

Neue Pulvinsäurederivate aus *Pulveroboletus*-Arten (Boletales) [1]

New Pulvinic Acid Derivatives from *Pulveroboletus* Species (Boletales) [1]

Ryuji Marumoto

Rokko Pilzlaboratorium, Ashiya-shi, Hyogo, Japan

Claus Kilpert und Wolfgang Steglich

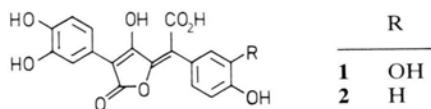
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

Z. Naturforsch. **41c**, 363–365 (1986);
received October 4, 1985

Pulveroboletus, Boletales, Basidiomycetes, Vulpinic Acid, Chlorinated Pulvinic Acid Derivatives

Vulpinic acid has been isolated from sporophores of *Pulveroboletus ravenelii*, its first reported occurrence in a Basidiomycete. Permethyl ethers of methyl xerocomate and methyl atromentate and its corresponding monochloro derivatives are produced by *P. auriflammus* of Japanese origin.

Die Fruchtkörper verschiedener *Pulveroboletus*-Arten besitzen leuchtend gelbe bis orangegelbe Farben, die sich beim Trocknen meist nur wenig verändern [2]. Untersuchungen über die darin enthaltenen Farbstoffe wurden bisher bei *Pulveroboletus lignicola* (Kbch.) Pilat [3], *P. auriporus* (Peck) Sing. [4] und *P. hemichrysus* (Bk. u. Curt.) Sing. [4] durchgeführt, in denen Bresinsky und Mitarbeiter die typischen Röhrlingsfarbstoffe Variegatsäure (**1**) und Xerocomäsure (**2**) nachweisen konnten. Interessanterweise bildet *P. lignicola* in Mycelkultur **2** [5], während die Fruchtkörper **1** enthalten.



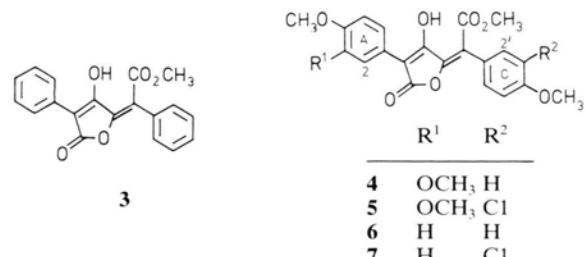
Wir haben nun einige weitere Arten untersucht und bemerkenswerte Unterschiede zu den bisher bekannten Röhrlingsfarbstoffen festgestellt.

P. ravenelii (Bk. u. Curt.) Murr. [6] weicht durch seine grünlichgelbe Farbe von den übrigen Pulveroboleten ab. Die Extraktion der getrockneten Fruchtkörper mit Chloroform ergab grünlichgelbe Kristalle, die nach Umkristallisation aus Dichlormethan/n-Hexan bei 148 °C schmolzen. Durch die spek-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Steglich.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/86/0300-0363 \$ 01.30/0

troskopischen Daten und den Vergleich mit einer aus der Flechte *Letharia vulpina* isolierten authentischen Probe wurde die Verbindung als Vulpinsäure (**3**) [7] identifiziert. Die Ausbeute betrug ca. 8% des Trockengewichts. Ein DC-Vergleich mit dem in der Farbe ähnlichen *P. frians* Corner ergab keinen Hinweis auf das Vorkommen von **3** in dieser Art aus Papua-Neuguinea [8].



Die leuchtend orangefarbenen getrockneten Fruchtkörper (9 g) von *P. auriflammus* (Bk. u. Curt.) Sing. [9] ergaben einen Chloroformextrakt (450 mg), der auf einer SepPak Si-Patrone (Millipore-Waters) mit Dichlormethan bzw. Dichlormethan/Methanol (9:1) in eine „rote“ (18 mg) und eine „orangegelbe“ (24 mg) Pigmentfraktion (A und B) aufgetrennt werden konnte. Die Fraktionen wurden nach Vorreinigung durch präparative TLC (Kieselgel G, Dichlormethan/Methanol 8:2) mittels HPLC im Gradientenbetrieb mit Wasser/Methanol auf RP 18-Phase in ihre Einzelkomponenten zerlegt [10]. Diese wurden nach ihrer Elutionsfolge mit A1, A2, B1, B2 und B3 bezeichnet.

