüften Alkaloidfällungsmitteln gaben einzig Goldchlorwasserstoffsäure in verd. HCl, Rhodanilsäure und Ammoniumreineckat brauchbare Niederschläge. Von diesen führte das Chloraurat zu einem reineren Präparat. Damit wurde auch eine glatte Abtrennung vom begleitenden Ammonchlorid erreicht.

800 mg Muscarinchloridkonzentrat wurden in 5 ml Wasser gelöst und die trübe Lösung mit einer Spatelspitze Norit versetzt. Darauf filtrierte man durch ein mit Kohle gedichtetes Filter und wusch zweimal mit 2 ml Wasser nach. Nun fügten wir 20-proz. Goldchlorwasserstoffsäure in 0,1-n. HCl tropfenweise zu. Die erste bräunliche Fällung ballte sich beim Erwärmen zusammen und wurde rasch abfiltriert. Dann wurde vorsichtig

⁴⁸⁾ F. G. Fischer & H. Dörfel, Z. physiol. Chem. **296**, 232 (1954).

⁴⁹⁾ N. Löfgren et al., Acta chim. scand. **7**, 225 (1953).

mit mehr Goldchlorwasserstoffsäure versetzt und die starke Trübung durch Erwärmen gelöst. Beim Anreiben mit in einem Vorversuch erhaltenen Kristallen kristallisierte das Muscarinaurat langsam aus. Durch Zugabe von mehr Goldchlorwasserstoffsäure wurde die Kristallisation vervollständigt. Nach Stehen in Eis wurde abgenutscht und mit wenig eiskaltem Wasser nachgewaschen. Die bräunlich-gelbe Fraktion wog nach dem Trocknen im Hochvakuum 440 mg (feine Blättchen). Aus den Mutterlaugen gewannen wir durch langsames Eindunstenlassen noch 122 mg einer grobkörnigen, reingelben Fraktion. Sie war reiner als die Fraktion 1.

Insgesamt wurden die folgenden Mengen Rohgoldsalz erhalten:

Vorversuch	30 mg	Smp. 115—117°
Aus den Reineckaten R-1	440 mg	Fr. 1 Smp. 108—111°
	122 mg	Fr. 2 Smp. 114—117°
Aus den Reineckaten R-2 und R-3	321 mg	Fr. 1 (umkristallisiert)
Ausbeute	913 mg	

Zur Analyse wurden 32 mg vom Smp. 108—111° aus Wasser umkristallisiert. Man erhielt 25 mg feine Blättchen. Sie wurden bei 20° 4 Std. im Hochvakuum getrocknet.

Weitere 31 mg wurden in 95-proz. Alkohol gelöst und nach der Filtration stark eingengt. Das Salz kristallisierte in undeutlichen, stark verwachsenen Prismen aus. Menge 25 mg. Sie wurden ebenfalls im Hochvakuum getrocknet.

Die Smp. erwiesen sich je nach der Erhitzungsgeschwindigkeit als ziemlich variabel. Manchmal trat Goldabscheidung ein, worauf sie unschärfer waren. Meist erstarrte die Schmelze beim Abkühlen wieder und schmolz dann gelegentlich etwas höher, doch wurde der Smp. bei keinem dieser Präparate höher als 114—117° festgestellt. Zur Umwandlung ins Chlorid waren die Aurate genügend rein. Völlig reines Muscarintetrachloraurat, Smp. 122—123°, wurde aus dem kristallisierten Muscarinchlorid hergestellt.

6. Muscarinchlorid. Die Überführung des Aurates in einfachere Salze mittels Ionenaustauschern und auf andere Weise verlief sehr unbefriedigend. Trotz mannigfacher Abänderung der Versuchsbedingungen traten grosse Aktivitätsverluste auf, und die Resultate liessen sich selten reproduzieren. Am einfachsten erfolgte schliesslich die Zerlegung mit der alten Schwefelwasserstoffmethode. Kristallisiertes Muscarinchlorid konnte aber erst erhalten werden, als seine hygroskopische Natur beachtet wurde:

