

20. *Russula*-Farbstoffe: Zur Struktur von Russupteridin- s_{III} ¹⁾

von Peter Xaver Iten²⁾, Shigenobu Arihara und Conrad Hans Eugster

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(27. XI. 72)

Zusammenfassung. Der rote Hauptfarbstoff aus den zu den Basidiomyceten gehörenden Pilzen *Russula emetica* Fr., *R. sardonia* Fr. em. Rom. und anderen Spezies, das sog. Russupteridin- s_{III} , ist ein «dimeres» Lumazinderivat. Nach Säurehydrolyse konnte Ribose, bzw. Furfurol nachgewiesen werden, neben dem tricyclischen 2,10-Dihydro-4,6,8-trihydroxy-10-ribityl-2-oxo-pyrimido[5,4-g]pteridin (2). Spaltung mit 2proz. Essigsäure unter Sauerstoffausschluss im geschlossenen Rohr lieferte die N-Ribityllumazine 3a, 3b und 4, nebst weiteren, bisher nicht identifizierten Verbindungen.

Verschiedene *Russula*-Arten können, da sie verhältnismässig viel Riboflavin enthalten, als flavinogene Organismen angesprochen werden. Wir postulieren einen Zusammenhang zwischen der Entstehung der roten Russupteridine und der Biosynthese von Riboflavin.

Vor allem auf Grund der Elektronenspektren hatten wir [1] [2] für die roten Farbstoffe aus den Fruchtkörpern verschiedener *Russula*-Arten (Täublinge, Basidiomycetae) eine «dimere» Pteridinstruktur mit einem dem Pterorhodin und ähnlichen Verbindungen [3] verwandten chromophoren System vorgeschlagen. Die nachfolgend beschriebenen Versuche beweisen diesen Vorschlag.

Da bis heute keiner der roten Farbstoffe kristallisiert werden konnte³⁾, mussten alle Versuche an amorphem Material ausgeführt werden. Deshalb sind auch unsere besten Präparate möglicherweise noch Gemische. Auf die ungewöhnlichen Eigenschaften der Russupteridine wurde in [2] bereits hingewiesen.

In [1] und [2] wurde über den Nachweis von Ribose bei saurer Hydrolyse von Russupteridin- s_{III} berichtet. Dabei wird der Farbstoff schneller in farblose und blassgelb gefärbte Bruchstücke zerlegt, als Ribose freigesetzt wird. Das Ribosid weist also beträchtliche Hydrolysenbeständigkeit auf. Chromatographische Untersuchungen zeigen, dass neben Ribose keine anderen Pentosen und Hexosen auftreten. Alle Versuche, ein Aglykon zu fassen, z. B. durch Einwirkung von Nucleosidasen aus Bäckerhefe und Nucleosidphosphorylase aus Kalbsmilz oder durch Hydrolysen unter verschiedenen Bedingungen, blieben bisher erfolglos. Entweder trat keine Riboseabspaltung ein, oder der Chromophor wurde abgebaut. Quantitative Ribosebestimmungen durch energische Hydrolyse mit 12proz. HCl und Kolorimetrie des gebildeten Furfurols mit einer modifizierten Methode nach [5] gab an den Modellsubstanzen Adenosin und Inosin je 67% d. Th. Furfurol. Ribose selbst wird unter den Hydrolysebedingungen zu 81% d. Th. in Furfurol umgewandelt. Da nun Russupteridin- s_{III}

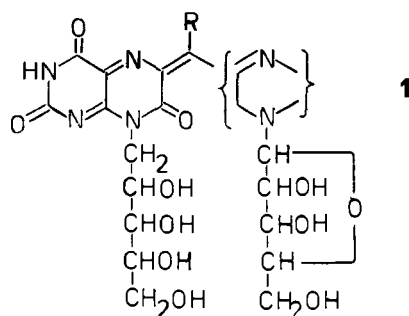
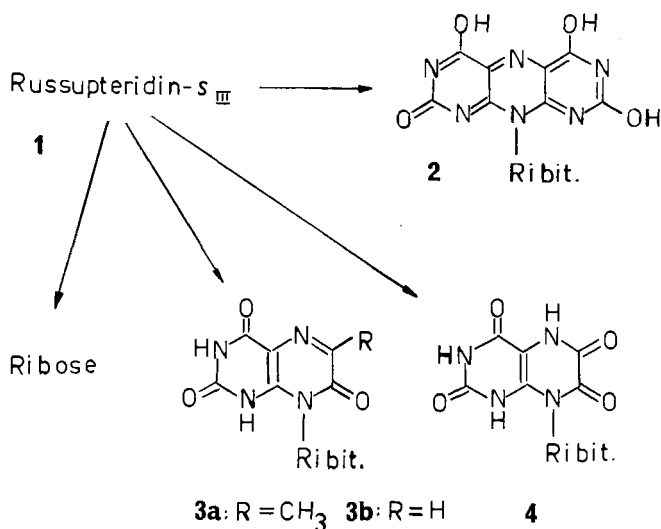
1) Herrn Prof. Dr. Max Viscontini mit allen guten Wünschen zum 60. Geburtstag gewidmet.

2) Aus der Dissertation von Peter Xaver Iten, in Vorbereitung.

