

3-Methylriboflavin aus *Panellus serotinus* (Agaricales)

Pigments of Fungi, XXXII

3-Methylriboflavine from *Panellus serotinus* (Agaricales)

Wolfgang Steglich und Lothar Zechlin

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

(Z. Naturforsch. **32 c**, 520–522 [1977]; eingegangen am 7. April 1977)3-Methylriboflavine, Pigments, Fungi, *Panellus*

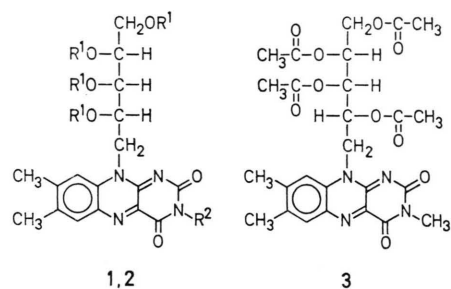
The isolation and identification of 3-methylriboflavine from the toadstool *Panellus serotinus* is described.

Die Fruchtkörper des Gelbstieligen Muschelings, *Panellus serotinus* (Pers. ex Fr.) Kühn., kommen vom Herbst bis in den Winter an Laubholzstümpfen vor. Die Pilze sind auf der Huthaut olivgrün, an Lamellen und Stiel gelb gefärbt und zeigen im UV-Licht eine gelbe Fluoreszenz.

Zur Isolierung der Farbstoffe wurden die gefriergetrockneten Fruchtkörper mit wäßrigem Methanol extrahiert und die gelben Lösungen nach Entfetten an Sephadex chromatographiert. Die intensiv gelb fluoreszierende Fraktion zeigte im DC ² einen Hauptfleck neben geringen Mengen eines zweiten gelben Farbstoffes. Da eine chromatographische Abtrennung dieser Komponente an Sephadex nicht gelang, wurde das Gemisch acetyliert und anschließend an acetyliertem Polyamid aufgetrennt.

Das Acetat des Nebenfarbstoffs erwies sich nach UV-, ¹H-NMR- und MS-Spektrum als identisch mit Riboflavin-tetraacetat (**1b**). Auch der freie Farbstoff war dünnschichtchromatographisch nicht von Riboflavin (**1a**) zu unterscheiden.

Das Acetat des Hauptfarbstoffs zeigte im hochaufgelösten MS ein Molekül-Ion *m/e* 558, C₂₆H₃₀N₄O₁₀, und einen Basispeak *m/e* 256, C₁₃H₁₂N₄O₂, was mit einem Methylriboflavin-tetraacetat zu vereinbaren ist³. Dies wird durch das ¹H-NMR-Spektrum bestätigt, in dem neben den typischen Signalen von **1b** zusätzlich das einer N-Methylgruppe bei $\delta = 3,50$ ppm (in CDCl₃) zu sehen ist. Da das Absorptionsspektrum praktisch mit dem von **1b** übereinstimmt, kann die Verbindung nur 3-Methylriboflavin-tetraacetat (**2b**) sein.



- 1a: R¹ = R² = H
 1b: R¹ = Ac, R² = H
 2a: R¹ = H, R² = CH₃
 2b: R¹ = Ac, R² = CH₃

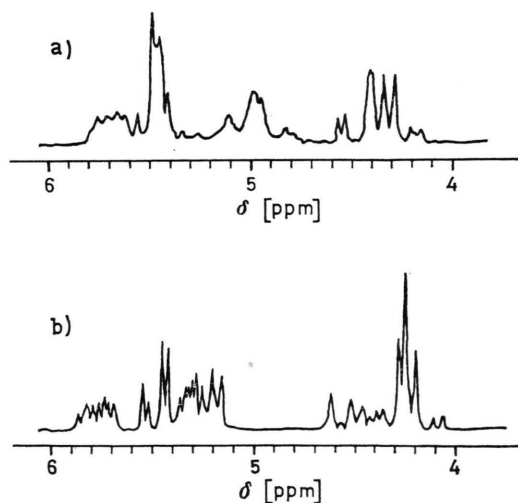


Abb. 1. Ausschnitt aus dem 90-MHz-¹H-NMR-Spektrum von a) **2b**; b) **3** (in CDCl₃).

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Steglich, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, Max-Planck-Str. 1, D-5300 Bonn.

Zum Vergleich wurde **2b** durch Methylieren von **1b** hergestellt⁴. Die Ribit- und Acetatsignale der

^1H -NMR-Spektren von natürlichem und synthetischem **2b** waren deckungsgleich, so daß an der Konfiguration der Seitenkette kein Zweifel besteht⁵. 3-Methylaraboflavin-tetraacetat **3** zeigte dagegen im genannten Bereich große Unterschiede (Abb. 1).