A1: Schmp. 176 °C, *R*_F 0.65 [11], gelb; UV (Methanol): $\lambda_{\text{max}} = 250, 306 \text{ nm}$. – ¹H-NMR (Tab. I). –

Tab. I. ¹H-NMR-Spektren der Pulvinsäurederivate **4–7** (δ -Werte; 400 MHz; in [D₆]Aceton mit TMS als innerem Standard)

- 4** 3.74 (4-OCH₃), 3.78 (3-OCH₃), 3.82 (4'-OCH₃), 3.83 (CO₂CH₃); 6.94, 7.63 (AA'BB'-System, 3',5'-H bzw. 2',6'-H); 6.77 (d, 5-H), 7.95 (dd, 6-H), 8.22 (s, 2-H).
- 5** 3.74 (4-OCH₃), 3.78 (3-OCH₃), 3.84 (CO₂CH₃), 3.92 (4'-OCH₃); 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 5-H), 7.13 (d, *J* = 9 Hz, 5'-H), 7.58 (dd, *J* = 9 + 2.3 Hz, 6'-H), 7.77 (d, *J* = 2.3 Hz, 2'-H), 7.94 (dd, *J* = 8.4 + 2 Hz, 6-H), 8.21 (d, *J* = 2 Hz, 2-H).
- 6** 3.74 (4-OCH₃), 3.82 (4'-OCH₃), 3.83 (CO₂CH₃); 6.77, 8.33 (AA'BB'-System, 3',5'- bzw. 2',6'-H); 6.94, 7.62 (AA'BB', 3.5- bzw. 2.6-H).
- 7** 3.74 (4-OCH₃), 3.83 (CO₂CH₃), 3.92 (4'-OCH₃); 6.77, 8.33 (AA'BB'-System, 3.5- bzw. 2.6-H); 7.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 5'-H), 7.56 (dd, 8.8 + 2 Hz, 6'-H), 7.77 (d, *J* = 2 Hz, 2'-H).



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.

MS (DE 180 °C): m/e 380.0879 ($M^+ \text{-CH}_3\text{OH}$, 100%, ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_7$ 380.0896), 352 (7), 324 (39), 268 (22), 205 (4), 175 (5), 149 (17), 147 (18), 119 (16), 91 (3). Aus Lage und Aufspaltung der Aromatensignale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ergibt sich eine Xerocom-säure-Substitution [12]. Nach dem Massenspektrum [13, 14] müssen alle phenolischen Hydroxygruppen methyliert sein, während die Hydroxygruppe im Tetrosäurering wegen des fehlenden Moleküllions (Methanol-Abspaltung) frei vorliegt. Danach handelt es sich bei Pigment A 1 um 3,4,4'-Tri-O-methyl-xerocom-säure-methylester (**4**).

A2: Schmp. 162 °C, R_F 0.63 [11], gelborange; UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 258$, 380 nm. – $^1\text{H-NMR}$ (Tab. I). – MS (DE 180 °C): m/e 446.0787/448.0751 (M^+ , 55/25%, ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{ClO}_8$ 446.0765/448.0740), 414/416 ($M^+ \text{-CH}_3\text{OH}$, 100/36), 358/360 (32/12), 302/306 (24/10), 209/211 (10/4), 205 (6), 149 (18), 121. Die Verbindung stimmt nach den $^1\text{H-NMR}$ -Signalen für Ring A mit Pigment A 1 überein, zeigt aber für Ring C infolge des zusätzlichen Chlorsubstituenten ein AMX-Muster. Aus der Tieffeldverschiebung des 2'-H kann geschlossen werden, daß das Chloratom an C-3' sitzt. Dadurch wird das Signal der benachbarten Methoxygruppe nach $\delta = 3.92$ verschoben, während es bei den chlorfreien Verbindungen bei 3.82 erscheint. Für A2 ergibt sich damit die Konstitution eines 2'-Chlor-3,4,4'-tri-O-methylxerocom-säure-methylesters (**5**).

