

146. Isolierung von (2S, 4S)-(+) - γ -Hydroxynorvalin und (2S, 4R)-(-) - γ -Hydroxynorvalin aus *Boletus satanas* Lenz.

von P. Matzinger¹⁾, Ph. Catalfomo²⁾ und C. H. Eugster

Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich, Rämistrasse 76, 8001 Zürich

(28. III. 72)

Summary. We have isolated from the carpophores of *Boletus satanas* Lenz (*Basidiomycetae*) (2S, 4S)-(+) - γ -hydroxynorvaline (**1**) and (2S, 4R)-(-) - γ -hydroxynorvaline (**2**). The chirality of each diastereomer has been determined by chemical synthesis starting from optically active precursors and by application of different chiroptical methods. Gaschromatographic separation of the derived diastereomeric N-[(S)- α -methoxypropionyl]-lactones reveals that the optical purity of natural **2** is 88% whereas **1** exists as a partial racemate: (2S, 4S):(2R, 4R) = 3:2.

Muscarine could not be detected in the carpophores of *B. satanas*, contrary to some literature data but basic substances of unknown structure are present in low concentration.

Anlässlich der Überprüfung einiger *Boletus*-Arten auf ihren Gehalt an «Boletol» [1] ergab sich die Gelegenheit, den in der mykologischen Literatur als giftig geltenden Satanspilz (*Boletus satanas* Lenz; *Basidiomycetae*) auch in bezug auf andere Inhaltsstoffe zu untersuchen. Chemisch definierte Giftstoffe sind nämlich bis heute noch nicht bekanntgeworden (siehe die Diskussion am Ende dieser Mitteilung).

In der Fraktion der wasserlöslichen Stoffe fanden wir auf zweidimensionalen Papierchromatogrammen einen Ninhydrin-positiven Fleck von auffällig rotbrauner Farbe, der keiner bekannten Aminosäure zugeordnet werden konnte. Durch Analyse einer angereicherten Fraktion eines Gemisches der sauren und neutralen Aminosäuren³⁾ wurden folgende Bestandteile nachgewiesen (in der Reihenfolge ihrer Elution aufgeführt): Asp, Thr, Ser, Glu-NH₂ + Asp-NH₂, Glu, Pro, *Unbekannt*, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, β -Ala (?).

Eine anschliessende mikropräparative Trennung bestätigte das Vorkommen eines unbekanntes Bestandteiles: es ergab sich Übereinstimmung zwischen aufgefundenem Fleck auf Papierchromatogrammen und dem unbekanntes Pik im Elutionsdiagramm des Analysators. Aus der Form des Piks musste auf ein Gemisch nahe verwandter Stoffe geschlossen werden, was durch die spätere Untersuchung bestätigt wurde. Die präparative Auftrennung erforderte zahlreiche Chromatographien (siehe exp. Teil). Aus 426 g frischen Carpophoren von *B. satanas* wurden schliesslich 305 mg **1** und 340 mg **2** erhalten. Über die Eigenschaften der beiden Stoffe orientiert Tab. 1.

Veresterung nach *Fischer-Speier* führte die beiden Aminosäuren in die entsprechenden γ -Lacton-hydrochloride über, welche sich wieder in die Ausgangsmaterialien **1** und **2** verseifen liessen. Dabei fand keine gegenseitige Umwandlung statt.

1) Aus der geplanten Dissertation von *Peter Matzinger*.

2) Gast am Organisch-Chemischen Institut der Universität Zürich 1969/70; Adresse: Dept. of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Oregon State University, Corvallis, Oregon USA.

3) Wir sind Herrn Prof. Dr. *P. S. Chen* und Herrn *R. Bühler*, Zoologisch-Vergleichendes anatomisches Institut der Universität Zürich, für die Ausführung der Aminosäureanalysen zu Dank verpflichtet.

Tabelle 1. *Eigenschaften von 1 und 2 (bzw. 1a und 2a)*

	Säure 1 (erythroid)	Lacton 1a	Säure 2 (threoid)	Lacton 2a
<i>Naturprodukte</i>				
Summenformel	C ₉ H ₁₁ O ₃ N	C ₉ H ₉ O ₂ N, HCl	C ₉ H ₁₁ O ₃ N	C ₉ H ₉ O ₂ N, HCl
Smp.	192–193° (Zers.) farblose Nadeln	166–167,5° farblose Blättchen	194–195° (Zers.) farblose Blättchen	194–195° (Zers.) feine, farblose Nadelchen
Farbe mit Ninhydrin (0,3% i. n-Butanol/Eisessig) auf Papier	braunrot	gelb	braunrot	gelb
[α] _D (c = 1,5 bis 2; H ₂ O)	+ 3,5°	- 8,5°	- 35,5°	- 3,0°
λ _{max}			189 nm	190 nm
Δε (λ _{max} nm; c = 0,05; H ₂ O)	+ 0,29 (201)	+ 0,124 (217)	+ 0,73 (201)	+ 0,118 (223), - 0,15 (199)
Rf (Whatman Nr. 1)	0,72 ¹⁾ , 0,40 ²⁾ , 0,47 ³⁾ , 0,23 ^{2a)}	0,52 ²⁾ , 0,40 ^{2a)}	0,72 ¹⁾ , 0,40 ²⁾ , 0,32 ³⁾ , 0,23 ^{2a)}	0,52 ²⁾ , 0,40 ^{2a)}
DC., Cellulose MN 300	0,52 ²⁾ , 0,60 ³⁾ , 0,59 ⁴⁾ , 0,60 ⁵⁾ , 0,35 ^{2a)}	0,65 ²⁾ , 0,52 ^{2a)}	0,52 ²⁾ , 0,44 ³⁾ , 0,59 ⁴⁾ , 0,60 ⁵⁾ , 0,35 ^{2a)}	0,52 ^{2a)}
Elektrophorese (Whatman Nr. 1)	4,0 cm (500 V, 110 Min.) ⁶⁾ 4,6 cm (500 V, 135 Min.) ⁷⁾ 0,4 cm (300 V, 165 Min.) ⁸⁾	6,6 cm (400 V 90 Min.) ⁶⁾	4,0 cm ⁶⁾ 3,9 cm ⁷⁾ 0,4 cm ⁸⁾	6,6 cm ⁶⁾ 3,7 cm ⁸⁾
[α] _D des N-Acetylderivates (c = 1,5; DMSO)	0°	- 31,0°	- 10°	- 21,5°
Δε des N-Acetylderivates (c = 0,05, Methanol)		+ 0,04 (220)		- 0,08 (236), - 0,28 (212)
<i>Syntheseprodukte</i>				
Smp. Racemate	193,5–194,5° (Zers.) körnige Kristalle	177–178° Nadelchen	197–199° (Zers.) Nadelchen	191–192° körnige Kristalle
[α] _D (c = 2; H ₂ O)	+ 25° ⁹⁾		+ 35° ⁹⁾	

1) Phenol/H₂O 3:1; 2) n-Butanol/Eisessig/Wasser 12:3:5; 3) n-Butanol/Aceton/NH₃ (5proz.)/H₂O 10:10:5:2; 4) Methanol/Wasser/Pyridin 20:5:1; 5) Isopropylalkohol/Ameisensäure/Wasser 20:1:5; 2a) n-Butanol/Eisessig/Wasser 90:10:29 (alle Chromatogramme aufsteigend); 6) pH 1,38 (Eisessig/Ameisensäure/Wasser 3:1:16); 7) pH 2,85 (Eisessig/Ammoniumacetat); 8) pH 5,94 (Pyridin/Eisessig/Wasser 10:1:89); 9) auf Grund der optischen Reinheit des Ausgangsmaterials berechneter Wert.