Saure Hydrolyse von synthetischem **2b** lieferte 3-Methylriboflavin (**2a**)⁶, das im UV-Spektrum und chromatographischen Verhalten mit natürlichem **2a** übereinstimmte.

3-Methylriboflavin wurde unseres Wissens bisher noch nicht als Naturstoff isoliert. Dagegen wurde wiederholt über das Vorkommen von Riboflavin in Fruchtkörpern von Basidiomyceten berichtet. Die Verbindung liegt z. T. in so hohen Konzentrationen vor, daß sie für die Färbung der Pilze verantwortlich ist^{7,8}. Bei einer Untersuchung des Vitamin Gehaltes getrockneter Pilze wurde bereits von Kawakami und Miyayosi⁹ festgestellt, daß *Panellus serotinus* neben Ergosterin die Vitamine B_1 , B_2 und C enthält.

Beschreibung der Versuche

Elektronenspektren: Varian Cary 17. — IR-Spektren: Pye-Unicam. — ^1H -NMR-Spektren: Bruker WH 90 (TMS als innerer Standard). — Massenspektren: AEI MS-30 (Direkteinlaß, 70 eV). — DC-System A: Merck DC-Alufolie, Kieselgel 60, 0,25 mm Schichtdicke; Laufmittel: Benzol/Ameisensäure-ethylester/Ameisensäure 10 : 5 : 3. — Die Pilze wurden im Oktober 1976 in der Nähe von Tübingen gesammelt.

Isolierung der Farbstoffe

55 g gefriergetrocknete Fruchtkörper von *P. serotinus* wurden sorgfältig zerkleinert und fünfmal mit je 500 ml Methanol/Wasser (4 : 1 Vol.) extrahiert. Eindampfen der vereinigten Extrakte im Vakuum lieferte 8,4 g eines hellgelben, klebrigen Pulvers, von dem 2 g in Wasser gelöst und dreimal mit Essigester ausgeschüttelt wurden. Nach Einengen der wäßrigen Phase wurde nacheinander über eine Säule mit Sephadex G 10 und LH 20 (50 × 3 cm; mobile Phase: Wasser) chromatographiert. Dabei wurde jeweils die intensiv gelb fluoreszierende Fraktion weiterverarbeitet. Die eingedampfte Farbstoff-Fraktion wurde in 50 ml Acetanhydrid/Eisessig (1 : 1 Vol.) gelöst und nach Zugabe von 2 Tropfen 70-prozentiger Perchlorsäure 1 h bei 40 °C gerührt¹⁰. Man gab unter Kühlung 50 ml Wasser zu und schüttelte dreimal mit Chloroform aus. Die vereinigten Chloroformphasen wurden zweimal mit Wasser gewaschen und nach Trocknen über MgSO_4 im Va-

kuum eingedampft. Man brachte den Rückstand auf eine Säule von MN-Polyamid MN SC 6-AC (Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren) und eluierte **2b** mit Chloroform/Petrolether (40–60 °C) = 1 : 4 und anschließend **1b** mit dem Mischungsverhältnis 1 : 1.

Zur quantitativen Bestimmung der Farbstoffe wurden 2,5 g des getrockneten Rohextraktes nach Entfetten mit Essigester über Sephadex LH 20 vorgereinigt. Aus der Extinktion der gelben Fraktion berechnet sich ein Gesamtgehalt an **1a** und **2a** von 0,047%, bezogen auf das Trockengewicht. Zur Abschätzung der Einzelanteile wurde ein Teil der oben erhaltenen Lösung durch präparative DC getrennt und nach Extraktion der Farbflecke UV-spektrometrisch vermessen. Danach ergibt sich ein Gehalt von 0,007% **1a** und 0,040% **2a**.

3-Methylriboflavin-tetraacetat (**2b**)

6,5 mg; Schmp. 185–188 °C (aus Ethanol); $[\alpha]_{546}^{23} - 54,7^\circ$ ($c = 0,013$ in Methanol); DC-System A: R_F 0,80; UV-Spektrum (Methanol): $\lambda_{\text{max}} = 446, 353, 271, 223 \text{ nm}$; IR (KBr): 1747, 1711, 1670, 1585, 1550, 1380, 1225 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1,74, 2,08, 2,22, 2,30$ (jeweils s, 3H) 2,44, 2,57 (jeweils verbr. s, 3H), 3,50 (s, 3H), 4,12–4,59 (m, 2H), 4,74–5,20 (m, 2H) 5,30–5,82 (m, 3H), 7,55, 8,03 (jeweils verbr. s, 1H); MS (Ionenquellentemp. 180 °C): $\text{M}^+ m/e = 558, 2009$ (0,7%, ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{10}$ 558,1962), 516(3), 515(7), 500(5), 499(15), 473(4), 457(3), 440(2), 439(3), 431(2), 397(9), 295(3), 270(11), 257(61), 256(100, $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$).

