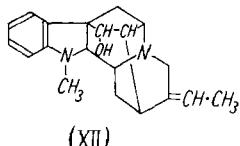


Angriff auf die β -Stellung des Indol-Rings durch die bei der Spaltung freiwerdende $-\text{CHO}$ -Gruppe, Reduktion zu einem Indolin (und in irgendeiner Stufe Methylierung von N(a)), Oxydation von $-\text{CH}(\text{OH})-$ zu $-\text{CO}_2$, Oxydation von $-\text{CH}_2-\text{N}$: (Tryptophan-Anteil) zu $-\text{CH}(\text{OH})\text{-N}$; Ringschluß durch Carbinolamin-Keton Kondensation, Reduktion des Carbonyls zu XII, sodann Reduktion



der Äthylenid-Gruppe und Oxydation von $-\text{N}\cdot\text{CH}_2-$ (Methylen-Gruppe der Berberin-Brücke), Oxydation der sek. Alkohol-Gruppe unter Bildung von Ajmalidin. Ajmalin kann durch Reduktion erhalten werden, oder unmittelbar dadurch, daß die Oxydation der sekundären Alkohol-Gruppe vermieden wird. Die Reaktionsfolge möge als Darstellung der verschiedenen erforderlichen Umwandlungen betrachtet werden und nicht als Theorie mit präziser biogenetisch-mechanistischer Bedeutung.

In diesem kurzen Bericht über die Chemie des Ajmalins ist die Pharmakologie nicht berücksichtigt worden, doch sei darauf hingewiesen, daß die hypotensive sowie andere physiologische Wirkungen der *Rauwolfia serpentina* dem von E. Schlittler und seinen Mitarbeitern⁹⁾ isolierten Reserpin innewohnen, während Ajmalin keine dieser nütz-

⁹⁾ J. M. Müller, E. Schlittler u. H. J. Bein, *Experientia* 8, 338 [1952]; L. Dorfman, A. Furlemeyer, C. F. Huebner, H. Lucas, H. B. MacPhailly, J. M. Müller, E. Schlittler, H. Schwyzer u. St. André, *Helv. chim. Acta* 37, 59 [1954]. Vgl. auch E. Schlittler, J. A. Schneider u. A. J. Plummer, diese *Ztschr.* 66, 386 [1954].

lichen Eigenschaften hat. Diese ausgesprochene Inaktivität war ein glücklicher Umstand für den Chemiker, dem das unerwünschte Alkaloid in größeren Mengen als je zur Verfügung stand.

Das Studium des Ajmalins hat einen weiteren, sehr interessanten Beitrag für die Wandelbarkeit des Aldehyd-Restes erbracht, der bei der Woodward-Spaltung intermediär auftritt. Er unterliegt einigen relativ einfachen Umwandlungen, die zu den entsprechenden Teilstrukturen des Corynanthins, δ -Yohimbins und Spermostrychnins usw. führen; die Methylen-Gruppe von $-\text{CH}_2\text{CHO}$ ist an der Biosynthese des Strychnins beteiligt. Wenn Openshaws Deutung zutrifft, ist die Biosynthese des Aspidospermins eine andere Variante. Bei den Curarebasen Mavocurin und Flavocurin (*Karrer*) greift die endständige Aldehyd-Gruppe (aus der 3-Stellung der DOPA-Molekel) den Stickstoff des Indol-Rings an. Beim Emetin wird aus dem gleichen Aldehyd-Rest, zusammen mit einer weiteren Molekel DOPA (oder einem Äquivalent), das Teilstück eines neuen Tetrahydro-isochinolin-Rings aufgebaut.

Die neuen Erkenntnisse, die mit der Aufklärung der Ajmalin-Struktur gewonnen wurden, reihen sich an die bereits bekannten Tatsachen gleichbedeutend an. Außerdem repräsentieren die speziellen Eigenschaften der Carbinolamin-Gruppierung ein auffallendes Merkmal der Chemie dieses Alkaloids.

(Übersetzt von Doz. Dr. A. Mondon, Kiel)

Eingegangen am 5. September 1956 [A 769]

Die Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*)

Von Prof. Dr. THEODOR WIELAND*), Frankfurt/M.

Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt/M.

Als Gifte des grünen Knollenblätterpilzes wurden die Cyclopeptide, Phalloidin, α -, β - und γ -Amanitin isoliert. Sie unterscheiden sich wesentlich in ihrer Toxizität; auch sind die letalen Dosen von Tier zu Tier verschieden. Während die Phalloidin-Struktur aufgeklärt und bereits Syntheseversuche unternommen werden konnten, ist die Konstitution der Amanitine noch nicht vollständig bekannt.

Seit es eine geschichtliche Überlieferung gibt, ist von tödlichen Vergiftungen nach dem Genuss von Pilzen berichtet worden und auch heute fordert diese Todesart weiterhin ihre Opfer, deren Zahl auf der Erde zu einigen Hundert pro Jahr geschätzt werden kann. Wir wissen heute, daß hierfür allein Pilze aus der Amanita-Species verantwortlich zu machen sind, in der sich einige wenige Vertreter gefährlicher Giftigkeit finden. Den überwiegenden Anteil stellt in Mitteleuropa der grüne Knollenblätterpilz (*A. phalloides*, Fr.), Vergiftungsfälle sind bei uns auch vom weißen Frühlingsknollenblätterpilz (*A. verna*) beschrieben. Dieser scheint in den USA, wo er als „destroying angel“ bezeichnet wird, neben einer weiteren giftigen Art, *A. tenuifolia*, die Hauptrolle zu spielen¹⁾. Der in Europa verbreitete und vom Kenner durch die leicht gelbe Farbe des Fruchtfleisches und den typischen Geruch nach Kartoffelkeimen vom grünen leicht zu unterscheidende gelbe Knollenblätterpilz (*A. mappa*, Batsch) enthält keine Spur der tödlichen Giftstoffe.

*) 12. Mitt. über die Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes.
11. Mitt. s. Fußnote¹⁰⁾.

¹⁰⁾ S. S. Block, R. L. Stephens u. W. A. Murrill, *Agricult. and Food Chem.* 3, 584 [1955]; dieselben mit A. Barretto, *Science* [Washington] 127, 505 [1955].

Isolierung der giftigen Inhaltsstoffe

Versuche verschiedener Forscher, das tödliche Gift von *A. phalloides* in reiner Form zu gewinnen, reichen bis zum Anfang des letzten Jahrhunderts zurück, aber erst vor 20 Jahren stellte sich ein chemisch bemerkenswerter Erfolg ein. Man war bis dahin über die Erkenntnis nicht weit hinausgekommen, daß der Giftpilz neben einem hitzelabilen Haemolysin komplizierter Natur, das die Todesfälle durch gekochte Gerichte nicht verursachen kann und deshalb bisher nicht näher untersucht wurde, ein thermostabiles Gift „Amanitatoxin“ enthält (W. W. Ford und Mitarb.). 1931 nahm H. A. Raab im Münchner Chemischen Universitätslaboratorium die chemische Bearbeitung auf. In der ersten Publikation²⁾ findet sich ein kurzer tabellenartiger Überblick bis zu diesem Zeitpunkt für den geschichtlich interessierten Leser. Der weitere Gang der Isolierungsarbeiten bis zum Beginn unserer eigenen Untersuchungen sei in ähnlicher Weise hier skizziert.

