

Über das Vorkommen von Muscaflavin bei *Hygrocybe* (Agaricales) und seine Dihydroazepin-Struktur^{1,2}

Isolation of Muscaflavin from *Hygrocybe* Species (Agaricales) and Its Dihydroazepine Structure

R. von Ardenne*, H. Döpp**, H. Musso**
und W. Steglich*

Organisch-Chemisches Institut, Technische Universität Berlin* und Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe**

(Z. Naturforsch. **29 c**, 637–639 [1974]; eingegangen am 6. Juni 1974)

Hygrocybe, Dihydroazepines, Muscaflavin

Sporophores of *Hygrocybe* species (Agaricales) contain muscaflavin, a pigment recently isolated from *Amanita muscaria*. Spectroscopic and chemical evidence for its dihydroazepine structure **5a** is presented, indicating a close biogenetic relationship to betalamic acid **6a**. The chemical nature of the water soluble pigments of *Hygrocybe* is discussed.

Die Saftlinge, *Hygrocybe* Kummer, gehören zu den farbenprächtigsten Blätterpilzen. Ihre leuchtend roten und gelben Fruchtkörper findet man im Herbst auf Wiesen, Weiden und Grasplätzen, vor allem im Gebirge. Trotz der auffälligen Färbung wurden sie bisher chemisch kaum untersucht³. Wir berichten nun über erste Einblicke in die chemische Natur der *Hygrocybe*-Farbstoffe.

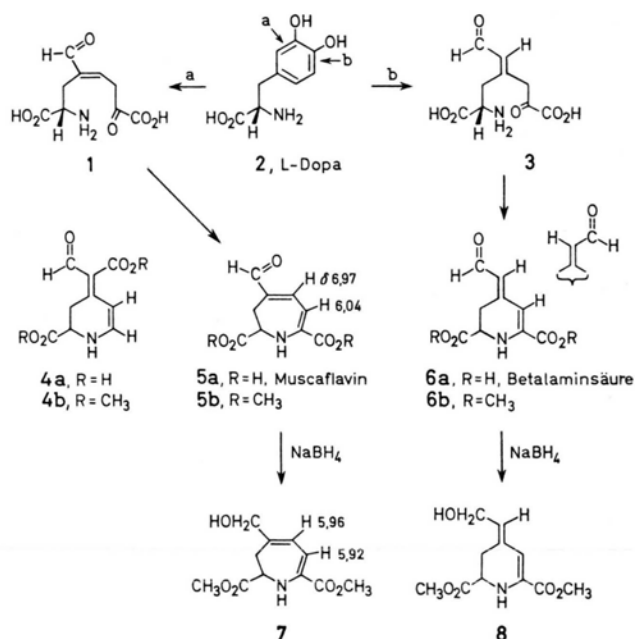
Zur Isolierung der Farbstoffe wurde auf die Beschaffung einheitlicher Arten verzichtet, da die sichere Bestimmung schwierig ist, und sich die verschiedenen Arten in ihren Pigmentmustern nur wenig unterscheiden⁴. Die Pilze wurden getrennt nach gelben und orange-roten Arten in Methanol eingelegt, dem etwas Salzsäure zugesetzt worden war. Man engte die Extrakte im Vakuum ein und schüttelte den wäßrigen Rückstand erschöpfend mit Essigester aus. Dabei ging eine hellgelbe Komponente in die organische Phase, während der Hauptteil der Farbstoffe im Wasser verblieb. Chromatographie der eingedampften Essigester-Extrakte an MN-Polyamid SC 6-Ac (Macherey und Nagel, Düren; Eluent: Aceton) ergab einen gelben Rohfarbstoff, der mit großen Mengen Äpfelsäure verunreinigt war. Ihre Abtrennung gelang durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (Laufmittel: Benzol/Ämeisensäure-äthylester/Ämeisensäure = 10/5/3). Die hellgelbe Hauptzone lie-

ferte nach üblicher Aufarbeitung einen amorphen gelben Rückstand ($\lambda_{\max} = 407 \text{ nm}$ in H_2O ; + HCl: 398 nm; + NaHCO_3 : 415 nm), bezogen auf das Pilztrockengewicht ca. 0,2%.

