

CHROM. 10,035

Note

Ein neues DC-System zur Identifizierung mittelpolarer bis lipophiler Boletales-Pigmente

FRIEDRICH V. MASSOW und DIETER HUBER

Botanisches Institut der Universität Fridericiana (TH) Karlsruhe, Kaiserstrasse 2, D-7500 Karlsruhe 1 (B.R.D.)

(Eingegangen am 4. März 1977)

Angeregt durch Untersuchungen über die Farbstoffbildung bei *Peniophora sanguinea* suchten wir nach einem DC-System, das exakter als die bisher üblichen Standard-DC-Systeme^{1,2} eine Identifizierung der wichtigsten mittelpolaren bis lipophilen Boletales-Pigmente ermöglichen sollte. Zu diesen Pigmenten zählen die Pulvinsäuren, die Pulvinsäurelactone, die Pentenone und die Grevilline. Erprobt wurde das erarbeitete DC-System mit synthetisierten* oder isolierten** Reinsubstanzen und mit Extrakten aus Mycel-Flüssigkulturen von *Leccinum aurantiacum* sowie mit Extrakten aus Fruchtkörpern frisch gesammelter Exemplare von *Leccinum aurantiacum* bzw. von *Suillus grevillei*.

MATERIAL UND METHODEN

Versuchsorganismen

Leccinum aurantiacum (Bull. ex Fr.) S.F. Gray Kultur CBS 125.50, Nr. 64/Baarn, kultiviert in Flüssigmedium³; L-Tyrosin ersetzt durch gleiche Menge an L-Phenylalanin; Dauer 110 Tage.

Leccinum aurantiacum, frisch gesammelte Fruchtkörper.

Suillus grevillei, frisch gesammelte Fruchtkörper.

Extraktionen

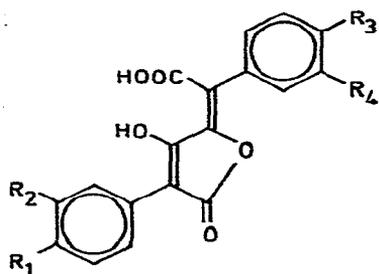
Die frischen Fruchtkörper bzw. die am Rotationsverdampfer bei 30° eingedickten Kulturen wurden mit einer Mischung aus Äthanol-HCl (99:1) im Mixer extrahiert. Dieser Extrakt wurde am Rotationsverdampfer fast zur Trockne eingedampft und zur DC in Essigsäure-Äthylester aufgenommen.

DC-Adsorbens

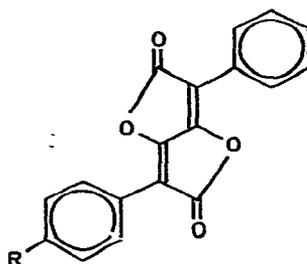
Als Schicht wurden Kieselgelfertigplatten mit Fluoreszenzindikator (Nr.

* Pulvinsäure, 4-Hydroxy-Pulvinsäure, 4'-Hydroxy-Pulvinsäure, 4,4'-Dihydroxy-Pulvinsäure (Atromentinsäure), 3,4-3',4'-Tetrahydroxy-Pulvinsäure (Variegatsäure), Pulvinsäurelacton, 4-Hydroxy-Pulvinsäurelacton.

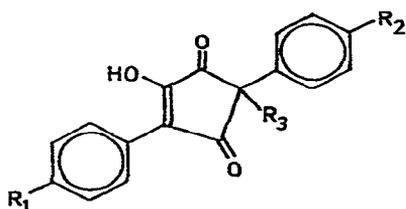
** Gyrocyanin⁵ aus *Gyroporus cyanescens*.

