

Substanzen	Rf-Wert mit Laufmittel Nr.			
	1	2	3	4
Indol	1,0	1,0	0,97	0,85
5-Hydroxyindol	0,96	0,91	0,73	0,77
Tryptophan	0,40	0,11	0,06	0,59
5-Hydroxytryptophan	0,38	0,00	0,00	0,00
ω -N-Acetyl-serotonin	0,90	0,56	0,40	0,50
ω -N-Acetyl-5-hydroxytryptophan	0,37	0,27	0,19	0,40

Fließmittelgemische

Nr. 1: Methylacetat, Isopropanol, Ammoniakflüssigkeit (25proz.) (45 : 35 : 20) ⁴⁾.

Nr. 2: Chloroform, Äthanol, Eisessig (75 : 20 : 5).

Nr. 3: Chloroform, Äthanol, Ameisensäure (85 : 15 : 0,5).

Nr. 4: Aceton, Benzol (70 : 30).

Die entwickelten DC wurden unter der UV-Lampe bei 254 und 350 nm betrachtet. Dann wurden die Platten mit Echtblausalz B-Reagens und anschließend mit van Urk'-Reagens besprüht.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine freundlich gewährte Sachbeihilfe.

⁴⁾ E. Stahl und H. Kaldeweg, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 323, 182 (1961).

Anschrift: Prof. Dr. H. Rochelmeyer, 65 Mainz, Saarstraße 21.

[Ph 502]

P. H. List und P. Luft

Gyromitrin, das Gift der Frühjahrsorchel

16. Mitt. über Pilzinhaltsstoffe*)

Aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Marburg/Lahn

(Eingegangen am 4. Oktober 1967)

Das Gift der Frühjahrsorchel wurde als N-Methyl-N-formylhydrazon des Acetaldehyds aufgeklärt und synthetisiert.

The poison of *Gyromitra esculenta* („Frühjahrsorchel“) has been recognized as N-Methyl-N-formylhydrazone of acetaldehyde and synthesized.

Die Frühjahrsorchel, *Gyromitra esculenta* FRIES ex PERSON, gehört zur Familie der Helvellaceae innerhalb der Ascomycetenordnung der Pezizales. Früher

*) 15. Mitt.: P. H. List und B. Freund, Naturwissenschaften im Druck.

wurde sie zur Gattung *Helvella* gerechnet und wird daher im älteren Schrifttum als *Helvella esculenta* PERSONA bezeichnet.

Zu den gebräuchlichsten Synonyma des Pilzes gehören die Namen Hasenmauroche, Lauerchen, Laurich, Lorchel, Frühlorchel, Speiselorchel, sowie Stockmorchel oder einfach Morchel¹⁾ 2). Gerade aber die letzten beiden Bezeichnungen sind verhängnisvoll irreführend, denn unter den Morcheln ist keine giftige Art bekannt, während die Frühjahrslorchel zu den gefährlichsten Giftpilzen zählt, ungeachtet der Tatsache, daß sie nach Abkochen und Weggießen des Kochwassers oft ohne Schaden genossen werden kann. *Friese*¹⁾ wendet sich mit Recht auch gegen die Benennung „Speiselorchel“, er schlägt außerdem vor, das Wort „*esculenta*“ der botanischen Bezeichnung durch „*vernalis*“ zu ersetzen. — Nach ihrem äußeren Habitus kann man jedoch die beiden Pilzfamilien auch bei oberflächlicher Betrachtung kaum verwechseln.

Die Morcheln weisen als Hauptmerkmal runde, sich konisch verjüngende Hüte auf, deren wabenartige, eingesenkte Kammern von erhabenen Leisten begrenzt sind. Dagegen ist der Hut der Frühjahrslorchel wulstig, gekröseartig gefurcht und unregelmäßig Gehirnartig gewunden. Seine Farbe schwankt von hellrotbraun bis dunkelbraun, die Oberseite der dunkleren Typen trägt oft einen feuchten, violetten Schimmer. Der Hut mißt etwa 3—10 cm im Durchmesser und ist hohl. Das 1 mm dicke, gelblichweiße Hutfleisch zeigt auf der Innenseite vielgestaltige, weißlich bereifte bis zartfilzige Hohlräume. Auch der 2—9 cm hohe, höckerige oder flachgrubige, öfters längsgerippte, 1—5 cm dicke Stiel ist hohl. Jung ist er im Innern markig angefüllt. Die farblosen Sporen des Pilzes sind elliptisch, 17—22 μ lang und 8—22 μ breit¹⁾.

Die frische Lorchel strömt einen köstlichen, verlockenden Pilzgeruch aus. Das wachsartige, brüchige Fleisch verliert auch durch Kochen oder Braten seine angenehme Festigkeit nicht. Es schmeckt so hervorragend, daß der Pilz als Delikatesse gilt.