²⁾ H. A. Raab, *Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem.* 207, 157 [1932].

1932	H. A. Raab	Ausarbeitung des Meerschweinchen- testes. Das Amanitatoxin wird, haupt- sächlich durch Schwermetallsalz- Fällungen etwa 100fach angereichert. Entfernung von Ballaststoffen durch Ausfällung mit Bleiessig.
1934–35	J. Renz ³⁾ (mit H. A. Raab ⁴⁾ und J. Kimmig ⁵⁾ :	Anwendung der chromatographischen Adsorption. Das Toxin ist schwer dialysierbar und kann aus Wasser mit Butanol ausgeschüttelt werden.
1937	F. Lynen und U. Wieland ⁶⁾ :	Das Gift ist aus wässriger Lösung mit Ammonsulfat nahezu quantitativ ausfällbar. Es besteht aus zwei Komponenten, von denen die an der weißen Maus rascher wirkende kristallisiert erhalten und als Phalloidin bezeichnet wird. Beobachtungen zur chemischen Natur. Die langsamer wirkende, giftigere Komponente (I) wird auf 50%ige Reinheit gebracht, Anhaltspunkte für eine dritte werden mitgeteilt.
1941	H. Wieland und R. Hallermayer ⁷⁾ :	Die hochtoxische Komponente (I) wird in kristallisierter Form gewonnen und Amanitin genannt.

Durch die Kriegs- und Nachkriegsereignisse ist die erfolgreiche Arbeit in München abgebrochen worden, die auch über die chemische Natur des Phalloidins Wesentliches ans Licht brachte (s. u.). Zur Zeit ihrer Wiederaufnahme durch den Verfasser standen neue Trennmethoden aus anderen Laboratorien (Gegenstromverteilung, Papierchromatographie) und aus dem eigenen (Papierelektrophorese) zur Verfügung. So konnte bald gezeigt werden, daß Amanitin aus zwei Komponenten, einer neutralen α - und einer sauren, papierelektrophoretisch zur Anode wandernden β -Komponente besteht, die ebenfalls giftig ist und kristallisiert wurde⁸⁾. Später wurde unter vielen Dutzenden von Lösungsmittelkombinationen ein Spezialgemisch, die obere Phase des Systems aus 20 Vol. Methyläthylketon, 2 Vol. Aceton und 5 Vol. Wasser aufgefunden, mit dem die papierchromatographische Trennung der Gifte und damit die rasche Analyse von Pilzsäften möglich ist⁹⁾. Die Sichtbarmachung der Toxine gelingt dabei am besten mit Zimtaldehyd in einer stark HCl-haltigen Atmosphäre, wobei diese Indol-Derivate unter Blau- und Blauviolett-Färbung reagieren. (s. Tab. 1). Dabei konnte eine weitere in sehr kleiner Menge anwesende Verbindung entdeckt werden, die vor kurzem ebenfalls isoliert wurde und sich auch als giftig erwies, das γ -Amanitin¹⁰⁾. Bei der Abtrennung dieses neuen Giftstoffs, der im normalen Papierchromatogramm das Phalloidin hartnäckig begleitet, führte die Imprägnierung des Papiers mit Borat-Puffer, auch zur mikropräparativen Gewinnung, zum Ziel.

Die Isolierung der verschiedenen giftigen Bestandteile aus *A. phalloides* folgt nun der grobskizzierten Vorschrift:

Einlegen der frischen Pilze in Methanol, Filtern und Abpressen nach einigen Tagen, dann Abdampfen im Vakuum. Beim Versetzen des zurückbleibenden Sirups mit der 5–10fachen Menge an Methanol bleibt viel Kaliumchlorid zurück, von dem abfiltriert wird. Dann wird nochmals verdampft, in Wasser aufgenommen und mit Bleiacetat versetzt bis keine starke Fällung mehr eintritt und das entbleite Filtrat mit Ammonsulfat gesättigt. Dabei

scheiden sich die Giftstoffe zur Hauptsache ab, der Rest wird durch Ausschütteln mit sek. Propanol herausgeholt. Auf diese Weise gewinnt man nahezu alles Gift in einem sog. Primärmaterial, das zu 10–20% aus den Toxinen neben vorwiegend sauren, aber auch basischen Ballaststoffen besteht. Zu ihrer Entfernung behandeln wir mit Anionen- und Kationenaustauschern und reduzieren so das Gewicht um 50% ohne Wirksamkeitsverlust¹¹⁾. So dann wird das Phalloidin vom α -Amanitin und dieses vom β -Amanitin durch Verteilungs- und Adsorptions-chromatographie an Tonerde getrennt und aus Methanol kristallisiert. γ -Amanitin verbleibt in den Mutterlaugen der Phalloidin-Kristallisation. Es besteht erhebliche Wahrscheinlichkeit, daß noch weitere ähnliche Giftstoffe in Amanita-Extrakten aufgefunden werden.

Die Amanita-Toxine sind in Wasser, Methanol, flüssigem Ammoniak und Pyridin gut, in Äthanol weniger löslich, in den höheren Alkoholen und Phenol nur bei Wassersatz und unlöslich in den wenig polaren organischen Lösungsmitteln. Sie unterscheiden sich zum Teil recht stark in ihrer Toxizität und in ihren Erkennungsreaktionen. Eine vergleichende Zusammenstellung einiger wichtiger Daten gibt Tabelle 1.

	Phalloidin	α - und β -Amanitin	γ -Amanitin
Zimtaldehyd-HCl	hellblau, flüchtige Farbe, erfaßt 10–20γ	tiefrot- violett, er- faßt 1–2 γ	tiefrot- violett, erfaßt 1–2 γ
Fe ³⁺ -haltige konz. H ₂ SO ₄	leuchtend blau	olivgrün, ver- blaßt nach gelb	olivgrün, ver- blaßt nach gelb
Folin-Denis	blau	blau	blau
Millons Reagens	braun	braun	braun
Diazot. Sulfanilsäure (Pauly)	gelb	rot	rot
Hopkins-Cole	negat.	blau	blau
Ammoniakal. Silber-Lsg.	negat.	wird sofort reduziert	wird bei 70 °C rasch reduz.
Toxizität (pro kg weiße Maus)	2000 γ	100 γ (α) 400 γ (β)	800 γ
Max. d. UV-Abs. (mμ) . .	290	305	305

Tabelle 1

Über den Gehalt des grünen Knollenblätterpilzes an den einzelnen Giftkomponenten läßt sich anhand der isolierten Stoffe oder aus toxikologischen Angaben nur eine ungenaue Aussage machen. Sicherer ist die spektrophotometrische Gehaltsbestimmung nach papierchromatographischer Trennung und Elution der Gifte, besonders wenn das hochangereicherte quantitativ gewonnene Primärmaterial eingesetzt wird¹¹⁾. Diese Bestimmung ergibt in 100 g Frischpilzen: 10 mg Phalloidin, 8 mg α -Amanitin, 5 mg β -Amanitin und etwa 0,5 mg γ -Amanitin. Für die toxische Wirkung ist hiervon das α -Amanitin maßgebend, so daß man verstehen kann, daß der Giftgehalt eines schweren Pilzes (50 g) genügt, um den Tod eines Menschen herbeizuführen (dos. let. etwa 0,1 mg pro kg). Im Vergleich hierzu beträgt die letale Dosis am Meerschweinchen etwa 0,05 mg/kg, an der Maus 0,1 mg/kg und am Hund 0,15 mg/kg. In der Tödlichkeit bestehen gewisse Schwankungen bei den Säugetieren. Besonders resistent sind die Ratten, die erst mit einer zehnfach höheren Dosis als Mäuse dem Gift erliegen. Poikilotherme (wechselwarme), im Stoffwechsel träge Tiere, sind ebenfalls viel weniger empfindlich. So führen bei Fröschen und Kröten erst 1,5 mg/kg α -Amanitin in 5–10 Tagen zum Tod. Das Phalloidin ist in allen Fällen etwa um 10mal

³⁾ J. Renz, ebenda 230, 245 [1934].

