

63. Isolierung und Struktur von Pteridinen (Lumazinen) aus *Russula sp.* (Täublinge; *Basidiomycetes*)

von Peter Xaver Iten, Hana Märki-Danzig¹⁾, Herbert Koch²⁾ und Conrad Hans Eugster*
Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich

(15.XII.83)

Isolation and Structure Elucidation of Pteridines (Lumazines) from *Russula sp.* (*Basidiomycetes*)

Summary

Extensive chromatographic separations and chemical and spectroscopic investigations have led to the isolation and identification of several water-soluble pteridines from *Russula sp.*, the so-called russuapteridines, namely: 1-(5-amino-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)amino-1-deoxy-D-ribitol (**1**); a pro-lumazine; first identification in a *basidiomycete*; 1-deoxy-1-(6-methyl-2,4,7-trioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydropteridin-8-yl)-D-ribitol (**3**) and 1-deoxy-1-(2,4,7-trioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydropteridin-8-yl)-D-ribitol (**4**); both compounds found for the first time in higher fungi; they belong to the components with the strongest violet-blue fluorescence in *Russula sp.*; ribo-flavine (**6**; now recognized as an important yellow colorant in a great many of *Russula sp.*); russuapteridine-yellow I (= 1-(6-amino-7-(*N*-formylimino)-2,4-dioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydropteridin-8-yl)-1-deoxy-D-ribitol; **5**); a component with very strong fluorescence; the first derivative of the novel 6,7-diamino-lumazine); russuapteridine-yellow IV (= 1-deoxy-1-(2,6,8-trioxo-2,4,5,6,7,8-hexahydro-1*H*-imidazo[4,5-*g*]pteridin-4-yl)-D-ribitol (**7**)). Two further yellow russuapteridines (yellow II and yellow V) with very strong fluorescence have been isolated and characterized.

1. Einleitung. – In früheren Arbeiten hatten wir Versuche zur Trennung und Konstitutionsermittlung der komplexen roten Farbstoffe aus *Russula sp.* veröffentlicht [3] [4]. Sie ergaben als wichtigste Tatsache, dass «dimere» *N*(8)-Ribityllumazine mit einer zusätzlichen, bisher nicht lokalisierbaren *N*-(β-D-Ribosyl)-Gruppierung vorliegen³⁾.

In der vorliegenden Veröffentlichung beschreiben wir die Auftrennung des komplizierten Gemisches von farblosen und gelben Lumazinen aus *R. emetica*, *R. paludosa* und *R. sardonia* und die Erkennung der gelben Hauptkomponenten als Derivate des bisher nicht bekannten 6,7-Diamino-8-(D-ribitylamino)-7,8-dihydrolumazins⁴⁾. Die meisten *Russula*-Arten sind reich an wasserlöslichen, farblosen und gelben Verbindungen, die

¹⁾ Aus der Dissertation [1].

²⁾ Aus der Dissertation [2].

³⁾ Neue Versuche zur Identifikation des *N*-Ribosylteiles, s. [5]. Mit «D-Ribityl» bezeichnen wir das Radikal an C(1) von 1-Deoxy-D-ribitol.

⁴⁾ Vorarbeiten sind beschrieben in [6]. Vorläufige Mitteilungen, s. [7-9].

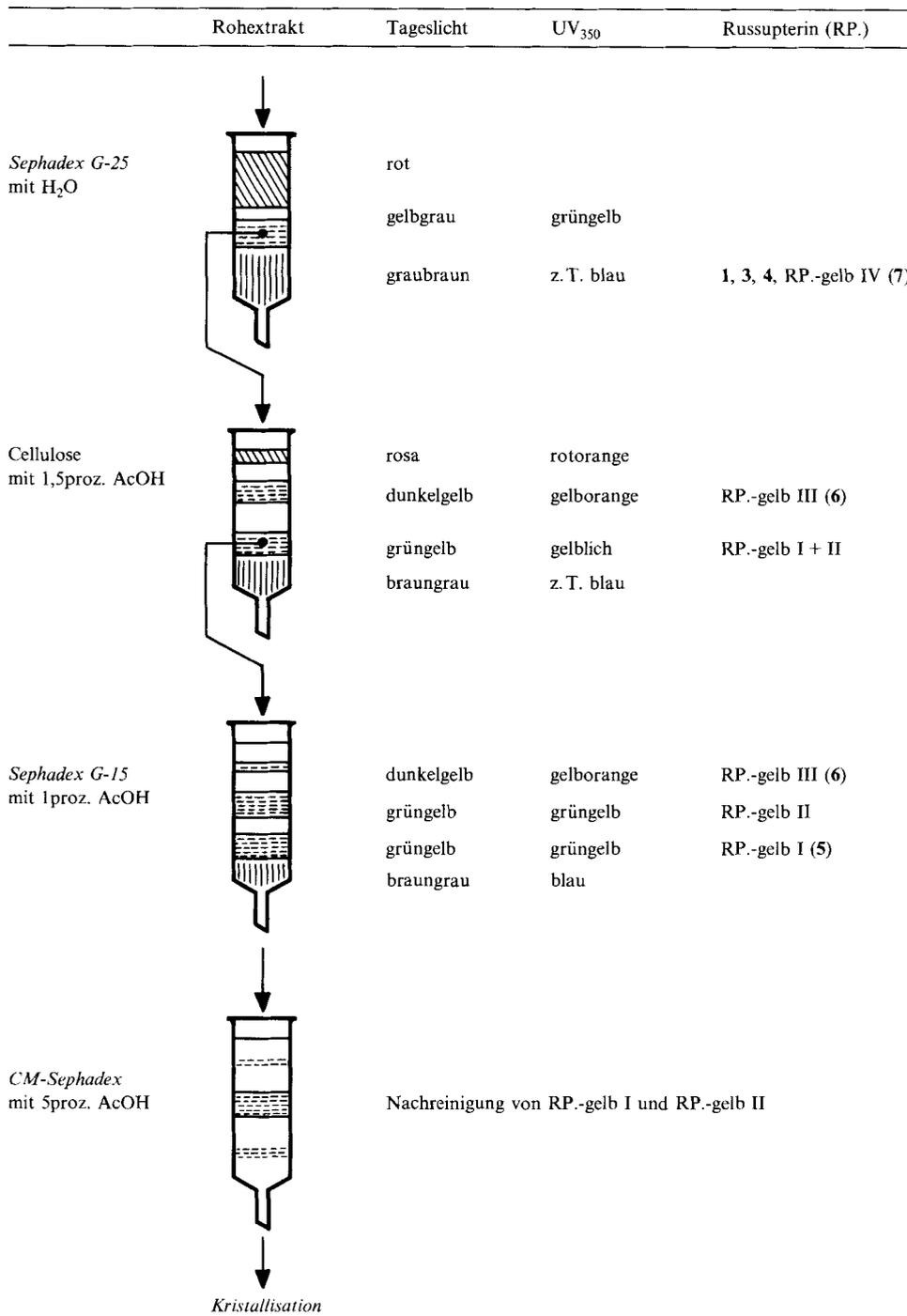


Fig. 1. Trennschema für farblose und gelbe Russuapteridine

Die den gelben Zonen vorauslaufende graubraune Zone enthielt viel Mannit und mehrere farblose, auf dem DC im UV stark fluoreszierende Zonen (vgl. *Exper. Teil*). Die Verbindungen **1**, **3**, **4** und **7** wurden daraus in mehreren, voneinander unabhängigen Trennversuchen erhalten.

2. 5-Amino-6-(D-ribitylamino)uracil⁷⁾ (1). – Diese farblose, nicht fluoreszierende und sehr empfindliche Verbindung wurde in *R. paludosa* und *R. sardonia* folgendermassen nachgewiesen: ein Teil der graubraunen *Sephadex*-Zone wurde an einer Cellulose-Säule mit H₂O erneut chromatographiert, um stärker haftende Stoffe abzutrennen. Aus dem H₂O-Eluat wurde dann das Uracil **1** mit 3-Hydroxybutan-2-on oder Butan-2,3-dion in schwach essigsaurer Lösung zum sog. «G-Compound» (**2**)⁸⁾ kondensiert. Dieses liess sich, da es gelb und stark fluoreszierend ist, durch Chromatographie an Cellulose und *CM-Sephadex C-25* leicht in reiner Form isolieren. Es erwies sich in allen Eigenschaften als identisch mit einer synthetisch erhaltenen Vergleichsprobe (s. [13] [14]). Damit ist unseres Wissens **1** erstmals in einem *Basidiomycet* nachgewiesen worden⁹⁾¹⁰⁾. Bekanntlich ist 5-Amino-6-(D-ribitylamino)uracil (**1**) ein fundamentales Zwischenprodukt der biologischen Riboflavin-Synthese.

Das sog. «G-Compound» (**2**) haben wir, trotz verschiedener Versuche, in *Russula sp.* bisher nicht auffinden können¹¹⁾.

3. Lumazine 3¹²⁾ und 4¹³⁾. – Neben dem Uracil **1** enthält die graubraune Zone aus *Sephadex*-Chromatogrammen (s. *Fig. 1*) zahlreiche, im UV intensiv blau- und blauviolett-fluoreszierende Substanzen¹⁴⁾. Eine präparative Isolierung wurde an Extrakten von *R. sardonia* und *R. emetica* mittels Chromatographie an *DEAE*-Cellulose und einem AcOH-Gradienten durchgeführt. Aus der intensiv blau-fluoreszierenden Zone, die sich mit 1,5proz. AcOH eluieren liess, wurde 6-Methyl-7-oxo-*N*(8)-(D-ribityl)-7,8-dihydrolumazin (**3**) isoliert und durch Vergleich mit einem synthetisch hergestellten Präparat identifiziert (Daten s. *Exper. Teil*).

Mit 3–5proz. AcOH wurde eine weitere, blauviolett-fluoreszierende Zone eluiert. Sie enthielt 7-Oxo-*N*(8)-(D-ribityl)-7,8-dihydrolumazin (**4**), dessen Identität ebenfalls durch eingehenden Vergleich mit einem Synthesepreparat sichergestellt wurde (s. *Exper. Teil*). Qualitative Untersuchungen zeigten, dass **3** und **4** in *Russula sp.* eine weite Verbreitung besitzen; wir haben sie z. B. in *R. sardonia*, *R. ochroleuca*, *R. obscura* und *R. paludosa* festgestellt. Zahlreiche andere fluoreszierende Pteridine wurden beobachtet, die strukturell jedoch nicht untersucht wurden.

Das Lumazin **3** ist erstmals in *Eremothecium ashbyii* [22] und **4** in *Pseudomonas ovalis* [23] gefunden worden. Für *Basidiomyceten* bedeutet dies der erstmalige Nachweis.

⁷⁾ 1-(5-Amino-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)amino-1-deoxy-D-ribitol (**1**).

⁸⁾ 1-Deoxy-1-(6,7-dimethyl-2,4-dioxo-2,3,4,8-tetrahydropteridin-8-yl)-D-ribitol (**2**).

⁹⁾ Synthese von **1**, s. z. B. [13] und zahlreiche spätere Autoren; vgl. *Exper. Teil* dieser Arbeit.

¹⁰⁾ Nachweis in Mangelmutanten von *Saccharomyces cerevisiae* durch Abfangversuche mit Butan-2,3-dion [15].

¹¹⁾ In der Natur ist **2** in mehreren Riboflavin-produzierenden Organismen aufgefunden worden, erstmals in *Eremothecium ashbyii* [16] und *Ashbya gossypii* [17].

¹²⁾ 1-Deoxy-1-(6-methyl-2,4,7-trioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydropteridin-8-yl)-D-ribitol (**3**).

