

Über die Inhaltsstoffe des grünen Knollenblätterpilzes, XXVI¹⁾

Die Bausteine des γ -Amanitins

von Theodor Wieland und Hartmut Wehrt²⁾

unter Mitarbeit von Jochen Dölling

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

Eingegangen am 16. Mai 1966

γ -Amanitin wird nach mehrstufiger chromatographischer Anreicherung, zuletzt zur Abtrennung farbiger Verunreinigungen an Sephadex G-25, kristallin erhalten. Das Gift ($LD_{50} = 0.2$ mg/kg weiße Maus, langsam wirkend) zeigt in seiner Zusammensetzung große Ähnlichkeit mit α -Amanitin bis auf eine γ -Hydroxyaminosäure, der — wie sich später herausstellte, irrtümlich — die Struktur β -Methyl- γ -hydroxy-leucin zugeschrieben wurde.

Isolierung

γ -Amanitin, eines der in geringerer Konzentration in *Amanita phalloides* enthaltenen Toxine, wurde schon vor zehn Jahren auf umständliche Weise in einheitlicher Form gewonnen³⁾. Die Schwierigkeit seiner Isolierung besteht darin, daß es sich chromatographisch sehr ähnlich wie das Hauptgift Phalloidin verhält⁴⁾.

Unter Ausnutzung der Veränderung in der chromatographischen Laufgeschwindigkeit, welche Phalloidin in Gegenwart von Borat wegen seiner γ,δ -Glykol-Seitenkette erfährt, die aber beim γ -Amanitin ausbleibt, gelang es, eine mäßige Menge Phalloidin-freien γ -Amanitins in die Hand zu bekommen. Als Ausgangsstoffe dienten die mittelschnell wandernden Fraktionen einer Chromatographie stark angereicherten Primärmaterials an einer großen Säule von Cellulose-Pulver mittels Butanon/Aceton/Wasser (20:6:5)⁵⁾. Der Einfluß der Borat-Konzentration auf die R_F -Werte der zu trennenden Gifte Phalloin, γ -Amanitin und Phalloidin wurde vorher ermittelt (Abb. 1). Als Kompromiß zwischen Trennvermögen und wieder zu entfernenden Salzen wurde eine Konzentration von 12.5 mMol/l Borax gewählt, mit der mehrere hundert Papierbögen durchgefuechtet und dann an der Luft getrocknet wurden. Man erhielt darauf aus 58 g γ -Amanitin-haltigem Gemisch 5.5 g braunes Pulver, in dem γ -Amanitin zwar stark angereichert war, das aber noch ziemlich viel Phalloin enthielt.

1) XXV. Mitteilung: Th. Wieland, H. Schiefer und U. Gebert, Naturwissenschaften **53**, 39 (1966).

2) H. Wehrt, Dissertation Univ. Frankfurt a. M. 1964 (D 30).

3) Th. Wieland und Ch. Dudensing, Liebigs Ann. Chem. **600**, 156 (1956).

4) Siehe z. B. das Diagramm bei Th. Wieland, Helv. chim. Acta **44**, 919 (1961).

5) Th. Wieland und W. Boehringer, Liebigs Ann. Chem. **635**, 178 (1960).

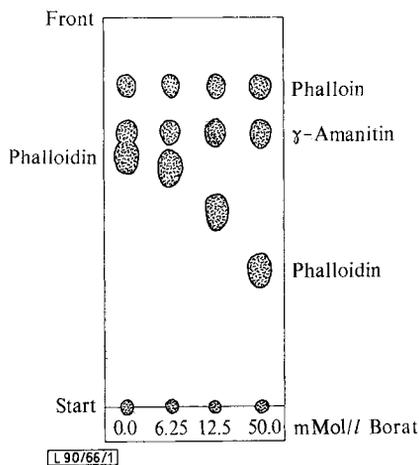


Abbildung 1. Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeiten von Phalloidin, γ -Amanitin und Phalloin auf Borax-impregniertem Papier von der Konzentration an Na-tetraborat Papier: Schleicher & Schüll Nr. 2043 b, nach der Imprägnierung getrocknet. — Laufmittel: Butanon/Aceton/Wasser (20 : 2 : 5).

