Pilzpigmente, XIV [1]

Neue Pigmente vom Flavomannin-Typ aus *Cortinarius vitellinus* (Agaricales)

Pigments of Fungi, XIV

Novel Pigments of the Flavomannin Type from *Cortinarius vitellinus* (Agaricales)

Wolfgang Steglich und Edda Töpfer-Petersen

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität Berlin

(Z. Naturforsch. **28 c**, 255–259 [1973]; eingegangen am 20. Februar 1973)

Herrn Prof. Dr. Theodor Wieland zum 60. Geburtstag gewidmet

4-Hydroxy-flavomannin-6,6′-dimethyl ether, tetrahydroanthracene derivatives, pigments, fungi, *Cortinarius*

The structure of the yellow main pigment of *Cortinarius vitellinus* has been established as 4-hydroxy-flavomannin-6,6′-dimethyl ether A_1 (**1**). **1** is easily oxidized to a number of quinones, whose structures have been elucidated by mass spectrometry. A nomenclature for stereoisomeric flavomannin derivatives is proposed.

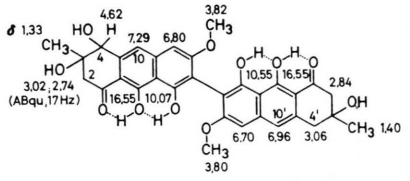
Die Fruchtkörper von *Cortinarius vitellinus* Mos. (*Phlegmacium vitellinum* Mos.) fallen durch ihr intensiv chromgelbes Fleisch auf, das sich beim Betupfen mit Laugen rotbraun verfärbt [2]. Wir haben nun das färbende Prinzip in seiner Struktur aufgeklärt und Einblicke in den Chemismus der Farbreaktion gewonnen.

Isolierung der Farbstoffe

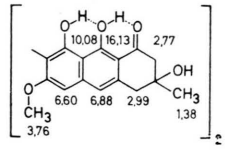
Zur Isolierung der Farbstoffe wurden 1,6 kg frische Fruchtkörper mit Äthanol unter Zusatz von etwas Eisessig extrahiert. Nach dem Eindampfen der Lösung verteilte man den Rückstand zwischen Wasser und Essigester, dampfte die organische Phase ein und entfernte die Fette durch Digerieren mit Petroläther. Chromatographie an acetyliertem Polyamid lieferte einen schmutzigroten Vorlauf I, dem nach einer schwachgelben Zone II das Hauptpigment III folgte. Rechromatographie von III und Umkristallisieren aus Benzol ergab 0,84 g (0,05%) gelbe Blättchen, die sich gegen 250 °C zersetzten und eine spezifische Drehung von $[\alpha]_{564}^{20}$ −680° aufwiesen.

4-Hydroxy-flavomannin-6.6′-dimethyläther A_1

Das Hauptpigment ähnelt in Farbe, Löslichkeitsverhalten, Oxidationsempfindlichkeit, UV- und IR-Daten Flavomannin-6.6′-dimethyläther **2**, den wir kürzlich aus verschiedenen Dermocyben isolierten [3]. Die Verbindung stimmt im massenspektrometrischen Fragmentierungsverhalten mit **2** überein, unterscheidet sich aber durch eine zusätzliche Hydroxygruppe, deren Stellung sich aus dem NMR-Spektrum [4] ergibt:



1



2

Entscheidend ist, daß das 10′-H-Signal durch Kopplung mit der benzylischen Methylengruppe verbreitert ist [5], während das 10-H-Signal wesentlich schärfer erscheint und nach tieferem Feld verschoben ist. Die OH-Gruppe kann daher nur in 4-Stellung sitzen, was eine Aufspaltung des Signals der 2-Methylengruppe in ein deutliches AB-Quartett bewirkt. Alle übrigen Signale stimmen gut mit denen von **2** [3] überein.

Das Vitellinus-Pigment hat demnach die Struktur eines 4-Hydroxy-flavomannin-6.6′-dimethyläthers **1**. Wie ein Vergleich der ORD-Kurven zeigt (Abb. 1), besitzen **1** und **2** an der Biarylbindung die gleiche absolute Konfiguration. Versuche, die relative Kon-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Steglich, Org.-Chem. Institut der Technischen Universität, *D-1000 Berlin 12*, Straße des 17. Juni 135.