Der gelbe *Hygrocybe*-Farbstoff zersetzte sich langsam beim Stehen seiner Lösungen an der Luft. Er wurde daher mit methanolischer Salzsäure (12 Stunden, Raumtemperatur) oder ätherischem Diazomethan in den stabileren Dimethylester umgewandelt⁵. Der Diester, durch präparative Dünnschichtchromatographie leicht rein erhältlich, zeigte nach Umkristallisieren aus Wasser einen Schmelzpunkt von 98–99 °C. Er stimmt im Massenspektrum (Tab. I) und den übrigen spektroskopischen Daten sehr gut mit Muscaflavindimethylester **4b** überein, einem Derivat des Fliegenpilz-Farbstoffs Muscaflavin **4a**^{6,7}.

Tab. I. Vergleich der Massenspektren von gelbem „*Hygrocybe*-Dimethylester“ und Muscaflavin-dimethylester⁸.

„ <i>Hygrocybe</i> -Dimethylester“			Muscaflavin-dimethylester ⁶	
<i>m/e</i>	relative Intensität [%]	Zusammensetzung	<i>m/e</i>	relative Intensität [%]
239	55,6	$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_5$	239	44,0
210	6,3	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_4$		
180	100,0	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_3$	180	100,0
148	75,7	$\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_2$	148	77,3
120	46,7	$\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}$	120	56,0



Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Musso, Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe, D-7500 Karlsruhe 1, Postfach 6380 oder an Prof. Dr. W. Steglich, Organisch-Chemisches Institut, Technische Universität Berlin, D-1000 Berlin 12, Straße des 17. Juni 135.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

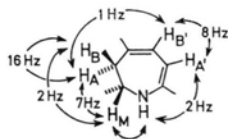
Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Ein direkter Vergleich beider Dimethylester ergab übereinstimmendes Laufverhalten in verschiedenen Chromatographiesystemen, eine Erhöhung des Mischschmelzpunktes („Hygrocyben-Dimethylester“ Schmelzpunkt 98–99 °C, Muscaflavin-Dimethylester Schmelzpunkt 99–102 °C, Mischschmelzpunkt 104–106 °C) und minimale Unterschiede in den IR-Spektren, die wohl auf der verschiedenen optischen Reinheit der beiden Präparate beruhen. Da sich auch die freie Dicarbonsäure chromatographisch und elektrophoretisch nicht von authentischem Muscaflavin unterschied, besteht kein Zweifel daran, daß diese Farbstoffe aus *Hygrocybe* und *Amanita* identisch sind. Damit kann Muscaflavin als Leitpigment gelber und roter Hygrocyben angesehen werden⁹.

Im ¹H-NMR-Spektrum des Muscaflavins (Tab. II) sind neben den bereits beim Dimethylester beobachteten Kopplungen⁶ zwei Fernkopplungen nachzuweisen, die infolge ungenügender Auflösung des Gerätes bisher der Beobachtung entgingen. Danach sind die Spinsysteme ABM und A'B' durch eine 1-Hz-Kopplung der Protonen H_A und H_{B'} miteinander verbunden. Da außerdem sowohl H_M als auch H_{A'} mit dem NH-Proton koppeln, muß ein cyclisches System vorliegen, für das auf Grund der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten nur die Siebenringformel **5a** in Frage kommt. Die Allylkopplung ist mit der früher für Muscaflavin vorgeschlagenen Konstitution **4a** nur schwer vereinbar.



Tab. II. ¹H-NMR-Spektrum von Muscaflavin aus *Hygrocyben*¹⁰.

Aufspaltung	Kopplungskonstanten (a)	Proton
2,64 ddd	$J_{AB} = 16 \text{ Hz}$ $J_{AM} = 7 \text{ Hz}$ $J_{AB'} = 1 \text{ Hz}$	H _A
3,38 dd	$J_{AB} = 16 \text{ Hz}$ $J_{BM} = 2 \text{ Hz}$	H _B
4,03 breit (nach Zusatz von D ₂ O dd)	M-Teil des ABM-Systems, gekoppelt mit NH	H _M
6,04 dd (nach Zusatz von D ₂ O d)	$J_{A'B'} = 8 \text{ Hz}$ $J_{A'NH} = 2 \text{ Hz}$	H _{A'}
6,97 dd	$J_{A'B'} = 8 \text{ Hz}$ $J_{AB'} = 1 \text{ Hz}$	H _{B'}
9,32 s		HCHO

(a) Alle Kopplungen wurden durch Entkopplungsexperimente bewiesen.

