

261. Über die Verbreitung der stereomeren Muscarine innerhalb der Ordnung der *Agaricales*¹⁾

von René Josef Stadelmann^{a) b) 2)}, Emil Müller^{b)} und Conrad Hans Eugster^{a)}

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

b) Institut für spezielle Botanik der ETHZ,
Universitätstrasse 2, CH-8006 Zürich

(10. VIII. 76)

Investigations on the distribution of the stereoisomeric muscarines within the order of *agaricales*. – *Summary.* Stereomeric muscarines (muscarine, epi-muscarine and allo-muscarine), albeit in low concentrations (≤ 2 mg/100 g dry weight), have been found in fruiting bodies of the following species of *agaricales*: *Amanita pantherina*, *Amanita phalloides*, *Boletus calopus*, *Boletus luridus*, *Clitocybe dealbata*, *Clitocybe hydrogramma*, *Clitocybe gibba* (= *Cl. infundibuliformis* s.s. auct. plur.), *Clitocybe vermicularis*, *Clitopilus intermedius*, *Collybia peronata*, *Hygrocybe nigrescens*, *Hypholoma fasciculare*, *Lactarius rufus*, *Lactarius trivialis*, *Mycena pelianthina*, *Mycena pura*, *Paxillus involutus*, *Rhodophyllus rhodopolius*, *Rhodophyllus sinuatus*, *Russula emetica*, *Tricholoma sulphureum*, *Tylopilus felleus*. Collections of the same species from different sites showed pronounced variation in the relative amounts of stereoisomers, e.g. with *Clitocybe dealbata* and *Rhodophyllus rhodopolius*. *epi-allo*-Muscarine could not be detected in any of the species tested.

Wir haben vor einigen Jahren nachweisen können, dass stereomere Muscarine in Fruchtkörpern von *Amanita muscaria* [2] und von *Inocybe*-Arten [3] vorkommen. Dieser Nachweis war mit Hilfe einer Gas-chromatographischen Trennung der Norbasen an Hochleistungs-Glas-Kapillarkolonnen nach Prof. K. Grob möglich geworden. Die Norbasen ihrerseits wurden aus der durch präparative Isolierung nach üblichen Verfahren³⁾ gewonnenen Muscarinchlorid-fraktion durch Pyrolyse bei 200–240° und 0,001 bis 0,0001 Torr hergestellt⁴⁾⁵⁾. Dabei treten, wie Kontroll-Pyrolysen an reinen Isomeren ergeben haben [2] und durch NMR.-Spektren an natürlichen Gemischen vor der Pyrolyse bestätigt wurde [2], keine nachweisbaren Epimerisierungen ein.

1) 38. Mitt. über Muscarin und verwandte Stoffe.

2) Aus der am Organisch-chemischen Institut der Universität Zürich und am Institut für spezielle Botanik der ETH Zürich ausgeführten und an der Abteilung für Naturwissenschaften der ETHZ eingereichten Dissertation [1].

3) Diskussion solcher Verfahren und Angabe eines universellen Extraktions- und Chromatographieverfahrens s. [4]. Bei Anwesenheit von grösseren Quantitäten von Zuckern in den Extrakten empfiehlt sich eine Modifikation, s. [5] und exper. Teil dieser Arbeit.

4) Die Auftrennung eines Gemisches von stereoisomeren Muscarinen in ihre reinen Diastereomeren durch Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie oder Papierelektrophorese ist bisher nicht gelungen. Anderslautende Angaben [6] haben sich als unrichtig erwiesen.

5) Es könnten auch die *nor*-, *bis-nor*- und *tris-nor*-Muscarine, d.h. die den Muscarinen entsprechenden primären, sekundären und tertiären Amine natürlich vorkommen. Nachweise fehlen jedoch bis heute.

Zwar sind biologische Nachweisverfahren für Muscarin empfindlicher als chromatographische; sie versagen aber bei seinen Stereoisomeren, da diese eine sehr viel kleinere biologische Wirksamkeit aufweisen [7]⁶⁾. Somit könnte ein Pilz aufgrund von negativen biologischen Befunden als «muscarinfrei» klassifiziert werden, obschon er grössere Mengen an stereoisomeren Muscarinen enthält.⁶⁾ Aus diesen Gründen haben wir mehrere Arten aus der Ordnung der *Agaricales* mit den heute zur Verfügung stehenden modernen Verfahren auf ihren Gehalt an stereoisomeren Muscarinen untersucht. Über die Ergebnisse orientiert nachfolgende Tabelle.

