

Pistillarin, ein charakteristischer Inhaltsstoff der Herkuleskeule (*Clavariadelphus pistillaris*) und einiger *Ramaria*-Arten (Basidiomycetes)

Pistillarin, a Characteristic Metabolite of *Clavariadelphus pistillaris* and Several *Ramaria* Species (Basidiomycetes)

Wolfgang Steglich, Bert Steffan, Klaus Stroech und Maria Wolf

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, Gerhard-Domagk-Straße 1, D-5300 Bonn 1

Z. Naturforsch. 39c, 10–12 (1984); received November 8, 1983

Clavariadelphus pistillaris, *Ramaria* sp., Basidiomycetes, Bitter Substance, Spermidine Derivative, Chemotaxonomy

From *Clavariadelphus pistillaris* and several *Ramaria* species a bitter substance, pistillarin, has been isolated which is responsible for the green colour reaction of the fruit-bodies with FeCl₃. Its structure has been determined as N¹,N⁸-bis(3,4-dihydroxybenzoyl)spermidine (**1**).

Einleitung

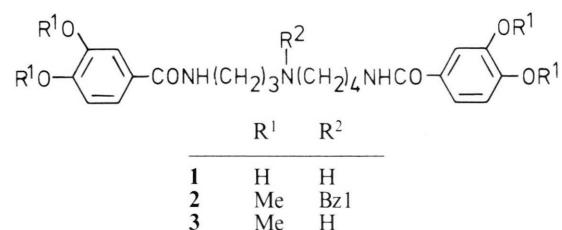
Die Fruchtkörper der Herkuleskeule, *Clavariadelphus pistillaris* (Fr.) Donk, enthalten einen Bitterstoff, der für die grüne Farbreaktion des Pilzes mit Eisen(III)chlorid verantwortlich ist. Die von uns Pistillarin genannte Verbindung gibt eine positive Dragendorff-Reaktion und verfärbt sich mit Laugen oder einer wässrigen Lösung von K₃[Fe(CN)₆]/NaHCO₃ braun.

Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese von Pistillarin

Zur Isolierung des Bitterstoffs wird der Acetonextrakt der gefriergetrockneten Fruchtkörper nacheinander an Sephadex-LH 20 und Bio-Gel P-2 chromatographiert, wobei neben 1,4% Mannit 1,7% Pistillarin erhalten werden. Die Verbindung ist ein wasserlösliches, zähes Harz, das im UV-Spektrum (Wasser) Maxima bei 207, 255 und 288 nm aufweist.

Im Elektronenstoßmassenspektrum ist nur ein sehr schwaches Molekülion bei *m/z* 417 zu erkennen, das der Zusammensetzung C₂₁H₂₇N₃O₆ entspricht. Dagegen zeigt das FD-Massenspektrum ein intensives (M+1)-Ion bei *m/z* 418. Nach dem ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) enthält Pistillarin zwei 3,4-Dihydroxybenzoylreste. Signale im Aliphatenbereich sind aufgrund ihrer Lage und dem

Ergebnis von Entkopplungsexperimenten einer Spermidin-Einheit zuzuordnen. Aus den chemischen Verschiebungen der den Aminogruppen benachbarten Methylenprotonen folgt, daß die beiden Acylreste an den terminalen Aminogruppen sitzen, womit sich für Pistillarin die Konstitution eines N¹,N⁸-Bis(3,4-dihydroxybenzoyl)spermidins (**1**) ergibt. In Übereinstimmung damit liefert die Hydrolyse mit wässriger Salzsäure 3,4-Dihydroxybenzoësäure und Spermidin.



Die Konstitution **1** wird durch eine Synthese bewiesen, die von N⁴-Benzylspermidin [1] und Veratrumsäurechlorid ausgeht. Das daraus erhältliche Bisacylderivat **2** liefert bei der Hydrogenolyse das Amin **3**, das nach Entfernung der Methoxygruppen mit Bortribromid Pistillarin-hydrobromid (**1** × HBr) ergibt. Die Verbindung erwies sich als identisch mit dem aus dem Naturstoff hergestellten Salz.