⁴⁾ H. A. Raab u. J. Renz, ebenda 216, 224 [1933].

⁵⁾ J. Kimmig, Dissert. Univ. München 1935.

⁶⁾ F. Lynen u. U. Wieland, Liebigs Ann. Chem. 533, 93 [1937].

⁷⁾ H. Wieland u. R. Hallermayer, ebenda 548, 1 [1941].

⁸⁾ Th. Wieland, L. Wirth u. E. Fischer, ebenda 564, 152 [1949].

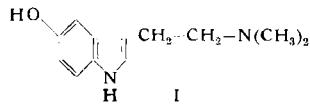
⁹⁾ Th. Wieland u. G. Schmidt, ebenda 577, 215 [1952].

¹⁰⁾ Th. Wieland u. Chr. Dudensing, Liebigs Ann. Chem. 600, 156 [1956].

¹¹⁾ K. Mannes, Dipl.-Arbeit Univers. Frankfurt/M. 1956.

weniger giftig. Bei Wirbellosen (*Helix pomatia*, *Limax arborum*) konnte nur am α -Amanitin, von dem etwa 100 mg/kg tödlich waren, eine Giftwirkung beobachtet werden, während das weniger giftige Phalloidin vertragen wurde. Die letalen Mengen sind also bei den verschiedenen Tierarten außerordentlich unterschiedlich, wohl in der Weise, daß die Intensität ihres Stoffumsatzes in direkter Weise mit der Anfälligkeit im Zusammenhang steht¹²⁾. Es fällt auf, daß Herzfibroblasten in Kultur und auch Einzeller wie Hefen oder Milchsäurebakterien von den Giften nicht abgetötet werden.

Wie erwähnt, ist die typische Kombination der Giftstoffe bisher nur in wenigen Pilzarten aufgefunden worden. Bei einer vergleichenden Untersuchung amerikanischer Autoren über den Giftgehalt von *Amanita*-Arten¹⁾ fällt das Fehlen von Phalloidin auf. Da die Farbreaktion mit Zimtaldehyd-HCl für Phalloidin etwa 10fach weniger empfindlich ist als für die Amanitine, die dort papierchromatographisch analysiert wurden, scheint uns jener Stoff in den nicht angereicherten Extraktten übersiehen worden zu sein. Der verwandte gelbe Knollenblätterpilz enthält, wie oben erwähnt, keinen der giftigen Stoffe, dafür aber einen anderen Indol-Körper, der ebenfalls isoliert werden konnte. Er hat



sich als die auch im Sekret der Kröte (*Bufo vulgaris*) enthaltene Base Bufotenin (5-Hydroxy-N-dimethyl-tryptamin (I)) herausgestellt¹³⁾.

Chemie der Giftstoffe

In ihrer chemischen Natur haben die vier Giftstoffe einige Züge gemeinsam, die auf eine gewisse Verwandtschaft hindeuten. So sind sie alle Cyclopeptide aus wenigen Aminosäuren (Molgew. etwa 1000), von denen einige in Proteinen nicht vorkommen. Alle enthalten ein S-Atom pro Molekel, das einem Cystein angehört, aber weder als SH noch als S-S vorliegt. Im UV zeigen sie ein intensives Absorptionsmaximum in der Gegend von 300 m μ , das auf das Vorliegen eines Indol-Chromophors schließen läßt, womit auch gewisse Farbreaktionen, be-

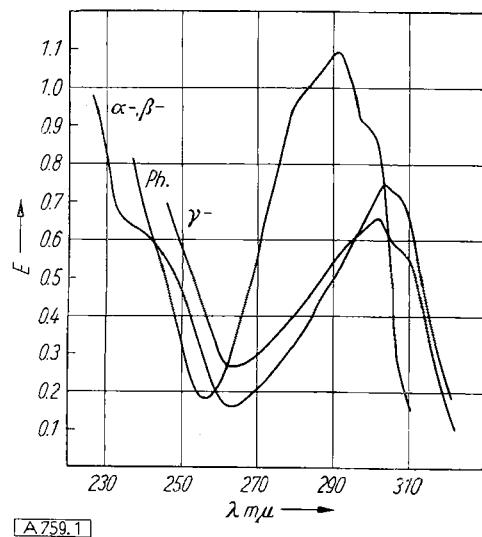


Bild 1

UV-Spektren der Amanita-Toxine (etwa 80 γ/cm³) in Wasser

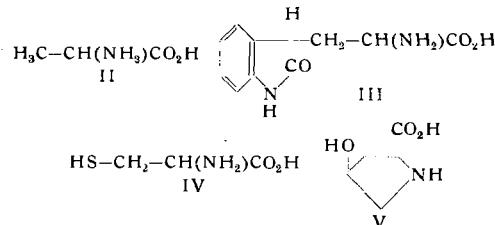
¹²⁾ Th. Wieland u. K. Dose, Biochem. Z. 325, 439 [1954].

¹³⁾ Th. Wieland, W. Motzel u. H. Merz, Liebigs Ann. Chem. 581, 10 [1953].

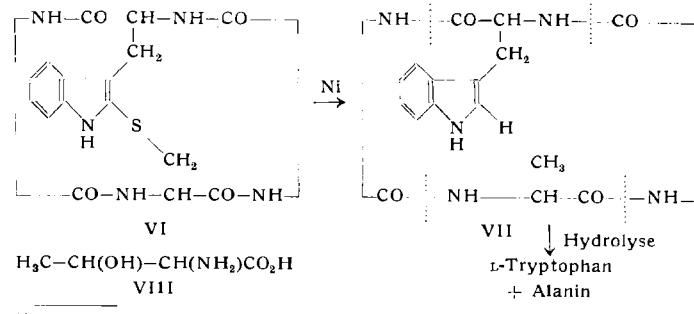
sonders aber die positive Fichtenspanreaktion nach der Alkalischmelze übereinstimmen. Schließlich kommt die vermutete Verwandtschaft auch in der prinzipiellen Ähnlichkeit ihrer pharmakologischen Wirkung zum Ausdruck. Am genauesten sind unsere Kenntnisse beim Phalloidin.

