

Strukturaufklärung

Birnbaumin A und B, zwei ungewöhnliche 1-Hydroxyindol-Farbstoffe aus dem „Blumentopfpilz“ *Leucocoprinus birnbaumii***

Andrea Bartsch, Monika Bross, Peter Spitteler,
Michael Spitteler und Wolfgang Steglich*

Professor Timm Anke zum 60. Geburtstag gewidmet

Der Gelbe Faltenschirmling (*Leucocoprinus birnbaumii* (Corda) Singer) erscheint gelegentlich in Blumentöpfen und Warmhäusern, wo er durch seine schwefelgelbe Farbe und zierliche Gestalt auffällt. Er stammt ursprünglich aus den Tropen und wurde mit Pflanzen und Blumenerde weltweit

[*] Dr. A. Bartsch, Dr. M. Bross, Dr. P. Spitteler, Prof. Dr. W. Steglich
Department Chemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, Haus F, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-mail: wos@cup.uni-muenchen.de
Prof. Dr. M. Spitteler
Institut für Umweltforschung
Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)

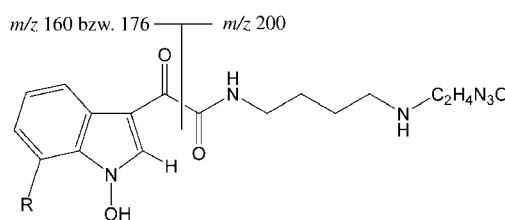
[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (SFB 369). Wir danken Till Hägеле (Botanischer Garten München), Claudia Dubler, Tina Hübscher, Dr. Franz von Nussbaum und vielen anderen für ihre Hilfe bei der Beschaffung der Pilze.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

verbreitet.^[1] Über die Chemie des Pilzes ist bisher nichts bekannt. Wir berichten hier über die ungewöhnliche Struktur seiner gelben Farbstoffe, die wir Birnbaumine A und B genannt haben.

Zur Isolierung der Farbstoffe wurden die Fruchtkörper vorsichtig mit Methanol extrahiert. Anschließende Auftrennung des Extraks durch präparative HPLC an reverser Phase lieferte neben L-Tryptophan die Birnbaumine A und B. Beide Farbstoffe ähneln sich in ihren UV/Vis-Spektren, jedoch weist die Hauptkomponente Birnbaumin B gegenüber Birnbaumin A eine bathochrome Verschiebung des langwelligeren Absorptionsmaximums von 322 nach 356 nm auf (beide in MeOH). Im ESI-Massenspektrum zeigt Birnbaumin A einen $[M+H]^+$ -Peak bei $m/z = 361$, dessen Hochauflösung die Summenformel $C_{16}H_{20}N_6O_4$ ergibt. Birnbaumin B unterscheidet sich nach dem ESI-MS durch ein zusätzliches Sauerstoffatom.^[2] Im ESI-MS/MS der Farbstoffe beobachtet man einen charakteristischen Zerfall in zwei Fragmente. Davon ist ein Fragment mit $m/z = 200$ ($C_9H_{14}N_5O_2$) beiden Verbindungen gemeinsam, während das andere beim Birnbaumin A einen Peak bei $m/z = 160$ ($C_9H_6NO_2$) und beim Birnbaumin B einen Peak bei $m/z = 176$ ($C_9H_6NO_3$) aufweist. Der durch Atomabsorptionsspektroskopie nachgewiesene hohe Gehalt der Substanzproben an K^+ - und Na^+ -Ionen spricht für die Fähigkeit der Birnbaumine zur Bindung von Metallen.

