

Fluoreszenzstoffe aus *Cortinarius rubellus* Cke. – Steroide statt nephrotoxischer Cyclopeptide

L. MATTHIES, H. LAATSCH*

Institut für Organische Chemie, Universität Göttingen,
Tammannstr. 2, D-3400 Göttingen

W. PÄTZOLD

Schwarzwälder Pilzlehrschau, Werderstr. 17,
D-7746 Hornberg/Schwarzwaldbahn

Eingegangen am 15.2.1991

L. Matthies, H. Laatsch & W. Pätzold (1991) – Fluorescent constituents of *Cortinarius rubellus* Cke. – Steroides, not nephrotoxic cyclopeptides. – Z. Mykol. 57(2): 273–280.

Key Words: Cortinarin, *Cortinarius rubellus*, *Cortinarius speciosissimus*, Fluorescence, Mushroom, Sterol, Toxin.

Abstract: Fluorescent cyclic decapeptides, the so-called cortinarins have been claimed to cause – or at least to contribute to – the nephrotoxicity of the deadly poisonous mushroom *Cortinarius rubellus* (formerly *C. speciosissimus*). As the structure elucidation described in literature is doubtful or incorrect in decisive parts, the proposed structures must be disputed. The alleged cortinarins are not peptides: The blue fluorescence is mainly due to ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (11) and to photodecomposition products of the nephrotoxin orellanine (1). Moreover, we were not able to reproduce the isolation of fluorescent or any other peptides related to cortinarins from *Cortinarius rubellus*.

Zusammenfassung: Fluoreszierende cyclische Decapeptide, die sog. Cortinarine, sollen nach Literaturangaben – zumindest teilweise – für die tödliche Nephrotoxizität von *Cortinarius rubellus* (vormals *C. speciosissimus*) verantwortlich sein. Die beschriebene Strukturermittlung ist aber in wichtigen Teilen zweifelhaft oder nachweislich unkorrekt. Die als Cortinarine bezeichneten Substanzen sind keine Peptide: Die intensive, blaue Fluoreszenz von *Cortinarius rubellus*-Extrakten wird überwiegend von Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-on (11) hervorgerufen, über dessen Toxizität nichts bekannt ist. Weder Cortinarine oder deren Abbauprodukte, noch andere Peptide mit den beschriebenen Eigenschaften konnten aus Pilzen verschiedener Jahrgänge oder Standorte isoliert werden. Die Giftigkeit von *Cortinarius rubellus* muß somit Orellanin (1) zugeschrieben werden, dessen Photoprodukte auch einen Beitrag zur Fluoreszenz leisten.

1. Einleitung

Die hohe Giftigkeit einiger *Cortinarius*-Arten ist aus zahlreichen Berichten über z. T. tödliche Intoxikationen bekannt (Schumacher und Høiland 1983). Das Vergiftungs-Syndrom wurde nach einer Massenvergiftung mit *Cortinarius orellanus* 1952 in Polen entdeckt und erst danach auch verwandte Arten wie *Cortinarius rubellus* als gleich toxisch erkannt. Zu den Charakteristika (Flammer 1982) des sog. *Orellanus*-Syndroms gehören eine extrem lange Latenzzeit (2–17 Tage) und meist tiefgreifende Nie-

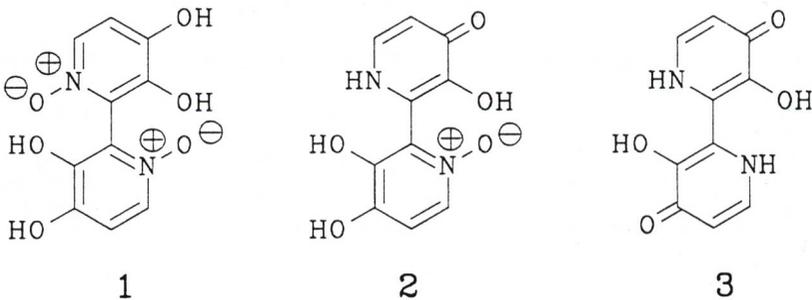
*) Anschrift zur Anforderung von Sonderdrucken