Aus Spektren und Verbrennungsanalysen folgte (Fig. 1, 2, 3), dass die diastereomeren γ -Hydroxynorvaline **1** und **2** vorlagen.

Da es sich um sehr seltene Aminosäuren handelt, haben wir diese einer näheren Untersuchung unterzogen.

Schema 1

(Die Formeln stellen absolute Konfigurationen dar.)

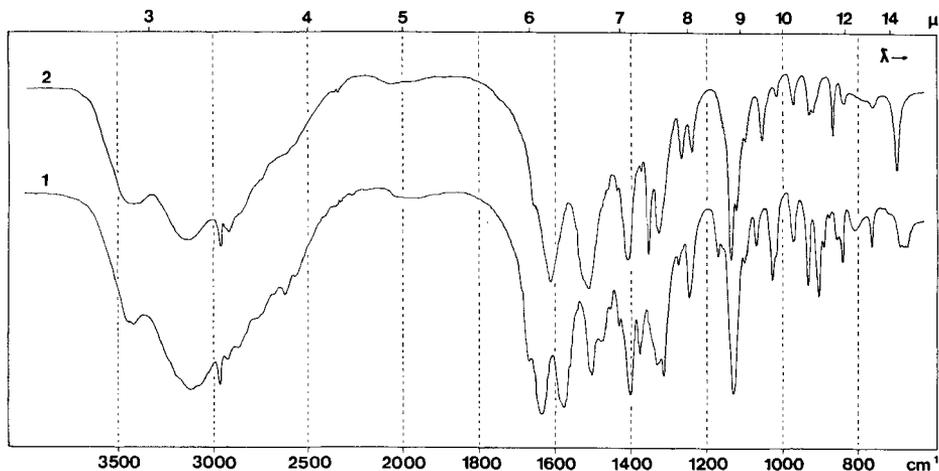
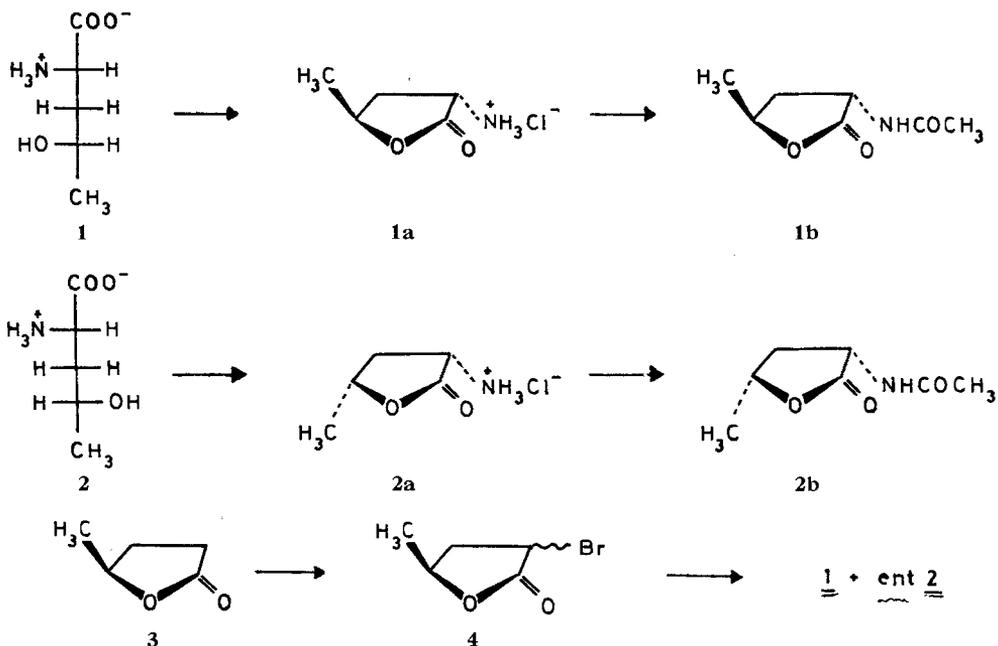


Fig. 1. IR.-Spektren von **1** und **2** (in KBr)

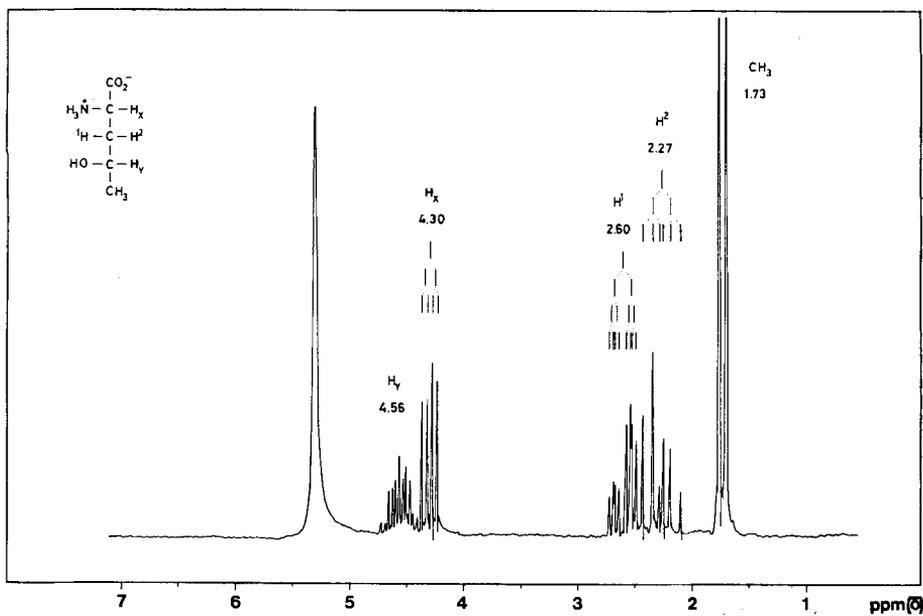


Fig. 2. NMR.-Spektrum von **1** (in D_2O)

