

**174. Zur Biogenese des Muscarins in Mycelkulturen von *Clitocybe rivulosa*<sup>1)</sup>**von Keiichi Nitta<sup>2)</sup>, René Josef Stadelmann<sup>3)</sup> und Conrad Hans Eugster

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

(1. IV. 77)

**Studies on the biosynthesis of muscarine in mycelial cultures of *Clitocybe rivulosa****Summary*

The incorporation and distribution of several <sup>14</sup>C-labelled simple compounds into muscarine has been investigated with mycelial cultures of *Clitocybe rivulosa*. Specifically, the carbon atoms 1, 2 and 3 of pyruvate are incorporated into CH<sub>3</sub>-C(2), C(2) and C(3), and the carbon atoms 2, 3 and 4 of glutamate into C(4), C(5) and CH<sub>2</sub>-C(5) of muscarine. The carbon atoms 1 and 5 of glutamate are lost during the biosynthesis. Therefore, muscarine can be regarded as a derivative of glutamate.

Über die Biogenese des Muscarins (1 = Muscarinchlorid) bestehen erst Hypothesen<sup>4)</sup>, deren experimentelle Überprüfung bisher erfolglos verlaufen ist<sup>5)</sup>. Signifikant ist der Nachweis, dass alle bis heute isolierten Muscarine an C(2) (*S*)-Konfiguration aufweisen [8]<sup>6)</sup>. Schwierigkeiten bieten vor allem folgende Eigenheiten der Muscarin-produzierenden Organismen: a) die meisten sind Mykorrhizapilze mit teilweise sehr enger Wirtsspezifität und lassen sich nur mit grosser Mühe *in vitro* kultivieren; b) solche Kulturen wachsen sehr langsam, und Muscarin wird, wenn überhaupt, nur in äusserst geringer Menge gebildet; c) Einbauversuche an Fruchtkörpern am natürlichen Standort geben erratische Resultate und lassen vermuten, dass Muscarin im Mycel gebildet wird<sup>7)</sup>.

Am geeignetsten sind saprophytische *Clitocybe*-Arten, die etwas besser wachsen, jedoch nur sehr wenig Muscarin produzieren<sup>8)</sup>. Für die vorliegende Untersuchung benutzen wir *Cl. rivulosa*, Stamm CBS 152.37, unter Bedingungen, die der eine von uns [1] [13] soweit optimiert hatte, dass eine konstante Produktion von 1,8–2,2 mg

<sup>1)</sup> 40. Mitt. über Muscarin und verwandte Stoffe; 39. Mitt. [1], 38. Mitt. [2].

<sup>2)</sup> Kanazawa University, Faculty of Pharmacy, Kanazawa, Japan; Gast am Organisch-chemischen Institut der Universität Zürich 1975.

<sup>3)</sup> Institut für spezielle Botanik der ETH Zürich.

<sup>4)</sup> Hexose als Vorläufer [3], erwähnt in Standardwerken [4] (scheinbare Bestätigung durch Isolierung von *erythro*-4,5-Dihydroxyhexyl-trimethylammoniumchlorid aus *Amanita muscaria* [5]); Vermutungen, dass sich Muscarin aus kleineren (als C<sub>6</sub>) Bruchstücken bildet [4c] [6].

<sup>5)</sup> Einbauversuche an Fruchtkörpern von *Inocybe napipes* [6] und Mycelkulturen von *Clitocybe rivulosa* [7] liessen keine Schlüsse zu.

<sup>6)</sup> Die Chiralität des ebenfalls in der Natur vorkommenden *epi-allo*-Muscarins [9] ist noch nicht bekannt.

<sup>7)</sup> Versuche von H. Bollinger und Ph. Catalfomo (Oregon State University, Corvallis USA) 1971/72, vgl. [10].

<sup>8)</sup> *Cl. rivulosa* (PERS. ex FR.) KUMMER [7a] [11], *Cl. angustissima* (LASCH) KUMMER und weitere *Cl.*-Arten [12].