Einige der in der Tabelle aufgeführten Arten sind schon vor sehr langer Zeit aufgrund von biologischen Testen als muscarinhaltig angesprochen worden, so *Amanita pantherina* 1885 durch *Boehm* [8] und 1889/1890 durch *Inoko* [9]; *A. phalloides* 1892 und 1899 durch *Kobert* [10] und 1901 durch *Carter* [11]; *Russula emetica* 1906 durch *Kobert* [12] sowie *Boletus luridus* durch *Boehm* [8]. Unsere Ergebnisse bestätigen diese alten Untersuchungen, wenn auch Vortäuschung eines Muscaringehaltes durch Acetylcholin *etc.* im biologischen Versuch nicht ausgeschlossen werden kann. *Clitocybe dealbata* ist in neuerer Zeit von *Hughes et al.* [13] als Muscarin-Pilz erkannt worden. Auch haben diese Autoren daraus Muscarin präparativ und kristallisiert gewonnen.

Für *Mycena pura* ist der hier geleistete chemische Nachweis eines Muscaringehaltes neu. Aufgrund verschiedener mittelschwerer Vergiftungsfälle haben schon *Thellung* [14], *Heim* [15], *Makara* [16] und *Herrmann* [17] auf einen Muscaringehalt dieser Art geschlossen.

Der aktuelle Muscaringehalt in allen in der Tabelle aufgeführten Arten ist, mit Ausnahme der *Clitocybe*-Arten, sehr gering. Er beträgt ≤ 2 mg/100 g Trockengewicht.

Unsere Resultate zeigen, dass Muscarine in *Agaricales* weitverbreitete Inhaltsstoffe sind. *epi*-Muscarin ist in der Mehrzahl der Fälle das vorherrschende Isomer. Es kann sogar in einzelnen Fällen alleiniges Isomer darstellen (*Rhodophyllus sinuatus*, *Mycena pelianthina*). *allo*-Muscarin tritt seltener auf; *epi-allo*-Muscarin ist in der vorliegenden Versuchsreihe nie aufgefunden worden; vgl. [2]. Nach unseren Untersuchungen ist dabei die Variation der relativen Anteile der Stereoisomeren in den Fruchtkörpern nicht von der Methode abhängig. Die unabhängige Aufarbeitung von je zwei Teilkollektionen ergab übereinstimmende Ergebnisse sowohl bei *Rhodophyllus sinuatus* als auch bei *Clitocybe hydrogramma*. Eine weitere Bestätigung dafür liefern die Ergebnisse von Kulturversuchen [1].

Die Tatsache, dass die Isomerenzusammensetzung bei *Mycena pura*, einem Saprophyten, in engen Grenzen schwankt, kommt eher unerwartet. Die verschiedenen Kollektionen der ebenfalls saprophytischen *Clitocybe dealbata* und diejenigen von *Rhodophyllus rhodopolius*, einem wahrscheinlichen Mykorrhizapilz mit weitem Wirtsspektrum, sind hingegen bezüglich der Isomerenzusammensetzung sehr verschieden. *A. phalloides*, ein Mykorrhizapilz mit engem Wirtsspektrum ist in bezug auf die Isomerenzusammensetzung jedoch sehr einheitlich. In Kulturversuchen mit *Cl. rivulosa*, *Cl. dealbata*, *Cl. festiva* und *A. muscaria* haben wir ebenfalls grosse Schwankungen in

⁶⁾ Das Umgekehrte dürfte auch zutreffen, vor allem bei einigen älteren Arbeiten, bei denen unter Umständen ein Muscaringehalt durch Acetylcholin oder ähnliche Stoffe vorgetäuscht worden ist.