3) Die Angaben von Bregant & Turk, wonach kristallisierte Farbstoffe erhalten worden seien [4], beruhen auf einem Irrtum; so enthielt ihr sog. «Russularhodin C» nur 2–3% organischen Farbstoff. Wir danken den Herren Dres. Bregant & Turk sowie Prof. K. Balenović, Zagreb, für die Überlassung von Vergleichspräparaten.

unter denselben Bedingungen 16 bis 17% Furfurol liefert, kann unter Berücksichtigung des systematischen Fehlers von 20 bis 35% auf ein Äquivalentgewicht von ca. 550 geschlossen werden. Das stimmt in Anbetracht der Ungenauigkeit der Methode befriedigend überein mit dem in [2] postulierten MG. von ca. 650. Damit ist aber auch ein bis-Ribosid unwahrscheinlich geworden.

Verbrennungsanalysen und NMR.-Spektren zeigen, dass ein weiterer Polyhydroxyrest in der Molekel anwesend sein muss⁴⁾. Er konnte in den Abbauprodukten **2**, **3a**, **3b** und **4** als N-Ribitylgruppe identifiziert werden.



Die eingangs erwähnte Ähnlichkeit der Russupteridine mit Pterorhodin und seinen Strukturisomeren beschränkt sich allerdings auf die «dimere» Natur und auf das chromophore System. Sonst verhalten sich die Verbindungen recht verschieden, insbesondere bei Oxydationen und Hydrolysen: Unter den zahlreichen aus Russupteridin erhaltenen Spaltstücken konnte kein bekanntes *Pterin* (3,4-Dihydro-2-amino-4-oxo-pteridin) identifiziert werden.

⁴⁾ Perjodatspaltungen an Russupteridin-s_{III} [1] hatten zu hohe Oxydationsäquivalente ergeben. Der Chromophor wurde rasch abgebaut.

In IR.-Spektren von Russuapteridin-*s*_{III} (KBr) fällt im Carbonylbereich die kurzwellige Bande bei 1724 cm⁻¹ besonders auf. Sie wird in der Pterinchemie seit *Brown & Mason* [6] der 4-Oxo-gruppe zugeschrieben. Besonders ausgeprägt ist sie bei Flavinen und Lumazinen, siehe Tabelle 1.

Tabelle 1. IR.-Spektren von Flavinen und Lumazinen (KBr) im 6 μ -Bereich (cm⁻¹)

| | |
|--|--|
| Riboflavin | 1741, 1660, 1592, 1555 (breit) |
| Lumiflavin | 1716, 1660, 1587, 1550 |
| Lumichrom | 1730, 1705, 1533, 1517, 1490 |
| 7,8-Dihydro-7-oxo-8-methyl-lumazin | 1742, 1700, 1670, 1545, 1446 |
| 7,8-Dihydro-7-oxo-8-ribityl-lumazin (3b) | 1730, ~ 1700, 1680 (br.), 1542, 1438 |
| 7,8-Dihydro-7-oxo-6,8-dimethyl-lumazin | 1735, 1705, 1668, 1545 (br.), 1440 (br.) |
| 7,8-Dihydro-7-oxo-6-methyl-8-ribityl-lumazin (3a) | 1745, 1698, 1664, 1546, 1438 |
| 6,7-Dimethyl-lumazin | 1728, 1697, 1569, 1528 |
| Russuapteridin- <i>s</i> _{III} | 1724, ~ 1650, 1620, 1565 (br.), 1420 (br.) |

Rückflussskochen von Russuapteridin-*s*_{III} in 1 N HCl während 45 Min. ohne Luftausschluss ergab eine hellgelbe, im UV. stark hellblau fluoreszierende Lösung. Nach chromatographischer und elektrophoretischer Trennung wurde die kristalline Verbindung **2** (2,10-Dihydro-4,6,8-trihydroxy-10-ribityl-2-oxo-pyrimido[5,4-*g*]pteridin) rein erhalten. Sie stimmte in allen Eigenschaften mit einem nach *Davoll & Evans* [7] hergestellten Präparat überein.