Tabelle 1. Einbau von  $^{14}\text{C}_3\text{H}_5\text{COONa}$  in Muscarin (50  $\mu\text{Ci}$ , 20 Flaschen zu 160 ml Nährmedium)

Zugabe am	Ernte am	spezifische Radioaktivität (dpm/mg)			
		Mycel	Lipide	Muscarin- chlorid	Cholin- chlorid
15. Tag	36. Tag	760	3060	490	36
22. Tag	36. Tag	870	2000	310	26

Tabelle 2. Einbau von  $\text{H}^{14}\text{COONa}$  in Muscarin und Cholin (50  $\mu\text{Ci}$ , 20 Flaschen zu 160 ml Medium)

Zugabe am	Ernte am	spezifische Radioaktivität (dpm/mg)			
		Mycel	Lipide	Muscarin- chlorid	Cholin- chlorid
15. Tag	24. Tag	880	940	9550	3190
21. Tag	28. Tag	906	1060	8750	800

Muscarin(chlorid) pro 20 Kulturflaschen (= 3,2 l Medium mit 33–35 g Myceltrockengewicht für eine 35tägige Wachstumsperiode) eintrat. Unter den gewählten Bedingungen blieb praktisch alles Muscarin im Mycel, und Stereoisomere wurden kaum gebildet<sup>9)</sup>. Der Muscaringehalt erhöhte sich parallel zum Mycelgewicht und erreichte am 30. Tag sein Maximum. Einbauversuche mit 2- $^{14}\text{C}$ -Essigsäure<sup>10)</sup> zeigten eine höhere Radioaktivität des isolierten Muscarins, wenn der Vorläufer am 15. statt am 22. Tag zur Kultur gegeben wurde, s. *Tab. 1*. Wegen der etwas besseren Einbauraten wurde für die nachfolgenden Versuche die Zugabe am 15. Tag ausgeführt, die Einbauraten blieben aber auch in diesem Fall niedrig (vgl. *Tab. 3*).

Muscarin wird in Fruchtkörpern und in den Kulturen von Cholin begleitet. Wurde  $^{14}\text{C}$ -Ameisensäure<sup>10)</sup> verabreicht, dann zeigten Muscarin und Cholin verhältnismässig hohe Radioaktivität, welche zudem bei früherer Zugabe des Vorläufers höher war (s. *Tab. 2*). Der auffällige Unterschied in den Radioaktivitäten von Cholin und Muscarin deutet auf Biogenese des Cholins in einem sehr frühen Stadium und auf verschiedene Biogenesewege für die beiden Verbindungen hin. Die Resultate mit anderen Vorläufern sind in *Tab. 3* aufgeführt. Da 2- $^{14}\text{C}$ -Essigsäure, 1- $^{14}\text{C}$ -Brenztraubensäure, 2- $^{14}\text{C}$ -Brenztraubensäure, U- $^{14}\text{C}$ -Glutaminsäure und U- $^{14}\text{C}$ -Asparaginsäure in Muscarin relativ gut eingebaut wurden, dürfte dessen Biogenese eng am Tricarbonsäure-Cyclus angeschlossen sein. Andererseits weisen die geringe Einbauraten von 1- $^{14}\text{C}$ -Essigsäure, 1- $^{14}\text{C}$ -Glutaminsäure und 5- $^{14}\text{C}$ -Glutaminsäure und die gute Einbauraten von U- $^{14}\text{C}$ -Glutaminsäure darauf hin, dass C(1) und C(5) der letzteren bei der Bildung von Muscarin verloren gehen. Da C(1) von Essigsäure im Verlauf des Tricarbonsäure-Cyclus in C(1) und C(5) von Glutaminsäure, C(2) von Essigsäure hingegen in C(2), C(3) und C(4) der Aminodicarbonsäure eingebaut werden kann, lässt sich die geringe Einbauraten von 1- $^{14}\text{C}$ -Essigsäure deuten.

U- $^{14}\text{C}$ -Asparaginsäure wurde gut in Muscarin eingebaut; es ist jedoch nicht klar, welche C-Atome dieser Aminodicarbonsäure dies betrifft. Guter Einbau wurde auch mit 2- $^{14}\text{C}$ - und 1- $^{14}\text{C}$ -Brenztraubensäure beobachtet. Da 1- $^{14}\text{C}$ -Essigsäure nur

<sup>9)</sup> Bildung von Stereoisomeren durch Variation von Nährmedium, Gefässform, Art des Schüttelns, Belüftung sowie über deren Zeitabhängigkeit s. [1] [13].

<sup>10)</sup> Einbauversuche mit radioaktiv markierten Ameisen-, Essig-, Brenztrauben-, Glutamin-, Asparagin- und Glyoxylsäuren erfolgten jeweils mit den entsprechenden Natriumsalzen.