Das Verbreitungsgebiet der Frühjahrslorchel umfaßt ganz Mittel- und Osteuropa mit Schwerpunkt in Polen und Westrußland. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Pilze stammten aus der Lüneburger Heide. Lediglich für die Versuche mit Frischpilzen konnten an zwei Stellen im Burgwald bei Marburg wenige Exemplare gerettet werden.

Die Frühjahrslorchel ist trotz ihrer geschmacklichen Qualitäten ein gefährlicher Giftpilz.

Nach einer Zusammenstellung von *Franke*³⁾, in der sämtliche in der Literatur zugänglichen Vergiftungsanfälle von 1782—1965 referiert sind, starben von 513 vergifteten Personen 74 (14,5%) an den Folgen einer Lorchemahlzeit. (Es konnten sinngemäß nur Fälle berücksichtigt werden, bei denen die Gesamtzahl der Vergifteten angegeben war, insgesamt

1) *W. Friese*, Pharmaz. Zentralhalle Deutschland 89, 37 (1950).

2) *J. V. Krombholz*, Naturgetreue Abbildung und Beschreibung der eßbaren, schädlichen und verdächtigen Schwämme. J. G. Cave, Prag 1831, III, S. 30.

3) *S. Franke*, Dissertation Dresden 1965.

wurde von 154 Todesfällen berichtet.) *Gessner*⁴⁾ gibt eine Letalität von 10—50% an. Bestürzend sind auch die Zahlen von *Orlov*⁵⁾, der berichtet, daß von sämtlichen in der Sowjetunion amtlich registrierten Pilzvergiftungen 45% (!) auf die Wirkung der Frühjahrs-orchel entfallen, davon 34,5% (!) mit tödlichem Ausgang. Danach ist also die Rate der Todesfälle der Lorchelvergiftungen weit höher als bei anderen Giftpilzen. Sie wird nur noch von dem Grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) mit einer Letalität von 50—70%⁴⁾ übertroffen.

Aber nicht jeder erkrankt nach dem Genuß des Pilzes. So vertragen viele Menschen selbst rohe Lorcheln (*Seidel*⁶⁾), während andere allein durch die bei der Zubereitung entstehenden Dämpfe gesundheitliche Schäden erlitten (*Pick*⁷⁾, *Teodorowicz*⁸⁾, *Stuhlfauth* und *Jung*⁹⁾). Oft stellen sich schwere Vergiftungen nach jahrelangem beschwerdefreien Genuß ein (*Bostroem*¹⁰⁾, *Dittrich*¹¹⁾). Auch sind Fälle bekannt, bei denen vorschriftsmäßig abgekochte, vom Kochwasser befreite Lorcheln zum Tode führten (*Herzog*¹²⁾, *Umber*¹³⁾, *Welsmann*¹⁴⁾).

1885 teilten *Boehm* und *Kuelz*¹⁵⁾ mit, daß das Gift der Frühjahrsorchel Helvella-säure, $C_{12}H_{20}O_7$, sei. Der Versuch, Helvellasäure erneut zu isolieren und womöglich in ihrer Konstitution aufzuklären, fand erst durch *Franke*, *Freimuth* und *List* statt¹⁶⁾. Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, daß Helvellasäure nicht existiert und allenfalls ein Gemisch verschiedener Carbonsäuren, v. a. Fumarsäure, vorgelegen haben kann. In Fortsetzung der Arbeit von *Franke* wurde versucht, mit Hilfe von Tierversuchen zu einer weiteren Anreicherung des Giftstoffes und schließlich zu seiner Isolierung zu gelangen.

Die Tierversuche wurden nur als Leitfaden für die Fraktionierung vorgenommen. Wenn Sektionen durchgeführt wurden, sollten sie in erster Linie sicherstellen, daß das Tier nicht etwa an einer Perforation des Schlundes oder des Magens durch die Sonde gestorben war.

Als Versuchstier nahmen wir zunächst ein Kaninchen, dem ein aus der abgepreßten und filtrierten Konservierungsflüssigkeit durch Abziehen des Alkohols unter Ausschluß von Luftsauerstoff hergestellter Extrakt per Schlundsonde verabreicht wurde. Die Extraktmenge entsprach 660 g Frischpilzen. Das Tier starb 42 Std.

⁴⁾ *O. Gessner*, Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, C. Winter Universitätsverlag Heidelberg, 2. Aufl. 1953.

⁵⁾ *N. I. Orlov*, Sjedobuye i jadovitye griby gribenye ostravlenija i ich profilaktika, Megdiz, Moskau 1953, S. 44.

⁶⁾ *Seidel*, Pilz- und Kräuterfreund 1920, S. 14 u. 1923, S. 200 zit. nach *Kärber*.

⁷⁾ *E. Pick*, Dtsch. med. Wschr. 53, 1563 (1927).

⁸⁾ *F. v. Teodorowicz*, Z. Pilzk. 10, 66 (1931).

⁹⁾ *K. Stuhlfauth* und *F. Jung*, Samml. Vergiftungsfälle, Arch. Toxikol. 14, A 998, 86 (1952).