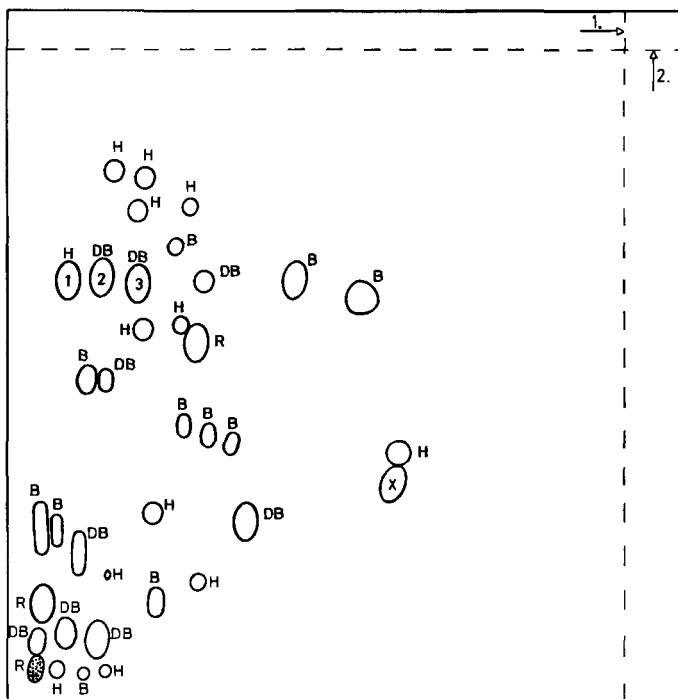
Verbindung **2** stellt ein Rekombinationsprodukt aus durch Hydrolyse gebildetem 5-Amino-4-ribitylamino-uracil dar [8]. Sie beweist erstmals das Vorhandensein einer N-Ribitylgruppe im Russuapteridin-*s*_{III}. Weitere Informationen lieferte milde Hydrolyse von **1** mit 2proz. Essigsäure unter Sauerstoffausschluss im Bombenrohr (150°, 2 Std.). Dabei bilden sich zahlreiche farblose, im UV. fluoreszierende Spaltstücke. Durch Isolierung und mittels spektroskopischer sowie chromatographischer Methoden wurden identifiziert: 7,8-Dihydro-6-methyl-7-oxo-8-ribityl-lumazin (**3a**) = *Masuda's* V-Compound [9]; 7,8-Dihydro-7-oxo-8-ribityl-lumazin (**3b**) und 5,6,7,8-Tetrahydro-6,7-dioxo-8-ribityl-lumazin (**4**)⁵⁾. Diese 3 Verbindungen sind unter den Hydrolysebedingungen nicht stabil. Sie ergeben verschiedene fluoreszierende, strukturell noch nicht erkannte Umwandlungsprodukte. Damit kann zumindest teilweise die grosse Zahl der Spaltstücke aus **1** gedeutet werden; vgl. Figur. Eventuell spielt auch die eingangs erwähnte mögliche Uneinheitlichkeit von **1** eine Rolle.

Verbindung **3a** ist erstmals von *Masuda et al.* aus *Eremothecium ashbyii* [9] sowie neuerdings von *Suzuki et al.* zusammen mit **3b** und anderen, hier nicht erwähnten N-Ribityllumazinen aus *Pseudomonas ovalis* isoliert worden [10]. Es handelt sich offensichtlich um Seitenprodukte der Riboflavinbiogenese. Riboflavin und verwandte Verbindungen konnten wir neuerdings auch in etlichen *Russula*-Arten in zum Teil bedeutender Menge feststellen⁶⁾.

Zur Struktur von Russuapteridin-*s*_{III}. Die erwähnten Abbauresultate beweisen den Pteridincharakter von Russuapteridin-*s*_{III} und zeigen, dass es sich um ein «dimeres»

⁵⁾ Nur dünnschichtchromatographischer Nachweis. Das in [2] erwähnte Leucopterin konnte aus den in dieser Arbeit verwendeten Russuapteridin-*s*_{III}-Präparaten nicht wieder erhalten werden.

⁶⁾ Vgl. eine spätere Mitteilung mit *H. Koch*.



Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm des Hydrolysates von **1** (2proz. Essigsäure, 2 Std. 150°) (MN-Polygram CEL 300/UV₂₅₄). Laufmittel 1: *n*-Butanol-Eisessig-Wasser 20:3:17; Laufmittel 2: 4proz. Natriumcitratlösung. + = Startfleck; x löscht Fluoreszenz UV₂₅₄. Fluoreszenzfarben UV₃₅₀: H = hell-weisslich, B = blau, DB = dunkelblau, R = rosa-orange; 1 = Verbindung **4**, 2 = **3b**, 3 = **3a**.

Lumazin handelt. Die eine Molekelhälfte entspricht demnach der Verbindung **3a**. Ihre C(6)-Methylgruppe zeigt die Verknüpfungsstelle der beiden Hälften an. Unter Annahme eines weiteren Pteridinkernes erfolgt diese demnach in 6,7' oder 6,6'. Analysen, Elektronenspektren und Partialhydrierungen weisen in diese Richtung. Letztere haben sowohl an **1** wie an **3a** zum charakteristischen Partialchromophor des 2,4-Dioxypyrimidins (= 5,6,7,8-Tetrahydrolumazin) [11] geführt, so dass wir annehmen können, dass auch die zweite Molekelhälfte, die ja Träger des N-Ribosylrestes⁷⁾ sein muss, ebenfalls ein Pteridin (Lumazin oder Pterin) ist. Dazu kommt, dass unter den Spaltstücken der Essigsäurehydrolyse 4-5 strukturell noch nicht identifizierte, dunkelblau fluoreszierende Ribosylverbindungen nachgewiesen werden konnten, welche bis auf eine denselben Chromophor wie **3a** und **3b** aufweisen.

Die Lumazinderivate **3a** und **3b** sind stark sauer. Sie wandern in der isoelektrischen Fokussierung in den Anodenraum. Da Russupteridin-s_{III} sich scharf fokussieren lässt (pI 7,29 [2]), muss die noch unbekannte Molekelhälfte eine basische Funktion enthalten. Noch nicht ganz ausschliessen können wir, dass Russupteridin-s_{III} ein ca. 1:1-Gemisch einer bis-N-Ribosyl- mit einer bis-N-Ribitylverbindung darstellt.

⁷⁾ Ein O-Ribosylderivat schliessen wir aus spektroskopischen Gründen und wegen der Hydrolysenbeständigkeit aus; vgl. [12].

Wir danken den Herren Prof. *M. Viscontini*, Zürich, Prof. *W. Pfeleiderer* und Dr. *H. Schlobach*, Konstanz, für Vergleichsproben und wertvolle Diskussionen, Herrn *R. Strickler* für seine Hilfe bei den Aufarbeitungen und Herrn *H. Koch* für Elektrofokussierungsexperimente. Der *Schweizerische Nationalfonds* (Gesuch Nr. 2.434.71) hat diese Arbeit finanziell unterstützt, wofür wir ebenfalls danken.