B1: Schmp. 168 °C, R_F 0.78 [11] gelb; UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 242$, 303. – $^1\text{H-NMR}$ (Tab. I). – MS (DE 180 °C): m/e 382.1033 (M^+ , 51%, ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_7$ 382.1053), 350 ($M^+ \text{-CH}_3\text{OH}$, 100), 322 (8), 294 (61), 238 (35), 175 (28), 147 (70), 119 (62), 91 (5). Aus den spektroskopischen Daten folgt für B1 die Konstitution eines 4,4'-Di-O-methyltromentinsäure-methylesters (**6**).

B2: Schmp. 149 °C, R_F 0.77 [11], gelborange; UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 256$, 374 nm. – $^1\text{H-NMR}$ (Tab. I). – MS (DE 180 °C): m/e 416.0705/418.0684 (M^+ , 38/14%, ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{ClO}_7$ 416.0663/418.0634), 384/386 ($M^+ \text{-CH}_3\text{OH}$, 100/36), 356/358 (6/3), 328/330 (47/16), 272/274 (30/10), 209/211 (6/2), 181/183 (11/4), 175 (26), 153/155 (7/2), 147 (30), 119 (28), 91 (5). Die Verbindung stimmt in den $^1\text{H-NMR}$ -Signalen für Ring A mit B1 und für Ring C mit A2 überein, so

daß ein 3'-Chlor-4,4'-di-O-methyltromentinsäure-methylester (**7**) vorliegt.

Neben diesen Farbstoffen ließ sich in geringer Menge ein „gelboranges“, schwerlösliches Pigment B3 vom R_F 0.76 [11] abtrennen, das nach dem Massenspektrum [m/e 450.0299/452.0255 (M^+ , ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_7$ 450.0273/452.0244), 418/420, 362/364, 306/308, 209/211] ein Dichlor-tri-O-methylxerocom-säure-methylester ist. Da Phenylbruchstücke mit zwei Chloratomen im Massenspektrum fehlen, müssen sich die Chloratome auf beide Phenylringe verteilen. Für eine sichere Bestimmung der Stellung der Chlorsubstituenten reichte die vorhandene Substanzmenge nicht aus.

Im Unterschied zu den beiden vorstehend erwähnten Arten verdankt *P. cramesinus* Secr. Sing. [15] seine leuchtend gelbe Farbe der Variegatsäure (**1**), die an Hand der spektroskopischen Daten und durch direkten Vergleich identifiziert wurde.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Gattung *Pulveroboletus* pigmentmäßig wenig einheitlich ist. Neben einer Gruppe von Arten, die die „normalen“ Röhrlingsfarbstoffe Xerocom-säure und Variegatsäure enthält (*P. auriporus*, *P. cramesinus*, *P. hemichrysus*, *P. lignicola*) gibt es Arten, die Methylester von Pulvinsäuren produzieren. Während *P. auriflammeus* noch im Substitutionsmuster mit den herkömmlichen Boletales-Farbstoffen übereinstimmt, nimmt *P. ravenelii* durch das Vorkommen der unsubstituierten Vulpinsäure unter den Röhrlingen eine Sonderstellung ein. Im Unterschied zu den übrigen Boletales-Pigmenten, die sich biosynthetisch vom Tyrosin ableiten [16], scheint hier Phenylalanin der Vorläufer zu sein. Permethylierte Hydroxypulvinsäureester wurden auch bei *Hygrophoropsis aurantiaca* beobachtet [17, 18]. Interessant ist das Vorkommen von chlorierten Pulvinsäuren bei *P. auriflammeus*. Vorher war eine Chlorxerocom-säure in Spuren in *Xerocomus chrysenteron* nachgewiesen worden [14].

