

Fliegenpilzfarbstoffe, II ¹⁾

Isolierung und Chromophore der Farbstoffe aus *Amanita muscaria*

Heinrike Döpp und Hans Musso *

Institut für Organische Chemie der Universität Karlsruhe,
D-7500 Karlsruhe 1, Richard-Willstätter-Allee 2

Eingegangen am 12. April 1973

Aus der roten Huthaut des Fliegenpilzes werden durch Chromatographie an verschiedenen Sephadex-Typen mehrere sehr empfindliche Farbstoffe isoliert; zwei orangefarbene: Muscaaurin-I und -II, ein gelber: Muscaflavin, ein rotbrauner: Muscarubrin und das violette Muscapurpurin. Die Elektronenspektren zeigen an, daß diese Farbstoffe die gleichen Chromophore besitzen wie die Betalaine²⁾.

Colouring Matters from Fly Agaric, II¹⁾

Isolation of Pigments from *Amanita muscaria* and their Chromophoric Systems

Several very unstable pigments have been isolated from the red skin of the fly agaric by chromatography on different types of sephadex: the two orange components muscaaurin-I and -II, the yellow muscaflavin, the red brown muscarubrin, and the violet muscapurpurin. It is concluded from the electronic spectra that these pigments belong to the same chromophoric systems as the betalains²⁾ do.

Drei Eigenschaften des Fliegenpilzes haben immer wieder das Interesse der Menschen erweckt. 1. Die Form und das Wachstum; wie dieser Pilz aus der Erde hervorsproßt und seine Gestalt entfaltet, wurde in früheren Zeiten als Symbol der Fruchtbarkeit angesehen, 2. Die physiologische Wirksamkeit fand vielseitige Anwendungen in der Volksmedizin, bei kultischen Bräuchen und religiösen Zeremonien^{3,4)} und 3. die auffallende Farbe; noch heute werden bei uns Pilze in Märchenbüchern und Glückspilze vom Konditor mit rotem Hut und weißen Tupfen darauf dargestellt. Warum eigentlich? — weiß doch jedermann, daß diese Pilze giftig sind.

Die wirksamen Inhaltsstoffe sind durch Arbeiten von Eugster⁵⁾ und anderen weitgehend bekannt. Auch der rote Farbstoff hat viele Chemiker zur Konstitutionsermittlung herausgefordert. Für diese Muscarufin genannte Verbindung haben Kögl und Erxleben⁶⁾ in ihrer bekannten Arbeit 1930 mit, wie wir heute wissen, unzureichenden Argumenten eine Hydroxyterphenylchinon-Formel abgeleitet. Mehrere Versuche

¹⁾ 1. Mitteil.: H. Döpp, W. Grob und H. Musso, *Naturwissenschaften* **58**, 566 (1971).

²⁾ T. J. Mabry, in S. W. Pelletier, *Chemistry of the Alkaloids*, S. 367, van Nostrand Reinhold Comp., New York 1970.

³⁾ R. G. Wasson, *Soma, Divine Mushroom of Immortality*, Harcourt Brace Jovanovich, Inc. (New York) 1972.

⁴⁾ J. M. Allegro, *Der Geheimkult des heiligen Pilzes. Rauschgift als Ursprung unserer Religion*, Verlag F. Molden, Wien, München, Zürich 1970.

⁵⁾ C. H. Eugster, *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* **27**, 261 (1969).

⁶⁾ F. Kögl und H. Erxleben, *Liebigs Ann. Chem.* **479**, 11 (1930).

von anderen Arbeitsgruppen, diese Formel durch eine eindeutige Synthese zu beweisen, sind gescheitert^{7,8)} und haben Zweifel an ihrer Richtigkeit aufkommen lassen. Daraufhin haben Chemiker in verschiedenen Ländern erneut probiert, die Isolierung des Farbstoffes aus dem Fliegenpilz mit modernen Methoden zu wiederholen, aber ohne bisher über einen reinen Farbstoff aus *Amanita muscaria* berichten zu können⁹⁾. Somit mochte es nicht sehr aussichtsreich, aber deshalb nicht minder reizvoll erscheinen, die Konstitutionsermittlung dieses Farbstoffes nochmals zu beginnen. Die vorliegende Mitteilung berichtet über solche Bemühungen.

Zunächst wurden von Grob¹⁰⁾ drei wichtige Voraussetzungen für die Trennung und Isolierung festgestellt. 1. Der Methanolextrakt aus der Huthaut der Pilze zeigt ein Absorptionsmaximum bei 475 nm, dessen Intensität ohne Vorsichtsmaßnahmen täglich um 10–15% abnimmt. Säure und Alkali zerstören den Farbstoff in Minuten und Sekunden. 2. Wie früher beschrieben⁶⁾, läßt sich der Farbstoff mit Silber-Ionen fällen, es gelingt jedoch nicht, den Farbstoff aus dem Niederschlag zu regenerieren. Auch lassen sich keine farbigen Derivate herstellen, die man mit einem organischen Lösungsmittel aus der wäßrig-alkoholischen Lösung extrahieren könnte. 3. Alle gebräuchlichen Adsorptionsmittel sind für chromatographische Trennversuche unbrauchbar, nur an Dextrangel Sephadex kann in wäßrigen Systemen eine Anreicherung und Fraktionierung erreicht werden¹¹⁾. Als brauchbare Methode zur analytischen Trennung und Reinheitsprüfung erwies sich die Hochspannungs-Papier-elektrophorese, bei der bis hinab zu pH 2 alle Farbstoffe anionisch wandern.