renschädigungen mit schlechten Heilungschancen. Aufgrund des verzögerten Einsetzens der Vergiftungssymptome und der hohen Toxizität, die an Knollenblätterpilzvergiftungen (Latenzzeit des *Phalloides*-Syndroms 8–12 h) erinnern, wurde die *Cortinarius*-Vergiftung zunächst als „*Paraphalloides*-Syndrom“ bezeichnet. Nach genauen klinischen Untersuchungen erwies sich das *Orellanus*-Syndrom jedoch als Pilzvergiftung völlig neuen Typs: Die für das *Phalloides*-Syndrom typischen hepatotoxischen Wirkungen konnten bei Vergiftungen mit den *Cortinarien* nur sehr selten beobachtet werden; dagegen steht die nephrotoxische Wirkung hier ganz im Vordergrund. Eine ausgezeichnete Zusammenfassung der medizinischen Aspekte beider Pilzvergiftungen findet sich bei Bresinsky & Besl (1985) sowie in der dort zitierten Literatur.

Das Vorkommen von stark fluoreszierenden Substanzen in Arten der Sektion *Leprocybe* hatte Moser bereits 1952 unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Bei chromatographischen Untersuchungen fiel späteren Bearbeitern auf, daß die Extrakte der nephrotoxischen *Cortinarius*-Arten stets polare, im UV Licht blau fluoreszierende Zonen bildeten. Erst in der jüngeren Vergangenheit wurden von Arbeitsgruppen in Polen und Schottland zwei völlig unterschiedliche Substanzgruppen als *Cortinarius*-Nephrotoxine vorgestellt, nämlich Bipyridyle und dem Amanitin ähnliche Cyclopeptide.

2. Orellanin: Ein Nephrotoxin und seine Photoabbauprodukte

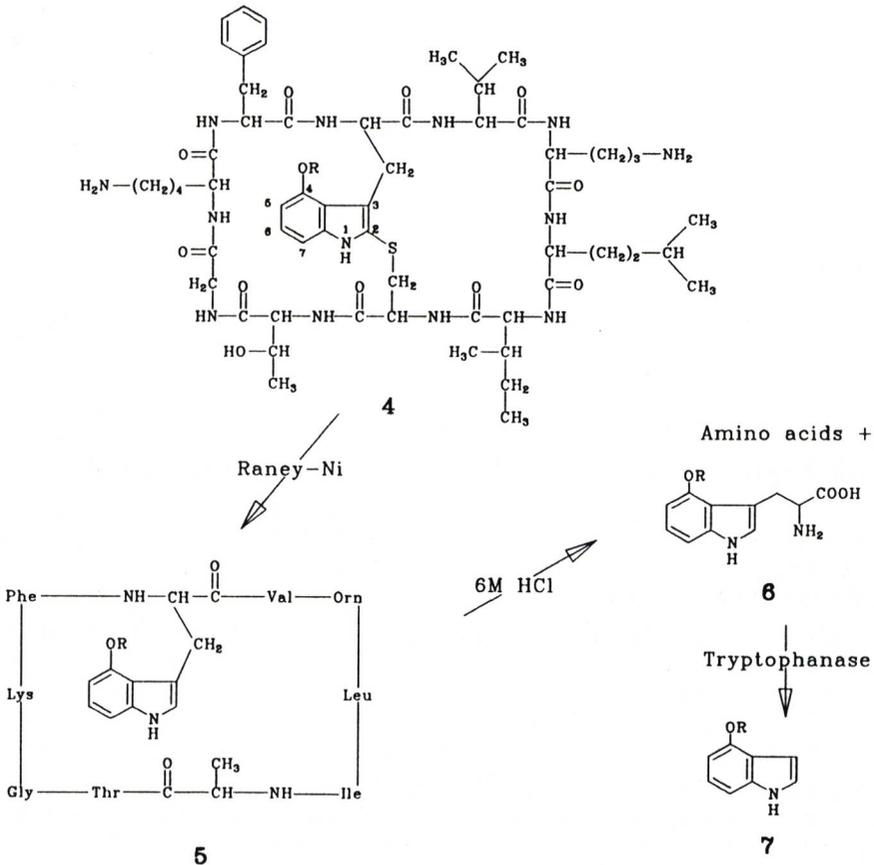
Ein langsam wirkendes *Orellanus*-Toxin wurde erstmals 1962 von Grzymala, in reiner Form schließlich 1979 von Antkowiak & Gessner aus *Cortinarius orellanus* isoliert und von letzteren als 3,3',4,4'-Tetrahydroxy-2,2'-bipyridyl-bis-N-oxid (1) aufgeklärt. Orellanin, das später auch aus *C. rubellus* (vormals *C. speciosissimus* Kühn. & Romagn.) isoliert wurde und auch in anderen *Cortinarien* vorkommt (Rapior et al. 1988), zersetzt sich im Licht zu 2 und 3, die unter UV-Bestrahlung im Chromatogramm blau fluoreszieren (Antkowiak & Gessner 1985); nach Tiecco et al. (1987) fluoresziert nur das nicht toxische Orellin (3).



