

145. Mycelprodukte höherer Pilze

1. Mitteilung

Phenoxazin-Derivate in *Calocybe gambosa*

von Urs Peter Schlunegger, Arnold Kuchen¹⁾,

Institut für organische Chemie der Universität Bern, Erlachstrasse 9a, CH-3012 Bern

und Heinz Cléménçon,

Institut de botanique systématique de l'Université de Lausanne,
Avenue de Cour 14 bis, CH-1007 Lausanne

(23. III. 76)

Mycelium Products in Higher Fungi. I. Phenoxazine Derivatives in *Calocybe gambosa*. – *Summary.* Phenoxazone and α -Amino-phenoxazone have been detected in cultured mycelium of *Calocybe gambosa* (FR.) DONK.

Einleitung. – Unser Interesse an den *Calocybe*-Pigmenten geht auf Kulturen zurück, die ursprünglich für taxonomische Untersuchungen angelegt worden waren. Dabei fiel auf, dass sich die Nährlösungen im Laufe einiger Wochen gelb und schliesslich cognac-braun färbten (Fig. 1). Diese Pigmentbildung veranlasste uns, weitere Untersuchungen anzustellen, die sowohl der Physiologie des Pilzes, als auch der Chemie der Farbstoffe galten.

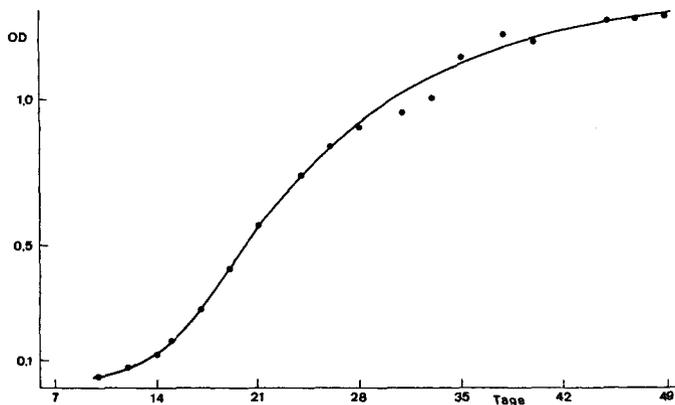


Fig. 1. Verlauf der Farbstoffbildung in Mycel-Kulturen von *Calocybe gambosa* (FR.) DONK (optische Dichte bei 450 nm)

¹⁾ Auszug aus der Diplomarbeit von A. Kuchen am Institut für organische Chemie der Universität Bern.

Die physiologischen Versuche wurden zunächst darauf beschränkt, eine gute Pigmentbildung zu erreichen²⁾. Pilzfarbstoffe sind in letzter Zeit stark bearbeitet worden, wobei ihre Bedeutung für die taxonomische Mykologie zum Vorschein kam (siehe z.B. [1] [2]). Über die Pigmente von *Calocybe gambosa* ist bisher nichts bekannt geworden. In der vorliegenden Arbeit soll nun über die Isolierung und die Struktur-aufklärung von zwei Komponenten des komplexen Pigmentgemisches aus Flüssigkulturen berichtet werden³⁾.

Isolierung und Reinigung der Farbstoffe. – Ein Grossteil der farbigen Bestandteile liess sich mit Dichlormethan aus den Pilznährlösungen extrahieren. Diese Extrakte wurden bei *ca.* 15 Torr und *ca.* 30° bis zur Trockne eingengt und nach Zugabe einiger Tropfen Chloroform (als Biostatikum) bei – 20° bis zur Weiterverarbeitung gelagert. In diesem Konzentrat liessen sich dünn-schichtchromatographisch mindestens sechs definierte, relativ apolare Substanzen und eine stark polare – vermutlich aus mehreren Komponenten bestehende – Fraktion nachweisen. Unter den sechs «apolaren» Substanzen wurden zwei farbige Verbindungen (im folgenden mit K3 bzw. K5 bezeichnet) gereinigt und ihre Strukturen ermittelt.