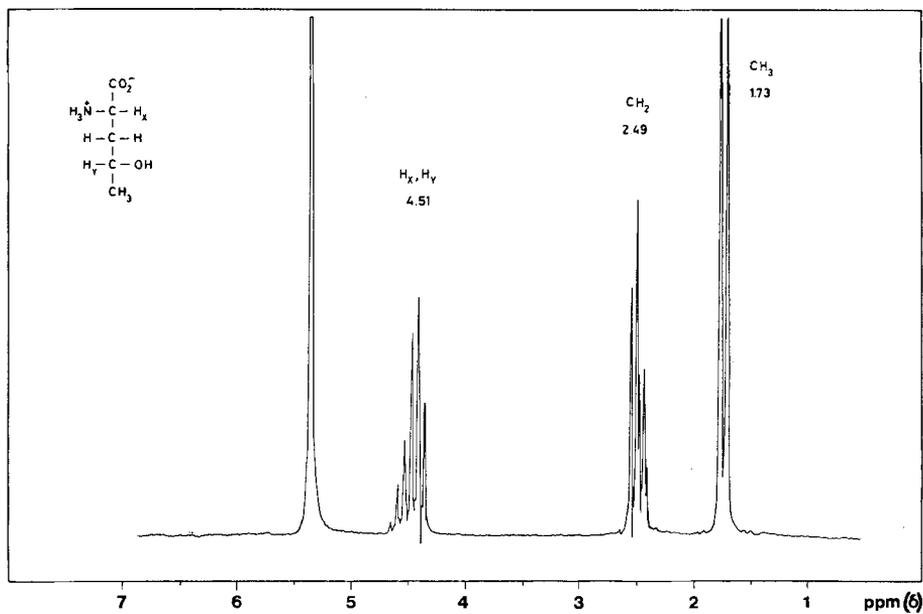
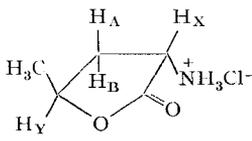
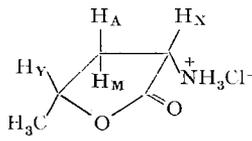


Fig. 3. NMR.-Spektrum von **2** (in D_2O)

Konstitutionszuweisung. – Zuerst stellten wir das Gemisch der diastereomeren γ -Hydroxynorvaline nach *Wiss* und *Fuchs* [2] dar (vgl. auch [3]) und trennten es chromatographisch in die beiden Racemate. Spektren bewiesen die Identität mit den Naturprodukten. Die Konstitutionszuweisung erfolgte am einfachsten durch Interpretation der NMR.-Spektren von **1a** und **2a** (vgl. Fig. 4 und 5 sowie Tab. 2). In der *cis*-Verbindung **2a** (threide Aminosäure) müssen die Methylenprotonen H_A und H_M durch die Nachbargruppen stark verschiedene Abschirmungen erfahren. H_M wird durch die Methyl- und Ammoniumgruppe nach höherem Feld verschoben, während das Signal von H_A bei wesentlich tieferem Feld erscheint. In **1a** zeigen H_A und H_B fast identische Resonanzpositionen. Über ähnliche Beobachtungen bei substituierten γ -Lactonen siehe [4]. Die 1,3ständigen Substituenten üben nur geringe (entschirmende) Effekte aus: In **1a** wird das Signal von H_X durch die Methylgruppe und in **2a** das Signal der Methylprotonen durch die Ammoniumgruppe je um ca. 0,05 ppm nach tieferem Feld verschoben.

Tabelle 2. NMR.-Daten der Lactone **1a** und **2a**
(Messungen in D_2O mit TMS in Kapillare; δ [ppm])

			
1a		2a	
H_A	ca. 3,06 (<i>m</i>)	H_A	3,43 (Oktett), $J_{A,M} = 12$ Hz $J_{A,X} = 8,5$ $J_{A,Y} = 5$
H_B	ca. 3,06 (<i>m</i>)	H_M	2,55 (Sextett) $J_{A,M} = 12$ $J_{M,X} = 12$ $J_{M,Y} = 10$
H_X	5,08 (<i>t</i>), $J_{AX} + J_{BX} = 20$ Hz	H_X	5,03 (<i>q</i>) $J_{A,X} = 8,5$ $J_{M,X} = 12$
H_Y	5,54 (<i>m</i>)	H_Y	5,33 (<i>m</i>) $J_{A,Y} = 5$ $J_{M,Y} = 10$ $J_{CH_3,Y} = 6$
CH_3	1,92 (<i>d</i>) $J = 6$	CH_3	1,97 (<i>d</i>) $J = 6$

Absolute Konfiguration. – Durch Racematspaltung der γ -Hydroxyvaleriansäure [5] (siehe auch exp. Teil) erhielten wir S(-)-**3** in 69proz. optischer Reinheit. α -Bromierung mit PBr_3/Br_2 [6] gab unreines **4**, das als Diastereomeregemisch der Ammonolyse im Bombenrohr unterworfen wurde. Nach Entsalzung an Dowex 50 (H^+) und Uinkristallisation wurde das erhaltene Gemisch von **1** und *ent* **2** wie beim Naturprodukt chromatographisch an einer Cellulosesäule in die beiden Diastereomeren aufgetrennt. Die schneller durch die Säule wandernde Substanz (erythroide Form **1**) erwies sich als mit dem Naturprodukt identisch, während die langsamer wandernde, threide Verbindung das Enantiomere von **2** darstellt. Da die Chiralität der enantiomeren γ -Hydroxyvalerolactone bekannt ist [5], kommt somit den beiden Aminosäuren aus *Boletus satanas* die erythroide 2*S*,4*S* (*L_S*, *L_G*)-Konfiguration für **1** mit

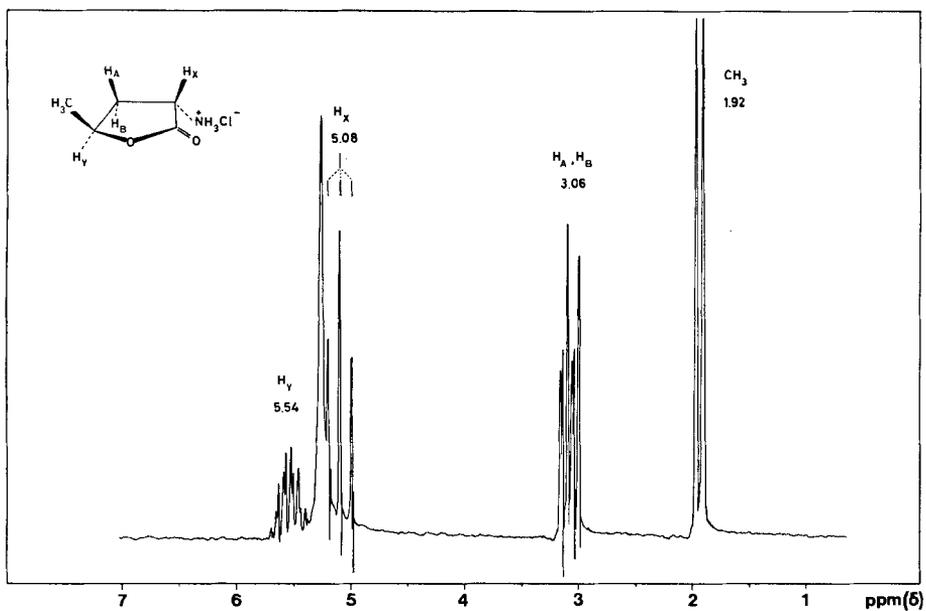


Fig. 4. NMR.-Spektrum von Lacton 1a (in D_2O)