Experimenteller Teil

1. Isolierung von Russupteridin- s_{III} aus *Russula emetica*. – 35 kg frische Fruchtkörper von *R. emetica*, Ernte 1970, Herkunft Schwarzwald, wurden von den Stielen befreit, darauf in 50 l Alkohol/Wasser/Eisessig 50:50:1 eingelegt, grob zerkleinert und 16 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Abgiessen der roten Lösung und Filtrieren durch Glaswatte wurde der Rückstand noch 2–3 mal auf dieselbe Art extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden durch Celit filtriert und die Filtrate im Vakuum (LUWA-Dünnschicht-Eindampfer) zum dünnflüssigen Sirup eingedampft. Nach Entfetten mit Petroläther (3- bis 4maliges Ausschütteln) wurde der Extrakt (10 l) portionsweise zu je 2 l an einer gut ausgewaschenen Sephadex-G-25-Säule (20 × 100 cm; 7 kg) adsorbiert. Nach dem langsamen Aufziehen (Vorsicht: die Lösungen dürfen nicht zu konzentriert sein!) wusch man die Säule solange mit bidestilliertem Wasser aus, als noch gelbgefärbte und blau- oder gelb fluoreszierende Stoffe eluiert wurden. Diese Vorläufe enthalten u. a. Riboflavin und Lumazinderivate⁶⁾.

In diesem Zustand soll die Säule bis höchstens zur Hälfte karminrot angefärbt sein. In einigen wenigen Ansätzen wurde eine leichte Wanderung der roten Farbstoffe beobachtet, so dass nach dem Waschen mit Wasser zuoberst eine unbelegte Sephadex-Schicht erschien. Dies ist auf ungenügendes Auswaschen der Säule vor Gebrauch zurückzuführen, s. unten. Hierauf erfolgte Entwicklung der einzelnen Zonen mit 1proz. Pyridin in Wasser. Das Säulenbild ähnelt dem für *R. sardonia* erhaltenen (Fig. 2 in [2]), mit folgenden Unterschieden: Fehlen der untersten blautönen, blauen, violettroten und gelblichen Zonen. An deren Stelle tritt ein sehr schmaler roter Ring (E- s_I) und eine diffusere, rosarote Zone (E- s_{II}) auf. Die oberen Hauptzonen (E- s_{III} bis E- s_V) entsprachen ausser in der Intensität der erwähnten Fig. 2. Hauptfarbstoff von *R. emetica* ist wie bei *R. sardonia* Russupteridin- s_{III} . Die einzelnen Zonen wurden im Durchlaufverfahren eluiert: mit 1proz. Pyridin werden die roten Zonen E- s_I bis E- s_{III} , mit 4proz. Essigsäure die Zonen E- s_{IV} und E- s_V eluiert. Nach Eindampfen der Eluate (LUWA) zum dünnflüssigen Sirup wurde der Farbstoff der Hauptzone (E- s_{III}) an einer trockengestampften Cellulosesäule (20 × 40 cm, *Whatman*, CF 11) adsorbiert. Nach gründlichem Auswaschen mit bidest. Wasser (ca. 20 l) eluierte man die Hauptzone mit 2proz. Essigsäure (ca. 50 l Lösung). Ein Nebenfarbstoff liess sich anschliessend mit 15proz. Essigsäure oder mit 10proz. Pyridin eluieren. Seine Charakterisierung erfolgt in einer späteren Mitteilung. Die den Hauptfarbstoff enthaltende Lösung wurde im Rotationsverdampfer zur Entfernung der Essigsäure ganz eingedampft. Der Rückstand wurde in 4 l bidest. Wasser gelöst. Erneute Chromatographie in 8 Portionen an Säulen aus Sephadex G-25 (12 × 40 cm) nach der angegebenen Methode führte nochmals zur Abtrennung von Nebenfarbstoffen und farblosen, fluoreszierenden Verbindungen (teilweise vermutlich Hydrolyseprodukte!). Nach Eindampfen der Farbstofflösung der Hauptzone im Vakuum wurde der Rückstand in wenig Wasser gelöst, die Lösung durch eine Glassinternutsche klar filtriert und der Farbstoff durch Zugabe von Isopropanol zur konzentrierten wässrigen Lösung ausgefällt und abzentrifugiert. Nach Trocknen (0,001 Torr 80°) wurden 420 mg schwarzrotes Pulver mit Oberflächenglanz erhalten, kein Smp.⁸⁾.

Alle Operationen wurden unter möglichster Vermeidung von direkter Lichteinwirkung durchgeführt. Die Sephadexsäulen sind nach gründlichem Auswaschen mit 40–50 l 20proz. Essigsäure und bidest. Wasser bis zur Neutralität (ca. 50 l) für eine neue Trennung bereit. Man wirbelt auf und lässt unter Durchlaufen von bidest. Wasser absetzen. Bei längerem Nichtgebrauch werden sie in 0,02proz. Na₃-Lösung aufbewahrt.

2. Charakterisierung von Russupteridin- s_{III} . – *Verbrennungsanalyse*: Gef. C 41,2 H 5,9 N 19,1% (0,8% Rückstand berücksichtigt). pI 7,3 (isoelektrische Fokussierung).

