

## Eine chromatographische Analysenmethode für Betalainfarbstoffe in Pilzen und höheren Pflanzen \*

Chromatographic Analysis of Betalaine Pigments in Toadstools and Higher Plants

H. Döpp und H. Musso

Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe

(Z. Naturforsch. **29 c**, 640–642 [1974]; eingegangen am 6. Juni 1974)

*Amanita*, Betalaines, Chromatography

A simple chromatographic procedure for the separation of betalaine pigments is described. The betalaines of *Amanita muscaria*, *A. caesarea* and *A. flavoconia* are compared and the composition of several musca-aurins is given.

Kürzlich wurden die Farbstoffe aus der roten Huthaut des Fliegenpilzes erstmals rein isoliert<sup>1</sup>. Es handelt sich um Betalaine – eine Farbstoffklasse, die bisher ausschließlich bei den Centrospermen gefunden wurde<sup>2</sup>. Im Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) kommen das gelbe Muscavflavin ( $\lambda_{\text{max}}$  420 nm), das rotviolette Muscapurpurin ( $\lambda_{\text{max}}$  475 nm) und mehrere orangegelbe Musca-aurine ( $\lambda_{\text{max}}$  475 nm) vor. In dieser Mitteilung wird ein analytisches Trennverfahren beschrieben, das es gestattet, rasch ein Übersichtsdiagramm der Farbstoffe eines einzelnen Pilzes oder anderen betalainhaltigen Pflanzenmaterials zu erhalten.

Die Farbstoffe werden mit Methanol bei Raumtemperatur extrahiert, nach dem Einengen des Extraktes im Vakuum bei maximal 25 °C an DEAE-Sephadex A-25 (Säule 0,8 × 27 cm) mit einem linearen Kochsalzgradienten (0,3 → 1,0 M NaCl, 400 ml) aufgetrennt und dabei die in den Abbns. 1–7 gezeigten Elutionsdiagramme aufgenommen (Extinktion bei 475, 420 und 540 nm, bezogen auf den Farbstoffextrakt aus je 3 g Pilzhuthaut oder Pflanzenmaterial).

Die Farbe der Fliegenpilze kann von Tiefrot bis Hellgelb variieren. In Europa sind die roten Fliegenpilze am häufigsten, in Amerika überwiegen die blasser orangegefärbten<sup>3</sup>.

Abb. 1 zeigt das Elutionsdiagramm für einen kräftig rotgefärbten Pilz, Abb. 2 ist typisch für einen gelben Fliegenpilz. Der gelbe Pilz enthält etwa nur ein Fünftel der Farbstoffmenge des roten, außerdem sind die gelben Komponenten relativ stärker vertreten. Bei Pilzen gleicher Farbe variieren die relativen Mengenverhältnisse der Farbstoffkomponenten nur geringfügig und sind praktisch unabhängig vom Baumbestand (Fichten, Birken,

Eichen) oder der Herkunft (Schwarzwald, Bayerischer Wald, Pfälzer Wald, Spessart-Weserbergland, Harz, Südschweden, Umgebung von Bremen, Bückeburg, Karlsruhe und Marburg). Die gelbe Schicht unter der Huthaut hat dieselbe Farbstoffzusammensetzung wie die Haut.

Im Elutionsdiagramm des amerikanischen Fliegenpilzes<sup>4</sup> (Abb. 3) ist Musca-aurin I relativ schwach und Musca-aurin III wesentlich intensiver vertreten. Der als eßbar geschätzte Kaiserling (*Amanita caesarea*)<sup>5</sup> (Abb. 4) enthält deutlich weniger Komponenten als der Fliegenpilz. Musca-aurin I mit der halluzinogenen Aminosäure Ibotensäure<sup>6</sup> ist nicht vertreten. Der in Amerika und Canada vorkommende gelbe *Amanita flavoconia*<sup>7</sup> (Abb. 5) zeigt nur zwei orangegelbe Hauptkomponenten. Zum Vergleich sind die Elutionsdiagramme der in ihrer Farbstoffzusammensetzung bekannten Centrospermen Rote Bete (*Beta vulgaris*)<sup>8</sup> (Abb. 6) und der gelben Wunderblume (*Mirabilis jalapa*)<sup>9, 10</sup> (Abb. 7) aufgeführt.

Zur weiteren Identifizierung der einzelnen Farbstoffkomponenten ist es notwendig, die chromatographisch rein abgetrennten Zonen durch Entsalzen und Gefriertrocknen zu isolieren und hydrolytisch zu spalten. Dabei erhält man aus Muscapurpurin und den Musca-aurinen Betalaminsäure<sup>11</sup> und eine Aminosäure. Die Betalaminsäure wird als Methylester (DC, IR, UV, MS) identifiziert, die Aminosäuren werden mit Papierchromatographie und Elektrophorese und in Form ihrer trifluoracetylierten Methylester mit Hilfe der GC-MS-Kombination nachgewiesen<sup>12</sup>.