Tabelle 3. *Einbau von verschiedenen Vorläufern in Mycelkulturen von Cl. rivulosa*

Vorläufer <sup>10)</sup> und verwendete Aktivität	Spezifische Radioaktivität (dpm/mg) <sup>a)</sup>				Cholin- chlorid
	Mycel	Amino- säuren	Lipide	Muscarin- chlorid <sup>b) c)</sup>	
1-[ <sup>14</sup> C]-Essigsäure 1,0 mCi	17400	3630	136800	2040 (1,8 · 10 <sup>-4</sup> %)	54
2-[ <sup>14</sup> C]-Essigsäure <sup>d)</sup> 1,0 mCi	37260	10000	232000	19100 (17 · 10 <sup>-4</sup> %)	820
1-[ <sup>14</sup> C]-Brenztraubensäure 0,25 mCi	1440	2880	2440	5900 (5,3 · 10 <sup>-4</sup> %)	300
2-[ <sup>14</sup> C]-Brenztraubensäure 0,25 mCi	13500	6520	55600	22700 (20 · 10 <sup>-4</sup> %)	70
U-[ <sup>14</sup> C]-Glutaminsäure 0,1 mCi	7900	6330	8260	17800 (16 · 10 <sup>-4</sup> %)	570
1-[ <sup>14</sup> C]-Glutaminsäure 0,1 mCi	2550	13600	4230	860 (0,8 · 10 <sup>-4</sup> %)	130
5-[ <sup>14</sup> C]-Glutaminsäure 0,1 mCi	3010	24150	1840	2480 (2,3 · 10 <sup>-4</sup> %)	65
U-[ <sup>14</sup> C]-Asparaginsäure 0,1 mCi	5520	10500	10300	11100 (10 · 10 <sup>-4</sup> %)	410
2-[ <sup>14</sup> C]-Glyoxylsäure 0,1 mCi	19300	4460	16500	29200 (26 · 10 <sup>-4</sup> %)	6080
[ <sup>14</sup> C]-Ameisensäure 0,88 mCi	17160	16360	14030	443200 (400 · 10 <sup>-4</sup> %)	65100

a) Die aufgeführte spezifische Radioaktivität ist auf 1,00 mCi des Vorläufers umgerechnet. Einbauversuche beziehen sich auf einen Ansatz mit 20 Flaschen zu 160 ml Medium.

b) Aktivität vor dem Verdünnen mit inaktivem Muscarinchlorid.

c) Absolute Einbaurate in % in Klammern.

d) Zugabe am 10. Tag der Kultur; alle anderen Zugaben am 15. Tag. Ernte überall am 35. Tag.

geringfügig eingebaut wurde, darf angenommen werden, dass sich aus Essigsäure nur wenig Brenztraubensäure bildet. Brenztraubensäure und – unter Berücksichtigung der Konfiguration an C(2) von Muscarin – (*S*)-Milchsäure stellen somit die eigentlichen C<sub>3</sub>-Vorläufer in der Muscarinbiogenese dar.

[<sup>14</sup>C]-Ameisensäure wurde sehr gut in Muscarin eingebaut. Die geringe Verteilung auf andere Fraktionen lässt auf einen kleinen C<sub>1</sub>-Pool schliessen.

Die hohe Einbaurate von 2-[<sup>14</sup>C]-Glyoxylsäure könnte z.B. über den Glyoxylsäure- und Tricarbonsäure-Cyclus *via* Glutaminsäure zustandekommen. Abbau des Muscarins aus diesem Einbauversuch ergab aber, dass 90% der Radioaktivität in den *N*-Methylgruppen von Muscarin lokalisiert sind. *Tab. 3* zeigt, dass für mehrere Vorläufer das gebildete Muscarin eine höhere spezifische Aktivität aufweist als die der übrigen Fraktionen (Mycel, Aminosäuren, Lipide). Daraus kann auf die spezifische Teilnahme dieser Vorläufer an der Muscarinbiogenese geschlossen werden.

