

## 97. Muscimol, ein pharmakodynamisch wirksamer Stoff aus *Amanita muscaria*<sup>1)</sup>

von G. F. R. Müller<sup>2)</sup> und C. H. Eugster

(3. IV. 65)

**1. Einleitung.** – Psychomimetica pflanzlicher Herkunft haben in neuerer Zeit aus verschiedenen Gründen ein steigendes Interesse erweckt. Die seit einigen Jahren intensivierte chemische und medizinische Bearbeitung lieferte eine Fülle wertvoller neuer Einsichten, deren Bedeutung den engeren naturwissenschaftlichen Rahmen überragt [2]. Hervorgehoben seien hier nur die Untersuchungen an den in mittel-amerikanischen Kulturen seit alten Zeiten kultisch verwendeten Pilzen der Gattungen *Psilocybe* und *Stropharia* [3]. Es ist eine seit langem bekannte Tatsache, dass psychotrope Stoffe auch in etlichen europäischen Pilzarten vorkommen [4]. Dabei hat seit jeher der *Fliegenpilz* (*Amanita muscaria* (L. ex FR.) HOOKER) besondere Aufmerksamkeit gefunden, da er möglicherweise im nordeuropäisch-asiatischen Raum eine ähnliche Rolle als Berausungsmittel gespielt haben mag wie die *Psilocybe*-Arten in den präkolumbianischen Kulturen Mittelamerikas<sup>3)</sup>. Seine Verwendung als Berausungsmittel bei sibirischen Völkern steht seit dem ersten Bericht von PHILIPP JOHANN v. STRAHLENBERG aus dem Jahre 1730 fest und ist seitdem mehrfach bestätigt worden<sup>4)</sup>. Als der eine von uns im Jahre 1953 die chemische Bearbeitung der Inhaltsstoffe des Fliegenpilzes aufnahm [6], musste das Schwergewicht nur deshalb auf die Untersuchung der muscarinischen Inhaltsstoffe gelegt werden, weil uns damals keine geeignete Methode zur pharmakologischen Prüfung zentralaktiver Stoffe zur Verfügung stand. Wir hatten aber, sobald uns das neben der Arbeit am Muscarin möglich war, nach weiteren physiologisch aktiven Fraktionen zu suchen begonnen. Darüber wurde bereits berichtet [7].

In unserer ersten ausführlichen Arbeit über die Isolierung des Muscarins wurde ausdrücklich auf die Anwesenheit einer grösseren Zahl von Begleitstoffen hingewiesen, die sich vor allem in Papierchromatogrammen, teilweise aber auch in nicht muscarinischen Wirkungen auf das damals verwendete Testorgan bemerkbar machten [8].

Eine neuere pharmakologische Untersuchung an zahlreichen wasserlöslichen Fraktionen aus Fliegenpilzen ergab die Anwesenheit mehrerer physiologisch aktiver Fraktionen, insbesondere von Fraktionen mit *narkosepotenzierenden Wirkungen*. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung des *Muscimols*, eines Trägers dieser Wirkung. In nachfolgenden Arbeiten folgen Strukturaufklärung und Synthese des *Muscimols* [9], sowie die Bekanntgabe der Isolierung, Strukturaufklärung und Syn-

<sup>1)</sup> 18. Mitteilung über Inhaltsstoffe aus Fliegenpilzen, 17. Mitteilung siehe [1].

<sup>2)</sup> Auszug aus der Dissertation von GÜNTER F. R. MÜLLER.

<sup>3)</sup> Die chemische, pharmakologische und ethnomykologische Literatur über den Fliegenpilz ist sehr umfangreich, vgl. [4] [5]. Eine eingehende Besprechung wird andernorts erfolgen.

<sup>4)</sup> Im Schrifttum über den Fliegenpilz sind die zentralaktiven Stoffe mit dem Begriff *Pilzatropin* oder *Muscaridin* umschrieben. Offenbar in Unkenntnis dieser Literatur ist leider letzterer Name in neuerer Zeit für einen ganz anderen Inhaltsstoff erneut verwendet worden.

these weiterer physiologisch aktiver Inhaltsstoffe des Fliegenpilzes [10] [11]. Es sei bereits hier festgehalten, dass Muscimol wahrscheinlich keinen genuine Inhaltsstoff des Fliegenpilzes darstellt.

**2. Vorversuche zum Nachweis von narkosepotenzierenden Stoffen.** – Der Fliegenpilz enthält eine sehr grosse Zahl Inhaltsstoffe, von denen bisher nur ein Bruchteil identifiziert werden konnte. Um neue pharmakologische Wirkungen festzustellen, war es notwendig, unter Vermeidung von Fällungsverfahren, zunächst eine grobe Auftrennung in Gruppen vorzunehmen und diese pharmakologisch zu prüfen. Dabei sollten die bekannten aktiven Stoffe wie Muscarin, Acetylcholin möglichst nur in einer Fraktion auftreten. Das wurde mit folgender einfacher Verarbeitung erreicht: die im Herbst 1958 gesammelten frischen Fliegenpilze wurden zur Stabilisierung sofort nach Eingang unter Äthanol fein zerhackt. Nach Abnutschen und Abpressen wurden die wässrig-alkoholischen Extrakte im Vakuum möglichst schonend (Dünnschichtverdampfer) stark eingeengt (zu einer ca. 20-proz. Lösung). Anschliessend wurde die schwach saure Lösung gründlich mit Äther ausgezogen (→ *Ätherlösliche Anteile*). Hierauf folgte eine Extraktion der Lösung mit wassergesättigtem Butanol (→ *Butanol-lösliche Anteile*). Die zurückbleibenden, *butanolunlöslichen Anteile* enthalten die stark polaren, extrem wasserlöslichen Stoffe. Die ätherlöslichen Anteile stellen nach dem Eindampfen ein hellbraunes Öl mit starkem «Pilzgeruch» dar. Sie enthalten in geringer Menge basische Stoffe.

Die butanollöslichen Teile enthalten praktisch alles Muscarin, viel Cholin, mehrere Indolverbindungen und Aminosäuren, von denen Tryptophan kristallisiert erhalten worden ist, nebst verschiedenen anderen bisher noch unbekanntem Stoffen (siehe experimenteller Teil).

Im Butanolunlöslichen befindet sich der Hauptteil der Zucker, Aminosäuren und Salze. Zur näheren Charakterisierung wurden zahlreiche weitere Trennversuche unternommen und die erhaltenen Fraktionen vor allem papierchromatographisch und elektro-phoretisch mit den üblichen Reagentien charakterisiert. Als besonders wertvoll erwiesen sich u. a. GROTE's Reagens wegen seiner Spezifität, sowie Phenylheptatrienal/HCl, das wir wegen seiner Empfindlichkeit neben *p*-Dimethylaminobenzaldehyd, Zimtaldehyd oder *p*-Dimethylaminozimtaldehyd oft benutzten (siehe experimenteller Teil).

Zahlreiche Fraktionen wurden hierauf orientierend pharmakologisch geprüft. Aus dieser Prüfung ging hervor, dass vor allem im Butanolunlöslichen, das durch Chromatographie an Aluminiumoxid weiter aufgetrennt worden war, deutlich narkosepotenzierende Substanzen enthalten waren. Da die Beurteilung der Narkosepotenzierung einen Hinweis auf unser Ziel der Erfassung zentralaktiver Stoffe im Fliegenpilz ergab, wurde auf diese Stoffe das Schwergewicht bei der Fortführung der weiteren Isolierungsarbeiten gelegt. Im folgenden wird der Weg, der zur Isolierung einer Substanz mit stark narkosepotenzierender Wirkung (*Muscimol*) führte, beschrieben.

Der pharmakologische Leittest, der uns die Verfolgung einer eventuellen Anreicherung des Wirkstoffes gestattete, beruht auf der Beeinflussung der Schlafwirkung eines Kurznarcoticums (2-Methoxy-4-allyl-phenoxyessigsäure-diäthylamid), wobei die Dauer der Seitenlage der Versuchstiere (Mäuse), sowie die Anzahl Tiere in Seitenlage bestimmt und diese Zahlen gegenüber einer Kontrollserie als Änderung *in Prozent* an-

gegeben werden. Die zu prüfenden Fraktionen wurden jeweils subcutan als wässrige Lösungen 30 Min. vor der intraperitonealen Verabreichung von 40 mg/kg des Narcotics injiziert<sup>5)</sup>.