Bisher konnte so die Zusammensetzung folgender Farbstoffkomponenten aus dem Fliegenpilz bestimmt werden:

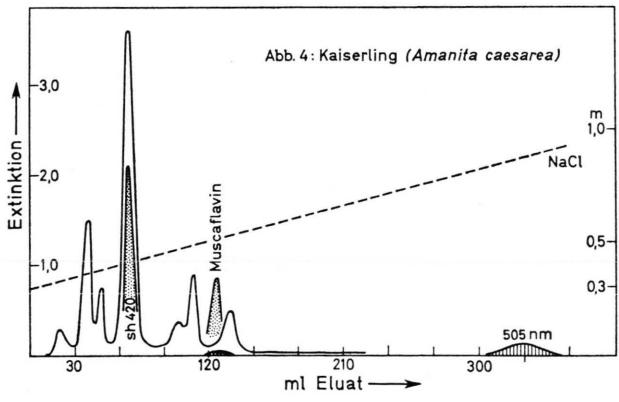
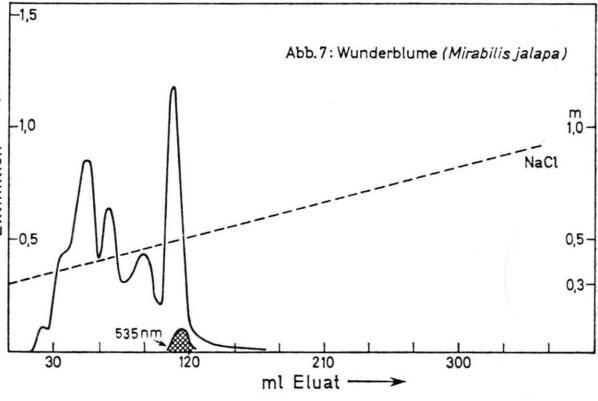
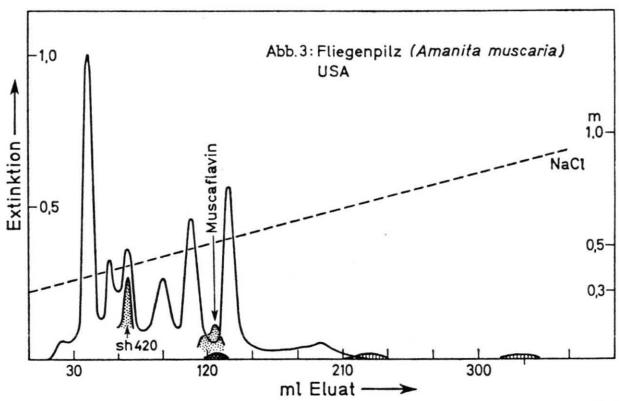
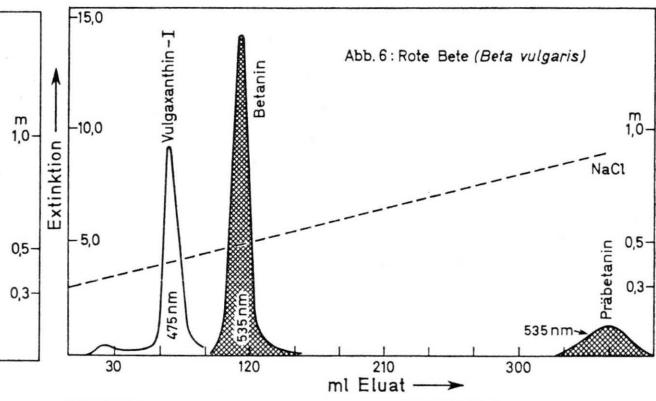
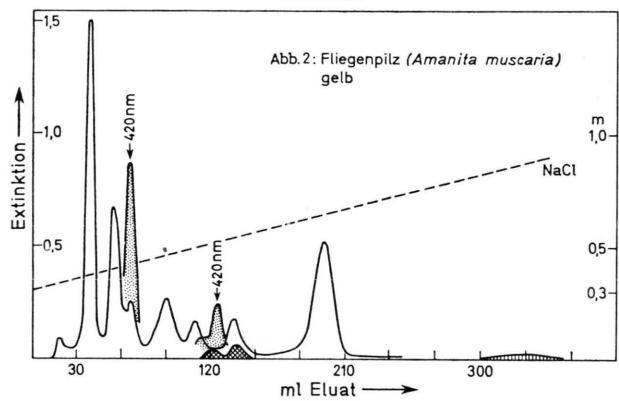
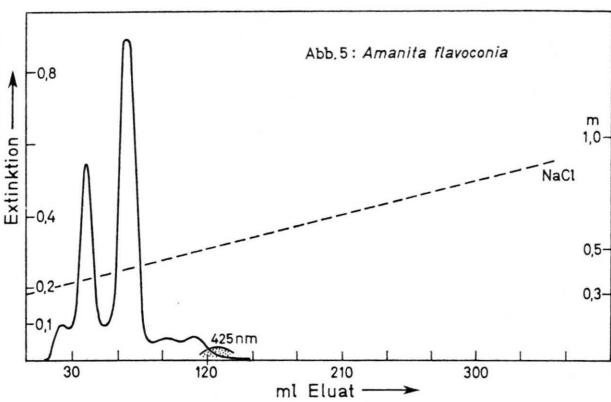
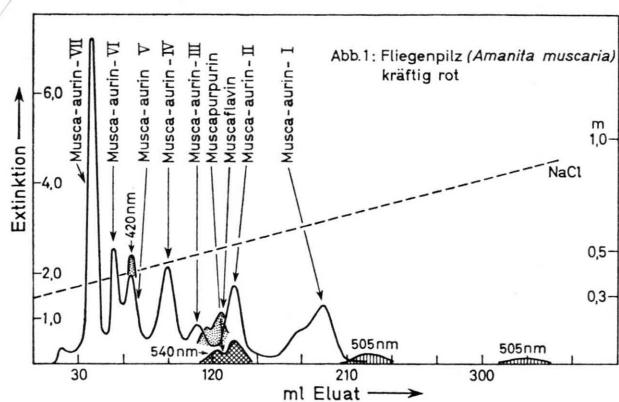
Musca-aurin I	Betalaminsäure +	Ibotensäure <sup>6</sup>
Musca-aurin II	Betalaminsäure +	unbekannte Aminosäure
Musca-aurin III }	Betalaminsäure +	säure Aminosäuren: Glu, Asp, $\alpha$ -Amino-adipinsäure
Musca-aurin IV }	Betalaminsäure +	neutrale Aminosäuren: Glu.NH <sub>2</sub> , (Leu, Val, Asp.NH <sub>2</sub> , Pro)
Musca-aurin V }	Betalaminsäure +	
Musca-aurin VI }	Betalaminsäure +	
Musca-aurin VII	Betalaminsäure +	Histidin