Die im folgenden beschriebene Aufarbeitung einer reichlichen Pilzernte aus dem Schwarzwald im Herbst 1970 wurde deshalb möglichst rasch, kühl und im Dunkeln ausgeführt. 300 kg Pilzköpfe ergaben 20 kg Haut, deren Methanolextrakte, im Vakuum eingedampft, bei Gefriertrocknung 600 g dunkel rotbraunen Rückstand mit einer spezifischen Extinktion (e^s) bei 475 nm von ca. 1.7 lieferten, der sich bei -40°C über ein Jahr ohne nennenswerte Farbstoffverluste aufbewahren ließ. Die Reinigung und Trennung erfolgte in kleineren Portionen, im wesentlichen in vier Schritten.

a) Bei der Chromatographie an CM-Sephadex C-25 ($-\text{CH}_2\text{CO}_2^-\text{Na}^+$ -Form) in Methanol/Wasser (3:7) wandern die meisten farblosen Begleitstoffe langsamer als die Farbstoffzone. Die Gefriertrocknung der Hauptfraktion lieferte mit ca. 8% Gewichtsausbeute einen rotbraunen Rückstand mit einer spezifischen Extinktion bei 475 nm von 8–9, entsprechend einer Farbstoffausbeute von 40%.

b) Bei der folgenden Reinigung an Sephadex G 10 in Wasser wurden im Vorlauf braune Verunreinigungen abgetrennt und am langsam wandernden Ende der Farbstoffzone eine gelbe Komponente mit λ_{max} 425 nm und $e^s = 15$ angereichert.

⁷⁾ F. Bohlmann und H. Kritzler, Chem. Ber. **90**, 1512 (1957).

⁸⁾ M. Nilsson und T. Norin, Acta Chem. Scand. **14**, 2243 (1960).

⁹⁾ G. Talbot und L. C. Vining, Can. J. Bot. **41**, 639 (1963), erhielten durch Chromatographie an Cellulose und Florisil drei nicht einheitliche Fraktionen; ferner Privatmitteilungen aus mehreren Laboratorien.

¹⁰⁾ W. Grob, Dissertation, Universität Marburg 1966.

¹¹⁾ Bei Vorversuchen wurde auch an Cellulosepulver und Stärke eine Fraktionierung in gelbe, orangefarbene und violettrote Komponenten beobachtet, reine Farbstoffe ließen sich so jedoch bisher nicht erhalten (s. auch Lit.^{5,9,10)}).

c) Die Hauptfraktion vom Trennschritt b) wurde nun mit einem Kochsalzgradienten (0,3–1,0 M in Wasser) auf DEAE-Sephadex A-25 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Cl}^-$ -Form) zu dem in Abb. 1 gezeigten Elutionsdiagramm auseinandergezogen, in dem die volle Linie den Extinktionsverlauf bei 475 nm wiedergibt und nach der Schmutzfraktion 0 sieben orangefarbene Komponenten anzeigt, die als Musca-aurine-I bis -VII bezeichnet werden. Trägt man die bei 425 nm gemessenen Extinktionen der Eluatfraktionen auf, so erkennt man an der gestrichelten Linie mit Musca-aurin-II überlappend eine gelbe Komponente: Muscaflavin. Zwischen den Musca-aurinen-II und -III erscheint eine violette Zone, deren Absorptionsmaximum bei 540 nm liegt und deren Konzentrationsverlauf bei dieser Wellenlänge durch die $-\cdot-\cdot-$ Linie in Abb. 1 eingetragen ist. Diese Komponente wird mit Muscapurpurin bezeichnet. Zwischen den Musca-aurinen-I und -II findet man bei einzelnen Ansätzen unterschiedlich stark ausgeprägt eine rotbraune Zone mit einem Absorptionsmaximum bei 495 nm, die mit der punktierten Linie in Abb. 1 angedeutet wird und deren Inhaltsstoff Muscarubrin heißen soll.

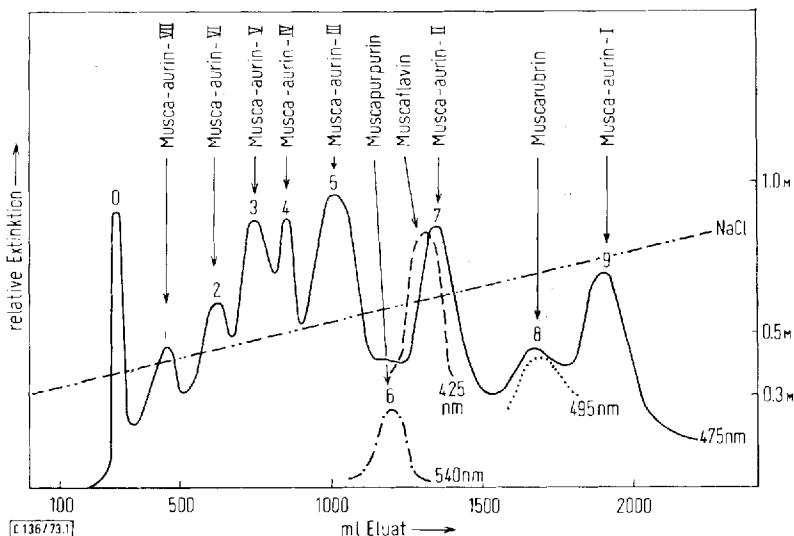


Abb. 1. Elutionsdiagramm der Fliegenpilzfarbstoffe an DEAE-Sephadex A-25 (Säule 3×65 cm, linearer Kochsalzgradient $-\cdot-\cdot-$)

