

Über die Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes 13. Mitteilung. Phalloin, ein weiteres Toxin

Von Prof. Dr. THEODOR WIELAND und
Dipl.-Chem. K. MANNES

Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt/M.

Die im Laboratorium von Heinrich Wieland in München 1932 begonnene Erforschung der Gifte des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) hat dort das rasch wirkende Phalloidin¹⁾ und das noch wesentlich giftigere, aber langsamer zum Tode führende Amanitin²⁾ in kristallisierter Form geliefert. Dieses erwies sich später als gemeinsames Kristallisat zweier sehr ähnlicher Komponenten, dem neutralen α - und dem sauren β -Amanitin³⁾, die beide ammoniakalische Silber-Lösung in der Kälte reduzieren. Vor kurzem wurde als vierte giftige Substanz eine weitere reduzierende Verbindung, γ -Amanitin isoliert⁴⁾.

Bei der chromatographischen Trennung des angereicherten Giftgemischs (Primärmaterial) der Pilzernte 1955 an neutralem Al_2O_3 in wassergesättigtem n-Butanol, dem 10 Vol % Äthanol zugesetzt waren, wurde ein in geringer Menge vorhandener, rascher als Phalloidin wandernder Inhaltsstoff in so reiner Form gewonnen, daß die sofortige Kristallisation aus Wasser gelang. Die in langen feinen Nadeln anfallende Verbindung zersetzt sich unter Schwarzfärbung von 250–280 °C an. Sie besitzt höhere Toxizität als Phalloidin und ist wie dieses ein rasch wirkender Giftstoff. So sterben 20 g schwere weiße Mäuse nach subcutaner Injektion von 50 γ bereits nach 6 h, die DL_{50} beträgt für die nach ca. 7 Tagen zum Tode führende Menge 20–30 γ . Wir bezeichnen die neue Verbindung als Phalloin.

Phalloin ist wie alle Amanitotoxine ein Peptid, das keine Ninhydrin-Reaktion zeigt und bei der Papierelektrophorese weder im sauren, noch im alkalischen wandert, also cyclisch gebaut sein muß. Sein R_f -Wert im Papirechromatogramm beträgt in einem Gemisch von Methyl-äthylketon-Aceton-Wasser (20:2:5) 0,6 bis 0,65, wodurch es sich als lipophiler als Phalloidin ($R_f = 0,50$) erweist. Dementsprechend ist es in Methanol sehr viel leichter löslich als Phalloidin und läßt sich aus diesem Lösungsmittel nicht kristallisieren. In seinen Farbreaktionen entspricht es völlig dem Phalloidin, ebenso im UV-Spektrum (Bild 1), das von dem des

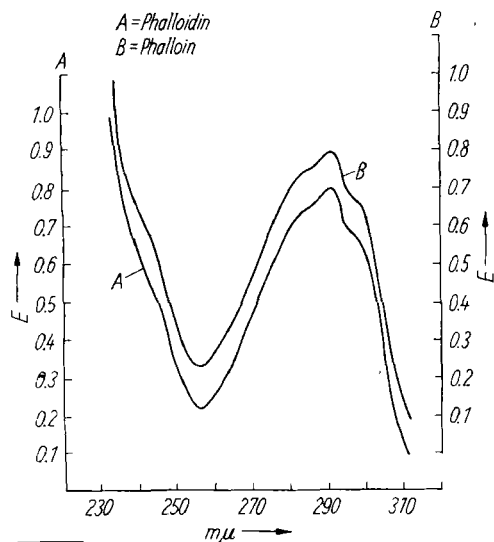


Bild 1
UV-Spektrum von Phalloidin und Phalloin

einen Hauptgifts nicht zu unterscheiden ist. Eine spektrophotometrische Molekulargewichtsbestimmung⁵⁾, berechnet unter der Annahme gleicher molarer Extinktionskoeffizienten von Phalloidin und Phalloin, ergibt für dieses ein Molgewicht von $730 \pm 4\%$ (Phalloidin + 6 H_2O 878).