Die Strukturen von 1–3 wurden inzwischen auch durch die Synthese bestätigt (Dehmlow & Schulz 1985, Tiecco et al. 1986). Toxikologische Untersuchungen (Gstrauntaler & Prast 1983) belegen die nephrotoxische Aktivität von Orellanin (1), und in den Tubuli toxin-geschädigter Nieren sind blau fluoreszierende Ablagerungen nachgewiesen worden (Bouska et al. 1980). Sowohl Isolierung, als auch die analytischen Daten von Orellanin (1) konnten von mehreren Bearbeitern und auch in der vorliegenden Untersuchung reproduziert werden (Prast 1982, Matthies 1991). Die Identität des Orellanins und seine nephrotoxischen Eigenschaften können damit als gesichert gelten.

3. Cortinarine: Nephrotoxische Cyclopeptide?

1984 gaben Tebbett & Caddy an, neue Cyclopeptide aus *C. rubellus* isoliert zu haben (Cortinarin A, 4a; Cortinarin B, 4b; Cortinarin C, 5b) und ordneten den angeblich blau fluoreszierenden Cortinarinen A und B einen Teil der nephrotoxischen Aktivität des Pilzes zu. Bei der Isolierung der Cortinarine aus *C. rubellus* griffen Tebbett & Caddy auf Ergebnisse von Testa (1970) zurück, der bei der Chromatographie von methanolischen Extrakten des Pilzes blau fluoreszierende Zonen gefunden hatte, die er aufgrund ihrer Anfärbbarkeit mit saurem Ninhydrin für Peptide hielt. Allerdings konnten spätere Bearbeiter diesen Befund Testas nicht reproduzieren (Antkowiak & Gessner 1975, Gamper 1977). Im Gegensatz zu Orellanin und seinen Photoprodukten ist die Isolierung von Cortinarinen in der Literatur bislang nur in der Originalarbeit beschrieben worden, die Strukturzuordnung wurde seither nicht durch neuere Ergebnisse bestätigt. Eine endgültige Abklärung der Frage, ob diese Peptide tatsächlich an der lebensbedrohlichen Cortinariusergiftung beteiligt sind, erschien auch aus medizinisch-diagnostischer Sicht geboten.