Strukturaufklärung von K3. – Bei K3 handelt es sich um eine leuchtend orange gefärbte Verbindung, die in relativ grosser Konzentration (*ca.* 1–2 mg/Liter Nährlösung) auftrat. Im Massenspektrum (Fig. 2) erschien das Molekel-Ion *m/e* 197 als Basis-Pik. Die Massenfeinbestimmung ergab die elementare Zusammensetzung C₁₂H₇NO₂. Abgesehen von den niedermolekularen Aromatenbruchstücken (*m/e* 39(8%), 51(10%), 65(3%), 77(7%)) fiel nur ein (*M*⁺ – 28)-Fragment *m/e* 169(70%) auf. Im DADI-Spektrum [3] trat unter anderem ein (*M* – 27)-Signal und ein solches für eine Abspaltung von 28 Masseinheiten vom (*M* – 28)-Fragment auf. Das ¹H-NMR.-Spektrum (Fig. 2) enthielt nur Signale zwischen 6,2 und 7,8 ppm. Das ¹³C-NMR.-Spektrum zeigte 12 Signale im Bereiche von 106 bis 187 ppm. Aufgrund der Intensitäten liess sich vermuten, dass 5 der 12 C-Atome quartär sind. Das einzelne Signal bei 186 ppm sprach für die Anwesenheit eines chinoiden Carbonyl-C-Atoms. Das IR.-Spektrum (Fig. 2) wies die für ein aromatisches und ein chinoides System charakteristischen Banden auf. Ein deckungsgleiches Spektrum fand sich im *Sadtler*-IR.-Katalog für Phenoxazon. Im UV./VIS.-Spektrum traten drei Absorptions-Maxima bei 244, 341 und 445 nm (in Methanol) und bei 252, 360 und 464 nm (in Wasser) auf. Der molare Extinktionskoeffizient bei 445 nm (Methanol) betrug 11 500.

Aufgrund dieser spektroskopischen Daten vermuteten wir, dass es sich bei der orange gefärbten Verbindung K3 um Phenoxazon (**1**) handelt. Wir synthetisierten [4] deshalb diese Verbindung und fanden eine Übereinstimmung der Spektren (MS., DADI, IR., UV./VIS., ¹H-NMR., ¹³C-NMR.) von biologischem und synthetischem Material. Die Identität der orange gefärbten Verbindung K3 aus Nährlösung mit Phenoxazon (**1**) darf daher als gesichert angesehen werden.

²⁾ Arbeiten zur Klärung der biologischen Bedeutung und Wirkung der isolierten Pigmente sind im Gange. Gleichzeitig werden einige weitere Arten der Gattung *Calocybe* auf ihre Pigmentbildung untersucht.

³⁾ Die restlichen Komponenten des Pigmentgemisches sind Gegenstand laufender Arbeiten zur Strukturermittlung.

