

80. Isolierung von (–)-R-4-Hydroxy-pyrrolidon-(2) und einigen weiteren Verbindungen aus *Amanita muscaria*

31. Mitteilung über Inhaltsstoffe von Fliegenpilzen¹⁾

von T. Matsumoto²⁾, W. Trueb³⁾, R. Gwinner und C. H. Eugster

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich, Rämistrasse 76, 8001 Zürich

(20. II. 69)

Zusammenfassung. Aus Carpophoren von *Amanita muscaria* (L. ex Fr.) HOOKER wurden neu β -n-Butyl-D-glucopyranosid, (–)-R-4-Hydroxy-pyrrolidon-(2), Uracil, Hypoxanthin und (–)-1, 2, 3, 4-Tetrahydro-1-methyl- β -carbolin-3-carbonsäure isoliert.

Bei der Isolierung von *Muscimol*⁴⁾ (VI) und *Ibotensäure*⁴⁾ (V) aus Fliegenpilzen (*Amanita muscaria* (L. ex Fr.) HOOKER) mit Hilfe des Narkosepotenzierungstestes [2] [3] wurden gelegentlich Fraktionen mit narkose-antagonisierender Wirkung beobachtet⁵⁾, so vor allem bei den butanollöslichen Anteilen.

Es zeigte sich nun, dass in solchen Fraktionen (–)-R-4-Hydroxy-pyrrolidon-(2)(II) enthalten ist.

Zur Isolierung dienten die üblichen Extrakte aus frischen Fruchtkörpern von Fliegenpilzen, die nach Eindampfen zum dünnen Sirup zuerst mit Äther entfettet und darauf mit wassergesättigtem Butanol erschöpfend extrahiert wurden [3]. In der Wasserphase blieben u. a. die sehr polaren Stoffe Ibotensäure und Muscimol⁶⁾. Hierauf wurde der Butanolextrakt an Aluminiumoxid (neutral) mit wassergesättigtem Butanol als Fliessmittel⁷⁾ chromatographisch aufgetrennt. Dabei wurden neben II noch die folgenden Stoffe identifiziert (aufgeführt in der Reihenfolge der Elution):

1) Aus früh-austretenden Fraktionen: das bitter schmeckende β -n-Butyl-D-glucopyranosid (*Ia*), identifiziert durch NMR.-Analyse des Tetracetates (*Ib*)⁸⁾ und Vergleich mit einem nach BOURQUELOT & BRIDEL [6] synthetisierten Präparat (analytische Daten unseres Produktes vgl. Tabelle).

Die bisher unseres Wissens in der Natur noch nie festgestellte Verbindung *Ia* ist wohl kaum als solche im Fliegenpilz enthalten, sondern dürfte sich während der Extraktion aus einem noch unbekannten und offensichtlich recht labilen Glucosid

¹⁾ 30. Mitteilung vorangehend.

²⁾ Hokkaido University, Sapporo, Japan, z. Z. Gast am Organisch-chemischen Institut der Universität Zürich.

³⁾ Jetzige Adresse: SANDOZ AG, Basel.

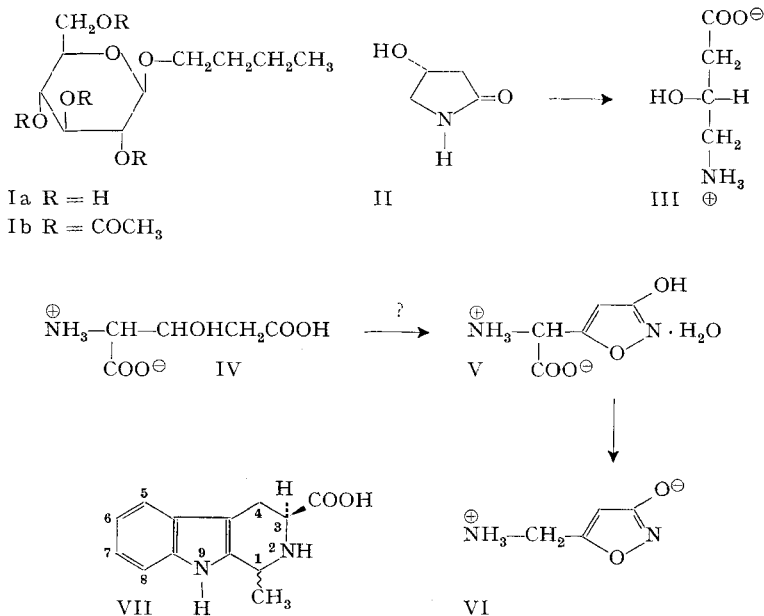
⁴⁾ Nomenklatur siehe [1].