IR. (KBr): 3370 (breit), 2930, 1724, 1620, 1565, 1490, 1419, 1325, 1293, 1121, 1079, 1040, 960, 898 cm⁻¹.

⁸⁾ Vgl. auch die Angaben in [2].

Elektronenspektren: pH 1,01 (0,1 M HCl/NaCl), $c = 0,647 \cdot 10^{-3}\%$; λ_{\max} in nm ($E_{\text{cm}}^{\%}$): 288 (209), 390 (142), 410 (133), ~ 497 , 523 (644).
 pH 6,95 (0,2 M Phosphat), $c = 0,790 \cdot 10^{-3}\%$: 268 (238), 391 (112), ~ 411 (96), 509 (561), 541 (573).
 pH 9,22 (2proz. Na_2HPO_4), $c = 0,657 \cdot 10^{-3}\%$: 268 (216), 391 (128), ~ 411 (94), 509 (415), 541 (519).

In Wasser ist das *Beer'sche* Gesetz wegen starker Assoziation nicht erfüllt.

CD.: pH 1,01, $c = 1,618 \cdot 10^{-2}\%$; 5 mm Küvette, Empf. $10^{-5}/\text{mm}$. (ΔE mm): 214 (+ 6,5), 241 (- 17,0), 484 (- 115,0), 550 (+ 7,5).

pH 6,95, $c = 1,976 \cdot 10^{-2}\%$: 219 (- 33), 253 (+ 15), 271 (+ 2), 285 (+ 14), 360 (- 6,5), 399 (0), 415 (- 5), 471 (+ 122), 515 (- 130).

pH 9,22, $c = 1,642 \cdot 10^{-2}\%$: 220 (- 25), 253 (+ 9), 267 (+ 2), 285 (+ 13), 355 (- 4), 399 (+ 3), 415 (- 1), 475 (+ 41), 510 (- 71).

Stabilität. Eine $1,3 \cdot 10^{-3}$ proz. Lösung in 20proz. Essigsäure war nach 4 Tagen zu 3%, 12 Tagen zu 9%, 25 Tagen zu 18%, 80 Tagen zu 47% abgebaut; Stabilitätsmaximum um pH 5; rascher Abbau in 2N NH_3 und 0,1N NaOH; allmählicher Abbau an SiO_2 in H_2O .

3. Nachweis der Ribose. – a) *Qualitativ* [1] [13]: 10 mg Russupteridin-*s*_{III} in 10 ml 1N HCl wurden 30 Min. unter Rückfluss gekocht, hierauf wurde die schwach gelbe Lösung im Vakuum abgedampft und der Rückstand an einem Bogen *Whatman*-Papier Nr. 1 (18 × 50 cm) mit Wasser (in Parallelexperimenten an einer Cellulosepulver-Säule) chromatographiert. Im UV. fluoreszierende Zonen wurden entfernt, die mit Anilinthalat und Triphenyltetrazoliumchlorid positiv reagierende Zone mit Wasser eluiert und eingedampft. Nach Wiederholung der Reinigungsstufe identifizierten wir die Ribose *papierchromatographisch* mit a) Butanol/Essigsäure/ H_2O 4:1:1, b) Methyläthylketon/Essigsäure/ges. wäss. Borsäure 9:1:1, c) Essigester/Essigsäure/ H_2O 9:2:2, d) Methyläthylketon/ NH_3 conc. 9:1, e) *n*-Butanol/Pyridin/ H_2O 5:3:2, f) *n*-Butanol/Äthanol/ H_2O 5:2:2, g) Essigester/*n*-Propanol/ H_2O 5,7:3,2:1,3.

Zur Erzielung reproduzierbarer Rf-Werte und deutlicher Flecken mit dem Anilinthalat-Reagens war Abtrennung der fluoreszierenden Begleitstoffe wesentlich.

Nach Silylierung eines zur Trockene eingedampften Rohhydrolysates von Russupteridin-*s*_{III} und Gas-Chromatographie an einer Kapillarkolonnen OV 101, \varnothing 0,3 mm, 46 m mit H_2 , 0,8 atm war ebenfalls Ribose eindeutig nachweisbar. Weder papierchromatographisch noch gas-chromatographisch konnten neben Ribose noch andere Zucker aufgefunden werden.

b) *Quantitativ*: Die Hydrolysen wurden mit 12proz. HCl (*Merck p.a.*) nach [5], jedoch in einer Apparatur nach *Wiesenberger* [14] durchgeführt. Nach 60–75 Min. waren 50 ml Destillat aufge-

Tabelle 2. *Kolorimetrische Ribosebestimmungen*

| Substanz | Einw. mg | kolorimetriert ml | E_{490} | Furfural total gef. mg | Ribose gefunden % d. Th. |
|--|-------------|----------------------|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| Ribose | 1,660 | 3 × 5 | 0,348 | 0,85 | 80 |
| „ | 2,853 | 3 × 5 | 0,626 | 1,50 | 82 |
| „ | 2,034 | 3 × 5 | 0,436 | 1,06 | 82 |
| Adenosin | 2,440 | 9 × 5 | 0,246 | 0,61 | 70 |
| „ | 3,670 | 9 × 5 | 0,354 | 0,86 | 65 |
| „ | 3,555 | 3 × 5 | 0,354 | 0,86 | 67 |
| Inosin | 2,905 | 3 × 5 | 0,269 | 0,67 | 64 |
| „ | 3,275 | 3 × 5 | 0,322 | 0,78 | 67 |
| „ | 2,435 | 3 × 5 | 0,242 | 0,62 | 71 |
| Riboflavin | 22,8 | 10 | – | – | – |
| Picrocrocin | 8,40 | 5 | – | – | – |
| Russupteridin- <i>s</i> _{III} | 6,280 | 3 × 5 | 0,377 | 0,905 | |
| „ | 4,940 | 3 × 5 | 0,267 | 0,65 | |
| „ | 3,928 | 3 × 5 | 0,222 | 0,55 | |