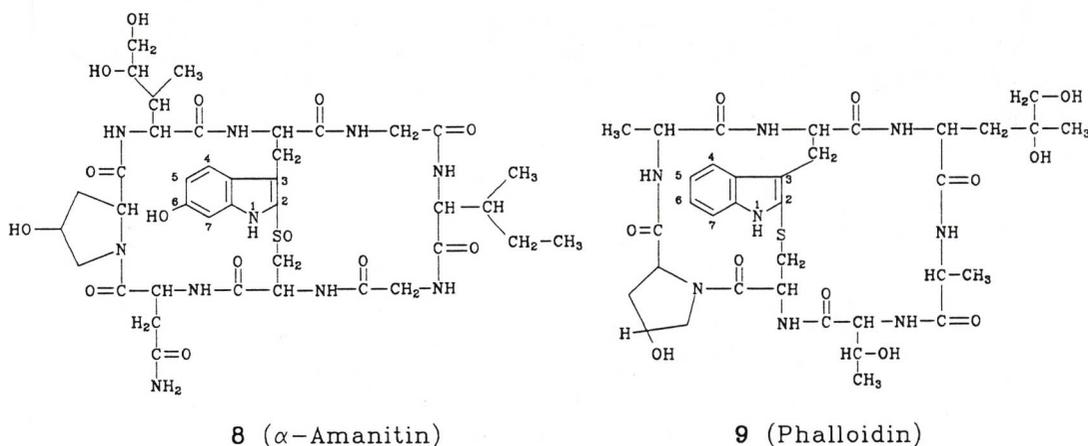
4a, 6a: R = H
 4b - 6b, 7: R = CH₃

4a: Cortinarin B 4b: Cortinarin A
 5b: Cortinarin C

Abgesehen von ihrer möglichen Bedeutung als Toxine waren die Cortinarine auch insbesondere wegen ihrer auffallenden strukturellen Details reizvoll, die zu einer näheren Begutachtung herausforderten.

Die Cortinarine (4a, 4b, 5b) sollen Decapeptide sein, die die seltenen Aminosäuren 4-Methoxytryptophan (6b) und 4-Hydroxytryptophan (6a) enthalten. 4-oxygenierte Indole kommen in der Natur nur sehr selten vor. Die bekanntesten Beispiele hierfür sind die halluzinogenen Pilzalkaloide Psilocin/Psilocybin (Hofmann 1960).

Besonders fällt aber die erstaunliche strukturelle Ähnlichkeit mit Hepatotoxinen (z.B. α -Amanitin, 8; Phalloidin, 9) des Grünen Knollenblätterpilzes auf.



3.1 Die Struktur der Cortinarine: Kritische Anmerkungen zur Literatur

Laut Originalvorschrift (Tebbett & Caddy 1984) wird das getrocknete Pilzmaterial zunächst mit Petrolether entfettet und sodann mit Methanol das Gemisch der Cortinarine A–C extrahiert, wobei die nephrotoxische Aktivität fluoreszierenden Zonen im Methanol-extrakt zugeordnet wurde.

Beim Nacharbeiten fanden wir die Verbindungen mit den für Cortinarin A (4b, Zone I) und Cortinarin C (4a, Zone II) beschriebenen chromatographischen Eigenschaften ganz überwiegend in dem intensiv blau fluoreszierenden Petroletherextrakt. Der Methanolextrakt enthielt dagegen nur noch geringe Mengen dieser Verbindungen. Dieses Extraktionsverhalten ist jedoch für die Peptide 4a, 4b und 5b nicht zu erwarten.

Nach genauer Prüfung der Originalliteratur ergaben sich weitere Zweifel an den dort beschriebenen analytischen Daten und präparativen Verfahren: Die angeblich selektive Öffnung von Cortinarin A (4b) zwischen Isoleucin und Alanin mit schwacher Säure ist unglaubhaft (Wieland 1990) und im Modellversuch auch nicht reproduzierbar. Weitere experimentelle Befunde, die unter anderem die Totalhydrolyse, den Nachweis der 4-oxygenierten Tryptophane und die NMR-Daten betreffen, stehen ebenfalls in Widerspruch zu der Originalarbeit und werden an anderer Stelle ausführlich diskutiert (Matthies & Laatsch 1991).

3.2. Chromatographie und Identifizierung der „Cortinarine“

Die durch Chromatographie der Pilzextrakte erhaltene Zone I („Cortinarin A“) fluoreszierte im langwelligen UV-Licht blau. Zone II („Cortinarin C“) erwies sich als zuerst nur fluoreszenzlöschend (254 nm). Nach einigen Stunden UV-Belichtung trat eine auch von Testa (1970) beschriebene Eigenfluoreszenz auf. Letzteres steht in Einklang mit einer anderen Nachuntersuchung von Testas Ergebnissen (Gamper 1978). Durch 2D-Dünnschichtchromatographie konnten wir zusätzlich beweisen, daß die aus II entstehende fluoreszierende Verbindung mit I identisch ist und dieses offenbar durch UV-Bestrahlung nachgebildet wird (Abb. 1).