100,9 mg Tetrachloraurat wurden in 3 ml Methanol gelöst und mit 20 ml Wasser versetzt. Eine Trübung entfernte man durch Erwärmen. Darauf leitete man Schwefelwasserstoff im Überschuss ein und liess etwa 10 Min. stehen. Nach dem Abnutschen wusch man mit warmem Wasser nach und brachte das klare, farblose Filtrat im Vakuum sofort zur Trockene. Den zähen Rückstand lösten wir in absolutem Alkohol, setzten die Spur Norit zu und filtrierten ab. Nach Abblasen des Lösungsmittels mit trockenem Stickstoff und Trocknen des Rückstandes im Hochvakuum kristallisierte das Chlorid beim Reiben langsam in eisblumenartigen Kristallen durch (siehe Fig. 3). Nach Umkristallisation aus abs. Äthanol/abs. Äther und Methanol/Äther erhielten wir 22,0 mg kurze, dicke Prismen mit keilförmig abgeschrägten Enden. Smp. 181—182° nach Sintern ab 179°. Die Substanz erstarrte nach dem Abkühlen wieder und schmolz dann bei 175—178°.

Die vereinigten Mutterlaugen ergaben nach dem Eindampfen und Umkristallisieren aus dem geeigneteren Lösungsmittelpaar Isopropanol/Aceton noch 9 mg (Smp. 170—171°).

Andere Ansätze lieferten die folgenden Ausbeuten: 339 mg Chloraurat → 103 mg Chlorid, Smp. 180—181°; 321 mg Chloraurat → 83 mg Chlorid, Smp. 180—181°.

Aus den insgesamt erhaltenen 913 mg Chloraurat wären somit ca. 260 mg kristallisiertes Chlorid (Halbhydrat) zu erwarten gewesen.

Die vereinigten, nicht mehr kristallisierenden Mutterlaugen lieferten nach Pyrolyse im Molekularvakuum 17 mg Normuscarin-hydrochlorid.

Die Gesamtausbeute an kristallisiertem Muscarinchlorid beträgt somit etwa 70% der durch biologische Versuche im Alkoholextrakt festgestellten Menge. Die nicht besonders gute Ausbeute bei der Überführung des Tetrachloraurates ins kristallisierte Chlorid kann zwei Ursachen haben: dass das Chloraurat noch nicht völlig rein war

(z. B. ist der Smp. des aus dem kristallisierten Chlorid hergestellten Chloroaurates etwas höher), oder dass während der Zerlegung eine geringe Zersetzung des Muscarins eingetreten ist. Wahrscheinlich ist beides der Fall.

7. Muscarinreineckat. Aus den in Vorversuchen erhaltenen (nicht mit Schwefelwasserstoff behandelten) Muscarinchloridlösungen wurde mit reiner Ammoniumreineckatlösung das Muscarin als schön kristallisierendes Salz abgeschieden. Es wurde mehrfach aus Aceton/Wasser auskristallisiert. Rote, langprismatische Nadeln, häufig gekreuzt, gelegentlich zu schwalbenschwanzartigen Formen verzwilligt. Smp. 181—182° (im Hochvakuum evakuierte Kapillare).

8. Zur Kontrolle, ob bei der Schwefelwasserstoffbehandlung eine Veränderung des Muscarins eingetreten war, wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

a) 16,5 mg reines Muscarinreineckat wurden in 0,5 ml Aceton und 0,5 ml Wasser gelöst. Darauf versetzte man mit 2,00 ml 0,01-m. Ag_2SO_4 -Lösung, zentrifugierte ab und fällte anschliessend mit 2,00 ml 0,01-m. BaCl_2 -Lösung. Nach dem Zentrifugieren wurde wieder im Vakuum eingedampft, in abs. Alkohol aufgenommen, filtriert und mit N_2 zur Trockene geblasen. Nach Trocknen im Hochvakuum erfolgte die spontane Kristallisation. Nach Umkristallisation aus Isopropanol/Aceton Smp. 175—179° (Vakuumröhrchen). Pharmakologisch war das Präparat voll aktiv. Der Rf-Wert in den Lmg. 15 und 16 war gleich wie beim Muscarin aus dem Chloroaurat (H_2S).

b) 0,990 mg Muscarinchlorid (aus Chloroaurat, mit H_2S) wurden ins Reineckat übergeführt. Smp. 178—178,5° (Vakuumröhrchen).

c) 1 mg Muscarinchlorid (aus Chloroaurat) wurde mit 20-proz. Goldchlorwasserstoffsäure ins Aurat zurückverwandelt. Nach kurzer Trübung kristallisierte das Salz in glänzenden Blättchen aus. Es wurde mit einem Tröpfchen Eiswasser und dann mit feuchtem Äther gründlich ausgewaschen. Smp. nach dem Trocknen im Hochvakuum 122—123° (rasch erhitzt), 121—121,5° (sehr langsam erhitzt).