1. Phalloidin

Bei der Hydrolyse des kristallisierten Giftstoffs mit 20%iger HCl oder 25%iger Schwefelsäure bei 100 °C über mehrere Stunden, wie sie für die Spaltung von Polypeptiden üblich ist, erhielten F. Lynen und U. Wieland¹⁴⁾ Alanin (II), H. Wieland und B. Witkop¹⁴⁾ außerdem L- α -Oxytryptophan (III) (wegen seiner Lactam-Struktur besser, aber umständlicher als α -Oxindolyl- β -alanin zu bezeichnen), L-Cystein (IV) und L-*allo*-Hydroxyprolin (V), also das Diastereomere des in der Natur vorkommenden Hydroxyprolins, bei dem Carboxyl und OH auf verschiedenen Seiten der 5-Ring-Ebene stehen. Das Alanin wurde als L-Form erkannt.



Es handelt sich also um ein recht ungewöhnliches Peptid, das zudem weder eine Amino- noch eine Carboxyl-Endgruppe aufweist und deshalb als Cyclopeptid angesprochen wurde. In folgenden Arbeiten konnten wir das Vorliegen einer eigenartigen Bindung des Cysteins an das Tryptophan beweisen, das schon von Neuberger und Mitarb.¹⁵⁾ auf Grund spektroskopischer Beobachtungen vermutet worden war. Das als „Baustein“ isolierte Oxindolylalanin (III) zeigt nämlich das Maximum der Absorption bei 250 m μ (kein Indol-, sondern Benzol-Spektrum), während das längerwellige Maximum (290 m μ) auf eine Indol-Konjugation im Phalloidin hindeutet. Im Verein mit dem Ausbleiben der Nitroprussid-Reaktion, auch nach Reduktion, führten diese Beobachtungen zum Postulat einer Bindung des Cysteinschwefels an die 2-Stellung des Tryptophan-Rings. Die hydrierende Entschwefelung durch Kochen mit Raney-Nickel lieferte aus Phalloidin tatsächlich ein ungiftiges, S-freies Cyclopeptid (Desthiophalloidin (VII)), das nach Hydrolyse statt Oxytryptophan Tryptophan und einen vermehrten Alanin-Gehalt aufwies¹⁶⁾. Hiermit war das Vorliegen einer Thioamid-Struktur (VI) so gut wie erwiesen. In der gleichen Arbeit konnte durch Papierchromatographie des Phalloidin-Hydrolysats Threonin (VIII) als weiterer Baustein aufgefunden werden, das wegen seiner schwierigen Isolierbarkeit den früheren Bearbeitern entgangen war.



¹⁴⁾ H. Wieland u. B. Witkop, ebenda 543, 171 [1940].
¹⁵⁾ R. H. Cornforth, C. E. Dalglish u. A. Neuberger, Biochem. J. 48, 598 [1951].

Weitere Beweise für das Vorliegen einer Thioamid-Struktur konnten durch Synthese von Modellsubstanzen erbracht werden. Bei der Reaktion von verschiedenen Indol-Körpern, auch des Tryptophans selbst, mit Dischweifeldichlorid $\text{CIS} \text{S}\text{Cl}$ und Sulfensäurechloriden RSCl wird der Schwefel definiert in die 2-Stellung des Rings eingeführt¹⁶⁾. Solche Thioamide, zum Beispiel 2-S-Methyl-indolylessigsäure (IX), zeigen außerordentlich große Ähnlichkeit im Absorptionsverhalten mit Phalloidin (Bild 2).

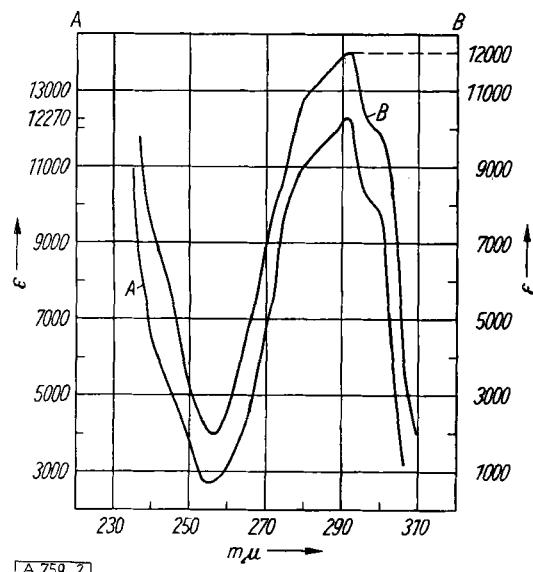
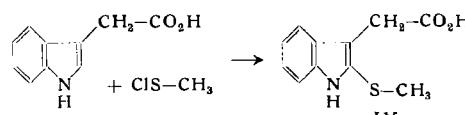


Bild 2
UV-Spektren. A=2-S-Methyl-3-indolylessigsäure (IX);
B=Phalloidin (XVI)

Durch den Vergleich der Extinktion der Modellverbindung IX ($\epsilon = 12270$, Molgew. 221,3) mit der des Phalloidins ließ sich dessen Molgew. spektrophotometrisch zu 890 berechnen.



Daß ein solches Thioamid bei der Hydrolyse mit Säure unter Ersatz des Schwefels durch Sauerstoff reagiert, konnte hierbei ebenfalls gezeigt werden. Auf dieser Reaktion beruht eine ergiebige Synthese des Oxytryptophans aus Tryptophan mit S_2Cl_2 in Chloroform, wobei der Zusatz von Trichloressigsäure die Aminosäure löslich macht, und anschließender hydrolytischer Abspaltung des Schwefels¹⁷⁾. Die in 2-Stellung durch Schwefel substituierten Indole geben die positive blaue Farbreaktion mit eisenhaltiger konz. Schwefelsäure wie Phalloidin, was einen weiteren Beweis für die Richtigkeit der angenommenen S-Brücke im Giftstoff bildet.

Die Fortsetzung der Versuche am Hydrolysat des Phalloidins, bei denen wegen des Versagens der Papierchromatographie die gekühlte Papierelektrophorese mit höheren Spannungen¹⁸⁾ entscheidende Dienste leistete, führte zur Entdeckung eines 6., bisher nicht bekannten Peptid-Bausteins¹⁹⁾. Im frisch bereiteten Säurehydrolysat ließ sich eine Ninhydrin-positive kationische Verbindung nachweisen, die durch verdünntes Alkali rasch in eine neutrale α -Aminosäure verwandelt wird und umgekehrt aus dieser

¹⁶⁾ Th. Wieland, O. Weiberg, E. Fischer u. G. Hörlein, Liebigs Ann. Chem. 577, 215 [1952].

¹⁷⁾ Th. Wieland, O. Weiberg, W. Dilger u. E. Fischer, ebenda 592, 69 [1955].

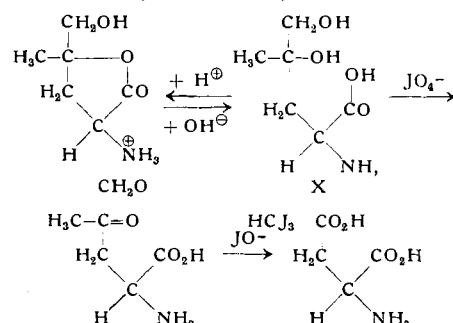
¹⁸⁾ Th. Wieland u. G. Pfleiderer, diese Ztschr. 67, 257 [1955].