¹³⁾ 1-Deoxy-1-(2,4,7-trioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydropteridin-8-yl)-D-ribitol (**4**).

¹⁴⁾ Die intensive Fluoreszenz des Fruchtfleisches im UV-Licht gilt in der mykologischen Literatur als ein charakteristisches Merkmal dieses taxonomisch notorisch schwierigen Genus [3] [18–21].

4. Eigenschaften und Struktur von Russupteridin-gelb I (5) (s. *Schema 1* und *Tab. 1*). – Bei der Isolierung von RP.-gelb I und RP.-gelb II musste auf ihre Säurelabilität und Lichtempfindlichkeit Rücksicht genommen werden, sonst sanken die Ausbeuten während den relativ langen Trennoperationen stark ab. Die Trennung erfolgte durch mehrfach wiederholte Chromatographie an Cellulose-, *Sephadex-G-15*- und *CM-Sephadex*-Säulen (s. *Fig. 1*), wenn möglich unter Ausschluss von Tageslicht.

Schliesslich konnte RP.-gelb I aus verdünnter AcOH kristallisiert werden. Die Kristalle schliessen Kristall-AcOH hartnäckig ein. Die neue Verbindung war unter Entfärbung leicht reduzierbar mit BH_4^- und $\text{H}_2/\text{Kat.}$ und liess sich, mindestens teilweise, zu gefärbten Produkten zurückoxydieren. Leider konnten weder an der Verbindung selbst noch an (nie rein erhaltenen) Derivaten brauchbare Massenspektren erhalten werden¹⁵⁾. Von den zahlreichen, in der Pteridinchemie erprobten Abbauverfahren gab keines

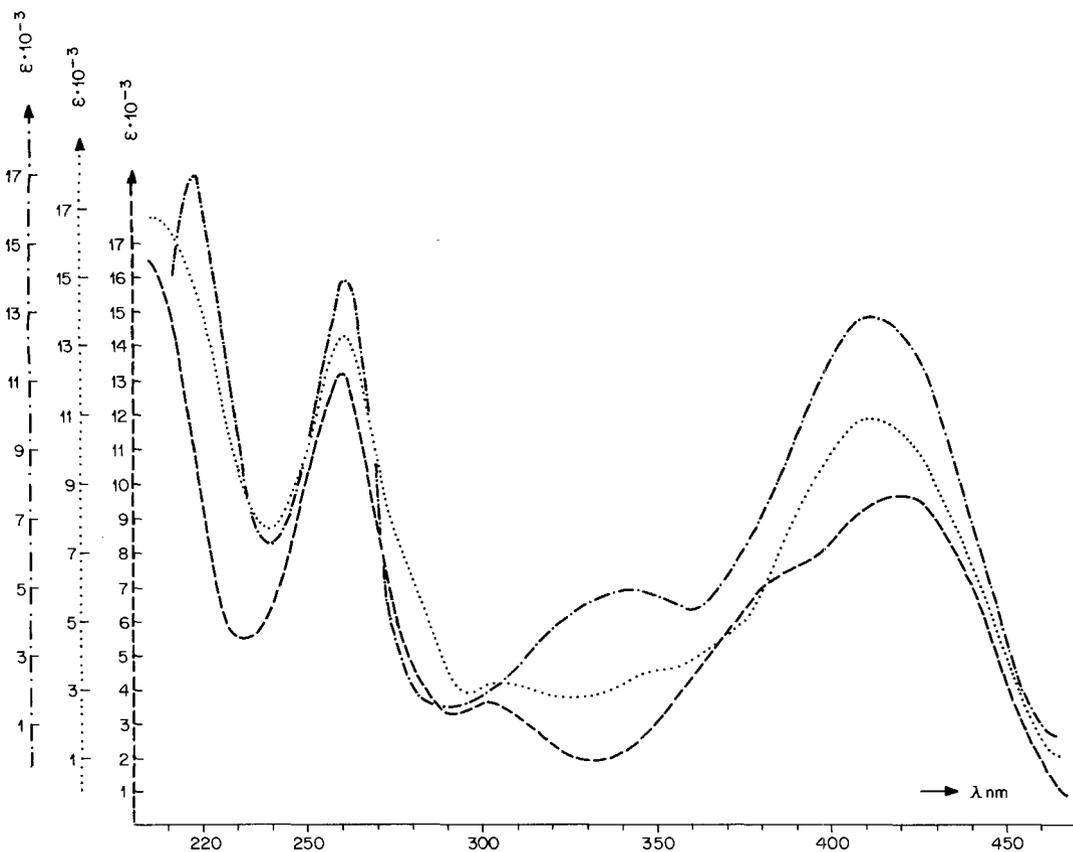


Fig. 2. UV/VIS-Spektren von 5. ····· in H_2O , $c = 6,99 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; — in $0,1\text{N HCl}$, $c = 7,02 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; -·-·- in $0,1\text{N NaOH}$, $c = 6,51 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

¹⁵⁾ Elektronenstoss-Ionisation, Felddesorption, chemische Ionisation.

brauchbare Resultate, ausser dass der *N*-Ribitylrest photolytisch als Ketopentose, analog Riboflavin, abgespalten und nachgewiesen werden konnte.

Von den verschiedenen, ungewöhnlichen Eigenschaften (s. *Tab. 1*) fallen vor allem auf: das UV/VIS-Spektrum (s. *Fig. 2*), das mit keinem der bisher bekannten Pteridinen korreliert werden konnte, und seine relativ geringe pH-Abhängigkeit sowie das Verhalten in der Elektrophorese.

Den Schlüssel zur Struktur **5** brachten, zusammen mit den NMR-Spektren, die Hydrolysen und die chemische Verknüpfung mit RP.-gelb IV (**7**; s. *Kap. 7*).

Tab. 1. *Eigenschaften von Russuapteridin-gelb I (5)*

Ausbeuten	110 mg/200 kg frische <i>R. sardonia</i> ^{a)} ; 155 mg/36 kg frische <i>R. paludosa</i> ^{b)}
Kristalle	sehr feine, gelbbraune, wollige Nadelbüschel (aus verd. AcOH); Schmp. > 300° (Zers.)
N-Gehalt ^{c)}	19,32, 21,67, 22,71, 22,20, 22,65%
Löslichkeit	ca. 0,5% in H ₂ O/RT.
Fluoreszenz (360 nm)	Lösung in H ₂ O: türkis; Lösung in 0,1N HCl: grüngelb; Lösung in 0,1N NaOH: grüngelb
R _F -Werte (Fluoreszenz) ^{d)}	0,7 (H ₂ O); 0,38–0,42 (4proz. Na-Citrat, hellblau); 0,58 (5proz. AcOH); 0,44–0,48 (4proz. NH ₄ Cl, grüngelb); 0,31 (BuOH/AcOH/H ₂ O 5:3:5, blau); 0,11 (<i>i</i> -PrOH/2N NH ₃ 4:1, hellblau)
Elektrophorese	AcOH, pH 2, 5000 V, 60 mA, 45 Min.: Start; Acetatpuffer, pH 3,5, 5000 V, 50 mA, 35 Min.: Start; Acetatpuffer, pH 4,6, 4000 V, 165 mA, 35 Min.: 4,7 cm, anodisch
pK _s (spektrophotometrisch)	0,25 ± 0,07; 4,80 ± 0,06; 12,10 ± 0,08
UV/VIS ^{e)}	H ₂ O (<i>c</i> = 6,99 · 10 ⁻⁵): 261 (13310), 306 (3150), 412,5 (10900) 0,1N HCl (<i>c</i> = 7,02 · 10 ⁻⁵): 261 (13200), 303 (3533), 383 (sh, 7150), 420 (9672) 0,1N NaOH (<i>c</i> = 6,51 · 10 ⁻⁵): 219 (16960), 263 (13810), 343 (4870), 412,5 (12870); 1N HCl (qual.): 252 (303), 378, 435 (sh)
CD	s. Kurve (<i>Fig. 6</i> im <i>Exper. Teil</i>)
IR (KBr)	1708, 1622, 1595, 1515
¹ H-NMR ((D ₆)DMSO)	3,2–5,0 (Ribityl-H), 8,85 (<i>s</i> , CH=O), 11,09 (<i>s</i> , H–N(3), austauschbar mit D ₂ O); H–N(3) erscheint in CF ₃ COOH bei 9,37 (<i>s</i>) und in CF ₃ COOD bei 9,19 (<i>s</i>)
¹³ C-NMR ((D ₆)DMSO)	21,1 (Kristall-AcOH), 49,5 <i>t</i> /63,1 <i>t</i> /68,4 <i>d</i> /72,8 <i>d</i> /74,8 <i>d</i> (Ribityl-C); 126,9 <i>s</i> /135,9 <i>s</i> /141,5 <i>s</i> /149,9 <i>s</i> /150,9 <i>d</i> /155,0 <i>s</i> /160,9 <i>s</i> /171,8 (AcOH)

^{a)} Ernte 1970, Herkunft Schwarzwald, etwas vermischt mit *R. obscura* und *R. paludosa*.

^{b)} Ernte 1970, Herkunft Schwarzwald.

^{c)} Aus Verbrennungsanalysen.

^{d)} Fertigfolien CEL 300/UV₂₅₄, Macherey & Nagel.

^{e)} S. *Fig. 2*; einige Extrema weichen von denen der Kurve etwas ab, da sie aus separaten Bestimmungen stammen.

Das ¹H-NMR-Signal ((D₆)DMSO) bei 11,09 ppm kann der HN(3)-Funktion in einem Lumazin zugeordnet werden; Verbindung **3** weist ein analoges, mit D₂O austauschbares Signal bei 11,4 ppm auf¹⁶⁾. Das andere, neben den Signalen für die Ribitylgruppe, wichtige Signal bei 8,85 ppm haben wir einer *N*-Formylgruppe zugeordnet. Das entsprechende Signal im ¹³C-NMR-Spektrum findet sich im 'off-resonance'-Spektrum bei 150,9 ppm als *d*. Folglich muss die relativ kurzwellige Bande im IR bei 1708 cm⁻¹ ebenfalls der *N*-Formylgruppe zugeschrieben werden (s. *Fig. 3*). Der direkte

¹⁶⁾ Vgl. 11,0 ppm in **2** und 11,34 ppm in **6** (beide in (D₆)DMSO gemessen).

Nachweis von HCOOH wurde im $^1\text{H-NMR}$ durch Hydrolyse mit 1N DCl in $(\text{D}_6)_2\text{DMSO}$ (1:1; 15 Min., ca. 40°) durchgeführt. Dabei verminderte sich das s bei 9,1 ppm und gleichzeitig trat das Signal von HCOOH bei 8,10 ppm auf. Damit ist nachgewiesen, dass RP.-gelb I eine N -Formylgruppe besitzt.

Laut $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum enthält RP.-gelb I neben einer Ribitylgruppe noch 7 sp^2 -hybridisierte C-Atome, von denen 6 s sind, deren Signallage sehr gut mit einem Lumazinkern übereinstimmt (s. [7]); sp^3 -C-Atome fehlen ganz. In $^1\text{H-NMR}$ -Spektren $((\text{D}_6)_2\text{DMSO})$ ist nur das Signal von H-N(3) (s. oben) klar ersichtlich; dasjenige von H-N(1) tauscht aus. Auch fehlen weitere H-C-Signale, insbesondere das charakteristische von H-C(6), das z. B. in **4** bei 8,35 ppm (D_2O) erscheint. Daraus folgt, dass C(6) und C(7) substituiert sind.