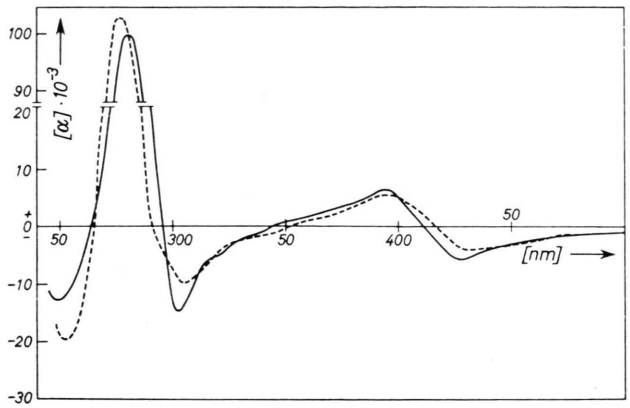


Abb. 1. ORD-Kurven von Flavomannin-6.6′-dimethyläther A_1 (···) und 4-Hydroxy-flavomannin-6.6′-dimethyläther A_1 (—).

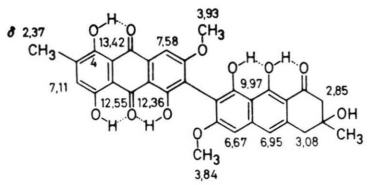
figuration der 3- und 4-Hydroxylgruppen durch Bildung eines Acetonids festzulegen, verliefen negativ.

Kürzlich isolierte K. Gluchoff [6] aus *Tricholoma sulfureum* ein Stereoisomeres, das nach dem spiegelbildlichen Verlauf seiner ORD-Kurve an der Biarylbindung mit **1** enantiomer ist. Über zusätzliche Unterschiede in der Konfiguration der sp^3-Zentren kann noch nichts ausgesagt werden. Damit ergibt sich die Notwendigkeit, stereoisomere Flavomannin-Derivate bis zur Klärung ihrer absoluten und relativen Konfiguration eindeutig zu benennen. Wir schlagen deshalb vor, Verbindungen mit stark positivem Cotton-Effekt zwischen 270 – 300 nm mit A, solche mit negativem mit B und Racemate mit fehlendem oder schwachem Cotton-Effekt mit C zu bezeichnen. Die sich durch Unterschiede in der Konfiguration der sp^3-Zentren ergebenden Stereoisomeren werden in der Reihenfolge ihrer Isolierung mit fortlaufenden Indices numeriert. Die Verbindung **1** muß danach als 4-Hydroxy-flavomannin-6.6′-dimethyläther A_1 und das Pigment aus *T. sulfureum* als B_1 bezeichnet werden. Für die bereits früher aus *Dermocybe* und *Tricholoma* isolierten Verbindungen **2** [3] ergeben sich die Bezeichnungen Flavomannin-6.6′-dimethyläther A_1 bzw. C_1.

Oxidationsprodukte

Der rotbraune Vorlauf I stellt nach dem Dünnschichtchromatogramm ein komplexes Gemisch gelber, roter und violetter Komponenten dar, deren Reindarstellung infolge ähnlicher R_f-Werte und der Tendenz zur Weiteroxidation große Schwierigkeiten bereitet. Als Methode der Wahl für die Strukturaufklärung dieser Verbindungen erwies sich die hochauflösende Massenspektroskopie.

Versetzt man die Fraktion I mit Petroläther, so flocken die Farbstoffe aus. Durch mehrfache, verlustreiche Dünnschichtchromatographie können daraus die roten Hauptpigmente **3** und **4** isoliert werden. **3**, das mengenmäßig überwiegt, besitzt nach dem NMR-Spektrum die Struktur eines 4-Hydroxy-anhydroflavomannin-9.10-chinon-6.6′-dimethyläthers:



3

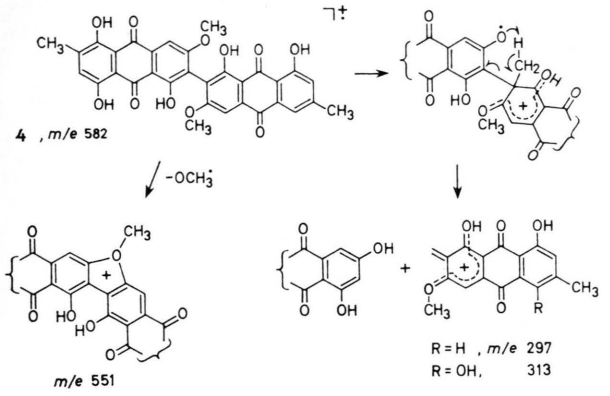
Typisch für die Substitution im Anthrachinonkern sind die drei Singuletts der chelatisierten Hydroxygruppen bei $\delta = 12{,}36$, 12,55 und 13,42 und das Fehlen eines Signals bei $\delta \approx 7{,}5$, wie es für ein 4-H zu erwarten wäre [7]. Alle übrigen Signale sind mit denen des Anhydroflavomannin-9.10-chinon-6.6′-dimethyläthers [3] nahezu identisch.

Im Einklang mit Struktur **3** kann das Absorptionsspektrum des Pigments durch ein 1:1-Gemisch von **2** und 1.5.8-Trihydroxy-6-methoxy-3-methylanthrachinon (Xanthorin) [8] simuliert werden. Im MS tritt der Molekülpeak *m/e* 586 nur sehr schwach auf neben intensiven Ionen *m/e* 568 und 537, die durch Abspaltung von Wasser und anschließenden Verlust eines Methoxyradikals entstehen.

3 geht beim Aufbewahren allmählich in **4** über, dessen Absorptionsbanden gut mit denen eines 1:1-Gemisches von Physcion und Xanthorin übereinstimmen. Im MS wird wie beim 7.7′-Biphyscion [9] eine OCH_3-Abspaltung beobachtet, die zum stabilen Ion *m/e* 551 führt [10]. Auch die Spaltung des Moleküls unter CH_2-Übertragung zu den Ionen *m/e* 297 und 313 ist kennzeichnend für die 7.7′-Verknüpfung. Wir schlagen dafür den umseitig aufgeführten Mechanismus vor:

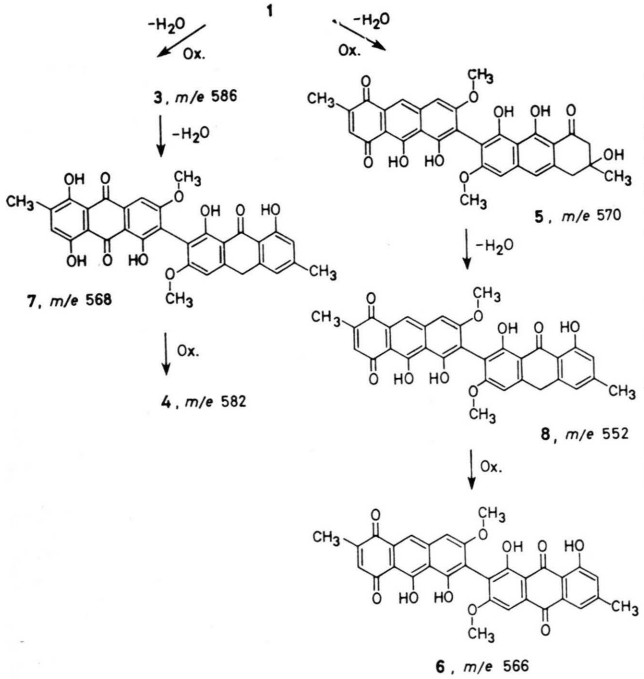
Bei dem aus **3** durch Wasserabspaltung entstehenden Ion *m/e* 568 ist die Spaltung unter CH_2-Übertragung zur Anthrachinonhälfte *m/e* 313 gegenüber der zur Anthronhälfte *m/e* 283 bevorzugt. Daneben treten die für Anthrone dieses Typs charakteristischen Ionen *m/e* 269 und 270 auf.