Nähere Einblicke in die Struktur der Birnbaumine liefern die NMR-Spektren. Im 1H -NMR-Spektrum ($[D_6]DMSO$) von Birnbaumin A erkennt man Signale eines 1,2-substituierten Benzolrings, eines einzelnen Aromatenprotons bei $\delta_H = 7.98$ ppm und einer $-NHCH_2CH_2CH_2CH_2NH$ -Einheit. Außerdem erscheinen bei tieferem Feld ein scharfes Singulett bei $\delta_H = 11.95$ und ein verbreitertes Signal bei $\delta_H = 12.32$ ppm, die OH-Protonen zugeordnet werden können. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt 16 Signale, die vier Methylen- und fünf Aromaten-CH-Gruppen sowie sieben quartären C-Atomen bei $\delta_C = 109.8, 121.4, 134.1, 151.4, 156.7, 161.6$ und 183.8 ppm entsprechen. Aus den HMBC-Korrelationen lässt sich für Birnbaumin A die in Schema 1 abgebildete Partial-

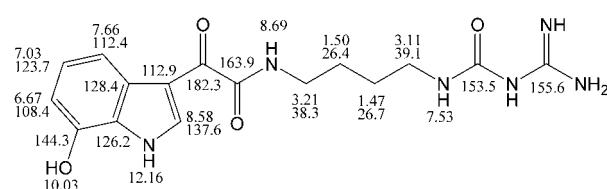
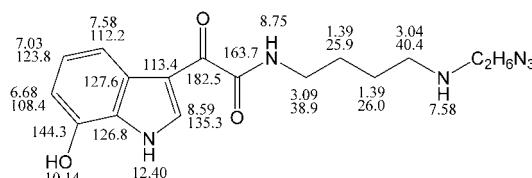


Schema 1. Partialstrukturen der Birnbaumine A ($R=H$) und B ($R=OH$) mit Schlüsselfragmenten im ESI-MS/MS.

struktur ableiten, wobei die α -Spaltung zwischen den beiden CO-Gruppen die beiden Schlüsselfragmente mit $m/z = 160$ und 200 im Massenspektrum erklärt. Birnbaumin B enthält den NMR-Spektren und HMBC-Experimenten zufolge eine zusätzliche OH-Gruppe in 7-Stellung des Indolringes, was mit den Fragment-Ionen mit $m/z = 176$ und 200 vereinbar ist.

Zum Beweis des Substitutionsmusters wurde Birnbaumin B mit Zink in Eisessig reduziert. Der reduktive Verlust der N-OH-Gruppe bewirkt dabei eine starke Verschiebung

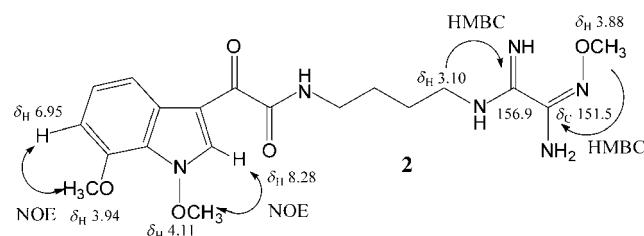
des 2-H-Signals im 1H -NMR-Spektrum ($[D_6]DMSO$) von $\delta_H = 7.73$ nach 8.59 ppm, gleichzeitig tritt eine Kopplung von 2.9 Hz zum benachbarten Indol-NH ($\delta_H = 12.40$ ppm) auf. Auch die unbekannte Endgruppe $-C_2H_4N_3O$ verliert bei der Reduktion ihr Sauerstoffatom und geht unter Aufnahme von zwei Wasserstoffatomen in den Rest $-C_2H_6N_3$ über. Dies schließt eine Amidinotharnstoff-^[3] oder Carbamoylguanidino-Gruppierung als Endgruppe aus. Die ausgezeichnete Übereinstimmung der Aromatensignale des Reduktionsprodukts mit denen der synthetischen Vergleichsverbindung **1** bestätigt die 7-Position der Hydroxygruppe (Schema 2).^[4]