Zur ungefähren Kontrolle einer Anreicherung in einem bestimmten Trennungsgang, sowie zur anschaulichen Darstellung haben wir das Produkt aus Ausbeute und % Änderung der Dauer der Seitenlage bestimmt: Ausbeute-Wirkungsprodukt (AWP) = % Ausbeute  $\times$  % Änderung der Dauer der Seitenlage (negative Werte bedeuten Narkosehemmung). Natürlich kommt solchen Zahlen aus verschiedenen Gründen nur relativer Wert zu, da z. B. der Prozentsatz der Tiere in Seitenlage nicht berücksichtigt ist. Ein Vergleich verschiedener Versuchsserien untereinander ist nur qualitativ möglich, da wir die Ausbeute immer nur auf die Ausgangsfraktion der jeweiligen Versuchsreihe bezogen haben. Bei der grossen Anzahl von Inhaltsstoffen in den jeweiligen Fraktionen waren wir längere Zeit ausschliesslich auf den pharmakologischen Test zur Kontrolle der erzielten Anreicherung angewiesen.

**3. Vorversuche zur Isolierung des Muscimols.**—*Aluminiumoxidchromatographie:* die butanolunlöslichen Anteile wurden nach weitgehendem, aber schonendem Eindampfen im Vakuum in der doppelten Menge 50-proz. Methanol gelöst, durch neutrales Aluminiumoxid filtriert und mit demselben Lösungsmittel nachgewaschen. Den Verlauf einer solchen Anreicherung gibt Fig. 1. Die im experimentellen Teil angegebenen ausführlichen Zahlen zeigen, dass die Aktivität einzelner, in geringerer Menge erhalte-

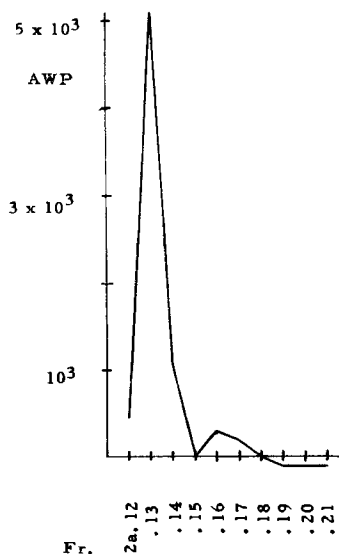


Fig. 1. Auftrennung durch Aluminiumoxid-Chromatographie, verfolgt an Hand des AWP

ner Fraktionen nicht übersehen werden darf. Eine weitere Anreicherung wurde anschliessend mit aktiven Fraktionen an folgenden Ionenaustauschern durchgeführt: Amberlite IRC-50 (H<sup>+</sup>), Amberlite IRA-400 (OH<sup>-</sup>), Dowex 1-X 10 (Cl<sup>-</sup>), Dowex

<sup>5)</sup> Die Wahl der Narcosepotenzierung als pharmakologische Testmethode und die Durchführung der pharmakologischen Untersuchung erfolgte durch Herrn Dr. W. THEOBALD, J. R. GEIGY AG, Basel [12].

50-W X 12 (H<sup>+</sup>), Dowex 50 (H<sup>+</sup>). Dabei beschränkten wir uns zunächst auf 3 Fraktionen: eluierbar mit a) H<sub>2</sub>O, b) 0,1N HCOOH, c) 0,1N HCl bzw. 0,1N NH<sub>3</sub>.

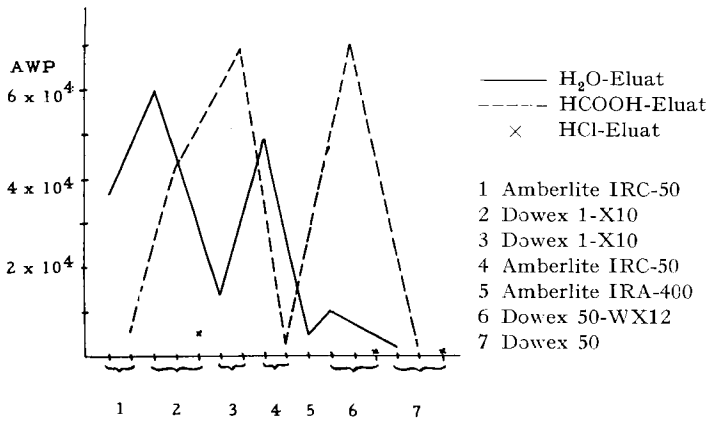


Fig. 2. Ionenaustauscher-Behandlung, verfolgt an Hand des AWP

Wie aus Fig. 2 hervorgeht, wurden die besten Anreicherungsgrade mit Dowex 50-W X 12 (H<sup>+</sup>) erzielt. Hier waren die Wassereluat praktisch ohne Aktivität. Diese konnte aber mit 0,1–2N HCOOH herausgeholt werden, während in Versuchen mit Amberlite IRC-50 der grössere Teil der Aktivität ins Wassereluat ging. Mit Dowex 1-X 10 (Cl<sup>-</sup>) waren die Ergebnisse je nach verwendeter Ausgangsfraktion verschieden. Sie waren deutlich besser, wenn die zur Anwendung gelangende Fraktion vorher mit verdünntem Ammoniak neutralisiert worden war, oder wenn der Austauscher in der Acetat- oder Formiat-Form eingesetzt wurde.

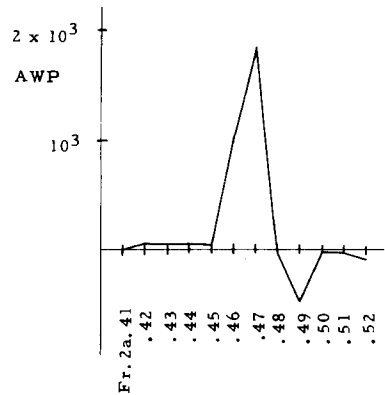


Fig. 3. Ionenaustauscher-Behandlung mit steigendem Ameisensäuregradienten, verfolgt an Hand des AWP

In der Folge haben wir die Gradientenelutionstechnik am Ionenaustauscher angewandt. Es wurde mit einem linearen Gradienten mit Wasser-Ameisensäure in einer im wesentlichen nach GEISS [13] gebauten Apparatur gearbeitet. Ein Beispiel ist in Figur 3 dargestellt. Die verwendete Fraktion stammt ebenfalls aus einer Aluminiumoxid-Fraktionierung und war zudem mit Amberlite IRC-50 (H<sup>+</sup>) vorgereinigt worden. Zwei der Fraktionen wiesen eine hohe Aktivität auf.

Ein Zusammenhang zwischen pharmakologischer Aktivität und den Ergebnissen der chemischen Nachweisverfahren konnte auf dieser Stufe noch nicht erkannt werden. Schwierigkeiten in der Reproduzierbarkeit, insbesondere sehr starke Schwankungen in den Ausbeuten und in den papierchromatographisch nachweisbaren Flecken liessen uns eine erhebliche Instabilität der aktiven Prinzipien vermuten, weshalb wir weitere Trennmethoden ausprobierten.

Dazu dienten Trennversuche an *Cellulose*-Säulen. In Figur 4 ist ein Trennverlauf bei einer aktiven, an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  vorgetrennten Fraktion graphisch dargestellt. Auch hier war eine Anreicherung festzustellen. Es traten aber bedeutende Aktivitätsverluste ein und die Reproduzierbarkeit war besonders schlecht.

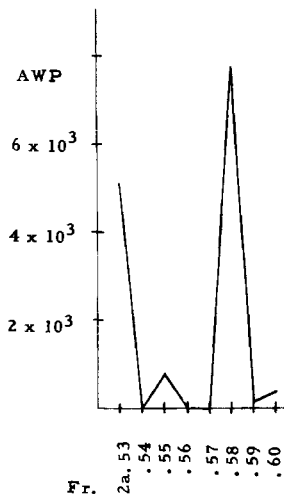


Fig. 4. Auftrennversuch an einer *Cellulose*-Säule, verfolgt an Hand des AWP

**4. Korrelation zwischen pharmakologischer Aktivität und chemischem Nachweis.** – In den in den beschriebenen Vorversuchen erhaltenen aktiven Fraktionen sprachen auf Farbreagentien bei der papierchromatographischen Prüfung besonders stark folgende Substanzen bzw. Flecke an (Beispiel: s. Fig. 5; Lösungsmittelgemisch 14<sup>6)</sup>, WHATMAN-Papier Nr. 1 absteigend); die vorläufige Bezeichnung dieser Substanzen mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\alpha_2$  ist beigefügt:

1. Mit Reagens auf Amine: deutlich vier Flecke, alle blau, besonders stark die Flecke bei Rf 0,05 (=  $\alpha_2$ ), 0,15 (=  $\alpha$ ) und 0,33–0,36 (=  $\beta$ ).
2. Mit Ninhydrin: mindestens sieben Substanzen; von diesen treten hervor, Substanzen mit den Rf-Werten 0,07 gelb-braun (=  $\alpha_2$ ), 0,15 obere violett, untere braun (=  $\alpha$ ), 0,33–0,36 (=  $\beta$ ) gelbbraun, wird nach mehreren Stunden langsam violett.
3. Mit GROTE-Reagens: drei Flecke Rf 0,07, 0,15, 0,33–0,36, alle blau, bei 0,07 aber schwach.