Da man Phalloin von Phalloidin (und auch vom gleich weit wandernden γ -Amanitin) durch Chromatographie an Al_2O_3 mit Wasser-haltigem Butanol einigermaßen gut abtrennen kann⁶⁾, haben wir die γ -Amanitin-Fraktion, nach Zwischenreinigung durch Ammonsulfat-Fällung, auf diese Weise weiter gereinigt und dabei 4.2 g *Phalloin-freies, γ -Amanitin-reiches Präparat* erhalten.

Als Vorversuche für eine *präparative Trennung* von Phalloin und γ -Amanitin sind dünnschichtchromatographische Analysen an Kieselgel ausgeführt worden. Dabei wurde in Methanol/Essigester (1 : 1) ein Laufmittel gefunden, das es erlaubt, γ -Amanitin ($R_F = 0.55$) gut von Phalloin ($R_F = 0.34$) und Phalloidin ($R_F = 0.31$) abzutrennen. Diese Trennung ließ sich auch präparativ erreichen. Das Phalloin-freie, γ -Amanitin-reiche Präparat (4.2 g) wurde an einer Säule von 2 kg *Kieselgel* in zwei Portionen auf diese Weise weiter gereinigt. Man erhielt 1.5 g hoch angereichertes γ -Amanitin-Präparat.

Ohne das umständliche Borax-Verfahren konnten nun durch eine *Chromatographiefolge* an Cellulose-Pulver (in Butanon/Aceton/Wasser = 20 : 6 : 5), Aluminiumoxid (in wassergesättigtem Butanol) und Kieselgel (in Methanol/Essigester = 1 : 1) auch aus den Primärmaterialien späterer Pilzernten 1.2 g eines gleich stark angereicherten γ -Amanitins gewonnen werden.

Da es jedoch noch nicht gelang, aus den vereinigten 2.7 g hoch angereicherten γ -Amanitins Kristalle des Giftstoffs zu erhalten, benutzten wir zur Abtrennung der höhermolekularen Verunreinigungen eine Chromatographie an *Sephadex G-25* in

⁶⁾ Th. Wieland, K. Mannes und A. Schöpf, Liebigs Ann. Chem. **617**, 152 (1958).

Wasser. Nach Auftragen der Substanz in 10 ccm Wasser traten beim Waschen des Gels (80×2.5 cm) mit Wasser zuerst die Verunreinigungen aus, danach γ -Amanitin in farbloser Lösung (papierchromatographische Kontrolle). Der nach dem Gefrier-trocknen nahezu farblose Rückstand wurde in 95-proz. wäßr. Methanol warm gelöst und durch Animpfen mit einer Spur α -Amanitin zur Kristallisation gebracht. Man erhielt so 184 mg kristallisiertes und aus der Mutterlauge nach Abdampfen noch 224 mg amorphes γ -Amanitin.

Toxizität, physikalische und chemische Eigenschaften

Das krist. γ -Amanitin zeigte eine *Toxizität* von $LD_{50} = 0.1 - 0.2$ mg/kg weiße Maus, die im Verlauf von 3—4 Tagen zum Tode führten. γ -Amanitin ist mithin der bisher giftigste Inhaltsstoff von *Amanita phalloides* (α -Amanitin: $LD_{50} = 0.35$ mg/kg).