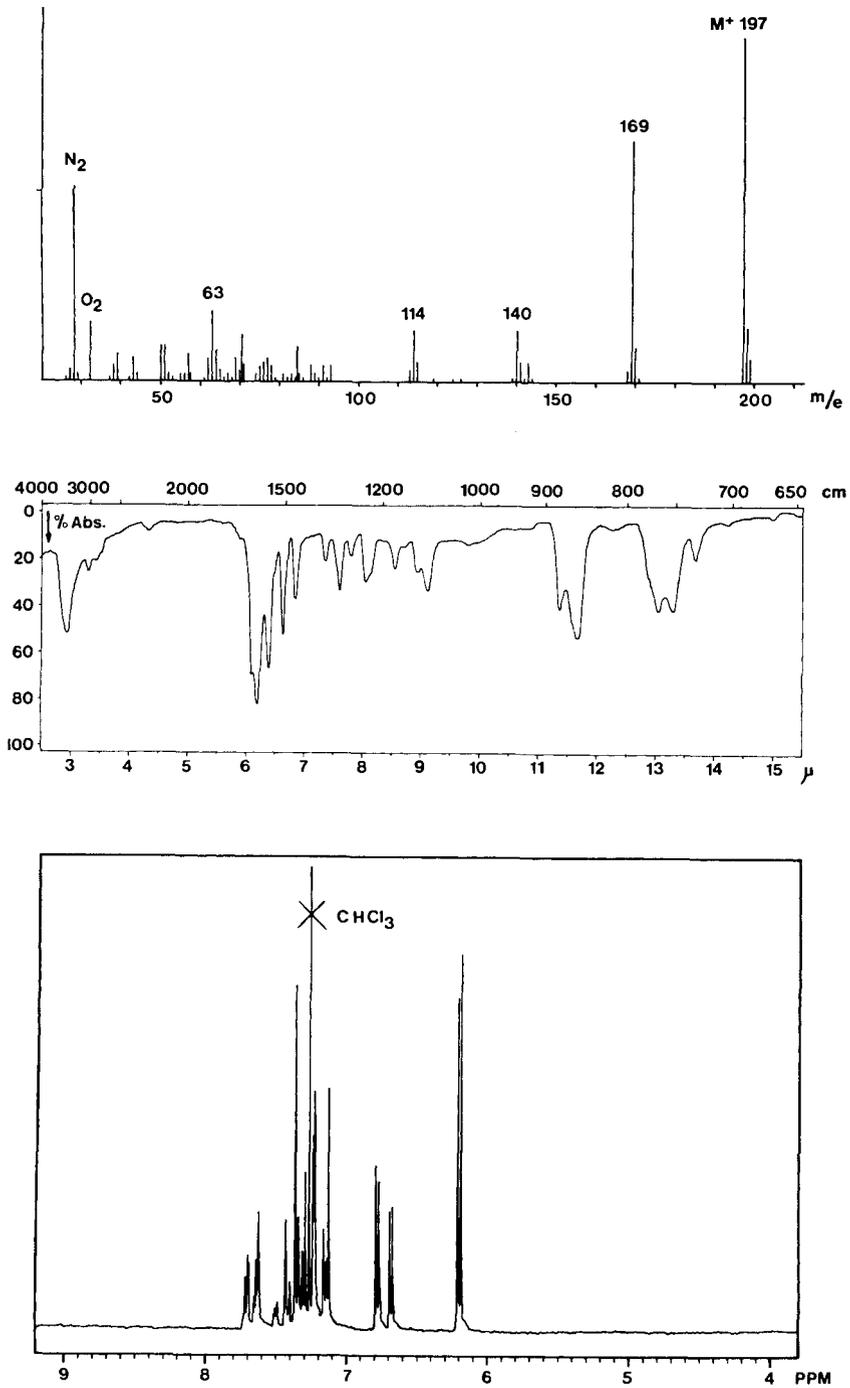


Fig. 2. MS-, IR- und 1H -NMR.-Spektren von K3 (Phenoxazon (1))