¹⁹⁾ Th. Wieland u. W. Schön, Liebigs Ann. Chem. 593, 157 [1955].

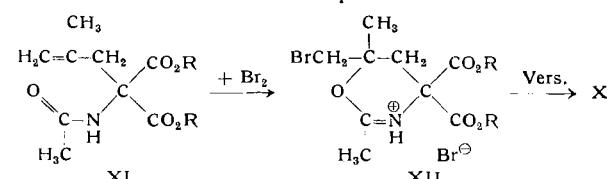
mit Mineralsäuren wieder hervorgeht. Dies ließ auf die Struktur einer α -Amino- γ - (oder δ -)hydroxsäure schließen, die als Aminolacton im elektrischen Feld zur Kathode wandert. Die Verbindung konnte als Lactonhydrochlorid aus mehreren Papierpherogrammen eluiert und kristallisiert gewonnen und in ihrer Konstitution durch folgende weitere Reaktion aufgeklärt werden:

1. die Summenformel des Hydrochlorids lautet $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$, HCl , die der neutralen durch Ringöffnung entstehende Aminosäure $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$.
2. Die C-Methyl-Bestimmung nach Kuhn-Roth liefert 1 Mol Essigsäure.
3. Mit Perjodat entsteht aus der Aminosäure 1 Mol Formaldehyd und 1 Mol α -Amino-laevulinsäure.
4. Die Abbausäure wurde außer durch Rf -Vergleich mit einem synthetischen Produkt²⁰⁾ durch ihre positive Jodoform-Reaktion identifiziert, bei der außerdem Asparaginsäure entstand.

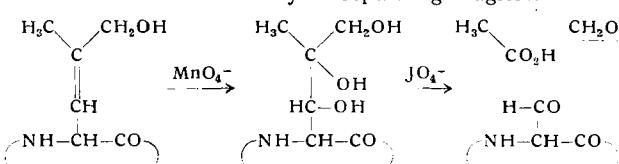
Dem neuen Baustein kommt also die Struktur einer α -Amino- γ -hydroxy- γ -hydroxymethyl-n-valeriansäure (X) zu, die wir als δ -Oxyleuceninhydrat bezeichnen haben.



Inzwischen ist die Synthese des Racemats dieser Verbindung gelungen²¹⁾, die von Meth-allylbromid und Na-Acetamino-malonester ihren Ausgang nimmt. Das Kondensationsprodukt (X1) addiert 1 Mol Brom unter Bildung eines Brommethyl-oxaziniumbromids (XII), das bei anschließender Verseifung durch schwefelsaure Silbersulfatlösung die Verbindung der erwarteten analytischen Zusammensetzung gibt, die sich in ihrem R_f -Wert und dem ihres Lactons nicht vom Naturprodukt unterscheidet.



Da intaktes Phalloidin bei der Reaktion mit Perjodsäure keinen Formaldehyd gibt und nur 3 OH-Gruppen enthält (krist. Triacetyl-Verbindung⁶⁾), muß die lactonisierte Aminosäure in Form einer Vorstufe darin gebunden sein. Als solche betrachten wir die ungesättigte Verbindung (XIII), die wir δ -Oxyleucenin genannt haben; es hat sich nämlich gezeigt, daß der Giftstoff Permanganat reduziert und das hierbei entstehende Glykol mit Perjodat nunmehr unter Formaldehyd-Abspaltung reagiert.

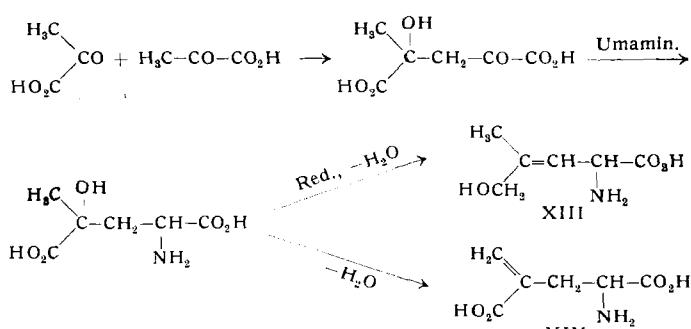


Das Kohlenstoffskelett des neu entdeckten Bausteins (XIII), das uns auch im Leucin begegnet, ist vom biologischen Standpunkt aus wohlverständlich. Über seine Genese können heute allerdings nur Spekulationen an-

²⁰⁾ O. Wiss u. H. Fuchs, Helv. chim. Acta 35, 407 [1952].

²¹⁾ Th. Wieland u. O. Weiberg, erscheint demnächst.

gestellt werden. So möchten wir es nicht für wahrscheinlich halten, daß die δ -Hydroxy-Verbindung eine Vorstufe des Leucins darstellt, ja sogar nicht einmal, daß der Syntheseweg beider Aminosäuren teilweise gemeinsam verläuft. Vielmehr möchte man an eine direkte Verknüpfung von 2 Molekülen Brenztraubensäure (oder Oxalessigsäure), Amidierung der Parabrenztraubensäure und anschließende Hydrierung denken. Beim Fehlen dieses Schritts käme eine biogenetische Verknüpfung mit der in letzter Zeit in Pflanzen aufgefundenen Methylen-glutaminsäure (XIV)²²⁾ zustande.



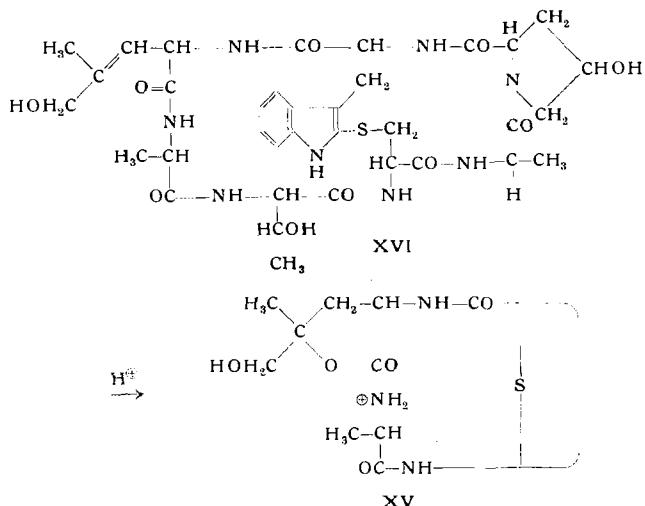
Die Bausteinformel des Phalloidins ließ sich nach volliger Kenntnis der Bausteine und ihres molaren Verhältnisses nunmehr festlegen zu

- 1 Cystein
- 2 Alanin
- 1 allo-Hydroxyprolin
- 1 Threonin
- 1 Oxindolylalanin
- 1 δ -Oxyleucenin
- 7 H_2O (7 Peptid-Verknüpfungen)
- 1 H_2O (Thioäther-Verknüpfung)

$C_6H_{14}O_1N_2S$

Der Giftstoff enthält im lufttrocknen Zustand 6 Mol H_2O ziemlich fest gebunden, so daß hier das Molekulargewicht um diesen Betrag zu vermehren ist und sich zu 878 berechnet (spektrophotometrisch ermittelt: 890). Auf dieser Grundlage stimmen die analytischen Werte für alle Elemente sehr gut mit der Berechnung überein.