Das *UV-Spektrum* des γ -Amanitins (Abb. 2) ist mit dem des α -Amanitins so gut wie identisch. Auch die vom α -Amanitin bekannte Verschiebung des Maximums von 303 nach 332—333 $m\mu$ bei Zugabe von wenig Natronlauge wird vom γ -Amanitin gegeben. Bei Annahme eines Molekulargewichts um 900 für γ -Amanitin ergibt sich ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon \approx 10000$ (α -Amanitin: $\epsilon \approx 11500$). Wegen der Rotverschiebung im Alkalischen muß γ -Amanitin eine freie *phenolische Hydroxylgruppe* enthalten. Auf ihre Anwesenheit konnte früher³⁾ an weniger reinen Präparaten wegen der geringeren Reduktion von Diamminsilber-Ion nicht geschlossen werden.

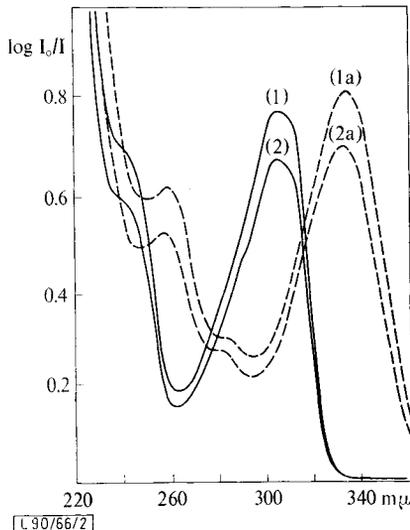
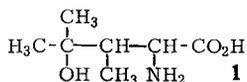


Abbildung 2. UV-Spektren von α -Amanitin in Wasser (1) und verd. Natronlauge (1a), γ -Amanitin in Wasser (2) und verd. Natronlauge (2a)

Konzentrationen: In Wasser = 0.6 mg/10 ccm; in Natronlauge 0.61 mg in 10 ccm Wasser + 0.2 ccm 0.5*n* NaOH. — Küvette: $d = 1.0$ cm.

Auch in der *Bausteinanalyse* zeigt γ -Amanitin mit α -Amanitin⁷⁾ große Ähnlichkeit. Im Salzsäurehydrolysat wurden folgende Aminosäuren durch Papierelektrophorese nachgewiesen: Asparaginsäure, Cystein, Cysteinsäure, Glycin, Hydroxyprolin, Isoleucin und das basische Lacton einer γ -Hydroxyaminosäure. Dieses gibt, ähnlich dem analogen Baustein des α -Amanitins, mit Ninhydrin anfänglich eine Rosafarbe, wandert aber im Elektropherogramm bei pH 6.5 rascher. Das früher³⁾ im Hydrolysat zusätzlich festgestellte Alanin fand sich in keinem der umkristallisierten Präparate mehr. Eine quantitative Aminosäureanalyse zeigte, daß Gly gegenüber Asp, Hypro und Ileu in doppelt molarer Menge enthalten ist, das Peptid also aus acht Aminosäuren besteht.

Die basische Verbindung gab sich als Lacton einer γ -Hydroxyaminosäure dadurch zu erkennen, daß diese, nach Elution aus dem Pherogramm mit wenig verd. Natronlauge kurz erwärmt, am Startpunkt der Elektrophorese (pH 6.5) zurückblieb und stark violette Ninhydrin-Reaktion (neutrale α -Aminosäure) gab, nachfolgende Behandlung mit wenig verd. Salzsäure z. T. aber wieder die zur Kathode wandernde Verbindung hervorrief. Im absteigenden Papierchromatogramm (sek.-Butanol/Ameisensäure/Wasser = 75:15:10) wanderte das neue Lacton etwa 1.5mal so weit wie das aus α -Amanitin, für welches wir⁷⁾ die Struktur β -Methyl- γ , δ -dihydroxy-leucinlacton vorgeschlagen haben. Größere elektrophoretische Beweglichkeit (kleineres Molekulargewicht) und größerer R_F -Wert (Mindergehalt hydrophiler Gruppen) ließen es plausibel erscheinen, daß das Lacton aus γ -Amanitin eine OH-Gruppe weniger hat als



