

- [1] G. Maier, G. Mihm, R. O. W. Baumgärtner, H. P. Reisenauer, *Chem. Ber.* 117 (1984) 2337, zit. Lit.
 [2] G. Maier, G. Mihm, H. P. Reisenauer, *Chem. Ber.* 117 (1984) 2351, zit. Lit.
 [3] R. Boese, N. Finke, J. Henkelmann, G. Maier, P. Paetzold, H. P. Reisenauer, G. Schmid, *Chem. Ber.* 118 (1985) 1644.
 [4] P. Jutzi, J. Baumgärtner, *J. Organomet. Chem.* 148 (1978) 257.
 [5] A. J. Ashe III, E. Meyers, P. Shu, T. von Lehmann, J. Bastide, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 6865.
 [6] A. J. Ashe III, W. Butler, H. F. Sandford, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 7066.
 [7] B. Glaser, H. Nöth, *Angew. Chem.* 97 (1985) 424; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 416.
 [8] Erstes B=C-System: H. Klusik, A. Berndt, *Angew. Chem.* 95 (1983) 895; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 877. – Zur Struktur von *Berndis* Substanz siehe auch: P. H. M. Budzelaar, P. von R. Schleyer, K. Krogh-Jespersen, *ibid.* 96 (1984) 809 bzw. 23 (1984) 825; G. Frenking, H. F. Schaefer III, *Chem. Phys. Lett.* 109 (1984) 521; P. H. M. Budzelaar, K. Krogh-Jespersen, T. Clark, P. von R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 2773.

Zur Chemie und antibiotischen Aktivität des Carbolegerlings (*Agaricus xanthoderma*)**

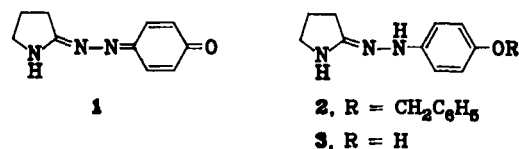
Von Sabine Hilbig, Thomas Andries, Wolfgang Steglich* und Timm Anke

Professor Hans Grisebach zum 60. Geburtstag gewidmet

Der Carbolegerling (*Agaricus xanthoderma* Gen.) läuft bei Verletzung intensiv chromgelb an, verfärbt sich mit Laugen orangegelb und entwickelt einen phenolartigen Geruch. Extrakte des Pilzes weisen eine starke antibiotische Aktivität auf, die von Atkinson^[1] einer photolabilen Verbindung „Psalliotin“ zugeschrieben wurde. Später erhielt man bei Aufarbeitung der Fruchtkörper unter Zusatz von Natriumsulfit das stark antibiotisch und cancerostatisch wirksame „Agaricin“^[2]. In beiden Fällen wurden die Wirkstoffe chemisch nicht näher charakterisiert. Erste Einblicke in die Chemie von *A. xanthoderma* erhielten Gill und Strauch^[3], die aus dem Ethanolextrakt Phenol, Hydrochinon, 4,4'-Dihydroxyazobenzol und 4,4'-Dihydroxybiphenyl isolieren konnten. Wir beschreiben nun die Strukturaufklärung von Verbindungen, auf denen antibiotische Wirksamkeit und Gelbverfärbung des Pilzes beruhen.

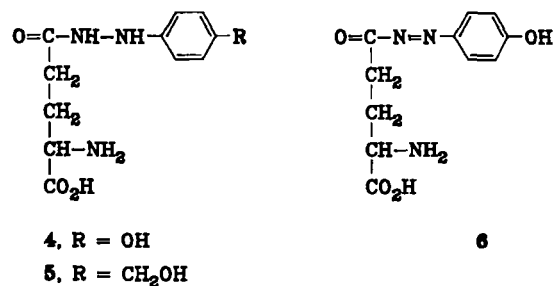
Extrahiert man Fruchtkörper von *A. xanthoderma* in der Kälte mit Essigester, engt die Lösungen vorsichtig ein und chromatographiert bei 0–3°C, so kann eine intensiv gelbe Zone abgetrennt werden. Nach Rechromatographie erhält man Agaricon 1^[4] (Ausbeute 5 · 10⁻⁴%), das nach dem Massenspektrum die Formel C₁₀H₁₁N₃O hat und im ¹H-NMR-Spektrum neben breiten Signalen im Arenbereich typische Signale für eine -(CH₂)₃-Einheit aufweist^[5]. Die charakteristischen MS-Fragmente *m/z* 107 (C₆H₅NO), 106 (C₆H₄NO), 94 (C₆H₆O), 93 (C₆H₅O), 84 (C₄H₈N₂) und 83 (C₄H₇N₂) geben Hinweise auf Struktur 1, die durch Synthese bewiesen wird. Dazu wird Butyrolactim-methylether mit *N*-(4-Benzoyloxyphenyl)hydrazin-hydrochlorid in Methanol zum Hydrochlorid des Pyrrolidonhydrazons 2 umgesetzt

(Ausbeute 75%), das bei der Hydrogenolyse mit Pd/Kohle in Methanol das kristallisierte Hydrochlorid von 3^[4] ergibt.