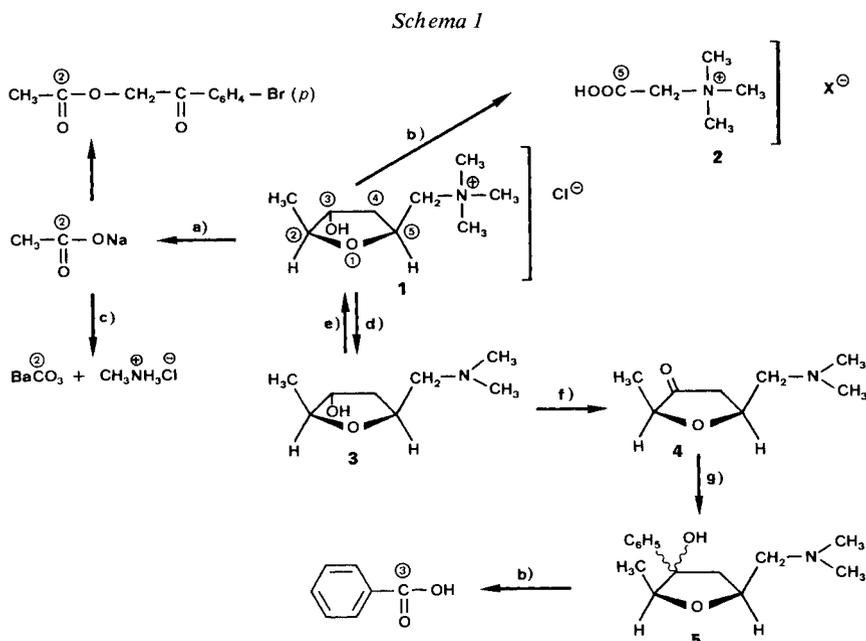
Durch Abbau der markierten Muscarinchloride (**1**) wurde versucht, Anhaltspunkte über die Verteilung der Radioaktivität zu erhalten (s. *Schema 1* und *Tab. 4*). 1-[<sup>14</sup>C]-Brenztraubensäure zeigt demnach zwar hohen Einbau in C(3) und 2-[<sup>14</sup>C]-Brenztraubensäure in C(2) von **1**; überraschend und nicht ohne weiteres zu deuten ist aber die Radioaktivität im Betainbruchstück (**2**) (Verschmierungeffekt?). U-[<sup>14</sup>C]-Glutaminsäure ergab höchste Aktivität an C(5) und CH<sub>2</sub>-C(5). Diese C-Atome müssen also aus C(2) und C(3) von Glutaminsäure stammen. Dagegen war C(3) von **1** nicht markiert; C(3) kommt also nicht aus Glutaminsäure. Im Versuch mit U-[<sup>14</sup>C]-Asparaginsäure zeigten C(5) und CH<sub>2</sub>-C(5) höhere Aktivität als C(4). Eine mögliche Erklärung dafür ist die Annahme, dass U-[<sup>14</sup>C]-Asparaginsäure im Tricarbonsäure-Cyclus zuerst über U-[<sup>14</sup>C]-Oxalessigsäure in C(1), C(2), C(3)-markierte Glutaminsäure umgewandelt wird, bevor es in Muscarin eingebaut wird. Mit 2-[<sup>14</sup>C]-Glyoxylsäure wurde ein Muscarin erhalten, das wie bereits erwähnt 90% ± 6% der Aktivität in den CH<sub>3</sub>N-Gruppen aufwies. Es ist deshalb zu vermuten, dass Glyoxylsäure vor allem als C<sub>1</sub>-Quelle dient und dass nur Bruchteile *via* Glyoxylsäure- und Tricarbonsäure-

Tabelle 4. *Abbauversuche an biosynthetischen, markierten Muscarinen<sup>a)</sup>*

Vorläufer <sup>10)</sup>	C <sub>H<sub>3</sub></sub> -C(2)	C(2)	C(3)	C(4)	C(5) + C <sub>H<sub>2</sub></sub> -C(5)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>b)</sup>
2-[ <sup>14</sup> C]-Essigsäure	11	4	3	(10)	(63 ± 7)	10 ± 6
	14		(13)		73	
1-[ <sup>14</sup> C]-Brenztraubensäure	8		49	(5)	38	
			(54)			
2-[ <sup>14</sup> C]-Brenztraubensäure	4	54	(22)		(19 ± 7)	0 ± 6
	59				19	
U-[ <sup>14</sup> C]-Glutaminsäure	8	2	0	(17)	(49 ± 7)	24 ± 6
			(17)		73	
U-[ <sup>14</sup> C]-Asparaginsäure	7	6	(3)		(60 ± 7)	24 ± 6
					84	
2-[ <sup>14</sup> C]-Glyoxylsäure	2	3	(7)		(0 ± 7)	90 ± 6
					88	
[ <sup>14</sup> C]-Ameisensäure	1		(2)		0 ± 7	99 ± 6
					97	

a) Einklammerte Werte wurden durch Differenzbildung ermittelt; Werte ohne Klammern beziehen sich auf direkte Messungen an den Abbauprodukten (s. *Schema 1*).