Tabelle. Vorkommen von stereomeren Muscarinen in Fruchtkörpern verschiedener Arten aus der Ordnung der Agaricales

Art	Trocken- gew. g	Musca- rin rel. %	epi- Musc. rel. %	allo- Musc. rel. %
<i>Amanita pantherina</i> (DC ex. Fr.) Secr.	4,31	47	53	–
<i>Amanita phalloides</i> (Vaill. ex Fr.) Secr.				
1. Kollektion ^{a)}	42,96	34	64	2
2. Kollektion ^{b)}	178,79	35	64	1
3. Kollektion ^{c)}	25,94	34	65	1
<i>Boletus calopus</i> Fr.	23,48	36	64	–
<i>Boletus luridus</i> Fr.	21,59	8	92	–
<i>Clitocybe dealbata</i> (Sow. ex Fr.) Kummer				
1. Kollektion ^{d)}	0,27	–	–	100
2. Kollektion ^{e)}	3,00	54	35	11
3. Kollektion ^{f)}	4,05	50	38	12
4. Kollektion ^{g)}	2,99	64	20	16
5. Kollektion ^{h)}	1,49	–	7	93
6. Kollektion ⁱ⁾	3,04	76	1	23
7. Kollektion ^{k)}	5,57	74	2	24
<i>Clitocybe hydrogramma</i> (Bull. ex Fr.) Sing.				
Kollektion 1. Teil	9,74	41	59	–
Kollektion 2. Teil	9,04	43	57	–
<i>Clitocybe gibba</i> (Pers. ex Fr.) Kummer (= <i>Cl. infundibuliformis</i> (Schff. ex Fr.) Quél.	12,71	25	58	17
<i>Clitocybe vermicularis</i> (Fr.) Quél.	1,42	13	12	75
<i>Clitopilus intermedius</i> Romagn.	5,42	–	12	88
<i>Collybia peronata</i> (Bolt. ex Fr.) Sing.	4,13	37	63	–
<i>Hygrocybe nigrescens</i> (Quél.) Kühn.	5,02	35	65	–
<i>Hypholoma fasciculare</i> (Huds. ex Fr.) Kummer	6,48	43	57	–
<i>Lactarius rufus</i> (Scop.) Fr.	23,33	41	54	5
<i>Lactarius trivialis</i> Fr.	8,00	39	56	5
<i>Mycena pelianthina</i> (Fr.) Quél.	2,12	–	100	–
<i>Mycena pura</i> (Pers. ex Fr.) Kummer				
1. Kollektion ^{l)}	1,86	25	75	–
2. Kollektion ^{m)}	1,36	18	82	–
3. Kollektion ⁿ⁾	5,49	14	86	–
4. Kollektion ^{o)}	4,12	18	82	–
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr.	8,67	4	96	–
<i>Rhodophyllus rhodopolius</i> (Fr.) Quél.				
1. Kollektion ^{p)}	4,43	5	95	–
2. Kollektion ^{q)}	7,12	33	64	–
<i>Rhodophyllus sinuatus</i> (Bull. ex Fr.) Sing.				
Kollektion 1. Teil	91,66	–	100	–
Kollektion 2. Teil	85,66	–	100	–
<i>Russula emetica</i> Fr.	14,22	41	59	–
<i>Tricholoma sulphureum</i> (Bull. ex Fr.) Kummer	11,52	33	67	–
<i>Tylopilus felleus</i> (Bull. ex Fr.) Karst.	32,44	27	73	–
<i>Cortinarius orellanus</i> (Fr.) Fr.	13,21	–	–	–
<i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	92,45	–	–	–
<i>Agaricus bisporus</i> (Lge) Sing.				
1. Kollektion ^{r)}	169,27	–	–	–
2. Kollektion ^{s)}	64,53	–	–	–

Noten zur nebenstehenden Tabelle.

a) Tellberg b/Effretikon, Kt. Zürich; b) Hardtwald/Rixheim, Elsass; c) Moghegno, Tessin; d) Meride, Tessin; e) Cademario, Tessin; f) Cademario, Tessin; anderer Standort als e); g) Cademario, Tessin; anderer Standort als e) f) g); h) Cademario, anderer Standort als e) f) g); i) Eselriet b/Effretikon, Kt. Zürich; k) Rehalp, Zürich; l) Rappenhalde b/Effretikon, Kt. Zürichs m) Älpli b/Unterwasser, Toggenburg, Kt. St. Gallen; n) Klotenerwald, Kloten, Kt. Zürich; o) Horgenerwald, Horgen, Kt. Zürich; p) Hüntwangen, Kt. Zürich; q) Eselriet b/Effretikon, Kt. Zürich; r) Warenhaus, Zürich; s) Produzent, Gossau, Kt. Zürich.

der Isomerenzusammensetzung in Abhängigkeit von Kulturmedium (Mannitgehalt, Luftzutritt *etc.*) und Kulturdauer festgestellt [1] [18]. Zweifellos üben genetische und ökologische Faktoren einen grossen Einfluss auf die Produktion der stereomeren Muscarine aus.