Diskussion

Pistillarin ist das erste Spermidinderivat aus Basidiomyceten. Es ist strukturell nahe verwandt mit

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Steglich.

0341-0382/84/0100-0010 \$ 01.30/0

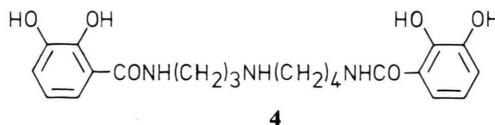


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

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 digitized 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.



Siderochrom II (**4**) aus *Paracoccus denitrificans*, das im Stoffwechsel dieses Mikroorganismus eine Rolle als Eisenkomplexbildner spielt [2].

Die Grünverfärbung der Fruchtkörper mit Fe(III)chlorid ist auch für Keulenpilze der Gattungen *Ramaria* und *Gomphus* charakteristisch [3]. Wie wir fanden, beruht die Farbreaktion bei *Ramaria* ebenfalls auf dem Vorhandensein von Pistillarin, das aus *R. formosa* (Pers. per Fr.) Quélet, *R. flava* (Schaeff. per Fr.) Quélet und *R. mairei* Donk isoliert und spektroskopisch identifiziert werden konnte. Die Verbindung ist besonders in der Außenschicht und in den Spitzen der Fruchtkörper konzentriert und läßt sich nur schwer vollständig extrahieren.

Das Vorkommen von Pistillarin (**1**) in *Clavariadelphus* und *Ramaria* unterstreicht die nahe Verwandtschaft der beiden Gattungen. Inwieweit **1** für die Chemotaxonomie dieses Formenkreises [4] von allgemeinerem Wert ist, muß noch überprüft werden.

Experimenteller Teil

UV-Spektrum: Beckman Modell 25. – IR-Spektren: Pye Unicam SP 1100 (Intensitätsangaben in Klammern: st = stark, m = mittel, w = schwach). – ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren: Bruker WM 400 und Varian EM 360 (δ -Werte). Zur DC wurden Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ der Fa. Merck verwendet (Laufmittel: *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 4:1:1, Vol.). Säulenchromatographie: Sephadex LH 20 (Fa. Pharmacia), Bio-Gel P-2 (100–200 mesh, Fa. Bio-Rad Laboratories). *Clavariadelphus pistillaris* und *Ramaria formosa* wurden im Oktober 1980/81 bei Karlstadt/Main gesammelt, *R. flava* bei Nasse-reith/Tirol und *R. mairei* bei Wanfried/Werra.

Aufarbeitung der Pilze

61,5 g gefriergetrocknete Fruchtkörper von *C. pistillaris* wurden zerkleinert und mit insgesamt 2 l Aceton extrahiert. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand mit 400 ml Petrolether digeriert und

i. Vak. getrocknet. Man nahm den Rückstand (5,3 g) in Methanol auf und chromatographierte an Sephadex LH 20. Mit Methanol wurden zunächst 0,25 g Mannit eluiert, gefolgt von 1,75 g eines Gemisches von Mannit und **1**. Rechromatographie der Mischfraktion an Bio-Gel P-2 ergab mit Wasser als Eluent zunächst eine Auftrennung in 0,59 g Mannit und 0,69 g **1**. Anschließend wurde mit Wasser, das auf 100 ml 1 Tropfen Eisessig enthielt, noch 0,35 g **1** erhalten. – Gesamtausbeute: 1,04 g (1,7%).

Auf analoge Weise wurde **1** auch aus tiefgefrorenen oder in Methanol unter Zusatz von etwas Ascorbinsäure eingelegten Fruchtkörpern von *Ramaria formosa*, *R. flava* und *R. mairei* isoliert. Die Ausbeute an **1** betrug bei *R. mairei* 0,15% (bezogen auf Trockengewicht).

