

Desglucocheirotol. 7 mg Desglucocheirotxin wurden nach früherer Vorschrift⁴⁵⁾ mit 1 mg NaBH₄ reduziert. Das Rohprodukt (4,8 mg) zeigte mit H₂SO₄ praktisch gleiche Färbung wie Convallatoxol. Im Pch (System von Fig. 5) gab es nur einen Fleck mit Laufstrecke wie F''.

Die Mikroanalyse wurde unter der Leitung von Herrn E. THOMMEN im Mikrolabor des Instituts ausgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Samen von *Castilla elastica* CERV. sind sehr reich an Cardenolid-glykosiden. Präparativ wurden Periplocymarin, Cymarin, Cymarol, Helveticosid, Desglucocheirotxin, k-Strophanthin- β , sowie Spuren von drei Stoffen (F', F'' und F''') in Kristallen isoliert. F' ist vermutlich mit Helveticosol identisch. Papierchromatographisch liess sich ausserdem die Anwesenheit von Corchorosid A, Cheirotxin, k-Strophanthosid und einer nicht identifizierten Substanz J feststellen. Hauptglykoside sind Cymarin, k-Strophanthin- β und Periplocymarin. Der Milchsaft derselben Pflanze enthält kleine Mengen von Periplocymarin, Cymarin, Cymarol und Helveticosid, sowie Periplogenin und Strophanthidin. Die zwei zuletzt genannten freien Genine waren in den Samen nicht anwesend.

In Bezug auf die Glykoside unterscheidet sich *Castilla elastica* erheblich von den zwei anderen bisher untersuchten Cardenolid-führenden Vertretern der Moraceen (*Antiaris toxicaria* und *Streblus asper*) und ähnelt mehr einer Gruppe von *Strophanthus*-Arten.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

106. Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*)¹⁾

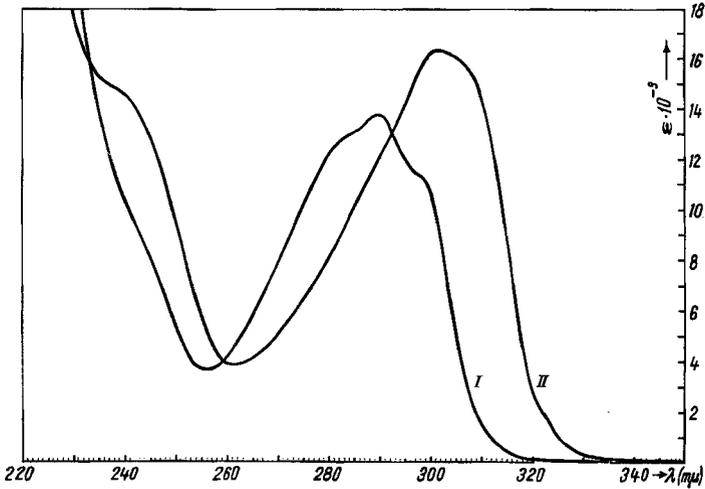
von Theodor Wieland

(23. III. 61)

Für den Teil der Chemie, den wir heute mit Naturstoffchemie bezeichnen, hat zu Anfang des letzten Jahrhunderts BERZELIUS den Namen «organische» Chemie geprägt. Man sagt und hört oft, die organische Chemie habe sich nach dieser ihrer Taufe von ihrem ursprünglichen Inhalt, der Chemie der Organismen, abgewandt, doch scheint es mir, dass unser Fach in den 1½ Jahrhunderten seiner Existenz fortwährend mit der Natur verbunden blieb, die immer die grosse Lehrmeisterin und Zielsetzerin gewesen ist. Ob beim Bemühen um eine Chininsynthese der erste brauchbare Anilinfarbstoff, Mauvein, erfunden wird, ob ein Jahrhundert später die Ausscheidungsprodukte von Mikroorganismen, mit denen sie sich ihre Gegner oder Mitesser vom Hals halten, als die wundersamsten Antiinfektionsstoffe erkannt werden, ob durch die Beschäftigung mit dem Kautschuk und der Cellulose das Gebiet der makromolekularen Chemie eröffnet wird oder ob die unerreichbare katalytische Wirkung der Enzyme zur Aufklärung und Nachahmung reizt – immer ist es die Beziehung zur

¹⁾ Vortrag, gehalten an der Winterversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Fribourg am 11. Februar 1961. Gilt als 20. Mitteilung in der Reihe «Über die Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes». 19. Mitt. siehe Fussnote ²⁰⁾. Veröffentlicht laut besonderem Beschluss des Redaktionskomitees.