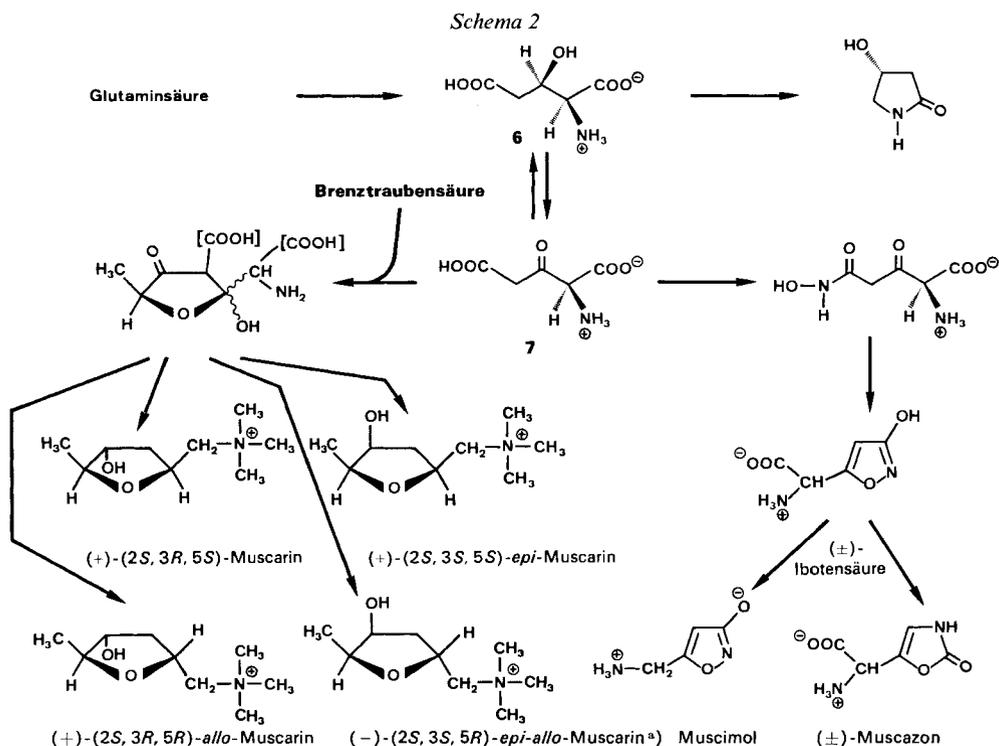
b) Wert erhalten durch Differenzbildung zwischen Radioaktivität von Muscarinchlorid (1) und dem durch Pyrolyse erhaltenen Nor-muscarin (3).



a) *Kuhn-Roth*-Abbau; b)  $\text{KMnO}_4$ ; c) *Schmidt*-Abbau; d) Pyrolyse bei  $240^\circ/0,001$  Torr; e)  $\text{CH}_3\text{I}$ ;  
f)  $\text{CrO}_3$ ; g)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Li}$ .

Cyclus in Glutaminsäure eingebaut werden. Eindeutig sind die Resultate mit Ameisensäure: praktisch die ganze Radioaktivität war in den CH<sub>3</sub>N-Gruppen lokalisiert. Schwierig zu verstehen ist die hohe Aktivität in der Trimethylammoniummethyl-Einheit von 1, wenn 2-[<sup>14</sup>C]-Essigsäure verfüttert wird (73%). Falls ein guter Einbau von Essigsäure in Glutaminsäure stattfände, müsste hohe Aktivität an C(4) erwartet werden.

Die hier vorgelegten Resultate lassen den Schluss zu, dass die Biogenese von Muscarin nicht über eine Hexose, sondern durch Kondensation von Brenztraubensäure (bzw. (S)-Milchsäure) und Glutaminsäure erfolgt. Dabei gehen die beiden Carboxylgruppen der Glutaminsäure verloren, s. *Schema 2*. Das Auftreten von *threo*-3-Hydroxyglutaminsäure (**6**) und 3-Ketoglutaminsäure (**7**) als Zwischenprodukte wird postuliert, weil damit die Kondensation mit Brenztraubensäure (bzw. Milchsäure) und die formale Herleitung anderer Inhaltsstoffe von *Amanita muscaria* ((-)-(*R*)-4-Hydroxy-2-pyrrolidon [14], Ibotensäure, Muscazon und Muscimol [15]) leicht verständlich ist<sup>11</sup>). Die Entstehung des Tetrahydrofuranrings von Muscarin ist noch ganz unbekannt. Die Formulierung über ein Halbacetal ist rein hypothetisch.