⁵⁾ Z. B. die Fraktionen 2b:2 und 2b:3 in [2], pag. 61, und in [3], pag. 921.

⁶⁾ Muscarin und Cholin gehen zum grössten Teil in die Butanolphase über [3]. Wir vermuten, dass SWENBERG *et al.* [4] bei der Isolierung von Muscarin aus Kulturen von *Clitocybe rivulosa* (PERS. ex FR.) KUMMER, durch die angewendete Entfettung mittels Butanolextraktion beträchtliche Verluste an Muscarin erlitten haben.

⁷⁾ Verfahren von TH. WIELAND *et al.* [5].

⁸⁾ Wir danken Herrn cand. chem. T. WINKLER für 100-MHz-NMR.-Spektren und für zahlreiche Spinentkopplungsexperimente.

Formelschema. Verbindungen aus *Amanita muscaria*

oder Glucose-ester durch Reaktion mit dem *n*-Butanol gebildet haben. Sie beweist übrigens das Vorkommen von D-Glucose in europäischen Fliegenpilzen (vgl. [7]).

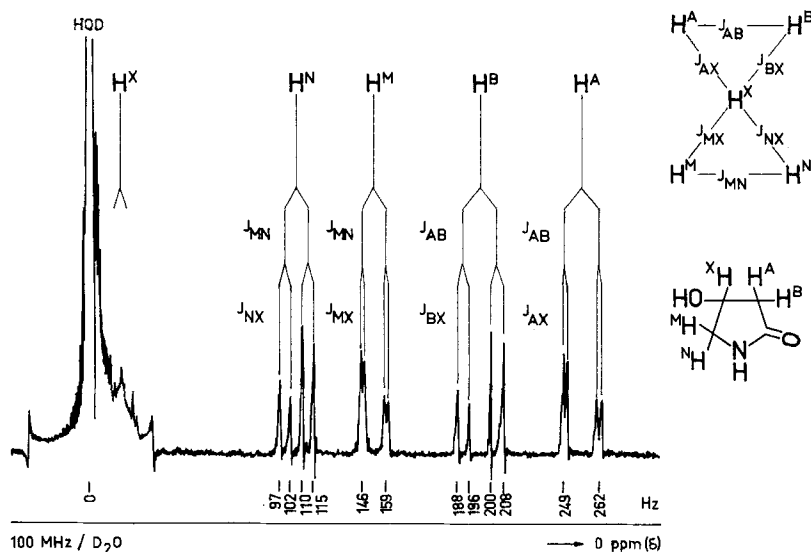
2) In darauffolgenden Fraktionen: (–)-*R*-4-Hydroxy-pyrrolidon-(2) (II), welches auf Papierchromatogrammen zuerst mit Hilfe des Cl_2 -Benzidin-Testes [8] nachgewiesen werden konnte. Es liess sich aus angereicherten Fraktionen durch Vakuumsublimation und Umkristallisation rein herstellen. Seine Struktur ergab sich aus Analysen, NMR.- und IR.-Spektren (siehe Tabelle und Figur) und D-Austausch ($2\text{H} \rightarrow 2\text{D}$).

Das Protonenresonanzspektrum (D_2O) zeigt bei δ ca. 4,5 ppm ein verdecktes Multipllett (Hx) und anschliessend gegen höheres Feld 16 Linien, von denen je 4 aufeinanderfolgende Signale gleiche Integrale aufweisen. Wir interpretieren es als *ABMN*X-Spektrum (vgl. Figur), wobei *AB* und *MN* primäre Partner je eines *AB*-Systems darstellen, welche durch zusätzliche und offenbar aus sterischen Gründen unterschiedliche Kopplungen mit dem *X*-Partner gestört erscheinen. Das Auftreten zweier nicht vinylischer *AB*-Systeme in einer so kleinen Molekel kann am ehesten durch die unmittelbare Nachbarschaft zu einem chiralen Zentrum interpretiert werden, da die chemische Verschiebung 0,44 bzw. 0,58 ppm beträgt. Diese Schlussfolgerungen wurden durch Vergleich mit einem racemischen synthetischen Produkt (hergestellt nach [9]) bestätigt. Milde Verseifung des Naturproduktes mittels $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung gab die konfiguratив bekannte [10] (–)-*R*- γ -Amino- β -hydroxy-buttersäure (III).