Zur Ermittlung der Bausteinreihenfolge mußte die cyclische Moleköl möglichst an einer definierten Stelle hydrolytisch geöffnet werden, um den Ansatzpunkt für das *Edmansche* Abbauprozess mit Phenylsenföl²⁸⁾ zu liefern. Die selektive Öffnung gelang wider Erwarten glatt durch 30 min Erhitzen mit 0,2 n Schwefelsäure auf 100 °C dank der Lactonisierungstendenz des ungesättigten Aminosäure-Bausteins.



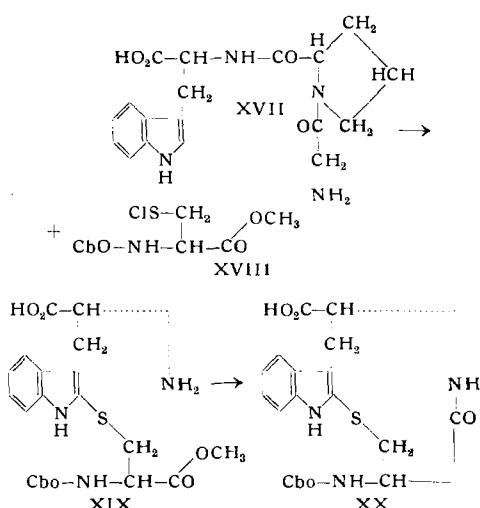
²²) J. Done u. L. Fowden, Biochem. J. 51, 451 [1952].
²³) P. Edman, Acta chem. scand. 4, 283 [1950].

28) P. Edman, Acta chem. scand. 4, 283 [1950].

Sie ergibt ein durch die S-Brücke cyclisiertes „halboffenes“ Phalloidin (XV), das wie das andere monocyclische, durch Entschwefelung gewonnene Desthio-phalloidin (VII) keine Giftwirkung mehr hat und bemerkenswerterweise gegen Peptidasen verschiedener Herkunft resistent ist. Die hydrolytische Ringöffnung gelingt auch am Desthio-Produkt VII zu einem völlig geöffneten Peptid, das dem stufenweisen Abbau zugeführt wurde. Aus der hierbei resultierenden Bausteinreihenfolge konnte schließlich die Formel des Phalloidins (XVI) aufgestellt werden, in der nur noch die Konfigurationen des Threonins und des δ -Oxyleucenins zu klären sind.

Syntheseversuche

Versuche, die Resynthese der bicyclischen Molekel aus dem Hydrolyseprodukt XV durch Erwärmen unter Zusatz tert. Basen in intramolekularer aminolytischer Ringöffnung des Lacton-Endes zu erzwingen, sind bisher ohne Erfolg geblieben. Das hierbei erwartete „Phalloidinhydrat“ wäre für Studien über die Toxizität und über den Angriffspunkt der Giftstoffe im Organismus interessant. Es ist nämlich gelungen, aus XV den endständigen Alanin-Rest präparativ abzuspalten und an die freigelegte Amino-Endgruppe des verkürzten Cyclopeptids eine beliebige Aminosäure, darunter etwa auch radioaktives Alanin, wieder anzuhangen²⁴). Weiterhin sind im Frankfurter Laboratorium Bemühungen zur Totalsynthese des Phalloidins oder ähnlich gebauter Bicyclopeptide im Gang, wobei die Hauptklippen jetzt als überwunden gelten können. So wurde z. B. die S-Brücke am Glycyl-prolyl-tryptophan (XVII) mit dem S-Chlorid des Carbobenzoxy-(abgek. Cbo-) cysteinmethylesters (XVIII) geschlagen und der so erhaltene Peptidester (XIX) in verdünnter Tetrahydrofuran-Lösung unter Zusatz von Triäthylamin zu XX cyclisiert²⁵).



Das Cyclopeptid XX zeigt die für Phalloidin typische blaue Farbreaktion mit eisenhaltiger konz. Schwefelsäure, die hellblaue Reaktion mit Zimtaldehyd-HCl auf Filterpapier und das charakteristische UV-Maximum bei 290 m μ . Bei der Weiterführung der Versuche²⁶⁾ gelang der Aufbau des noch komplizierteren Thioamids XI aus Alanyl-hydroxyproyl-tryptophanyl-isoleucin und dem S-Chlorid des Cho-alanyl-threonyl-cysteinmethylesters.

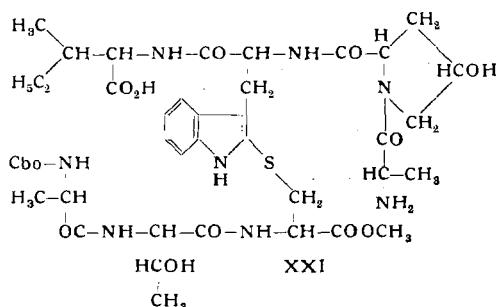
Da dieser Umsatz von zahlreichen Nebenreaktionen begleitet ist, die im ganzen nur etwa 25 % des gewünschten Produkts entstehen lassen, kam uns auch hier die präparative Paperelektrophorese¹⁸⁾ sehr zu statten. Mit dem

²⁴⁾ A. Schöpf, Dipl.-Arbeit Frankfurt/M. 1956.

²⁴⁾ A. Schöpf, Dipl.-Arbeit Frankfurt/M.
²⁵⁾ K. Freter, Dissert. Frankfurt/M. 1955.

²⁸) E. Groß, Dipl.-Arbeit Frankfurt/M. 1956.

Filterkarton 866, Macherey, Nagel & Co., war es möglich, auf 35 cm breiter Bahn 200 mg Synthesegemisch aufzu-



tragen und so in einem Lauf 50 mg des reinen Produkts XXI auf einmal zu gewinnen.

2. Die Amanitine

Bei den giftigeren Amanitinen sind unsere Kenntnisse noch nicht so weit entwickelt. Der chemische Hauptunterschied gegenüber dem Phalloidin besteht hier in einer viel intensiveren Farbreaktion mit Zimtaldehyd-HCl und der reduzierenden Wirkung auf ammoniakalische Silber-Lösung. Für diese wird bei allen ein in p-Stellung zum Indol-N befindliches O-Atom (p-Aminophenol-Gruppierung) verantwortlich gemacht. Für eine solche spricht auch das längerwellige Absorptionsmaximum in der Gegend von 300 m μ bei diesen Stoffen (Bild 1), das man z. B. auch am in 2-Stellung geschwefelten 5-Methoxy-tryptophan beobachtet²⁷⁾. Auch das Vorkommen von Bufotenin (I) im nahe verwandten gelben Knollenblätterpilz¹³⁾ möchte man nicht für einen bloßen Zufall halten.