Die weitere Untersuchung erfolgte hierauf elektrophoretisch (400–600 V, 5–10 mA, Ameisensäure-Eisessig-Wassergemisch von pH 1,9, Laufzeit 60 Min.). Die Substanzen wandern kationisch, wie das nach ihrem Verhalten in den Ionenaustauscherversuchen zu erwarten war. Als Beispiel sei die elektrophoretische Auftrennung der Fraktion aus

<sup>6)</sup> Bezeichnung siehe Zusammenstellung im experimentellen Teil.

einem Cellulosechromatogramm, die der Fig. 5 zugrunde lag, aufgeführt. Nach Kon-

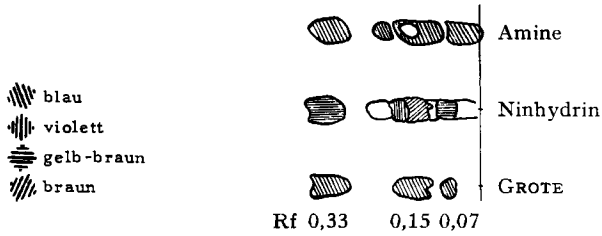


Fig. 5. Fr. 2a. 71, Lmg 14, WHATMAN Nr. 1 absteigend

trollstreifen schnitt man Zonen heraus; es ergaben sich vier Hauptzonen und die vereinigten Zwischenzonen. Drei Hauptzonen wurden nun im Lösungsmittelgemisch 14 papierchromatographisch noch einmal aufgetrennt. Daraus gingen wiederum vier Hauptzonen hervor, die papierchromatographisch und elektrophoretisch (siehe Fig. 6)

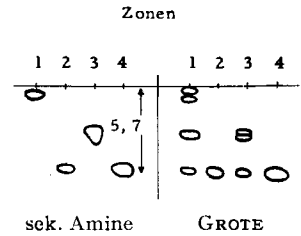


Fig. 6. Endfraktionen nach kombinierter Papierchromatographie/Papierelktrophorese, Pherogramme

charakterisiert wurden. Nicht erklärbar war zunächst die Übereinstimmung der Zonen 2 und 4 und das Auftreten der Substanz aus Zone 4 in den Zonen 1 und 3.

Hierauf wurden derartige aktive Fraktionen aus Vortrennungen teils präparativ auf Cellulosekartons chromatographiert, teils papierelktrophoretisch aufgetrennt. Die Ergebnisse der pharmakologischen Prüfung sind in Figur 7 wiedergegeben:

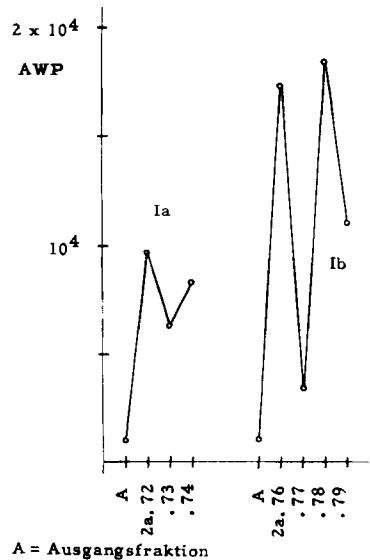


Fig. 7. Pharmakologische Prüfung von durch präparative Papierchromatographie auf Cellulosekartons erhaltenen Fraktionen

A = Ausgangsfraktion

Daraus ergeben sich folgende Zusammenhänge:

a) *Papierchromatographische Kennzeichnung* (Gemisch 14, WHATMAN Nr. 1). Ninhydrin: gelb Rf 0,15 und 0,36; gelb-braun 0,24; violett 0,11; 0,14; 0,29; schwache Färbung Rf 0,07; 0,09; 0,21 und Startpunkt. Reagens auf *Amine*: blau Rf 0,08; 0,12; 0,36 und Startpunkt. – GROTE-Reagens: blau 0,09; 0,15; 0,36.

Folgende Stoffe fallen durch starke bzw. besondere Farbreaktionen auf (Lösungsmittelgemisch 14): Rf 0,15 und 0,36 gelbe Farbreaktion mit Ninhydrin. Die genannten zwei Stoffe geben auch starke Reaktionen mit dem Reagens auf Amine und dem GROTE-Reagens.

b) *Papierelektrophoretische Kennzeichnung*: Die mit Ninhydrin gelb reagierenden Stoffe haben Laufstrecken von 0,4 und 5,7 cm. Laufstrecken zweier weiterer Stoffe sind 1,0 und 3,1 cm.

Pharmakologisch findet sich Hauptaktivität bei Auftrennung im Lösungsmittelgemisch 11 bei Rf 0,05 und 0,2, im Lösungsmittelgemisch 14 bei Rf 0,15 und 0,36 (Hinweis auf die mit Ninhydrin gelb reagierenden Stoffe). Bei der Aufarbeitung zeigte es sich, dass in allen Endfraktionen in geringer Konzentration der Stoff mit Rf 0,36 im Lösungsmittelgemisch 14 auftrat. Besonders deutlich kam das bei der elektrophoretischen Untersuchung der Endfraktionen zum Ausdruck (s. Fig. 6). Die Ähnlichkeit der papierchromatographischen Eigenschaften der beiden mit Ninhydrin gelbe Färbungen gebenden Substanzen (Rf 0,15 und 0,36) und das Auftreten der gelb färbenden Substanz mit dem grösseren Rf-Wert in allen Fraktionen lässt auf eine chemische Verwandtschaft dieser beiden Stoffe schliessen. Diese beiden pharmakologisch aktiven Verbindungen seien als  $\alpha$ -Verbindung (kleiner Rf-Wert) und als  $\beta$ -Verbindung (grosser Rf-Wert) bezeichnet.

Die nicht so eindeutig verlaufenen pharmakologischen Untersuchungen der Fraktionen aus den präparativen Papierchromatogrammen könnten ihre Erklärung in der Labilität einer der beiden Verbindungen finden.

Dieser zunächst nur vermutete Zusammenhang zwischen der  $\alpha$ - (evtl.  $\alpha_2$ -; siehe Seite 914) und der  $\beta$ -Verbindung ergibt sich definitiv aus folgendem Experiment: Ein Teil eines aktiven Ameisensäureeluates aus Dowex 1-X 10 (Cl<sup>-</sup>) wurde mit 0,04 N Ameisensäure im Bombenrohr zwei Stunden auf 100° erhitzt. Nach Aufarbeitung zeigte die elektropherographische Prüfung (s. Fig. 8), dass die vorher in starker Konzentration vorhandene  $\alpha$ -Verbindung verschwunden war und dafür die  $\beta$ -Verbindung in viel grösserer Konzentration auftrat. Hinweise auf einen Zerfall der  $\alpha$ -Verbindung in mehrere Bruchstücke ergaben sich in dem komplexen Gemisch nicht eindeutig.

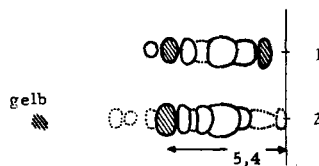


Fig. 8. Umwandlung von  $\alpha$  in  $\beta$  durch Behandlung mit HCOOH

1 = vor Behandlung mit HCOOH; 2 = nach Behandlung mit HCOOH, Sprühmittel Ninhydrin

Bei einer Wiederholung dieser Umwandlung in grösserem Maßstab erhitzte man die Substanz 2,5 Stunden auf dem siedenden Wasserbad mit 0,04 N Ameisensäure.

Das pH der Lösung blieb dabei unverändert. Aus dem Pherogramm war ersichtlich, dass die  $\alpha$ -Verbindung auch hier umgewandelt worden war.