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

- [1] 51. Mitteilung über Pilzfarbstoffe. 50. Mitteilung: H.-J. Lohrisch, H. Schmidt u. W. Steglich, Liebigs Ann. Chem., im Druck.
- [2] Vgl. z. B. R. Singer, The Agaricales in Modern Taxonomy, p. 726, ff., 3. Aufl., J. Cramer, Vaduz 1975.
- [3] A. Bresinsky und P. Orendi, Z. Pilzkunde **36**, 137 (1970).
- [4] A. Bresinsky und H. Besl, Z. Mykologie **45**, 247 (1979).
- [5] H. Besl und A. Bresinsky, Z. Pilzkunde **43**, 311 (1977).
- [6] *P. ravenelii*: Gesammelt im Oktober 1983 bei Takarazuka (Hyogo, Japan), leg. et det. R. Marumoto. Herbarbelege der untersuchten Pilzproben befinden sich im Staatsherbarium München.
- [7] A. Spiegel, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **15**, 1546 (1882); A. Spiegel, Liebigs Ann. Chem. **219**, 1 (1883).
- [8] Wir danken Herrn Dr. E. Horak, ETH Zürich, für die freundliche Überlassung des Pilzes.
- [9] *P. auriflameus*: Gesammelt im Oktober 1977 bei Takarazuka (Hyogo, Japan), leg. R. Marumoto, det. T. Hongo. Interessanterweise enthielt eine Kollektion von 1983 aus dem Great Smoky Mountain National Park (USA) (leg. W. Steglich, det. A. Bresinsky) nur die Farbstoffe des Atromentinsäuretyps. Möglicherweise handelt es sich bei den japanischen und amerikanischen Aufsammlungen um Varietäten, die sich in ihren Pigmenten unterscheiden.
- [10] HPLC-Trennbedingungen: System Millipore-Waters; Vertex-HPLC-Trennsäule, 250×8 mm (Knauer) gefüllt mit LiChrosorb RP 18, $7 \mu\text{m}$ (Merck) und Vertex-HPLC-Vorsäule, 30×8 mm (Knauer) gefüllt mit LiChrosorb RP 18, $10 \mu\text{m}$ (Merck), geschützt durch GuardPak C18 (Millipore-Waters); Lösungsmittel: Wasser (demineralisiert und über RP nachgereinigt), Methanol, p. A. (Baker); Laufmittel A: Wasser/Methanol 9:1, B: Wasser/Methanol 1:9. Bei einem Fluß von 3 ml/min wurde nach der Injektion ein Gradient von 10% B auf 50% B in 40 min. linear durchlaufen. Detektiert wurde bei 305 nm. Bei den semipräparativen Läufen wurden Trennfaktoren von bis zu jeweils 1.27 erreicht.
- [11] Kieselgel G, Laufmittel Dichlormethan/Methanol 95:5.
- [12] W. Steglich, H. Besl und K. Zipfel, Z. Naturforsch. **29b**, 96 (1974).
- [13] R. M. Letcher, Organic Mass Spectrom. **1**, 805 (1968).
- [14] W. Steglich, W. Furtner und A. Prox, Z. Naturforsch. **23b**, 1044 (1968).
- [15] Gesammelt im Oktober 1983 bei Karlstadt/Main (leg. et det. B. Oertel) und bei Ashiya (Hyogo, Japan) (leg. et det. R. Marumoto).
- [16] R. Herrmann, C. Kilpert und W. Steglich, unveröffentlicht; R. Herrmann, Dissertation Univ. Bonn 1980.
- [17] R. L. Edwards, J. Chem. Research (S), **1977**, 276.
- [18] H. Besl, A. Bresinsky, L. Kopanski und W. Steglich, Z. Naturforsch. **33c**, 820 (1978).