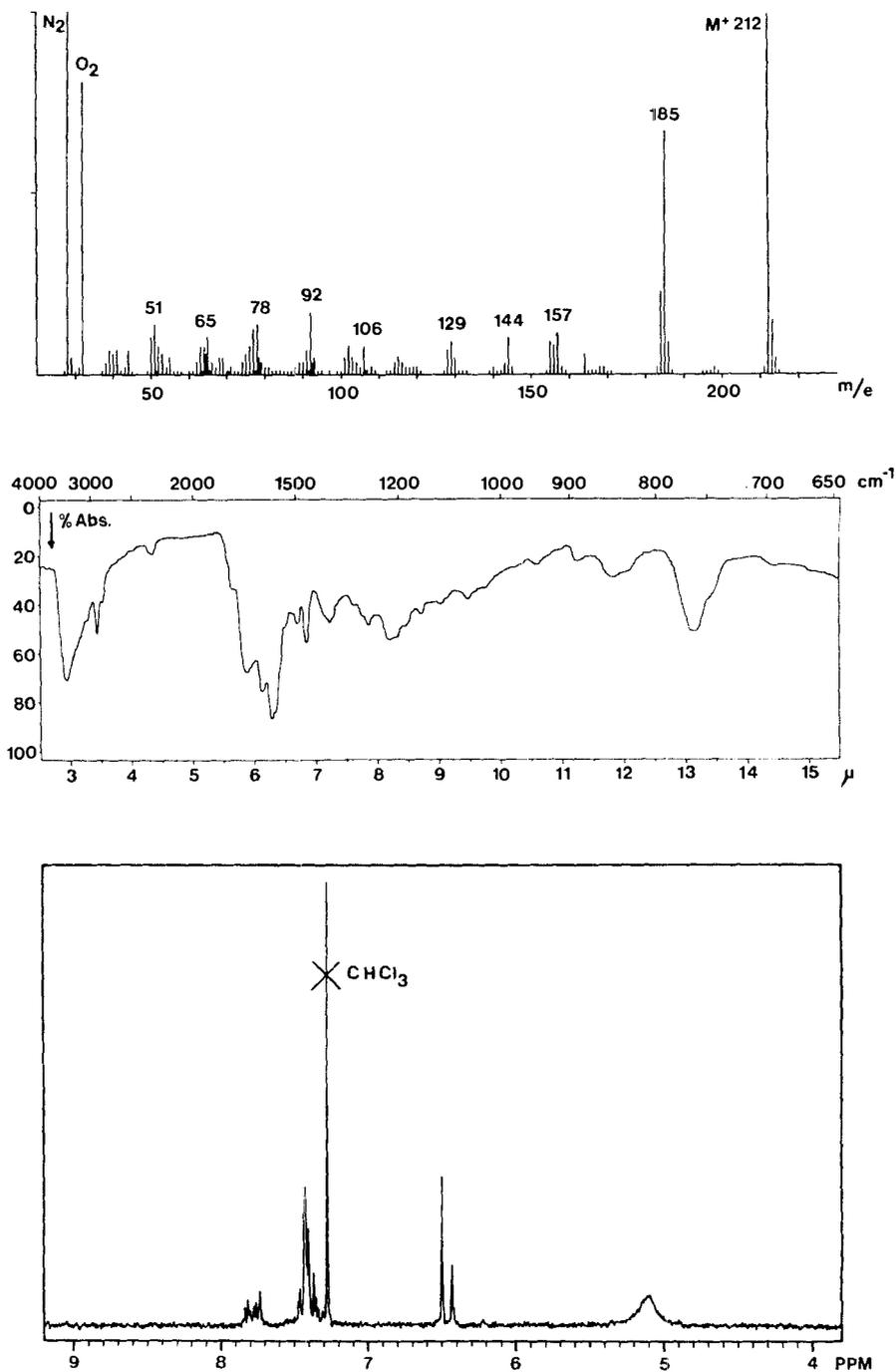


Fig. 3. *MS.*-, *IR.*- und 1H -*NMR.*-Spektren von K5 (2-Amino-phinoxazon (2))

Strukturaufklärung von K5. - Aus biologischen Überlegungen vermuteten wir in der Nährlösung von *Calocybe gambosa* weitere Komponenten mit dem Phenoxazin-Grundgerüst. Massenspektrometrische Voruntersuchungen bestätigen diese Annahme speziell für die gelbbraune Fraktion K5, bei der die Massenfeinbestimmung die Bruttoformel $C_{12}H_8N_2O_2$ ergab. Eine Ähnlichkeit des Fragmentierungsmusters mit K3 (Aromatenbruchstücke, viele Bruchstücke kleiner Intensität, DADI-Spektren) legte die Vermutung nahe, es handle sich bei K5 um ein substituiertes Phenoxazon. Das 1H -NMR.-Spektrum zeigte ein breites Signal im Bereiche von 4,9-5,3 ppm, das den H-Atomen einer Aminogruppe zugeordnet werden kann (Fig. 3).



Aufgrund dieser spektroskopischen Daten vermuteten wir, dass es sich bei K5 um 2-Amino-phenoxazon (**2**) handeln könnte. Wir verglichen deshalb diese Messdaten mit denjenigen von synthetisiertem 2-Amino-phenoxazon [5] und stellten Übereinstimmung der entsprechenden MS-, IR.-⁴), und 1H -NMR.-Spektren fest. Zudem verhielt sich synthetisches und biologisches Material chromatographisch (DC. und GC.) in verschiedenen Systemen gleich. Die Identität des Farbstoffes K5 ($\epsilon = 23200$ bei 425 nm in Methanol) mit **2** darf deshalb als gesichert angesehen werden.

Wir danken Herrn Dr. W. Richter, c/o Ciba-Geigy AG, für die Aufnahme eines Teils der IR.- und NMR.-Spektren, der *Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Universität Bern* für den Ausbau unseres Gas-Chromatographen (Gesuch Nr. 38/74), und dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* für die Unterstützung der DADI-Massenspektrometrie (Gesuch Nr. 2.386-0.75).

Experimenteller Teil

Apparatives. Massenspektren (MS.): Varian-MAT, CH5-DF, Elektronenstossionenquelle, 70 eV, Direkteinlass, Probentemperatur 50 bis 150°, Quellentemperatur 250°. - NMR.-Spektren: 100-MHz-Spektrometer XL-100 Varian, chemische Verschiebung bezogen auf TMS, Lösungsmittel $CDCl_3$, Fourier-Transformations-Spektren. - IR.-Spektren: Substanzen in KBr-Pillen. - UV./VIS.-Spektren: Beckmann Spektrophotometer 24. - Gas-Chromatogramme: Varian GC 1400 modif., Probeneinlass: on column, Glas-Säule: 4 ft, \varnothing ca. 2 mm, ca. 3% OV-17 auf Gaschrom Q, 80-100 mesh.

Herkunft und Kultur des Pilzes. *Calocybe gambosa* (FR.) DONK (*Agaricales, Basidiomycetes*), Kollektion Cléménçon 73/11, wurde am 6. 5. 1973 bei Bremblens VD (Schweiz) gesammelt. Steril entnommene Transplantate aus dem Fruchtkörpergewebe wuchsen gut auf Malzextrakt-Agar.

Zur Pigmentbildung wurde der Pilz auf das flüssige, farblose Milieu T. A. [8] (Malzextrakt ersetzt durch Glucose, Vitamine und Spurenelemente) überimpft und bei ca. 22° vor Sonnenlicht geschützt wachsen gelassen.