d) Durch Herausschneiden entsprechender Fraktionen, Einengen durch Gefrier-trocknung, Entsalzen an Sephadex G 10 in Wasser und mehrfaches Wiederholen der Schritte c) und d) wurden zunächst 5 Farbstoffkomponenten chromatographisch rein gewonnen. Da die Farbstoffe sich während der Chromatographie laufend zersetzen, konnte das nur erreicht werden, indem zum Schluß kleine Mengen (5–50 mg) rasch verarbeitet wurden.

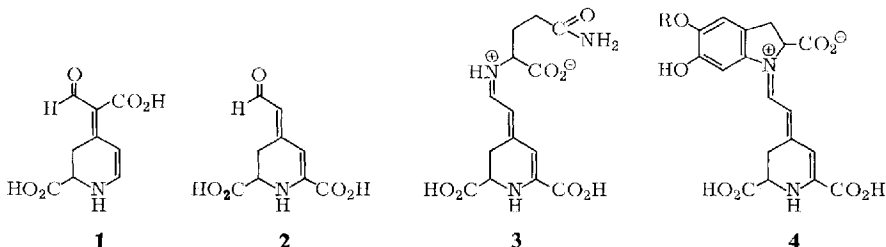
Aus den spektroskopischen und analytischen Daten im exp. Teil erkennt man, daß alle bisher isolierten Farbstoffe als optisch aktive Natriumsalze von Carbonsäuren vorliegen, die alle 5–6% Stickstoff enthalten und im sichtbaren Spektralbereich viel intensivere Absorptionsmaxima aufweisen als im UV. Damit ist gezeigt, daß

Fliegenpilze vier verschiedene Farbstofftypen enthalten, deren Elektronenspektren nicht mit einer Hydroxyterphenylchinon-Konstitution⁶⁾ vereinbar sind. Es kann sich auch nicht um einen Detailunterschied handeln; diese Farbstoffe müssen prinzipiell andere Chromophore enthalten.

Natürlich wurden Pilze verschiedener Herkunft verglichen, aus Südschweden, aus dem Weserbergland, aus dem Harz, von wo *Kögl* vor 40 Jahren sein Ausgangsmaterial bezog, aus der Nähe von Bremen, Bückeburg, Karlsruhe und Marburg, aus dem Spessart, dem Pfälzer Wald, dem Bayerischen Wald und dem Schwarzwald. Die Extrakte aller Pilze zeigen praktisch das gleiche Elutionsdiagramm wie Abb. 1 mit Schwankungen im Gehalt einzelner Komponenten. Auch der Kaiserling, *Amanita caesarea*¹²⁾, eine in Italien geschätzte Delikatesse, enthält z.T. die gleichen Komponenten, viel weniger Muscarubin und nur Spuren Muscapurpurin.

Muscaflavin

Da sich Muscaflavin an Sephadex G 10 nicht vom Kochsalz abtrennen ließ, wurden die Muscaflavin-haltigen Fraktionen (λ_{\max} 425 nm) des Reinigungsschrittes b) an DEAE-Sephadex A-25 in der Phosphatform mit 0.2 M Phosphatpuffer pH 6.8 aufgetrennt. An Sephadex G 10 konnte dann das Muscaflavin vom Phosphat befreit werden. Die weitere Konstitutionsermittlung führte zum Vorschlag **1**¹³⁾ für Muscaflavin. Diese Formel ist isomer zur Betalaminsäure (**2**), die von *Dreiding, Wilcox* und *Wyler*¹⁴⁾ als Abbauprodukt der Betalaine erkannt und auch als Naturstoff nachgewiesen wurde¹⁵⁾. Daraufhin wurde Betalaminsäure aus Vulgaxanthin-I und Betanin aus der roten Bete gewonnen und mit Muscaflavin verglichen. Beide Verbindungen weisen in vielen Eigenschaften ihrer Dimethylester deutliche Unterschiede auf, die Elektronenspektren der Natriumsalze von **1** und **2** (Abb. 2) sowie ihrer Ester sind jedoch so ähnlich, daß man für beide Verbindungen den gleichen Chromophor annehmen muß.



Musca-aurine

Nach diesem Ergebnis war es natürlich naheliegend, auch die anderen Farbstofftypen aus dem Fliegenpilz mit den orangefarbenen¹⁶⁾ und violetten Farbstoffen aus

¹²⁾ Zwei schöne Exemplare aus dem Kaiserstuhl wurden uns von Herrn *D. Knoch*, Emmendingen, überlassen.