1

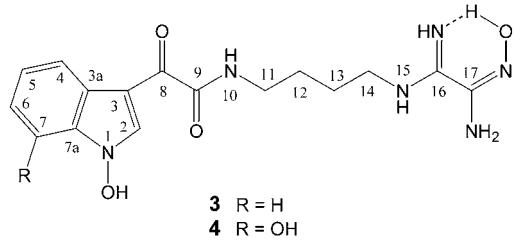
Schema 2. Vergleich der NMR-Daten des reduzierten Birnbaumins B (oben) mit denen der synthetischen Vergleichsverbindung **1** (in $[D_6]DMSO$).^[4]

Zur Aufklärung der Struktur der Endgruppe wurden die Birnbaumine A und B mit Diazomethan/Ether in Methanol bei 0°C permethyliert, wobei im ersten Fall ein Dimethylether, im zweiten ein Trimethylether entsteht. Dabei werden die OH-Gruppe am Indolstickstoffatom ($\delta_H = 12.32$ bzw. 12.06 ppm), die wasserstoffverbrückte OH-Gruppe bei $\delta_H = 11.95$ bzw. 11.89 ppm und beim Birnbaumin B außerdem die Phenolfunktion methyliert. Die *O*-Methylgruppen können über die NOESY-Spektren zugeordnet werden, wobei das Substitutionsmuster der Birnbaumine bestätigt wird (Schema 3). Besonders wichtig ist die HMBC-Beziehung der endständigen Methoxygruppe bei $\delta_H = 3.88$ zum ungesättigten Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 151.5$ ppm, die nur mit der in Schema 3 gezeigten Struktur **2** vereinbar ist. Im Einklang damit ist die Korrelation der terminalen Methylengruppe bei $\delta_H = 3.10$ zum Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 156.9$ ppm. Analoge

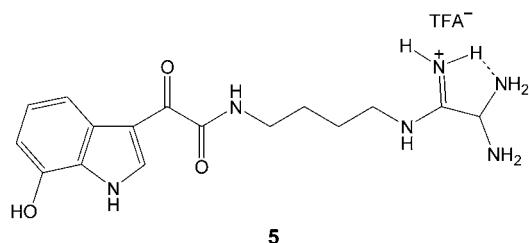


Schema 3. Wichtige NOE- und HMBC-Beziehungen beim Birnbaumin-B-trimethylether (**2**) (in $[D_6]DMSO$).

Beziehungen sind auch beim Birnbaumin-A-dimethylether zu beobachten, womit sich für Birnbaumin A und B die Strukturen **3** und **4** ergeben. Die Wasserstoffbrücke im terminalen



N-Hydroxyoxamidin-Rest erklärt zwanglos das charakteristische scharfe Singulett im ¹H-NMR-Spektrum der Birnbaumine und die HMBC-Beziehung des OH-Protons zum Amidoxim-Kohlenstoffatom. Außerdem sind die ¹H, ¹⁵N-HMBC-Korrelationen von Birnbaumin B im Einklang mit der vorgeschlagenen Struktur (siehe Hintergrundinformationen). Für das als Trifluoracetat erhaltene Reduktionsprodukt des Birnbaumins B schlagen wir die Aminalstruktur **5** vor, deren



Methingruppe mit NMR-Signalen bei $\delta_H = 5.27$ und $\delta_C = 58.0$ ppm vereinbar ist. Offensichtlich wird das Aminal durch eine Wasserstoffbrücke zur benachbarten Amidiniumfunktion stabilisiert.

Die Birnbaumine haben mehrere strukturelle Besonderheiten: So waren einfache *N*-Hydroxyoxamidine unseres Wissens bisher unbekannt, und 1-Hydroxyindole^[5] kommen im Unterschied zu den stabileren *O*-Methylderivaten^[6] nur in Ausnahmefällen in der Natur vor. Auch 7-Hydroxyindole findet man nur selten, wobei die aus Meeresschwämmen isolierten Coscinamide^[7] als Indolylglyoxylsäureamide Birnbaumin A und B strukturell besonders ähnlich sind.

Für die Bildung der Birnbaumine schlagen wir einen Biosyntheseweg vor, der von Tryptophan, Citrullin, Glycin und Nitrit ausgeht (siehe Hintergrundinformationen). Die experimentelle Überprüfung dieser Hypothese ist in Arbeit.