Diese Erkenntnis erlaubte, eine endgültige Korrelation zwischen  $\beta$ -Verbindung = Muscimol und pharmakologischer Aktivität aufzustellen: In einer aktiven Fraktion aus einer Dowex 1-X 10 (Cl<sup>-</sup>)-Auftrennung wurde durch Erhitzen in verdünnter Ameisensäure wie beschrieben die  $\alpha$ - in die  $\beta$ -Verbindung umgewandelt. Das Umwandlungsprodukt und seine Begleitstoffe verteilte man darauf an Kieselgel-Celite im Lösungsmittel 26. Damit gelang eine gute Anreicherung des Muscimols. Die Reindarstellung gelang durch Chromatographie an Aluminiumoxid (s. Figur 9) und Kristalli-

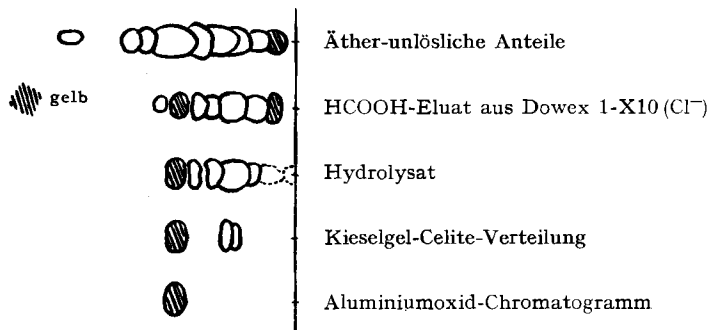


Fig. 9. *Reinigung von Muscimol*

sation aus Wasser-Methanol. Die papierchromatographisch und elektrophoretisch einheitliche Substanz wies bei 2 mg pro kg s. c. die sehr hohe Aktivität von > 1000% (Dauer der Seitenlage) auf. Damit war ein Ziel dieser Arbeit erreicht, auch wenn alles dafür spricht, dass Muscimol kein genuiner Inhaltsstoff des Fliegenpilzes ist, sondern während der Isolierung aus einer labilen Vorstufe entsteht.

**5. Präparative Isolierung von Muscimol.** – Zur Isolierung grösserer Mengen von Muscimol konnte auf Grund der gewonnenen Erfahrungen ein vereinfachter Trennungsgang angewendet werden: frisches Pilzmaterial wurde wie beschrieben mit Alkohol aufgearbeitet und darauf mit Äther entfettet (die Butanolextraktion wurde weggelassen). Nach Abpuffern mit verdünntem Ammoniak wurde die Lösung an Dowex 1-X 10 (Cl<sup>-</sup>) perkoliert. Nach gründlichem Auswaschen der Austauscherkolonne mit Wasser und Elution der aktiven Fraktionen mit verdünnter Ameisensäure wurde das gesamte erhaltene Eluat in verdünnter Ameisensäure bis zum Verschwinden der  $\alpha$ -Fraktion auf dem Wasserbad erhitzt. Nach der so erreichten Umwandlung der labilen Substanz in die stabilere wurde die Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand in 50-proz. Methanol an der 30-fachen Menge Aluminiumoxid chromatographisch aufgetrennt. Die Muscimol-haltigen Fraktionen wurden vereinigt (sie enthielten noch 5 andere, ninhydrinpositive Substanzen) und durch Verteilung an Kieselgel aus dem Gemisch Nr. 26 weiter aufgetrennt (siehe Fig. 10). Die übrigen Ninhydrin-positiven Stoffe waren bis auf Spuren eines Stoffes entfernt. Bei dem in der ersten Fraktion auftretenden Stoff mit gelber Ninhydrinfärbung handelt es sich wahrscheinlich um *Prolin*.



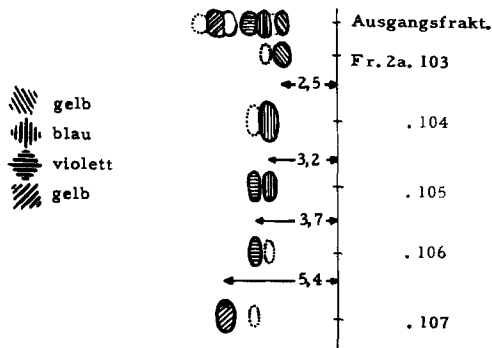


Fig. 10. *Kieselgelverteilung*  
Sprühmittel Ninhydrin

Die an Muscimol angereicherte Fraktion stellte nach dem vollständigen Abdampfen des Lösungsmittels eine ölige unangenehm riechende Masse dar. Die riechende Verunreinigung liess sich durch mehrmalige Extraktion der wässrigen Lösung mit Äther beseitigen, gleichzeitig wurde die Lösung merklich aufgehellt. Nach Behandlung mit Norit wurde sie konzentriert und mit Äthanol bis zur Trübung versetzt, worauf beim Stehen Muscimol in farblosen Kristallen (siehe Fig. 11) auskristallisierte.



Fig. 11. *Kristallisiertes Muscimol*

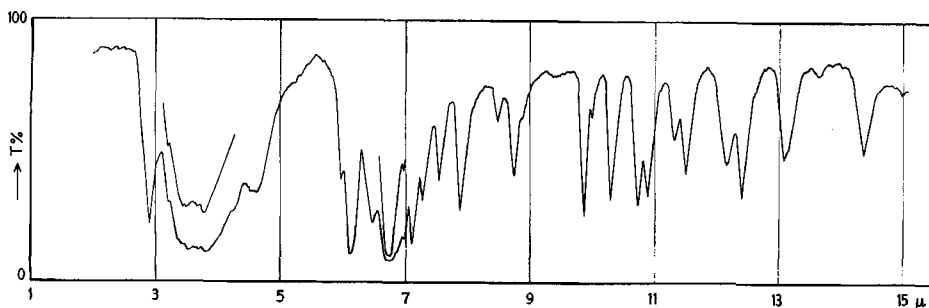


Fig. 12. *IR.-Spektrum von Muscimol (in KBr)*

**6. Eigenschaften des Muscimols.** – Das Muscimol der Formel  $C_4H_6O_2N_2$  (laut Verbrennungsanalysen und Mol.-Gew.-Bestimmungen) ist farblos und kristallisiert aus Wasser-Methanol in nadeligen Kristallen (s. Fig. 11) vom Smp. 155–156°. Es ist in Wasser sehr leicht, in Methanol schwer und in absolutem Äthanol unlöslich. In Papierchromatogrammen zeigt die Verbindung mit Ninhydrin eine intensiv gelbe Färbung, die sich nach mehreren Stunden über bräunlich nach violett verfärbt; letztere Farbe ist dann beständig. Die Gelbfärbung auf dem Papier kann zu einer halbquantitativen Bestimmung ausgenutzt werden. Mit dem GROTE-Reagens<sup>7)</sup> tritt sofort nach der Entwicklung mit Wasserdampf eine stark blaue Farbe auf. Da die Verbindung keinen Schwefel enthält – das GROTE-Reagens ist ursprünglich zum Nachweis schwefelhaltiger Substanzen entwickelt worden –, muss es sich um eine Reaktion mit einer speziellen Gruppierung handeln. Die Färbungen sind längere Zeit haltbar, wenn das Papier keine Säure enthält. Die Prüfung auf Amine fällt am Muscimol mit blauer Farbe stark positiv aus. Die unteren Nachweisgrenzen bei elektrophoretischer Untersuchung betragen ungefähr: Ninhydrin, 0,1 µg; GROTE-Reagens, 1,0 µg.

In der Papierelektrophorese (550 V, 5 mA, Puffer pH = 1,9, WHATMAN-Papier Nr. 1, Zimmertemperatur, 60 Min.) hat die Substanz eine Laufstrecke von 5,4–5,7 cm. In Papierchromatogrammen (WHATMAN Nr. 1, absteigend) betragen die Rf-Werte: mit Gemisch 14 0,35, mit Gemisch 16 0,11 und mit Gemisch 11 0,07.

Die Verbindung zeigt im UV. nur sehr kurzwellige Absorption. Ihr IR.-Spektrum ist in Fig. 12 abgebildet. Sie ist optisch inaktiv.

Die Autoren haben folgenden Personen zu danken: den Herren R. GOOD, D. MONNEY, U. BIRCHLER und P. ASCHWANDEN für Mithilfe bei den Aufarbeitungen der Fliegenpilze; der Firma J. R. GEIGY AG, Basel, für finanzielle Unterstützung; Herrn Dr. W. THEOBALD für die Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen, sowie für die Überlassung der Resultate; Herrn Dr. R. DENSS für vielfältige Hilfe.

### Experimenteller Teil

**A. Methodisches.** – *Papierchromatographie:* Verwendet wurden WHATMAN-Papier Nr. 1, 3 und 4. Cellulosepulver WHATMAN, Standard Grade.