Die äußerst große Ähnlichkeit des altbekannten mit dem neuen Giftstoff erstreckt sich auch auf die Aminosäure-Zusammensetzung. Im 2-dimensionalen Papirechromatogramm des Phal-

loinhydrolysats erschienen ebenfalls Alanin, Threonin, Cystein, allo(?)-Hydroxyprolin und Oxindolylalanin. Die Intensität des Alanin-Flecks ist hierbei aber wesentlich vermindert, so daß man an die Anwesenheit von nur einer Alanin-Molekel pro Mol denken muß, während Phalloidin davon 2 Mole enthält. Dieses Defizit, zusammen mit einem vermutlichen Mindergehalt von Kristallwasser in der lipophilen Substanz kann das niedrigere Molgewicht erklären. Außer den genannten Aminosäuren enthält das H_2SO_4 -Hydrolysat noch ein bei der Elektrophorese zur Kathode wanderndes Ninhydrin-positives Aminolacton, das aber wegen seiner etwas rascheren Wanderung vom analogen Baustein des Phalloidins⁶⁾ verschieden sein muß.

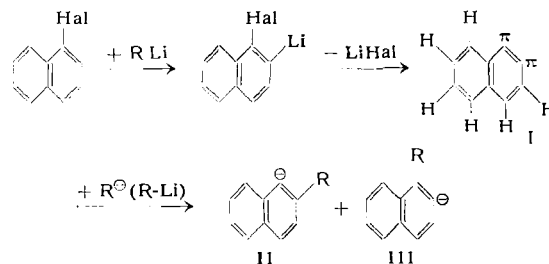
Die gemeinsamen Voraussetzungen für die Giftigkeit: cyclische Natur und Gehalt an verkapptem Cystein-Schwefel und einer lactonisierenden Aminosäure, sind also auch bei dem fünften Inhaltsstoff des Giftpilzes gegeben.

Eingegangen am 23. April 1957 [Z 461]

Addition von Basen an 1,2-Naphthin

Von Prof. Dr. R. HUISGEN und Dipl.-Chem. L. ZIRNGIBL
Institut für Organische Chemie der Universität München

Die Produkte der Reaktionen des 1- und 2-Fluor-naphthalins sowie des o- und m-Fluor-anisols mit Phenyl-lithium zwangen zur Annahme, daß sich an die primäre Metallierung der Fluor-Aromaten eine Eliminierung zum Arin als bindungssymmetrische Zwischenstufe anschließt¹⁾. Bei der nachfolgenden nucleophilen Addition des Phenyl-lithiums etwa an das aus Fluor-naphthalin hervorgehende 1,2-Naphthin entstehen isomere metallorganische Verbindungen, im folgenden Formelschema mit den Anionen II und III ($\text{R} = \text{C}_6\text{H}_5$) symbolisiert. Bei der Hydrolyse erhält man das Gemisch der Phenyl-naphthaline, bei der Carboxylierung das der Phenyl-naphthoesäuren; die Analyse zeigt, daß die Anionen II und III im Verhältnis 63:37 % auftreten.



Die Reaktionen des 1-Fluor-naphthalins mit n-Butyl-lithium sowie tert. Butyl-lithium in Äther verlaufen nicht nur nach gleichem Schema, sondern ergeben auch praktisch das gleiche Verhältnis an den II und III entsprechenden Anionen. Im ersten Fall führte die Carboxylierung zum Gemisch der 1-n-Butyl-naphthoesäure-(2) und der 2-n-Butyl-naphthoesäure-(1); im zweiten wurde nach der Hydrolyse der Gehalt an 1- und 2-tert. Butyl-naphthalin IR-spektrophotometrisch bestimmt. Der recht unterschiedliche Raumbedarf des Carbanions im Phenyl-, n-Butyl- und tert. Butyl-lithium hat somit keinen Einfluß auf das Verhältnis der Anlagerung an die Positionen 1 und 2 des 1,2-Naphthins (I); die Erfahrungen am Naphthalin-System weisen auf eine gewisse Abschirmung der Stellung 1 durch den peri-Wasserstoff hin.