Natur, die das besondere Interesse der Chemiker erregt und wachhält. Sicher würden viele grossartige Synthesen der letzten Jahre trotz ihres grossen chemischen Wertes an Beachtung verlieren, wenn ihre Produkte nicht Stoffe aus der Natur wären; und sogar den «abstrakten» Organiker erfüllt es mit Freude, wenn man Vertretern seiner



UV-Spektren von Phalloidin, Phalloin oder Phallacidin (I) und von α - oder β -Amanitin (II) in Wasser

Tabelle 1. Zimtaldehyd-positive Inhaltsstoffe von *Amanita phalloides*

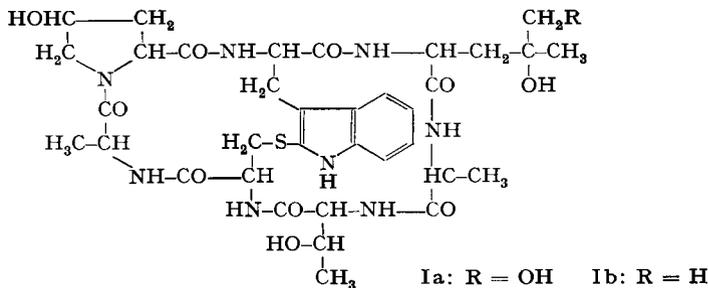
Rf		Farbe mit Zimtaldehyd in HCl	LD ₅₀ in mg/kg weisse Maus
1,0	Front		
0,9			
0,8	○ -X	violett	—
0,7			
0,6	○ -Phalloin (Ib)	blau	1,4
<u>γ-Amanitin-</u>	○	violett	0,8
0,5	○ - <u>Phalloidin (Ia)</u>	blau	1,9
0,4			
0,3	○ -Y	blau	—
0,2	<u>α-Amanitin-</u> ○	violett	0,1
0,1	<u>β-Amanitin-</u> ○	blau violett	2,5 0,4
	○ -Phallacidin (Ic)		
	⊗		

Stoffwelt wie 3- und 4-gliedrigen Ringen, Kohlenstoff-Dreifachbindungen, Hydroxamsäuren oder Nitro- und Halogen-Aromaten in der Natur begegnet. Das hier behandelte Thema umfasst eine merkwürdige Klasse von Naturstoffen, die sich als bicyclische Peptide erwiesen haben²⁾.

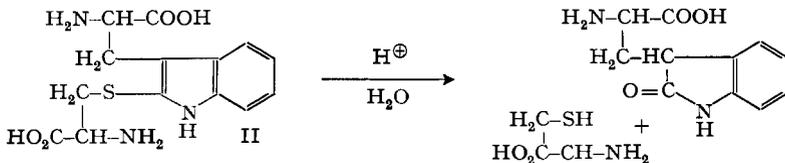
Im methanolischen Extrakt von *A. phalloides* findet man, neben vielen Ballaststoffen, die in Tab. 1 schematisch abgebildeten, mit Zimtaldehyd-HCl farbig werdenden Inhaltsstoffe. Sie sind wie im Papierchromatogramm in Aceton-Butanon-Wasser (2:20:5, obere Phase) angeordnet, wobei durch die Anzahl der Unterstrichungen die relative Konzentration angedeutet ist. Man hat es mit zwei Gruppen von Giftstoffen zu tun, den giftigeren *Amanitinen*, die eine sehr stark ansprechende violette Farb-reaktion mit Zimtaldehyd-HCl geben, und den weniger giftigen, aber rascher wirkenden Phalloidin-artigen Stoffen, die mit dem Reagens in 10fach unempfindlicherer Weise Blaufärbung verursachen. Bei beiden handelt es sich um Abkömmlinge des Indols. Die Gruppen unterscheiden sich auch charakteristisch durch ihre UV-Spektren (s. Fig.).