Isolierung der Komponenten. Die Mycelkultur von *Calocybe gambosa* wurde mit Dichlormethan extrahiert und der Extrakt bei ca. 30° im RV. eingeengt. Das in dieser Lösung enthaltene

4) Für die IR.-Spektren von Phenoxazon und 2-Amino-phenoxazon siehe [6] [7].

Gemisch wurde auf Kieselgel-Kieselgur-Dickschichtplatten (2/3 Kieselgel, 1/3 Kieselgur, total 7,5 g/dm²) durch viermaliges Entwickeln mit Chloroform/Dichlormethan 1:3 aufgetrennt. Es wurden sechs vorgereinigte Substanzen erhalten, die wir mit K1 bis K6 bezeichnen.

Reinigung der Komponente K3. Die vorgereinigte Komponente K3 wurde auf Kieselgel-Dickschichtplatten 6 mal mit Chloroform entwickelt, mit Methanol eluiert und die methanolische Lösung eingedampft. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst und über einer kurzen Aluminiumoxidsäule chromatographiert (Elutionsmittel: Dichlormethan).

Reinigung der Komponente K5. Die vorgereinigte Komponente K5 wurde auf Kieselgeldünnschichtplatten (Merck DC-Alufolien Kieselgel 60F 254) aufgetragen, mit Äther entwickelt, mit Methanol eluiert, der Eindampfungsrückstand in Dichlormethan gelöst und die Lösung filtriert und eingedampft. Der Rückstand wurde aus siedendem Wasser umkristallisiert.

Synthese von Phenoxazon [4]. 0,45 g (2,4 mmol) Phenoxazin werden in 90 ml kaltem Eisessig gelöst. Unter Kühlen gibt man langsam eine konzentrierte wässrige Lösung von 4,1 g (25 mmol) FeCl₃ zu. Schon nach dem Zusatz des ersten Tropfens FeCl₃-Lösung nimmt die Reaktionslösung die Farbe einer konzentrierten KMnO₄-Lösung an. Nach der Zugabe der ganzen Menge FeCl₃ verdünnt man mit 1 l Wasser und erhitzt für ca. 20 Min. zum Sieden. Nach dem Abkühlen filtriert man die Lösung und schüttelt das Phenoxazon mit CH₂Cl₂⁵⁾ aus. Das Rohprodukt enthält in geringen Mengen mehr als zehn Nebenprodukte. Zur Reinigung wird Phenoxazon aus Cyclohexan umkristallisiert. Ausbeute: 0,18 g Phenoxazon (37%). Phenoxazon kann auch durch Hochvakuumsublimation bei ca. 130° (10⁻³ Torr) gereinigt werden. Für kleine Mengen eignet sich präp. GC. sehr gut (Säulentemperatur: 200°).

Synthese von Amino-phenoxazon [5]. 2 g *o*-Aminophenol werden in 120 g Benzol (*p. a. Merck*) unter Zugabe von ca. 5 ml abs. Äthanol gelöst und zum Sieden erhitzt. Danach werden langsam 12 g feines Quecksilberoxid zugegeben; die Lösung wird dunkelrot. Man filtriert und entfernt das Lösungsmittel im RV. Der dunkelrote Rückstand wird in möglichst wenig siedendem Äthanol gelöst. Beim Abkühlen kristallisiert Amino-phenoxazon aus. Das so gewonnene Produkt ist noch stark verunreinigt. Eine gute Reinigung erzielt man durch Umkristallisieren aus viel Wasser. Amino-phenoxazon kann auch durch Hochvakuumsublimation bei ca. 130° (10⁻³ Torr) gereinigt werden. Für kleine Mengen eignet sich präp. GC. (Säulentemperatur: 240°).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. Besl, A. Bresinsky & I. Kronawitter, Z. Pilzkunde 41, 81–97 (1975).
- [2] W. Steglich, Chemie in unserer Zeit 9, 117–123 (1975).
- [3] U. P. Schlunegger, Angew. Chem. 87, 731–740 (1975).
- [4] F. Kehrmann & A. Saager, Ber. deutsch. chem. Ges. 35a, 341 (1902).
- [5] O. Fischer & O. Jonas, Ber. deutsch. chem. Ges. 27c, 2782 (1894).
- [6] H. Musso & H. G. Matthies, Chem. Ber. 90, 1814 (1957).
- [7] H. Musso, K. Spanke & K. R. Walter, Chem. Ber. 100, 1436 (1967).
- [8] D. Lamouze, Thèse de Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences de Lyon, 20 mai 1960.

5) In [4] mit Benzol.