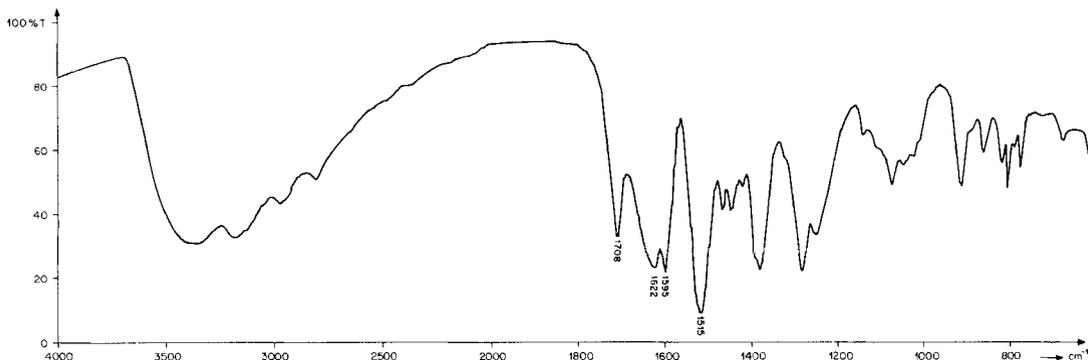


Fig. 3. IR-Spektrum von **5** (KBr)

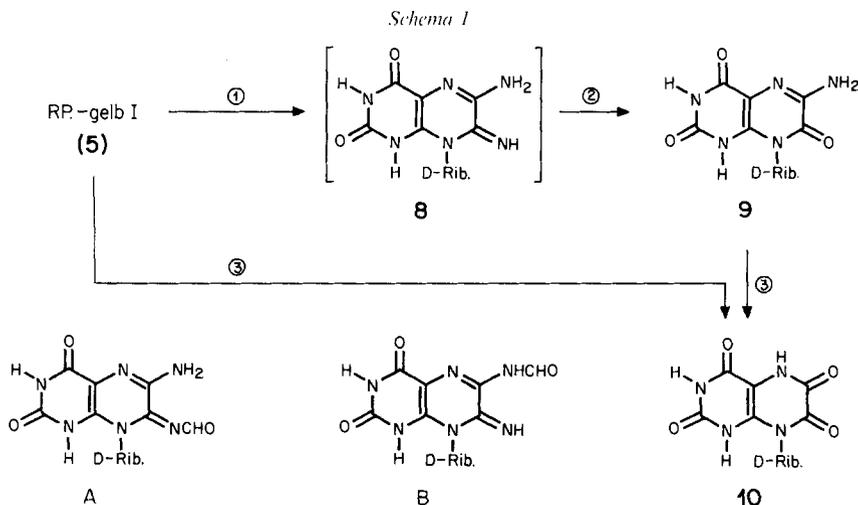
Verbrennungsanalysen von RP.-gelb I (s. Tab. 1) deuten auf die Anwesenheit von zusätzlichen N-Funktionen, die bereits nachgewiesene N -Formylgruppe miteingeschlossen. Aufgrund der möglichen Atomverhältnisse $\text{C}_{12}\text{H}_x\text{N}_6\text{O}_7$ oder $\text{C}_{12}\text{H}_x\text{N}_5\text{O}_8$ und unter der plausiblen Annahme, dass ein substituiertes **4** vorliegt, müssen folgende Kombinationen in Betracht gezogen werden: HO-C(6)/ N -Formylhydrazono-C(7); N -Formylhydrazino-C(6)/Oxo-C(7); Amino-C(6)/Formylimino-C(7); Formyl-amino-C(6)/Imino-C(7).

In Hydrolyseversuchen konnten weder Hydrazin noch Formamid aufgefunden werden, doch gelang die Isolierung eines neuen Lumazins, dessen UV-Spektrum (1N HCl) mit λ_{max} bei 293 und 345 nm demjenigen von **3** und **4** sehr ähnlich ist. Es handelt sich um 6-Aminolumazin **9**¹⁷⁾ (Schema 1). Die Verbindung wurde mit einem Präparat identifiziert, das auf eindeutigen Weg synthetisiert wurde [24]. Energische Hydrolyse von RP.-gelb I und von Aminolumazin **9** führte zum Dioxolumazin **10**¹⁸⁾, das chromatographisch und spektroskopisch mit einem Synthesepreparat verglichen und als identisch erkannt wurde. Da es uns nicht gelang, Formamid als Hydrolyseprodukt nachzuweisen, muss sich die Bildung von **9** aus **5** in Stufen vollziehen. Dabei muss **8**¹⁹⁾ gebildet

¹⁷⁾ 1-(6-Amino-2,4,7-trioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydropteridin-8-yl)-1-deoxy-D-ribitol (**9**).

¹⁸⁾ 1-Deoxy-1-(2,4,6,7-tetraoxo-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydropteridin-8-yl)-D-ribitol (**10**).

¹⁹⁾ Das 1-(6-Amino-7-imino-2,4-dioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydropteridin-8-yl)-1-deoxy-D-ribitol (**8**) ist, wie Fig. 2 zeigt, im UV/VIS-Spektrum von im sauren Bereich gemessenem **5** bereits vorhanden (sh bei ca. 380 nm).



Ⓛ 1N HCl, RT. Ⓜ 0,1N HCl, 90°, 2 Std. Ⓝ 2proz. AcOH, 150°, Bombenrohr.
 Strukturen, formuliert ohne Rücksicht auf Protonierungsgrad und Tautomerie;
 D-Rib. = an C(1) substituiertes 1-Deoxy-D-ribitol = «D-Ribityl».

werden, das aber voraussichtlich sehr rasch hydrolysiert wird. Es konnte präparativ nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. In Fig. 4 ist der zeitliche Verlauf der Hydrolyse von 5 nach 9 in 1N HCl graphisch dargestellt.

Aufgrund dieser Resultate können für RP-gelb I die Strukturen A und B (Schema 1) hergeleitet werden. B lässt sich aus folgenden Gründen ausschliessen: eine Iminogruppe an C(7) des gezeigten Lumazingerüstes wirkt, wie der Vergleich mit 9 zeigt, stark bathochrom. Dasselbe darf für eine N-Formyliminogruppe angenommen werden, während eine N-Formylaminogruppe an C(6) das Maximum wegen fehlender Konjugation keinesfalls ins Sichtbare verschieben kann. Dass nur die Formylierung der Iminogruppe an C(7) zur langwelligen Lichtabsorption führt, kann verstanden werden, wenn man die unerwartet hohe Azidität dieser Lumazine berücksichtigt: Verbindung 3 ist mit $\text{p}K_s^1 = 4,0$ (H₂O, 20°) [22] [25] [26] stärker sauer als AcOH, und es ist vorauszu-sehen, dass der Ersatz der Oxo- durch eine N-Formyliminogruppe an C(7) zu keiner wesentlichen Aziditätsänderung führen wird²⁰⁾, da dadurch ein stärker delocalisiertes System für das Anion zur Verfügung steht. Ähnliche Anordnungen finden sich bei den sog. Oxonolfarbstoffen. Der experimentell gefundene $\text{p}K_s^2$ -Wert von 5 beträgt 4,80.

Zur Feinstruktur von Russupteridin-gelb I (5). Das Verhalten von RP-gelb I in der Elektrophorese, die relative pH-Invarianz der UV/VIS-Spektren, der spektroskopische Nachweis einer Formylgruppe, die trotz einer benachbarten Aminogruppe laut IR-, ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren nicht nachweisbar als Aminal vorliegt und die oxydative Überführung in RP-gelb IV (7; s. Kap. 7), können mit der vorgeschlagenen Neutralformel 5 nicht befriedigend gedeutet werden. Wir nehmen an, dass RP-gelb I in einem Bereich von ca. pH 1 bis ca. 4,5 als Zwitterion 5a vorliegt. Hier ist die Delocalisation des Anions im Prinzip über 10 Bindungen bis zur Formylgruppe möglich (s. Schema 2). Die unterhalb pH 1 kationische Form unterliegt in einem wässrigen

²⁰⁾ S. die $\text{p}K_s$ -Werte von RP-gelb I in Tab. 1.

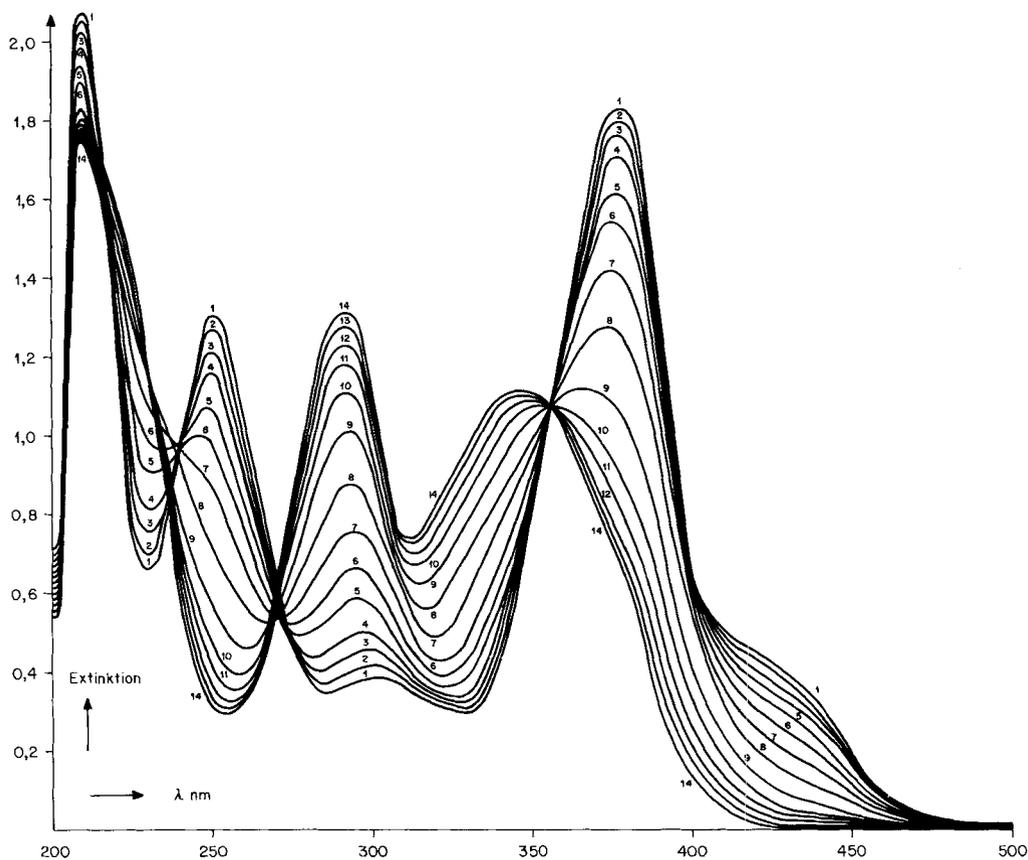
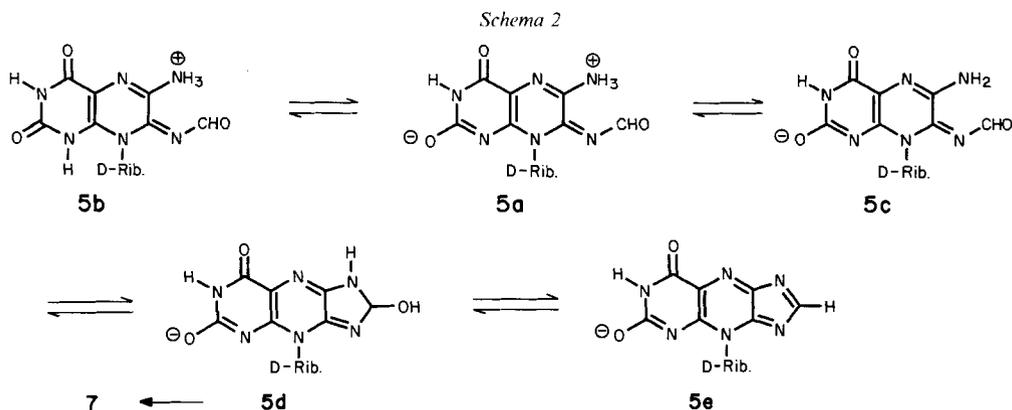


Fig. 4. Hydrolyse von **5** in 1N HCl. Kurve 1 nach 3, 2 nach 10, 3 nach 20, 4 nach 30, 5 nach 52, 6 nach 70, 7 nach 100, 8 nach 140, 9 nach 200, 10 nach 260, 11 nach 320, 12 nach 380, 13 nach 440 und 14 nach 500 Min. Spezies mit λ_{max} 252/378 entspricht **5b**, Spezies mit λ_{max} 292/345 entspricht **9**.