Analysen:

$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}^+\cdot\text{AuCl}_4$ (499,27)	Ber.	C 19,24	H 3,64	N 2,81	Au 39,50%	
$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}^+\cdot\text{AuCl}_4$ (511,28)	„ „	21,14	„ 3,55	„ 2,74	„ 38,57%	
$\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}^+\cdot\text{AuCl}_4$ (513,29)	„ „	21,06	„ 3,93	„ 2,73	„ 38,42	3 N- CH_3 8,79%
Aus Alkohol krist.	Gef.	„ 20,72	„ 3,93	„ 2,74	„ 39,05%	
Aus Wasser krist.	„ „	20,81	„ 3,89	—	„ 39,13]	3 N- CH_3 8,59%
	„ „	20,92	„ 3,82	—	„ 38,77	„ 8,84%

$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}^+\text{Cl}$ (195,70)	Ber.	C 49,10	H 9,27	N 7,15	Cl 18,12%	
$\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}^+\text{Cl}$ (209,72)	„ „	51,54	„ 9,62	„ 6,68	„ 16,91%	
$\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}^+\text{Cl}\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (218,73)	„ „	49,42	„ 9,68	„ 6,41	„ 16,21	1 C- CH_3 6,87%
Getr. 20°/10 ⁻³ Torr 2 h	Gef.	„ 49,96	„ 9,36	„ 6,18	„ 15,63	„ 6,50%
kein Gew.-Verlust!						(Carius) 16,58% (pot. Tit.)
Getr. 70°/10 ⁻³ Torr 5 h	„ „	51,37	„ 9,89			

kein Schwefel oder Methoxyl

$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}^+\cdot[(\text{SCN})_4\cdot\text{Cr}\cdot(\text{NH}_3)_2]^-$ (478,5)	Ber.	C 30,13	H 5,02	N 20,50%	
$\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}^+\cdot[(\text{SCN})_4\cdot\text{Cr}\cdot(\text{NH}_3)_2]^-$ (492,7)	„ „	31,69	„ 5,32	„ 19,90	Cr_2O_3 15,43%
	Gef.	„ 32,31	„ 5,47	„ 20,12	Asche 16,40%

Die Analysen entsprechen besser der C_9 -Formel als der Kögl'schen C_8 -Formel.

d) Muscarin ist schwefelfrei. Diese Versuche beweisen, dass bei der Schwefelwasserstoffbehandlung des Muscarins keine Veränderung der Molekel eingetreten ist.

9. Mikrohydrierungsversuch. 2,238 mg Muscarinchlorid wurden in 5 ml reinem 95-proz. Äthanol mit 50 mg Platinoxid bei 23° geschüttelt. Es wurde auch nach längerer Zeit keine Spur von Wasserstoff aufgenommen.

10. C-Methylbestimmungen durch Chromsäureoxydation. a) 0,4 mg Muscarinchlorid wurden mit $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CrO}_3$ nach *Kuhn-Roth* in der Apparatur von *Wiesenberger*⁵⁰⁾ oxydiert⁵¹⁾. Es konnte papierchromatographisch nach *Lindqvist & Storgårds*⁵²⁾ nur die ziemlich genau einem Mol entsprechende Menge Essigsäure gefunden werden.

Propionsäure und alle höheren Säuren waren gänzlich abwesend. Da die Propionsäure unter den genannten Bedingungen doch langsam zu Essigsäure abgebaut wird, haben wir das übliche vorausgehende Aufschliessen der Substanzen durch Rückflusskochen weggelassen. Unter Ersatz des Wassers wurde direkt in die Vorlage destilliert (15mal 2 ml)⁵³⁾. Mit 1,253 mg Conhydrin (*Merck*, puriss.) und 1,624 mg *d,l*- α -Aminobuttersäure (rein) wurde unter sonst gleichbleibenden Bedingungen ein deutlicher Essigsäure- und Propionsäurefleck erhalten (Rf 0,17 bzw. 0,25). Mit Muscarinchlorid (1,091 mg) konnte aber keine Spur Propionsäure aufgefunden werden.

b) 9,252 mg Muscarinchlorid wurden auf die übliche Weise abgebaut: C-Methylber. 6,87%, gef. 6,50%. — In der zurückbleibenden Oxydationslösung wurde die überschüssige Chromsäure reduziert, dann wurde mit Äther 2 Tage perkoliert. Im Äther-Eindampfdruckstand konnte aber papierchromatographisch keine Dicarbonsäure aufgefunden werden.