Löst man 3 in Wasser und versetzt mit Natriumhydrogencarbonat, so färbt sich die Lösung bei Luftzutritt sofort gelb. Besonders glatt verläuft die Oxidation bei Zugabe von Natriumperiodat. Durch Extraktion mit Essigester läßt sich 1 abtrennen; es stimmt in allen Eigenschaften mit dem gelben Farbstoff aus *A. xanthoderma* überein. Man kann daher annehmen, daß der Pilz Leukoagaricon 3 enthält, das bei Verletzung der Fruchtkörper durch Luftsauerstoff (Oxidasen) zu 1 oxidiert wird^[6].

Extrahiert man frische Pilze mit SO₂-gesättigtem Methanol und führt alle Chromatographieschritte unter Argon bei 0–3°C durch, so kann durch Chromatographie an Sephadex LH 20 (Eluens: Methanol/Wasser 9:1) und mehrfache Rechromatographie an LichroPrep RP 8 (Eluens: Wasser) ein farbloses Chromogen von großen Mengen Mannit abgetrennt werden (Ausbeute 1 · 10⁻³%). Die Trennung läßt sich durch Tüpfeln mit K₃[Fe(CN)₆]/NaHCO₃-Lösung verfolgen (orangegelbe Farbreaktion!). Das von uns Xanthodermin^[4] genannte Chromogen gibt eine positive Ninhydrinreaktion und zeigt im ¹H-NMR-Spektrum typische Signale für einen Glutaminsäurerest sowie ein Signal im Arenbereich. Berücksichtigt man, daß im Massenspektrum des Peracetyl-Derivats Ionen mit drei Stickstoffatomen auftreten, so liegt für Xanthodermin die Struktur eines γ-Glutamyl-*N'*-(4-hydroxyphenyl)hydrazids 4 nahe. Sie wird durch Synthese bewiesen. Beim α-Benzylester von *N*-(Benzyloxycarbonyl)-L-glutaminsäure wird dazu nach der 4,6-Diphenylthieno[3,4-*d*][1,3]dioxol-2-on-5,5-dioxyd-Methode^[7] mit *N*-(4-Benzoyloxyphenyl)hydrazin in 70% Ausbeute die γ-Carboxygruppe in das *N'*-(4-Benzoyloxyphenyl)hydrazid umgewandelt. Die Abspaltung der Schutzgruppen mit H₂/Pd-C liefert in quantitativer Ausbeute 4, das sich mit dem Naturstoff als identisch erweist.



4 gibt in wäßriger Lösung mit K₃[Fe(CN)₆]/Natriumhydrogencarbonat oder Natronlauge eine intensive Gelbfärbung. Das gleiche Phänomen wird auch bei Zugabe des wäßrigen Pilzextrakts beobachtet. Diese Farbreaktion ist auf das Anion der Acylazoverbindung 6 zurückzuführen. Der Pilz enthält demnach zwei Chromogene 3 und 4, die an der Gelbverfärbung der Fruchtkörper und deren Farbreaktion mit Natronlauge beteiligt sind.

Bei der anfänglichen Sephadex-Trennung fällt in den letzten Fraktionen der gelbe Feststoff Natrium-4-hydroxy-

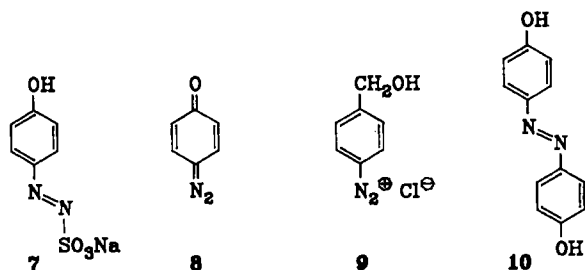
[*] Prof. Dr. W. Steglich, Dipl.-Chem. S. Hilbig, T. Andries
 Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
 Gerhard-Domagk-Straße 1, D-5300 Bonn 1

Prof. Dr. T. Anke
 Lehrbereich Biotechnologie der Universität Kaiserslautern
 Paul-Ehrlich-Straße 22, D-6750 Kaiserslautern

[**] Antibiotika aus Basidiomyceten, 22. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. – 21. Mitteilung: T. Anke, J. Heim, F. Knoch, U. Mocek, B. Steffan, W. Steglich, *Angew. Chem.* 97 (1985) 714; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 709.

benzoldiazosulfonat **7**^[8] an (Ausbeute $5 \cdot 10^{-3}\%$). **7** ist ein Artefakt, das aus im Pilz vorhandenem 4-Diazo-2,5-cyclohexadien-1-on **8** entsteht. Dieses läßt sich im methanolischen Pilzextrakt durch Azokupplung mit Resorcin oder β -Naphthol nachweisen^[9] und nach Aufarbeitung der Pilze unter Kühlung und Lichtausschluß, jedoch ohne SO_2 -Zusatz, durch DC-Vergleich mit der authentischen Verbindung identifizieren^[10].