Eine massenspektrometrische Untersuchung der gelben Fraktion II ergab, daß sie zum größten Teil aus einer Verbindung **5** besteht, die neben einem



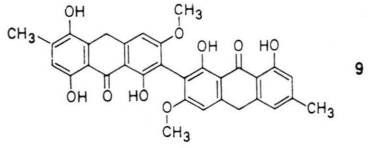
äußerst schwachen Molekülion *m/e* 570 intensive Fragmentionen *m/e* 552 [$C_{32}H_{24}O_9$], 521, 270 und 269 aufweist *. Beim Stehen geht **5** in ein gelbes Dichinon **6** *m/e* 566 [$C_{32}H_{22}O_{10}$] über, das gegen weitere Oxidation stabil ist. Massenspektrometrisch findet man ein intensives M-OCH_3-Ion und Spaltung unter CH_2-Übertragung zu *m/e* 297. Berücksichtigt man das UV-Spektrum mit Maxima bei 442, 303 (sh) und 280 – 270 nm, so kommen für die Verbindungen *m/e* 570 und 566 nur die 1.4-Anthrachinonstrukturen **5** und **6** in Betracht.

Die beschriebenen Verbindungen lassen sich in einem Schema zusammenfassen, das ihre Entstehung aus **1** als Folge von Wasserabspaltungs- und Oxidationsschritten erklärt:



Da die Neigung von **1** zur Autoxidation sehr groß ist – Lösungen in Chloroform werden bereits bei mehrtägigem Stehen oxidiert – besteht der Verdacht, daß **3**, **4**, **5** und **6** zumindestens zum Teil Artefakte sind. Sicher spielt hierbei das Alter der Fruchtkörper und die Dauer ihrer Lagerung in der Tiefkühltruhe eine Rolle.

Die Oxidation wird durch Laugen stark beschleunigt. So verfärbt sich eine gelbe Lösung von **1** in 20-proz. Natronlauge innerhalb von 15 Min. dunkel rotbraun. Arbeitet man auf, so lassen sich im MS die Verbindungen **4** (wenig), **6**, **7**, **8** und das Dianthron **9**, *m/e* 554, nachweisen, das durch Behandeln von **1** mit Eisessig/HCl [11] zugänglich ist. Daneben entstehen violette Verbindungen ungeklärter Struktur (Dimere?).



Der von Mykologen als taxonomisches Merkmal benutzten Verfärbung der Fruchtkörper mit starken Laugen [2] liegt somit ein komplexer Chemismus zugrunde, bei dem aus einem einzigen Pigment eine Vielzahl farbiger Oxidationsprodukte entsteht.

Beschreibung der Versuche

Die IR-Spektren wurden mit einem Beckman IR 9, die UV-Spektren mit einem Beckman Cary 15 aufgenommen. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit einem Varian-MAT 711 über ein Direkteinlaßsystem bei 70 eV. Die Elementarzusammensetzung der Ionen wurde durch automatische Datenverarbeitung mit einem Spectro-System 100 von Varian-MAT ermittelt. Auflösung 10000 (10% Tal); Registrierzeit 46 sec. Die ORD-Kurven wurden mit einem Zeiss Spektralpolarimeter REP M 12 aufgenommen.

Isolierung der Farbstoffe

1,6 kg Fruchtkörper von *C. vitellinus* ** wurden mit 2 l Äthanol/Eisessig (30 : 1 vol.) im Mixer zerkleinert. Man saugte ab und extrahierte das Pilz-

* *Anmerkung bei der Korrektur:* Bei einer erneuten Aufarbeitung wurde aus Fraktion II 4-Oxo-flavomannin-6.6′-dimethyläther A_1 isoliert, so daß **5** zumindest teilweise aus dieser Verbindung entstanden sein kann (K. Gluchoff und W. Steglich, unveröffentlicht).

** Im September 1970 im Isartal bei Puppling, Oberbayern, gesammelt und 6 Monate in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

material noch zweimal mit je 1 l Äthanol/Eisessig. Nach Eindampfen der vereinigten Extrakte i. Vak. wurde der Rückstand in Wasser aufgeschlämmt und mehrfach mit Essigester ausgeschüttelt. Eindampfen der getrockneten Extrakte lieferte 11,3 g dunkelbraunen, schmierigen Rückstand, dem durch mehrfaches Digerieren mit Petroläther der größte Teil der Lipoide entzogen wurde. Der Rest wurde in Chloroform gelöst und an MN-Polyamid 6-Ac (Fa. Macherey und Nagel, Düren) chromatographiert (2 Säulen, 80 × 3 cm). Benzol eluierte einen öligen, rotbraunen Vorlauf (I), Benzol – Chloroform 1 : 1 eine hellgelbe Fraktion (II, 9 mg) und Chloroform das gelbe Hauptpigment (III, 1,1 g).