I. Phalloidingruppe

1. *Natürliche Vertreter.* Die von uns ermittelte Strukturformel des *Phalloidins* (Ia)³⁾ und *Phalloins* (Ib)⁵⁾ ist nachstehend wiedergegeben.



Von den Bausteinen sind nur die 2 *Alanin*molekeln normale Eiweiss-Aminosäuren (L-Form), das *Hydroxyprolin* gehört zur *Alloreihe*⁶⁾, und *Threonin* liegt in der D-Form vor⁴⁾. Die Diaminodicarbonsäure mit S-Brücke, II, die man sich durch oxydative Kondensation aus *Tryptophan* und *Cystein* entstanden denken kann, bezeichnen wir als *Tryptathionin*⁷⁾, doch hat dies nur formale Bedeutung, da sie nicht als solche aus



²⁾ Letzte zusammenfassende Darstellung: TH. WIELAND & O. WIELAND, *Chemistry and Toxicology of the Toxins of Amanita phalloides*, *Pharmacological Reviews* 11, 87 (1959); früher: TH. WIELAND, *Angew. Chem.* 69, 44 (1957), *STOLL-Festheft*.

³⁾ TH. WIELAND & W. SCHÖN, *Liebigs Ann. Chem.* 593, 157 (1955).

⁴⁾ TH. WIELAND & A. SCHÖPF, *Liebigs Ann. Chem.* 626, 174 (1959).

⁵⁾ TH. WIELAND, K. MANNES & A. SCHÖPF, *Liebigs Ann. Chem.* 617, 152 (1958).

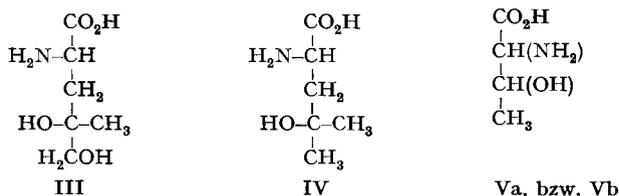
⁶⁾ H. WIELAND & B. WITKOP, *Liebigs Ann. Chem.* 543, 171 (1940).

⁷⁾ TH. WIELAND, K. FRETER & E. GROSS, *Liebigs Ann. Chem.* 626, 154 (1959).

der Molekel herausgeschält werden kann, sondern bei der Hydrolyse zerfällt, und zwar in saurem Milieu zu *Cystein* und *Oxindolylalanin*.

Tryptathionin (II) stellt den UV.-Chromophor der Phalloidine dar. Synthetisch aus Indolderivaten und aliphatischen Sulfonylchloriden erhaltene Modellsubstanzen zeigen in der Wellenlänge und Grösse der maximalen Extinktion identische Absorptionskurven.

Als neuer Naturstoff wurde im Hydrolysat von Phalloidin (Ia) das γ -Lacton des γ,δ -Dihydroxyleucins aufgefunden⁸⁾⁴⁾. Die vier möglichen Diastereomeren dieser Aminosäure haben wir synthetisiert⁸⁾⁹⁾ und den Naturstoff mit allen verglichen. Er erwies sich als identisch mit einer L-Form, der wir die *erythro*-Konfiguration III zuschreiben⁴⁾⁹⁾.



Im *Phalloin* (Ib) fanden wir⁵⁾ als einzigen Unterschied zum Phalloidin (Ia) den Ersatz der δ -ständigen OH-Gruppe durch H im verzweigten Baustein. γ -Hydroxyleucin (IV) war bereits bekannt, jedoch in der Natur noch nicht aufgefunden worden. Es bildet ebenfalls spielend leicht ein Lacton; die Lactonisierungstendenz von III und IV ist dafür verantwortlich, dass die Giftstoffe schon beim $\frac{1}{2}$ -stdg. Erhitzen mit 0,2N Schwefelsäure auf 100° nur an den Peptidbindungen der entsprechenden Carboxylgruppen hydrolytisch gespalten werden.