fangen. Weitere Destillate enthielten kein Furfurol mehr. Die Kolorimetrie erfolgte nach [5], mit bidest. Wasser als Referenz. Die Lösungen wurden 30 Min. im Dunkeln stehengelassen und dann sofort die maximale Extinktion durch wiederholte Messungen mit einem registrierenden Spektrophotometer mit Kinetikzusatz ermittelt. Bei Verwendung reiner und frisch destillierter Chemikalien konnte eine einwandfreie Standardkurve ermittelt werden. Resultate siehe Tab. 2.

4. Isolierung der Verbindung 2. – Die Lösung von 62 mg Russupteridin-*s*_{III} in 40 ml 1 N HCl wurde 45 Min. unter Rückfluss gekocht (Ölbad, 115°), nach dem Abkühlen im Vakuum eingedampft und der dunkelbraune Rückstand mit Wasser an Cellulosepulver (Säule 7 × 35 cm) chromatographiert. Die hellgelben Zonen mit hellblauer Fluoreszenz im UV₃₅₀ wurden gesammelt und hierauf papierelektrophoretisch (5proz. Essigsäure, *Beckman*-Spinco Modell CP, 400 Volt) getrennt. Aus der zur Anode geneigten, hellgelben Hauptzone wurden 9 mg rohes **2** gewonnen, das an Sephadex G-15 (5,4 × 24 cm) zuerst mit Wasser (300 ml) und dann mit 5proz. Pyridin chromatographiert wurde. Verschiedene Nebenzone wurden abgetrennt. Aus der am langsamsten wandernden hellgelben Hauptzone **4** (UV₃₅₀ himmelblau) wurde weitgehend reines, kristallisiertes **2** erhalten. Identifikation durch Elektronenspektren in 0,1 N HCl und 0,1 N NaOH (s. Tab. 3). Remissions- und Fluoreszenzspektren ab Dünnschicht und dünnschichtchromatographischen Vergleich mit authentischem Material in 8 Lösungsmitteln auf 4 Trägermaterialien. Herstellung einer Vergleichsprobe erfolgte nach [7] [8]. Es wurde zusätzlichen *Whatman* Nr. 3-Kartons mit Butanol/Eisessig/Wasser 6:3:5 gereinigt.

Alle Arbeiten wurden möglichst im diffusen Licht durchgeführt.

5. Isolierung, bzw. Nachweis der Verbindungen 3a, 3b und 4. – Die Lösung von 48 mg Russupteridin-*s*_{III} in 38 ml 2proz. Essigsäure (*Merck p.a.*) wurde auf 16 Pyrexbombenröhrchen verteilt, hierauf eingefroren und im Hochvakuum durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen sorgfältig entgast und abgeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgte im Autoklaven bei 150° während 2 1/2 Std. (Anheiz- und Abkühlzeit nicht eingerechnet). Die vereinigten Hydrolysate enthielten nach dem Einengen schwerlöslichen roten Farbstoff, von welchem abfiltriert wurde. Das Filtrat (zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm s. Figur) haben wir an DEAE-Cellulose (*Serva*, Heidelberg; 2,9 × 21 cm, Kapazität 0,6 mval/g) chromatographiert, wobei zuerst mit 4 l bidest. Wasser ausgewaschen und hierauf mit 0,5proz. Essigsäure eluiert wurde. Dabei wurden im UV₃₆₀ 6 dunkelblau fluoreszierende Zonen sichtbar (Zonen Z₁–Z₆). Sie waren teilweise mit einer rosaroten, diffusen Zone überlagert. Im obersten Teil der Säule befanden sich eine schmale hellgelbe und eine rosarote festhaftende Zone. Zonen Z₁, Z₂, Z₃ wurden mit 0,5proz. Essigsäure im Durchlauf einzeln eluiert, Zone Z₄ mit 1proz. und Zonen Z₅ und Z₆ mit 2proz. Essigsäure. Die weitere Reinigung erfolgte einzeln durch Chromatographie an Cellulosesäulen (H₂O) und Sephadex G-15 (H₂O). Die Substanz aus der ursprünglichen Zone Z₄ erwies sich als identisch mit Substanz **3a**, diejenige aus Zone Z₅ mit **3b**; siehe Tabelle 3; Verbindung **4** wurde in diesem Experiment überschen. Verbindung **2** bildete sich nicht oder höchstens in Spuren. Änderungen der Reaktionsbedingungen (Konzentrationen, Hydrolysendauer, Temperatur) hatten einen verhältnismässig grossen Einfluss auf die Produkte.