1: farbloser zäher Schaum; R_F = 0,39 (Fleck färbt sich beim Liegen ockerfarben; wäßriges $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$: braun; $FeCl_3$: dunkelgrün; Dragendorff: orangerot). Eine Lösung von Pistillarin in 2 N Ammoniak färbt sich allmählich braun. – UV (H_2O): λ_{max} (log ϵ): 207 (4,70), 255 (4,23), 288 (3,95). – IR (KBr): 3600–2400 (st, br), 1660–1560 (st, br), 1520 (st), 1450 (m), 1300 (st), 1260 (st), 1120 (m), 880 (w), 825 (w), 785 (w), 760 cm^{-1} (m). – ¹H-NMR (400 MHz, δH_2O = 4,60): δ = 1,48, 1,54, 1,78 (jeweils *m*, 3×2 H); 2,88 („*t*“, J = 7,4 Hz, 4 H); 3,17 (*t*, J = 6,8 Hz, 2 H); 3,25 (*t*, J = 6,4 Hz, 2 H); 6,71 (*d*, J = 8 Hz, 2 H); 7,00 (*dd*, J = 8 + 2 Hz, 2 H); 7,04 (*d*, J = 2 Hz, 2 H). – ¹³C-NMR (D_2O): δ = 24,1 (T, J = 125,5 Hz), 26,8 (T, 125 Hz, $2 \times CH_2$), 37,5 (T, 141,5), 40,0 (T, 141,8 Hz), 46,0 (T, 142 Hz), 48,3 (T, 142,5 Hz), 116,0 (*Dd*, 159 + 7 Hz, $2 \times CH$), 116,8 (s, $2 \times C$), 121,4, 121,5 (*Dd*, 162 + 7,3 Hz), 126,5, 127,0 (*d*, 9 Hz), 145,2 (*m*, $2 \times C$), 149,2, 149,4 (m), 171,0, 171,4 (*t*, 4,2 Hz). – MS: m/z 417,1898 (M^+ , ber. für $C_{21}H_{27}N_3O_6$ 417,1900, 0,2%), 345 ($C_{18}H_{23}N_3O_4$, 1), 344 ($C_{18}H_{22}N_3O_4$, 1), 307 ($C_{15}H_{21}N_3O_4$, 7), 263 ($C_{14}H_{21}N_3O_2$, 8), 192 ($C_{10}H_{12}N_2O_2$, 35,5), 191 ($C_{10}H_{11}N_2O_2$, 56), 166 ($C_8H_8NO_3$, 13), 153 ($C_7H_7NO_3$, 13), 137 ($C_7H_5O_3$, 100), 136 ($C_7H_6NO_2$, 25,5), 110 ($C_6H_6O_2$, 28), 109 ($C_6H_5O_2$, 19), 84 ($C_5H_{10}N$, 32), 81 (C_5H_5O , 22), 70 (C_4H_8N , 34,5). – FD-MS: m/z 418 ($M + 1$, 100%).

Hydrolyse von Pistillarin (**1**)

80 mg **1** wurden in 3 ml konz. Salzsäure 30 h in einer Glasampulle auf 110 °C erhitzt. Man rotierte ein und chromatographierte den Rückstand an Bio-

Gel P-2. Mit Wasser wurden 18 mg Spermidinhydrochlorid und anschließend mit Wasser und einem Tropfen Eisessig 23 mg 3,4-Dihydroxybenzoësäure eluiert. Die Verbindungen waren identisch mit authentischen Vergleichsproben (DC, IR, ¹H-NMR).

N⁴-Benzyl-N¹,N⁸-bis(3,4-dimethoxybenzoyl)spermidin (2)

1,8 g (7,6 mmol) N⁴-Benzylspermidin [1] wurden in 200 ml Dichlormethan mit 2 g (20 mmol) Triethylamin versetzt. Dann gab man unter Argon als Schutzgas bei 0 °C 4 g (20 mmol) Veratrumsäurechlorid in 50 ml Dichlormethan innerhalb von 30 min zu, ließ auf 25 °C erwärmen und rührte noch 18 h. Die Lösung wurde anschließend mehrmals mit verdünnter Natronlauge gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und einrotiert. Nach chromatographischer Reinigung (Kieselgelsäule, Eluent CH₂Cl₂/MeOH=9:1) Ausbeute 3,3 g (78%). Öl, IR (CHCl₃): 3050 (m), 1660 (st), 1515 (st), 1275 (st), 1033 cm⁻¹ (m). – ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,38 – 1,98 (m, 6 H); 2,26 – 2,68 (m, 4H); 3,15 – 3,80 (m, 6H); 3,81 (s, 12H); 6,55 – 7,80 (m, 13H). – MS: m/z 564,3068 (M + 1, ber. für C₃₂H₄₂N₃O₆ 564,3074).