Unsere Resultate werfen ein neues Licht auf jene Fälle, wo die Toxizität einer Pilzart in der mykologischen Literatur umstritten ist, so bei *Cl. dealbata* [19] und *Mycena pura* [20]. Diese Pilze sind offensichtlich in der Lage, bevorzugt oder ausschliesslich Muscarinisomere zu bilden, die physiologisch wenig aktiv sind.

Die Tabelle zeigt des weiteren, dass Muscarine innerhalb der Ordnung *Agaricales* weitverbreitet vorkommen. Die Arten, in deren Fruchtkörper stereomere Muscarine haben nachgewiesen werden können, gehören zu folgenden Familien: *Boletaceae*, *Hygrophoraceae*, *Tricholomataceae*, *Rhodophyllaceae*, *Amanitaceae*, *Strophariaceae*, *Paxillaceae*, *Russulaceae*.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Gesuch Nr. 2.129-0.74) für die finanzielle Unterstützung sowie Herrn Prof. Dr. H. Kern, ETHZ, die diese Arbeit ermöglicht haben. Herrn Dr. E. Horak danken wir für das Bestimmen von kritischen Arten; den Mitgliedern des Pilzvereins Zürich, insbesondere den Herren F. Lüthi, O. Hotz T. Rosa und B. Kobler für die Beschaffung von Pilzen und Hinweise auf Standorte.

Experimenteller Teil. – *Pilzmaterial.* Genaue botanische Beschreibung und Herkunftsangabe s. [1].

Aufarbeitung. Frischpilze wurden maschinell zu feinem Brei zerhackt und dieser dann gefriergetrocknet; Rückstand = Trockengewicht. Das zermörserte feine Mehl wurde 2mal mit Methanol im Überschuss während 3 Std. unter Rückfluss gekocht. Die filtrierte Methanolextrakte engte man hierauf i.V. auf ein kleines Volumen ein. Nach Wasserzugabe erfolgte Entfettung mit CH_2Cl_2 ⁷⁾; darauf Entfernung aller sauren Begleitstoffe durch langsame Perkolations durch Amberlite IRA 410, 20–50 mesh, OH^\ominus -Form; basische Perkolate mit 1N HCl neutralisiert und Eindampfen, dann Chromatographie an Alox (Fluka Typ 507 C, Aktivität 1) mit Aceton/Methanol 1:1 und Auffangen von Fraktionen⁸⁾. Überprüfung auf Cellulosefolien (Macherey & Nagel, Polygram Cel 300, 0,1 mm mit *s*-Butanol/Äthanol/Eisessig/Wasser 15:5:1:5 nach [22]). Wenn ein erhöhter Gehalt an Zuckern und Zuckeralkoholen (Mannit!) vorlag, wurden Muscarine vor der Alox-Chromatographie an einem Kationenaustauscher (Dowex 50 W, 50–100 mesh, K^\oplus -Form; hergestellt aus der H^\oplus -Form durch Perkolieren einer 40°-warmen, 5proz. K_2SO_4 -Lösung und gründlich ausgewaschen mit Wasser). Eluierung der Muscarine erfolgt mit 5proz. 40°-warmer KCl-Lösung

7) Die in [21] angegebene Methode des Entfettens mit wasserhaltigem Butanol kann unter Umständen zu grösseren Verlusten an Muscarinsalzen führen, worauf bereits in [4] hingewiesen wurde. Trotzdem ist das Verfahren seither von anderen Autoren übernommen worden.

8) Methode von [13].

rasch. Entfernung von KCl durch mehrfaches Ausfällen aus der konzentrierten Lösung mit Methanol. Anschliessend Einengen der Methanolextrakte und Chromatographie der Chloride an Alox wie angegeben.