Das neuerdings in reiner Form isolierte *Phallacidin* (Ic)¹⁰⁾ zeigt dasselbe UV.-Spektrum wie Ia und Ib. Es hat saure Natur und sollte unter den Produkten der Totalhydrolyse einen sauren Baustein entdecken lassen. Die Suche hiernach war im Schwefelsäurehydrolysat negativ; erst nach Hydrolyse mit Salzsäure fand man¹¹⁾ 2 papierelektrophoretisch bei pH 1,9 zur Kathode wandernde Aminosäuren, von denen die raschere etwa 10fach höher konzentriert war. Die Wanderungsgeschwindigkeiten beider stimmen mit denjenigen der diastereomeren β -Hydroxyasparaginsäuren (Va, b) überein. Im Giftstoff Ic scheint nur die rascher wandernde vorzukommen, die, für sich allein unter den Bedingungen der Hydrolyse erhitzt, zum Teil epimerisiert wird. β -Hydroxyasparaginsäure wird beim mehrstündigen Erhitzen mit 25-proz. Schwefelsäure unter Dehydratisierung zerstört; die *erythro*-Verbindung ist kürzlich auch aus tryptischen Casein-Verdauungsansätzen isoliert worden¹²⁾ und kann aus der entsprechenden Oxosäure durch Umaminierung entstehen¹³⁾. Für unseren Fall liegt es nahe, an eine Methyloxydation des Threonins zu denken, da dieses unter den Bau-

⁸⁾ TH. WIELAND & O. WEIBERG, Liebigs Ann. Chem. 607, 168 (1957).

⁹⁾ TH. WIELAND & H. KRANTZ, Chem. Ber. 91, 2619 (1958).

¹⁰⁾ H. SCHNABEL, Diplomarbeit Universität Frankfurt a. M., 1960.

¹¹⁾ H. SCHNABEL, unveröffentlicht.

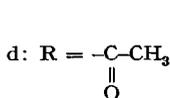
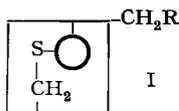
¹²⁾ H. J. SALLACH & M. L. KORNGUTH, Biochim. Biophys. Acta 34, 582 (1959).

¹³⁾ M. GARCIA-HERNANDEZ & E. KUN, Biochim. Biophys. Acta 23, 78 (1957); H. J. SALLACH & T. H. PETERSON, J. biol. Chemistry 223, 629 (1957).

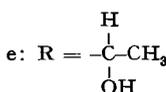
steinen von Ic fehlt. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass anstelle eines *Alanins* von Ia oder Ib im Phalloidin (Ic) eine *Valin*molekel enthalten ist. Die oben erwähnte Partialhydrolyse tritt langsamer ein und führt zur Freilegung einer Aminogruppe, die durch Reaktion mit Dinitrofluorbenzol als die des Valins erkannt wurde¹¹⁾. Sonst enthält Ic die Bausteine des Phalloidins.

2. *Künstliche Varianten.* Am Phalloidin (Ia) konnten verschiedene definierte chemische Eingriffe vorgenommen werden, deren Produkte toxikologisch verglichen wurden mit dem Ziel, Zusammenhänge zwischen der Giftwirkung und der Konstitution zu erkennen (s. Tab. 2). Mit Perjodat liess sich die γ, δ -Glykol-Gruppierung der Seitenkette spezifisch spalten^{3) 4)}. Das so erhaltene «*Ketophalloidin*» (Id) zeigt grössenordnungsmässig dieselbe Toxicität wie Phalloidin.

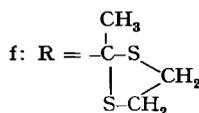
Tabelle 2. *Künstliche Phalloidin-Varianten*



LD₅₀ = 2–3 mg/kg



LD₅₀ = 2 mg/kg

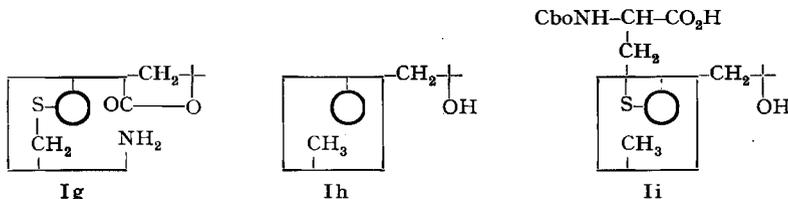


LD₅₀ = 2–3 mg/kg

Id lässt sich mit Na-Borhydrid in Methanol zu Desmethylphalloin (Ie) reduzieren¹⁴⁾, das dieselbe Giftigkeit aufweist. Mit 1,2-Dithioglykol und HCl entsteht aus Id das Dithiolan If¹⁴⁾, das seine S-Atome sehr fest gebunden enthält und etwa gleich giftig wie die anderen Stoffe der Phalloidinklasse ist. Zusammen mit den natürlichen Varianten Ia, b und c der Tab. 1 sieht man, dass recht bedeutende Veränderungen an der Peripherie des Ringsystems keinen Einfluss auf die biologische Wirkung haben. Erst wenn der Peptidring auch nur an einer Stelle geöffnet wird, wie bei den oben erwähnten Produkten der Partialhydrolyse (Ig), verschwindet die Giftwirkung vollständig.