*Lösungsmittelgemische* (die Zahlen bedeuten Vol.-Teile):

Lmg. 11: *n*-Butanol-Pyridin-Wasser, 2:1:1,

Lmg. 14: *s*-Butanol-Aethanol (95-proz.)-Eisessig-Wasser, 15:5:1:5,

Lmg. 16: *s*-Butanol-Aethanol (95-proz.)-Ammoniak aq. (verd. 1:9), 3:1:1,

Lmg. 25: *n*-Butanol-Wasser (gesättigte obere Phase),

Lmg. 26: *n*-Butanol, gesättigt mit gleichem Volumen 0,04*N* Ameisensäure, obere Phase.

*Sprühmittel:* 1) Modifiziertes DRAGENDORFF-Reagens [14].

2) Reagens auf Amine [15]. Bei Anwesenheit von primären und vor allem sekundären Aminen (eventuell auch Amid) treten sofort nach dem Sprühen intensiv blau gefärbte Flecke auf. Enthält das Papier Säuren, so können Flecke mit gelber oder grüner Farbe auftreten. Dieses Reagens spricht schon auf wenige µg der Verbindungen intensiv an.

3) GROTE-Reagens [16]. Substanzen, die mit diesem Reagens ansprechen, werden nach dem Besprühen und nach der Einwirkung von Wasserdampf blau, grün oder rot gefärbt.

5) Ninhydrin: 0,2-proz. Lösung in 95-proz. *n*-Butanol und 5-proz. Essigsäure.

6) Phenylheptatrienal. In letzter Zeit sind für den papierchromatographischen Nachweis von Indol-Verbindungen neben *p*-Dimethylaminobenzaldehyd (EHRlich-Reagens) noch Zimtaldehyd (WIELAND [17]) und *p*-Dimethylaminozimtaldehyd (HARLEY-MASON [18]) vorgeschlagen worden.

<sup>7)</sup> Auf das GROTE-Reagens zum Nachweis spezieller Inhaltsstoffe des Fliegenpilzes hatten wir bereits 1956 [8] hingewiesen.

Wir haben einige  $\omega$ -Phenyl- und  $\omega$ -Furyl-polyenale [19] auf ihre Brauchbarkeit für diesen Nachweis untersucht. Dabei zeigte Phenylheptatrienal besonders grosse Empfindlichkeit. Es bildet mit Indolen in stark saurem Bereich intensiv blau gefärbte Verbindungen. Mit anderen Verbindungsklassen, deren Natur noch zu ermitteln ist, können rote bzw. gelbe Färbungen auftreten. Wenige  $\mu\text{g}$  von Indolverbindungen lassen sich papierchromatographisch noch erfassen. Zur Ausführung der Reaktion werden die entwickelten und getrockneten Chromatogramme mit einer 0,1-proz. Lösung von Phenylheptatrienal in Methanol besprüht. Dann bringt man die Chromatogramme methanolfeucht in eine Chlorwasserstoff-Atmosphäre. Bei genügend hoher Konzentration an Chlorwasserstoff werden die Flecke von Indol-Derivaten sofort blau. Anstelle des Einbringens der Chromatogramme in eine Chlorwasserstoff-Atmosphäre kann man auch direkt mit einer methanolischen Reagenslösung besprühen, die zuvor unter Eiskühlung annähernd mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt worden war. So werden die Konturen der Flecke oft schärfer. Nachteilig ist aber die geringe Haltbarkeit der mit Chlorwasserstoff gesättigten Reagenslösung.

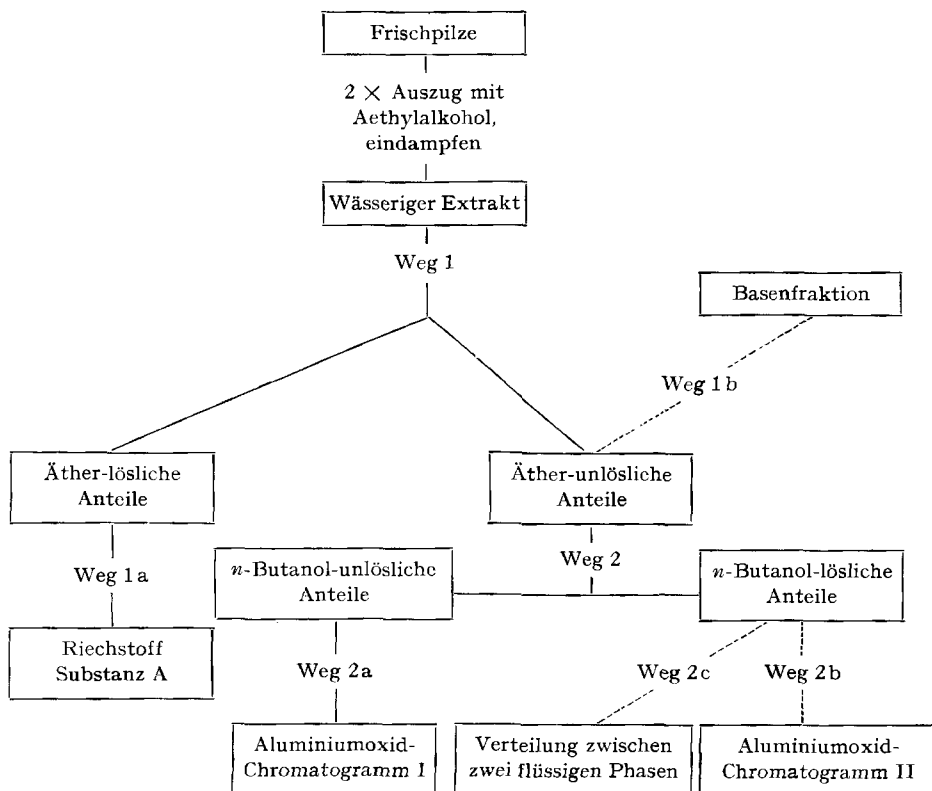
*PapierELEKTROPHORESE:* Papierstreifen  $7 \times 36$  cm; Puffer pH 1,9; Eisessig-Ameisensäure (98-proz.) – Wasser (3:1:16); Zimmertemperatur; Laufzeit 60 Min.; Spannung und Stromstärke bei WHATMAN Nr. 1 550 V, 5 mA und bei WHATMAN Nr. 3 540 V, 12 mA.

*KELLER-Reaktion* [20].

Es wurden ausserdem verwendet: *Aluminiumoxid*, neutral, «WOELM». Für Kieselgel-Celite-Verteilung: *Kieselsäure* 100 mesh nach RAMSAY-PATTERSON (MALLINCKRODT); *Celite*. Für Kieselgel-Verteilung: *Kieselgel* «MERCK», 0,2–0,5 mm, für Säulenchromatographie.

**B. Allgemeine Aufarbeitung** (s. Schema). – 457 kg frische Pilze, die man im Herbst 1958 im Südschwarzwald gesammelt hatte, wurden sofort nach Eingang in einem Turmix unter 95-proz. Äthanol zu einem feinen Brei zerhackt. Nach mehreren Std. Stehen nutschte man den

*Allgemeines Aufarbeitungsschema*



alkoholisch-wässrigen Brei ab und behandelte den Rückstand erneut mit Äthanol. Im Durchschnitt verbrauchte man 1,5 l Äthanol pro kg frischer Pilze.

Die Filtrate waren zu Anfang durch den Farbstoff «Muscarufin» intensiv rot gefärbt, verfärbten sich jedoch bald nach braun. Die Lösung wurde in einem Dünnenschicht-Eindampfer (Labortyp der Firma LUWA AG, Zürich) stark konzentriert. Bei Teilvakuum regulierte man den Zufluss derart, dass die Temperatur des ausfließenden Konzentrates zwischen 25° und 30° lag. Die so erhaltenen 40 l Konzentrat, die nur noch wenig Äthanol enthielten, wurden bei 12 Torr im Rotationsverdampfer zu sirupöser Konsistenz eingeeengt. Zum Sirup gaben wir so viel Wasser, als zur Lösung erforderlich war (ca. 20-proz. Lösung) und ätherten dann diese Lösung aus (Weg 1). Hier war für 1 l 20-proz. Extraktlösung 1 l Äther erforderlich. Nach Abdampfen des Äthers blieben die *ätherlöslichen Anteile* als braune ölige Masse zurück. Die *ätherunlöslichen Anteile* der Wasserphase konzentrierte man im Rotationsverdampfer zu einer ca. 50-proz. Lösung, die man nach Weg 2 aufarbeitete.