Der Vorlauf I wurde mit Petroläther digeriert, wobei rotbraune Flocken ausfielen, die man abzentrifugierte. Sie lieferten bei der präparativen DC an Kieselgel G (Laufmittel: Benzol/Ameisensäureäthylester/Ameisensäure = 10 : 5 : 3) in Laufrichtung die Banden I – 1 (gelbgrün), I – 2 (violett), I – 3 (rot), I – 4 (gelb), I – 5 (blauviolett) und I – 6 (rot)*.

4-Hydroxy-flavomannin-6.6′-dimethyläther A_1 (**1**)

Rechromatographie von Fraktion III und Umkristallisation aus Benzol lieferten 0,84 g honiggelbe Blättchen (0,05%), Schmp. 250 °C (Zers., nach Sintern ab 207 °C), $[\alpha]_{546}^{25}$ −680° (*c* = 0,01 in Chloroform). UV-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{max.}$ = 406,5 (ε = 21 800), 330 (sh, 10 100), 319 (12 600), 278,5 (66 230), 233 nm (30 900); IR (KBr): 3400 (m), 2970 (w), 2940 (w), 1635 (ss), 1590 (s), 1520 (m), 1470 (s), 1410 (s), 1340 (s), 1280 (m), 1225 (m), 1185 (m), 1105 (s), 1065 (m), 1040 (w), 1005 (w), 965 (w), 920 (w), 885 (w), 835 (w), 820/cm (w); MS: *m/e* 590 ($C_{32}H_{30}O_{11}$, 26,0%), 573 (31,5%), 572 (100%), 555 (24,3%), 554 ($C_{32}H_{26}O_9$, 64,85%), 523 (16,2%), *m/2e* 286 (6,25%), 277 (6,2%), *m/e* 270 (5,0%), 269 (4,15%), *m/2e* 261,5 (4,1%), *m/e* 255 (3,1%).

$C_{32}H_{30}O_{11}$ (590,6)	Ber.	C 65,08	H 5,12,
	Gef.	C 65,04	H 5,63.

4-Hydroxy-anhydroflavomannin-9.10-chinon-6.6′-dimethyläther (**3**)

Wiederholte Rechromatographie von I – 3 lieferte 16 mg rote Mikrokristalle, die nach Umfällen aus Benzol/Petroläther ohne weitere Reinigung untersucht wurden. UV (Chloroform): λ_{max} = 528,5, 514, 493, 464, 400, 313 (sh), 276,5, 230 nm; nach Zusatz von etwas Natriummethylat: 600, 558, 529,5 (sh), 402 nm; IR (KBr): 3430, 1630, 1605/cm; MS: *m/e* 586 (5,9%), 569 (35%), 568 ($C_{32}H_{24}O_{10}$, 88,5%), 551 (11,8%), 550 (10%), 538 (53%), 537 ($C_{31}H_{21}O_9$, 100%), 519 (20,6%), 313 ($C_{17}H_{13}O_6$, 51,9%), 312 (24,7%), 297 (25,9%), 284 (29,4%), 283 (28,8%), 270 ($C_{16}H_{14}O_4$, 62%), 269 (51,3%), *m/2e* 268,5 (58,2%), *m/e* 255 (29,4%), 227 (29,4%).

4-Hydroxy-7.7′-biphyscion (**4**)

Durch Rechromatographie von I – 6; 5 mg rote Mikrokristalle, die ohne weitere Reinigung untersucht wurden. UV (Chloroform): λ_{max} = 531,5, 517, 496, 467,5, 445 (sh), 305 (sh), 278,5, 272 nm (sh); MS: *m/e* 582 ($C_{32}H_{22}O_{11}$, 100%), 552 (25,9%), 551 (78,6%), 537 (13,9%), 536 (14,7%), 313 (23,9%), 297 (13,9%), *m/2e* 291 (8,4%), 275,5 (18,3%), *m/e* 268 (18,7%).