Tabelle 3. *Spektrale Identifikation von Abbauprodukten*

| | | | | | | | |
|------------|------------|----------|------------------|---------------------|------------------|-----------------|----|
| 2: | 0,1 N HCl, | Abbau | λ_{\max} | 226, 239, 279, 424; | λ_{\min} | 237, 262, 318 | nm |
| | | Synthese | | 227, 239, 278, 424; | | 237, 261, 219 | |
| | 0,1 N NaOH | Abbau | | 230, 273, 436; | | 261, 335 | |
| | | Synthese | | 231, 272, 436; | | 255, 335 | |
| 3a: | 0,1 N HCl | Abbau | | 282, 327; | | 244, 300 | |
| | | Synthese | | 281, 328; | | 246, 299 | |
| | 0,1 N NaOH | Abbau | | 257,5, 286, 352; | | 244, 270, 309 | |
| | | Synthese | | 258, 286, 353; | | 242, 271, 309 | |
| 3b: | 0,1 N HCl | Abbau | | 278, 331; | | 247, 297 | |
| | | Synthese | | 277, 331; | | 248, 297 | |
| | 0,1 N NaOH | Abbau | | 261, 280, 360; | | 241, ~ 276, 303 | |
| | | Synthese | | 260, 282, 360; | | 238, 272, 302 | |

Chromatographische Identifikation: 1- und 2-dimensional auf Polygram CEL 300 *Macherey & Nagel, Whatman* Nr. 1 oder 3 oder DE 81-Cel mit a) 4proz. Na-Citrat, b) Butanol/Eisessig/Wasser 20:3:17 und 4:2:3, c) Äthanol/*n*-Butanol/Wasser/Propionsäure 20:20:15:9, d) Isopropylalkohol/2proz. Ammoniumacetat 1:1, e) Propanol/1proz. Ammoniak 1:1, f) 17proz. Essigsäure und Co-Chromatographie authentischer Substanzen; zusätzlich in einzelnen Fällen Aufnahme von Fluoreszenzmaxima und Remissionsmaxima mit dem Dünnschichtspektralphotometer *Zeiss PMQ II* mit Fluoreszenzzusatz.

6. Hydrolysen von Modellsubstanzen. – Die essigsäure Druckhydrolyse (Abschnitt 5) von Pterorhodin ergab Leucopterin und 7-Methylxanthopterin, aber kein Xanthopterin; vgl. auch die Angaben in [2]. **3a** gab drei und **3b** zwei neue, dunkelblau fluoreszierende Produkte mit grösseren Rf-Werten; aus **4** entstand hauptsächlich eine hellgelbe, wahrscheinlich mit **2** identische Verbindung neben dunkelblau fluoreszierenden Nebenkomponenten; aus **2** bildeten sich 9 Flecke mit hell- bis dunkelblauer Fluoreszenz.

7. Synthese der Vergleichssubstanzen. – *Ribamin:* Reduktion von Riboseoxim [15] mit H_2/PtO_2 (*Adams*) in Eisessig [16] gab rohes Ribamin. Durch Umsatz mit Benzoyloxycarbonylchlorid in verdünnter Sodalösung, Neutralisation mit verd. HCl, Extraktion mit Essigester und Kristallisation aus konz. Essigesterlösung wurden 74% (bez. auf Riboseoxim) Z-Ribamin in farblosen Nadeln, Smp. 114°, erhalten.

$C_{13}H_{19}NO_6$ (285,32) Ber. C 54,70 H 6,67 N 4,92% Gef. C 54,55 H 6,60 N 4,94%

Hydrogenolyse von Z-Ribamin erfolgt leicht in abs. Methanol mit 1,1 Äq. HCl und Pd/C im *Rosenmund*-Reduktor. Isolierung von Ribamin als Hydrochlorid, oder als Base nach Perkolation durch Amberlite CG 400, OH^- . Vgl. auch die Angaben in [7].

Verbindung 2 nach [7] aus 5-Nitro-4-d-ribitylamino-uracil durch Reduktion (PtO_2 , Wasser) zum Amin und Umsatz des letzteren mit Alloxanhydrat. Reinigung durch Chromatographie an *Whatman*-Papier No. 3 mit Butanol/Essigsäure/Wasser 6:3:5.

Verbindung 3a aus vorstehend erwähntem Amin (0,5 g) entweder durch Umsatz mit Hydrazinhydrat (1,2 ml) und Brenztraubensäure (1,25 g) nach [17], Chromatographie an Norit (10 g) mit 300 ml 2proz. wässrigem Pyridin (verworfen) und 400 ml 5proz. wässrigem Pyridin, Umkristallisation aus Äthanol/Wasser, oder durch Kondensation mit Brenztraubensäure-methylester in Eisessig nach [18] und Reinigung durch Chromatographie an Amberlite XAD-II mit Wasser Ausbeute im ersten Fall 46% (0,25 g farblose Nadeln), im zweiten 43%.

Verbindung 3b wurde nach [7] hergestellt. Reinigung an Dowex 50 W \times 12 (2,5 \times 20 cm, H^+); das mit Wasser eluierbare, blau fluoreszierende Produkt wird nach Eindampfen aus Äthanol/Wasser umkristallisiert: 0,80 g (52%), Smp. 148–149° (155° Zers.); es geben [7] Smp. 228–229° und [10] Smp. 262–263° an.