Lösungsmittel einer raschen Hydrolyse (s. Fig. 4). Bei pH-Werten > 5 dürfte das Monoanion **5c** vorliegen, das nun ins Gleichgewicht mit dem Aminal **5d** tritt. Die plausible Wasserabspaltung zu **5e** haben wir nicht beobachtet.

Wenn man von der Neutralform **5** für Russupteridin-gelb I ausgeht, so ist diese systematisch als 1-(6-Amino-7-(N-formylimino)-2,4-dioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydropteridin-8-yl)1-deoxy-D-ribitol zu bezeichnen. RP.-gelb I ist das erste in der Natur aufgefundene 6,7-Diaminolumazin-derivat und fällt wegen seinen kumulierten Amidin-Substrukturen aus dem Rahmen des Gewohnten. Es ist bisher aus *R. paludosa*, *R. emetica*, *R. obscura*, *R. sardonica* und *R. badia* isoliert bzw. säulenchromatographisch nachgewiesen worden. Es besitzt jedoch ohne Zweifel eine weitere Verbreitung im Genus *Russula*.

5. Eigenschaften von Russupteridin-gelb II (s. Tab. 2). – RP.-gelb II unterscheidet sich von RP.-gelb I vor allem in folgender Hinsicht: höhere Stabilität gegen Licht, Säuren und Oxydationsmittel, geringere Stabilität gegenüber Basen, bessere Löslichkeit in H_2O , stärkere Säure als RP.-gelb I und ausgeprägte pH-Abhängigkeit der UV/VIS-



D-Rib. = an C(1) substituiertes 1-Deoxy-D-ribitol = «D-Ribityl»

Spektren. Gemeinsam sind: der *N*-Ribitylrest (s. ^{13}C -NMR), das ^1H -NMR-Signal der N(3)-Amidgruppe und die Bildung der Dioxoverbindung **8** bei der energischen Hydrolyse. Somit ist wiederum ein an C(6)- und C(7)-substituiertes *N*(8)-Ribosyllumazin anwesend. Ein gesicherter Strukturvorschlag ist auf der Basis der bisher erzielten Resultate nicht möglich.

6. Identifikation von Russupteridin-gelb III (6) als Riboflavin; Riboflavinbestimmungen in *Russula* sp. – Aus 200 kg *R. sardonia* vermischt mit etwas *R. paludosa* und *R. obscura* (Herkunft Schwarzwald, BRD, Ernte 1970) konnten nach eingehenden chromatographischen Trennungen 208 mg kristallisiertes RP.-gelb III isoliert werden. Die-

Tab. 2. Eigenschaften von Russupteridin-gelb II

Ausbeuten	72 mg/200 kg frische <i>R. sardonia</i> ^{a)} ; 40 mg/36,3 kg frische <i>R. paludosa</i> ^{b)}
Kristalle	dunkelgelbes Pulver; Lösungen in H ₂ O orangegelb; Löslichkeit in H ₂ O grösser als bei RP.-gelb I
Fluoreszenz (360 nm)	Lösung in H ₂ O: intensiv grüngelb
R _F -Werte (Fluoreszenz) ^{c)}	0,76 (H ₂ O); 0,31–0,35 (4proz. Na-Citrat, gelbgrün); 0,53 (5proz. AcOH); 0,30 (4proz. NH ₄ Cl, gelb); 0,22 (BuOH/AcOH/H ₂ O 5:3:5, gelb); 0,003 (<i>i</i> -PrOH/2N NH ₃ 4:1, gelbgrün)
Elektrophorese	AcOH, pH 2, 5000 V, 60 mA, 45 Min.: 6,3 cm, anodisch ^{d)} ; Acetatpuffer, pH 3,5, 5000 V, 50 mA, 35 Min.: 6,8 cm, anodisch; Acetatpuffer, pH 4,6, 4000 V, 165 mA, 35 Min.: 9,6 cm, anodisch
UV/VIS ^{e)}	H ₂ O (qual.; c = 0,78 mg/100 ml): 226 (0,404), 287 (0,247), 446 (0,362) 0,1N HCl (c = 1,276 mg/100 ml): 219 (0,680), 274 (0,214), 303 (sh, 0,15), 403 (sh, 0,67), 421 (0,757) 0,1N NaOH (c = 1,548 mg/100 ml): 222 (0,827), 287 (0,588), 465 (0,848)
^1H -NMR ((D ₆)DMSO)	3,2 – ca. 5 (Ribityl-H), 10,5, 12,2 (sehr br.)
^{13}C -NMR ((D ₆)DMSO)	46,5r/63,3d/69,9d/72,9d/74,2d (Ribityl-C); 114,4/130,8/144,8/148,6/154,5/155,2/160,9/162,7 ^{f)}

^{a)} S. Tab. 1.

^{b)} S. d) in Tab. 1.

^{c)} Whatman-Papier No. 1.

^{d)} Kurven s. [7].

^{e)} Anzahl und Identifikation der Signale im Bereich 100–180 ppm mit Unsicherheit behaftet.

Tab. 3. Riboflavin-Gehalte in *Russula* sp.^{a)}

Spezies	Spender (Sammelort)	analysiert	Gehalt mg%/ Trockengewicht
<i>R. adullerina</i>	Cléménçon (Michigan, 1968)	Febr. 1972	Spuren
<i>R. adusta</i> (FR.) FR.	[32]		6,1
<i>R. aeruginea</i>	b)	Jan. 1973	4,5
<i>R. atrorubens</i>	Bresinsky (Regensburg, Sept. 1972)	Dez. 1972	0
<i>R. badia</i>	Bresinsky (Regensburg, Sept. 1972)	Okt. 1972	++
<i>R. Bresadoliana</i>	Cléménçon (St. Moritz, Aug. 1971)	Febr. 1972	3,6
<i>R. cavipes</i>	Cléménçon (Bot. Garten Lausanne, Sept. 1972)	März 1973	Spuren
<i>R. coerulea</i>	Cléménçon 700902 (Fanelwald BE, Sept. 1970)	Jan. 1973	2,9
<i>R. decolorans</i> (FR.) FR.	[32]		6,1
<i>R. densifolia</i>	Bresinsky (Regensburg, Sept. 1972)	Dez. 1972	4,8
<i>R. emetica</i> «gregaria»	Shaffer 3665 (Michigan, Okt. 1961)	März 1973	Spuren?
<i>R. emetica</i> «gregaria»	Shaffer 1862 (Michigan, Sept. 1957)	Febr. 1974	Spuren?
<i>R. emetica</i> «gregaria»	Shaffer 1955 (Michigan, Sept. 1957)	Febr. 1974	+
<i>R. emetica</i> «microspora»	<i>R. emetica</i> (Michigan, Aug. 1971)	Febr. 1974	Spuren
<i>R. emetica</i> «microspora»	Shaffer 5783 (Michigan, Aug. 1967)	Febr. 1974	0
<i>R. emetica</i> var. <i>longipes</i>	Preuss ^{c)}	Jan. 1973	2,6
<i>R. emetica</i> var. <i>sylvestris</i>	H. Plenk (Jenbach, Tirol, Juli 1973)	Febr. 1974	0
<i>R. emetica</i>	P. Volpers (Schwarzwald, Sept. 1972)	Jan. 1973	6,0
<i>R. jellea</i>	H. Plenk (Hochgalzein/Schelnberg, Juli 1973)	Mai 1974	0
<i>R. firmula</i>	H. Plenk (Kogelmoos, Okt. 1973)	April 1974	0
<i>R. firmula</i>	H. Plenk (Tiwwag N.O., Okt. 1973)	April 1974	0
<i>R. foetens</i>	H. Plenk (Tirol, Okt. 1973)	Mai 1974	0
<i>R. fragrantissima</i>	Shaffer 2412 (Michigan, Juli 1960)	April 1974	+
<i>R. fragrantissima</i>	Shaffer 3055 (Michigan, Juli 1961)	April 1974	1,9
<i>R. grisea</i> (SECR.) FR.	[32]		4,4
<i>R. illota</i>	b)	Jan. 1973	0,15
<i>R. laurocerasi</i>	H. Plenk (Jenbach, Juli 1973)	Mai 1974	(0)
<i>R. maculata</i>	Bresinsky (München, 1959)	März 1973	Spuren
<i>R. melliolens</i>	Bresinsky (Kapuzinerhölzle/München, 1958)	Jan. 1974	0
<i>R. mustelina</i>	Zürich (Markt, Sept. 1972)	Nov. 1972	0
<i>R. nigricans</i>	H. Plenk (Jenbach, Juli 1973)	April 1974	0
<i>R. ochroleuca</i>	Zürich (Markt, Sept. 1972)	Okt. 1972	6,0
<i>R. paludosa</i>	Neuner (Aufhofen, Juli 1963)	April 1973	0
<i>R. paludosa</i> BRITZ.	[32]		26,4
<i>R. pulchella</i>	b)	Febr. 1973	Spuren
<i>R. Queletii</i>	H. Plenk (Kogelmoos, Okt. 1973)	Febr. 1974	3,3
<i>R. Queletii</i>	H. Plenk (Jenbach, Birkenwald, Okt. 1973)	Febr. 1974	4,4
<i>R. sardonía</i>	Horak (Schwarzwald, Nov. 1973)	Jan. 1974	5,3/5,9
<i>R. sardonía</i>	H. Plenk (Jenbach, Birkenwald, Okt. 1973)	Jan. 1974	7,6
<i>R. sardonía</i>	F. Marti (Peseux, Föhrenwald, Nov. 1973)	Nov. 1973	3,9
<i>R. sardonía</i>	P. Volpers (Schwarzwald, Sept. 1970)	Nov. 1972	7,7
<i>R. variata</i>	Smith 1517 (Michigan, Juli 1935)	April 1974	Spuren
<i>R. ventricosipes</i>	Rogerson 1971 (Michigan, Okt. 1971)	März 1974	Spuren
<i>R. ventricosipes</i>	Shaffer 3583 (Michigan, Sept. 1961)	März 1974	4,3
<i>R. ventricosipes</i>	Smith 42454 (Michigan, Sept. 1953)	März 1974	0
<i>R. vesca</i> FR.	[32]		5,2
<i>R. virescens</i>	Smith 1675 (Michigan, Juli 1935)	März 1974	Spuren
<i>R. virescens</i>	Shaffer 6132 (Michigan, Juli 1961)	März 1971	2,2
<i>R. virescens</i> (SCHAEFF.) FR.	[32]		2,7
<i>R. viscida</i>	Bresinsky (Ischenberg, Okt. 1964)	Jan. 1974	7,4
<i>R. viscida</i>	Bresinsky (Oberbayern, Okt. 1964)	Jan. 1974	2,0
<i>R. xerampelina</i>	Bresinsky (Regensburg, Sept. 1972)	Dez. 1972	9,2
<i>R. xerampelina</i> (SECR.) FR.	[32]		12,6

a) Wenn nicht anders bemerkt, eigene Bestimmungen; Methode s. *Exper. Teil*.

b) Spender und Herkunft nicht mehr zu eruieren.

c) Herkunft nicht mehr bekannt.

ses erwies sich nach allen analytischen, spektroskopischen und chiroptischen Kriterien als Riboflavin (**6**). Es gehört, wie die Angaben in *Tab. 3* zeigen, zu den weitverbreiteten gelben, fluoreszierenden Farbstoffen in *Russula sp.*²¹⁾. Wegen des Vorkommens von mehreren Riboflavin-ähnlichen Verbindungen mit starker Fluoreszenz haben wir die analytischen Bestimmungen an Riboflavin-Fractionen erhoben, die entweder durch chromatographische Trennung an *Sephadex* oder an *Amberlite XAD-II* (Methode von [30]) gereinigt worden waren. Die Ergebnisse zeigen, dass zahlreiche *Russula sp.* relativ reich an Riboflavin (**6**) sind²²⁾.