Experimentelles

Isolierung der Farbstoffe: Die frischen, tiefgefrorenen oder gefriergetrockneten Pilze wurden mit Stickstoff-gesättigtem MeOH unter Ausschluss von Licht auf dem Schüttler bis zur vollständigen Entfärbung extrahiert. Nach Eindampfen im Vakuum wurde der Rückstand in MeOH (HPLC-grade) gelöst, über eine RP-18-Kartusche vorge reinigt und anschließend durch präparative HPLC aufgetrennt (Säule: Nucleosil 100 C-18, 7 μ m, 16 \times 250 mm (Macherey & Nagel); Laufmittel A: CH₃CN/H₂O (1:9) + 0.25 % Trifluoressigsäure (TFA), Laufmittel B: CH₃CN; Gradient: 100 % A linear in 35 min auf 50 % A/50 % B; Flussgeschwindigkeit: 5.00 mL min⁻¹; Detektion: UV). Die Überprüfung der Reinheit der Substanzen erfolgte mit analytischer HPLC (Säule: Nucleosil 100 C-18, 5 μ m, 4 \times 250 mm (Knauer); Laufmittel wie oben; Gradient: 100 % A linear in 25 min auf 50 % A/50 % B; Flussgeschwindigkeit: 1.00 mL min⁻¹). Die Retentionszeiten t_R betragen dabei für **4** 11.2, für Tryptophan 12.3 und für **3** 15.5 min. Die Farbstoffe können unter N₂ bei -20°C aufbewahrt werden. Aus einer Charge von 42 g Frischpilzen wurden 59 mg (0.14 %) Birnbaumin A, 228 mg Birnbaumin B (0.54 %) und 58 mg L-Tryptophan (0.14 %) isoliert. Die Ausbeuten schwankten je nach Alter und Zustand der Pilze.

3: gelber Feststoff; DC: $R_f = 0.84$ (RP-18, MeOH + 2 Tropfen TFA); UV/Vis (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 212 (4.42), 250 (4.03), 322 nm (3.96); IR (KBr): $\nu = 3403$ (s), 3205 (m), 2945 (m), 2863 (m), 1665 (s), 1625 (m), 1575 (m), 1537 (m), 1508 (m), 1483 (m), 1452 (m), 1438 (m), 1371 (m), 1340 (m), 1324 (m), 1250 (m), 1203 (s), 1139 (m), 1066 (m), 1009 (m), 890 (m), 842 (m), 801 (m), 751 (m), 722 (m), 674 (m), 600 (m), 426 cm⁻¹ (m); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD, Referenz: $\delta = 3.35$ ppm, 25°C): $\delta = 1.68$ (br. m, 4H, 12-H, 13-H), 3.26 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, 11-H), 3.39 (t, $J = 6.1$ Hz, 14-H, teilweise verdeckt durch MeOH-Signal), 7.34 (dd, $J = 7.8, 7.5$ Hz, 1H, 5-H), 7.40 (dd, $J = 8.0, 7.5$ Hz, 1H, 6-H), 7.56 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 7-H), 7.92 (s, 1H, 2-H), 8.25 ppm (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 4-H); ¹H-NMR (600 MHz, [D₆]DMSO, Referenz: $\delta = 2.49$ ppm, 25°C): $\delta = 1.48$ (br. m, 4H, 12-H, 13-H), 3.10 (,,q“, $J = 5.6$ Hz, 2H, 14-H), 3.17 (,,q“, $J = 5.6$ Hz, 2H, 11-H), 7.27 (dd, $J = 7.5, 7.4$ Hz, 1H, 5-H), 7.33 (dd, $J = 7.8, 7.4$ Hz, 1H, 6-H), 7.52 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 7-H), 7.57 (br. s, 1H, 15-NH), 7.99 (s, 1H, 2-H), 8.10 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 4-H), 8.28 (br. t, $J = 5.6$ Hz, 1H, 10-NH), 11.95 (s, 1H, 17-(N)OH), 12.32 ppm (br. s, 1H, 1-OH); ¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD, Referenz: $\delta = 49.0$ ppm, 25°C): $\delta = 27.1$ (C-12), 27.7 (C-13), 39.5 (C-11), 42.1 (C-14), 110.4 (C-7), 111.8 (C-3), 122.5 (C-4), 123.5 (C-3a), 124.5 (C-5), 125.1 (C-6), 135.6 (C-2), 136.2 (C-7a), 152.2 (C-17), 158.6 (C-16), 164.3 (C-9), 185.9 ppm (C-8); ¹³C-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO, Referenz: $\delta = 39.5$ ppm, 25°C): $\delta = 26.0$ (C-12), 26.2 (C-13), 38.1 (C-11), 40.4 (C-14), 109.6 (C-7), 109.8 (C-3), 120.8 (C-4), 121.4 (C-3a), 122.9 (C-5), 123.6 (C-6), 133.6 (C-2), 134.1 (C-7a), 151.4 (C-17), 156.7 (C-16), 161.6 (C-9), 183.8 ppm (C-8); (+)-FAB-MS: m/z (%) = 361 (100) [M + H]⁺; HR-(+)-FAB-MS: m/z : 361.1576 [M + H]⁺, ber. für C₁₆H₂₁N₆O₄ (361.1624); HR-(+)-ESI-MS/MS (-30 eV): m/z : 361, 200 [C₇H₁₄N₅O₂]⁺, 184 [C₇H₁₄N₅O]⁺, 160 [C₉H₆NO₂]⁺, 157 [C₆H₁₃N₄O]⁺.