**PULVINSÄUREN**

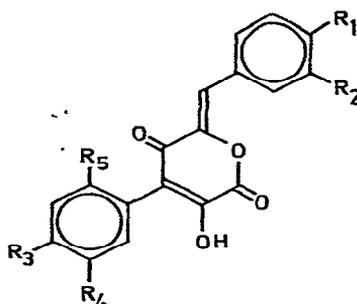
- z.B.: 1 Pulvinsäure ($R_1=R_2=R_3=R_4=H$)
 2 4-Hydroxy-pulvinsäure ($R_1=OH$;
 $R_2=R_3=R_4=H$)
 3 4'-Hydroxy-pulvinsäure ($R_3=OH$;
 $R_1=R_2=R_4=H$)
 4 Atromentinsäure ($R_1=R_3=OH$;
 $R_2=R_4=H$)
 5 Variegatsäure ($R_1=R_2=R_3=R_4=OH$)

**PULVINSÄURE-LACTONE**

- z.B.: 6 Pulvinsäurelacton ($R=H$)
 7 4-Hydroxy-pulvinsäurelacton
 ($R=OH$)

**PENTENONE**

- z.B.: 8 Gyroporin ($R_1=R_2=R_3=OH$)
 9 Gyrocyanin ($R_1=R_2=OH$;
 $R_3=H$)

**GREVILLINE**

- z.B.: 10 Grevillin-A ($R_1=R_3=OH$;
 $R_2=R_4=R_5=H$)
 11 Grevillin-B ($R_1=R_2=R_3=OH$;
 $R_4=R_5=H$)
 12 Grevillin-C ($R_1=R_2=R_3=R_4=OH$;
 $R_5=H$)
 13 Grevillin-D ($R_1=R_2=R_4=R_5=OH$;
 $R_3=H$)

5715; Fa. Merck, Darmstadt, B.R.D.) verwendet. Die Entwicklung erfolgte aufsteigend in üblichen DC-Trögen.

Laufmittel

n-Pentan-Chloroform-Diäthyläther-Essigsäureäthylester-Methanol-Ameisensäure (2:2:5.5:3:1:1); 2, Aceton; 3, *n*-Pentan-Chloroform-Diäthyläther-Ameisensäure (4:20:45:3); 4, Cyclohexan-Aceton (7:1).

Durchführung der DC

Um auch kleine Farbstoffmengen nachweisen zu können, wurde der Extrakt strichförmig 2 cm über dem unteren Plattenrand aufgetragen (Fig. 1). Der Abstand zum linken Plattenrand betrug 1 cm, der zum rechten ca. 3 cm (bewirkt Verlängerung

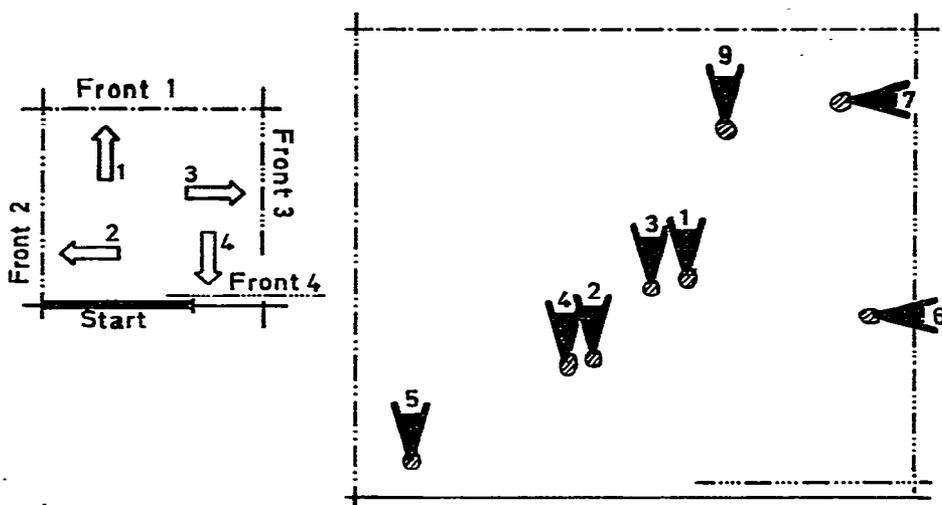


Fig. 1. Schematisches Vorgehen bei dem beschriebenen DC-System.