Dasselbe gilt für die Sprengung der Schwefelbrücke in Ia oder Ib. Durch Erhitzen mit RANEY-Nickel lässt sich das S-Atom hydrogenolytisch entfernen³⁾; das Tryptophan – und ein Alanin mehr enthaltende Desthiophalloidin (Ih) ist völlig ungiftig. Die Verbindung wurde mit dem S-Chlorid des Carbobenzocysteins umgesetzt¹⁵⁾ zu einem Thioäther (Ii), der das ursprüngliche Absorptionsspektrum des Phalloidins (s. Fig.), aber keinerlei Giftwirkung aufweist.

Ungiftige Phalloinderivate



¹⁴⁾ D. REHBINDER, Diplomarbeit Universität Frankfurt a. M., 1960.

¹⁵⁾ R. SARGES, unveröffentlicht.

Tabelle 3. Giftwirkung und Rf von β -Amanitin und einiger seiner Derivate

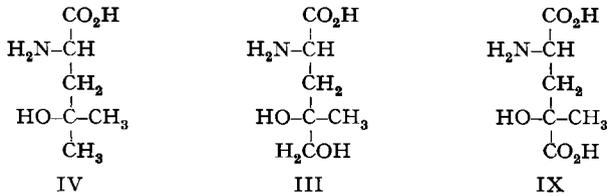
Substanz	LD ₅₀ (μ g/kg)*	R**
α -Amanitin	38,5	1,00
α -Amanitin aus β -Amanitin	39,0	1,00
β -Amanitin	97	0,37
β -Amanitin-methylester	760	1,30
β -Amanitin-thiophenylester	590	1,72
β -Amanitinanilid	4450	1,65
β -Amanitin-dodecylamid	>4000	2,63

* an der weissen Maus von 20 g.
 ** Wanderungsstrecke im Papierchromatogramm, bezogen auf die des α Amanitins = 1,00. Lösungsmittel: Butanon/Aceton/Wasser (30:3:5 Vol.).

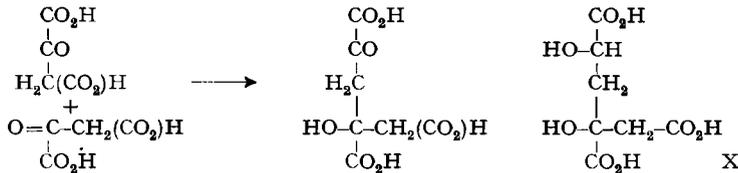
Die einzige Gesetzmässigkeit, die sich erkennen lässt, ist die einer abnehmenden Giftwirkung mit steigender Lipoidlöslichkeit. Das in gleicher Weise wie beim Phalloidin bereitete Desthio- α -amanitin zeigt überhaupt keine Giftwirkung mehr, ebenso wenig wie das auf Grund der Lactonisierbarkeit von VII erhältliche, an einer Stelle des Peptidrings gespaltene Gift. Am γ -Amanitin konnten die Untersuchungen nicht über den unter Lit. 2) geschilderten Stand vorangetrieben werden.

III. Betrachtungen zur Biogenese der lactonisierenden Aminosäuren

Eine Aminosäure mit dem C-Gerüst von III und IV ist vor einigen Jahren in verschiedenen Farnarten aufgefunden worden²¹⁾, nämlich γ -Methyl- γ -hydroxy-glutaminsäure (IX).



Bei der Biosynthese von IX hat man²²⁾ an eine Kondensation von 2 Molekeln Brenztraubensäure (oder Oxalessigsäure) mit nachfolgender Umaminierung gedacht und als Stütze hierfür das Auftreten von 2,4-Dihydroxy-1,2,4-butantricarbonsäure (X) in Hundeleber²³⁾ und Bakterien²⁴⁾ herangezogen.



