

STRUKTUR DER LENTINSÄURE: 2-( $\gamma$ -GLUTAMYLAMINO)-4,6,8,10,10-PENTAOXO-  
4,6,8,10-TETRATHIAUNDECANSÄURE

G. Höfle

Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Berlin, Straße des 17. Juni 135, D-1000 Berlin 12

R. Gmelin, H.-H. Luxa und M. N'Galumume-Treves

Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin

Sh. I. Hatanaka

Department of Biology, College of General Education, University of Tokyo

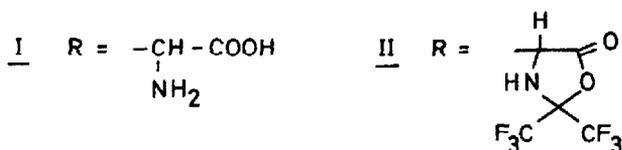
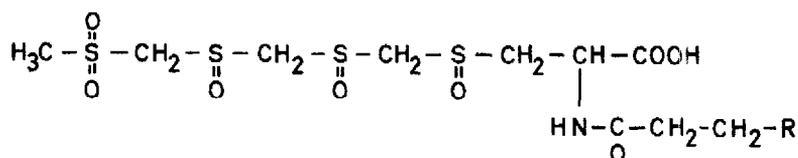
(Received in Germany 28 June 1976; received in UK for publication 16 July 1976)

Im Zuge unserer Arbeiten über die Geruchsbildung in höheren Pilzen<sup>1</sup> untersuchten wir auch die knoblauch- und kohllartig riechenden Fruchtkörper von Micromphale perforans (Hofm. ex Fr.) Sing.<sup>2</sup> und Collybia hariolorum (DC. ex Fr.) Quel.<sup>3</sup> (Basidiomycetae; Tricholomataceae). Nach einer kürzlich für  $\gamma$ -Glutamylmarasmin beschriebenen Isolierungsmethode<sup>1</sup> konnten wir aus beiden Spezies in ca. 1% Ausbeute (Trockengewicht) ein schwefelhaltiges Peptid I mit der Zusammensetzung  $C_{12}H_{22}N_2S_4O_{10}$  isolieren, das von Ninhydrin ziegelrot angefärbt wird und bei der Reduktion mit Raney-Ni in Wasser  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-alanin, bei milder Hydrolyse in 2 N HCl L-Glutaminsäure ergibt. Diese Eigenschaften sowie der Zers. Pkt. von 157°C, das IR-Spektrum (KBr) und das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum<sup>4</sup> im D<sub>2</sub>O deuteten daraufhin, daß es sich bei I um die von Yasumoto et al.<sup>5</sup> aus Lentinus edodes (Berk.) Sing. isolierte Lentinsäure ("lentic acid"), handelt. Lentinsäure stellt den Vorläufer von Lenthionin und verwandten Aromastoffen<sup>6</sup> dieses bekannten japanischen Speisepilzes ("shiitake") dar.

Wie wir fanden sind I, authentische Lentinsäure und eigene Isolate aus Lentinus edodes<sup>7</sup> auch im chromatographischen Verhalten<sup>8</sup> identisch. Nach Untersuchungen von Yasumoto et al.<sup>5</sup> ist Lentinsäure ein Derivat des  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinsulfoxids; über die Struktur des verbleibenden Fragments  $C_4H_9S_3O_4$ , das mit dem Schwefel des Cysteins verknüpft ist, gibt es jedoch keine genauen Vorstellungen, da beim Lösen der Verbindung in D<sub>2</sub>O offensichtlich sechs der in diesem Fragment enthaltenen Protonen rasch gegen Deuterium aus-

getauscht werden ; die übrigen drei tauschen dagegen erst im alkalischen Bereich aus.

Um diese Probleme zu umgehen, nahmen wir das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum<sup>4</sup> von I in  $\text{H}_2\text{O}$  bei pH 7 auf. Es zeigt neben den bekannten Signalen eines  $\gamma$ -Glutamyl-cysteinsulfoxidrestes<sup>9, 1</sup> Signale bei  $\delta = 44.5, 67.7, 68.1$  und  $71.0$  ppm, die aufgrund der Aufspaltungen bei "off-resonance" Entkopplung einer Methylgruppe und drei Methylengruppen zuzuordnen sind. Daraus kann auf eine alternierende Anordnung von drei Methyl- und drei Sulfoxidgruppen geschlossen werden. Das Ende der Kette bildet eine Methylgruppe, deren benachbartes Schwefelatom mit dem noch übrigen Sauerstoff zur Sulfongruppe oxidiert ist. In guter Übereinstimmung damit finden wir die  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR-Signale der Methylgruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 44.5$  und  $\delta_{\text{H}} = 3.17$  ppm<sup>10</sup>.



