

Zur Kenntnis der *Hygrocybe*-pigmente*

A. BRESINSKY und I. KRONAWITTER

Botanisches Institut der Universität Regensburg,
Universitätsstraße 31, 8400 Regensburg

Eingegangen am 10.6.1986

Bresinsky, A. & I. Kronawitter (1986): A contribution to the knowledge of the pigments of *Hygrocybe*. Z. Mykol. 52(2): 321–334.

Key Words: Pigments, muscaflavine, hygroaurines, *Hygrophoraceae*, *Hygrocybe*.

Abstract: Water-soluble yellow pigments of the genus *Hygrocybe* (*Agaricales*) were separated chromatographically and documented in elution diagrams. The pigments of *Hygrocybe* species from different collections out of various localities were examined for constancy within individual species and for differences among related taxa. Muscaflavine was found in 42 of the 53 species studied. The hygroaurines which had been shown by other authors to be connected with muscaflavine were subjected to an indirect structure analysis of their amino acid content. The suspected combination of threonine with one of the hygroaurines was confirmed directly.

Zusammenfassung: Die wasserlöslichen gelben Pigmente der Gattung *Hygrocybe* (*Agaricales*) wurden mittels Säulenchromatographie getrennt und als Elutionsdiagramme abgebildet. Die Pigmentierung einzelner *Hygrocybe*-Arten wird auf die Konstanz innerhalb verschiedener Kollektionen einer Art sowie auf sippenpezifische Unterschiede untersucht. In 42 von 53 bearbeiteten Arten wurde Muscaflavin gefunden. Die zusammen mit Muscaflavin auftretenden Hygroaurine werden nach den bereits von anderen Autoren veröffentlichten Strukturvorstellungen (als Schiffische Base aus Muscaflavin und jeweils einer Aminosäure) auf die beteiligten Aminosäuren einer indirekten Strukturanalyse unterworfen. Das hierbei u. a. vermutete Vorkommen von Threonin-Hygroaurin konnte durch direkte Aminosäureanalyse weitgehend bestätigt werden.

Die leuchtend gelben und roten Farben der Saftlinge (Arten der Gattung *Hygrocybe*) haben bereits öfters das Interesse von Mykologen und Chemikern auf sich gezogen. v. Ardenne & al. (1974) wiesen in *Hygrocyben* gelbes Muscaflavin nach und klärten dessen Struktur auf. Die Verbindung war zuvor aus *Amanita muscaria* isoliert worden (Döpp & Musso 1973a). Besl & al. (1975) fanden Muscaflavin bei einer größeren Zahl von rot und gelb gefärbten *Hygrocybe*-Arten und glaubten auch bei einigen Spezies der Gattung *Hygrophorus*, sect. *Discoidea* (*H. lucorum*, *hypothejus* und *speciosus*) einen entsprechenden Nachweis erbracht zu haben. Schrödl (1975) und Cibula (1976) haben sich mit Pigmentmustern bei *Hygrocybe* beschäftigt. Weitere chemische Untersuchungen an *Hygrophoraceen* erfolgten durch Fugmann (1985).

* Bericht über Teilaspekte einer von I. Kronawitter gefertigten Doktorarbeit (Diss. Regensburg, 1984), die vom Erstautor dieses Beitrags angeleitet wurde.

Bei der Auftrennung der wasserlöslichen Pigmente von gelben und orangeroten *Hygrocyben* erhielten v. A r d e n n e & al. (1974) außer Muscaflavin ($\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$) auch drei goldgelbe Fraktionen (Hygroaurine; $\lambda_{\max} = 465 \text{ nm}$), die bei Behandlung mit 0,6 n NH_4OH (20 min Raumtemperatur) ein mit dem von Muscaflavin übereinstimmendes Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$ zeigten. Bei Veresterung mit Diazomethan lieferten diese Fraktionen Muscaflavin-dimethylester.

Hingegen ließ sich bei den oben genannten *Amanita*-Arten in den gelb gefärbten Fraktionen des wäßrigen Pigmentextraktes nach entsprechender Behandlung Betalaminsäure-dimethylester nachweisen (D ö p p & M u s s o , 1973b). Daraus konnte geschlossen werden, daß bei den *Hygrocyben* Betalaminsäure als Komponente der gelben Pigmente fehlt im Gegensatz zu den entsprechend gefärbten *Amanita*-Arten. Es lag daher die Vermutung nahe, daß ähnlich wie die Betalaminsäure in den Betalainen der *Amanita*-Arten in den *Hygrocybe*-Arten das Muscaflavin mit Aminosäuren verbunden ist.