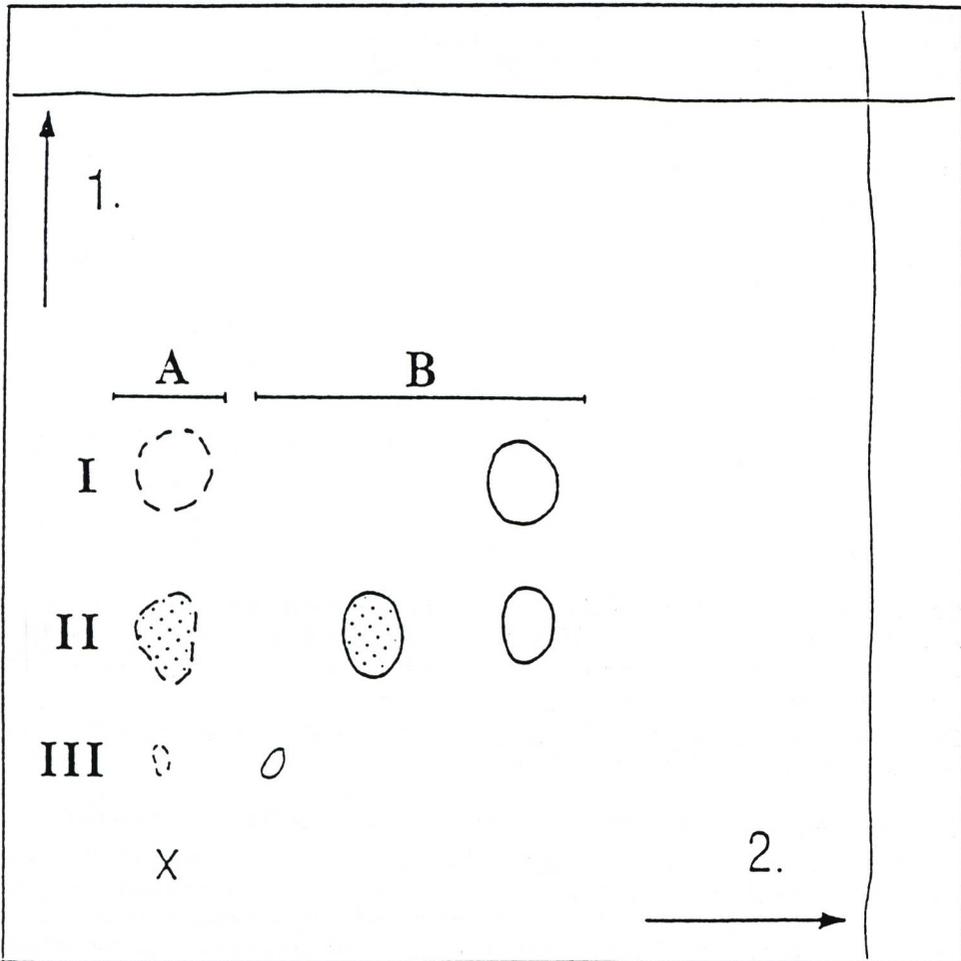


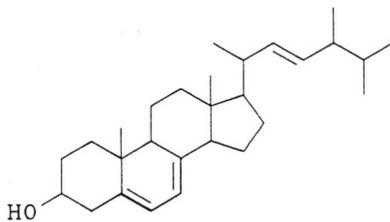
Abb. 1: 2D-Chromatogramm (Kieselgel) der „Cortinarin“-Zonen in Cyclohexan/Essigester (3:1). – X = Start, A = Flecken nach Entwickeln in der ersten Dimension, B = nach Entwickeln in der zweiten Dimension. UV-löschende Zonen: gepunktet; fluoreszierende Zonen: weiß. Zone I ($R_F = 0.5$) fluoresziert intensiv blau und enthält das Tetraenon 11. Zone II ($R_F = 0.3$) enthält Ergosterin (10), aus dem sich bei Belichtung 11 nachbildet. Weitere Erläuterungen im Text.

1. Identifizierung von Zone II

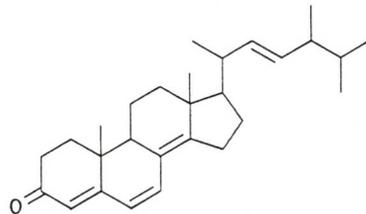
Nach präparativer Plattenchromatographie unter Lichtausschluß kristallisierte der Inhaltsstoff II aus Ethanol/Wasser als farblose Blättchen, die IR- und $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch durch Vergleich mit einer authentischen Probe als Ergosterin (10) identifiziert wurden. 10 ergibt im Chromatogramm beim Ansprühen mit 2 N Salzsäure und anschließendem Erhitzen eine taubenblaue Anfärbung; mit saurem Ninhydrin erhält man eine rotbraune Färbung. Diese Eigenschaft hat offenbar den Anlaß zu Verwechslungen mit Peptiden gegeben.