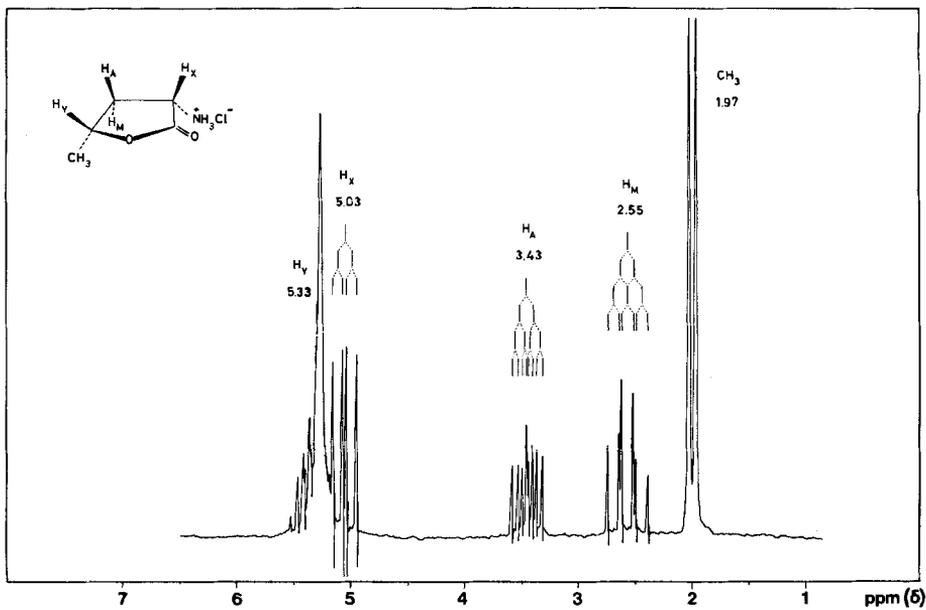


Fig. 5. NMR.-Spektrum von Lacton 2a (in D_2O)

$[\alpha]_D = +$ beziehungsweise die threoide 2*S*,4*R* (*L_S*, *D_G*)-Konfiguration für **2** mit $[\alpha]_D = -$ zu. Dieselben Schlussfolgerungen können auch aus Anwendung von chiroptischen Regeln abgeleitet werden:

Beide Aminosäuren zeigen positive *Cotton*-Effekte im Bereich des $n \rightarrow \pi^*$ -Überganges der Carboxylgruppe (siehe Tab. 1 und Fig. 6). Umfangreiche vergleichende

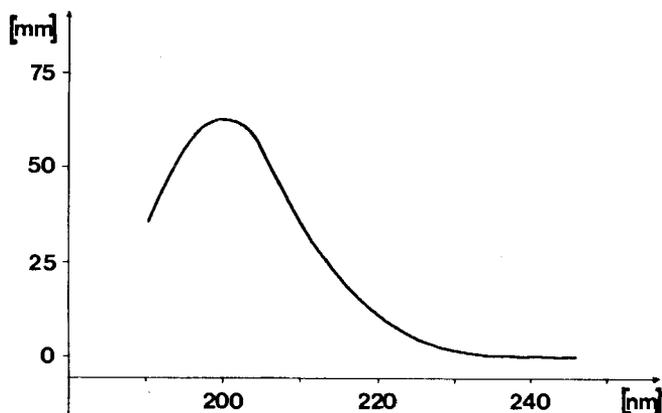


Fig. 6. CD.-Spektrum von **2** (in H_2O)

Studien [7] haben ergeben, dass daraus auf das Vorliegen einer *L_S*-2-Amino-carbonsäure geschlossen werden darf, sofern keine störenden Chromophore vorliegen. Die CD.-Kurve des Lactons **2a** ist in Fig. 7 wiedergegeben. Die beiden Extrema dürften dem $n \rightarrow \pi^*$ - (223 nm) bzw. dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Lactoncarbonylgruppe entsprechen. Die sog. *Hudson*-Lacton-Regel [8] verbindet Drehungsvorzeichen bei der D-Linie und Chiralität des hydroxylierten C-Atoms in γ - und δ -Lactonen in dem

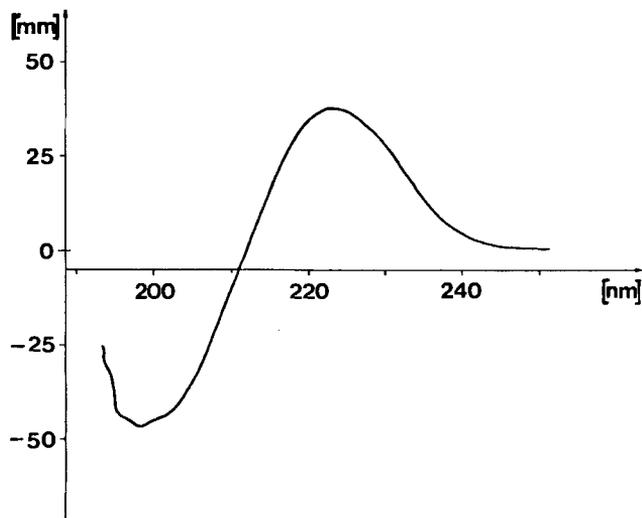


Fig. 7. CD.-Spektrum von **2a** (in H_2O)

Sinn, dass ein positiver Drehwert mit einer D_G - (meist R -) und umgekehrt ein negativer mit einer L_G - (meist S -) Chiralität verknüpft ist. Bei Vorliegen von mehreren Chiralitätszentren wird die Drehungsdifferenz zwischen offener und lactonisierter Molekel verwendet. Sind weitere polare Funktionen anwesend (OH, NH_2 usw.), können Abweichungen auftreten [8c–e]. Es war deshalb von Interesse, diese Regel für unsere Lactone zu überprüfen: mit $\Delta[\alpha]_D = +32^\circ$ für **2a** und $\Delta[\alpha]_D = -12^\circ$ für **1a** stimmt sie bestens mit den in Schema 1 angegebenen Konfigurationen überein, hingegen versagt die Regel bei dem N-Acetylderivat **2b** (Messung in DMSO nach [8b]), wo anstelle eines positiven ein negativer Differenzwert erhalten wurde⁴). Auch die Regeln von Okuda *et al.* [9] und von Jorgensen [10] wurden durch unsere Befunde bestätigt.