*Weg 2.* (Extraktion mit wassergesättigtem *n*-Butanol). 1 l einer 40-proz. wässrigen Lösung der ätherunlöslichen Anteile wurden mit je 500 ml wassergesättigten *n*-Butanols so oft extrahiert, bis die KELLER-Reaktion mit der oberen Phase negativ ausfiel. Dazu waren 5–6 l der Butanol-Phase erforderlich. Nach Abdampfen (40°, 12 Torr) verblieben 92,5 g *n*-butanollöslicher Anteile als undurchsichtige, braune, zähe Masse. Die *n*-butanolunlöslichen Anteile wogen 310 g.

*Behandlung des n-Butanollöslichen (Weg 2b):* Aluminiumoxidchromatogramm II. Die Lösung von 30 g *n*-butanollöslichen Anteilen in 150 ml Lösungsmittelgemisch 25 wurde auf eine mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch klimatisierte Säule von 2,6 kg neutralem Aluminiumoxid aufgetragen und mit diesem Lösungsmittel eluiert. Es wurden je Glas 20 ml aufgefangen. Bis Glas 90 blieb die KELLER-Reaktion negativ, dann trat kirschrote Reaktion auf, deren Intensitätsmaximum zwischen den Gläsern 110 und 120 lag. Zwischen den Gläsern 550 und 780 war die KELLER-Reaktion violett. Die auslaufende Lösung zeigte unter UV.-Licht zwischen den Gläsern 70 und 115 grau-grüne, zwischen 115 und ca. 630 blaue, zwischen 630 und 770 intensiv grüne und ab Glas 770 wieder blaue Fluoreszenz.

In der Säule war eine scharfe gelbe Zone sichtbar, die nur sehr langsam wanderte.

Die Fraktionen wurden nach dem Ergebnis der Papierchromatographie (siehe Figur 13) zu Gruppen vereinigt. Man untersuchte jedes 5. Glas. (Sprühmittel: Phenylheptatrienal, Ninhydrin und Dragendorff.)

Fr. 2b	1 Gl.	1– 69	1,44 g	6 Gl.	366–500	1,77 g
	2 Gl.	70– 89	0,50 g	7 Gl.	501–540	0,50 g
	3 Gl.	90–130	0,92 g	8 Gl.	541–700	4,40 g
	4 Gl.	131–152	1,46 g	9 Gl.	701–780	2,30 g
	5 Gl.	153–365	8,80 g			

#### *Narkosepotenzierung Maus:*

Fr. 2b:	2 D.d.S. <sup>8)</sup>	50 mg/kg s.c. – 50%	3 D.d.S.	40 mg/kg s.c. – 100%
	A.T.S. <sup>8)</sup>	50 mg/kg s.c. – 73%	A.T.S.	40 mg/kg s.c. – 100%

*Behandlung des n-Butanolunlöslichen (Weg 2a):* Aluminiumoxidchromatogramm I. 235 g *n*-Butanolunlösliches wurden in 500 ml 50-proz. Methanol gelöst und über 235 g neutralem Aluminiumoxid filtriert. Man wusch so lange mit dem gleichen Lösungsmittel nach, bis das Filtrat substanzfrei war. Nach Eindampfen des Filtrates verblieben 208 g dicker brauner Sirup. Die Lösung des Sirups in 300 ml 50-proz. Methanol wurde auf eine Säule mit 3,5 kg neutralem Aluminiumoxid aufgetragen und dann mit demselben Lösungsmittel entwickelt. Fraktionen von je 25 ml. Die Zusammennahme der Fraktionengläser erfolgte schematisch zu je 30 Gläsern:

Fr. 2a:	12 Gl.	1– 30	4,6 g	17 Gl.	151–180	3,2 g
	13 Gl.	31– 60	102,0 g	18 Gl.	181–210	2,4 g
	14 Gl.	61– 90	17,1 g	19 Gl.	211–240	2,3 g
	15 Gl.	91–120	9,8 g	20 Gl.	241–281	3,25 g
	16 Gl.	121–150	4,6 g	21 Eluat	6 l	8,2 g

<sup>8)</sup> D.d.S. = % Änderung der Dauer der Seitenlage; A.T.S. = % Änderung der Anzahl Tiere in Seitenlage.

Übersichtschromatogramme  
Aluminiumoxid-Chromatogramm II

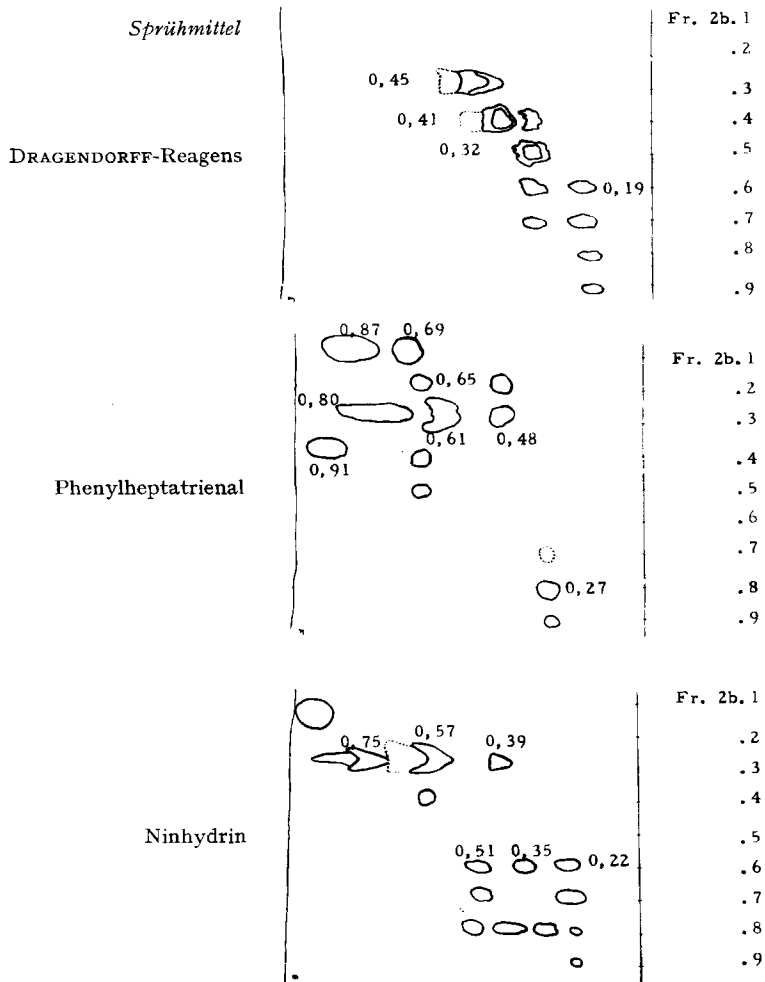


Fig. 13. Lösungsmittelgemisch 14, WHATMAN Nr. 1, absteigend

Narkosepotenzierung Maus:

Fr. 2a: 12 D.d.S. 50 mg/kg s.c. + 283%	17 D.d.S. 50 mg/kg s.c. + 150%
A.T.S. 50 mg/kg s.c. + 11%	A.T.S. 50 mg/kg s.c. + 11%
13 D.d.S. 50 mg/kg s.c. + 133%	18 D.d.S. 50 mg/kg s.c. 0%
A.T.S. 50 mg/kg s.c. - 26%	A.T.S. 50 mg/kg s.c. + 75%
14 D.d.S. 50 mg/kg s.c. + 183%	19 D.d.S. 50 mg/kg s.c. - 23%
A.T.S. 50 mg/kg s.c. 26%	A.T.S. 50 mg/kg s.c. + 25%
15 D.d.S. 50 mg/kg s.c. ± 0%	20 D.d.S. 50 mg/kg s.c. - 11%
A.T.S. 50 mg/kg s.c. - 26%	A.T.S. 50 mg/kg s.c. + 25%
16 D.d.S. 50 mg/kg s.c. + 167%	21 D.d.S. 50 mg/kg s.c. - 23%
A.T.S. 50 mg/kg s.c. + 83%	A.T.S. 50 mg/kg s.c. - 25%