2. Identifizierung von Zone I

Der Inhaltsstoff aus Zone I erwies sich nach Rechromatographie an Kieselgel und Aluminiumoxid durch gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektroskopie einer silylierten Probe als Gemisch aus Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-on (11), 22,23-Dihydroxyergosta-4,6,8(14)-trien-3-on und (3 β)-24-Methylenlanost-8-en-3-ol.



10 (Ergosterin)



11 (Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-on)

Durch weitere Auftrennung erhielt man schließlich ein einheitliches, intensiv blau fluoreszierendes Produkt mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Schulte et al. 1968) von 11. Im Chromatogramm läßt sich 11 leicht durch Besprühen mit 2 N Salzsäure identifizieren; die Farbe der Fluoreszenz wechselt dann von Blau nach Gelb.

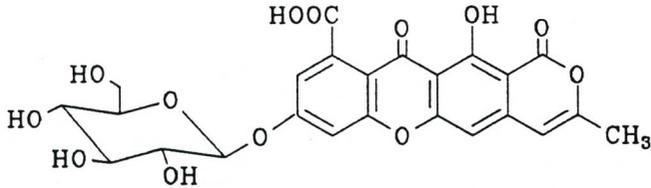
Der nicht näher untersuchte Inhaltsstoff der Zone III ergab bei saurer Hydrolyse keine Aminosäuren und war daher ebenfalls kein Peptid.

4. Anmerkungen zur chemotaxonomischen Relevanz fluoreszierender Steroide

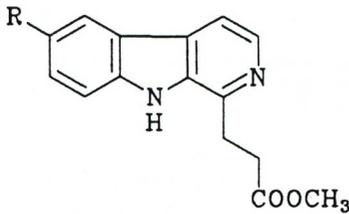
Daß insbesondere *Leprocycbe*-Arten neben blau auch intensiv grün oder gelb fluoreszierende Zonen enthalten, ist seit längerer Zeit bekannt; der chromatographische Vergleich der Fluoreszenz von Extrakten verschiedener Arten wurde sogar für taxonomische Zwecke verwendet (Moser 1969, Gruber 1969, Høiland 1980) oder galt als Hinweis auf einen Gehalt an nephrotoxischen Inhaltsstoffen (Gruber 1969).

Über die Identität dieser Fluoreszenzstoffe ist erst wenig bekannt. So ist z. B. das gelb fluoreszierende Glycosid Leprocycin (12) 1982 von Steglich und Mitarb. aus *Cortinarius cotoneus* aufgeklärt worden. Ein blau (Infracin, 13) und ein gelb (6-Hydroxyinfracin,

14) fluoreszierendes Indolalkaloid wurden von Steglich et al. (1984) aus *Cortinarius infractus* isoliert. Auch Anthranilsäure und Pteridin-Derivate (z. B. Riboflavin, Vitamin B₂; Gill & Steglich 1987) wurden in Pilzen gefunden; die schwach blaue Fluoreszenz der Bipyridyle 2 und 3 wurde bereits erwähnt.

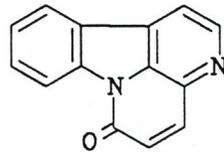


12



13: R = H

14: R = OH



15

Es ist anzunehmen, daß außer *C. rubellus* auch andere *Cortinarien* der Untergattung *Le-procybe* das Tetraenon 11 enthalten, da Extrakte einiger dieser Pilze lebhaft blaue Fluoreszenz aufweisen, die wegen ihrer Farbe und hohen Intensität offenbar nicht durch Orellaninabbauprodukte oder 12–14 bedingt ist. Da aber Ergosterin (10) praktisch in allen Asco- und Basidiomyceten auftritt, ist bei der Untersuchung von Pilzextrakten stets auch mit der Bildung von Ergostatetraenon (11) durch Photooxidation während der Aufarbeitung zu rechnen. Selbst wenn 11 nicht generell als Artefakt aufzufassen ist, kommt seinem Nachweis als chemotaxonomischem Merkmal daher nur begrenzte Bedeutung zu.