Enantiomerenreinheit der isolierten Aminosäuren 1 und 2. – Die geringe Drehung von **1** sowie andere Beobachtungen liessen auf eine partielle Racemisierung entweder während der Isolierung oder im genuinen Vorkommen schliessen. Deshalb wurde eine gaschromatographische Überprüfung durchgeführt. Nach N-Acylierung der beiden racemischen Lactone **1a** und **2a** mit (*S*)- α -Methoxypropionylchlorid konnten sowohl auf einer 60 m langen Kapillarkolonne, Typ SF 96 (Methylsilikon), als auch auf einer 24 m langen XF 1105-(10% Cyanoäthylsilikon)-Kolonne getrennte Piks für die entstandenen Diastereomere beobachtet werden (siehe Fig. 8), welche sich für die quantitative Auswertung heranziehen liessen. Auffälligerweise konnten jedoch keine Bedingungen ermittelt werden, bei denen am Racemat identische Flächenintegrale für die beiden Diastereomere entstanden; für **2a** war das Verhältnis der Flächenintegrale erster/zweiter Pik auf der 60-m-Kolonne ca. 0,95, für **1a** hingegen 1,60 und auf der 24-m-Kolonne ca. 0,95 resp. 1,20⁵). Trotzdem gelang es, die Ergebnisse soweit

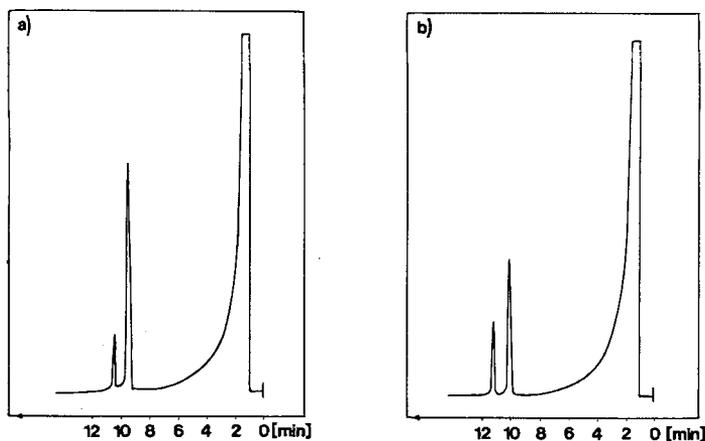


Fig. 8. a) Gas-Chromatogramm des *N*-[(*S*)- α -methoxypropionyl]-cis-lactons (aus *B. satanas*); Isomerenverhältnis (2*S*,4*R*):(2*R*,4*S*) = 6,8:1.

b) *do.* des trans-Lactons; Isomerenverhältnis (2*S*,4*S*):(2*R*,4*R*) = 2,1:1.

- ⁴) Möglicherweise trat eine chemische Reaktion ein, denn das regenerierte Lacton besass eine veränderte Drehung.
- ⁵) Da mit grossem Überschuss an Acylierungsmittel gearbeitet wurde und zudem lange Reaktionszeiten eingehalten wurden, dürften kinetische Effekte ausser Betracht fallen. Vermutlich kommt eine verschiedenartige Empfindlichkeit der Diastereomere während der Gaschromatographie zum Ausdruck.

reproduzierbar zu gestalten, dass eindeutige Schlüsse gezogen werden konnten: die isolierten Aminosäuren **2** und **1** enthielten ca. 12% resp. 36% des jeweiligen Enantiomeren⁶⁾. Damit ist es nachgewiesen, dass der Pilz, besonders im Falle des erythroiden Diastereomeren, auch die 2*R* (*D*_S)-Aminosäure erzeugt, sofern keine Epimerisierung am α -C-atom von **2**, trotz aller Vorsicht, während der Isolierung eingetreten ist. Kritisch ist natürlich in dieser Hinsicht die Chromatographie an Ionenaustauschern unter sauren und basischen Bedingungen. Folgende Versuche sprechen gegen das Eintreten einer Epimerisierung während der Isolierung: a) je eine Probe von **1** und **2** wurden separat an Dowex 50 (H[⊕]) adsorbiert und dann mit 1*N* NH₃-Lösung eluiert. Papierchromatogramme der eluierten Aminosäuren zeigten jeweils nur einen Fleck; b) getrocknete Carpophoren von *B. satanas* wurden gepulvert und mit 80proz. Äthanol extrahiert. Nach Entfetten wurde ein Teil des Konzentrates mit dem basischen Lösungsmittel *n*-Butanol/Aceton/NH₃ (5proz.)/Wasser 10:10:5:2 direkt präparativ auf Papier chromatographiert: 2 getrennte Flecke von **1** und **2**, die nach Elution und erneuter Chromatographie im selben System nur je einen Fleck erkennen liessen; und ein anderer Teil mit dem sauren System *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 12:3:5: ein ungetrennter Fleck, der nach Elution und nochmaliger Chromatographie im basischen System in die Flecken von **1** und **2** aufspaltete. Damit scheint eine gegenseitige Umwandlung der diastereomeren Aminosäuren **1** und **2** ausgeschlossen zu sein und es liegt der Schluss nahe, dass der Pilzorganismus sowohl *D*_S- als auch *L*_S-Aminosäuren erzeugt. Das Vorkommen von *D*_S-Aminosäuren in Pilzen ist nicht weiter verwunderlich [11], da dafür viele Beispiele bekanntgeworden sind; merkwürdig scheint hingegen das gleichzeitige Vorkommen von partiell epimerisierten und racemisierten Diastereomeren.

Zum Vorkommen der γ -Hydroxynorvaline. – Ein γ -Hydroxynorvalin ist erstmals von Fowden [12] aus Samen von *Lathyrus odoratus* (*Papilionaceae*) isoliert und als Gemisch von Diastereomeren erkannt worden ($[\alpha]_D^{20} = +22^\circ$ (in H₂O)). Er nahm Epimerisierung während der Isolierung an (wofür wir in unserem Fall keine Anhaltspunkte haben) und schloss aus Analogiegründen, dass das auf Papierchromatogrammen schneller wandernde Isomere die 2-*L*_S-threo-Struktur **2** besitze, was jedoch mit unseren Befunden nicht übereinstimmt: unsere threoide (2*S*,4*R*)-Aminosäure **2** hat $[\alpha]_D = -35,5^\circ$ und läuft in Papierchromatogrammen langsamer als das Isomer **1**; die synthetische, erythroide (2*S*,4*S*)-Aminosäure **1** hat $[\alpha]_D = +25^\circ$. Später ist « γ -Hydroxynorvalin» auch in Samen von *Astragalus*-Arten (*Papilionaceae*) papierchromatographisch nachgewiesen worden [13]. Wieland *et al.* [14] [3] haben Phalloidin (aus *Amanita phalloides*; *Basidiomycetae*), welches erythro-2-*L*_S- γ , δ -Dihydroxyleucin als Peptidbaustein enthält, partiell abgebaut und das gebildete γ -Hydroxynorvalin qualitativ nachgewiesen. Es steht nicht fest, ob **1**, **2** oder ein Gemisch beider vorgelegen hat. Schliesslich haben Wieland *et al.* [15] eine Konstitutions- und Konfigurationszuordnung für die diastereomeren γ -Hydroxynorvaline auf Grund der chemi-