*Ionen austauscher-Behandlung*

- a) Amberlite IRC-50 (H<sup>+</sup>): Säule 2 × 20 cm, 680 mg 2a. 9 in Wasser gelöst.
  - 1) Wasser-Eluat 0,510 g Fr. 2a. 22
  - 2) 0,1 N Ameisensäure-Eluat 0,115 g Fr. 2a. 23
- b) Dowex 1 – X 10 (Cl<sup>-</sup>): Säule 2 × 20 cm, 483 mg 2a. 9 in Wasser gelöst.
  - 1) Wasser-Eluat 0,360 g Fr. 2a. 24
  - 2) 0,1 N Ameisensäure-Eluat 0,062 g Fr. 2a. 25
  - 3) 0,1 N Salzsäure-Eluat 0,027 g Fr. 2a. 26
- c) Dowex 1-X10(Cl<sup>-</sup>): Säule 2 × 20 cm, 700 mg 2a. 10 in Wasser gelöst
  - 1) Wasser-Eluat 0,395 g Fr. 2a. 27
  - 2) 0,1 N Ameisensäure-Eluat 0,249 g Fr. 2a. 28
  - 3) 0,1 N Salzsäure-Eluat 0,014 g Fr. 2a. 29
- d) Amberlite IRC-50(H<sup>+</sup>): Säule 2 × 20 cm, 750 mg 2a. 10 in Wasser gelöst
  - 1) Wasser-Eluat 0,386 g Fr. 2a. 30
  - 2) 0,1 N Ameisensäure-Eluat 0,300 g Fr. 2a. 31
- e) Amberlite IRA-400 (OH<sup>-</sup>): Säule 2 × 20 cm, 600 mg 2a. 10 in Wasser gelöst
  - 1) Wasser-Eluat 0,234 g Fr. 2a. 32
  - 2) 0,1 N Ammoniak-Eluat 0,004 g Fr. 2a. 33
  - 3) 1 N Ammoniak-Eluat Spuren Fr. 2a. 34
- f) Dowex 50-WX12 (H<sup>+</sup>): Säule 2 × 20 cm, 450 mg 2a. 10 in Wasser gelöst
  - 1) Wasser-Eluat 0,148 g Fr. 2a. 35
  - 2) 0,1 N Ameisensäure-Eluat 0,022 g Fr. 2a. 36
  - 3) 0,1 N Salzsäure-Eluat 0,028 g Fr. 2a. 37
- g) Dowex 50(H<sup>+</sup>): Säule 2 × 27 cm, 410 mg 2a. 10 in Wasser gelöst
  - 1) Wasser-Eluat 0,113 g Fr. 2a. 38
  - 2) 0,1 N Ameisensäure-Eluat 0,109 g Fr. 2a. 39
  - 3) 0,1 N Salzsäure-Eluat 0,075 g Fr. 2a. 40

*Narkosepotenzierung Maus:*

Fr. 2a: 22 D.d.S. 10 mg/kg s.c.	—	50 mg/kg s.c.	+ 140%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 85%
23 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 80%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 52%
24 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 220%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 100%
25 D.d.S. 10 mg/kg s.c.	+ 160%	50 mg/kg s.c.	+ 900%
A.T.S. 10 mg/kg s.c.	>+ 200%	50 mg/kg s.c.	>+ 233%
26 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 260%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	— 33%
27 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 240%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 167%
28 D.d.S. 10 mg/kg s.c.	+ 320%	50 mg/kg s.c.	+ 1980%
A.T.S. 10 mg/kg s.c.	+ 167%	50 mg/kg s.c.	+ 183%
29 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	—
A.T.S.	—	—	—
30 D.d.S. 10 mg/kg s.c.	+ 200%	50 mg/kg s.c.	+ 960%
A.T.S. 10 mg/kg s.c.	>+ 233%	50 mg/kg s.c.	>+ 233%
31 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 60%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 67%
32 D.d.S. 10 mg/kg s.c.	—	50 mg/kg s.c.	+ 120%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 67%
33 D.d.S.	—	—	—
A.T.S.	—	—	—
34 D.d.S.	—	—	—
A.T.S.	—	—	—

Fr. 2a: 35 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 33%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 11%
36 D.d.S. 10 mg/kg s.c.	> + 2900%		—
A.T.S. 10 mg/kg s.c.	> + 270%		—
37 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 83%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 85%
38 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	- 100%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	- 100%
39 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 67%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 48%
40 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 50%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	+ 159%

*Cellulose-Chromatogramm.* Herkunft der Ausgangsfraktion: *n*-Butanolunlöslicher Rückstand wurde nach Filtration über Aluminiumoxid in der beschriebenen Weise mit Amberlite IRC-50 (H<sup>+</sup>) behandelt. Der Rückstand des Wassereluates ging in eine Behandlung mit Dowex 1-X10 (Cl<sup>-</sup>). Das hieraus hervorgehende Ameisensäureeluat wurde in das Cellulose-Chromatogramm eingesetzt (4,9 g). Wir verwendeten 1000 g mit Lösungsmittelgemisch 11 klimatisierte Cellulose. Aufgefangen wurden Fraktionen von je 25 ml. Die Kontrolle erfolgte papierchromatographisch (WHATMAN Nr. 1, Lmg 11, absteigend; Ninhydrin als Sprühmittel). Die angegebenen Rf-Werte beziehen sich auf die Hauptfleckle.

Fr. 2a: 61 Gl.	1- 90	1,43 g	Rf 0,65
62 Gl.	91- 95	0,17 g	Rf 0,65-0,45-0,22
63 Gl.	96-107	0,28 g	Rf 0,40-0,22
64 Gl.	108-115	0,26 g	Rf 0,35-0,22
65 Gl.	116-128	0,80 g	Rf 0,32-0,22
66 Gl.	129-140	0,63 g	Rf 0,24
67 Gl.	141-164	0,64 g	Rf 0,24-0,03
68 Gl.	165-190	0,30 g	Rf 0,16-0,03
69 Gl.	191-200	0,10 g	Rf 0,09-0,03
70 Gl.	201-260	0,45 g	Rf 0,07-0,03
71 Gl.	261-315	0,21 g	Rf 0,07-0,03

*Narkosepotenzierung Maus:*

Fr. 2a: 68 D.d.S. 10 mg/kg s.c.	—	50 mg/kg s.c.	- 100%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	- 100%
69 D.d.S.	—	50 mg/kg s.c.	- 100%
A.T.S.	—	50 mg/kg s.c.	- 100%
70 D.d.S. 10 mg/kg s.c.	+ 240%	50 mg/kg s.c.	+ 1820%
A.T.S. 10 mg/kg s.c.	- 50%	50 mg/kg s.c.	+ 100%
71 D.d.S. 10 mg/kg s.c.	+ 1180%		—
A.T.S. 10 mg/kg s.c.	> + 150%		—

*Präparative Papierchromatographie und Papierelektrophorese:* 0,1 g der Fraktion 2a.70 aus dem Cellulose-Chromatogramm, in 0,5 ml Methanol gelöst, wurde nach beschriebener Technik an mehreren Bogen WHATMAN Nr. 3 im Lösungsmittelgemisch 14 absteigend chromatographiert. Entwicklung der Kontrollstreifen mit dem Reagens auf Amine und dem GROTE-Reagens. Anschliessend elektrophoretische Auftrennung der Substanzen mit Rf-Wert bis 0,5. Resultat (Aminreagens):

		Papier- Elektrophorese	Färbung mit Aminreagens	Rf Lgm 14	Färbung mit GROTE-Reagens
Zone 1	11,3 mg	0,2-1,0 cm	blau	0,07	blau $\alpha$
Zone 2	—	1,5-1,9 cm	gelb	(0,09)-0,33	blau
Zone 3	15,7 mg	3,0-4,0 cm	blau	0,11	blau $\alpha_2$
Zone 4	8,2 mg	5,2-6,2 cm	blau	0,33	blau $\beta$
Zwischenzonen	49,4 mg				

Die Übereinstimmung der Rf-Werte der Zonen 2 und 4 war zunächst nicht erklärbar.

*Erkennen eines Zusammenhanges zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Verbindung.* – a) Vorversuch zu Figur 8 (S. 916): 2 mg Ameisensäureeluat aus der Austauschbehandlung an Dowex 1-X 10 ( $\text{Cl}^-$ ) wurden mit 0,5 ml 0,04N Ameisensäure in einem kleinen Bombenrohr 2 Std. auf 100° erwärmt. Nach Abdampfen der Säure zeigte die papierchromatographische und elektrophoretische Untersuchung des Rückstandes, dass die  $\alpha$ -Verbindung verschwunden war, dafür aber die Konzentration der  $\beta$ -Verbindung zugenommen hatte.

b) Ein analoges Resultat wurde an einer weitgehend angereicherten  $\alpha$ -Fraktion erzielt.

c) Präparativer Versuch an den ätherunlöslichen Anteilen (s. Figur 9, S. 917): 1,65 g Ätherunlösliches wurden in 40 ml 0,04N Ameisensäure 2,5 Std. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Im Gegensatz zur Ausgangslösung besass die erhaltene Lösung einen unangenehmen Geruch, der aber nach dem Abdampfen der Säure verschwand. Im erhaltenen Rückstand (1,40 g) war elektrophoretisch keine  $\alpha$ -Verbindung mehr festzustellen. Er diente zu einem Vorversuch zur Isolierung des kristallisierten Muscimols.