¹³⁾ *H. Döpp* und *H. Musso*, noch nicht veröffentlicht.

¹⁴⁾ *H. Wyler, M. E. Wilcox* und *A. S. Dreiding*, *Helv. Chim. Acta* **48**, 361, 1922 (1965).

¹⁵⁾ *L. Kimler, R. A. Larson, L. Messenger, J. B. Moore* und *T. J. Mabry*, *Chem. Commun.* **1971**, 1329.

¹⁶⁾ *M. Piattelli, L. Minale* und *G. Prota*, *Phytochemistry* **4**, 121 (1965).

den *Centrospermae* zu vergleichen. Musca-aurin-I und -II stimmen im Elektronenspektrum (Abb. 3) mit Vulgaxanthin-I (3) überein, unterscheiden sich jedoch deutlich davon in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit (Abb. 6).

Muscarubrin

Das linksdrehende Natriumsalz kristallisiert aus Wasser in sehr feinen, schwerlöslichen Nadelchen. Das Elektronenspektrum (Abb. 4) paßt zu keinem bisher aufklärten Farbstoff, das Absorptionsmaximum liegt bei 496 nm ähnlich wie bei der Farbstofffraktion A₃ (505 nm)¹⁷⁾ aus der Wunderblume (*Mirabilis jalapa*), für die noch kein Konstitutionsvorschlag gemacht wurde. Nur bei Muscarubrin ist λ_{\max} geringfügig und reversibel pH-abhängig.

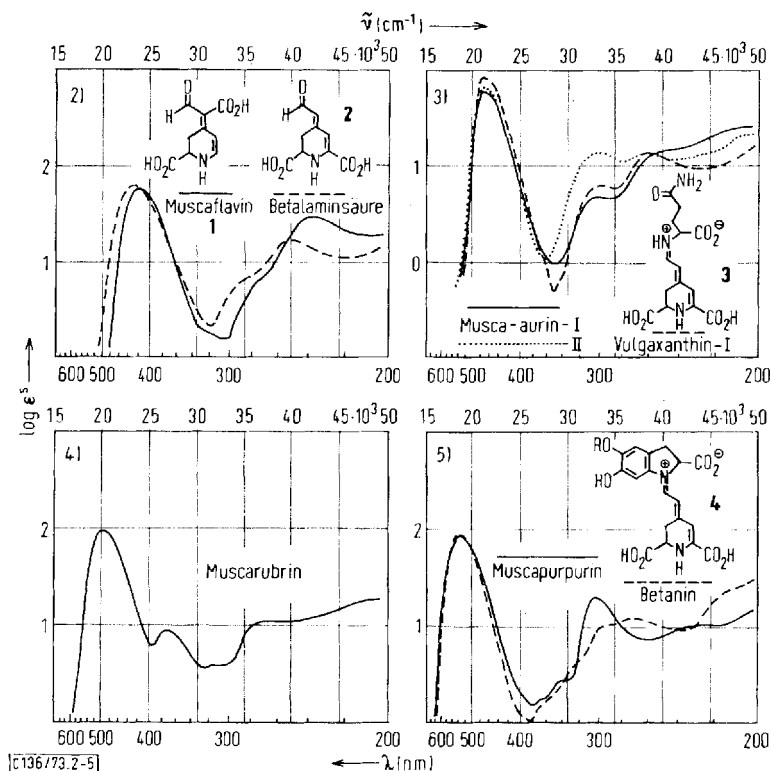


Abb. 2. Elektronenspektren der Natriumsalze von Betalaminsäure — — — und Muscaflavin — — — in Wasser

Abb. 3. Elektronenspektren der Natriumsalze von Vulgaxanthin-I — — —, Musca-aurin-I — — — und Musca-aurin-II ··· in Wasser

Abb. 4. Elektronenspektrum von Muscarubrin in Wasser

Abb. 5. Elektronenspektren der Natriumsalze von Betanin — — — und Muscapurpurin — — — in Wasser

¹⁷⁾ M. Piattelli, L. Minale und R. A. Nicolaus, *Phytochemistry* **4**, 817 (1965).

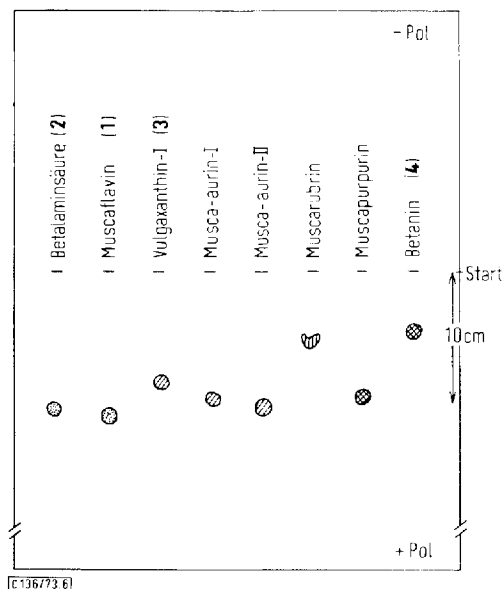


Abb. 6. Pherogramm der Farbstoffe aus *Amanita muscaria* und *Beta vulgaris* bei pH 6.2 (Spannung 2000 Volt, Stromstärke 55–60 mA, Laufzeit 60 min)

Muscapurpurin

Diese violette Komponente muß den gleichen Chromophor enthalten wie Betanin (4), denn die Elektronenspektren (Abb. 5) stimmen im langwelligen Maximum bei 540 nm überein. Der Unterschied im UV-Gebiet bei 303 nm muß darauf beruhen, daß beide Farbstoffe in der Stellung und Art der Substituenten an der Peripherie der Moleküle verschieden sind. Auch wandert Muscapurpurin bei der Elektrophorese deutlich schneller als Betanin (Abb. 6).

