

98. Isolierung und Charakterisierung von Prämuscimol und Muscazon aus *Amanita muscaria* (L. ex Fr.) HOOKER¹⁾

von R. Good, G. F. R. Müller und C. H. Eugster

(5. IV. 65)

In der vorangehenden Abhandlung dieser Reihe [1] ist die Isolierung des *Muscimols* aus Fliegenpilzen beschrieben worden. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass diese Verbindung aus einer labilen Vorstufe bei der Aufarbeitung entsteht. Diese Vorstufe wurde bereits durch papierchromatographisches, elektrophoretisches und pharmakologisches Verhalten charakterisiert. Sie zeigt, wie Muscimol, intensive Gelbfärbung mit Ninhydrin, spricht auf GROTE-Reagens blau an und ist im Narkosepotenzierungstest wirksam. Wir bezeichnen diese Substanz in der Folge mit *Prämuscimol*. Die Isolierung in kristallisierter Form gelang uns nach zahlreichen Versuchen erst mit frischem Pilzmaterial (Ernte Herbst 1962), das sehr schonend aufgearbeitet worden war. Durch sorgfältige Chromatographie der erhaltenen wasserlöslichen Anteile am Ionenaustauscher Dowex 50-W X 12 (H⁺) konnte der Hauptteil der Begleitstoffe abgetrennt werden. Elution mit verdünnter Ameisensäure lieferte zwei dicht aufeinanderfolgende, mit Ninhydrin *gelb* reagierende Substanzen, von denen die erste das gesuchte *Prämuscimol*²⁾ und die zweite eine weitere neue Substanz darstellt, die wir mit *Muscazon* bezeichnen wollen²⁾. Eine vollständige Trennung der beiden Stoffe war allerdings meist nur durch mehrfach wiederholte Chromatographie zu erreichen.

Prämuscimol (C₅H₈O₅N₂) gibt beim vorsichtigen Umkristallisieren aus Wasser farblose Kristalle vom Smp. 145° (Zers.). Von den 8 Wasserstoffatomen werden 6 beim Lösen in D₂O sofort ausgetauscht. Die Verbindung ist optisch inaktiv. Sie absorbiert im UV.-Spektrum kurzwellig: λ_{max} 210 nm ($\epsilon = 6150$) bei pH ca. 4; 208/240 nm ($\epsilon = 6260$ bzw. 2420) bei pH ca. 6–7; 212 nm ($\epsilon = 6370$) bei pH ca. 12. Die bereits erwähnte intensiv gelbe Farbreaktion mit Ninhydrin verändert sich beim Stehen über bräunlich nach rotviolett. Den Namen Prämuscimol haben wir der neuen Verbindung gegeben, weil sie leicht in Muscimol (–H₂O, –CO₂) übergeführt werden kann. Diese Umwandlung kann schon beim Auftragen von Substanzflecken auf Cellulose zur Papierchromatographie eintreten.

Muscazon (C₅H₈O₄N₂) ist stabiler und kann ohne besondere Schwierigkeiten aus heissem Wasser umkristallisiert werden. Es hat keinen Schmelzpunkt, sondern zersetzt sich ab 190° unter Dunkelfärbung. Vier der sechs Protonen lassen sich mit milder Deuteriumoxidbehandlung austauschen. Die Verbindung ist ebenfalls optisch inaktiv. Sie absorbiert im UV. wie folgt: λ_{max} 212/300 nm ($\epsilon = 8750/64$) bei pH ca. 6; 220 nm breit ($\epsilon = 7460$) bei pH ca. 12. Die Farbreaktionen entsprechen weitgehend denen von Prämuscimol, die gelbe Farbe mit Ninhydrin ist allerdings länger beständig als bei Prämuscimol. Papierchromatographische und papierelektrophoretische Daten sowie Farbreaktionen s. Tabelle 1.

¹⁾ 19. Mitteilung über Inhaltsstoffe von Fliegenpilzen, 18. Mitteilung [1].

²⁾ In der 18. Mitteilung [1] als α -Verbindung (= Prämuscimol) und als α_2 -Verbindung (= Muscazon) bezeichnet.