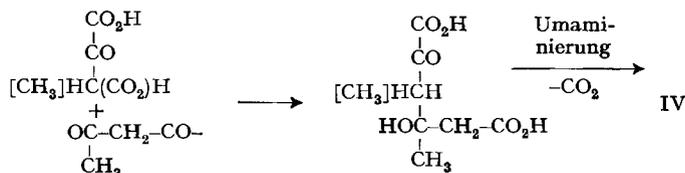
²¹⁾ Vgl. die Übersichten von a) A. I. VIRTANEN, *Angew. Chem.* 67, 385 (1955); b) H. MUSSO, ebenda 68, 313 (1956); und c) TH. WIELAND, ebenda 72, 892 (1960).

²²⁾ P. LINKO & A. I. VIRTANEN, *Acta chem. scand.* 12, 68 (1958).

²³⁾ S. RAPOPORT & R. H. WAGNER, *Nature (London)* 168, 295 (1955).

²⁴⁾ W. W. UMBREIT, *J. Bacteriol.* 66, 74 (1953).

Sollte all diesen Verbindungen ein biogenetischer Pfad gemeinsam sein und sollten die von uns in den Pilzgiften entdeckten verzweigten Säuren III und IV mit dem Farnkrautinhaltsstoff IX zusammenhängen, so wäre eher an eine Verwandtschaft im Sinne einer Methyloxydation von IV über III zu IX zu denken, als an die umgekehrte Reduktion der Carboxyl- zur Methyl-Gruppe, für die man u. E. bis heute kein Beispiel kennt. Dann wäre γ -Hydroxyleucin (IV) als die erste Station zu betrachten. Für ihre Biogenese kommt ausser einer Oxygenierung des Leucins die Kondensation von Acetacetat (vielleicht als CoA-Verbindung) mit Oxalacetat oder Pyruvat in Betracht, wobei auch die Entstehung der Methylverzweigten Amanitinkomponente VII im Eingreifen von α -Oxobutyrat anstelle von Pyruvat eine Erklärung fände:



Mit diesen spekulativen Schlussbetrachtungen haben wir uns auf das Gebiet der Biochemie begeben, in ganz zwangsläufiger Entwicklung der Naturstoffchemie. Diese ist längst aus dem beschreibenden Stadium herausgetreten und wendet sich mehr und mehr der Erforschung der funktionellen und dynamischen Seite zu. Die Kenntnis biosynthetischer Zusammenhänge hat schon mehrmals Strukturaufklärungen an Naturstoffen erleichtert; umgekehrt wird aber die klassische Richtung mit der Isolierung und Konstitutionsaufklärung weiterer Inhaltsstoffe von Pflanze und Tier weiterhin die Enzymologie befruchten.

ZUSAMMENFASSUNG

Die bisher aus *A. phalloides* isolierten Giftstoffe gehören zwei im UV.-Spektrum, in der Farbreaktion mit Zimtaldehyd-HCl und in der Toxizität verschiedenen Gruppen an, der Phalloidin- und der Amanitin-Gruppe. Die erste umfasst Phalloidin, Phalloin und Phallacidin, von welchen die Strukturen ermittelt werden konnten. Es handelt sich um Cyclopeptide, deren Ring durch eine Schwefelbindung des Cysteins an die α -Stellung des Indolrings von Tryptophan überbrückt ist. Alle enthalten ungewöhnliche Aminosäuren, darunter γ -Hydroxy- bzw. γ , δ -Dihydroxy-leucin. Durch Oxydation mit Perjodat lässt sich letztere Glykolgruppierung zu $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_3$ verkürzen; das so aus Phalloidin entstehende «Ketophalloidin» und seine Derivate zeigen dieselbe Toxizität wie der unveränderte Giftstoff. Hingegen führt die Aufspaltung des Peptidrings oder die der Brücke durch Behandlung mit RANEY-Nickel zum Toxizitätsverlust. In der 2. Gruppe, ebenfalls bicyclische Peptide, ist beim α - und β -Amanitin die Natur fast aller Bausteine bekannt. Man findet u. a. β -Methyl-, γ , δ -dihydroxy-leucin. Biogenetische Möglichkeiten der verzweigten Aminosäuren werden zum Schluss diskutiert.

Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.