α - und β -Amanitin stehen zueinander im Verhältnis eines Säureamids zur Carbonsäure⁹⁾. Die α -Verbindung, die im Papierpherogramm nicht wandert, enthält im Hydrolysat dieselben Bausteine wie β -Amanitin, darunter auch Asparaginsäure, zusätzlich aber noch eine Molekül Ammoniak. Es ist somit sicher, daß sich das neutrale Cyclopeptid vom sauren nur durch die Amid-Gruppe des Asparagins unterscheidet. Als weitere Bausteine konnten im schwefelsauren Hydrolysat des α -Amanitins mit Sicherheit Cystein, Glycin, Hydroxyprolin (wahrscheinlich als allo-Form), Isoleucin und eine lactonisierende Aminosäure nachgewiesen werden²⁸⁾. Das Aminolacton ist jedoch nicht mit dem aus Phalloidin identisch, sondern scheint ein etwas höheres Molekulargewicht zu haben, da es im Pherogramm deutlich langsamer wandert. Der interessanteste Bezirk der Molekül, der reduzierende Baustein, der auch die Lichtabsorption im UV bedingt, hat sich bisher wegen seiner großen Empfindlichkeit der Isolierung und Aufklärung entzogen. Erst in letzter Zeit konnten die milden Hydrolysebedingungen ausgearbeitet werden, die zu seiner Isolierung führen können. Hierzu muß die phenolische OH-Gruppe des α -Amanitins mit Diazomethan veräthert werden. Im Gegensatz zu früheren Befunden⁷⁾ beobachteten wir, daß dieses Methylamanitin ammoniakalische Silber-Lösung nicht in der Kälte, sondern erst bei 70 °C reduziert, wie man das auch an p-Aminophenoläthern findet. Methylamanitin läßt sich mit 2 n H₂SO₄ bei 100 °C in 1–2 h weitgehend aufspalten und zeigt dann im Papierchromatogramm den Flecken einer Aminosäure, die mit diazotierter Sulfanilsäure starke Rotfärbung gibt und sich durch Quecksilber-Fällung aus dem Hydrolysat abscheiden läßt²⁸⁾.

²⁷⁾ H. Weissmann, Dissert. Frankfurt/M. 1956.

²⁸⁾ A. Höfer, Dipl.-Arbeit Frankfurt/M. 1956.

Über die Bindung des Cysteins in den Amanitinen wurde durch Entschwefelungsversuche mit Raney-Nickel⁹⁾ ein ähnliches Bild wie beim Phalloidin gewonnen: Desthiio- α -amanitin läßt im Papierchromatogramm des Hydrolysats den neuen Flecken des Alanins anstelle von Cystein erkennen; gegen eine Bindung des Cystein-Schwefels an die 2-Stellung des Indol-Rings spricht der positive Ausfall der Hopkins-Col-Reaktion am α -Amanitin, die nur von Indol-Verbindungen mit freier 2-Position gegeben werden soll. Andererseits kennt man aber das Verhalten von 5-hydroxylierten Indol-Derivaten mit besetzter 2-Stellung noch zu wenig, als daß aus der positiven Farbreaktion schon ein sicherer konstitutioneller Schluß gezogen werden könnte.

Das Molekulargewicht des α -Amanitins konnte durch eine spezifische enzymatische Bestimmung der Menge von L-Asparaginsäure im Hydrolysat (12,34%) unter der Annahme eines Restes zu 1072 ermittelt werden²⁹⁾.

γ -Amanitin, ein Nebentoxin von *A. phalloides*, haben wir bisher nur in kleiner Menge auf mühsamem Reinigungswege erhalten¹⁰⁾. Seine Verwandtschaft zu den Hauptgiften erhellt durch verschiedene Eigenschaften, hauptsächlich durch die fast identische Absorption im UV. Anders als jene reduziert es aber Diammin-silber erst bei 70 °C rasch, was den Gedanken eines p-Aminophenoläthers nahelegt, da Methylamanitin dieselbe Eigenschaft hat. γ -Amanitin enthält ebenfalls Cystein in der noch ungeklärten Bindungsweise sowie (*allo*?)-Hydroxyprolin, Isoleucin und Asparaginsäure, wahrscheinlich als β -Amid. Als weiterer Baustein wurde auch hier im Hydrolysat das basische Lacton einer Hydroxyamino- säure aufgefunden und es scheint, als ob dieses sowohl von dem beim Phalloidin als auch beim α -Amanitin aufgefundenen verschieden sei. Eine sichere Differenz gegenüber den anderen Amanitinen besteht im Vorliegen von Alanin, anstelle des Glycins unter den Bausteinen.

Zur Pharmakologie und Biochemie der Vergiftung

Die durch mehr oder weniger geringe Dosen der reinen Toxine hervorgerufene tödliche Vergiftung zeigt in ihren Erscheinungen bei allen im Prinzip ein ähnliches Bild, bei dem vor allem das Fehlen einer momentanen Giftwirkung auffällt. Es ist zwar möglich, den Tod der Versuchstiere durch sehr starke Überdosierung mit Phalloidin in einigen Stunden herbeizuführen, doch scheint uns ein bemerkenswertes Phänomen darin zu liegen, daß die dosis letalis minima ihre Wirkung u. U. erst nach mehreren Tagen entfaltet. Dabei kommt es zum Tod der Tiere unter den Erscheinungen eines akuten Hungers. Dies läßt auf eine tiefgreifende Beeinflussung der zentralen Regulierung des gesamten Stoffwechsels schließen. Es besteht kein Zweifel, daß dabei die Leber als Hauptorgan vor allen anderen Organen betroffen wird. O. Wieland u. a.³⁰⁾ fanden, daß schon wenige Stunden nach der Vergiftung der Glykogen-Gehalt der Leber von Mäusen auf minimale Werte absinkt und die Leber dann nicht mehr in der Lage ist, aus parenteral zugeführter Glucose Glykogen aufzubauen. Wir konnten später zeigen, daß auch die Synthese der Serumproteine verschiedener Tiere durch die Giftstoffe stark gehemmt wird, allerdings erst nach längerer Zeit gemäß der geringeren Umsatzgröße von Eiweiß im Organismus¹²⁾. Dies läßt darauf schließen, daß die Gifte ganz prinzipiell die synthetischen energieverbrauchenden Leistungen des Organismus unterbinden. Weitere bio-

²⁹⁾ G. Pfleiderer, W. Gruber u. Th. Wieland, Biochem. Z. 326, 446 [1955].

³⁰⁾ O. Wieland, H. E. Fischer u. M. Reiter, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 215, 75 [1952].

chemische Untersuchungen zielten deshalb darauf hin, diese Erscheinung noch detaillierter zu erkennen. Hierbei fand man, daß beim vergifteten Tier im Lauf der Zeit auch die Menge an Milchsäure, Brenztraubensäure, Glutathion und vor allem an Adenosintriphosphat wesentlich zurückgeht³¹⁾. Die Ursache des tödlichen ATP-Mangels, die wir in einem Versagen der oxydativen Phosphorylierung zu erkennen hofften, läßt sich noch nicht mit Sicherheit erklären. Eine Entkopplung dieses biologischen Grundvorgangs konnte von uns an Rattenleber-mitochondrien *in vitro* mit den Giften nicht erreicht werden. Da jedoch Phalloidin in 10^{-4} mol. Konzentration die oxidative Erzeugung von ATP aus ADP und Phosphat im System Ascorbinsäure-Cytochrom-Sauerstoff, also im isolierten letzten Schritt der Atmungskette eines Mitochondriums.