Damit ist jetzt bekannt, daß die Farbstoffe in der roten Huthaut des Fliegenpilzes zur Klasse der Betalaine²⁾ gehören, die bisher nur in höheren Pflanzen gefunden wurden. Das ist sicher für die Systematik und Entwicklungsgeschichte in der Botanik von Interesse. Ein Hydroxychinonfarbstoff konnte in Fliegenpilzen auch in geringer Menge nicht gefunden werden (vgl. auch⁹⁾).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die großzügige Unterstützung. Herrn Prof. H. Kühlwein, Karlsruhe, und Herrn D. Knoch, Emmendingen, danken wir für die Hilfe bei der Beschaffung der Kaiserlinge sowie Fräulein S. Fischer für die geschickte experimentelle Mitarbeit. Herr Prof. D. Döpp war beim Erkunden fruchtbarer Standorte und beim Sammeln großer Pilzmengen wesentlich beteiligt, wofür wir ebenfalls herzlich danken.

Experimenteller Teil

Alle chromatographischen Trennungen an Sephadex (Pharmacia) wurden im Dunkeln im Kühlraum bei 7–10°C mit einem Fraktionssammler durchgeführt. In den Fraktionen wurde die Extinktion bei 475, 420 bzw. 540 nm am Zeiss PMQ II gemessen.

Die vereinigten Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer bei Badtemp. unter 30°C eingengt und zuletzt gefriergetrocknet. Die aufgeführten Extinktionsangaben und Auswaagen sind in den meisten Fällen Mittelwerte von 15–30 etwa gleichartigen Chromatogrammen.

Elektronenspektren: Cary 14 oder Beckman DK 2 A; CD-Spektren: Dichrographie II, Roussel-Jouan; IR-Spektren: Perkin-Elmer 221. Hochspannungselektrophorese: Pherograph-Original-Frankfurt, Type 64 nach Wieland-Pfleiderer, Pyridin-Eisessig-Puffer pH 6,2, 2000 Volt, Laufzeit 60 min, Papier MN 214, Macherey, Nagel & Co., Düren, 58×35 cm.

Ausgangsmaterial: Die im Schwarzwald frischgesammelten Fliegenpilze wurden im Kühlraum bei $5-10^\circ\text{C}$ aufbewahrt. An den folgenden Tagen (je nach Menge $15-45$ h nach dem Sammeln) wurde die rote Huthaut abgezogen und in Portionen zu 300 g bei -40°C gelagert. Die Ernte 1970 betrug 19.6 kg Haut von 294 kg Pilzen.

Extraktion: 300 g gefrorene Haut wurden grob zerkleinert, mit 750 ml Methanol übergossen und unter gelegentlichem Umrühren 30 min im Dunkeln stehengelassen. Die kräftig orangefarbene Lösung wurde durch ein Leinentuch filtriert und der Rückstand ausgepresst. Der Abpreßrückstand wurde in gleicher Weise ein zweites Mal mit 150 ml Wasser und 450 ml Methanol extrahiert. Die Methanol-Wasser-Extrakte wurden im Rotationsverdampfer bei $20-30^\circ\text{C}$ eingengt, zur Entfernung von Lipiden über eine Kieselgurschicht abgesaugt und eingefroren. Zur Bestimmung des Rückstandsgewichts und der spez. Extinktion wurde eine kleine Probe gefriergetrocknet. Aus 300 g Haut erhielt man etwa 9 g Rückstand mit $\epsilon_{475}^s = 1.7$.

Chromatographie an CM-Sephadex C-25: Der Rohextrakt von $1.8-2.0$ kg Haut ($50-60$ g Rückstand) wurde an einer CM-Sephadex C-25-Säule (Na[®]-Form; 7×70 cm) in Methanol/Wasser (3:7) chromatographiert. Nach 900 ml Eluat wurde die breite Farbstoffzone in 2 Fraktionen aufgefangen:

CM I: 700 ml; 3.6 g, $\epsilon_{475}^s = 8.72$ (Aminosäuren und Kohlenhydrate negativ)

CM II: 800 ml; 10.0 g, $\epsilon_{475}^s = 2.05$ (Aminosäuren und Kohlenhydrate positiv)

Die Hauptmenge der farblosen Ballaststoffe wurde nach den Farbstoffen eluiert.

Aus CM II konnten bei einer weiteren Chromatographie an CM-Sephadex 1.85 g Farbstoffgemisch mit $\epsilon_{475}^s = 5.93$ gewonnen werden.