11. Versuche zum Nachweis der Aldehydgruppe. a) *Angeli-Rimini-Test*: Ausführung nach *Cheronis & Entrikin*⁵⁴⁾. Mit 1,5 mg kristallisiertem Muscarinchlorid war der Test völlig negativ, in Blindversuchen mit einer ganzen Reihe von Aldehyden jedoch durchwegs positiv. Der Test wurde ebenfalls mit verschiedenen muscarinhaltigen Fraktionen der Chromatogramme ohne Erfolg durchgeführt.

b) *Schiff'scher Test*: Ausführung nach *Cheronis & Entrikin*⁵⁴⁾ (Seite 463). Er war mit 1,5 mg Muscarinchlorid (krist.) völlig negativ, jedoch sehr intensiv mit einer ganzen Reihe von daneben geprüften Aldehyden.

c) 0,4 mg Muscarinchlorid wurden mit 1 ml 0,2-n. HCl über Nacht stengelassen und dann mit N_2 zur Trockene geblasen. Der kristalline Rückstand reagierte ebenfalls nicht mit Fuchsin-schwefliger Säure.

d) 1 mg Muscarinchlorid wurde mit ca. 2 mg Dinitrophenylhydrazin in 0,5 ml 2-n. HCl versetzt: weder in der Kälte noch beim Kochen war eine Reaktion festzustellen. Die hellgelbe Lösung blieb klar.

e) Spektroskopisch konnte in $3,8 \cdot 10^{-4}$ bis $0,9 \cdot 10^{-3}$ -m. Lösungen in Wasser (Schichtdicken 1 cm) keine einer Carbonylgruppe entsprechende Absorption gefunden werden. Muscarin ist in diesen Konzentrationen bis 220 μ völlig transparent. Muscarinchlorid, Normuscarin und Muscarintetrachloraurat zeigten im IR. (aufgenommen in Nujol und CCl_4) keine einer Carbonylgruppe entsprechenden Absorptionsbanden.

f) 2,998 mg Muscarinchloraurat wurden in 1 ml abs. Methanol gelöst und mit 3 mg Natriumborhydrid in 1 ml abs. Methanol versetzt. Das Gold wurde schlagartig als schwarzes Metall ausgefällt. Starke Wasserstoffentwicklung. Man kochte noch 1 Std. unter Rückfluss (es waren keine flüchtigen Basen nachweisbar) und versetzte dann mit 1 ml Wasser. Nach Stehen bei Zimmertemperatur wurde mit Stickstoff zur Trockene geblasen. Der Rückstand enthielt keine ätherlöslichen Anteile. Ein Papierchromatogramm zeigte die Anwesenheit von unverändertem Muscarin. Nach Neutralisation mit verdünnter Essigsäure liess sich mit Reineckesalz das bekannte Muscarinreineckat unschwer erhalten.

g) 1,944 mg Muscarinchlorid wurden in 0,5 ml abs. Methanol gelöst und mit 2 mg Kaliumborhydrid in 0,3 ml abs. Methanol versetzt: deutliche Gasentwicklung. Nach 1 Std. Stehen bei Zimmertemperatur wurden nochmals 2 mg festes Kaliumborhydrid zu-

⁵⁰⁾ *E. Wiesenberger*, *Mikrochemie* **33**, 51 (1948).

⁵¹⁾ *C. F. Garbers, H. Schmid & P. Karrer*, *Helv.* **37**, 1336 (1954).

⁵²⁾ *B. Lindqvist & T. Storgårds*, *Acta chem. scand.* **7**, 87 (1953).

⁵³⁾ Vgl. *J. H. Lister, C. H. Eugster & P. Karrer*, *Helv.* **38**, 221 (1955).