⁶⁾ Der in der Tab. 1 angeführte Wert von $[\alpha]_D = +3,5^\circ$ für **1** kann zur Berechnung der Enantiomeren-Reinheit nicht verwendet werden, da es sich gezeigt hat, dass bei der Umkristallisation von partiell racemischem **1** eine Anreicherung des Racemates in der schwerlöslichen Fraktion eintritt. Die im Text angegebenen %-Werte stammen von Aminosäuren, die nach Isolierung (ohne Verwendung von Ionenaustauschern) nicht auskristallisiert, sondern direkt lactonisiert und acyliert wurden. Umkristallisierte **2** zeigt jedoch eine Enantiomerenreinheit von >96%.

schen Verschiebung der Methylsignale und einer Partialsynthese aus *L*-Norvalin (Ausbeute ca. 0,1%) getroffen. Dem in Papierchromatogrammen schneller wandernden diastereomeren Lacton wurde die erythroide (2*S*,4*S*)-Struktur **1**, der langsamer wandernden Komponente die threoide (2*S*,4*R*)-Struktur **2** zugeteilt (rein isoliert wurde jedoch nur **2**). Unsere Ergebnisse bestätigen die von *Wieland et al.* [15] getroffenen Zuordnungen. Gleichzeitig haben *Wieland et al.* eine von *Fowden* stammende Probe (aus *Lathyrus odoratus*) als erythroide Form erkannt und ihr die (2*S*,4*S*)-Chiralität zugewiesen.

Das Gemisch der Racemate von **1** und **2** ist schon verschiedentlich hergestellt [2], [15], [16], [17], [18], jedoch noch nie in beide Komponenten getrennt worden. Die diastereomeren γ -Hydroxynorvaline sind zum erstenmal in der vorliegenden Arbeit im Pilzreich nachgewiesen worden.

*Weitere Inhaltsstoffe aus B. satanas*⁷⁾. – Folgende Verbindungen sind bis heute aus Carphophoren isoliert worden: Ergosterin [19], Palmitinsäure [19], eine Dihydroxystearinsäure (Agaricinsäure) [19], Glucose [20], Trehalose [20], Glycogen [20], Mannit [20], Cholin [20], Variiegatsäure (= Luridussäure) [1], nach [20] die Aminosäuren Arg, His, Leu, Lys, Try, Tyr, Val + 3 Unbekannte, nach [21] die Aminosäuren Asp, Glu, Ser, Gly, Thr, Ala, Val, Met, Leu, Ile, Tyr, Phe, Asp-NH₂, einige basische Aminosäuren, kein Try; ferner β -Ala, α -Aminoadipinsäure, γ -Aminobuttersäure [21], Äthanolamin + 4 bis 7 weitere Unbekannte [21]. Das Vorkommen von *Boletol* ist zu streichen [1].

Die auffälligen Unterschiede in den Angaben über die Aminosäurezusammensetzung (vgl. auch die von uns festgestellten, eingangs erwähnten Aminosäureanalysen) sind vermutlich auf die sehr verschiedenartigen Aufarbeitungs- und Nachweismethoden zurückzuführen.

In der mykologischen und toxikologischen Literatur finden sich gelegentlich Angaben über das Auftreten von *Muscarin* in *B. satanas*, z. B. [22], [23]. Sie gehen offenbar auf die Arbeit von *Utz* [24], der eine basische Substanz («*Boletin*») isoliert haben will, sowie auf die Vermutungen von *Ford* [25], dass es sich dabei um unreines *Muscarin* gehandelt habe, zurück, sind aber offenbar nie verifiziert worden. Aus diesem Grund haben wir das vermutete Vorkommen von *Muscarin* mit den in unserem Laboratorium ausgearbeiteten und vielfach erprobten chromatographischen Methoden überprüft. Das Resultat war eindeutig negativ; es konnte keine Spur von *Muscarin* festgestellt werden. Neben Cholin wurde allerdings eine weitere Base in sehr geringer Menge festgestellt, deren Struktur noch unbekannt bleibt. Die gesicherten Nachweise von *Muscarin* bleiben demnach immer noch auf die Gattungen *Amanita* (1 Spezies), *Clitocybe* (4 Spezies) und *Inocybe* (über 50 Spezies) beschränkt [26].

Die Aufklärung über die Natur der im Satanspilz zweifellos vorhandenen Giftstoffe bleibt demnach immer noch offen.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds* (Projekte Nr. 5011.2 und 2.434.71) für die Unterstützung dieser Arbeit; Herrn Prof. Dr. *K. Grob* danken wir für die Hilfe bei der Gas-Chromatographie; Herrn *F. Barth* (†), ehemals Pilzkontrolleur der Stadt Basel, für das Sammeln und Identifizieren der Pilze. Orientierende Versuche sind von Herrn *R. Strickler* ausgeführt worden. Verbrennungsanalysen und IR.-Spektren verdanken wir Herrn *H. Frohofer*, NMR.-Spektren

⁷⁾ *B. satanas* ist früher oft mit *B. luridus* verwechselt worden.

Prof. *W. v. Philipsborn* und Massenspektren Prof. *M. Hesse*. CD-Spektren wurden von Herrn *R. Buchecker* gemessen. *Philip Catalfomo* dankt der *American Foundation for Pharmaceutical Education* für die *Gustavus A. Pfeiffer Memorial Research Fellowship* in den Jahren 1969–1970.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines*. – NMR-Spektren wurden an einem *Varian HA-100 MHz*-Gerät mit Tetramethylsilan als externem Standard (Kapillare), IR-Spektren an einem *Perkin-Elmer*-Spektrographen, Modell 257, Massenspektren an einem *CEC*-Gerät, Typ 21-110 B, CD-Spektren an *Roussel-Jouan*-Dichrographen, Modell 185, UV-Spektren an einem *Beckman Acta-III*-Spektrophotometer und Drehungsmessungen an einem *Zeiss-Winkel*-Polarimeter (D-Linie) aufgenommen.

Lösungsmittelsysteme für Papier-, Dünnschicht- und Säulenchromatographie:

A = *n*-BuOH/Eisessig/Wasser 12:3:5;

B = *n*-BuOH/Aceton/NH₃ (5%)/Wasser 10:10:5:2.

Die Gas-Chromatogramme wurden mit einem *Carlo-Erba-Fractovap*, Modell G1, Typ A1D an Glaskapillarkolonnen SF 96 (60 m, 0,32 m/m, Methylsilikon) bzw. XF 1105 (24 m, 0,31 m/m, 10% Cyanäthylsilikon) unter folgenden Bedingungen ausgeführt: Verdampferblock 200° bzw. 170°, Kolonne 135–140°, Trägergas 0,4–0,5 at H₂. Quantitative Auswertung mit einem *Carlo-Erba*-Elektrometer-Digital-Integrator Modell 72 und einem Infotronic automatischem Digital-Integrator Modell CRS-208.

Die Smp. sind unkorrigiert.