¹⁰⁾ *E. Bostroem*, Dtsch. Arch. klin. Med. 32, 209 (1883).

¹¹⁾ *G. Dittrich*, Ber. dtsh. bot. Ges. 35, 27 (1917).

¹²⁾ *G. Herzog*, Münchener med. Wschr. 44, 1366 (1917).

¹³⁾ *F. Umber*, Dtsch. med. Wschr. 42, 627 (1916).

¹⁴⁾ *L. Welsmann*, Z. Pilzk. 13, 119 (1934).

¹⁵⁾ *R. Boehm* und *E. Kuelz*, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 19, 403 (1885).

¹⁶⁾ *S. Franke*, *U. Freimuth* und *P. H. List*, Arch. Toxikol. 22, 293 (1967).

nach Applikation unter den von *Franke* beschriebenen Symptomen. Für die weiteren Tierversuche nahmen wir Meerschweinchen, die sich im Gegensatz zu Mäusen und Ratten als ebenfalls empfindlich gegen das Lorchelgift erwiesen hatten. Nachdem *Franke*³⁾ bereits eine weitgehende Anreicherung des Giftes in Äther gelungen war, perforierten wir die von Alkohol befreiten Extrakte erschöpfend mit peroxidfreiem Äther. Die Kontrolle im Tierversuch ergab, daß alles Gift in die ätherische Phase übergegangen war. Unter ständiger Kontrolle im Tierversuch und gleichzeitiger Dünnschichtchromatographie wurde versucht, das Gift rein zu gewinnen. Dies gelang schließlich durch Destillation bei 0,5 Torr ohne zusätzliche Heizung in eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte Vorlage und der Reinigung des noch Alkohol und eine nach Schweiß riechende Verunreinigung enthaltenden Destillats. Die viskose, fast farblose, bei -10° erstarrende Flüssigkeit enthielt noch geringe Mengen Alkohol, die durch Tieftemperaturdestillation in der in Abb. 1 dargestellten Apparatur beseitigt wurden.

In den unter Vakuum abgeschmolzenen Ampullen erhielten wir so zunächst etwa 150 mg reinen Giftstoffes.

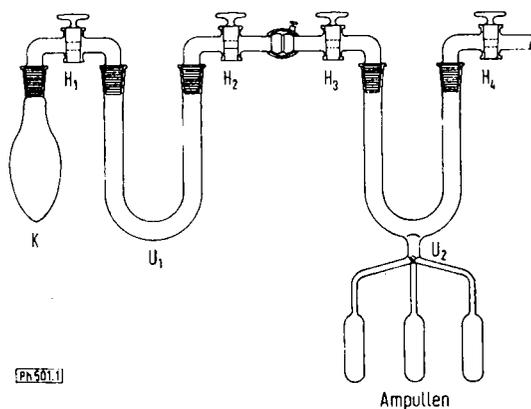


Abb. 1

PR 501.1

Im Lauf der Versuche wurden drei verschiedene Verfahren entwickelt, um zu dem von *Franke*, *Freimuth* und *List*¹⁶⁾ Gyromitrin genannten Gift zu kommen (Abb. 2). Verfahren 3 hat sich als das ergiebigste erwiesen.

Gyromitrin stellt eine farblose, bei Raumtemperatur flüssige Substanz dar. Sie hat etwa die Viskosität dünnflüssigen Speiseöls und kristallisiert bei Kühlung in tetragonalen, prismatischen, quaderförmigen Kristallen, die in der Ampulle unter Vakuum bei $19,5^{\circ}$ schmelzen. Der Siedepunkt des Giftstoffes konnte wegen seiner leichten Zersetzlichkeit nicht ermittelt werden. Bei Versuchen mit der Mikromethode nach *Emich*¹⁷⁾ färbte sich das Gyromitrin ab 60° braun und verharzte zusehends bei steigender Temperatur. Gyromitrin ist bei Raumtemperatur recht flüchtig*); es sublimiert im Hochvakuum.

*) Dampfdruckbestimmungen konnten der bisher zur Verfügung stehenden kleinen Mengen wegen noch nicht durchgeführt werden.

¹⁷⁾ *F. Emich*, Mh. Chem. 38, 219 (1917).