Belegmaterial

Die Fruchtkörper von *Cortinarius rubellus* Cke. wurden von W. Pätzold (Hornberg) gesammelt und bestimmt. Fundorte: MTB 7816 und 7715. Belegexsikkate der untersuchten Aufsammlungen wurden im Herbarium der Universität Leipzig hinterlegt (LZ 3900, LZ 3901). Fotos liegen vor.

Die Autoren danken Herrn Dr. G. Remberg für die Aufnahme von Massenspektren und für hilfreiche Diskussionen, sowie dem Land Niedersachsen für die Gewährung eines Doktoranden-Stipendiums (L. M.) und dem Fonds der Chemischen Industrie für Sachmittel. Frau F. Hettich (Freising) und Herrn H. Grünert (Herrsching) schulden wir Dank für die Überlassung einiger Aufsammlungen, auch im Rahmen anderer Projekte.

Literatur

- ANTKOWIAK, W. Z. & W.P. GESSNER (1975) – Isolation and characteristics of toxic components of *Cortinarius orellanus* Fries. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Chim. 23, 729–733.
- & W. P. GESSNER (1979) – The structures of orellanine and orellinine. Tetrahedron Lett. 21, 1931–1934.
- & W. P. GESSNER (1985) – Photodecomposition of orellanine and orellinine, the fungal toxins of *Cortinarius orellanus* Fries and *Cortinarius speciosissimus*. Experientia 41, 769–770.
- BOUSKA, I., R. REHANEK, K. MOTYCKA & J. VESELSKY (1980) – Detection of UV-fluorescence in renal tissues in *Cortinarius orellanus* Fr. poisoning. Ceska Mykol. 34, 188–190.
- BRESINSKY, A. & H. BESL (1985) – Giftpilze, 1. Aufl., S. 18 ff, 50 ff, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- DEHMLow, E. V. & H.-J. SCHULZ (1985) – Synthesis of orellanine, the lethal poison of a toadstool. Tetrahedron Lett. 26, 4903–4606.
- FLAMMER, R. (1982) – Das Orellanus-Syndrom: Pilzvergiftung mit Niereninsuffizienz. Schweiz. Med. Wschr. 112, 1181–1184.
- GAMPER, R. (1977) – Untersuchungen über die Giftstoffe der Pilze *Cortinarius orellanus* Fr. und *Cortinarius speciosissimus* Kühn. & Romagn. Dissertation Innsbruck.
- GILL, M. & W. STEGLICH (1987) – Pigments of fungi (macromycetes), in L. Zechmeister (Ed.), Progress in the chemistry of organic natural products 51, 210–215.
- GRUBER, I. (1969) – Fluoreszierende Stoffe der *Cortinarius*-Untergattung *Leprocycbe*. Z. Pilzk. 35, 249–261.
- GRZYMALA, S. (1962) – L'isolement de l'orellanine, poison du *Cortinarius orellanus* Fries et l'étude de ses effets anatomo-pathologiques. Bull. Soc. Mycol. Fr. 78, 394–404.
- GSTRAUNTALER, G. & H. PRAST (1983) – Studies on the nephrotoxicity of *Cortinarius orellanus* (Fr.) Fr.: The effect of dipyrindyles on renal epithelial cell cultures. Sydowia 36, 53–58.
- HOFMANN, A. (1960) – Die psychotropen Wirkstoffe der mexikanischen Zauberpilze. Chimia 14, 309–318.
- HØILAND (1980) – *Cortinarius* subgenus *Leprocycbe* in Norway. Norw. J. Bot. 27, 101–126.
- MATTHIES, L. & H. LAATSCH (1991) – Cortinarins in *Cortinarius speciosissimus*? – A critical revision. Experientia 47, 634–640.
- (1991) – Aminosäuren, Peptide und andere niedermolekulare Inhaltsstoffe aus Macromyceten. Dissertation Göttingen.
- MOSER, M. (1952) – Die Gattung *Cortinarius* Fr. in heutiger Schau. Z. Pilzk. 11, 1–10.
- (1969) – *Cortinarius* Fr. Untergattung *Leprocycbe* Subgen. Nov., Die Rauhköpfe. Z. Pilzk. 35, 213–248.
- PRAST, H. (1982) – Die Nephrotoxicität von *Cortinarius orellanus*. Dissertation Innsbruck.
- RAPIOR, S., C. ANDARY & G. PRIVAT (1988) – Chemotaxonomic study of orellanine in species of *Cortinarius* and *Dermocybe*. Mycologia 80, 741–747.
- SCHULTE, K. E., G. RÜCKER & H. FACHMANN (1968) – Ergosta-4,6,8(14),22-tetraenon-(3) als Inhaltsstoff des Lärchenschwammes. Tetrahedron Lett. 10, 4763–4764.
- SCHUMACHER, T. & K. HØILAND (1983) – Mushroom poisoning caused by species of the genus *Cortinarius* Fries. Arch. Toxicol. 53, 87–106 und dort zitierte Literatur.
- STEGLICH, W., L. KOPANSKI & M. KLAAR (1982) – Leprocycin, der Fluoreszenzstoff von *Cortinarius cotoneus* und verwandten *Leprocycben*. Liebigs Ann. Chem., 1280–1292.
- , L. KOPANSKI, M. WOLF, M. MOSER & G. TEGTMEYER (1984) – Indolalkaloide aus dem Blätterpilz *Cortinarius infractus*. Tetrahedron Lett. 25, 2341–2344.
- TEBBETT, I. R. & B. CADDY (1984) – Mushroom toxins of the genus *Cortinarius*. Experientia 40, 441–446.
- TESTA, E. (1970) – Indagini sulla tossicità dei funghi del genere *Cortinarius*. Rass. micol. tic. 2, 89–99.
- TIECCO, M., M. TINGOLI, L. TESTAFERRI, D. CHIANELLI & E. WENKERT (1986) – Total synthesis of orellanine, the lethal toxin of *Cortinarius orellanus* Fries. mushroom. Tetrahedron 42, 1475–1485.
- TIECCO, M., M. TINGOLI, L. TESTAFERRI, D. CHIANELLI & E. WENKERT (1987) – Totalsynthesis of orellinine, a minor toxic component of the fungus *Cortinarius orellanus* Fries. Experientia 43, 462–463.
- WIELAND, T. (1990). Pers. Mitt.



Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.
German Mycological Society

Dieses Werk stammt aus einer Publikation der DGfM.

www.dgfm-ev.de

Über [Zobodat](#) werden Artikel aus den Heften der pilzkundlichen Fachgesellschaft kostenfrei als PDF-Dateien zugänglich gemacht:

- **Zeitschrift für Mykologie**
Mykologische Fachartikel (2× jährlich)
- **Zeitschrift für Pilzkunde**
(Name der Hefreihe bis 1977)
- **DGfM-Mitteilungen**
Neues aus dem Vereinsleben (2× jährlich)
- **Beihefte der Zeitschrift für Mykologie**
Artikel zu Themenschwerpunkten (unregelmäßig)

Dieses Werk steht unter der [Creative Commons Namensnennung - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz](#) (CC BY-ND 4.0).



- **Teilen:** Sie dürfen das Werk bzw. den Inhalt vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen, sogar kommerziell.
- **Namensnennung:** Sie müssen die Namen der Autor/innen bzw. Rechteinhaber/innen in der von ihnen festgelegten Weise nennen.
- **Keine Bearbeitungen:** Das Werk bzw. dieser Inhalt darf nicht bearbeitet, abgewandelt oder in anderer Weise verändert werden.

Es gelten die [vollständigen Lizenzbedingungen](#), wovon eine [offizielle deutsche Übersetzung](#) existiert. Freigibiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Mykologie - Journal of the German Mycological Society](#)

Jahr/Year: 1991

Band/Volume: [57_1991](#)

Autor(en)/Author(s): Matthies L., Pätzold Walter Wilfried Artur

Artikel/Article: [Fluoreszenzstoffe aus Cortinarius rubellus Cke. - Steroide statt nephrotoxischer Cyclopeptide 273-280](#)