⁵⁴⁾ *N. D. Cheronis & J. B. Entrikin*, *Semimicro Qualitative Organic Analysis* (T. Y. Crowell Comp., N. Y. 1947), Seite 123.

gefügt. Nach 5 Std. Stehen bei Zimmertemperatur wurde mit 0,1-n. HCl auf Kongo neutralisiert. Nach erneutem einstündigem Stehen bei Raumtemperatur dampfte man im Vakuum zur Trockene ein. Den Rückstand digerierten wir mit abs. Äthanol und filtrierten von KCl ab. In Papierchromatogrammen liessen sich keine anderen Flecken erkennen (Lmg. 14 und 16, Bromkresolgrün und Jod) als die zum Muscarin gehörenden. (In der Nähe des Startflecks befindet sich jeweils ein vom Alkaliborat herrührender, stark basischer Fleck.) Den Rest der Alkohollösung brachte man hierauf zur Trockene, behandelte den Rückstand mit Wasser und einer Spur Norit und filtrierte. Zum klaren und farblosen Filtrat wurden einige Tropfen 20-proz. HAuCl_4 in 0,1-n. HCl gegeben. Es trat sofort Trübung auf und nach wenigen Sek. kristallisierten die glänzenden Blättchen des Muscarinchloroaurates aus. Nach dem Abnutschen und gründlichen Waschen mit feuchtem Äther trockneten wir im Hochvakuum. Ausbeute 2 mg. Smp. 116—118°.

h) Muscarinchlorid reduziert weder neutrale noch ammoniakalische Silbernitratlösung.

i) Triphenyltetrazoliumchlorid wird in hydrogencarbonatgepufferter Lösung weder kalt noch warm zum Formazan reduziert.

k) Auch Normuscarin reagiert nicht mit dem *Schiff'schen* Reagens.

l) Muscarin liess sich katalytisch mit Pt in Alkohol nicht hydrieren.

12. *Hofmann'scher* Abbau. a) 1,519 mg Muscarinchlorid wurden in Wasser gelöst und auf eine Säule von Amberlite IRA 400 (OH^-) (6×40 mm) gegeben. Das anfänglich neutrale Perkolat reagierte nach kurzer Zeit stark alkalisch. Man wusch mit Wasser bis zur neutralen Reaktion nach. Nach der Zugabe eines Platintetraeders wurde in der Apparatur nach *Wiesberger*⁵⁵) 1 Std. gekocht und das abdestillierte Wasser immer wieder ersetzt. Das Destillat fing man in 0,1-n. HCl auf. Nach Eindampfen im Vakuum wurde papierchromatographisch untersucht. Mit Bromphenolblau (0,2-proz. in Alkohol)⁵⁵) konnte erst nach Auftragen von grossen Mengen eine Spur eines basischen Stoffes gefunden werden (im Lmg. 14 Säurefleck Rf 0,17, Basenfleck 0,20). Zum Vergleich waren 20 γ Trimethylamin-hydrochlorid aufgetragen worden (Säurefleck Rf 0,17, Basenfleck Rf 0,29 bis 0,30). — Der im Kölbchen verbliebene Rückstand wurde ebenfalls papierchromatographisch untersucht: Lmg. 14, Jod, Rf 0,36—0,37; Lmg. 16, Bromkresolgrün, Rf 0,24 bis 0,25. Identisch mit mitgelaufenem Muscarin.

Muscarinhydroxyd verändert sich also unter diesen Bedingungen kaum und spaltet jedenfalls kein Trimethylamin ab. Dass Trimethylamin-hydrochlorid in sehr verdünnten, schwach salzsauren Lösungen ohne merkbaren Verlust im Vakuum eingedampft werden kann, wurde durch einen besonderen Versuch festgestellt.

b) 2,087 mg Muscarinchlorid in 10 ml Wasser mit ca. 100 mg frisch gefälltem und gründlich ausgewaschenem Silberoxyd wurden in der gleichen Apparatur 1 Std. gekocht und das Destillat in 0,1-n. HCl eingeleitet. Nach Eindampfen des Destillates blieb eine Spur eines weissen, festen Rückstandes, der nach Lösen in 0,5 ml Methanol papierchromatographisch untersucht wurde.