4: gelber Feststoff; DC: $R_f = 0.88$ (RP-18, MeOH + 2 Tropfen TFA), $R_f = 0.25$ (Kieselgel 60 F₂₅₄, nBuOH/H₂O/EtOH/AcOH 4:1:1:1); UV/Vis (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 214 (4.74), 248 (4.34), 267 (sh, 4.19), 356 nm (4.16); IR (KBr): $\nu = 3415$ (m), 3210 (m), 2930 (m), 2856 (m), 1666 (s), 1628 (m), 1538 (m), 1493 (m), 1436 (m), 1374 (m), 1332 (m), 1279 (m), 1144 (m), 1086 (w), 1045 (w), 986 (w), 865 (m), 837 (m), 799 (m), 723 (m), 673 cm⁻¹ (m); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD, Referenz: $\delta = 3.35$ ppm, 25°C): $\delta = 1.66$ (br. m, 4H, 12-H, 13-H), 3.23 (br. t, $J = 6.5$ Hz, 2H, 11-H), 3.37 (t, $J = 6.6$ Hz, 14-H, teilweise verdeckt durch MeOH-Signal), 6.73 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 6-H), 7.10 (dd, $J = 7.9, 7.9$ Hz, 1H, 5-H), 7.74 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 4-H), 7.78 ppm (s, 1H, 2-H); ¹H-NMR (600 MHz, [D₆]DMSO, Referenz: $\delta = 2.49$ ppm, 25°C): $\delta = 1.47$ (br. m, 4H, 12-H, 13-H), 3.10 (,,q“, $J = 5.7$ Hz, 2H, 14-H), 3.16 (,,q“, $J = 6.2$ Hz, 2H, 11-H), 6.67 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 6-H), 7.01 (dd, $J = 7.8, 7.5$ Hz, 1H, 5-H), 7.53 (br. t, $J = 5.7$ Hz, 1H, 15-NH), 7.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 4-H), 7.73 (s, 1H, 2-H), 8.25 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, 10-NH), 9.83 (s, 1H, 7-OH), 11.89 (s, 1H, 17-(N)OH), 12.06 ppm (s, 1H, 1-OH); ¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD, Referenz: $\delta = 49.0$ ppm, 25°C): $\delta = 27.0$ (C-12), 27.6 (C-13), 39.5 (C-11), 42.0 (C-14), 110.6 (C-6), 111.6 (C-3), 113.8 (C-4), 125.2 (C-7a), 125.4 (C-5), 126.2 (C-3a), 135.8 (C-2), 145.2 (C-7), 152.1 (C-17), 158.5 (C-16), 164.2 (C-9), 185.6 ppm (C-8); ¹³C-NMR (151 MHz, [D₆]DMSO, Referenz: $\delta = 39.5$ ppm, 25°C): $\delta = 26.2$ (C-12), 26.4 (C-13), 38.3 (C-11), 40.6 (C-14), 109.3 (C-6), 109.8 (C-3), 111.8 (C-4), 123.7 (C-7a), 124.0 (C-5), 124.5 (C-3a), 134.1 (C-2), 144.3 (C-7), 151.8 (C-17).