Tabelle 1. *Analytische Eigenschaften von Muscimol, Prämuscimol und Muscazon*

	Muscimol	Prämuscimol	Muscazon
Rf (Lgm 14 [1], WHATMAN Nr. 1)	0,34–0,36	0,16–0,20	0,06–0,10
Färbung mit Ninhydrin	gelb → violett	gelb → violett	gelb → violett
Färbung mit GROTE-Reagens	blau	blau	blau
Elektrophorese (WHATMAN Nr. 1, pH 1,9; 5 mA, 550 V, 2 h)	ca. 70 mm	ca. 15 mm	ca. 21 mm

Aus 700 kg Frischpilzen der Ernte 1962 wurden 215 g kristallisiertes Prämuscimol erhalten, d. h. ca. 0,03%. Da Verluste bei der Aufarbeitung unvermeidlich sind, darf der Gehalt im Frischpilz auf 0,05% geschätzt werden. Die Sommerpilze scheinen mehr Prämuscimol zu enthalten als die Herbstpilze. Prämuscimol hat starke narkosepotenzierende Wirkung. Wenn man den hohen Wassergehalt der Frischpilze berücksichtigt, stellt es demnach einen wesentlichen Inhaltsstoff des Fliegenpilzes dar.

Muscazon kann in ähnlicher Ausbeute erhalten werden, doch scheint sein Gehalt stark von äusseren Bedingungen abzuhängen. Darüber sind breitere Untersuchungen geplant.

Mehrmals konnten wir in frischen Pilzen bei sorgfältiger Aufarbeitung kein Muscimol, sondern nur Prämuscimol und Muscazon feststellen. Muscimol scheint demnach kein genuiner Inhaltsstoff des Fliegenpilzes zu sein, sondern dürfte bei der Aufarbeitung aus Prämuscimol entstehen.

Über Struktur und Synthese dieser Verbindungen werden wir später berichten.

Zusatz bei der Korrektur (9.5.65): Prämuscimol ist inzwischen aus *Amanita muscaria*, *A. pantherina* und *A. strobiliformis* von TAKEMOTO *et al.* [2] ebenfalls isoliert und strukturell aufgeklärt worden. Die von den japanischen Autoren gewählte Bezeichnung «Ibotensäure» hat Priorität. Synthese vgl. GAGNEUX, HÄFLIGER, MEIER & EUGSTER [3].

Die Autoren danken den Herren P. ASCHWANDEN und H. J. LEUENBERGER für Hilfe bei den Pilzaufarbeitungen, Herrn Dr. R. DENSS für vielfältige Hilfe und der J. R. GEIGY AG, Basel, für finanzielle Unterstützung.

Experimentelles. – 1) *Aufarbeitung der Ernte 1962* (ca. 700 kg Frischpilze). Die frischen Pilze wurden mit Äthanol im Turmix zu einem dicken Brei zerschlagen. Nach mehrstündigem Stehen wurde durch aufgehängte Jutesäcke filtriert → Filtrat. Der Filtrationsrückstand wurde in einer Obstpresse vollständig ausgepresst. Als Presstücher wurden Koliertücher in Verbindung mit Terylen-Tüll verwendet. Der Preßsaft wurde mit dem Filtrat vereinigt. Wie papierchromatographische Tests zeigten, konnten aus dem Presskuchen durch Anrühren mit Wasser und Auspressen weitere Anteile mit Wirksubstanz gewonnen werden. Hierauf wurde der Rückstand verworfen. Die vereinigten Filtrate wurden im Luwa-Dünnschichtverdampfer auf ca. $\frac{1}{3}$ konzentriert. Die Konzentrattemperatur wurde dabei immer unter 40° gehalten. Das Konzentrat war weitgehend alkoholfrei.

2) *Auftrennung am Ionenaustauscher*: Austauscher: 3,5 kg Dowex 50 W X 12 (50/100 mesh H⁺-Form), neutralgewaschen, neu oder einmal regeneriert. Säule ca. 12 cm Durchmesser, ca. 60 cm hoch.

Konzentrat: Ca. 1,7 kg Trockensubstanz in 10–20 l Totalvolumen, nicht entfettet.