Das Fehlen der exocyclischen Doppelbindung erklärt, warum in den NMR-Spektren von **5a** und **5b** alle Signale nur einfach auftreten. Läge ein Sechsring **4** vor, so sollten wie bei Betalaminsäure **6a** und ihrem Dimethylester **6b** infolge cis-trans-Isomerie zumindest einige Signale doppelt zu beobachten sein⁶. Weitere Argumente für die Siebenringformel liefern die spektroskopischen Daten der Alkohole **7** [ν_{OH} 3630 (Schulter), 3610 cm⁻¹; M⁺: m/e 241] und **8** [ν_{OH} 3615 cm⁻¹; M⁺: m/e 241], die aus **5b** und **6b** durch Reduktion mit Natriumborhydrid erhalten wurden. Gegenüber den Ausgangsverbindungen zeigen die Alkohole **7** und **8** eine starke hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima von $\lambda_{max} = 394 \text{ nm}$ (in CH₃OH) nach 336 bzw. 323 nm. Diese ist verständlich, da bei der Reduktion der Merocyanin-Chromophor aufgehoben wird¹¹. Im Falle von Formel **4b** sollte die Verschiebung geringer sein, da auch nach Reduktion der Aldehydgruppe ein Merocyanin-System erhalten bleibt. Im Dimethylester **5b** läßt sich der große Unterschied in den chemischen Verschiebungen der Olefinprotonen (δ 6,10, 6,94; $\Delta\delta$ 0,84; in CDCl₃) auf den Anisotropieeffekt der Aldehydgruppe zurückführen. Fällt dieser weg, wie beim Alkohol **7**, so rücken die Signale dicht zusammen (δ 5,92, 5,96; $\Delta\delta$ 0,04). Ein solcher Effekt ist mit der Sechsringformel **4b** nicht zu erklären, da hier Aldehyd- und Esterfunktion die Olefinprotonen gleichsinnig beeinflussen.

Die Dihydroazepin-Formel **5a** läßt sich biogenetisch zwanglos vom L-Dopa **2** ableiten. Oxidation von **2** unter Spaltung der Doppelbindung a führt zum Aldehyd **1**, der sich zu **5a** cyclisiert, während Spaltung der Doppelbindung b über den Aldehyd **3** Betalaminsäure **6a** ergibt, ein Weg, der durch Verfütterungsexperimente mit markiertem Dopa bei Centrospermen von Dreiding, Mabry, Wyler und Mitarbeitern¹² gesichert ist. Das Biogeneschema wird durch das gemeinsame Vorkommen von Muscaflavin und Betalaminsäure-Derivaten bei *Amanita muscaria*^{6,7} wahrscheinlich gemacht.

Zur Trennung der wasserlöslichen Hygrocyben-Farbstoffe benutzten wir die am Fliegenpilz entwickelte Methodik^{6,13}. Der frische, wäßrig-methanolische Pilzextrakt wurde am Rotationsverdampfer vorsichtig zur Trockene gebracht, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und über Sephadex DEAE A-25 mit einem Kochsalzgradienten (0,3–1,0 M) aufgetrennt. Sowohl gelbe als auch orangefarbene Hygrocyben lieferten drei gelbe Fraktionen ($\lambda_{max} = 465 \text{ nm}$), gefolgt von Muscaflavin ($\lambda_{max} = 420 \text{ nm}$) (Abb. 1). Bei der anschließenden Entsalzung an einer Sephadex-G-10-Säule ergab Fraktion I ein einheitliches Bild, während die Frak-