Da auch beim Umsatz der Aryl-halogenide mit Alkali-amiden die Zwischenstufe des Arins passiert wird²⁾, lag es nahe, auch das Verhältnis der Amid-Addition an die Positionen 1 und 2 von I zu untersuchen. Aus bestimmten Gründen³⁾ wurde dabei das 1-Chlor-naphthalin der Einwirkung der Li-Salze sekundärer Amine in ätherischer Lösung unterworfen. Die Übereinstimmung in der Zusammensetzung der aus 1- und 2-Chlor-naphthalin erhaltenen Naphthyl-Basen-Gemische beweist den vollständigen Ablauf über I. Mit Lithium-diäthylamid in Gegenwart von überschüssigem sek. Amin entsteht beispielsweise 95 % d.Th. am Gemisch der Diäthylamino-naphthaline mit dem 1- und 2-Isomeren im Verhältnis 38:62. Aus der Tabelle (s. S. 390) geht die erstaunliche Unabhängigkeit des Verhältnisses von II:III von den sterischen und elektronischen Eigenschaften des Anions in R-Li hervor. Man muß

¹⁾ F. Lynen u. U. Wieland, Liebigs Ann. Chem. 533, 93 [1937].

²⁾ H. Wieland u. R. Hallermayer, ebenda 548, 1 [1941].

³⁾ Th. Wieland, L. Wirth u. E. Fischer, ebenda 564, 152 [1949].

⁴⁾ Th. Wieland u. Ch. Dudensing, ebenda 600, 156 [1956].

⁵⁾ Th. Wieland u. W. Schön, ebenda 593, 157 [1955].

¹⁾ R. Huisgen u. H. Rist, Naturwissenschaften 41, 358 [1954]; Liebigs Ann. Chem. 594, 137 [1955].

²⁾ J. D. Roberts, H. E. Simmons, L. A. Carlsmith u. C. W. Vaughan, J. Amer. chem. Soc. 75, 3290 [1953].

³⁾ Vgl. nachfolgende Zuschrift.

1-Halo-naphthalin	Reaktion mit	Anlagerung des R [⊖] an 1,2-Naphthth in	
		in 1-	in 2-
F	C ₆ H ₅ -Li (Carboxylierung) ¹⁾	37	63
Cl	C ₆ H ₅ -Li mit Piperidin-Katalyse ⁴⁾ (Hydrolyse)	35	65
F	n-Butyl-Li (Carboxylierung)	33	67
F	tert. Butyl-Li (Hydrolyse)	34	66
Cl	Li-piperidid + Piperidin ³⁾	33	67
Cl	Li-diäthylamid + Diäthylamin ⁵⁾	38	62
Cl	Li-diisobutylamid + Diisobutylamin	36	64

annehmen, daß schon bei relativ schwacher Bindung des R[⊖] an I (große Bindungslänge!) der Übergangszustand der Addition passiert wird; trotz der nur kleinen Aktivierungsschwelle genießt II einen recht konstanten, vermutlich durch elektronische Faktoren bedingten Vorzug.

Eingegangen am 23. April 1957

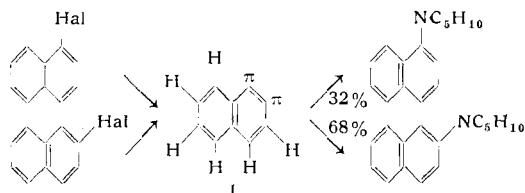
[Z 459]

Reaktion der Halogen-naphthaline mit Lithium-piperidid

Von Prof. Dr. R. HUISGEN und Dipl.-Chem. J. SAUER

Institut für Organische Chemie der Universität München

Der Umsatz des 1- oder 2-Chlor-, Brom- oder Jod-naphthalins mit Lithium-piperidid in Gegenwart eines weiteren Äquivalents Piperidin in siedendem Äther führte in bis zu 93proz. Ausbeute zum Gemisch der N-Naphthyl-piperidine; dieses enthielt laut IR-Analyse stets 67,6% N-(2-Naphthyl)-piperidin neben 32,4% des 1-Isomeren, wobei die Abweichungen innerhalb $\pm 2\%$ lagen. Die Substitutionen verlaufen also quantitativ über die bezüglich der Positionen 1 und 2 bindungssymmetrische Zwischenstufe des 1,2-Naphththins (I). Im Gegensatz zur Reaktion des 2-Fluor-naphthalins mit Phenyl-lithium⁶⁾ zeigen die 2-Halo-naphthaline bei der Behandlung mit Li-amiden in homogener, ätherischer Lösung somit keine 2,3-Eliminierung⁷⁾.