<sup>a)</sup> *epiallo*-Muscarin ist in der Natur nachgewiesen [9]; die Konfiguration des Naturstoffes ist jedoch noch nicht bekannt. Konfiguration der anderen Stereoisomeren s. [8].

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Gesuch Nr. 2.129-0.74) für finanzielle Unterstützung, den Herren Prof. Dr. H. Kern und Prof. Dr. E. Müller (Institut für spezielle Botanik der ETH Zürich) für die Zurverfügungstellung ihrer Kulturräume; Herrn H. Frohofer für die Radioaktivitätsbestimmungen und Herrn Dr. W.-D. Woggon für eine kritische Diskussion.

## Experimenteller Teil

1. *Herstellung der Kulturen.* Zur Gewinnung von homogenem Impfmateriale wurde *Clitocybe rivulosa*, Stamm CBS 152.37, in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane (ca. 2 cm tiefe und 1 cm hohe seitliche Einbuchtung) auf 160 ml Nährlösung folgender Zusammensetzung wachsen gelassen: 35 g Malzextrakt (*Oxoid*), 20 g Mannit, 8 g Hefeextrakt (*Difco*), 1 g Glutamin, 1 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml *Hoaglandlösung* [16] und 1 l destilliertes  $\text{H}_2\text{O}$ . 3–5 Kolben wurden mit je 2–3 Haken voll Hyphenmaterial geimpft, welches mit einer Impfnadel aus Schräg-Agarröhrchen gekratzt wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Reste des alten Nährbodens mit übertragen wurden. Inkubiert wurde bei 24° auf einer Rundschüttelmaschine mit 48 U/Min. (Schüttelamplitude 2,4 cm). Innert 12 Tagen entwickelte sich das Mycel submers sehr kräftig in Form von Mycelkügelchen von ca. 2 mm Durchmesser. Unter diesen Schüttelbedingungen konnte das so erhaltene Impfmateriale ohne Beeinträchtigung während einiger Wochen bei 8° weiter erhalten werden. Für eine Muscarin-Produktion wurden je 20 Schikanekolben mit je 160 ml der beschriebenen Nährlösung benutzt und diese mit je 1 ml 12 Tage altem Impfmateriale geimpft. Anschliessend wurden diese Kolben 35 Tage bei  $24 \pm 1^\circ$  auf einer Maschine mit 72 Hin- und Herbewegungen/Min. (Schüttelamplitude 5 cm) unter diffussem Kunstlicht inkubiert. (Ein Einfluss des Lichts auf die Versuchsergebnisse wurde nicht festgestellt.) Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Schikane jedes Kolbens senkrecht zur Auslenkung dieser Schüttelmaschine befand. Sämtliche Nährmedien wurden während 20 Min. bei 1 atm und 120° im Autoklaven sterilisiert.

2. *Isolierung von Muscarin*<sup>12)</sup>. Das aus einem Ansatz von 20 Kolben durch Filtration durch Käsetuch erhaltene Mycel wurde mit Wasser gewaschen, ausgepresst und gefriergetrocknet. Ausbeute 33–35 g Trockenmateriale. Nach Mahlen und Extraktion mit je 3 Portionen zu 500 ml Methanol unter Rückfluss während 3 Std. wurden die kombinierten Methanollösungen i. V. verdampft. Die zurückgebliebene trübe Lösung wurde hierauf mit HCl auf pH 3–4 eingestellt und anschliessend im Scheidetrichter mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  erschöpfend entfettet. Die erhaltene klare wässrige Lösung wurde auf eine Säule mit *Amberlite* IRA-410 (20–50 mesh,  $\text{OH}^-$ ,  $1,5 \times 25$  cm) gebracht und solange langsam perkoliert, als noch deutlich alkalische Substanz eluiert wurde. Nach Neutralisation mit HCl wurde das Eluat i. V. zur Trockene eingedampft. Rückstand hierauf mit wenig Methanol zur Abtrennung von NaCl behandelt. Der Methanolextrakt wurde eingedampft und der Rückstand in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 3 die Lösung auf *Dowex-50 W*  $\times 12$  (50–100 mesh,  $\text{H}^+$ ,  $1,5 \times 30$  cm) gegeben. Nach gründlichem Auswaschen der Kationen und Neutralstoffe mit Wasser wurden Muscarin und Cholin mit 500 ml 1N NaOH eluiert. Eluat mit HCl neutralisiert und hierauf i. V. zur Trockene eingedampft. Rückstand mehrmals mit Methanol zur Abtrennung von NaCl behandelt und die konzentrierte Methanollösung an einer Alox-Säule (*Fluka* Typ 507 C, Aktivität I) mit Methanol/Aceton 1:2 chromatographiert. Muscarinhaltige Fraktion erneut mit demselben Lösungsmittel an Alox chromatographiert. 1 i. HV. getrocknet und aus abs. 2-Propanol/Aceton kristallisiert. Dünnschichtchromatographischer Nachweis auf *Polygram Cel 300* (0,1 mm) mit *s*-Butylalkohol/Äthanol/Eisessig/ $\text{H}_2\text{O}$  15:5:1:5 und *Dragendorff*-Reagens [17].