N(3)-Methylriboflavin, das in *Panellus serotinus* festgestellt wurde [31] und das leicht mit **6** verwechselt werden kann, haben wir in unseren Riboflavin-Fractionen aus *Russula* nicht festgestellt.

7. Eigenschaften und Struktur von Russuapteridin-gelb IV (7). – Der nach [4] erhaltene Extrakt aus 300 kg *Russula sardonia* (Ernte 1969) wurde an mehreren *Sephadex-G-25*-Säulen chromatographiert, wodurch die roten Russuapteridine abgetrennt wurden. Die gesamten, mit H₂O eluierten Fractionen, enthaltend die Verbindungen **1** und **3–6** liessen chromatographisch eine neue, im UV₃₆₀ intensiv blaugrün-fluoreszierende Zone erkennen (= RP.-gelb IV²³⁾). Die Reinigung erfolgte an Cellulose-Säulen mit 1proz. AcOH und an *Sephadex CM C-25* mit 5proz. AcOH; dann gelang die Kristallisation aus H₂O. Die Eigenschaften der neuen Verbindung sind in *Tab. 4* zusammengestellt.

Die neue Verbindung unterscheidet sich von RP.-gelb I (**5**) und RP.-gelb II vor allem durch ihre Stabilität: weder am Tageslicht, noch mit Hydrolysen in 0,1N NaOH bzw. 0,1N HCl bei 80° oder 2proz. AcOH bei 150° konnten nennenswerte Mengen an Abbauprodukten festgestellt werden, und RP.-gelb IV wurde unverändert zurückisoliert. Aus dem UV-Spektrum konnte auf ein modifiziertes Lumazinderivat geschlossen werden; s. *Fig. 5*. Dies wird durch das ¹³C-NMR unterstützt, indem anstelle des Signals der *N*-Formylgruppe ein neues Signal im Lactambereich auftaucht und dasjenige bei 126,9, das wahrscheinlich C(4a) in **5** zukommt, nach 110,5 verschoben ist. Aufgrund dieser Daten postulierten wir Struktur **7** für RP.-gelb IV²⁴⁾. Sie konnte durch Partialsynthese aus RP.-gelb I (**5**) mittels *Tollens*-Reagens oder Ag₂O/NaOH (s. *Exper. Teil*) und durch eine Synthese aus **1** und Parabansäure [24] bewiesen werden. Die Partialsynthese beweist einerseits, dass die Aminalform **5d** (*Schema 2*) von RP.-gelb I in basischem Milieu im Gleichgewicht vorliegt und bringt andererseits einen unabhängigen Beweis für die Struktur von **5**.

²¹⁾ Es scheint im nachhinein sonderbar, dass *Watson* [10] und *Gluchoff* [11] in ihren ausgedehnten chromatographischen Untersuchungen das Vorhandensein von Riboflavin nicht erkannt haben. Allerdings enthalten zwei Standardwerke über Pilzmetaboliten [27] [28] auch keinen Hinweis auf Riboflavin in Pilzen! Hingegen sind solche, wenn auch unvollständig, in [29] enthalten. Unsere Versuche, herauszufinden, welcher der gelben, fluoreszierenden Flecke auf den Chromatogrammen von [10] und [11] dem Riboflavin entspricht, ergaben keine eindeutigen Resultate.

²²⁾ Die in *Tab. 3* aufgeführten Riboflavin-Bestimmungen sind ein Nebenergebnis unserer umfangreichen Versuche, das mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung und der *Sephadex*-Chromatographie (vgl. [3] [7] [12]) gewonnene Verteilungsmuster aller, d. h. auch der roten Russuapteridine, zu taxonomischen Zwecken zu verwenden.

²³⁾ Kristalle sind hellgelb, verdünnte Lösungen praktisch farblos, die Verbindung wurde deshalb früher [7] [8] noch als RP.-farblos III bezeichnet.

²⁴⁾ 1-Deoxy-1-(2,6,8-trioxo-2,4,5,6,7,8-hexahydro-1*H*-imidazolo[4,5-*g*]pteridin-4-yl)-D-ribose (7).

Tab. 4. *Eigenschaften von Russupteridin-gelb IV (7)*

Ausbeute	25 mg aus 300 kg <i>R. sardonia</i> ^{a)}
Kristalle	blassgelbes Pulver; Schmp. > 300° (Verkohlung)
N-Gehalt	20,9%
Fluoreszenz (360 nm)	Lösung in H ₂ O: blaugrün
R _f -Werte (Fluoreszenz)	0,23 (4proz. Na-Citrat); 0,22 (BuOH/AcOH/H ₂ O 5:3:5); 0,61 (20proz. AcOH); 0,85 (<i>i</i> -PrOH/1proz. NH ₃ 4:1); 0,33 (4proz. NH ₄ Cl)
Elektrophorese	AcOH, pH 2, 500 V, 60 mA, 45 Min.: 1,3 cm, anodisch; Acetatpuffer, pH 3,5, 500 V, 45–50 mA, 35 Min.: 4,7 cm, anodisch; Acetatpuffer, pH 4,6, 400 V, 130–150 mA, 45 Min.: 8,2 cm, anodisch
pK _s (spektrophotometrisch)	2,97
UV/VIS ^{b)}	H ₂ O: 219 (33 090), 277 (17 440), 296 (sh, 8820), 389 (20 770) 0,1N HCl: 212 (22 280), 263 (6910), 296 (5650), 360 (16 660) 0,1N NaOH: 220 (19 200), 276 (8340), 310 (sh, 4140), 389 (12 590)
CD	(H ₂ O): 245 (–0,96), 270 (0), 300 (+0,50)
IR (KBr)	3420 (br.), 3220 (br.), 1765 _w , 1705 _s , 1645 _m , 1600 _s , 1545 _m , 1500 _m , 1475 _w , 1405 _w , 1380 _m , 1350 _w , 1260 _w , 1155 _w , 960 _w , 870 _w , 710 _w
¹ H-NMR ((D ₆)DMSO)	3,0–4,8 (Ribityl-H), 11,5 (br., ca. 2 NH)
¹³ C-NMR	48,52 _t /62,31 _d /68,05 _d /72,21 _d /72,91 _d (Ribityl-C); 110,47, 139,19, 143,17, 148,91, 151,39, 159,96, 163,94 (alle <i>s</i>)
MS	(FD) ^{c)} : 355 (<i>M</i> ⁺ + 1), 341, 327, 281, 267, 265, 242, 220, 207, 191, 177; (EI) ^{d)} : 859 (<i>M</i> ⁺), 844, 770, 755, 679, 665, 653, 551, 508

^{a)} Ernte 1969, Herkunft Schwarzwald.

^{b)} S. Fig. 5.

^{c)} Felddesorptionsmethode.

^{d)} Heptasilyläther, Elektronenstoss-Spektrum.

8. Isolierung und Eigenschaften von Russupteridin-gelb V. – Bei der chromatographischen Untersuchung von *Russula ochroleuca* wurde eine neue gelbe, im UV₃₆₀ stark gelbgrün-fluoreszierende Zone entdeckt, die sich von allen bisher besprochenen gelben Russupteridinen durch ihr starkes Haften an *Sephadex G-25* unterschied. Nach Elution mit 0,1proz. wässrigem Pyridin und starkem Einengen der Fraktion fiel RP.-gelb V kristallin an. Eigenschaften, s. Tab. 5. Die Verbindung ist, vor allem in sauren Lösungsmitteln, sehr lichtempfindlich. Mit RP.-gelb I gemeinsam ist die pH-Invarianz der langwelligeren Absorptionsbande im VIS. Sie liegt allerdings um etwa 35 nm bei längeren Wellen.

Tab. 5. *Eigenschaften von Russupteridin-gelb V*

Ausbeute	7 mg aus 6 kg <i>R. ochroleuca</i> ^{a)}
Fluoreszenz (360 nm)	Lösung in H ₂ O: gelbgrün
R _f -Werte (Fluoreszenz)	Start (<i>i</i> -PrOH/2N NH ₃ 4:1, grünlichgelb); 0,23 (4proz. Na-Citrat, grünlichgelb); 0,40 (BuOH/AcOH/H ₂ O 5:3:5, grünlichgelb); 0,44 (4proz. NH ₄ Cl, grünlichgelb); 0,66 (20proz. AcOH)
UV/VIS	H ₂ O: 247, 290, 375, 454; 0,1proz. AcOH: 246, 290, 452; 0,1N HCl: 207, 247, 297, 360, 451; 0,1N NaOH: 216, 247, 283, ca. 348, 454

^{a)} Ernte Sept. 1977, Herkunft Gottschalkenberg.