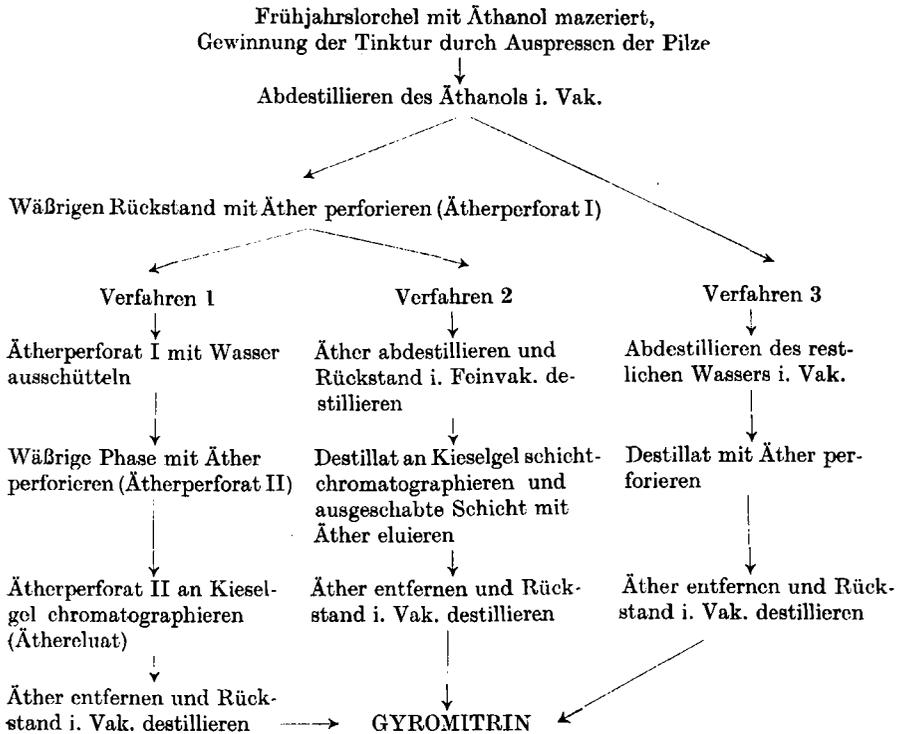


Abb. 2. Schema der drei angewandten Darstellungsverfahren für Gyromitrin

Der Giftstoff besitzt einen sehr schwachen, eigentümlichen Geruch, der etwas an Schokolade erinnert. Er ist löslich in Wasser, Methanol, Äthanol, Aceton, Essigester, Äther, Chloroform, Benzol, Methylenchlorid und Tetrachlorkohlenstoff.

Gyromitrin ist sehr empfindlich gegen Luftsauerstoff. Erst bei -25° nimmt die Autoxydation merklich ab. Das Oxydationsprodukt stellt eine braune Schmiere dar, die nach Maggi riecht. — Auffallend ist auch die leichte Zersetzlichkeit bei Temperaturen oberhalb 50° .

Beim Lösen von Gyromitrin in Wasser, wie es für die Tierversuche oft notwendig war, trat manchmal intensiver Geruch nach Acetaldehyd auf. Der gleiche Geruch entstand beim Behandeln mit verdünnten Säuren. Um das Entstehen von Acetaldehyd sicherzustellen, wurde Gyromitrin mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens versetzt. Es fiel ein gelber Niederschlag, der umkristallisiert bei 150° schmolz. Der dc Vergleich mit authentischem Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon ergab gleiche Laufstrecken. Bei der alkalischen Hydrolyse wurde als zweites Bruchstück ein Amin gefunden, das alkalische Kaliumpermanganatlösung reduzierte. Die Isonitrilreaktion fiel positiv aus. Beim Versuch, das oder die unbekanntenen Amine

bunden sein mußten. Eine Bande bei 1620 cm^{-1} wurde als $\text{C}=\text{N}$ -Valenzschwingung gedeutet.

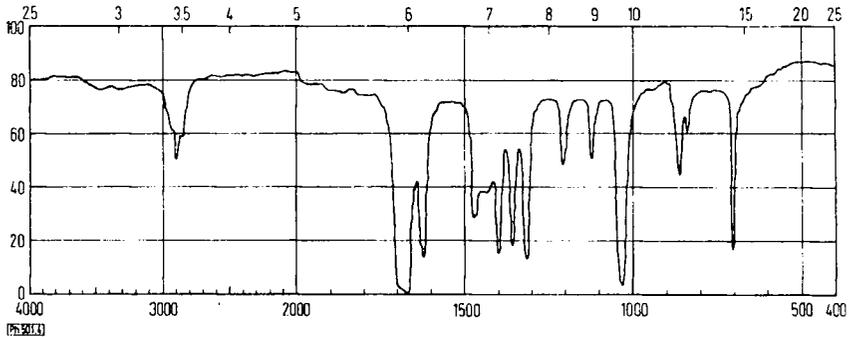


Abb. 4. IR-Spektrum des Gyromitrins

Im NMR-Spektrum lagen die Signale bei 1,67 ppm (τ) S, 2,99 ppm (τ) Q, 7,27 ppm (τ) S und 8,44 ppm (τ) D. Die Integration der Kurven ergab ein Protonenverhältnis von 1 : 1 : 3 : 3. Quartuplett und Dublett hatten die gleichen Kopplungskonstanten ($J = 5,5\text{ Hz}$), so daß hier vermutlich eine Methylgruppe in Nachbarschaft eines tertiären Kohlenstoffatoms vorlag. Das Singulett bei 7,27 ppm (τ) dürfte einer isoliert stehenden Methylgruppe zuzuordnen sein, während das zweite Singulett bei 1,67 ppm (τ) als Proton einer N-Formylgruppe interpretiert wurde. Für diese Annahme sprachen vor allem die Ergebnisse des IR-Spektrums, sowie der Vergleich mit dem NMR-Spektrum des Dimethylformamids, bei dem das Signal des Formylprotons bei 1,98 ppm (τ) liegt.