$C_{11}H_{14}N_4O_7 \cdot H_2O$ (332,3) Ber. C 40,6 H 4,96 N 17,3% Gef. C 40,9 H 4,92 N 17,3%

Verbindung 4: Modifikation von Vorschriften von [19]. Die obenerwähnte, durch katalytische Reduktion von Nitro-ribitylamino-uracil erhaltene Lösung desamins (0,4 g) wurde i.V. eingedampft. Der Rückstand wurde nach Befreiung von Resten von Wasser durch azeotrope Destillation mit abs. Äthanol in 20 ml trockenem Äthylenglykol aufgenommen und mit 3,2 g Dimethyl-oxalat versetzt. Nach 8 Std. bei 100° wird an Norit chromatographiert (Säule 3 \times 12 cm). Nach Auswaschen mit 100 ml Wasser, dann mit 200 ml 2proz. Pyridin wird das hellblau fluoreszierende Produkt mit 5proz. Pyridin eluiert. Nach Eindampfen und Umkristallisation aus Äthanol/Wasser 280 mg (52%) blässgelbe Nadeln, Smp. > 255°.

$C_{11}H_{14}N_4O_8$ (330,3) Ber. C 40,4 H 4,9 N 16,9% Gef. C 39,3 H 4,52 N 16,7%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *E. F. Frauenfelder*, Dissertation Universität Zürich 1970.
- [2] *C. H. Eugster, E. F. Frauenfelder & H. Koch*, *Helv.* **53**, 131 (1970).
- [3] *P. B. Russell, R. Purvmann, W. Schmitt & G. H. Hitchings*, *J. Amer. chem. Soc.* **71**, 3412 (1949).
- [4] *N. Bregant & Z. Turk*, *Bull. scient. Yougosl. Section A* **15**, 158 (1970).
- [5] *R. A. Stillings & B. L. Browning*, *Ind. Eng. Chemistry, Analytical Ed.* **72**, 499 (1940).

- [6] *D. J. Brown & S. F. Mason*, J. chem. Soc. 1956, 3443.
 [7] *J. Davoll & D. D. Evans*, J. chem. Soc. 1960, 5041.
 [8] *R. Beach & G. W. E. Plaut*, Tetrahedron Letters 1969, 3489; *R. M. Cresswell, T. Neilson & H. C. S. Wood*, J. chem. Soc. 1960, 4776.
 [9] *T. Masuda, T. Kishi & M. Asai*, Chem. pharmaceut. Bull. 6, 291 (1958).
 [10] *A. Suzuki, T. Miyagawa & M. Goto*, Bull. chem. Soc. Japan 45, 2198 (1972).
 [11] *W. Pfeleiderer*, Liebigs Ann. Chem. 747, 111 (1971).
 [12] *W. Pfeleiderer & D. Söll*, J. heterocycl. Chemistry 1, 23 (1964).
 [13] *R. Rieker*, Diplomarbeit, Universität Zürich 1970.
 [14] *E. Wiesenberger*, Mikrochemie 33, 51 (1948).
 [15] *R. Kuhn, K. Reinemund, F. Weygand & R. Ströbele*, Ber. deutsch. chem. Ges. 68, 1765 (1935).
 [16] *G. F. Maley & G. E. E. Plaut*, J. biol. Chemistry 234, 641 (1959).
 [17] *T. Masuda, T. Kishi, M. Asai & S. Kuwada*, Chem. pharmaceut. Bull. Japan 7, 366 (1959).
 [18] *A. Suzuki & M. Goto*, Bull. chem. Soc. Japan 44, 1869 (1971).
 [19] *C. H. Winestock, T. Aogaichi & G. W. E. Plaut*, J. biol. Chemistry 238, 2866 (1963); *W. Pfeleiderer*, Chem. Ber. 90, 2631 (1957).

21. Synthetische Übergänge von der Jonon- in die Damasconreihe

von **K. H. Schulte-Elte**, **B. L. Müller** und **Günter Ohloff**

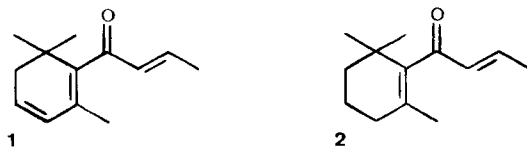
Firmenich & Cie, Forschungslaboratorium, Genf

(29. 11. 72)

Summary. New preparative routes to the isomeric damascones (**2**, **4** and **9**) and β -damascenone (**1**) starting from the readily accessible ionone isoxazoles [11] are described. γ -Damascone (**9**) was prepared from **10** following the *Büchi-Vedéras* transformation [11], while α - and β -damascone (**4** and **2**) were obtained as the end products of the reaction sequence: β -aminodamascones [11] \rightarrow β -ketodihydrodamascones (**20** and **21**) \rightarrow β -hydroxydihydrodamascones (**24** and **25**). β -Damascenone (**1**), however, is formed from the epoxides of β -ionone isoxazole (**14**) by *Birch* reduction followed by treatment with acid.

The unusual behaviour towards metal hydrides of the crotonyl group in the damascones and damascenones is described.

Mit der Entdeckung [1] von β -Damascenon (**1**) [1] [2] [3] und β -Damascon (**2**) [3] in ätherischen Ölen setzten gleichzeitig Versuche zur präparativen Darstellung dieser für die Riechstoffchemie wichtigen Verbindungsklasse ein [1] [4] [5] [6] [7]. Ihre



unmittelbare strukturelle Verwandtschaft mit den Jononen ebenso wie biogenetische Überlegungen hatten unser Laboratorium zu experimentellen Untersuchungen ange-