Untersuchung von Fraktion II

Bewahrt man die Fraktion II mehrere Monate auf, so zeigt sie bei der DC zusätzlich zur ursprünglichen gelben Zone II – 1 eine zweite, II – 2, die schneller läuft. Durch DC an Kieselgel G (Eluent: Benzol/Essigester = 10 : 1) wurden beide Verbindungen getrennt.

4-Hydroxy-anhydroflavomannin-1.4-chinon-6.6′-dimethyläther (**5**)

Aus II – 1; MS: *m/e* 552 ($C_{32}H_{24}O_9$, 100%), 522 (33%), 521 (90%), 297 (49%), 283 (23,6%), m/2e 276 (25%), *m/e* 270 ($C_{16}H_{14}O_4$, 24,5%), 269 (17%), *m/2e* 260,5 (17%).

4-Hydroxy-dianhydroflavomannin-1.4.9′.10′-dichinon-6.6-dimethyläther (**6**)

Aus II – 2; UV (Chloroform) λ_{max} = 451 (sh), 442, 303 (sh), 280 – 271 nm; MS: *m/e* 566 ($C_{32}H_{22}O_{10}$, 71,5%), 449 (8%), 548 (5,3%), 536 (39%), 535 ($C_{31}H_{19}O_9$, 100%), 520 (11%), 517 (10%), 297 ($C_{17}H_{13}O_5$, 63%), 284 (8,3%), 283 (15,7%), 268 (9%), *m/2e* 267,5 (11,3%), *m/e* 267 (11,9%).

4-Hydroxy-dianhydroflavomannin-6.6′-dimethyläther (**9**)

0,10 g 4-Hydroxy-flavomannin-6.6′-dimethyläther A_1 (**1**) wurden mit 20 ml Eisessig und 3 ml konz. Salzsäure 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Man zentrifugierte den Niederschlag ab, wusch mit Wasser und trocknete. Aus Methylenchlorid 55 mg (53,2%), grünliches Pulver vom Schmp. > 300 °C (Zers.);

* Hauptbanden sind I – 3 und I – 6, die nach dem MS **3**, **5** bzw. **4**, **6**, **7**, **8** bestehen; R_f-Werte auf DC-Kieselgelfertigplatten Merck: 0,50 bzw. 0,74.

UV (Chloroform: λ_{max} = 364,5 (ε = 26160), 272,5 (29460), 264 (29850), 240 nm (30900); IR (KBr): 3400 (breit), 2960, 2860, 1640 – 1590 (breit), 1575, 1490/cm.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit. Fräulein E. Beske sei für ihre geschickte Mitarbeit gedankt.

[1] XIII. Mitt.: W. Steglich, H. Besl u. A. Prox, Tetrahedron Letters [London] **1972**, 4895.
[2] M. Moser, Die Gattung Phlegmacium, Julius Klinkhardt, Bad Heilbrunn 1960.
[3] W. Steglich, E. Töpfer-Petersen, W. Reininger, K. Gluchoff u. N. Arpin, Phytochemistry **11**, 3299 [1972].
[4] Alle NMR-Spektren wurden mit einem Varian HA 100 in $CDCl_3$ aufgenommen; δ in ppm gegen TMS als inneren Standard (δ_{TMS}=0,00).
[5] Durch Entkopplung bewiesen. Wir danken Herrn Dr. G. Höfle für diesen Versuch.
[6] K. Gluchoff u. W. Steglich, im Druck.
[7] W. Steglich u. W. Lösel, Tetrahedron [London] **25**, 4391 [1969].
[8] W. Steglich, W. Lösel u. W. Reininger, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 4719.
[9] K. Gluchoff, N. Arpin, M.-P. Dangy-Caye, P. Lebreton, W. Steglich, E. Töpfer, H. Pourrat, F. Regerat u. D. Deruaz, C. R. Acad. Sc. Paris, Sér. D **274**, 1739 [1972].
[10] Wie J. Atherton *et al.* [11] nachwiesen, liefert Dianhydroflavomannin unter Wasserabspaltung einen base peak *m/e* 492. Ähnlich wie beim 7.7'-Bi-emodin [9] ist hier der Verlust eines OH-Radikals von untergeordneter Bedeutung.
[11] J. Atherton, B. W. Bycroft, J. C. Roberts, B. Roffey u. M. E. Wilcox, J. chem. Soc. [London] C **1968**, 2560.