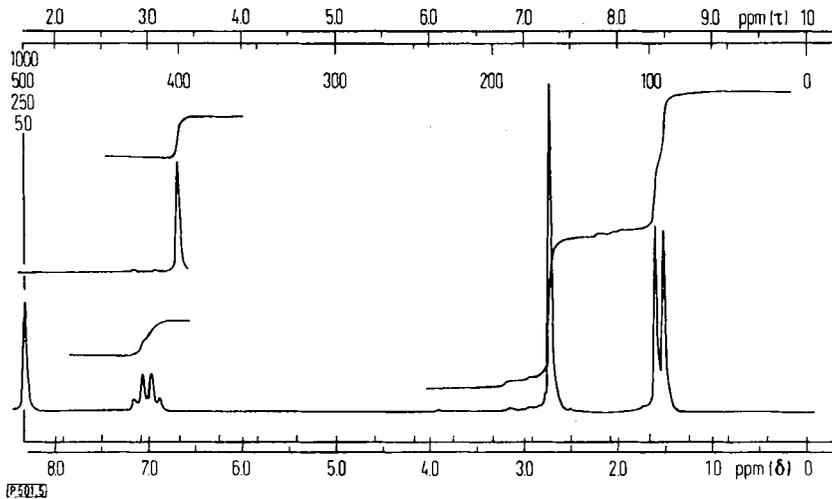
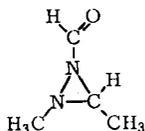
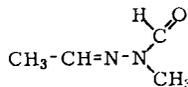


Abb. 5. NMR-Spektrum des Gyromitrins

Diese Analysenergebnisse beschränkten die Zahl der möglichen Strukturen auf zwei: die eines trisubstituierten Diaziridins (1-Formyl-2,3-dimethyl-diaziridin) oder eines Hydrazons (N-Methyl-N-formyl-acetaldehydhydrazon).



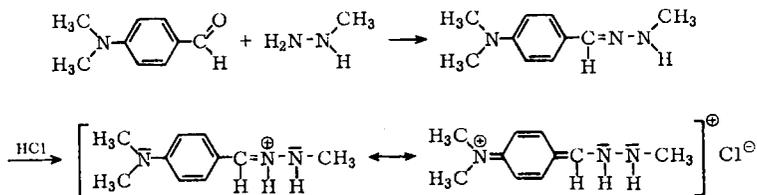
(1)



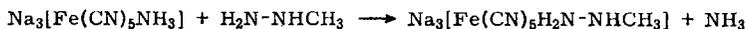
(2)

Beide Stoffe mußten zu Acetaldehyd und Methylhydrazin hydrolysieren. Im Hydrolysat mußte Ameisensäure nachweisbar sein. Die Prüfung bestätigte dies. Bei der sauren Hydrolyse entstand Methylhydrazin, das elektrophoretisch nachgewiesen wurde. Das gesuchte, Kaliumpermanganatlösung reduzierende „Amin“ war damit gefunden.

Außer durch Papierelektrophorese wurde Methylhydrazin mit Tüpfelreaktionen nachgewiesen. Beim Erwärmen von Gyromitrin mit einer sauren Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd und Tüpfeln der erkalteten Lösung auf Filtrierpapier entstand ein rosa Fleck, der im UV-Licht lachsfarben fluoreszierte. Dieser empfindliche Hydrazinnachweis beruht auf der Bildung von p-Dimethylaminobenzaldehydmethylhydrazon, das sich in saurer Lösung in das chinoide, nicht fluoreszierende Kation umlagert. Dieses bildet wahrscheinlich Adsorbate mit den sauren Bestandteilen des Papiers, die die Färbung und die Fluoreszenz bewirken¹⁹⁾.



Zu einem weiteren Hydrazinnachweis wurde Gyromitrin alkalisch hydrolysiert und nach Neutralisation mit einer Lösung von Natriumpentacyanoamminferat (II) versetzt. Die Mischung färbte sich tief rot. Vermutlich wird bei dieser Reaktion der Ammoniak im Cyanidkomplex durch das Hydrazin ausgetauscht²⁰⁾.

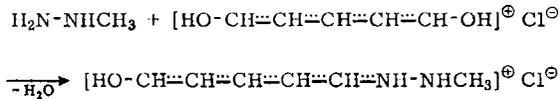


Glutaconaldehyd bildet mit Hydrazinen in stark saurer Lösung intensiv gefärbte Polymethinfarbstoffe²¹⁾. Wurden Spuren von Gyromitrin mit dem Reagenz betüpfelt, so entstand eine tief blutrote Farbe.

¹⁹⁾ F. Feigl, Tüpfelanalyse Bd. II: Organischer Teil, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main 1960, S. 303.