Fig. 2. DC der Einzelsubstanzen. Die Zahl-Angaben der DC-Flecke entsprechen den Formel-Zahlen.

der Laufstrecke für Laufmittel 4). Nach erfolgter bandenförmiger Auftrennung mit Laufmittel 1 wurden die Platten mit einem Fön trockengeblasen. Als zweites "Laufmittel" wurde Aceton zwischengeschaltet. Dies erfolgte wiederholt, bis eine einheitliche Startlinie 1 cm vom linken Plattenrand entstanden war. Auf dieser sind zwar in der Lage einheitlich, aber in der Zusammensetzung (bedingt durch die 1. Auftrennung) nach Polarität gegliedert, die einzelnen Substanzen bzw. Substanzgruppen des ursprünglichen Extraktes nebeneinander angeordnet. Die Entwicklung mit dem Laufmittel 3 erfolgte entgegen der Aceton-Schiebrichtung. Die letzte Auftrennung erfolgte mit Laufmittel 4 entgegen der 1. Laufrichtung. Es wurden dabei die lipophilen, bis jetzt nur an der Laufmittelfront liegenden, Komponenten getrennt.

Identifizierung der Stoffe

Eigenfärbung: Fluoreszenzlöschung bei UV (254 nm); Fluoreszenz bei UV (366 nm); Farbreaktion nach Besprühen mit konz. H_2SO_4 oder nach Bedampfen mit konz. NH_3 oder nach Neutralisation und nachfolgender Oxidation mit $NaHCO_3$ - $K_3Fe(CN)_6$. Färbungen u.a. mit H_2SO_4 : Gyroporin⁴ = blaugrün, Grevilline² = lila; mit $NaHCO_3$ - $K_3Fe(CN)_6$: Gyrocyanin⁵ = blau.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Pulvinsäuren

Bei der DC-Auswertung von Vertretern der Pulvinsäuregruppe (Reinsubstanzen) wurde festgestellt, dass nach Beendigung der Auftrennung mit Laufmittel 3 die symmetrisch substituierten Pulvinsäuren (Variegatsäure, Atromentinsäure, Pulvinsäure) in Abständen gleicher Größenordnung auf einer Geraden lagen. Die asymmetrisch substituierten Pulvinsäuren (4-Hydroxy-Pulvinsäure und 4'-Hydroxy-Pulvinsäure) waren nicht direkt in obige Polaritätsgerade einzuordnen, woraus sich

folgern liess, dass ihr DC-Verhalten nicht ausschliesslich von der Zahl der Hydroxy-Gruppen, sondern auch von deren Lage und der daraus resultierenden unterschiedlichen Beeinflussung der freien Carboxylgruppe abhängt. Den Beweis für diese Vermutung lieferte das DC-System (s. Fig. 2). Die R_F -Verschiebung von Pulvinsäure zu Atromentinsäure kann dementsprechend dargestellt werden durch die Summe der beiden Effekte, die zum einen durch die 4-Hydroxy-Gruppe und zum andern durch die 4'-Hydroxy-Gruppe verursacht werden.