Chromatographie an Sephadex G 10: Je 2.0 g der CM I-Fractionen wurden in 10 ml Wasser auf eine Sephadex G 10-Säule (5×50 cm) aufgetragen und bei einer Durchflußgeschwindigkeit von $1-2$ ml/min mit Wasser eluiert. Nach 350 ml Eluat wurden folgende Fraktionen aufgefangen:

G 10 I: 100 ml, braune Vorzone 0.44 g, $\epsilon_{\max}^s = 9.9$

G 10 II: 100 ml, Hauptzone mit λ_{\max} 475 nm 1.12 g, $\epsilon_{\max}^s = 7.9$

G 10 III: 130 ml, $\lambda_{\max} < 475$ nm 0.32 g, $\epsilon_{\max}^s = 11.0$

G 10 IV: 200 ml, λ_{\max} 475 nm 0.07 g, $\epsilon_{\max}^s = 7.8$

Die G 10 I-Fractionen wurden erneut über die G 10-Säule chromatographiert. Dabei erhielt man aus 2.0 g:

0.83 g Vorzone I mit $\epsilon_{475}^s = 9.3$ und

0.78 g Hauptzone II mit $\epsilon_{475}^s = 9.8$.

Die G 10 III-Fractionen wurden solange über G 10 chromatographiert, bis das Absorptionsmaximum bei $420-430$ nm lag. Aus 2.0 g G 10 III erhielt man:

1.4 g Hauptzone II mit $\epsilon_{475}^s = 9.4$ und

0.4 g G 10 III mit $\epsilon_{425}^s = 15.4$ mit Schulter bei 475 nm.

Trennung der Farbstoffe an DEAE-Sephadex A-25: Je 2.5 g G 10 II-Fraktion wurden an DEAE-Sephadex A-25 (Chlorid-Form, Säule 3×65 cm, 10 -ml-Fractionen) mit einem linearen Kochsalzgradienten ($0.3 \rightarrow 1.0$ M NaCl; 3000 ml) innerhalb von 24 h aufgetrennt. Es wurden

9 verschiedene Zonen eluiert, die nach Einengen im Rotationsverdampfer an Sephadex G 10 (Säule 3.5×50 cm) entsalzt wurden. Beim Entsalzen der Zonen 6 und 7 wurde zusammen mit der Kochsalzfraktion gelber Farbstoff Muscaflavin eluiert, der bei der vorangegangenen Trennung an Sephadex G 10 nicht vollständig abgetrennt worden war.

Beim Einengen der Zonen 8 und 9 fiel Muscarubrin (MR) als rotbrauner amorpher Niederschlag aus, der abzentrifugiert und getrennt vom Überstand ebenfalls an Sephadex G 10 entsalzt wurde.

Bei der DEAE-Säule wurden nach 260 ml Eluat folgende Zonen erhalten:

| Zone | | λ_{\max} (nm) | ml | nach dem Entsalzen mg | $\epsilon^s_{\lambda_{\max}}$ |
|------|---------|-----------------------|-----|--------------------------|-------------------------------|
| 0 | Vorzone | 475 | 70 | verworfen | |
| 1 | MA VII | 475 | 170 | 198 | 3.5 |
| 2 | MA VI | 475 | 170 | 287 | 4.2 |
| 3 | MA V | 475 | 140 | 144 | 8.1 |
| 4 | MA IV | 475 | 90 | 208 | 5.8 |
| 5 | MA III | 475 | 210 | 228 | 7.6 |
| 6 | MP | 475 | 170 | 74 | 12.3 |
| | | 540 | | | 4.0 |
| 7 | MA II | 475 | 170 | 55 | 21.7 |
| 8 | | 475 | 350 | 55 | 12.3 |
| 9 | MA I | 475 | 230 | 45 | 18.8 |
| | MR | 496 | | 4.7 | 68.4 |

Isolierung von Muscaflavin (I): Die G 10 III-Fractionen mit Absorptionsmaximum bei 425 nm wurden an DEAE-Sephadex A-25 in der Phosphatform (Säule 2×30 cm, 10-ml-Fractionen) mit 0.2 M Phosphatpuffer pH 6.8 (0.2 M NaH_2PO_4 : 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 1:1$) chromatographiert. Nach 2 orangefarbenen Zonen wurde Muscaflavin (MF) als breite gelbe Zone eluiert.

Nach 250 ml Eluat: Zone I, λ_{\max} 475 nm, 150 ml.

Nach 440 ml Eluat: Zone II, λ_{\max} 475 nm, 150 ml.

Nach 870 ml Eluat: MF λ_{\max} 420 nm, 600 ml.

Die Zonen I und II wurden verworfen. Der mittlere Teil der Muscaflavinzone wurde eingengt und das auskristallisierte Phosphat abgesaugt. Das Filtrat wurde mehrmals an Sephadex G 10 entsalzt (einmal Säule 3.5×50 cm; 3–4 mal 1.5×65 cm).

Aus 0.4 g G 10 III, $\epsilon^s_{425} = 15.4$, erhielt man 40 mg Muscaflavin mit $\epsilon^s_{420} = 58.4$; Gef. C 36.48% H 2.79% N 4.89% (36.5% Rückstand).