²⁰⁾ F. Feigl, V. Anger und O. Frehden, Mikrochemie 15, 181 (1943).

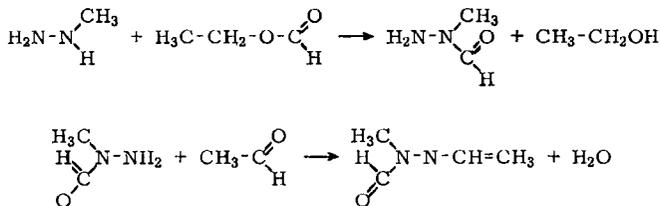
²¹⁾ V. Anger und S. Ofri, Mikrochim. Acta 1964, 626.



Die Formylgruppe des Giftstoffes konnte durch alkalische Hydrolyse zu Ameisensäure nachgewiesen werden. Diese wurde von Magnesium und Salzsäure zu Formylaldehyd reduziert, der positiven Ausfall der Chromotropsäurereaktion bewirkte.

Die Entscheidung, welche der beiden Strukturformeln dem Gyromitrin zukommt, ergab sich aus den unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Diaziridine werden nur sehr langsam von Säuren, oft erst nach mehrtägigem Stehen bei Raumtemperatur angegriffen. Sie bilden mit Säuren Salze, aus denen die Base durch Alkali unversehrt wieder freigesetzt werden kann (*Schmitz* und *Habisch*²²). Der Giftstoff dagegen wird sehr leicht von Säuren angegriffen und ist keinesfalls beständig gegen Alkali. Außerdem ist er ein Reduktionsmittel und empfindlich gegen Sauerstoff, während die Diaziridine als Oxydationsmittel in saurer Lösung Jodid zu Jod zu oxydieren vermögen. Diese Argumente sprachen für die Konstitution eines Hydrazons, zumal die Verbindung I ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält und optisch aktiv sein müßte. Es konnte jedoch bei Gyromitrin keine optische Drehung beobachtet werden. Das Gift der Frühjahrsorchel hat daher die Struktur eines N-Methyl-N-formylhydrazons des Acetaldehyds. Die Synthese bestätigte dies.

Für die Synthese des Gyromitrins wurde Methylhydrazin mit einer äthanolischen Lösung von Ameisensäureäthylester bei -15° umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und der nicht umgesetzten Ausgangsstoffe am Rotationsverdampfer blieb bei 85proz. Ausbeute reines farbloses N-Methyl-N-formylhydrazin zurück. Dieses wurde bei -15° mit der äquivalenten Menge frisch destillierten Acetaldehyds, gelöst in Äther, versetzt. Das entstandene Wasser wurde anschließend durch Rühren mit getrocknetem Natriumsulfat bei Raumtemperatur aus dem Reaktionsgemisch entfernt.



Nach Abdampfen des Äthers wurde Gyromitrin schichtchromatographisch gereinigt und mittels des bei der Isolierung des natürlichen Giftstoffes verwendeten Apparates destilliert und in Ampullen eingeschmolzen. Das Syntheseprodukt er-

²²) E. Schmitz und P. Habisch, Chem. Ber. 95, 680 (1962).

wies sich durch Vergleich des IR-Spektrums, des Schmelzpunktes, der Kristallform und des dc Verhaltens mit der aus den Pilzen isolierten Substanz identisch.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. W. Schmid, Pharmakologisches Institut Marburg, für die Ermöglichung und Leitung der Tierversuche.

Beschreibung der Versuche

Ausgangsmaterial

Es standen 2 Jahresernten von je etwa 50 kg in der Lüneburger Heide frisch nach dem Sammeln in Äthanol eingelegte Frühjahrsorcheln zur Verfügung. Jeweils 25 kg Frischpilze wurden in 25 l Äthanol konserviert und in 50-l-Polyäthylenbehältern bei + 4° gelagert. Die Lagerungsdauer von der Ernte bis zur Verwendung zu den Untersuchungen betrug durchschnittlich 1 Jahr.

Dünnschichtchromatographie

Schicht: Kieselgel GF₂₅₄, bei 105° aktiviert. Laufmittel: Methylenchlorid-Methanol = 9 + 1. Detektion: Joddampf.

Reindarstellung des Giftstoffes durch Destillation

Die Apparatur (Abb. 1) bestand aus 2 U-Rohren (U₁ und U₂), von denen eines mit 3 angeschmolzenen Ampullen versehen war. Als Verbindung dienten NS 14,5 Schliffteile mit Hähnen (H₁—H₄). Der Kugelschliff zwischen den beiden Rohren erlaubte es, diese leicht von der übrigen Apparatur zu trennen, was beim Abschmelzen der Glasampullen wichtig war. An Hahn 4 schloß sich über ein Hg-Manometer zwischen 2 in flüssigen Stickstoff tauchenden Kältefallen die Ölpumpe an.