In radioaktiven Versuchen wurde  $1/10$  des erhaltenen **1** ins Reineckat übergeführt und gewogen; inaktives Muscarinchlorid (10–30 mg) vor der Kristallisation zum Rest von **1** gefügt.

Die durch Methylenchlorid-Extraktion erhaltene Lipidfraktion zur Trockene eingedampft, gewogen, hierauf in Benzol gelöst und an einem Aliquot davon die Radioaktivität bestimmt.

Von der Kulturflüssigkeit wurde ein Aliquot (ca. 100 ml) durch *Dowex 50 W*  $\times 12$  (50–100 mesh,  $\text{H}^+$ ,  $1,5 \times 30$  cm) perkoliert. Nach gründlichem Auswaschen mit Wasser wurden die Aminosäuren mit 4N  $\text{NH}_4\text{OH}$  eluiert, das Eluat eingedampft und am Rückstand die Radioaktivität bestimmt. Radioaktivität im Mycel und im Muscarinreineckat durch Verbrennung und Ausfällung als  $\text{BaCO}_3$  bestimmt [18].

Die Radioaktivitätsmessungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit einem Flüssigkeitsscintillationszähler Modell TRICARB 3320 (*Packard Instruments Co.*) gemessen. Die Scintillationslösung bestand aus 4,0 g PPO (=2,5-Diphenyloxazol) und 100 mg Dimethyl-POPOP (=2,2'-(*p*-Phenyl)bis(4-methyl-5-phenyloxazol)) in 1000 ml reinem Toluol.

3. *Abbau.* 3.1. *C(1) und C(2) von 1.* Abbau von **1** nach *Kuhn-Roth* in der *Wiesenerberger-Apparatur*

<sup>11)</sup> Muscarine und Isoxazolderivate sind bisher nur aus *A. muscaria* isoliert worden; in den Muscarin-Genera *Inocybe* und *Clitocybe* sind die Isoxazole bisher nicht nachgewiesen worden.

<sup>12)</sup> Unter Anlehnung an unsere früheren, mehrfach publizierten Vorschriften, vgl. [15].

[19], Isolierung als *p*-Bromphenacyl-ester; Abbau nach *Schmidt* und Isolierung als Methylaminhydrochlorid und BaCO<sub>3</sub>.

3.2. *C*(5), *CH*<sub>2</sub>-*C*(5) und *(CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*N* von **1**. 3 mg **1** in schwach saurer Lösung bei 100° mit KMnO<sub>4</sub> bis zur bleibenden Rotfärbung behandelt. MnO<sub>2</sub> mit Sulfit reduziert und nachher die Lösung i. V. eingedampft. Die Isolierung des gebildeten Betains (**2**) geschah durch Extraktion mit Methanol, Eindampfen der Methanollösung zur Trockene, Aufnehmen des Rückstandes mit 10 ml Wasser, Ansäuern auf pH 4 und Austausch an einer Säule von *Dowex-50 W* × 12 (50–100 mesh, H<sup>+</sup>, 1 × 5 cm). Nach Auswaschen mit Wasser wurde **2** mit 30 ml 2N NH<sub>3</sub> eluiert. Nach Eindampfen des Eluates und Fällung mit Ammoniumreineckat (10proz. Acetonlösung) wurde das Reineckat von **2** aus Wasser kristallisiert; Ausbeute 2 mg.

3.3. *(CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*N* von **1**. Bestimmt durch Differenz zwischen radioaktivem **1** vor der Pyrolyse (220°/0,001 Torr) und mit inaktivem Methyljodid reequatertem Nor-muscarin (**3**); Destillation von **3** im Kugelrohr und Vakuum, Umkristallisation des Muscarinjodids aus 2-Propanol/Äther.