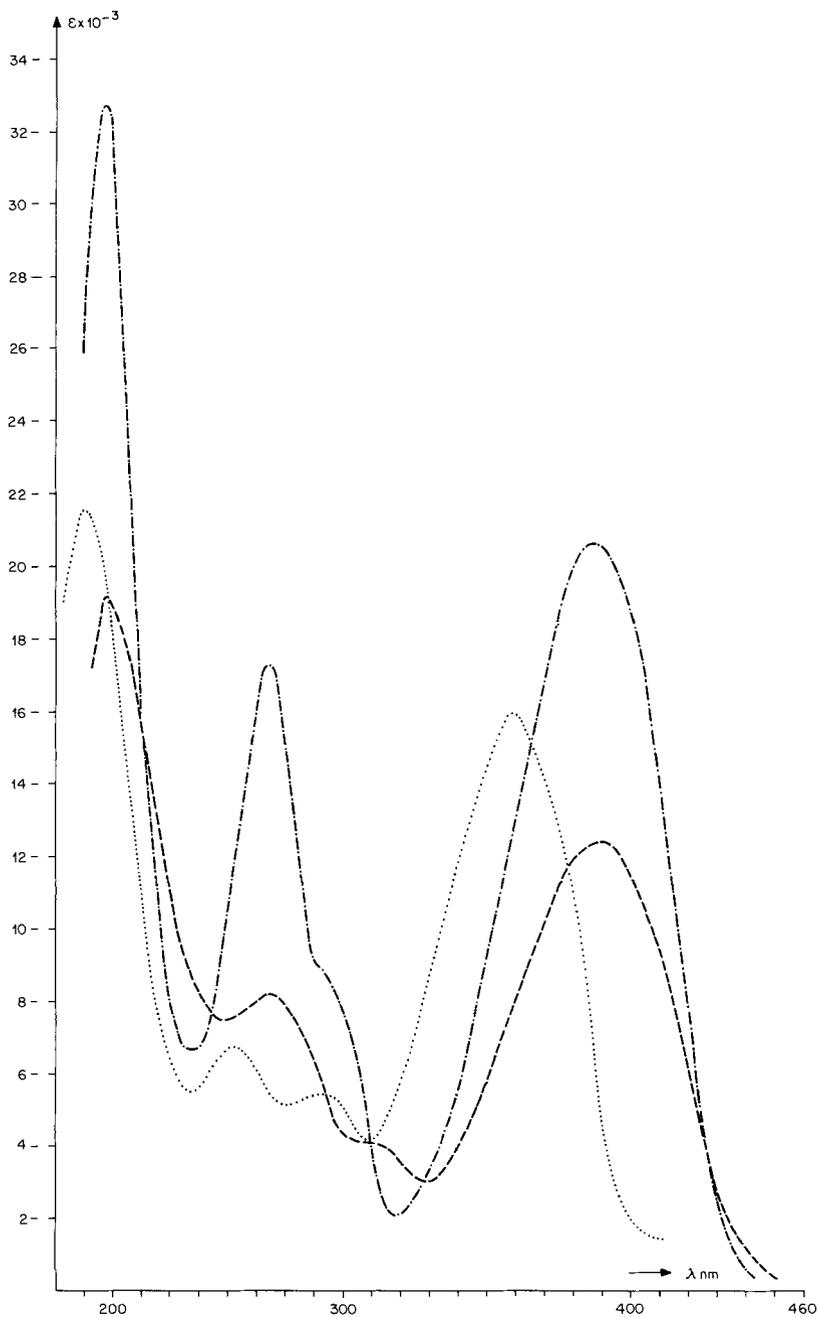


Fig. 5. UV/VIS-Spektren von 7. - - - - in H₂O, $c = 5,08 \cdot 10^{-5}$ M; ····· in 0,1N HCl, $c = 3,95 \cdot 10^{-5}$ M; - · - · in 0,1N NaOH, $c = 4,52 \cdot 10^{-5}$ M.

9. Bemerkungen. – Bei der Hydrolyse der «dimeren», roten Russupteridine wurden die Lumazine **3**, **4** und **10** als Abbauprodukte aufgefunden [4] [7]. Die Entdeckung, dass die gelben Russupteridine, RP.-gelb I (**5**), RP.-gelb II und RP.-gelb IV (**7**) Imino-derivate von 7-Oxolumazinen darstellen, die sich, wie im Fall von **5** und RP.-gelb II leicht zu 7-Oxolumazinen hydrolysieren lassen, wirft natürlich die Frage auf, ob in den roten, «dimeren» Russupteridinen nicht auch 7-Iminoderivate genuin vorhanden sind. Diesem Problem muss erneut nachgegangen werden.

Die hier vorgestellten Strukturen der gelben Russupteridine **5** und **7** sind die ersten natürlich vorkommenden Pteridine, die an C(6) und C(7) zusätzliche Aminofunktionen aufweisen. Da Pteridine und Lumazine biogenetisch bekanntlich aus Guanosintriphosphat entstehen, wobei dessen Imidazolring *via* die Verbindung **1** Vorläufer des Pyrazinringes ist, verwundert jetzt die weitere Angliederung eines Imidazolsystems an den Pyrazinring und die Ausbildung von zwei Amidin-Funktionen.

Wir danken den folgenden Institutionen und Personen, welche unsere Arbeiten auf dem Gebiet der Russupteridine unterstützt haben: dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die finanzielle Unterstützung; den Herren Prof. Dr. M. Viscontini (Universität Zürich) und Prof. Dr. W. Pfeleiderer (Universität Konstanz) und ihren Mitarbeitern für die Überlassung von zahlreichen Vergleichssubstanzen, für Diskussionen und für pK_s -Bestimmungen; Frä. T. Oertli, Frau R. Kaspar-Müller, den Herren Ing. HTL R. Strickler, cand. chem. B. Scholl, U. Egli und J. Lipscher für zeitweise experimentelle Mitarbeit; den Herren Dr. S. Arihara für Synthesen von Vergleichspräparaten, Dr. R. Buchecker für CD-Spektren, Dr. P. Rüedi für HPLC-Analysen; den Herren Dr. P. Scrabal (Organisch-chemisches Laboratorium der ETH), Dr. P. Niklaus und H. R. Loosli (Sandoz AG, Basel) für NMR-Messungen; Herrn Dr. H. R. Schulten (Universität Bonn) für FD-Massenspektren und den analytischen Abteilungen unseres Instituts für Verbrennungsanalysen und Spektren; Herrn Dr. H. P. Märki für Diskussionen; den Herren Prof. A. Bresinsky (Universität Regensburg), H. Cléménçon (Universität Lausanne), E. Horak (ETH Zürich), R. L. Sheffer (University of Michigan), Herrn H. Plenk (Jenbach, Tirol) und Herrn F. Marti (Peseux) für wertvolle Pilzproben.

Experimenteller Teil

1. *Extraktionen und Vortrennungen.* Pilzmengen und Erntejahre, s. Angaben in Tab. 1, 2, 4 und 5. Generelle Aufarbeitung und Chromatographie an *Sephadex*, s. [4]. Für 200 kg *R. sardonia* wurden 2 Säulen mit 7,1 bzw. 7,3 kg *Sephadex G-25* alternierend verwendet: die Trennphase dauerte ca. 4 Tage, die Regenerationsphase ebenso lange. Insgesamt wurden 18 säulenchromatographische Trennungen ausgeführt. Je nach Ziel wurden gelbe und farblose Substanzen gesamthaft von den roten Russupteridinen abgetrennt («Vorläufe» [4]), oder es wurde, vor allem in späteren Versuchen, angestrebt, die gelben Komponenten von den braunen Vorläufen zu trennen. Nicht nur von Pilzernte zu Pilzernte, sondern auch von Extrakt zu Extrakt traten immer wieder Abweichungen vom normalen chromatographischen Verhalten in den *Sephadex*-Säulen auf.

2. *Vergleichssubstanzen.* Ribamin (= 1-Amino-1-deoxyribitol) wurde über das kristallisierte *N*-Benzyloxy-carbonyl-ribamin (Z-Ribamin) gereinigt [4] und mit HCl/Pd/H₂ im *Rosenmund*-Reduktor freigesetzt.

5-Amino-6-(D-ribitylamino)uracil (**1**) wurde aus 6-Chlor-5-nitrouracil [33] und Umsatz mit Ribamin nach [14] hergestellt.

Verbindung 2. Synthese aus **1** nach [14].

Verbindungen 3, 4 und 10. S. [4] und darin zit. Ref.

3. *Nachweis von 1.* Graubraune Fraktionen aus der Ernte 1969 («Vorläufe» [4]) wurden nach der Konzentrierung i. V. zum Sirup auf Cellulose-Säulen ('Balston-Whatman cellulose powder, standard grade': trockenstopft; 100 ml Sirup/2,5 kg Cellulose) chromatographiert und mit H₂O eluiert. Je nach Zusammensetzung der verwendeten «Vorläufe» erschienen auf der Säule (von oben nach unten) rosa, gelbe und braune Zonen. Die vereinigten, den gelben Zonen vorauslaufenden Zonen wurden gesammelt, i. V. eingengt, mit AcOH sauer

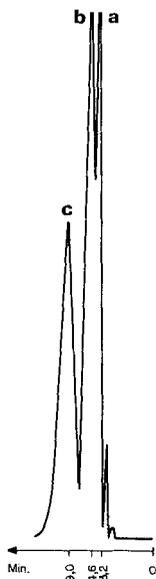


Fig. 6. HPLC-Trennung von **10** (a), **3** (b) und **4** (c) an ZIPAX (3×500 mm) mit $0,002\text{M KH}_2\text{PO}_4$, pH 2,65; $p = 10$ atm, Fluss 1 ml/Min.; Detektion 254 nm.

gestellt und dann mit 5 ml 3-Hydroxybutan-2-on (= Acetoin) versetzt. Hierauf wurde 2 Std. unter Rückfluss gekocht, nach dem Erhalten i. V. auf $2/3$ des Volumens eingengt und dann erneut auf einer Cellulose-Säule mit H_2O chromatographiert. Die schmale, grüngelbe, im UV_{360} grüngelb-fluoreszierende Zone wurde isoliert und dann an einer kleinen *CM-Sephadex-C-25*-Säule mit H_2O rechromatographiert. Nach Eindampfen wurden $2,4$ mg gelbes Pulver erhalten, das sich als mit **2** identisch erwies (UV/VIS, IR, DC).

4. *Isolierung von 3 und 4.* Die blauviolett-fluoreszierenden Vorfraktionen aus *Sephadex-G-25*- und aus sich anschließenden Cellulose-Chromatogrammen aus *R. emetica* (25 kg Frischpilze, Ernten 1971 und 1972. Herkunft Schwarzwald) wurden gesammelt und i. V. eingengt; pH $5-6$. Je 50 ml dieses Konzentrates wurden auf eine Säule ($5,5 \times 39$ cm) *DEAE-SS-Cellulose* (*Serva*, Heidelberg) aufgetragen und diese darauf mit $3,5$ l H_2O gespült. Hierauf folgten Elutionen mit 1 l $0,5\%$ AcOH, 5 l $0,8\%$ AcOH, 1 l $1,5\%$ AcOH (\rightarrow Elution einer intensiv blau-fluoreszierenden Zone, enthaltend **3**), 1 l 3% AcOH, 1 l 5% AcOH (\rightarrow Elution einer hellblau-fluoreszierenden schmaleren und einer blau-fluoreszierenden breiteren Zone, enthaltend **4**). Die weitere Reinigung erfolgte durch Chromatographie an Cellulose-Säulen ($0,5 \rightarrow 5\%$ AcOH) und anschliessend an *Sephadex G-15*

Tab. 6. R_f -Werte der Lumazine **3**, **4**, **9** und **10** ^{a)}

Verbindung	Lösungsmittelsysteme ^{b)}				
	A	B	C	D	E
3	0,59 (violett)	0,71 (violett)	0,61 (violett)	0,25 (violett)	0,79
4	0,60 (violett)	0,70 (violett)	0,56 (violett)	0,21 (violett)	0,83
9	0,44 (hellblau)	0,60	0,55 (hellblau)		0,86 (hellblau)
10	0,61 (weisslich)	0,69 (weisslich)	0,44 (hellblau)	0,01 (hellblau)	0,76

^{a)} Auf *Polygram-Folien*, 20×20 cm, *CEL 300/UV₂₅₄*; in Klammern Angabe der Fluoreszenz UV_{360} .

^{b)} A = 4proz. Na-Citrat; B = 4proz. NH_4Cl in H_2O ; C = BuOH/AcOH/ H_2O 5:3:5; D = *i*-PrOH/ 2N NH_3 4:1; E = AcOH/ H_2O 4:1.

Tab. 7. Spektraldaten der Lumazine 3, 4, 9 und 10

Verbindung	UV ^{a)} (qual.; $E_{\text{langwellig}}/E_{\text{kurzwellig}}$)			¹³ C-NMR ((D ₆)DMSO) ^{b)}
	A	B	C	
3	287, 343 (0,9)	280, 326 (1,0)	284, 351 (0,6)	20,3, 45,1, 63,2, 69,1, 72,8, 73,6, 107,8, 143,5, 147,7, 149,0, 155,2, 159,8
4	286, 346 (0,7)	276, 329 (0,96)	261, 358 (0,8)	45,3, 63,2, 69,0, 72,9, 73,7, 109,7, 139,4, 144,7, 149,2, 155,3, 159,8
9	304, 351 (1,2)	294, 342 (1,1)	303, 359 (1,04)	
10	299, 344 (1,8)	292, 327 (1,4)	307, 348 (1,2)	45,7, 63,2, 69,7, 72,8, 73,5, 97,5, 134,6, 148,8, 151,8, 157,1, 157,1

^{a)} A = H₂O; B = 0,1N HCl; C = 0,1N NaOH.
^{b)} 270 mg Substanz in 2 ml Lösungsmittel.