(–)-*R*-4-Hydroxy-pyrrolidon-(2) ist hiermit zum erstenmal in der Natur nachgewiesen worden. Als Derivat der γ -Aminobuttersäure verdient es auch im Zusammenhang mit der noch unaufgeklärten Biogenese von *Ibolensäure* (V), besondere Be-

Analytische Eigenschaften der isolierten Verbindungen^{a)}

	Ia	Ib	II	VII
Smp.	86–88°	64–65°	153,5–155°	> 290° (Zers.)
$[\alpha]_D$	– 38,4° (CH ₃ OH)	– 26° (CHCl ₃)	– 44,5° (CH ₃ OH), – 45,8° (H ₂ O)	– 142,8° (Pyridin- H ₂ O 1:1)
λ_{max} , nm	–	–	–	219, 271, 277, S 280, 287 (CH ₃ OH)
ν_{max} , cm ^{–1}	ca. 3300, 2915, 2865	2959, 2874, 1757 (CHCl ₃)	3257, 3155, 2941, 1661 ^{b)} (KBr)	3300, 1645, 1580, 746, 741 (KBr)
Rf, PC, WHATMAN 1	0,95	–	0,56 Lösgrm. 14	0,5 Lösgrm. 14
Migration, Elektrophorese	–	–	22 mm/h, pH 1,9 als Kation	22 mm/h, pH 1,9 zur Kathode
Farbreaktionen	KMnO ₄ alkalisch	–	Cl ₂ /Benzidin: blau; J ₂ : gelb	Cl ₂ /Benzidin: blau; Ninhydrin: blass- bräunlich; EHRlich: rosa

^{a)} Methodisches siehe [3].^{b)} Spitze einer sehr breiten, mit mehreren Inflexionen auftretenden Bande.

NMR.-Spektrum von (–)-R-4-Hydroxy-pyrrolidon-(2)

achtung. Wir vermuten, dass die Aminodicarbonsäure IV sowohl für II, als auch für V Vorläufer sein könnte. Bisher sind weder III noch IV aus Fliegenpilzen isoliert worden.

Der Gehalt an II in frischen Fliegenpilzen scheint sehr gering zu sein; quantitative Bestimmungen fehlen. Da auch eine pharmakologische Untersuchung von II aussteht, kann über seine eventuelle Mitverantwortung an den toxischen Wirkungen des Fliegenpilzes noch nichts ausgesagt werden.

3) Aus anschliessenden Fraktionen fielen ferner kristallisiert an: *Uracil*⁹⁾ (in bedeutenden Mengen), *Hypoxanthin*¹⁰⁾ und die (–)-1,2,3,4-Tetrahydro-1-methyl- β -carbolin-3-carbonsäure (VII)¹¹⁾. Ihre Struktur ergab sich aus Analysen und Spektren und wurde durch Vergleich mit einem nach [13] hergestellten Präparat bestätigt. Die Verbindung könnte sich möglicherweise aus (–)-Tryptophan und Acetaldehyd usw. gebildet haben, vgl. [14].

Verdankungen. Wir danken Herrn H. J. LEUENBERGER für Mithilfe bei den Aufarbeitungen und für Vorversuche; Herrn T. WINKLER für Aufnahme von 100-MHz-NMR.-Spektren; dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS für die Finanzierung dieser Arbeit.

Experimentelles. – 1. *Chromatographie an Aluminiumoxid:* 210 g Butanolextrakt aus Ernte 1964¹²⁾ wurden an 4 kg Aluminiumoxid (neutral, WOELM) mit wassergesättigtem Butanol, wie in [3] beschrieben, chromatographiert; aufgefangen wurden Fraktionen zu 32 ml (650 Tropfen). Das Butylglucosid Ia befand sich in Fraktionen 41–115, Hydroxypyrrolidon und Uracil in Fr. 105–145, Muscarin und Cholin in Fr. 130–210, Hypoxanthin in Fr. 210–240, die Tetrahydrocarbolincarbon-säure in Fr. 225–270.