UV (H_2O): λ in nm (ϵ^s) Max. 420 (58.4), Min. 307 (1.6), sh 274 (6.8), Max. 238 (30.0), Min. 208 (19.3); 0.1 N HCl: λ_{\max} 405 nm; 0.1 N NaOH: λ_{\max} 420 nm. — CD (H_2O): λ in nm ($\Delta\epsilon^s \cdot 10^3$) 410 (–4.6), 305 (–4.4), 254 (–9.7), 232 (+15.0). — IR (KBr): 3360 breit, 2925, 2835, 2750, 1623, 1535, 1505, 1360, 1315, 1180, 1070 cm^{-1} .

Musca-aurin-I: Die entsalzten Musca-aurin-I-Fractionen (Zone 9) der Trennung an DEAE-Sephadex wurden durch Chromatographie an Sephadex G 10 in Wasser (Säule 1.5×65 cm) in Portionen zu 50 mg weiter gereinigt. Aus 150 mg MA I-Fraktion ($\epsilon^s_{475} = 18.8$) erhielt man durch Herausschneiden der Hauptzone nach der Gefriertrocknung 48 mg mit $\epsilon^s_{475} = 46.0$. Eine Wiederholung dieses Reinigungsschrittes ergab 29 mg MA I mit $\epsilon^s_{475} = 64.0$.

UV (H₂O): λ in nm (ϵ^s) Max. 475 (64.0), sh 460 (56.8), Min. 340 (1.0), sh 295 (5.1), sh 245 (13.6). — CD (H₂O): λ in nm ($\Delta\epsilon^s \cdot 10^3$) 475 (+7.9), 305 (+1.5), 263 (−1.0), 220 (+5.6). — IR (KBr): 3360 breit, 1620, 1580, 1500, 1365, 1280, 1220 cm^{−1}.

Musca-aurin-II: 220 mg Musca-aurin-II-Fraktion (Zone 7; $\epsilon_{475}^s = 21.7$) wurden an einer DEAE-Säule (2 × 45 cm) mit einem Kochsalzgradienten (0.5 → 0.7 M NaCl; 500/500 ml) von Muscapurpurin (λ_{\max} 540 nm) abgetrennt. Die orangegelbe Hauptzone ergab nach Entsalzen an Sephadex G 10 und Gefriertrocknung 63 mg mit $\epsilon_{475}^s = 49.5$. Anschließend Chromatographie an einer DEAE-Säule (2 × 45 cm) mit 0.5 M NaCl-Lösung, Entsalzen der Hauptzone an Sephadex G 10 und Nachreinigung an einer Sephadex G 10-Säule (1.5 × 65 cm) ergab 14.1 mg gefriergetrocknetes Musca-aurin-II ($\epsilon_{478}^s = 67.2$); Gef. C 38.22% H 3.09% N 5.54% (33.6% Rückstand).

UV (H₂O): λ in nm (ϵ^s) Max. 478 (67.2), sh 462 (60.0), Min. 360 (1.1), Max. 301 (13.7), Min. 278 (11.5), Max. 261 (13.5), Min. 242 (11.8); 0.1 N HCl: λ_{\max} 478 nm; 0.1 N NaOH: Zersetzung. — CD (H₂O): λ in nm ($\Delta\epsilon^s \cdot 10^3$) 477 (+15.0), 265 (−5.4), 236 (+3.8), 215 (+7.5). — IR (KBr): 3370 breit, 1700, 1610, 1495, 1370, 1195 cm^{−1}.

Muscarubrin: 39 mg Muscarubrin-Fraktion ($\epsilon_{496}^s = 68.4$) wurden in drei Portionen an einer Sephadex G 10-Säule (1.5 × 65 cm) in Wasser chromatographiert. Die gefriergetrockneten Hauptzonen ergaben 14.8 mg Muscarubrin mit $\epsilon_{496}^s = 97.3$; Gef. C 39.95% H 3.78% N 5.78% (36.7% Rückstand).

UV (H₂O): λ in nm (ϵ^s) Max. 496 (97.3), Min. 394 (6.2), Max. 373 (9.0), sh 358 (7.7), Min. 324 (3.6), sh 314 (3.8), sh 280 (11.0), Max. 271 (12.3), Min. 260 (12.2). — pH-Abhängigkeit: λ_{\max} in nm (pH) 465 (8.5); 472 (7.2); 488 (6.2); 493 (5.2); 496 (4.2); 503 (1.3). — CD (H₂O): λ in nm ($\Delta\epsilon^s \cdot 10^3$) 496 (−13.7), 373 (+5.1), 312 (+7.3), 250 (−4.2), 215 (+6.3). — IR (KBr): 3425 breit, 3290, 2925, 2855, 1602, 1540, 1380, 1350, 1290, 1180, 1100, 1015 cm^{−1}.