N¹,N⁸-Bis(3,4-dimethoxybenzoyl)spermidin (3)

3,3 g (5,9 mol) **2** wurden in 23 ml Eisessig mit zwei Spatelspitzen Pd-C (10%) versetzt und unter Wasserstoff 15 h gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde eingedampft, der Rückstand in absolutem Methanol aufgenommen und bis zur deutlich basischen Reaktion mit Natriummethylat versetzt. Nach 2 h Röhren wurde einrotiert, der Rückstand in Dichlormethan gelöst und zweimal mit je 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Eindampfen der über MgSO₄ getrockneten organischen Phase im Vakuum ergab 1,9 g (68%) eines schaumigen, semikristallinen Produktes. IR (KBr): 3340 (st), 2960 (m), 1640 (st), 1520 (st), 1280 (st), 1240 (st), 1030 cm⁻¹ (st). – ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,43 – 1,96 (m, 7 H); 2,45 – 2,91 (m, 4 H); 3,22 – 3,66 (m, 4 H); 3,81 (s, 12H); 6,60 – 7,54 (m, 8 H). – MS: m/z 473, 2477 (M⁺, ber. für C₂₅H₃₅N₃O₆ 473, 2516).

mal mit je 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Eindampfen der über MgSO₄ getrockneten organischen Phase im Vakuum ergab 1,9 g (68%) eines schaumigen, semikristallinen Produktes. IR (KBr): 3340 (st), 2960 (m), 1640 (st), 1520 (st), 1280 (st), 1240 (st), 1030 cm⁻¹ (st). – ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,43 – 1,96 (m, 7 H); 2,45 – 2,91 (m, 4 H); 3,22 – 3,66 (m, 4 H); 3,81 (s, 12H); 6,60 – 7,54 (m, 8 H). – MS: m/z 473, 2477 (M⁺, ber. für C₂₅H₃₅N₃O₆ 473, 2516).

N¹,N⁸-Bis(3,4-dihydroxybenzoyl)spermidin-hydrobromid (Pistillarin-hydrobromid, 1 × HBr)

Zu 1,9 g (4 mmol) **3** in 75 ml trockenem Dichlormethan wurden bei 0 °C langsam 12,3 g (49,1 mmol) Bortribromid in 75 ml Dichlormethan getropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur rührte man noch 15 h unter Argon, versetzte bei 0 °C vorsichtig mit 75 ml Wasser und rührte noch 2 h. Dann trennte man die wässrige Phase ab, dampfte sie ein und nahm sie zur Abtrennung der Borsäure mehrmals mit Methanol auf, wonach jedesmal einrotiert wurde. Ausbeute 1,7 g (85%), semikristallines, farbloses Harz, das nach DC, Farbreaktionen, IR- und ¹H-NMR-Spektren mit einer aus Pistillarin und HBr erhaltenen Probe identisch war.

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung dieser Arbeit und die Gewährung eines Bruker WM 400 NMR-Spektrometers. Herrn Prof. Dr. H. Budzikiewicz, Köln, danken wir für die Aufnahme des FD-Massenpektrums, Herrn B. Oertel, Bonn, für Hilfe beim Bestimmen der Pilze.

- [1] R. J. Bergeron, P. S. Burton, K. A. McGovern u. E. J. St. Onge, *J. Med. Chem.* **23**, 1130 (1980); R. J. Bergeron, K. A. McGovern, M. A. Channing u. P. S. Burton, *J. Org. Chem.* **45**, 1589 (1980).
- [2] G. H. Tait, *Biochem. J.* **146**, 191 (1975).
- [3] M. A. Donk, *Persoonia* **3**, Part 2, 199 (1964).
- [4] R. H. Petersen, in "The Fungi: An Advanced Treatise", Vol. IVb, 351 – 368, Editors: G. C. Ainsworth, F. K. Sparrow, A. S. Sussman, Academic Press, New York & London 1973.