Pyrolyse und Gas-Chromatographie: nach [2].

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *R. J. Stadelmann*, Produktion von stereoisomeren Muscarinen in vitro sowie über deren Verbreitung innerhalb der Ordnung der Agaricales, Dissertation Nr. 5694 der ETH-Zürich 1976.
- [2] *C. H. Eugster & E. Schleusener*, *Helv.* 52, 708 (1969); *E. Schleusener & C. H. Eugster*, *ibid.* 53, 130 (1970).
- [3] *Ph. Catalfomo & C. H. Eugster*, *Helv.* 53, 848; *H. Bollinger & C. H. Eugster*, *ibid.* 54, 1332 (1971).
- [4] *C. H. Eugster*, Chemie der Wirkstoffe aus dem Fliegenpilz (*Amanita muscaria*), in Fortschritte d. Chemie organ. Naturstoffe, ed. L. Zechmeister, Springer Verlag Wien, New York, S. 273 (1969).
- [5] *H. Bollinger*, Konfigurative Zusammenhänge in der Muscarinreihe; Chiralität der enantiomeren *epi-*, *allo-* und *epi-allo-*Muscarine, Muscarone und *allo-*Muscarone; zur Biogenese des Muscarins. Dissertation Universität Zürich 1974.
- [6] *H. C. Cox, E. Hardegger, F. Kögl, P. Liechti, F. Lohse & C. A. Salemink*, *Helv.* 41, 229 (1958).
- [7] *P. G. Waser*, Chemistry and Pharmacology of Muscarine, Muscarone, and some related compounds, *Pharmacol. Rev.* 13, 465 (1961); *P. G. Waser*, *Experientia* 11, 452 (1955).
- [8] *R. Boehm*, *Arch. exp. Path. Pharm.* 19, 60 (1885).
- [9] *Y. Inoko*, *ref. Chem. Zbl.* 1893, II, 330.
- [10] *R. Kobert*, *ref. Chem. Zbl.* 1892, II, 929; 1899, II, 781.
- [11] *W. S. Carter*, *Amer. J. Physiol.* 5, 158 (1901).
- [12] *R. Kobert*, Lehrbuch der Intoxikationen, Bd. 2, 2. Aufl., S. 621, 1224, F. Enke, Stuttgart 1906.
- [13] *D. W. Hughes, K. Genest & W. B. Rice*, *Lloydia* 29, 328 (1966); *K. Genest, D. W. Hughes & W. B. Rice*, *J. pharm. Sci.* 57, 331 (1968).
- [14] *F. Thellung*, *Schw. Z. Pilzkunde* 16, 18 (1938).
- [15] *R. Heim*, Les Champignons toxiques et hallucinogènes, Boubée, Paris 1963.
- [16] *G. Makara*, Mykolog. Mitteilungen des Landesvereins für Forstwesen, Mykol. Sektion, Budapest 3, 138 (1971).
- [17] *M. Herrmann*, Mykol. Mitteilungsblatt (Halle, DDR) 17, 17 (1971).
- [18] *R. J. Stadelmann, E. Müller & C. H. Eugster*, Produktion von stereoisomeren Muscarinen in Reinkultur, *Sydowia (Annales mycologici II)*, Vol. 29, in Vorbereitung.
- [19] *E. Nüesch*, Die Trichterlinge. Monographie der Agaricengattung *Clitocybe* mit Bestimmungsschlüssel. F. Schwald, St. Gallen 1926; *H. T. Güssow & W. S. Odell*, *Mushrooms and Toadstools*, Ministry of Agriculture, Ottawa, Ontario, Canada 1927, p. 58.
- [20] *E. Michael & B. Hennig*, Handbuch für Pilzfreunde, VEB Gustav Fischer, Jena 1968; *J. Schlittler & F. Waldvogel*, Die Pilze. Silva Verlag, Zürich 1972; *B. Wicki & F. Loup*, *Schweiz. Zeitschr. f. Pilzkunde* 16, 54, 69 (1938).
- [21] *M.-L. L. Swenberg, W. J. Kelleher & A. E. Schwarting*, *Science* 155, 1259 (1967).
- [22] *C. H. Eugster*, *Helv.* 39, 1002 (1956).