**C. Isolierung und Kristallisation des Muscimols.** – a) *Dowex-Behandlung:* 600 g ätherunlösliche Anteile wurden in zwei Portionen über je 4,2 l Dowex 1-X 10 ( $\text{Cl}^-$ ) nacheinander mit Wasser und 0,1N Ameisensäure perkoliert, was insgesamt 15 l Wasser und 10 l 1N Ameisensäure erforderte. Nach Eindampfen verblieben: 310 g Wasser-Eluat, Fraktion 2a. 98, und 80 g Ameisensäureeluat, Fraktion 2a 99.

Die 80 g Säure-Eluat wurden in 500 ml 0,04N Ameisensäure 2,5 Std. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Eindampfen dieser Lösung löste man den Rückstand in 200 ml 50-proz. Methanol und filtrierte mit dem gleichen Lösungsmittel über 800 g neutralem Aluminiumoxid bis zur Substanzfreiheit des Ablaufenden. Abdampfrückstand des Filtrates 64 g.

b) *Aluminiumoxidchromatographie:* 64 g Filtratrückstand in 250 ml 50-proz. Methanol wurden auf eine mit dem gleichen Lösungsmittel klimatisierte Säule von 2 kg neutralem Aluminiumoxid aufgetragen und mit 50-proz. Methanol eluiert. Das Eluat (Gläser zu je 25 ml) wurde nach Ergebnis der Papierelektrophorese zusammengenommen, wobei die  $\beta$ -Verbindung in der dritten Fraktion neben mindestens noch fünf anderen Stoffen (Ninhydrin-positiv) angereichert war: Fr. 2a. 100, Gl. 14–104, 18,8 g; Fr. 2a. 101, Gl. 105–300, 24,7 g; Fr. 2a. 102, Gl. 301–430, 3,9 g.

c) *Kieselgelverteilung:* 350 g Kieselgel wurden mit der unteren Phase des Lösungsmittelgemisches 26 in eine Säule eingeschlämmt und anschliessend mit der oberen Phase des gleichen Lösungsmittelgemisches klimatisiert bis der Auslauf klar war. Das Kieselgel sah dann homogen aus. 3,8 g der Fraktion 2a. 102 versetzte man mit 10 ml der oberen Phase des Lösungsmittelgemisches 26 und trug ohne auf die Phasentrennung zu achten auf die Säule auf. Fraktionen zu je 15 ml; papier-elektrophoretische Kontrolle (Ninhydrin):

Fr. 2a: 103, Gl. 10–35	0,45 g	Stärkste Ninhydrinreaktion bei
104, Gl. 36–90	0,96 g	3,2 cm
105, Gl. 91–115	0,69 g	3,2–3,7 cm
106, Gl. 116–170	0,53 g	3,7 cm
107, Gl. 171–340	0,53 g	5,4 cm

Die Fraktion 2a. 107 löste man in 10 ml Wasser und zog die Lösung 10mal mit je 10 ml Äther aus. Der durch Eindampfen erhaltene ätherunlösliche Anteil (0,41 g) stellte eine helle, amorphe Masse von weitgehend reinem Muscimol dar.

d) *Kristallisation des Muscimols:* Die wässrige Lösung von 500 mg Rohmuscimol wurde mit Norit entfärbt und dann stark eingeeengt. Zur heissen Lösung gab man Äthanol bis zur Trübung, impfte an und liess langsam abkühlen. Man erhielt 220 g schwach gelbliches Muscimol, das bei erneuter Umkristallisation aus sehr wenig Wasser und Methanol farblose, spitze Nadeln vom Smp. 155–156° (Zers.) ergab. Äq. Gew. gef. 117 (potentiometrische Titration); Mol.-Gew. gef. 108 (kryoskopisch in Wasser).

$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_2$	Ber. C 42,10	H 5,30	N 24,55	O 28,05%
(114,10)	Gef. „ 42,09; 42,07	„ 5,71; 5,84	„ 23,83; 24,45	„ 28,65%

Übereinstimmende Verbrennungswerte waren nur nach guter Trocknung im Hochvakuum (24 Std., 70°, 10<sup>-3</sup> Torr) zu erzielen.



## ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Isolierung einer Substanz mit stark narkosepotenzierender Wirkung, des *Muscimols*  $C_4H_6O_2N_2$ , Smp. 155–156°, aus dem Fliegenpilz (*Amanita muscaria* (L. ex FR.) HOOKER) beschrieben. Die Substanz hat salzartigen Charakter (Betain). Muscimol ist kein genuiner Inhaltsstoff des Fliegenpilzes, sondern entsteht bei der Aufarbeitung aus einer labilen Vorstufe, die ähnliche pharmakologische Wirkungen aufweist. Der Nachweis dieser Verbindungen in Papierchromatogrammen und in Elektropherogrammen wird beschrieben. Sie sprechen mit Ninhydrin *gelb*, mit GROTE's Reagens *blau* an. Als empfindliches Nachweismittel für Indole auf Papierchromatogrammen wird Phenylheptatrienal eingeführt.

Organisch-Chemisches Institut  
der Universität, Zürich

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. E. ROSENKRANZ, K. ALLNER, R. GOOD, W. v. PHILIPSBORN & C. H. EUGSTER, *Helv.* **46**, 1259 (1963).
- [2] Übersichten siehe z. B. bei A. HOFMANN, *Acta Physiol. Pharmacol. Neerlandica* **8**, 240 (1959); *Svensk Kemisk Tidskrift* **72**, 12 (1960).
- [3] R. HEIM & R. G. WASSON «Les champignons hallucinogènes du Mexique», Paris 1958.
- [4] R. HEIM, «Les actions nerveuses provoquées par les champignons», *Science et Nature* **1958**, Nr. 29; «Le syndrome narcoticien chez les champignons à action cérébrale, Histoire de la médecine, **1958**, Nr. 8; «Champignons toxiques et hallucinogènes», Paris 1963; O. GESSNER, «Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa», *Giftpilze* S. 667 ff; Heidelberg 1953.
- [5] C. H. EUGSTER, *Helv.* **39**, 1002 (1956); V. P. & R. G. WASSON, *Mushrooms, Russia and History*, New York 1957; J. RAMSBOTTOM, *Mushrooms and Toadstools*, London 1959;
- [6] C. H. EUGSTER & P. G. WASER, *Experientia* **10**, 298 (1954).
- [7] C. H. EUGSTER, *Vierteljahresschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich* **104**, 441 (1959); *Revue mycol. (Paris)* **24**, 369 (1959).
- [8] C. H. EUGSTER, *Helv.* **39**, 1004, 1005, 1015 (1956).
- [9] A. R. GAGNEUX, F. HÄFLIGER & C. H. EUGSTER, *Tetrahedron Letters*, im Druck.
- [10] R. GOOD, G. F. R. MÜLLER & C. H. EUGSTER, *Helv.* **48**, S. 927 (1965).
- [11] H. FRITZ, A. R. GAGNEUX, R. ZBINDEN & C. H. EUGSTER, *Tetrahedron Letters*, im Druck.
- [12] W. THEOBALD & R. DOMENJOZ, *Arzneimittelforschung* **9**, 385 (1959).
- [13] E. GEISS, *Z. physiol. Chem.* **308**, 74 (1957).
- [14] H. THIES & F. W. REUTHER, *Naturwissenschaften* **1954**, 230.
- [15] B. FRANCK, *Chem. Ber.* **91**, 2803 (1958).
- [16] I. W. GROTE, *J. biol. Chemistry* **93**, 25 (1931); W. A. LANDMANN, M. P. DRAKE & J. DILLAHA, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 3638 (1953).
- [17] TH. WIELAND & L. BAUER, *Angew. Chem.* **63**, 511 (1951).
- [18] J. HARLEY-MASON & A. A. P. G. ARCHER, *Biochem. J.* **69**, 60 P (1958).
- [19] J. SCHMITT, *Liebigs Ann. Chem.* **547**, 270 (1941).
- [20] C. C. KELLER, *Schweiz. Wochenschr. Chem. & Pharm.* **34**, 65 (1896), zitiert von RIEDER & BÖHMER [21]; A. HOFMANN, *Helv.* **37**, 314 (1954).
- [21] H. P. RIEDER & M. BÖHMER, *Experientia* **14**, 463 (1958).