Versuche, I nach den üblichen Methoden der Peptidchemie zu derivatisieren, um ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum aller Protonen zu erhalten, schlugen wegen der großen Empfindlichkeit der Seitenkette fehl. Erfolg hatten wir schließlich bei der Umsetzung von I mit Hexafluoraceton, bei der die  $\alpha$ -Aminocarbonsäuregruppierung des  $\gamma$ -Glutamylrestes in ein Oxazolidinon-5 II übergeführt wird. In Abwandlung dieses für  $\alpha$ -Aminosäuren beschriebenen Verfahrens<sup>11</sup> setzten wir 1 - 5 mg I direkt in  $\text{DMSO-}d_6$  um und konnten so nach wenigen Minuten Reaktionszeit bei  $30 - 40^\circ$  ohne weitere Reinigung das NMR-Spektrum des Derivats II aufnehmen (Abb. 1, A)<sup>12</sup>.

Es zeigt neben den Signalen für den  $\gamma$ -Glutamylrest,  $\delta = 1.8$  ppm (m, 1 H), 2.0 (m, 1 H), 2.3 (m, 2 H), 4.25 (verbr. q,  $J = \text{ca. } 6$  Hz, 1 H), 6.15 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1) und den Cysteinsulfoxidrest,  $\delta = 3.21$  (dd,  $J = 13; 11$  Hz, 1 H), 3.74 (dd,  $J = 13; 3.5$  Hz, 1 H), 4.51 (ddd,  $J = 11; 7.5; 3.5$  Hz, 1 H), 8.59 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1 H) eine Gruppe von drei voneinander isolierten AB-Systemen bei 5.21; 4.95 ( $J = 14$  Hz), 4.91; 4.71 ( $J = 13.5$  Hz) und 4.83; 4.61 ( $J = 13.5$  Hz) die den diastereotopen Protonen der drei Methylengruppen zu-

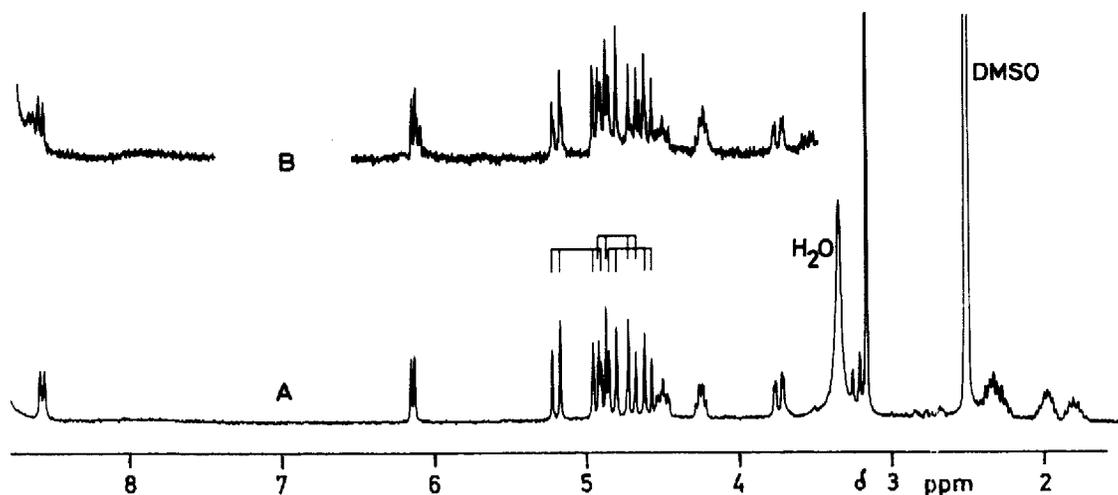


Abb. 1 270 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Oxazolidinone II (2 - 4 mg) in  $\text{DMSO-D}_6$  (0.5 ml).

zuordnen sind. Die deutliche Verbreiterung und Quartettfeinstruktur ( $J < 1$  Hz) der Signale bei  $\delta$  5.21 bzw. 4.95 können durch Entkopplung von den Methylprotonen bei  $\delta$  3.17 beseitigt werden. Diese Signale sind somit der Methylengruppe neben der Sulfonylgruppe zuzuordnen. Weiterhin zeigt II die erwartete Lactonbande im IR-Spektrum  $^{11}$  ( $\text{DMSO-D}_6$ ) bei  $1835\text{ cm}^{-1}$  und im Gegensatz zu I im FD-Massenspektrum  $^{13}$  ein Molekülion für  $(M + 1)^+$  bei  $m/e = 631$  ( $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{F}_6\text{N}_2\text{S}_4\text{O}_{10}$ ). Damit wird die oben für Lentinsäure abgeleitete Struktur bestätigt.

Über die Konfiguration an den drei chiralen Sulfoxidgruppen kann nichts ausgesagt werden, bemerkenswert ist jedoch, daß die aus Micromphale perf. und Collybia har. isolierte Lentinsäure wie das authentische Material, nach dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ein und dieselbe Form enthalten, während die aus Lentinus ed.  $^7$  von uns isolierte Lentinsäure etwa 30% eines Diastereomeren enthält (Abb. 1, B)  $^{14}$ .