(C-17), 156.9 (C-16), 161.9 (C-9), 183.7 ppm (C-8); ^{15}N -NMR (60.8 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, Referenz: Benzamid, $\delta_{\text{N}} = 73.6$): $\delta = 47.0$ (C(16)=NH), 55.1 (N-15), 83.8 (N-10), 161.0 (N-1), 344.5 ppm (C(18)=N-OH); (+)-ESI-MS: m/z (%) = 377 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-(+)-ESI-MS: $m/z = 377.1594$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_5$ (377.1573); HR-(+)-ESI-MS/MS(-30 eV): $m/z = 359.1464$ $[\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_4]^+$, 200.1140 $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2]^+$, 184.1190 $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}]^+$, 176.0339 $[\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_3]^+$, 157.1081 $[\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}]^+$.

Eingegangen am 10. Januar 2005
Online veröffentlicht am 7. April 2005

Stichwörter: *N*-Hydroxyoxamidine · Alkaloide · Farbstoffe/
Pigmente · Naturstoffe · Strukturaufklärung

- [1] R. Watling, *Fungi*, The Natural History Museum, London, **2004**.
- [2] In den ESI-MS/MS treten mit sehr geringer Intensität Begleit-Ionen auf, die den entsprechenden N_{ind} -Desoxybirnbauminen zugeordnet werden können.
- [3] Amidinoharnstoff findet sich als Endgruppe in verschiedenen Rotalgen-Metaboliten: a) Gigartinin: K. Ito, Y. Hashimoto, *Nature* **1966**, 211, 417; M. V. Laycock, J. S. Craigie, *Can. J. Biochem.* **1977**, 55, 27–30; b) Gongrin: K. Ito, Y. Hashimoto, *Agric. Biol. Chem.* **1965**, 29, 832–835; c) Nicaeensin: R. Chillemi, R. Morrone, A. Patti, M. Piattelli, S. Sciuto, *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 1220–1224.
- [4] Die Verbindungen sind in Schema 2 in unprotonierter Form angegeben, liegen aber nach Reinigung durch HPLC-Chromatographie als Trifluoracetate vor.
- [5] a) Arcyroxepin A: W. Steglich, B. Steffan, T. Eizenhöfer, B. Fugmann, R. Herrmann, J. D. Klamann, *Ciba Found. Symp.* **1990**, 154, 56–65; b) Nocathiacine: J. E. Leet, W. Li, H. A. Ax, J. A. Matson, S. Huang, R. Huang, J. L. Cantone, D. Drexler, R. A. Dalterio, K. S. Lam, *J. Antibiot.* **2003**, 56, 232–242; T. Sasaki, T. Otani, H. Matsumoto, N. Umemi, M. Hamada, T. Takeuchi, M. Hori, *J. Antibiot.* **1998**, 51, 715–721.
- [6] M. Somei, *Adv. Heterocycl. Chem.* **2002**, 82, 101–155.
- [7] H. R. Bokesch, L. K. Pannell, T. C. McKee, M. R. Boyd, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6305–6308. Siehe auch N. Lindquist, W. Fenical, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2521–2524.