Ohne im Detail die Doktorarbeit von K r o n a w i t t e r (1984) zu referieren – eine ausführliche Darstellung aller Ergebnisse soll in einer von der Autorin seit längerer Zeit angestrebten Veröffentlichung geschehen –, sei hier doch auf die wichtigsten Befunde zur Pigmentchemie der Gattung *Hygrocybe* eingegangen. An den Arbeiten war durch weiterführende Hinweise Prof. Dr. W. Steglich, Bonn, und durch Ausführung von Aminosäure-Analysen (im Labor von Prof. Steglich) mein Mitarbeiter H. Kemmer beteiligt. Herr Besl half mit vielerlei Ratschlägen. Allen Helfern sei hiermit der beste Dank ausgesprochen.

Material und Methoden

Die angewandten Methoden und das benützte Material sind ausführlich in der Dissertation von K r o n a w i t t e r (1984) beschrieben. Für die Untersuchung erwiesen sich tiefgefrorene oder in Alkohol eingelegte Pilze als brauchbar. Die Auftrennung der Pigmente erfolgte mittels Gradienten-Ionenaustauschchromatographie nach der Methode von D ö p p & M u s s o (1973a, 1974); sie wurde in einer mit DEAE-Sephadex A-25 gefüllten Säule (30 x 1 cm) mittels wäßriger Kochsalzlösung bei linear ansteigendem Kochsalzgradienten (0,3 bis 1,0 m) vorgenommen. Auf die Säule wurde 100 % (gelbe Arten) oder 25 % (rote Arten; diese enthalten gegenüber den gelben Spezies eine deutlich höhere Konzentration an gelben Pigmenten; der rote Farbeindruck kommt hier durch Überlagerung mit einem roten Pigment zustande) der Extraktmenge gegeben, die einer aus 1 g Frischpilz gewonnenen entsprach. Hierzu wurden die Pigmente mit wäßrigem Methanol durch mehrmaliges Wechseln der Lösung so lange extrahiert, bis die Fruchtkörper hellfarben (z. B. cremefarben) waren; lediglich die Fruchtkörper der schwärzenden Arten blieben nach der Extraktion intensiv schwarz.

Das Filtrat des Rohextraktes wurde im Rotationsverdampfer (Wassertemperatur 20–25 °C) völlig eingedampft; der Rückstand dann in wenig Wasser aufgenommen, die dabei entstehende farbige Lösung durch Dekantieren vom Rückstand getrennt und 3–5mal mit Petroläther (40–60 °C) ausgeschüttelt. Die gefärbte wäßrige Phase wurde am Rotationsverdampfer erneut zur Trockene eingedampft und der Rückstand tiefgekühlt aufbewahrt. Für die Säulenchromatographie wurde der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, über Filterwatte gereinigt, um dann auf die Säule in der oben angegebenen Menge aufgetragen zu werden. Für die während der Chromatographie eluierten Pigmentfraktionen wurde jeweils die Absorption (bei $\lambda = 465 \text{ nm}$) mittels eines Schreibers kontinuierlich aufgezeichnet (Elutionsdiagramm). Um die eluierten Pigmentfraktionen verschiedener Trennvorgänge miteinander vergleichen zu können, wurde die Elutionszeit von Muscaflavin als $R_M = 1$ festgesetzt und alle anderen (davor) eluierten Pigmentfraktionen auf diesen Wert bezogen. Ein Pigment mit $R_M = 0,50$ würde also in der halben Zeit gegenüber der Zeit von Muscaflavin eluiert. Durch Planimetrie der Gipfflächen des Elutionsdiagrammes und durch jeweiligen rechnerischen Bezug auf den Muscaflavin-Wert wurden F_{rel} -Werte erhalten. Diese F_{rel} -Werte geben an, wie groß bei einem Auftrennungsvorgang die relativen Mengen der einzelnen Pigmentfraktionen (Hygroaurine) im Vergleich zum Muscaflavin sind (vgl. R_M/F_{rel} -Diagramme Abb. 1–4).

Für die indirekte Strukturaufklärung der Hygroaurine wurde Säulenchromatographie wie oben beschrieben angewendet. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Aminosäuren ein Aminosäure-Analysator (Biotronic LC 6000 E) eingesetzt. Zur Bestimmung der freien Aminosäuren wurden getrocknete *Hygrocyben* zerkleinert und mit heißem Wasser extrahiert. Die Lösung wurde filtriert und eingedampft