das des α -Amanitins. Auch das Fehlen eines Borat-Effekts beim γ -Amanitin (vgl. Abb. 1) deutet auf die Abwesenheit der Glykolgruppierung hin. Wir glaubten daher, die neue Aminosäure aus γ -Amanitin als β -Methyl- γ -hydroxy-leucin (**1**) ansehen zu können. Diese würde sich zum Lacton des α -Amanitins so verhalten wie die lactonisierende Aminosäure des Phalloins (γ -Hydroxy-leucin)⁴⁾ zu der des Phalloidins (γ , δ -Dihydroxy-leucin)⁴⁾. Die massenspektroskopische Analyse des krist. Aminolacton-hydrochlorids⁸⁾, das durch mikropräparative Elektrophorese auf Filterkarton gewonnen war (vgl. S. 124), und der chromatographische Vergleich mit der synthet. Verbindung⁸⁾ zeigten aber, daß es sich um eine der diastereomeren Formen des bisher ebenfalls unbekanntes γ -Hydroxy-isoleucins handelt.

Wir danken Herrn Dr. W. Konz, Ingelheim, für die wertvolle Hilfe bei der Beschaffung und Aufarbeitung der Pilze und Fr. A. Schmitz für die Ausführung der Toxizitätsbestimmung.

⁷⁾ Th. Wieland und A. Höfer, Liebigs Ann. Chem. **619**, 35 (1958).

⁸⁾ P. Pfaender und Th. Wieland, Liebigs Ann. Chem. **700**, 126 (1966), nachstehend.

Beschreibung der Versuche

Die chromatographischen und elektrophoretischen Hilfsmittel sind bereits beschrieben^{5,6)}. Als Träger für die Säulenchromatographien wurden verwendet: Cellulosepulver „Ederol“ Nr. 221 (Fa. Binzer, Hatzfeld an der Eder); Aluminiumoxid „Giulini“ (Aktivitätsstufe 1, annähernd neutral) der Gebr. Giulini GmbH, Ludwigshafen/Rhein; Kieselgel Nr. 7733 (Korngröße 0.2–0.5 mm) der Fa. E. Merck, Darmstadt; Sephadex G-25 (fine) der Pharmacia, Uppsala.

Papierchromatographisch-präparative Trennung von angereichertem Primärgift: Die mittelschnell wandernden Fraktionen der Säulenchromatographie von 58 g γ -Amanitin-haltigem Primärmaterial an Cellulose-Pulver mit Butanon/Aceton/Wasser (20:6:5)⁵⁾ wurden auf 550 Borat-getränkte Papierbögen (60 × 60 cm, Schleicher & Schüll 2043b; Baden in wäbr. Lösung von 12.5 mMol/l Borax, Abtropfenlassen und an der Luft trocknen) aufgetragen. Als Fließmittel diente Butanon/Aceton/Wasser (20:2:5), absteigend. Die Zonen der Toxine wurden auf den trockenen Bögen mit einer UV-Handlampe (Mineralight) als dunkle Streifen lokalisiert und ausgeschnitten. Der γ -Amanitin- + Phalloin-haltige Teil wurde unter zehnmahliger Erneuerung des Lösungsmittels jeweils 24 Stdn. in Methanol liegen gelassen. Die Eluate wurden mit verd. Salzsäure auf pH 6 eingestellt und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand (64 g) wurde in der gerade ausreichenden Menge Methanol gelöst und die Lösung einige Tage bei -20° aufbewahrt. Man trennte vom ausgeschiedenen Salz ab, dampfte das Filtrat i. Vak. ein, löste den Rückstand in 250 ccm Wasser und fällte die Toxine durch Sättigen mit festem Ammoniumsulfat. Die hellbraune Fällung wurde abzentrifugiert, im Exsikkator getrocknet, in Methanol gelöst und durch Filtrieren von ungelöstem Ammoniumsulfat befreit. Nach dem Abdampfen erhielt man 5.54 g *angereichertes γ -Amanitin*.