3.4. *C*(3) von **1**. 40 mg **1** i. V. pyrolysiert und das erhaltene **3** mit CrO<sub>3</sub> in 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nach [8] zum Nor-muscarin (**4**) oxydiert. Das durch Extraktion und Destillation (Kugelrohr) gewonnene **4** ohne weitere Reinigung mit einem Überschuss von Phenyl-Li in Äther versetzt. Nach üblicher Aufarbeitung (Entfernung von Biphenyl durch Extraktion aus saurer Lösung) die rohe Base **5** ohne weitere Reinigung mit KMnO<sub>4</sub> in basischer Lösung oxydiert und auf Benzoesäure aufgearbeitet. Reinigung durch Umkristallisation und Sublimation; Ausbeute 3,0 mg. Im Vorversuch mit inaktivem Material wurden aus 30 mg **4** 27 mg **5** und daraus 9 mg Benzoesäure erhalten (Ausbeute bezogen auf **4**: 39%).

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *R. J. Stadelmann, E. Müller & C. H. Eugster*, *Sydowia* (Annales mycologici II) **29**, im Druck.
- [2] *R. J. Stadelmann, E. Müller & C. H. Eugster*, *Helv.* **59**, 2432 (1976).
- [3] *C. H. Eugster*, *Rev. Mycol. (Paris)* **24**, 369 (1959).
- [4] a) *M. W. Miller*, 'Handbook of Microbial Metabolites', McGraw-Hill, New York 1961, S. 291; b) *E. Leete*, 'Alkaloid Biogenesis', Ed. P. Bernfeld, MacMillan, New York 1963, S. 791; c) *H. R. Schütte*, «Biosynthese der Alkaloide», Ed. K. Mothes & H. R. Schütte, VEB Verlag der Wissenschaften, Berlin 1969, S. 178; d) *F. M. Dean*, 'Naturally occurring Oxygen Ring Compounds', Butterworth, London 1963, S. 29.
- [5] a) *F. Kögl, C. A. Salemink & P. L. Schuller*, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **79**, 278 (1960); b) *J. K. Brown, V. E. Tyler jr. & L. R. Brady*, in «Biochemie und Physiologie der Alkaloide», Symposiumsband, Akademieverlag Berlin 1966, S. 593.
- [6] *J. K. Brown*, 'Studies on the Physiology and Biosynthesis of Muscarine in *Inocybe* species', Thesis, University of Washington 1965.
- [7] a) *M.-L. L. Swenberg*, 'Production of Muscarine in *Clitocybe rivulosa* (PERS. ex. FR.) KUMMER Surface Culture', Thesis, University of Connecticut 1968; b) *W. J. Kelleher, M.-L. L. Swenberg & A. E. Schwarting*, Vortragsnotiz in *Lloydia* **34**, 496 (1970).
- [8] *H. Bollinger & C. H. Eugster*, *Helv.* **54**, 2704 (1971).
- [9] *Ph. Catalfomo & C. H. Eugster*, *Helv.* **53**, 848 (1970).
- [10] *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.
- [11] a) *S. D. Burton, W. J. Kelleher & A. E. Schwarting*, Kurznotiz eines Vortrages, *Lloydia* **28**, 260 (1965); b) *S. D. Burton*, 'Production and Isolation of Muscarine from surface Cultures of *Clitocybe rivulosa*', Thesis, Oregon State University 1969; c) *M.-L. L. Swenberg, W. J. Kelleher & A. E. Schwarting*, *Science* **155**, 1259 (1967).
- [12] *M. Porte*, «Activité muscarinique chez les *Clitocybes*», Thèse, Université Claude Bernard, Lyon 1972.
- [13] *R. J. Stadelmann*, «Produktion von stereoisomeren Muscarinen *in vitro* sowie über deren Verbreitung innerhalb der Ordnung der Agaricales», Dissertation ETH Nr. 5694, Zürich 1976.
- [14] *T. Matsumoto, W. Trueb, R. Gwinner & C. H. Eugster*, *Helv.* **52**, 716 (1969).
- [15] *C. H. Eugster*, *Fortschr. Chem. org. Naturst.* **27**, 261 (1969).
- [16] *D. R. Hoagland & W. C. Snyder*, *Amer. Soc. hort. Sci.* **30**, 288 (1933).
- [17] *C. H. Eugster*, *Helv.* **39**, 1002 (1956).
- [18] *H. Frohofer*, *Z. analyt. Chem.* **253**, 97 (1971).
- [19] *E. Wiesenberger*, *Mikrochemie* **33**, 51 (1948).