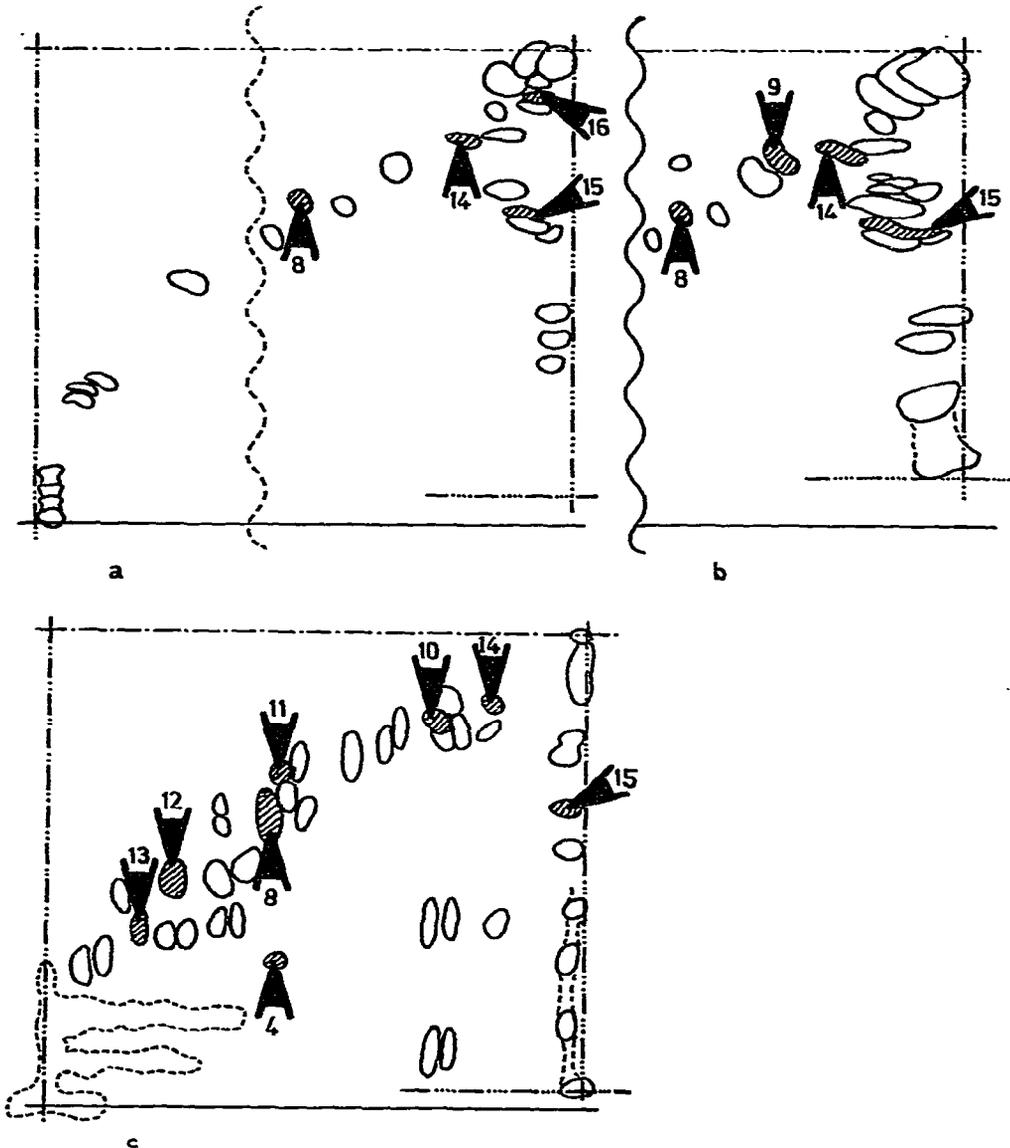


Fig. 3. DC von *Leccinum-aurantiacum*-Extrakten. (a) Huthaut; (b) Stielrinde; (c) 110-Tage Flüssigkultur. Die Zahl-Angaben der DC-Flecke entsprechen den Formel-Zahlen (Stoffe 1 bis 13) bzw. den Angaben im Text (Stoffe 14 bis 16).

Pulvinsäurelactone

Die verwendeten Pulvinsäurelactone (4-Hydroxy-Pulvinsäurelacton und Pulvinsäurelacton) waren so stark lipophil, dass sie erst mit Laufmittel 4 getrennt wurden (s. Fig. 2).

Pentenone

Gyrocyanin wurde als Isolat verwendet (s. Fig. 2), während von Gyroporin ein *Leccinum aurantiacum*-Kulturextrakt zur Lokalisierung diente (Fig. 3c). Dieser sollte zugleich eine Bestätigung der Pulvinsäureergebnisse liefern, da neben Gyroporin auch Atromentinsäure⁴ in Agarkulturen von *Leccinum aurantiacum* nachgewiesen wurde. Bei der Analyse der Fruchtkörper-Extrakte (getrennt nach Huthaut, Hutkörper, Stielkörper und Stielrinde) wurden im Stiel (Fig. 3b) beide Pentenone nebeneinander nachgewiesen, wobei im Stielkörper wenig vom Gyrocyenin (Stoff 9) gefunden wurde, es in der Stielrinde aber in sehr hoher Konzentration vorlag. Gyrocyenin wurde in keinem weiteren Teilextrakt gefunden, während Gyroporin (Stoff 8) überall in recht hoher Konzentration vorhanden war. Atromentinsäure wurde (im Gegensatz zu Kulturextrakten) in Fruchtkörperextrakten nicht gefunden. Die Hutfärbung dieses Pilzes ist offensichtlich auf ein lipophiles, rotes Pigment (Stoff 16) zurückzuführen, das ausschliesslich im Extrakt der Huthaut nachgewiesen werden konnte (Fig. 3a).