Chromatographie an Sephadex G-25 und Kristallisation von γ -Amanitin: 2.7 g wie voranstehend und dann nach Lit.⁶⁾ *angereichertes γ -Amanitin* wurden in 20 ccm Wasser gelöst und auf eine Säule von 100 g *Sephadex G-25 fine* (zuvor in Wasser gequollen) aufgegeben (Glasrohr 2.5 × 100 cm). Nach dem Einsickern ließ man allmählich ca. 500 ccm Wasser nachlaufen und sammelte 65 Fraktionen von je 5 ccm. Die Fraktionen Nr. 1–22 enthielten braune Verunreinigungen, Nr. 19–35 die Hauptmenge γ -Amanitin. Sie wurden vereinigt und bei 20° i. Vak. eingedampft. Den Rückstand löste man in 10 ccm 95-proz. wäbr. Methanol bei 45° , kühlte auf Raumtemperatur ab und impfte mit einem Kriställchen α -Amanitin. Innerhalb 24 Stdn. kristallisierten 184 mg γ -Amanitin als farblose, verfilzte Nadeln aus. Sie waren papierchromatographisch einheitlich (mit Zimtaldehyd/HCl violetter Fleck vom $R_F = 0.53$).

L- γ -Hydroxy-isoleucinlacton-hydrochlorid aus γ -Amanitin: 150 mg krist. γ -Amanitin wurden zu vier gleichen Teilen in je 2.5 ccm 6*n* HCl 14 Stdn. bei 110° hydrolysiert (geschlossene Röhrchen). Die Hydrolysate wurden mittels Rotationsverdampfers eingeengt und dann im Exsikkator (über konz. Schwefelsäure/KOH) ganz getrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ccm Wasser aufgenommen und die Lösung sofort auf einen mit Pyridin/Essigsäure-Puffer (pH 6.5) getränkten Filterkarton (30 × 40 cm) strichförmig nahe der angelegten Anode aufgetragen. Nach 3.5stdg. *Elektrophorese* (100 mA) trocknete man den Karton bei 30° . Das Aminolacton war als einzige Ninhydrin-positive Substanz etwa 14 cm kathodisch gewandert (Sichtbarmachen durch Ninhydrin-Einwirkung auf dem Randstreifen). Die Zone wurde ausgeschnitten und mit ca. 300 ccm Methanol kapillar eluiert. Im Auffanggefäß wurde etwas HCl-haltiges Methanol

vorgelegt. Das methanol. Eluat wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand in ca. 10 ccm absol. Methanol gelöst und die Lösung mit 90 ccm absol. Äther versetzt. Die Kristallisation des Lacton-hydrochlorids setzte nach etwa 1 Woche ein und war nach 2 Wochen beendet (Kristallisationsversuche aus kleineren Volumina führten zur öligen Abscheidung). Nach Abgießen der Mutterlauge wurde die Lösung in 1 ccm absol. Methanol (Zentrifugenglas) tropfenweise mit absol. Äther bis zur beginnenden Trübung versetzt. Der nach einigen Minuten erscheinende amorphe Niederschlag wurde abzentrifugiert, aus der klaren Lösung nochmals mit wenig Äther amorphes Material gefällt und abgetrennt. Die Lösung wurde im Wasserbad auf ca. 45° erwärmt, mit Äther tropfenweise bis zur Trübung versetzt, diese durch kurzes Verjagen von Äther eben beseitigt und nun die klare Lösung abgekühlt. Beim Animpfen mit synthet. L- γ -Hydroxy-isooleucinlacton-hydrochlorid trat Kristallisation ein. Nach 12stdg. Aufbewahren im Kühlschrank wurde abgesaugt und mit wenig Äther gewaschen: 5 mg Kristalle vom Schmp. 213–215°. Die Substanz war im Elektropherogramm und im Dünnschichtchromatogramm einheitlich (mit Ninhydrin rötliche Farbe); massenspektrometrische Analyse bei Lit.⁸⁾.

[90/66]