2. *Isolierung*. – 426 g frische Fruchtkörper (Jura, Ernte 1959) wurden zerkleinert und mehrmals mit Methanol in der Wärme extrahiert. Nach Einengen im Vakuum wurde der wässrige Rückstand mit Äther entfettet, hierauf die Wasserphase zum Sirup eingedampft und in diesem Zustand aufbewahrt. Die Aufarbeitung erfolgte 1969–1972 in mehreren Ansätzen wie folgt: Proben des Rohextraktes, gelöst in wenig Wasser, liess man in eine Kolonne von Dowex 50 W X 12 (50–100 mesh, H⁺) einlaufen. Nach gründlichem Auswaschen mit Wasser wurden die adsorbierten Aminosäuren mit 1N NH₃-Lösung desorbiert. Abtrennung der sauren Aminosäuren erfolgte hierauf wie üblich an Dowex 1 x 10 (200–400 mesh, Acetatform). Das Gemisch der neutralen Aminosäuren trennten wir anschliessend an einer Cellulosesäule (*Whatman*, CF 11; 650 g pro 2,5 g Aminosäuregemisch) mit Lösungsmittel **B**. Nach 300 ml Vorlauf wurden Fraktionen zu 15 ml aufgefangen.

Fr. 94–109: vorwiegend **1** enthaltend. Etwas verunreinigt mit mehreren anderen Aminosäuren.

Fr. 110–120: Mischfraktion (**1** + **2**)

Fr. 121–135: vorwiegend **2** enthaltend, etwas verunreinigt mit anderen Aminosäuren.

Fr. 136–170: **2** + viel Ala

Feinreinigung der Substanz aus Fr. 94–109 bzw. 121–135 erfolgte durch Chromatographie an Cellulose-Kartons (*Whatman* Nr. 3), wobei pro Bogen 10–15 mg Substanz eingesetzt wurden. Chromatographiert wurde mit Lösungsmittelsystem **A** während 15 Std., absteigend. Nach Elution der reinen Zonen und Vereinigung der gewonnenen Substanz wurde mit Norit entfärbt und aus Methanol/Wasser/Aceton umkristallisiert. Ausbente 305 mg **1** und 340 mg **2**. Eigenschaften siehe Tab. 1. Zur Analyse wurde bei 50° und 10⁻² Torr während 3 Std. getrocknet.

C ₅ H ₁₁ O ₃ N	Ber. C 45,10	H 8,33	N 10,52%
(133,15)	2 : Gef. „ 45,21	„ 8,17	–
1 :	–	–	„ 10,78%

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurde getrocknetes Pilzmaterial verwendet, aus dem die Aminosäuren kurz vor der gas-chromatographischen Analyse (s. 7. und S. 1485) isoliert wurden. Die Isolierung erfolgte ohne Verwendung von Ionentauschern: Der Extrakt wurde direkt auf Cellulosekartons zuerst mit Elutionsmittelsystem **A** chromatographiert, die entsprechende Zone ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und hierauf auf Kartons im System **B** chromatographisch in die beiden Diastereomeren **1** und **2** getrennt. Die Eluate aus den beiden Zonen wurden (ohne Kristallisation) nach 3. und 7. weiterbehandelt.

3. *Lacton-hydrochloride*. – Je 8 mg **1** und **2** wurden mit 5 ml 6N HCl versetzt und die Lösung auf dem Wasserbad während 1½ Std. auf 80° erhitzt. Nach Stehen über Nacht und Einengen

kristallisierte das Produkt aus. Umkristallisation aus Methanol/Äther; Eigenschaften siehe Tab. I. Die Verseifung wurde mit verdünnter K_2CO_3 - und KOH-Lösung durchgeführt. Nach Reinigung (Dowex 50, H^{\oplus} , P.C. mit Lösungsmittel **A** und **B**) erhielt man die unveränderten Ausgangsmaterialien zurück.

Massenspektren (der Lactone): m/e 115 (Molekularpik), 71 ($M^+ - CO_2$), 56 ($M^+ - CO_2 - CH_3$). IR. (KBr): 1780 cm^{-1} (Lacton).

4. *N-Acetyl-lactone*. – 5 mg Lacton-hydrochloride **1a** bzw. **2a** wurden mit 2,5 ml Acetanhydrid und 0,5 ml Pyridin versetzt und die Lösung während 14 Std. stehengelassen. Nach Einengen im Vakuum wurde der chloroformlösliche Teil im Kugelrohr bei $80\text{--}100^\circ$ (Luftbad) und 0,005 Torr destilliert. IR. ($CHCl_3$): 1777 (Lacton), 1680 (Amid) cm^{-1} . – MS.: m/e 157 (M^{\oplus}).

5. *Synthese von* (\pm)-**1** und (\pm)-**2**: Im wesentlichen nach [2]. β -Acetylalanin-hydrochlorid wurde mit Silbercarbonat in die freie Base übergeführt und dann die Carbonylgruppe mit $NaBH_4$ reduziert. Hierauf erfolgt Entsalzung mit Dowex 50 (H^{\oplus}) und Auftrennung in die Diastereomeren durch Chromatographie wie bei 2. Eigenschaften siehe Tab. I.

$C_5H_{11}O_3N$	Ber.	C 45,10	H 8,33	N 10,52%
(133,15)	(\pm)- 1	Gef. ,, 44,90	,, 8,34	,, 10,45%
	(\pm)- 2	Gef. ,, 45,07	,, 8,45	,, 10,68%

6. *Sterische Korrelation durch Synthese aus* ($-$)-Valerolacton. – a) Racematspaltung von γ -Hydroxyvaleriansäure (Modifikation der Methode von *Levene & Haller* [5]): 15 g (0,15 Mol) γ -Valerolacton wurden zusammen mit 24 g (0,076 Mol) Bariumhydroxid-octahydrat in 150 ml Wasser während 2,5 Std. gekocht. Hierauf erfolgte Zugabe einer Lösung von 45 g (0,15 Mol) Cinchonidin (*Fluka*, $[\alpha]_D^{24} = -103,5^\circ$, $c = 4$ in Alkohol) in 500 ml Methanol. Nach Abkühlung des Gemisches auf 0° wurde mit 3proz. H_2SO_4 vorsichtig neutralisiert; Verbrauch ca. 200 ml. Nach Zentrifugierung des $BaSO_4$ wurde das Methanol im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit 700 ml Wasser verdünnt: es kristallisiert nicht versalztes Cinchonidin aus. Nach Abfiltrieren desselben wurde das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft. Kristallisation und Umkristallisation erfolgte nach [5]. Nach 6 Umkristallisationen blieben 6,8 g Salz als Spitzenfraktion. Zerlegung und Isolierung erfolgte nach [5]. Die Destillation (Kugelrohr, Luftbad $80\text{--}90^\circ$, 12 Torr.) gab 1,45 g γ -Valerolacton, $[\alpha]_D^{22} = -18,5^\circ$ (in Substanz), d. h. bezogen auf den Literaturwert von $[\alpha]_D^{22} = -27,75^\circ$ [5] in 69-proz. optischer Reinheit.

b) α -Bromierung und Ammonolyse: Ausführung nach [6e] mit PBr_3/Br_2 bei $105\text{--}110^\circ$ während 5 Std. Überprüfung erfolgte gas-chromatographisch auf einer 1,2 m Apiezonssäule (10% auf Chromosorb W, Kolonnentemp. 170° , Verdampferblock 200°). Die Ammonolyse wurde mit 5 ml NH_3 fl. im Bombenrohr bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Abdampfen erfolgte Reinigung an Dowex 50 (H^{\oplus}) und Trennung an der Cellulosesäule wie bei 2. Ausbeute 40%, d. h. 322 mg **1** mit $[\alpha]_D^{22} = +7,5^\circ$ ($c = 2$, Wasser), $\Delta\epsilon = +0,36$ ($c = 0,07$, $\lambda_{max} = 200\text{ nm}$) und 422 mg *ent* **2** mit $[\alpha]_D^{22} = +10,5^\circ$ ($c = 2$, Wasser), $\Delta\epsilon = -0,26$ ($c = 0,08$; $\lambda_{max} = 200\text{ nm}$).