Die Elektrophorese der Farbstoffkomponenten Musca-aurin III–VI zeigt, daß es sich um Farbstoffgemische handelt. Partialsynthetische Farbstoffe mit den gefundenen Aminosäuren stimmen in der Elektrophorese und auf der DEAE-Säule mit den Farbstoffen aus dem Fliegenpilz überein.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Musso, Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe, D-7500 Karlsruhe 1, Postfach 6380.

\* 4. Mitteilung über Fliegenpilzfarbstoffe; 3. Mitteilung siehe l. c. l.





Abbn. 1-7. Elutionsdiagramme der Farbstoffextrakte von je 3 g Pilzhuthaut oder Pflanzenmaterial an DEAE-Sephadex A-25 (Säule 0,8 × 27 cm, linearer Kochsalzgradient ——, Extinktion (Schichtdicke 0,5 cm) bei 475 nm □, bei 420 nm △, bei 540 bzw. 535 nm ▲, bei 505 nm ▽).

Wir danken Fräulein S. Fischer für die geschickte experimentelle Mitarbeit und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Unterstützung.

- <sup>1</sup> H. Döpp u. H. Musso, Chem. Ber. **106**, 3473 [1973].  
<sup>2</sup> T. J. Mabry, Chemistry of the Alkaloids, S. W. Pelletier, ed., p. 367, van Norstrand Reinhold Comp., New York 1970; K.-H. Köhler, Pharmazie **28**, 18 [1973].  
<sup>3</sup> R. Heim, Les Champignons toxiques et hallucinogènes, N. Boubée et Cie, Paris 1963.  
<sup>4</sup> gesammelt von D. Döpp, 29. 7. 1973 bei Copper Harbor, Michigan, USA.  
<sup>5</sup> D. Knoch, Emmendingen 24. 9. 1970.  
<sup>6</sup> C. H. Eugster, Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe **27**, 261 [1969].  
<sup>7</sup> gesammelt von D. Döpp 22. 7. 1973 bei Sackville, N. B., Canada. Wir danken Prof. Harries für die Auffindung und Bestimmung der Pilze.
- <sup>8</sup> M. Piattelli, L. Minale u. G. Prota, Phytochemistry **4**, 121 [1965].  
<sup>9</sup> M. Piattelli, L. Minale u. R. A. Nicolaus, Phytochemistry **4**, 817 [1965].  
<sup>10</sup> aus dem Botanischen Garten der Universitäts Karlsruhe.  
<sup>11</sup> H. Wyler, M. E. Wilcox u. A. S. Dreiding, Helv. Chim. Acta **48**, 1922 [1965]; L. Kimler, R. A. Larson, L. Messenger, J. B. Moore u. T. J. Mabry, Chem. Commun. **1971**, 1329; H. Döpp u. H. Musso, Naturwissenschaften **60**, 477 [1973].  
<sup>12</sup> A. Darbre u. A. Islam, Biochem. J. **106**, 923 [1968]. Wir danken D. U.-I. Záhorszky für die Durchführung der GC-MS-Kombination.