In der Naphthth-Bildung mittels Phenyl-lithium geschwindigkeitsmäßig bevorzugt⁶⁾, nehmen die Fluor-naphthaline gegenüber Lithium-piperidid eine überraschende Ausnahmestellung ein, die nur mit einer Verzweigung der Reaktionswege vereinbar ist. Da jüngst auch J. F. Bunnett und T. K. Brotherton⁸⁾ bei der Reaktion mit Natriumamid in sied. Piperidin die bevorzugte Bildung des konstitutionsgleichen Amins beobachteten, berichten wir über unser, viel weitergehende Schlüsse erlaubendes Versuchsmaterial.

Die Umsetzungen mit 1- und 2-Fluor-naphthalin in sied. ätherischer Lösung, die je 1-molar an Lithium-piperidid und Piperidin war, ergaben ein innerhalb der Fehlergrenze mit obigem „Arin-Verhältnis“ (32:68) übereinstimmendes Naphthyl-piperidin-Gemisch. Ließ man dagegen zur Lösung von 1-Fluor-naphthalin (0,35-molar) und 6 Äquivalenten Piperidin in sied. Äther innerhalb 8 h 1,3 Äquivalente Phenyl-lithium zutropfen, das momentan das Lithium-piperidid erzeugt, dann fiel in 94% Ausbeute ein Isomergemisch an, das 84% 1- neben 16% 2-Piperidino-naphthalin enthielt. Bei der entsprechenden „inversen“ Prozedur wurde 2-Fluornaphthalin in das Gemisch von 6% 1- und 94% 2-Piperidino-naphthalin übergeführt⁹⁾.

¹⁾ R. Huisgen, J. Sauer u. A. Hauser, diese Ztschr. 69, 267 [1957].

²⁾ Diplomarbeit A. Hauser, Universität München 1957.

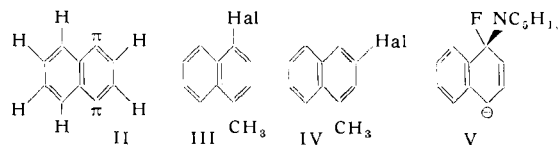
³⁾ R. Huisgen u. H. Rist, Naturwissenschaften 41, 358 [1954]; Liebig's Ann. Chem. 594, 137 [1955].

⁴⁾ Vgl. dagegen J. F. Bunnett u. T. K. Brotherton, J. Amer. chem. Soc. 78, 155 [1956] für die heterogene Reaktion des 2-Brom-naphthalins mit Natrium-amid in sied. Piperidin.

⁵⁾ J. Amer. chem. Soc. 78, 6265 [1956].

⁶⁾ Bei der Reaktion mit NaNH₂ in flüss. Ammoniak nehmen die Fluornaphthaline auch eine Sonderstellung ein: R. S. Urner u. F. W. Bergstrom, J. Amer. chem. Soc. 67, 2108 [1945].

Die Möglichkeit eines Weges über 1,4-Naphthth (II) als Konkurrenz mit der Substitution über I konnte durch Versuche mit 4-Methyl-1- und 4-Methyl-2-halogen-naphthalinen (III und IV) ausgeschlossen werden. Während III, Hal = Cl, Br und IV, Hal = Cl über das 4-Methyl-naphthth-(1,2) identische Gemische von 28% 1- und 72% 2-Piperidino-4-methyl-naphthalin ergaben, trat bei III, Hal = F beim Arbeiten mit kleiner Lithium-piperidid-Konzentration auch hier, wenn auch quantitativ schwächer ausgeprägt, die Bevorzugung der konstitutionsgleichen Base im Gemisch auf.