Der nicht wasserdampffüchtige Rückstand im Kölbchen wurde mit Salzsäure und Äther durchgeschüttelt. Im Äther waren keine sauren Stoffe nachweisbar. Die Salzsäure wurde durch ein aschefreies Filter filtriert und im Vakuum zur Trockene gebracht. Nach Aufnehmen in Methanol wurde nochmals filtriert und dann papierchromatographisch untersucht.

Im nicht wasserdampffüchtigen Teil fanden wir kein Anzeichen für die Dihydroxyvaleriansäure. Unter den Basen wurde nur noch wenig Muscarin gefunden (Rf 0,26, Lmg. 16). Die Natur der anderen, wasserdampffüchtigen, papierchromatographisch in Spuren nachzuweisenden Basen ist unbekannt (Rf 0,09 und 0,24 im Lmg. 14). Sie sind jedoch im Versuch mit Ag_2O in grösserer Menge vorhanden als im Versuch a).

Resultat: In den genannten und anderen Versuchen konnten wir kein Trimethylamin nachweisen.

⁵⁵) R. Schwyzer, Acta chem. scand. 6, 219 (1952).

13. Nachweis der Hydroxylgruppe. *Acetylierung*: 0,715 mg Muscarinchlorid wurden im HV. bei 40° getrocknet und mit 0,5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Das Chlorid ging allmählich in Lösung. Nach 2 Std. Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde noch 2 Std. auf 55° erhitzt. Hierauf bliesen wir das überschüssige Essigsäureanhydrid mit trockenem Stickstoff ab und erwärmten den Rückstand noch 2 Std. im HV. auf 40°. Das farblose Harz wurde in 0,750 ml Methanol gelöst und papierchromatographisch untersucht (Lmg. 14, Jod). Siehe Fig. 8. Das Acetylderivat reagierte mit Jod sehr viel intensiver. Die sepiafarbenen Flecke waren auch länger haltbar als beim Muscarin.

Verseifung: 0,117 ml der methanolischen Lösung des Acetylderivates wurden mit 0,077 ml 0,05-n. NaOH versetzt und 1 Std. bei 80° gehalten. Darauf gab man 0,080 ml 0,05-n. HCl zu und dampfte unter Stickstoff zur Trockene. Der Rückstand wurde in 0,117 ml Methanol gelöst und papierchromatographisch untersucht (siehe Fig. 8).

Zusammenfassung.

Aus Fliegenpilzen wurde das quaternäre Alkaloid Muscarin in reiner, kristallisierter Form isoliert (Chlorid, Chloroaurat, Reineckat). Analysen führten zur Formel $C_9H_{20}O_2N^+$. Die Strukturen I und II wurden durch Abbaueversuche überprüft und widerlegt.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

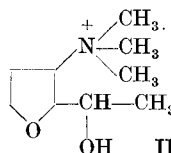
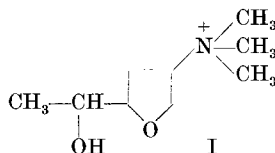
123. Zur Konstitution des Muscarins.

3. Mitteilung über Muscarin¹⁾

von C. H. Eugster.

(28. III. 56.)

In der vorangehenden Mitteilung beschrieben wir die Gewinnung des reinen Muscarinchlorides aus Fliegenpilzen sowie Reaktionen, welche die bisher angenommenen Konstitutionsformeln widerlegten. Hier soll nun über Abbaueversuche berichtet werden, welche wegen der Kostbarkeit des Muscarins zwar im Mikromaßstab, d. h. meist ohne Kontrolle durch quantitative Analysen durchgeführt werden mussten, und die deshalb für Schlussfolgerungen nicht die gewohnte Sicherheit bieten, aus denen wir aber trotzdem auf Grund einer grösseren Zahl von vergleichenden Untersuchungen an Modellsubstanzen mit guten Gründen glauben schliessen zu dürfen, dass dem Muscarin die Struktur eines Trimethyl-[2-(α -hydroxyäthyl)-tetrahydro-furyl-(4)]-ammonium-Salzes (I) oder, etwas weniger wahrscheinlich, eines Trimethyl-[2-(α -hydroxyäthyl)-tetrahydro-furyl-(3)]-ammonium-Salzes (II) zukomme.



¹⁾ 2. Mitteilung, Helv. **39**, 1002 (1956).