(0,5→1% AcOH). Die Lumazine 3 und 4 wurden als schwachbräunliche Festkörper (wenige mg) erhalten; Identifikation durch UV und DC (s. Tab. 6 und 7) sowie durch HPLC (s. Fig. 6).

5. *Isolierung von Riboflavin (6) und quantitative, fluorimetrische Bestimmungen.* «Vorläufe» (s. 1) aus 200 kg *R. sardonia* wurden i. V. zum dünnflüssigen Sirup eingedampft und hierauf auf grossen Cellulose-Säulen ('*Balston-Whatman cellulose powder, standard grade*'; trockengestopft; 100 ml Sirup/2,5 kg Cellulose) mit H₂O chromatographiert. Die Riboflavin-Zonen aus den einzelnen Säulen wurden vereinigt und an *Sephadex G-15* mit 1proz. AcOH nachgereinigt. Umkristallisation aus H₂O/EtOH: 200 mg. Für die quantitativen Bestimmungen wurden 1–2 trockene Fruchtkörper im Mörser zerrieben. Dann wurde das Pulver mit MeOH/2proz. AcOH 3:2 3mal bei 40° 6 Std. extrahiert. Nach Zentrifugation und Eindampfen der Lösung wurde mit Petroläther entfettet, in H₂O gelöst, durch *Celite* filtriert und an *Sephadex G-25* (3 × 25 cm) chromatographiert; Elution mit H₂O, dann 1proz. Pyridin. Die Riboflavin-Zone wurde eingedampft, der Rückstand in H₂O gelöst und an *Amberlite XAD-II* adsorbiert. Nach Waschen mit H₂O wurde mit Aceton/H₂O 1:1 eluiert, das Eluat auf 25 ml aufgefüllt und der Riboflavin-Gehalt fluorimetrisch, anhand einer Standardkurve, bestimmt (Anregung bei 465 nm, Emissionsmaximum 515 nm). Eine Auswertung erfolgte nur, wenn die Fluoreszenzkurve mit der von Riboflavin übereinstimmte.

6. *Isolierung von Russupteridin-gelb I (5).* Parallel zur Riboflavin-Isolierung (s. 5) aus verschiedenen Pilzern wurden auch die RP.-gelb I und II isoliert. Die ersten, völlig reinen Präparate erhielten wir aus *R. paludosa* wie folgt: 36,3 kg Frischpilze (Ernte 1970) wurden wie in [4] beschrieben extrahiert und durch 6 Säulenchromatogramme (*Sephadex G-25*, 20 × 100 cm) in rote und gelbe Zonen getrennt. Die Vorläufe mit angereicherten gelben Komponenten wurden i. V. auf 800 ml eingedampft und diese in 10 Portionen an Cellulose-Säulen ('*Whatman CF-II cellulose powder*'; 7,1 × 52 cm; trockengestopft) zuerst mit H₂O, dann mit 1,5proz. AcOH getrennt. Die unter der Riboflavin-Zone wandernden RP.-gelb-I- und RP.-gelb-II-Zonen (meist schlecht getrennt) wurden gesammelt und an *Sephadex G-15* (10 Säulen à 12 × 45 cm) mit 1proz. AcOH weiter gereinigt. Dabei liess sich erneut Riboflavin abtrennen (Tageslicht dunkelgelb bis orange, im UV₃₆₀ orange-gelb). Darunter lagen die Zonen von RP.-gelb II (Tageslicht gelb, UV₃₆₀ grüngelb bis türkis) und RP.-gelb I (analoges Verhalten wie RP.-gelb II). Die gesammelten Zonen mit den Einzelkomponenten wurden dann an 8 Säulen mit *CM-Sephadex* (5 × 40 cm, H⁺-Form) mit 5proz. AcOH chromatographiert (s. Fig. 1). Eine letzte Reinigung zur Abtrennung von Hydrolyseprodukten erfolgte an einer kurzen Cellulose-Säule mit 1,5proz. AcOH. Nach Eindampfen i. V. und vorsichtigem Lösen des Rückstandes in 45° warmem H₂O (Filtration der Lösung durch eine Glassinternutsche) und langsamer Zugabe von AcOH bis ca. 5% und Abkühlen begann 5 langsam auszukristallisieren: 155 mg gelbe, sehr feine, zu Büscheln vereinigte Nadelchen. Die Kristalle enthalten nach ¹H-NMR Kristall-AcOH. Eigenschaften: s. Tab. 1, Fig. 2, 3 und 7. Ähnliche Trennungen wurden für die aus *R. sardonia* erhaltenen Präparate ausgeführt.

7. *Stabilitätsteste an 5* (s. auch Fig. 4). Verdünnte Lösungen von 5 in a) H₂O, b) 5proz. AcOH (pH 2,7), c) 1M Acetatpuffer (pH 4,7) und d) 0,2M Phosphatpuffer (pH 10,5) wurden in kleinen Reagenzgläsern bei RT. im diffusen Tageslicht stehen gelassen und laufend papierchromatographisch untersucht. Vergleichsproben wurden im Dunkeln gehalten. Nach 2 Tagen war bei a)–c) kein 5 mehr festzustellen, jedoch noch in d). An seiner Stelle traten farblose, im UV blau-fluoreszierende Substanzen auf mit R_f 0,15 und 0,48 (9; Cellulose-Platten, 4proz. Na-Citrat).

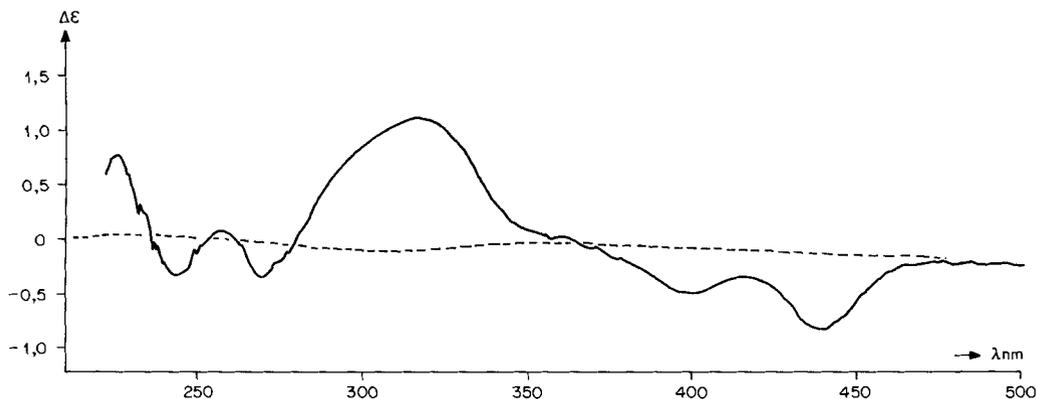


Fig. 7. CD-Spektrum von **5** in 0,1N HCl, $c = 0,125$ mg/ml (---- Nulllinie).

8. *Nachweis der N-Formylgruppe in 5*. Ein Gemisch von 1,5 mg **5** in 1 ml H₂O und 0,1 ml 8N H₂SO₄ wurde 40 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, dann mit 2-Thiobarbitursäure (= 2-Thioxo-2,3-dihydro-4,6(1*H*,5*H*)-pyrimidindion) versetzt und erneut 20 Min. auf 100° erhitzt. Spektrophotometrische Bestimmung nach [34]. Gefunden wurden ca. 0,8 Mol-äquiv. bezogen auf C₁₂H₁₆N₆O₇.

Die Lösung von 4 mg **5** in 400 µl (D₆)DMSO/1N DCl 1:1 zeigte das Signal der N-CHO-Gruppe bei 9,08 ppm. Nach 20 Min. Wärmen auf 50° war dieses Signal sehr stark vermindert und ein neues, starkes Signal trat bei 8,10 ppm auf. Durch Zumischen von HCOOH konnte seine Identifikation gesichert werden.

9. *Hydrolysen von 5*. Die Lösung von 2 mg **5** in 5 ml 1N NaOH wurde bei RT. 28 Std. im Dunkeln gehalten. Nach Ansäuern mit verd. HCl wurde an *Sephadex G-15* chromatographiert und die blau-fluoreszierende, farblose Zone mit 0,3proz. AcOH eluiert. UV (0,1N HCl): 293,5 (0,58), 344 (0,49).

In 30 ml 0,1N HCl wurden 10 mg **5** 2 Std. auf 80° gehalten. Nach Eindampfen und Chromatographie an *Sephadex G-15* (11 × 37 cm) wurde mit 0,3proz. AcOH eluiert und die Substanz mit λ_{\max} 294/344 mit Hilfe eines UV-Monitors isoliert. Dann wurde an einer DEAE-Cellulose-Säule (3,8 × 21 cm) zuerst mit H₂O, dann mit 0,5proz. AcOH chromatographiert. Die isolierte Substanz wurde aufgrund der UV und Vergleichschromatogramme als **9** identifiziert. Lösungen in H₂O zeigen im UV₃₆₀ eine intensive, hellblaue Fluoreszenz. Eigenschaften: s. Tab. 6 und 7.

Im entgasten Bombenrohr (vgl. [4]) wurden 8 mg **5** in 10 ml 2proz. AcOH 2½ Std. auf 150° gehalten. Nach Eindampfen der Lösung und Chromatographie an DEAE-Cellulose (3,7 × 16 cm) mit 1→2proz. AcOH konnte die **10** enthaltende Zone angereichert werden (Achtung: in sauren Lösungsmitteln keine Fluoreszenz). Die Nachreinigung erfolgte an *Sephadex G-15* (5,1 × 37 cm) mit 0,5proz. AcOH. Mit synthetischem Material übereinstimmende R_F-Werte in 5 verschiedenen Lösungsmitteln, s. Tab. 6. UV (H₂O): 295 (0,57), 346 (0,37). UV (0,1N HCl): 288 (0,46), ca. 324 (0,35). UV (0,1N NaOH): 305,5 (0,48), 350 (0,41), s. Tab. 7.

10. *Isolierung von Russupteridin-gelb II und Hydrolysen*. Aus *R. paludosa* (s. 6) von *R. sardonica* standen Extrakte aus 300 kg (Ernte 1969) bzw. 200 kg (Ernte 1970) zur Verfügung. Aufarbeitung analog **1**. Die Ernte 1970 wurde vor allem zur Isolierung von RP.-gelb I, II und III benutzt, wobei RP.-gelb IV (**7**) beobachtet, aber nicht isoliert wurde (Isolierung, s. 11). RP.-gelb II wurde parallel zu RP.-gelb I (**5**) isoliert (s. 6). In hochangereicherter Form haftete RP.-gelb II an *Sephadex G-15* mit H₂O als Elutionsmittel und liess sich dann mit 0,5proz. AcOH desorbieren. Die Kristallisation erfolgte aus warmer (45°; Zers. bei erhöhter Temp.!) H₂O-Lösung bei gleichzeitigem Abkühlen und Abblasen mit N₂ in sehr feinem dunkelgelbem Kristallpulver. Eigenschaften: s. Tab. 2.

Die Hydrolysen zu den Lumazinen **9** und **10** und ihre Identifikation wurden wie in **9** durchgeführt.