Die konkurrierende Substitution „ohne Umlagerung“ muß somit die direkte sein (V ist eine mesomere Grenzformel der Zwischenstufe); unter den nichtaktivierten Aryl-halogeniden haben wir diese Erscheinung—p-Fluor-toluol liefert p- und m-Tolyl-piperidin im „Arin-Verhältnis“—nur bei den Fluor-naphthalinen beobachtet. Das Ausmaß, in dem beide Substitutionswege beim 1-Fluor-naphthalin beschriftet werden, hängt charakteristisch vom Verhältnis Lithium-piperidid: Piperidin und in untergeordnetem Maß auch von der absoluten Konzentration am Piperidin ab, wie die Tabelle zeigt.

Lithium-piperidid mmol/l	Piperidin mmol/l	% Substitution	
		über Arin	direkt
440	0	100	0
370	300	100	0
187	441	87	13
346	910	85	15
188	578	80	20
182	728	68	32
173	1330	36	64

Kinetische Untersuchungen lehrten, daß sich die Arin-Bildung mittels Lithium-piperidid bei Fluor- und Chlor-Aromaten praktisch gleich schnell vollzieht. Das auf das Fluor-naphthalin beschränkte Konkurrenzphänomen läßt keinen Zweifel daran, daß die direkte Substitution des -F rascher abläuft als die der anderen -Hal. Mit diesem Nachweis wird eine bislang unverstandene Komplikation der nucleophilen aromatischen Substitution gegenstandslos. Die Reaktivitätsfolge der Halo-Aromaten J, Br > Cl > F beim Umsatz mit Anionen¹⁰⁾ wurde durch die Beteiligung des seinerzeit noch nicht bekannten Eliminierungsweges (Arin als Zwischenstufe) vorgetäuscht. Die bei der „aktivierten“ Substitution etwa des p-Nitro-halobenzols gefundene Folge F > Cl, Br > J gilt offensichtlich für alle direkten nucleophilen Substitutionen (Additionsmechanismus der Substitution).

Eingegangen am 23. April 1957

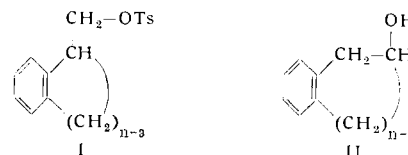
[Z 460]

Neue Umlagerung bei Solvolysen in der 1,2-Benzo-cyclenyl-(3)-methyl-Reihe

Von Prof. Dr. R. HUISGEN und Dipl.-Chem. G. SEIDL

Institut für Organische Chemie der Universität München

Die primären 1,2-Benzo-cyclenyl-(3)-methyl-tosylate (I) mit n = 5–7 lieferten bei der Solvolyse in Ameisensäure über das Phenonium-Ion als Zwischenstufe die ringverweiterten 1,2-Benzo-cyclenole-(4) (II) bzw. deren Formiate¹¹⁾. Dagegen führte die



Formolyse des durch Synthese und Abbau konstitutionell gesicherten I, n = 8 bei 65°C in 65% Ausbeute zu einem Kohlenwasserstoff C₁₃H₁₆; dieser wies, obwohl Produkt einer Eliminierung, keine Doppelbindung auf. Die Oxydation mit Chromsäure gab ein Keton C₁₃H₁₄O; die Lichtabsorption seines dunkelroten 2,4-Dinitrophenyl-hydrazons sprach für einen Abkömmling des α-Indanons oder α-Tetralons. Nur mit letzterem war die CO-Valenzschwingung des kristallinen Ketons bei 5,95 μm vereinbar.

¹⁰⁾ Vgl. die Diskussion bei J. F. Bunnett u. R. E. Zahler, Chem. Reviews 49, 332 [1951].

¹¹⁾ Diplomarbeit G. Seidl, Universität München 1957; R. Huisgen, diese Ztschr. 69, 341 [1957].