2. *Butylglycosid Ia.* Zur Reinigung wurden die Ia-haltigen Fraktionen aus mehreren Aufarbeitungen mit Chloroform behandelt und der lösliche Anteil (28,7 g), an 1,5 kg SiO₂-Celite mit Isopropanol-Äther 3:1 chromatographiert. Die Substanz aus den Spitzenfraktionen, ein gelbliches, rasch kristallisierendes Öl, ergab aus Essigester-Äther 5,5 g umkristallisiertes Produkt, Smp. 74–85°. Nach Umkristallisationen aus Aceton-Diisopropyläther, Aceton-Äther und Methylisopropylketon und Hochvakuumdestillation (in kleinen Portionen, Kugelrohr, Bad 145°, 0,001 Torr) wurde Smp. 86–88° erreicht.

C₁₀H₂₀O₆ (236,26) Ber. C 50,83 H 8,53% Gef. C 50,46 H 8,58%

Das *Acetat Ib* (Pyridin-Essigsäureanhydrid, 2 h/70–80°) wurde aus Methanol-Petroläther umkristallisiert; Prismen.

C₁₈H₂₈O₁₀ (404,40) Ber. C 53,46 H 6,98% Gef. C 53,74 H 7,36%

3. *Hydroxy-pyrrolidon II.* Die II-haltigen Fraktionen (10,5 g) wurden mit Methanol behandelt (Abscheidung von Uracil) und das Lösliche erneut an 1 kg Aluminiumoxid mit wassergesättigtem Butanol chromatographiert. Fraktionen zu 12 ml. Die Substanz aus Fraktionen 66–119 wurde in kleinen Portionen im Kugelrohr (105–130°/0,001 Torr) destilliert. Das erhaltene Sublimat wurde nach Waschen mit etwas Äther mehrmals aus Methanol-Äther umkristallisiert und erneut im Vakuum sublimiert. In Wasser und niederen Alkoholen leicht lösliche Substanz.

C₄H₇NO₂ (101,10) Ber. C 47,52 H 6,98 N 13,86% Gef. C 47,96 H 7,08 N 13,88%

4. (–)-R- γ -Amino- β -hydroxy-buttersäure (III). 32,7 mg II und 0,33 ml gesättigte Ba(OH)₂-Lösung wurden in einem kleinen, zur langen Kapillare ausgezogenen Röhrchen 1 h auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nachher Abkühlen, Neutralisieren mit 0,05N H₂SO₄, Zentrifugieren, Eindampfen und erhaltenes gelbes Öl aus H₂O-Äthanol kristallisieren; $[\alpha]_D^{21} = -18,8^\circ$ (H₂O); in PE. und PC. identisch mit racemischer Verbindung (FLUKA).

5. *Uracil und Hypoxanthin* wurden durch Umkristallisation aus Wasser gereinigt und durch Vergleich mit authentischen Präparaten identifiziert.

6. Die *Tetrahydrocarbolincarbon-säure VII* wurde durch Umkristallisationen aus Wasser (Norit) gereinigt; farblose Nadeln.

C₁₃H₁₄N₂O₂ (230,26) Ber. C 67,81 H 6,13 N 12,17% Gef. C 68,01 H 6,41 N 12,04%

⁹⁾ Entspricht der methanolunlöslichen Substanz B aus Fr. 2b.4 in [2], pag. 31/62.

¹⁰⁾ Bereits von BUSCHMANN [11] im Fliegenpilz wahrscheinlich gemacht. In Mutterlaugen und anderen Fraktionen dürften sich noch andere Purin- und Pyrimidin-Derivate befinden; eine genauere Untersuchung wurde von uns nicht beabsichtigt; *Adenosin* ist von uns früher [12] aus Cellulose-Chromatogrammen erhalten worden.

¹¹⁾ Entspricht dem Indolderivat mit Rf = 0,6 aus Fraktion 2b.3 in [2], pag. 31/62.