Wie japanische Autoren in Lentinus ed.  $^{17}$  finden wir in Micromphale perf. und Collybia har. eine  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (E.C. 2.3.2.2.)  $^{18}$  und eine CS-Lyase (E.C. 4.4.1.1-n), die Lentinsäure in Glutaminsäure, Brenztraubensäure, Ammoniak und, für den charakteristischen Geruch dieser Pilze  $^{2,3}$  verantwortliche Schwefelverbindungen unbekannter Konstitution spalten. In Analogie zur enzymatischen Bildung von Allicin aus Alliin  $^{19}$  dürfte auch hier zunächst eine Sulfensäure entstehen, aus der unter anderem durch Disproportionierung und Hydrolyse Polysulfide und Formaldehyd hervorgehen, die dann zu den von Morita und Kobayashi  $^6$  aus Lentinus ed. isolierten Aromastoffen vom Lenthionintyp reagieren.

Danksagung — Herrn Prof. K. Yasumoto und Herrn Dr. K. Iwami, Universität Kyoto sind wir für die Überlassung einer Probe Lentinstäure sehr zu Dank verpflichtet. Frau A. Schuster und den Herren E. Gerhard und B. Oertel danken wir für die Beschaffung von Pilzmaterial, Herrn Dr. D. Spitzner und Herrn G. Schwinger für die Aufnahme von FD-Massenspektren.

#### Literatur und Anmerkungen

- 1 R. Gmelin, H.-H. Luxa, K. Roth und G. Höfle, *Phytochemistry* im Druck.
- 2 E. Michael und B. Hennig, *Handbuch für Pilzfreunde*, Bd. III, S. 232, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1968; Fundort: Welschnofen, Südtirol, Italien; die Pilze wurden nach dem Sammeln luftgetrocknet.
- 3 *L.c.*<sup>2</sup>, S. 268; Fundorte: Berlin und Albstadt, BRD; Trocknung der Pilze wie bei *l.c.*<sup>2</sup>.
- 4 Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker WH-270 bei 270 MHz, die <sup>13</sup>C-NMR-Spektren ( $\delta_{\text{TMS}}^{\text{extern}} = 0$ ) mit einem CFT-20 von Varian bei 20 MHz aufgenommen.
- 5 K. Yasumoto, K. Iwami und H. Mitsuda, *Agr. Biol. Chem.* 35, 2059 (1971).
- 6 K. Morita und Sh. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.* 15, 988 (1967).
- 7 Getrocknete Marktware, Tokyo, Japan.
- 8 Ionenaustauschchromatographie wie *l.c.*<sup>1</sup>; DC-Alufolien, Kieselgel 60 F 254 Merck, Laufmittel: n-Butanol, i-Propanol, Wasser, Eisessig 8 : 3 : 5 : 2, Rf 0.05; Anfärbung mit Echtröt B: braunviolett, ammoniakalischer AgNO<sub>3</sub> Lösung, 15 Min 120<sup>0</sup>: grauschwarz; Entfärbung mit Jodplatinat- und Jodazidreagens.
- 9  $\delta$  (ppm) (Multiplizität): 176.0 (s); 175.8 (s); 175.3 (s); 55.8 (d); 51.1 (d); 33.0 (t); 27.6 (t); 56.2 (t).
- 10 Nach eigenen Messungen beträgt die <sup>13</sup>C-chem. Versch. der Methylgruppe in Methylphenylsulfonen  $\delta$  44 ppm, die <sup>1</sup>H-chem. Versch. der Methylprotonen im Dimethylsulfon und p-Tosyldimethylsulfon  $\delta$  3.02 bzw. 3.23 ppm: C.J. Pouchert und J.R. Campbell. *The Aldrich Library of NMR-Spectra*, Vol 10.
- 11 F. Weygand, K. Burger und K. Engelhardt, *Chem. Ber.* 99, 1461 (1966).
- 12 Auf gleiche Weise wurden Glutamin, Asparagin,  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-alanin, Glutathion und einige andere  $\alpha$ -Aminosäuren im mg-Maßstab in die Oxazolidinone-5 verwandelt und <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch untersucht. Über weitere Anwendungen dieser schonenden Derivatisierung wird an anderer Stelle berichtet.
- 13 Zur Aufnahme der FD-Massenspektren diente ein 311 A von Varian.
- 14 Dieser Befund soll durch CD-Messungen genauer untersucht werden. Bekannt ist z.B. das Auftreten von  $\gamma$ -L-Glutamyl-(trans-1-propenyl)-L-cysteinsulfoxid in der R- und S-Form in Allium cepa<sup>15</sup> bzw. Santalum album<sup>16</sup>.
- 15 A.I. Virtanen, *Phytochemistry* 4, 207 (1965); A.L. Virtanen, M. Hatanaka und M. Berlin, *Suomen Kemistil.*, B 35, 52 (1962).
- 16 R. Kuttan, N. Gopalan Nair, A.N. Radhakrishnan, T.F. Spande, H.J. Yeh und B. Witkop, *Biochemistry* 13, 4394 (1974).
- 17 K. Iwami, K. Yasumoto, K. Nakamura und H. Mitsuda, *Agr. Biol. Chem.* 39, 1941 und 1947 (1975).
- 18 Nach unseren Befunden weist Collybia har. eine auffallend hohe  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität auf.
- 19 A. Stoll und E. Seebeck, *Sci. Pharm.* 18, 61 (1950).