Interessanterweise sind bei der Aufarbeitung der Pilze mit SO_2 -haltigem Methanol weder Phenol noch 4,4'-Dihydroxyazobenzol **10** nachweisbar, so daß diese von Gill et al.^[3] isolierten Verbindungen möglicherweise erst bei der Aufarbeitung aus den von uns beschriebenen Vorläufern entstehen^[11].



Merocyanine vom Typ des Agaricins **1** waren bereits von Hünig et al.^[12] durch oxidative Azokupplung erhalten worden, wurden aber bisher noch nicht in der Natur entdeckt. Dagegen finden **4** und **8** eine Parallele in den gleichfalls aus *Agaricus*-Arten isolierten Verbindungen Agaritin **5**^[13] und 4-(Hydroxymethyl)benzoldiazoniumchlorid **9**^[14].

antibiotische Wirkung von „Psalliotin“^[1] sowie dessen Lichtempfindlichkeit sprechen für seine Identität mit **8**.

Eingegangen am 23. August,
ergänzte Fassung am 8. Oktober 1985 [Z 1440]

- [1] N. Atkinson, *Nature (London)* 174 (1954) 598; *Aust. J. Exp. Biol.* 33 (1955) 237, 381.
- [2] K. Dornberger, W. Gutsche, R. Horschak, A. Zureck, *Z. Allg. Mikrobiol.* 18 (1978) 647; K. Dornberger, H. Lich, C. Schönfeld, H. Knöll, DDR-Pat. 132878 (15. Nov. 1978); *Chem. Abstr.* 91 (1979) P87 622 e.
- [3] M. Gill, R. J. Strauch, *Z. Naturforsch. C39* (1984) 1027.
- [4] **1**: Rote Kristalle, $\text{Fp} = 115^\circ\text{C}$ (Zers.); R_f : 0.26 (Kieselgel; Laufmittel: Essigester); UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 242 (3.74), 427 nm (4.19); $^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2) [5]: $\delta = 2.11$ (tt, $J = 7, 7$ Hz, 2H), 2.81 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 3.56 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 5.59 (br. „s“, NH), 6.37 („d“, $J = 10$ Hz, 2H), 7.37 („d“, $J = 10$ Hz, 2H); MS (DE 180°C): m/z 189.0906 (M^+ , 100%, ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$ 189.0902), 188 (7.0), 161 (11.4), 160 (25.7), 121 (4.9), 109 (5.0), 107 (4.9), 106 (5.8), 94 (5.8), 93 (22.4), 84 (19.6), 83 (23.9), 69 (7.6), 55 (4.3), 41 (37.8). - $3 \cdot \text{HCl}$: $\text{Fp} = 224^\circ\text{C}$. - **4**: $\text{Fp} = 164-166^\circ\text{C}$ (Zers.); R_f : 0.20 (Cellulose, 1-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1); $[\alpha]_D$ 5.5 ($c = 1$, 1N HCl); UV (Wasser): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 228 (3.34), 292 nm (3.90); nach Zusatz von einem Tropfen NaOH $\lambda_{\text{max}} = 242, 348, 445$ nm; $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 1.98$ (dt, $J = 8.2, 6.3$ Hz, 2H), 2.31 (m, 2H), 3.59 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 6.65 („s“, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): $\delta = 28.0, 31.4, 56.0, 117.4, 118.0, 142.4, 151.9, 175.7, 176.4$; MS (DE 180°C): m/z 253.1091 (0.01%, ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$ 253.1062), 152 (0.04), 130 (1.9), 129 (7.0), 123 (0.2), 122 (1.25), 110 (18.3), 109 (100, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}$), 108 (15.5), 94 (78.1), 84 (62), 80 (41.9), 66 (19.9), 56 (6.6). - **7**: $^1\text{H-NMR}$ (MeOD): $\delta = 6.86$ und 7.76 (AA'BB'-System, $J = 9$ Hz).
- [5] Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **1** zeigt eine temperaturabhängige Verbreiterung.
- [6] **1** kommt auch als solches im Pilz vor, z.B. in den gelben Zonen der Stielknollen. Dagegen gelang es uns bisher nicht, die Leukoverbindung **3** aus dem Pilz zu isolieren.
- [7] O. Hollitzer, A. Seewald, W. Steglich, *Angew. Chem.* 88 (1970) 480; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 8 (1969) 981.
- [8] R. Schmitt, L. Glutz, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 2 (1869) 51.
- [9] Identifizierung der Azofarbstoffe durch Vergleich mit den authentischen Verbindungen. Nach Tüpfelreaktionen an frischen Fruchtkörpern ist **8** vor allem in den Lamellen konzentriert.