¹²⁾ Hergestellt nach [3], Seite 920: B. Allgemeine Aufarbeitung, Weg 2.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. H. EUGSTER & T. TAKEMOTO, *Helv.* **50**, 126 (1967).
- [2] G. F. R. MÜLLER, Beiträge zur Kenntnis der Inhaltsstoffe des Fliegenpilzes, Dissertation, Universität Zürich 1961.
- [3] G. F. R. MÜLLER & C. H. EUGSTER, *Helv.* **48**, 910 (1965).
- [4] M.-L. L. SWENBERG, W. J. KELLEHER & A. E. SCHWARTING, *Science* **155**, 1259 (1967).
- [5] TH. WIELAND & W. SCHÖN, *Liebigs Ann. Chem.* **593**, 157 (1955).
- [6] E. BOURQUELOT & M. BRIDEL, *C. r. hebdomadaire des Séances Acad. Sci.* **155**, 437 (1912).
- [7] J. L. BONNET, *Bull. Soc. Mycol. France* **75**, 215 (1959); G. TALBOT & L. C. VINING, *Canad. J. Botany* **41**, 639 (1963).
- [8] F. REINDEL & W. HOPPE, *Chem. Ber.* **87**, 1103 (1954).
- [9] M. TOMITA & T. FUKAGAWA, *Z. physiol. Chem.* **178**, 302 (1928).
- [10] T. KANEKO & R. YOSHIDA, *Bull. chem. Soc. Japan* **35**, 1153 (1962).
- [11] E. BUSCHMANN, *Pharmaz. Post* **45**, 453 (1911), *ref. Chem. Zbl.* **1912**, II, 613.
- [12] C. H. EUGSTER, *Helv.* **39**, 1002 (1956).
- [13] W. A. JACOBS & L. C. CRAIG, *J. biol. Chemistry* **113**, 759 (1936).
- [14] R. TSCHESCHE, H. JENSSEN & P. N. RANGACHARI, *Chem. Ber.* **91**, 1732 (1958).

81. Zur Kenntnis der VAN SLYKE-Reaktion des Muscimols und anderer 3-Hydroxyisoxazole

32. Mitteilung über Inhaltsstoffe von Fliegenpilzen¹⁾

von M. Fräter-Schröder, R. Good²⁾ und C. H. Eugster

Organisch-chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, 8001 Zürich

(20. II. 69)

Zusammenfassung. 3-Hydroxyisoxazole werden unter sehr milden Bedingungen zu instabilen N-Nitrosoverbindungen nitrosiert, welche in verdünnter Essigsäure rasch in N₂O und CO₂ zerfallen. Die Reaktion kann als Mikromethode zur Erkennung von 3-Hydroxyisoxazolen benutzt werden. Die Synthese mehrerer neuer 3-Hydroxyisoxazole wird angegeben.

Bei der chemischen Untersuchung der Fliegenpilz-Inhaltsstoffe *Muscimol* (I) und *Ibotensäure* (II) fielen die sehr hohen Werte auf, die bei der Bestimmung der primären Aminogruppen nach VAN SLYKE erhalten wurden³⁾, vgl. Tabelle.

Die nähere Untersuchung hat nun gezeigt, dass diese Erscheinung bei allen 3-Hydroxyisoxazolen anzutreffen ist, nicht aber bei den N-Acetylderivaten (2-Acetyl-3(2*H*)-isoxazolonen), z. B. VIII, den Isoxazolen, z. B. IX, den 5(4*H*)-Isoxazolen, z. B. IV, den 2(3*H*)-Oxazolonen, z. B. Muscazon (V), und den Oxazolidin-2-onen, z. B. *erythro*-Dihydromuscazon (VI).

Da es sich bei 3-Hydroxyisoxazolen um Iminolformen von Lactamen und zwar von cyclischen Hydroxamsäuren handelt, konnte vermutet werden, dass es sich bei dem zusätzlich entwickelten Gas um N₂O handle⁴⁾. Von aliphatischen Hydroxamsäuren

¹⁾ 31. Mitteilung vorangehend.

²⁾ Jetzige Adresse: J. R. GEIGY AG, Basel.

³⁾ Ausgeführt von Herrn H. FROHOFER 1963 und 1965 nach der Methode von KAINZ [1].

⁴⁾ Wir danken Herrn Prof. A. ESCHENMOSER, ETH Zürich, der in einer Diskussion erstmals auf diese Möglichkeit hingewiesen hatte.