Grevilline

Neben dem bei *Leccinum aurantiacum* bisher noch nicht nachgewiesenen Gyrocyenin (im Fruchtkörperstiel) konnten im Kulturextrakt dieses Pilzes weitere sechs

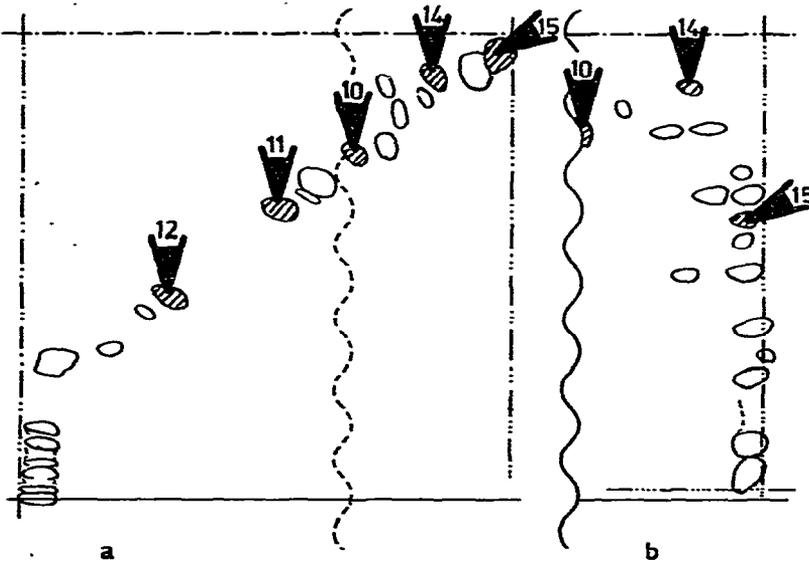


Fig. 4. DC des Fruchtkörperextrakts von *Suillus grevillei* (a) nach der dritten Laufrichtung, und (b) nach der vierten Laufrichtung. Die Zahl-Angaben der DC-Flecke entsprechen den Formel-Zahlen (Stoffe 1 bis 13) bzw. den Angaben im Text (Stoffe 14 bis 16).

Substanzen (Stoffe 10–15) neu nachgewiesen werden, die beim Besprühen mit konz. H_2SO_4 eine für Grevilline typische lila-Verfärbung zeigten. Zwei davon (Stoffe 14 und 15) konnten auch in Fruchtkörperextrakten von *Leccinum aurantiacum* gefunden werden.

Zur näheren Charakterisierung all dieser Stoffe wurden Extrakte von frisch gesammelten Fruchtkörpern von *Suillus grevillei* chromatographiert (Fig. 4a, b). Durch Polaritäts- und Konzentrationsvergleich mit bekannten Daten² konnten die Stoffe 10, 11 und 12 als die Grevilline A, B und C identifiziert werden. Daneben wurden in den Extrakten von *Suillus grevillei* (Fruchtkörper) ebenfalls die Stoffe 14 und 15 gefunden. Nach dem DC-Laufverhalten könnte es sich um ein mono- (Stoff 14) und ein nicht-hydroxy-substituiertes Grevillin (Stoff 15) handeln. Bei dem sechsten Stoff dieser Farbreaktion (Stoff 13; nur in Kulturextrakten von *Leccinum aurantiacum*), der polarer als alle anderen ist, handelt es sich möglicherweise um Grevillin D (Lit.6).

Insgesamt zeigten die verschiedenen Untersuchungen die gute Trennleistung des neu erarbeiteten DC-Systems.

LITERATUR

- 1 A. Bresinsky, *Bull. Soc. Linn. Lyon*, n° spécial (1974) 3223.
- 2 W. Steglich, H. Besl und A. Prox, *Tetrahedron Lett.*, 48 (1972) 4895.
- 3 Fr. v. Massow und M. Tevini, *Z. Pilzkunde*, 41 (1975) 99.
- 4 A. Bresinsky, H. Besl und W. Steglich, *Phytochemistry*, 13 (1973) 271.
- 5 H. Besl, A. Bresinsky, W. Steglich und K. Zipfel, *Chem. Ber.*, 106 (1973) 3223.
- 6 H. Besl, J. Michler, S. Preuss und W. Steglich, *Z. Naturforsch.*, 29 (1974) 784.