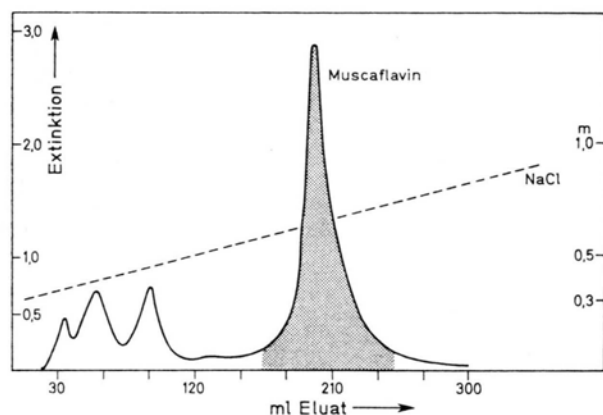


Abb. 1. Elutionsdiagramm des Farbstoffextrakts von 16 g orangefarbenen Hygrocyben an DEAE-Sephadex A-25 (Säule $0,8 \times 30$ cm), linearer Kochsalzgradient — — —, Extinktion (Schichtdicke 0,5 cm) bei 465 nm \square , bei 420 nm \blacksquare .

tionen II und III in 2 bzw. 3–4 Komponenten aufspalteten. Die Behandlung der einzelnen Fraktionen mit 0,6 N NH_4OH (20 min, Raumtemperatur)¹⁴ bis zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 420 nm lieferte nach Veresterung mit Diazomethan Muscaflavin-dimethylester. Betalaminsäuredimethylester konnte nicht nachgewiesen werden.

Damit unterscheiden sich die wasserlöslichen Farbstoffe der Hygrocyben charakteristisch von den Musca-aurinen des Fliegenpilzes, die alle Betalaminsäure enthalten⁷. Ob das Muscaflavin auf ähnliche Weise mit Aminosäuren verbunden ist wie Betalaminsäure in den Betalainen, soll durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Förderung dieser Arbeit. Herrn Dr. G. Höfle danken wir herzlich für die Durchführung der Entkoppelungsexperimente, Herrn G. Bieshalski für die Aufnahme der Massenspektren und Fr. S. Fischer für die geschickte experimentelle Mitarbeit.

¹ 21. Mitteilung über Pilzpigmente; 20. Mitteilung: W. Steglich, M. Klaar u. W. Furtner, *Phytochemistry*, im Druck.

² 5. Mitteilung über Fliegenpilzfarbstoffe; 4. Mitteilung: H. Döpp u. H. Musso, *Z. Naturforsch.* **29 c**, 640 [1974].

³ Einen ersten Versuch zur Charakterisierung der Hygrocyben-Farbstoffe führte E. Bachmann durch: Programm des Gymnasiums in Plauen 1886.

⁴ Die Pilze wurden im September 1973 im Ötztal und Pitztal in Tirol gesammelt.

⁵ Der Verlauf der Veresterung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel-Fertigplatten Merck, Laufmittel wie oben); gelber Farbstoff: $R_F=0,26$; Dimethylester: $R_F=0,45$.

⁶ H. Döpp u. H. Musso, *Naturwissenschaften* **60**, 477 [1973].

⁷ H. Döpp u. H. Musso, *Chem. Ber.* **106**, 3473 [1973].

⁸ Aufgenommen mit einem Varian-MAT 711 über ein Direktreinlaßsystem bei 70 eV. Die Elementarzusammensetzung der Ionen wurde durch automatische Datenverarbeitung mit einem Spectrosystem 100 von Varian-MAT ermittelt.

⁹ Systematische Untersuchungen von H. Besl und A. Bresinsky, Regensburg.

¹⁰ Aufgenommen mit einem Varian XL-100 in $[\text{D}_6]\text{Aceton}$.

¹¹ Zur unterschiedlichen Lage der UV-Maxima in beiden Systemen vgl. die Spektren von 1,3-Cycloheptadien, $\lambda_{\text{max}}=248$ nm (ϵ 7500) in Isooctan [E. Pesch u. S. L. Friess, *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 5756 [1950]] und 3-Methylen-cyclohexen, $\lambda_{\text{max}}=230$ nm (ϵ 8500) in Äthanol [H. Booker, L. K. Evans u. A. E. Gillam, *J. Chem. Soc.* **1940**, 1453].

¹² H. E. Miller, H. Rösler, A. Wohlpart, H. Wyler, M. E. Wilcox, H. Frohofer, T. J. Mabry u. A. S. Dreiding, *Helv. Chim. Acta* **51**, 1470 [1968].

¹³ H. Döpp u. H. Musso, *Z. Naturforsch.* **29 c**, 640 [1964].

¹⁴ H. Döpp u. H. Musso, unveröffentlicht.