Muscapurpurin: 530 mg Muscapurpurin-Fraktion (Zone 6; $\epsilon_{540}^s = 4.0$, $\epsilon_{475}^s = 12.3$) wurden an einer DEAE-Säule (2 × 45 cm) mit einem linearen Kochsalzgradienten (0.5 → 0.7 M NaCl; 500/500 ml) chromatographiert. Die MP-enthaltende Zone ergab nach Entsalzen, Einengen und Gefriertrocknen 84 mg Rückstand mit $\epsilon_{540}^s = \epsilon_{475}^s = 25.0$. Zur weiteren Reinigung wurde in gleicher Weise mit einem flacheren Gradienten (0.5 → 0.6 M NaCl) aufgetrennt. Man erhielt 32.4 mg Rückstand mit $\epsilon_{540}^s = 39.7$ (sh bei 480 nm). Anschließend wurde erneut an DEAE-Sephadex (2 × 45 cm) mit 0.5 M NaCl chromatographiert. Der mittlere Teil der Hauptzone ergab nach Entsalzen und Gefriertrocknen 14.1 mg MP-Fraktion mit $\epsilon_{540}^s = 66.0$. Bei der Nachreinigung an Sephadex G 10 (Säule 1.5 × 65 cm) erhielt man 7.3 mg Muscapurpurin mit $\epsilon_{540}^s = 86.1$; Gef. C 36.43% H 3.44% N 4.99% (35.7% Rückstand).

UV (H₂O): λ in nm (ϵ^s) Max. 540 (86.1), Min. 380 (1.5), Max. 303 (19.6), Min. 262 (7.4), Plateau 226 (10.3); 0.1 N HCl: λ_{\max} 540 nm; 0.1 N NaOH: Zersetzung. — CD (H₂O): λ in nm ($\Delta\epsilon^s \cdot 10^3$) 540 (−4.8), 370 (+1.5), 300 (+4.8), 246 (+2.0), 228 (−2.6). — IR (KBr): 3380 breit, 2925, 2855, 1615, 1510, 1365, 1235, 1210 cm^{−1}.

Isolierung von Vulgaxanthin-I (3) und Betanin (4) aus Beta vulgaris: Die Extraktion, Anreicherung und Trennungen wurden entsprechend wie bei den Fliegenpilzfarbstoffen durchgeführt. Aus 2 kg Rote Bete erhielt man 1.26 g Vulgaxanthin-Fraktion mit $\epsilon_{475}^s = 25.3$ und 0.56 g Betanin-Fraktion mit $\epsilon_{538}^s = 48.0$.

Bei weiterer Chromatographie an DEAE-Sephadex mit 0.3 M NaCl-Lösung (Säule 3 × 60 cm) und Entsalzung der Hauptzone an Sephadex G 10 erhielt man 340 mg Vulgaxanthin-I mit $\epsilon_{475}^s = 57.0$. Eine Probe von 120 mg ergab bei der Nachreinigung an einer Sephadex G 10-Säule (1.5 × 65 cm) in der Hauptzone 53 mg Vulgaxanthin-I als amorphes gefriergetrocknetes Natriumsalz mit $\epsilon_{475}^s = 85.7$.

UV (H₂O): λ in nm (ϵ^s) Max. 475 (85.7), sh 462 (80.0), Min. 350 (0.7), Max. 298 (7.3), Min. 286 (5.8), Max. 258 (13.8), Min. 227 (9.3). — CD (H₂O): λ in nm ($\Delta\epsilon^s \cdot 10^3$) 475 (+8.9), 260 (−6.8), 230 (+2.7), 205 (+6.4).

Die Betanin-Fraktion lieferte bei entsprechender Weiterreinigung 157 mg Betanin mit $\epsilon_{538}^s = 82.4$. 50 mg wurden an einer Sephadex G 10-Säule (1.5 × 65 cm) nachgereinigt. Dabei erhielt man nach Gefriertrocknung der Hauptzone 34 mg Betanin mit $\epsilon_{538}^s = 89.0$ als amorphes Natriumsalz.

UV (H₂O): λ in nm (ϵ^s) Max. 538 (89.0), Min. 385 (1.1), sh 295 (10.2), Max. 268 (12.0), Min. 238 (9.0). — CD (H₂O): λ in nm ($\Delta\epsilon^s \cdot 10^3$) 535 (+7.1), 375 (+2.0), 297 (−11.0), 265 (−7.4), 242 (+2.5), 215 (+6.1).

Betalaminsäure aus Vulgaxanthin-I: 50 mg Vulgaxanthin-I mit $\epsilon_{475}^s = 57.0$ wurden in 2 ml 5proz. Na₂HPO₄-Lösung unter Zusatz von 0.25 ml 1 N NaOH 3 h bei Raumtemp. stehen gelassen. Aus der gelben Lösung (λ_{\max} 430 nm, sh 470 nm) wurde durch mehrmalige Chromatographie an Sephadex G 10 (Säule 1.5 × 65 cm) das Natriumsalz der Betalaminsäure abgetrennt, das nach Gefriertrocknung 10 mg amorphen dunkelgelben Rückstand mit $\epsilon_{428}^s = 60.5$ ergab.

UV (H₂O): λ in nm (ϵ^s) Max. 428 (60.5), Min. 320 (2.1), sh 285 (6.8), Max. 250 (17.2), Min. 220 (11.1). — CD (H₂O): λ in nm ($\Delta\epsilon^s \cdot 10^3$) 430 (+6.0), 320 (+1.8), 250 (−7.2), 205 (+6.2).

[136/73]