Die nach der Schichtchromatographie anfallende ätherische Lösung des Giftstoffes wurde am Rotationsverdampfer bis auf wenige ml eingeeengt, in einen 25-ml-Spitzkolben überführt und hieraus der restliche Äther auf die gleiche Weise entfernt. Den Rückstand versetzten wir zum Trocknen und zur Vergrößerung der Oberfläche unter Kühlen mit einigen Körnchen Sikkon. Das poröse Material hatte nach kurzer Zeit die Flüssigkeit aufgesaugt. Nun wurde das Kölbchen an U₁ angeschlossen. Nach Schließen des Hahnes 1, bei geöffneten Hähnen 2—4, evakuierten wir die Apparatur. Dann wurde Hahn 1 vorsichtig geöffnet und U₁ mit Methanol-Kohlendioxid auf — 30° gekühlt. In der Vorlage kondensierte bei 0,2 Torr langsam eine wasserhelle Flüssigkeit. Nach etwa 10 Min. wurde Hahn 1 geschlossen und die Kühlung von U₁ entfernt. Die Flüssigkeitsmenge verringerte sich zusehends unter Zurücklassung von langen, weißen Kristallen. Jetzt wurde schnell wieder gekühlt und Hahn 1 geöffnet. Die erhaltenen Kristalle wirkten als Impfkristalle, so daß sich die Innenseite des mit dem Spitzkolben verbundenen Schenkels mit einem Netz von langen, schmalen Kristallen bedeckte, während sich am Boden des U-Rohres wieder Flüssigkeit ansammelte. Als sich keine neuen Kristalle mehr bildeten, also aller Giftstoff aus dem Spitzkolben in das U-Rohr übergegangen war, wurden durch mehrmaligen Wechsel zwischen Kühlen und Entfernung der Kühlung auch die letzten Flüssigkeitsreste entfernt. Zur weiteren Rektifizierung wurde das Verfahren mit U₂ als Vorlage wiederholt. Dazu wurde die Kühlung von U₁ entfernt und U₂ gekühlt. Bei dieser zweiten Stufe kondensierte nur noch wenig Flüssigkeit. Auch hier war bald die ganze Innenseite des mit U₁ verbundenen Schenkels mit einem Netz von Kristallen bedeckt. Nachdem der Inhalt von U₁ verdampft war, wurde Hahn 3 geschlossen und die Kühlung entfernt. Nach Vertreiben des Äthanols wurde auch Hahn 4 geschlossen und die Kristalle vorsichtig durch

Erwärmen mit der Hand geschmolzen. Durch Schrägstellen des U-Rohres verteilen wir die entstandene Flüssigkeit möglichst gleichmäßig in die drei Ampullen, die anschließend abgeschmolzen wurden. Auf diese Weise konnten etwa 150 mg reinen Giftstoffes gewonnen werden.

Elementaranalyse²³⁾

Durch Erhitzen von etwa 5 mg Gyromitrin mit Kalium und Überführen des Reaktionsgemisches in Wasser wurde eine Aufschlußlösung hergestellt, die auf Stickstoff (*Lassaigne*-Probe positiv), Schwefel (Probe mit Natriumnitrosylpentacyanoferrat (II) negativ), Halogene (Probe mit Silbernitrat negativ), geprüft wurde.

$C_4H_8N_2O$ (100,1)	Ber.: C 47,98	H 8,05	N 27,98
	Gef.: C 47,76	H 8,03	N 27,72

Identifizierung des Acetaldehyds

Etwa 2,5 mg Gyromitrin wurden in wenig Wasser gelöst und mit 1 ml 2,4-Dinitrophenylhydraziniumperchloratlösung versetzt (1,2 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden in 50 ml 30proz. Perchlorsäure gelöst). Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und zweimal aus Äthanol auskristallisiert. Schmp. 150°.

Zum Vergleich wurde aus frischdestilliertem Acetaldehyd ebenfalls durch Fällen mit 2,4-Dinitrophenylhydraziniumlösung das Hydrazon hergestellt. Die DC wurden auf Kieselgel G mit Tetrachlorkohlenstoff, Essigester und Hexan (100 : 10 : 20) nach ²⁴⁾ entwickelt. Beide Stoffe hatten den gleichen Rf-Wert.

Alkalische Hydrolyse, Isonitrilreaktion, Elektrophorese

5 mg Gyromitrin wurden in wenig Wasser gelöst, mit einem Tropfen 0,1 n NaOH versetzt und 10 Min. in ein Wasserbad von 80–90° gestellt. Dabei trat Geruch nach Amin auf. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit verd. Essigsäure angesäuert und am Rotationsverdampfer auf etwa 0,5 ml konzentriert.

Ein Teil der Lösung wurde in 1 ml Äthanol gelöst und mit 2 ml verd. Natronlauge, sowie einigen Tropfen Chloroform gekocht. Es entstand Isonitrilgeruch. Der Rest des alkalischen Hydrolysats wurde papierelektrophoretisch untersucht. (Gerät: Pherograph Original Frankfurt nach *Wieland-Pfleiderer*.)