Die nach Lit.⁶ hergestellte Vergleichsverbindung, Schmp. 187–190 °C; $[\alpha]_{546}^{23} - 56,1^\circ$ ($c = 0,098$ in Methanol), UV-Spektrum (Methanol): $\lambda_{\text{max}} = 446$ ($\log \epsilon = 4,06$), 353(3,92), 271(4,52), 223 nm (4,46), zeigte die gleichen IR-, ^1H -NMR- und MS-Spektren.

Riboflavin-tetraacetat (**1b**)

1,2 mg; DC-System A: R_F 0,65 (Araboflavin-tetraacetat 0,66); ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1,76, 2,08, 2,22, 2,29$ (jeweils s, 3H), 2,44, 2,57 (jeweils verbr. s, 3H), 4,12–4,59 (m, 2H), 4,74–5,20 (m, 2H), 5,30–5,82 (m, 3H), 7,59, 8,02, 9,02 (jeweils verbr. s, 1H); MS (Ionenquellentemp. 220 °C): $\text{M}^+ m/e = 544$ (0,4%), 502(2), 501(5), 486(4), 485(10), 459(4), 443(3), 426(3), 425(3), 417(3), 383(12), 341(3), 323(3), 285(3), 281(3), 267(3), 256(10), 243(79), 242(100).

3-Methylriboflavin (**2a**)

40 mg synthetisches **2b** wurden in 50 ml Methanol mit 2 Tropfen konz. Salzsäure 9 h bei 60 °C ge-

rührt, wobei allmählich **2a** ausfiel. Nach Einengen und Abkühlen wurde abfiltriert und mit wenig kaltem Methanol nachgewaschen. Ausbeute 25,7 mg (92%), Schmp. 270–272 °C (Zers.), Lit.⁶ Schmp. 272 °C (Zers.).

3-Methyl-D-araboflavin-tetraacetat (**3**)

20 mg D-Araboflavin-tetraacetat¹¹ wurden in 5 ml absolutem DMF mit 10 mg wasserfreiem K₂CO₃ und 100 mg Methyljodid ca. 4 h bei 20 °C gerührt, bis chromatographisch kein Ausgangsmaterial mehr nachweisbar war⁴. Nach üblicher Aufarbeitung resultierten 19 mg (92%); nach Umkristallisation aus Ethanol Schmp. 204–206 °C; DC-System A: *R_F* 0,84; ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,71, 2,00, 2,09,

2,31 (jeweils s, 3H), 2,44, 2,57 (jeweils verbr. s, 3H), 3,53 (s, 3H), 4,04–4,67 (m, 3H), 5,13–5,56 (m, 3H), 5,66–5,88 (m, 1H), 7,58, 8,07 (jeweils verbr. s, 1H); UV-Spektrum (Methanol): $\lambda_{\max}$ = 446 (log ϵ = 4,06), 353 (3,91), 271 (4,50), 223 nm (4,46).

C₂₆H₃₀N₄O₁₀ (558,5)

Ber. C 55,91 H 5,41 N 10,03,

Gef. C 56,01 H 5,48 N 9,63.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Oberwinkler und Herrn Dr. Anke, Tübingen, danken wir herzlich für die Beschaffung der Pilze.

¹ XXXI. Mitt.: H. Besl, G. Höfle, B. Jendry, E. Jägers u. W. Steglich, Chem. Ber., im Druck.

² Merck-DC-Alufolie, Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 mm; Laufmittel: Benzol/Methanol/Aceton/Eisessig (70 : 20 : 5 : 5 Vol.); **1a**: *R_F* 0,23; **1b**: 0,47; Araboflavin: 0,20.

³ P. Brown, C. L. Hornbeck u. J. R. Cronin, Organic Mass Spectrometry **6**, 1383 [1972].

⁴ P. Hemmerich, Helv. Chim. Acta **47**, 464 [1964].

⁵ T. Roberie, N. S. Bhacca u. J. Selbin, Can. J. Chem. **55**, 575 [1977].

⁶ R. Kuhn, K. Reinemund, F. Weygand u. R. Ströbele, Ber. dtsch. Chem. Ges. **68**, 1765 [1935].

⁷ C. H. Eugster, Z. f. Pilzk. **39**, 45 [1973]; P. X. Iten, S. Arihara u. C. H. Eugster, Helv. Chim. Acta **56**, 302 [1973].

⁸ K. Gluchoff, C. R. Acad. Sci., Ser. D, **279**, 473 [1974].

⁹ K. Kawakami u. H. Miyayosi, C. A. **35**, 5206⁶ und 6685⁶ [1941].

¹⁰ D. B. McCormick, J. Heterocycl. Chem. **7**, 447 [1970].

¹¹ R. Kuhn u. F. Weygand, Ber. dtsch. Chem. Ges. **68**, 166 [1935].