³¹⁾ Th. Wieland u. K. Dose, Biochem. Z. 327, 345 [1956].

dien-Präparats völlig hemmt³²⁾, so wird man doch den Angriffspunkt der Toxine bei diesem lebenswichtigen Prozeß vermuten dürfen.

Es ist mir ein besonderes Anliegen, allen meinen Mitarbeitern, die durch Fleiß, Ideen und Geschick zum Fortschritt auf diesem schwierigen Gebiet beigetragen haben und beitragen, auch an dieser Stelle meinen tiefen Dank zu zollen. Ebenso gilt mein Dank der Fa. C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim, dabei besonders den Herren Dr. P. Weyland und Dr. W. Konz für ihre nachhaltige Unterstützung bei der Beschaffung und Isolierung des Giftmaterials. Der Fonds der chemischen Industrie und die Research Corporation New York haben ebenfalls durch finanzielle Unterstützung zum Gelingen vieler der geschilderten Versuche beigetragen.

Eingegangen am 13. September 1956 [A 759]

³²⁾ B. Hess, Priv. Mitteilg.

Struktur und Biogenese der Makrolide Eine neue Klasse von Naturstoffen

Von Prof. Dr. R. B. WOODWARD, Harvard University, Cambridge, Mass./USA.

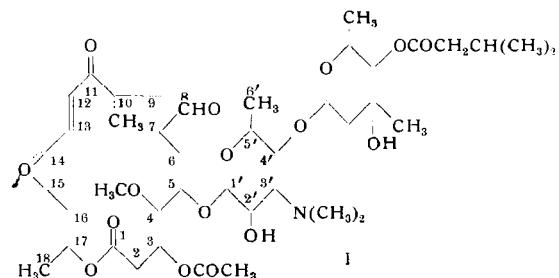
Unter den basischen Stoffwechselprodukten verschiedener *Streptomyces*-Arten befinden sich Substanzen mit einem makrocyclischen Lacton-Ring, die daher als „Makrolide“ bezeichnet werden. Zu ihnen gehört das Antibioticum Magnamycin, gewissermaßen ein riesiger Zucker und gleichzeitig eine langkettige aliphatische Verbindung, dessen Strukturaufklärung beschrieben wird. Die Stereochemie der Verbindung konnte zu einem erheblichen Teil gleichfalls aufgeklärt werden. Biogenetisch betrachtet, zeigt die Vorstufe des Magnamycins das Skelett der Tuberculostearinsäure. Es kann u. a. wahrscheinlich gemacht werden, daß lange Kohlenstoff-Ketten in der Natur durch schrittweise Addition von Acetat- oder äquivalenten Einheiten am jeweiligen Kettenende aufgebaut werden, wobei die Sauerstoff-Atome, die in den vorhergehenden Stufen eingeführt wurden, beibehalten werden, und es ist möglich, daß eine große Zahl der natürlich vorkommenden Zuckerarten durch Reaktionen gebildet wird, wie sie bei der Synthese von Fettsäuren ablaufen.

Die ausgedehnte Suche nach mikrobiischen Stoffwechselprodukten mit nutzbarer Aktivität gegen pathogene Mikroorganismen führte in den letzten Jahren zur Isolierung einer Gruppe von verwandten basischen Stoffwechselprodukten aus verschiedenen Arten von *Streptomyces*. Die am vollständigsten charakterisierten Vertreter dieser Klasse, welche wir als Makrolide bezeichnen wollen, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Pikromycin ¹⁾	$C_{25}H_{43}O_7N$
Methymycin ²⁾	$C_{25}H_{43}O_7N$
Narbomycin ³⁾	$C_{28}H_{47}O_7N$
Oleandomycin ⁴⁾	$C_{35}H_{63}O_{12}N$
Erythromycin ⁵⁾	$C_{37}H_{67}O_{13}N$
Magnamycin ⁶⁾	$C_{42}H_{87}O_{16}N$

Tabelle 1. Makrolide

Die Ergebnisse der jüngsten Vergangenheit führten zur vollständigen Aufklärung der Strukturen des Methymycins und Erythromycins und die kürzlich in unserem Laboratorium abgeschlossenen Forschungen ermöglichen uns, nun die komplette Formel für Magnamycin (I) abzuleiten.



Die Struktur des Magnamycins

Chemische Konstitution

Es sei darauf hingewiesen, daß die Bruttoformel einer so großen Molekel wie die des Magnamycins gewöhnlich erst nach der endgültigen Strukturermittlung mit Sicherheit angegeben werden kann. Obgleich die Formel $C_{42}H_{87}O_{16}N$ schon früh auf Grund zahlreicher Analysen des Magnamycins und dessen Derivaten bevorzugt wurde, so war doch die Genauigkeit der gewöhnlichen Elementaranalyse nicht genügend, um die Möglichkeit auszuschließen, daß die Zahl der Kohlenstoff- oder Wasserstoff-Atome von den jetzt als richtig erkannten Werten abweichen könnte. Dieser Schwierigkeit begegnet man allgemein bei den größeren Makroliden. Oleandomycin und Erythromycin

¹⁾ H. Brockmann u. W. Henkel, Chem. Ber. 84, 284 [1951]. H. Brockmann u. R. Oster, Naturwissenschaften 42, 155 [1955].

²⁾ M. N. Donin, J. Pagano, J. D. Dutcher u. C. M. McKee, Antibiotics Annual 1953–54, Medical Encyclopedia, Inc., New York, N. Y., S. 179. C. Djerassi u. J. A. Zderic, J. Amer. chem. Soc. 78, 2907 [1956].

³⁾ R. Corbaz, L. Ettlinger, E. Gäumann, W. Keller, F. Kradolfer, E. Kyburz, L. Neipp, V. Prelog, R. Reusser u. H. Zahner, Helv. chim. Acta 38, 935 [1955].

⁴⁾ B. A. Sobin, A. R. English u. W. D. Celmer, Antibiotics Annual 1954–55, Medical Encyclopedia, Inc., New York, N. Y., S. 827. H. Els, K. Mural u. W. D. Celmer, Abstracts of Papers, 130th Meeting of the Amer. chem. Soc. (Sept. 1956), S. 15 N. W. D. Celmer, Privatmitteilung.

⁵⁾ J. M. McGuire, R. L. Bunch, R. C. Andersen, H. E. Boaz, E. H. Flynn, H. M. Powell u. J. W. Smith, Antibiotics and Chemotherapy 2, 281 [1952]. M. V. Sigal jr., P. F. Wiley, K. Gerzon, E. H. Flynn, U. C. Quarck u. O. Weaver, J. Amer. chem. Soc. 78, 388 [1956]. K. Gerzon, Privatmitteilung.

⁶⁾ F. W. Tanner, A. R. English, T. M. Lees u. J. B. Routien, Antibiotics and Chemotherapy 2, 441 [1952]. R. L. Wagner, F. A. Hochstein, K. Murai, N. Messina u. P. P. Regna, J. Amer. chem. Soc. 75, 4684 [1953].