Papier: MN-Chromatographiepapier 2872 (*Macherey, Nagel u. Co.*).

Puffer pH 3,5 (Pyridin, Essigsäure, Wasser 1 + 9 + 90).

Spannung: 650 V. Temperatur: 0°. Laufzeit: etwa 2 Std.

Sprühreagens: 1.: Ninhydrin 0,25 g, Collidin 5 ml, Methanol 95 ml²⁵⁾. 2.: 1 Vol. $KMnO_4$ 1% + 1 Vol. Na_2CO_3 2%²⁵⁾.

Die Laufstrecke für das unbekannte Amin betrug 19,6 cm, für Äthylamin 19,3 cm.

NMR-Spektrum

Gerät Varian A 60. Temperatur 35°, sweep time 500 Sek., sweep offset 100 Hz.

²³⁾ *I. Houben und Th. Weyl*, Methoden der organischen Chemie, Band II, Analytische Methoden, Gg. Thieme Verlag, Stuttgart 1953, S. 9.

²⁴⁾ *A. Mehlitz, K. Gierschner und Th. Minas*, Chemiker-Ztg./Chem. Apparatur 87, 573 (1963).

²⁵⁾ *E. Merck*, Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, E. Merck AG, Darmstadt.

Hydrazinnachweis mit p-Dimethylaminobenzaldehyd

Wenig Gyromitrin wurden mit einem Tropfen Wasser gelöst und mit einem Tropfen einer sauren p-Dimethylaminobenzaldehydlösung (0,4 g p-Dimethylaminobenzaldehyd werden in 200 ml Äthanol gelöst und mit 2 ml Salzsäure angesäuert) 10 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Verdünnen mit einem Tropfen Wasser wurde etwas von der Lösung auf Filtrierpapier getupfelt und das Papier in Salzsäure (1 : 250) gebadet. Es bildete sich ein rosa Fleck, der unter der UV-Lampe lachsrot fluoreszierte.

Hydrazinnachweis mit Natriumpentacyanoamminferrat(II)

Wenig Gyromitrin wurde alkalisch hydrolysiert, neutralisiert und anschließend mit einer 1proz. Lösung von $\text{Na}[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$ versetzt. Die Mischung färbte sich tief rot.

Hydrazinnachweis mit Glutaconaldehyd

Glutaconaldehyd wurde bei Bedarf durch Umsetzung von 4-Pyridyl-pyridiumdichlorid mit Natronlauge gewonnen²⁶⁾. Zur Durchführung der Probe wurde wenig Gyromitrin auf der Tüpfelplatte mit einem Tropfen einer wäßrigen Lösung von 4-Pyridyl-pyridiniumdichlorid (1%) vermischt, mit einem Tropfen n NaOH versetzt und schließlich mit einem Tropfen konz. Salzsäure angesäuert. Es trat eine tiefrote Farbe auf.

Nachweis des Formylrestes

Wenig Gyromitrin wurde alkalisch hydrolysiert und mit 2 n HCl angesäuert. Nun wurde Magnesiumpulver zugesetzt, bis keine Gasentwicklung mehr auftrat. Nach Zugabe von 3 ml Schwefelsäure und wenig Chromotropsäure färbte sich die Mischung durch Erwärmen im Wasserbad bei 60° tief violett.

Darstellung von N-Methyl-N-formylhydrazin

In einem kleinen Dreihalskölbchen wurden 4,6 g (0,1 Mol) Methylhydrazin tropfenweise unter Rühren mit 7,4 g (0,1 Mol) Ameisensäureäthylester in 10 ml absol. Äthanol versetzt. Zulauf und Kühlung wurden so geregelt, daß die Temperatur bei etwa -15° lag, jedoch nie über 0° stieg. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch noch etwa 10 Min. gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel und nicht umgesetzte Ausgangsstoffe entfernt, wobei die Temperatur des Wasserbades allmählich auf 70° gesteigert wurde. Es entstand eine viskose farblose Flüssigkeit. Ausbeute 6,3 g (85% d. Th.).

Darstellung von Gyromitrin

In einem kleinen Dreihalskölbchen wurden 7,4 g (0,1 Mol) N-Methyl-N-formylhydrazin tropfenweise unter Rühren mit 4,4 g (0,1 Mol) frischdestilliertem Acetaldehyd in 50 ml Äther versetzt. Die Reaktion wurde bei -15° ausgeführt. Nach Beendigung der Aldehydzugabe wurde das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und 15 Min. mit trockenem Natriumsulfat gerührt. Das Lösungsmittel wurde nun am Rotationsverdampfer entfernt und das entstandene Gyromitrin schichtchromatographisch gereinigt. In der bei der Reindarstellung des natürlichen Pilzgiftes beschriebenen Apparatur wurde das Syntheseprodukt destilliert und in Ampullen eingeschmolzen.

²⁶⁾ E. Koenigs und H. Greiner, Chem. Ber. 64, 1052 (1931).