Das Konzentrat wird unverdünnt mit einer Geschwindigkeit von ca. 1 l pro h einlaufen gelassen. Man beobachtet gelbe Fettstoffausscheidungen am oberen Ende der Säule; die Fettstoffe wandern nicht. Der braune Auslauf ist stark sauer (pH 1). Nach dem Einlaufen des Konzentrats

wird mit Wasser (ca. 15–20 l) gewaschen, bis der Auslauf neutral und annähernd farblos ist. Beim Eluieren mit Wasser breitet sich eine rötliche Zone über die ganze Säule aus. Auslauf und Wassereluat werden nach Prüfung (Elektrophorese) auf einen eventuellen Durchbruch von Prämuscimol verworfen. Hierauf wird der Austausch mit 2N Ameisensäure (hergestellt aus 85-proz. techn. Ameisensäure) eluiert. Dieses Eluat wird laufend elektrophoretisch untersucht. Die ersten 10–30 l enthalten kein Prämuscimol und werden verworfen. Reines Prämuscimol (Muscazon-frei) läuft von ca. 10 bis 45 l aus, dann folgt eine Mischfraktion mit viel Prämuscimol neben etwas Muscazon und anderen Aminosäuren (ca. 30–45 l). Es wird bis zur prakt. vollständigen Prämuscimol/Muscazon-Freiheit eluiert (Gesamtverbrauch an 2N Ameisensäure ca. 70 l). Die Ameisensäure-Eluate werden im Rotationsverdampfer bei 40° eingedampft. Eine um nur 5° höhere Temperatur bewirkt schon eine stärkere Umwandlung des Prämuscimol in Muscimol.

3) *Die Reinsubstanzen.* – *Prämuscimol:* Die bis auf 100–300 ml eingedampften Eluate werden gekühlt und die kristalline Abscheidung durch Abnutschen isoliert. Das hellgelbe Kristalliat wird kurz mit kaltem Wasser gewaschen, es ist bereits weitgehend reines Prämuscimol. Das erhaltene stark saure Filtrat enthält noch etwas Prämuscimol, daneben jedoch viele Begleitstoffe; nach dem Eindampfen bleibt ein braungelbes Öl zurück, aus dem sich nur noch minimale Mengen an krist. Substanz gewinnen lassen. Die Mutterlauge wird deshalb gar nicht weiter bearbeitet, sondern zur Feinauftrennung zurückbehalten.

Rohes Prämuscimol wird in der notwendigen Menge Wasser unter kurzem Erwärmen auf 50–60° gelöst. Die filtrierte Lösung wird im Rotationsverdampfer bis zur beginnenden Ausfällung eingengt. Der Niederschlag wird durch kurzes Erwärmen zum grössten Teil wieder gelöst. Beim Abkühlen fällt das Prämuscimol als fast weisses Pulver aus. Die Mutterlauge wird nochmals bis zur beginnenden Ausfällung eingedampft; das dabei erhaltene Nachkristalliat ist ebenfalls noch ziemlich reines Prämuscimol. Die Mutterlauge wird mit der Mutterlauge von vorher vereinigt und an einer neuen Säule nochmals gereinigt. Ausbeute an krist. reinem Prämuscimol: 5–8 g.

Mutterlauge und Mischfraktion (20–30 g z. T. kristalline Trockensubstanz) enthalten schätzungsweise nochmals 10–20 g Prämuscimol. Sie gelangen zusammen in eine *Feinauftrennung*: 500 g Dowex 50 W X 12 (50/100 mesh H⁺), neutral gewaschen. Säule 4,5 cm Durchmesser, 40 cm hoch. 50–60 g Trockensubstanz (Mischfraktion, Mutterlaugen) gelöst in 1–2 l Wasser aufgetragen. Nach dem Einlaufen wird mit 2–5 l Wasser neutral gewaschen. Das Wassereluat wird nach Prüfung auf Durchbruch verworfen. Hierauf wird mit 2N Ameisensäure eluiert. Dieses Eluat wird auf dem Fraktionensammler in Gläsern zu 400–500 Tropfen (ca. 35 ml) aufgefangen.

Gl. 1 bis etwa 100 enthalten noch kein Prämuscimol
 Gl. 100 bis etwa 200; Prämuscimol-Fraktion
 Gl. 200 bis etwa 500; Prämuscimol/Muscazon-Mischfraktion
 Gl. 500 und folgende: Muscazonfraktion

Je nach Gehalt des Ausgangsgemisches lassen sich aus der Prämuscimol-Fraktion 5–16 g Reinprodukt kristallisieren. Die Mischfraktion gelangt wieder zur Feinauftrennung.