11. *Isolierung von Russupteridin-gelb IV (7)*. Die papierchromatographische Untersuchung (Cellulose, 4proz. Na-Citrat) der «Vorläufe» von 300 kg *R. sardonica* (Ernte 1969) liessen eine neue, im UV₃₆₀ blaugrün- bis türkis-fluoreszierende Substanz erkennen (s. Fig. 8), die schon bei der Isolierung von RP.-gelb I und II aufgefallen war. Zur Verfügung standen 20 l Konzentrat (aufbewahrt in Polyäthylengefässen unterhalb 0°). Sie wurden 1975 wie folgt aufgearbeitet: An 2 Cellulose-Säulen (5 × 49 cm (3 kg) bzw. 10 × 46 cm (5 kg); trockengestopft)

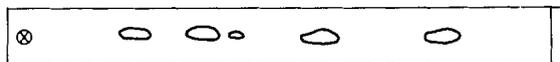


Fig. 8. DC von Lumazinen in Vorläufen von *Russula sardonia* (Cellulose, 4proz. Na-Citrat). R_f 0,23 (UV blau-grün, 7); 0,34 (UV gelb, 6 und evtl. weitere gelbe Lumazine); 0,39 (UV hellblau = ?); 0,56 (UV blauviolett; 3 und 4); 0,82 (UV blau; ?).

wurden parallel 0,6 l bzw. 1 l Konzentrat mit 1proz. AcOH getrennt (insgesamt 25 Chromatogramme). Säulenbild: oben hellrot, darunter blassgelbe Zone (UV₃₆₀ blaugrün), dann die gelben Zonen von RP.-gelb I-III. Die vereinigten blassgelben Zonen (= 7) wurden hierauf an 2 kg *Sephadex G-15* (5,5 × 73 cm, 10 Chromatogramme) mit 1proz. AcOH weiter gereinigt. Die Eluate aus den hellgelben Zonen (7 enthaltend) wurden i. V. eingedampft und an *Sephadex CM C-25* (H⁺, Säule 5 × 43 cm (0,75 kg)) an einer auf 20° thermostatisierten Säule mit 5proz. AcOH gereinigt. Nach dem Eindampfen liess sich 7 aus H₂O als mattgelbes Pulver kristallisieren: 25 mg. Eigenschaften: s. Tab. 4. Fluoreszenzmaximum (H₂O) bei 466,8 nm.

12. *Perjodatspaltung von 7 und 3*. Die Perjodatspaltungen wurden analog zu [35] [23] durchgeführt: Eine Lösung von 2 mg 7 in 1 ml H₂O und 5 mg NaIO₄ wurde 2 Std. bei 40° gehalten (DC-Kontrolle). Darauf wurde mit einer Spatelspitze NaBH₄ reduziert. Nach 20 Min. wurde i. V. eingedampft, der Rückstand mit Ac₂O/Pyridin acetyliert und an *Whatman Cellulose CC31* mit H₂O chromatographiert. Die Hauptzone liess sich aus EtOH/H₂O kristallisieren, Schmp. ca. 240° (Zers.). UV, ¹H- und ¹³C-NMR, MS: *O*-Diacetylverbindung (= (R)-4-(2,3-Diacetoxypropyl)4H-imidazo[4,5-g]pteridin-2,6,8(1H,5H,7H)-trion); nur 2 Moläquiv. NaIO₄ wurden verbraucht.

Ähnliche, unvollständige Perjodatspaltungen wurden auch an 3 beobachtet: aus 20 mg 3 in 5 ml H₂O und 5 mg NaIO₄ wurde wie vorstehend beschrieben das Gemisch der Acetate erhalten und dieses an *Sephadex LH-20* (3,5 × 40 cm) mit AcOEt/MeOH 4:1 und dann an *Sephadex G-15* (3,5 × 35 cm) mit 0,1proz. AcOH chromatographiert. Umkristallisation erfolgte aus 50proz. EtOH, Schmp. > 300°. UV, ¹H- und ¹³C-NMR, MS: unvollständiger Abbau zu (R)-6-Methyl-8-(2,3-diacetoxypropyl)-2,4,7(1H,3H,8H)-pteridintrion.

13. *Partialsynthese von RP.-gelb IV (7) aus RP.-gelb I (5)*. Zu einer Aufschlammung von 5 mg Ag₂O in 1,5 ml H₂O wurde verd. NH₃ bis zur Komplexierung des Silbers zugegeben. Dazu gaben wir die Lösung von 2,3 mg 5 in 1,5 ml 0,1N NaOH. Bei RT. wurde 4 Std. stehen gelassen, dann mit verd. HCl angesäuert und filtriert. Das erhaltene Gemisch 5/7 (ca. 1:1) wurde an *Sephadex CM C-25* (Säule 2 × 40 cm) mit 5proz. AcOH chromatographiert. Dabei haftete 5 und reines 7 wurde eluiert. Ein analoger Ansatz, bei dem die Reaktionszeit 15 Std. betrug, lieferte ohne Chromatographie direkt reines 7. Die Identität der partialsynthetisch erhaltenen Verbindung 7 mit der aus Pilzen direkt isolierten ergibt sich aus Tab. 8 sowie aus übereinstimmenden ¹H- und ¹³C-NMR.

Eine Oxydation von 5 konnte auch mit Ag₂O/0,1N NaOH erreicht werden (d. h. ohne NH₃!), allerdings bildete sich hier (chromatographischer Nachweis) neben dem gesuchten 7 auch etwas 10.

14. *Isolierung von Russuapteridin-gelb V*. Die Häute von 6 kg frischen *R. ochroleuca* (Ernte 1977, Gottschalkenberg, Kt. Zug) wurden 3mal mit je 2 l EtOH/H₂O/AcOH 50:50:1 während 30 Min. unter Rückfluss extrahiert. Nach Filtration, Konzentrieren i. V. und Entfetten mit CHCl₃ wurde i. V. eingedampft und der Rückstand in 0,1proz. wässr. Pyridin aufgenommen. Dann wurde portionsweise an *Sephadex G-15* (9,5 × 160 cm) chromatographiert. Säulenbild (von oben nach unten): mehrere gelbliche Zonen, grosse, grünstichig gelbe Hauptzone (UV₃₆₀ grüngelb) enthält RP.-gelb V, bräunlichgelb (UV₃₆₀ dunkelgelb; Riboflavin), schmal dunkelgelb (UV₃₆₀ dunkelgelb; unbekannt), farblos (UV₃₆₀ blau; 3). Die aus der Hauptzone isolierte, vom Riboflavin nur unvoll-

Tab. 8. Vergleich von isolierten^{a)} und partialsynthetischen 7

UV				DC (R _f)		
	0,1N HCl	0,1N NaOH	H ₂ O	4proz. Na-Citrat	20proz. AcOH	3proz. NH ₄ Cl
262 (263)	275 (277)	277 (277)	277 (277)	0,27 (0,27)	0,63 (0,63)	0,39 (0,40)
289 (289) sh	307 (307) sh	297 (296) sh	297 (296) sh			
360 (360)	390 (389)	389 (389)	389 (389)			

^{a)} Daten von isoliertem 7 in Klammern.

ständig getrennte Substanz wurde darauf auf *CM-Sephadex* (H^+ , $3,7 \times 30$ cm) mit 5proz. AcOH chromatographiert, wobei sich Riboflavin wegen seiner schnelleren Wanderung gut abtrennen liess. Kristallisation erfolgte durch Stehenlassen einer konzentrierten H_2O -Lösung bei 3° . RP.-gelb V war nach dem Auskristallisieren sehr schwer löslich in H_2O und DMSO. Eigenschaften: s. *Tab. 5*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *H. Märki-Danzig*, 'Zur Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese gelber Russupteridine', Dissertation, Universität Zürich, 1980.
- [2] *H. Koch*, 'Russulafarbstoffe; zur Struktur der gelben Komponenten', Dissertation, Universität Zürich, 1975.
- [3] *C. H. Eugster, E. F. Frauenfelder & H. Koch*, *Helv. Chim. Acta* 53, 131 (1970).
- [4] *P. X. Iten, S. Arihara & C. H. Eugster*, *Helv. Chim. Acta* 56, 302 (1973).
- [5] *Th. J. Venakis*, 'Zur Kenntnis der roten Täublingsfarbstoffe', Dissertation, Universität Zürich, 1978.
- [6] *E. F. Frauenfelder*, 'Russulafarbstoffe', Dissertation, Universität Zürich, 1970.
- [7] *C. H. Eugster & P. X. Iten*, 'Chemistry and Biology of Pteridines', Ed. W. Pfeleiderer, Walter de Gruyter, Berlin, 1975, S. 881.
- [8] *C. H. Eugster*, Abstracts 2. Intern. Mycol. Congress, Tampa (Florida), 1977, S. 178.
- [9] *P. X. Iten, H. Märki-Danzig & C. H. Eugster*, 'Chemistry and Biology of Pteridines', Ed. R. L. Kisluk und G. M. Brown, Elsevier, New York, 1979, S. 105.
- [10] *P. Watson*, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 49, 11 (1966).
- [11] *K. Gluchoff*, 'Etude chimicotaxonomique des pigments des Russules', Thèse 3^o cycle, Université de Lyon, 1969.
- [12] *C. H. Eugster*, *Z. Pilzkunde* 39, 45 (1973).
- [13] *T. Masuda, T. Kishi, M. Asai & S. Kuwada*, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 7, 361 (1959).
- [14] *R. M. Cresswell & H. C. S. Wood*, *J. Chem. Soc.* 1960, 4768.
- [15] *F. Lingens, O. Oltmanns & A. Bacher*, *Z. Naturforsch., B* 22, 755 (1967).
- [16] *T. Masuda*, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 5, 28 (1957).
- [17] *G. F. Maley & G. W. E. Plaut*, *J. Biol. Chem.* 234, 641 (1959).
- [18] *M. Jossierand & G. Nétien*, *Bull. mens. Soc. linnéenne Lyon* 7, 283 (1938); *idem*, *ibid.* 8, 14 (1939).
- [19] *G. Deysson*, *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 74, 207 (1958).
- [20] *J. L. Bonnet*, *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 75, 215 (1959).
- [21] *H. Romagnesi*, 'Les Russules d'Europe et d'Afrique du Nord', Bordas, Paris, 1967.
- [22] *T. Masuda, T. Kishi & M. Asai*, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 5, 598 (1957); *idem*, *ibid.* 6, 291 (1958).
- [23] *A. Suzuki, T. Miyagawa & M. Goto*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 45, 2198 (1972).
- [24] *H. Märki-Danzig & C. H. Eugster*, *Helv. Chim. Acta* 67, 570 (1984).
- [25] *W. Pfeleiderer & G. Nübel*, *Chem. Ber.* 93, 1406 (1960).
- [26] *H. S. Forrest & W. S. McNutt*, *J. Am. Chem. Soc.* 80, 739 (1958).
- [27] *W. B. Turner*, 'Fungal Metabolites', Academic Press, London, 1971, und 2. Auflage 1983.
- [28] *S. Shibata, S. Natori & S.-I. Udagawa*, 'List of Fungal Products', University of Tokyo Press, Tokyo, 1964.
- [29] *M. W. Miller*, 'The Pfizer Handbook of Microbial Metabolites', McGraw-Hill, New York, 1961.
- [30] *G. E. Treadwell & D. E. Metzler*, *Plant Physiol.* 49, 991 (1972).
- [31] *W. Steglich & L. Zechlin*, *Z. Naturforsch., C* 32, 520 (1977).
- [32] *A. N. Shiwrina & L. N. Koryakina*, *Prod. Bios. Vyssh. Gribov Ikh. Ispol'z* 45, Akad. Nauk Moskau 1966.
- [33] *W. Pfeleiderer & H. Walter*, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 677, 113 (1964).
- [34] *S. A. Barker & P. J. Somers*, *Carbohydr. Res.* 3, 220 (1966).
- [35] *A. Suzuki & M. Goto*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 44, 1869 (1971).