7. *Bestimmung der Enantiomerenreinheit durch Gas-Chromatographie*. – Proben von je 5 mg Aminosäuren **1** und **2** verschiedener Herstellung und Reinheit wurden lactonisiert, in 0,3 ml abs. Pyridin gelöst und die Lösung bei 0° mit 50 mg (*S*)-(-)- α -Methoxypropionylchlorid [27] und mit 1 ml abs. Aceton versetzt und unter Wasserausschluss während 14 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von Eiswasser/HCl wurde das *N*-Acetylderivat mit Chloroform ausgezogen. Nach Waschen (Hydrogencarbonat, Sole) und Trocknen ($MgSO_4$) wurde die erhaltene Lösung für die Gas-Chromatographie verwendet. (Resultate siehe theoretischer Teil.)

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *A. Bräm & C. H. Eugster*, *Helv.* **52**, 165 (1969); **55**, 974 (1972).
- [2] *O. Wiss & H. Fuchs*, *Helv.* **35**, 407 (1952).
- [3] *Th. Wieland & D. Rehbinder*, *Liebigs Ann. Chem.* **670**, 149 (1963).
- [4] a) *D. Savostianoff & M. Pfau*, *Bull. Soc. chim. France* **1967**, 4162; b) *C. Daremon, R. Rambaud & M. Vernietle*, *C.r. hebdom. Séances Acad. Sci.* **273**, 1273 (1971); c) *M. Klaren-de Wit, D. J. Frost & J. P. Ward*, *Rec. trav. chim. Pays-bas* **90**, 1207 (1971).
- [5] *P. A. Levene & H. L. Haller*, *J. biol. Chem.* **69**, 165 (1926).

- [6] a) *E. Späth & N. Platzer*, Ber. deutsch. chem. Ges. *69*, 255 (1936); b) *W. Reppe et al.* Liebigs Ann. Chem. *596*, 164 (1955); c) *J. E. Livak, E. C. Britton, J. C. van der Weele & M. F. Murray*, J. Amer. chem. Soc. *67*, 2218 (1945); d) *R. Sudo*, Nippon Kagaku Zasshi *80*, 924, 929 (1959), ref. C.A. *55*, 4529 (1961); e) *C. Daremon, R. Rambaud, M. Verniette*, C.r. hebd. Séances Acad. Sci. *272*, 503 (1971).
- [7] a) *L. Fowden, P. M. Scopes & R. N. Thomas*, J. chem. Soc. (C) *1971*, 833; b) *M. Legrand & R. Viennet*, Bull. Soc. chim. France *1965*, 679; *1966*, 2798; c) *L. I. Katzin & E. Gulyas*, J. Amer. chem. Soc. *90*, 247 (1968).
- [8] a) *P. Crabbé*, Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry, Holden-Day *1965*, pag. 267; b) *B. Witkop*, Experientia *12*, 372 (1956); c) *J. Kollonitsch, B. Witkop & Y. Fujita*, J. Amer. chem. Soc. *87*, 2030 (1965); d) *W. Klyne, P. M. Scopes & A. Williams*, J. chem. Soc. *1965*, 7237; e) *G. Fodor & F. Soti*, Tetrahedron Letters *1964*, 1917.
- [9] *T. Okuda, S. Harigaya & A. Kiyomoto*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) *12*, 504 (1964).
- [10] *E. C. Jorgensen*, Tetrahedron Letters *1971*, 863.
- [11] *B. W. Bycroft*, Nature *224*, 595 (1969).
- [12] *L. Fowden*, Nature *209*, 807 (1966).
- [13] *L. Fowden & P. M. Dunnill*, Phytochemistry *6*, 1659 (1967).
- [14] *Th. Wieland*, Helv. *44*, 919 (1961).
- [15] *Th. Wieland, M. Hasan & P. Pfaender*, Liebigs Ann. Chem. *717*, 205 (1968).
- [16] *G. B. Barlow & A. J. MacLeod*, J. chem. Soc. *1964*, 141.
- [17] *E. Fischer & H. Leuchs*, Ber. deutsch. chem. Ges. *35*, 3797 (1902).
- [18] *H. L. Goering, S. J. Cristol & K. Dittmer*, J. Amer. chem. Soc. *70*, 3310 (1948).
- [19] *J. Zellner & L. Bard*, Mh. Chem. *44*, 9 (1923).
- [20] *J. L. Bonnet*, Bull. Soc. mycol. France *25*, 215 (1959).
- [21] *S. Hatanaka & H. Terakawa*, Botan. Mag. (Tokyo) *81*, 261 (1968).
- [22] *F. A. Wolf & F. T. Wolf*, The Fungi, Wiley, N.Y. (1947), Vol. II, pag. 35.
- [23] *O. Gessner*, Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa. Winter, Heidelberg (1953).
- [24] *Utz*, Apotheker-Zeitung *20*, 993 (1905).
- [25] *W. W. Ford*, Poisonous Mushrooms, in Peterson-Haines, Textbook of legal medicine, Saunders NY. (1922), ref. nach *E. S. Faust*, Pilzgifte, in Handbuch der exp. Pharmakologie, A. Heffter Ed. Vol. 2, Berlin (1924).
- [26] *C. H. Eugster*, Fortschr. Chem. Org. Naturst. (Ed. *L. Zechmeister*), *27*, 288 (1969).
- [27] *W. A. Cowdrey, E. D. Hughes & C. K. Ingold*, J. chem. Soc. *1937*, 1228.

147. The π -Orbital Sequence in Norbornadiene and Related Hydrocarbons¹⁾

by **E. Heilbronner** and **H.-D. Martin**

Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Basel und
Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Freiburg i. Br.

(6. III. 72)

Summary. A method outlined previously [1] is used to show that in norbornadiene (**3**) the $b_2(\pi)$ orbital lies above $a_1(\pi)$, as predicted by theory. This indicates that in **3** through-space interaction between the two basis π -orbitals π_a and π_b is more important than through-bond interaction.

Analysis of the PE.-spectra of 8-isopropylidene-tricyclo[3.2.1.0^{2,4}]-octane (**13**) and the corresponding octene (**15**) confirms that the π -orbital π_c of the exocyclic double bond conjugates more

¹⁾ Part 34 of 'Applications of Photoelectron-Spectroscopy'; Part 33: [1].