$C_5H_8O_5N_2$ Ber. C 34,09 H 4,58 O 45,42 N 15,91% MG. 176,13
 Gef. „ 34,26 „ 4,77 „ 45,20 „ 15,82% „ 169³⁾; 186,4⁴⁾
 76,6 At.-% D nach Umkristallisation aus D₂O.

Muscazon: Das rohe Muscazon wird in warmem Wasser gelöst und die Lösung durch eine kleine Säule von neutralem Aluminiumoxid (WOELM) filtriert. Die aus dem Filtrat erhaltene kristalline Substanz wird hierauf aus heissem Wasser (ev. Norit) umkristallisiert. Farblose Kristalle, Smp. über 190° unter Zersetzung.

$C_5H_6O_4N_2$:
 Ber. C 37,98 H 3,83 O 40,48 N 17,72% MG. 158,13
 Gef. „ 37,95; 37,98 „ 3,84; 3,98 „ 40,16; 40,06 „ 17,60; 17,90% „ 164³⁾; 150,5⁴⁾
 64 At.-% D nach Umkristallisation aus D₂O.

³⁾ Kryskop., H₂O;

⁴⁾ Osmometer, H₂O.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus frischen Fruchtkörpern von *Amanita muscaria* (L. ex Fr.) HOOKER, wurden Prämuscimol, $C_5H_8O_5N_2$, Smp. 145° (Zers.) und Muscazon, $C_5H_6O_4N_2$, isoliert. Beide Substanzen reagieren mit Ninhydrin gelb. Prämuscimol geht leicht unter Wasser- und CO_2 -Abspaltung in Muscimol über. Prämuscimol wirkt wie Muscimol stark narkosepotenzierend.

Organisch-Chemisches Institut
der Universität, Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. F. R. MÜLLER & C. H. EUGSTER, *Helv.* **48**, 910 (1965).
 [2] T. TAKEMOTO *et al.*, *Yakugaku Zasshi* **84**, 1198, 1233 (1964); *Chem. Abstr.* **62**, 8121 (1965).
 [3] A. R. GAGNEUX, F. HÄFLIGER, R. MEIER & C. H. EUGSTER, *Tetrahedron Letters* **1965**, im Druck.

99. Beiträge zur Chemie der Carotinoide

2. Mitteilung

Säurekatalytische Reaktionen von Isozeaxanthin

von E. C. Grob und R. P. Pflugshaupt

(5. IV. 65)

In der 1. Mitteilung [1] beschrieben wir säurekatalysierte Umsetzungen von Isozeaxanthin, Lutein und Zeaxanthin in verschiedenen Lösungsmitteln. In 0,01M HCl haltigen Alkoholen erhielten wir aus Isozeaxanthin die entsprechenden Diäther,

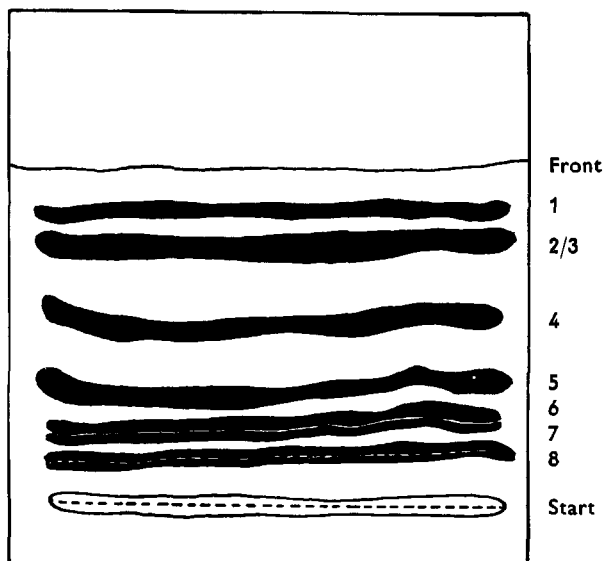


Fig. 1. *Dünnschichtchromatogramm der Reaktionsprodukte von Isozeaxanthin in Benzol-HCl*
(Kieselgel-G, Benzol:Petroläther:Äthanol 50:50:4)