Tabelle 1. Antibiotische Aktivität der Inhaltsstoffe von *A. xanthoderma* im Plattendiffusionstest auf Komplexmedium bei den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen [μg /Rondelle] [a, b].

Testorganismus	[100]	1 [50]	[10]	4 [10]	[100]	7 [10]	[1]	[100]	8 [10]	[1]	10 [3] [b] [10]	[1]
Hemmhofdurchmesser [mm]												
Bakterien:												
<i>Bacillus brevis</i>	32	28	19	15	30	25	15	35	24	11i	10i	—
<i>Bacillus subtilis</i>	25	21	10i	22	35	30	20	40	25	10i	—	—
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	19	12	—	—	35	25	20	40i	22i	+	—	—
<i>Micrococcus luteus</i>	20i	11i	—	—	30	17	10	45	30	—	+	—
Pilze:												
<i>Mucor miehei</i>	18	14i	—	—	30	14	—	38	20	—	+	—
<i>Paecilomyces varioti</i>	40i	30i	10i	+	20	11	—	26	15	—	10	—
<i>Nematospora coryli</i>	16	13	+	—	—	—	—	46	25	—	10	—
<i>Penicillium notatum</i>	20i	11i	—	—	—	—	—	16	—	—	10	—
<i>Fusarium oxysporum</i>	16i	10i	—	—	—	—	—	25	11	—	7	—

[a] Die Platten mit den Testkeimen wurden mit den Rondellen belegt und 12–16 h bei 27 oder 37°C inkubiert. Die Hemmhofdurchmesser geben die klaren Zonen um die Rondellen (6 mm Durchmesser) an, in denen kein Wachstum der Testorganismen erfolgt (—: kein Hemmhof; i: inkompletter Hemmhof). [b] 4,4'-Dihydroxybiphenyl [3] zeigt bei 100 μg /Rondelle gegenüber den angegebenen Mikroorganismen keine Hemmwirkung.

1, **4**, **7** und **8** sind gegenüber *Bacillus subtilis* antibiotisch wirksam (Tabelle 1). Als besonders aktiv gegenüber Bakterien und Pilzen erwiesen sich die Diazoverbindungen **7** und **8**, deren minimale Hemmkonzentrationen mit denen etablierter Antibiotica vergleichbar sind. So ergeben 1 μg Penicillin G oder Streptomycinsulfat in der gleichen Testanordnung wie in Tabelle 1 bei *Bacillus subtilis* Hemmhöfe von 25 bzw. 11 mm Durchmesser, während 10 μg des antifungischen Nystatins bei *Mucor miehei* zu einem Hemmhof von 16 mm Durchmesser führen. Wie ein Vergleich der IR- und UV-Spektren mit denen in^[2] lehrt, ist **7** mit „Agaricin“ identisch^[15]. Die von Atkinson beobachtete

- [10] **8**: R_f = 0.25 (Kieselgel; Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9:1$; rote Farbe beim Besprühen mit Resorcin in 1N NaOH).
- [11] Das Vorkommen eines 4-Hydroxybenzoldiazonium-Salzes als Vorläufer von Phenol usw. hatten schon Gill et al. [3] vermutet.
- [12] Vgl. beispielsweise S. Hünig, H. Balli, E. Breither, F. Brühne, H. Geiger, E. Grigat, F. Müller, H. Quast, *Angew. Chem.* 74 (1962) 818; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1 (1962) 640.
- [13] R. B. Kelly, E. G. Daniels, J. W. Hinman, *J. Org. Chem.* 27 (1962) 3229; B. Levenberg, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2267.
- [14] B. Levenberg, *Biochim. Biophys. Acta* 63 (1962) 212.
- [15] Inzwischen wurde die Identität von „Agaricin“ (in Agaridin umbenannt) mit **7** auch von K. Dornberger, W. Ihn, W. Schade, D. Tresselt, A. Zureck und L. Radics bewiesen; *Tetrahedron Lett.*, im Druck. Zur antifungischen Wirkung von **7** vgl. auch S. Petersen, W. Gauss, E. Urbschat, *Angew. Chem.* 67 (1955) 217.