

Über die Inhaltsstoffe des grünen Knollenblätterpilzes, XXXI<sup>1)</sup>

## Phallin A, ein untoxischer, und Phallin B, ein toxischer Bestandteil der lipophilen Extraktfraktionen

von Theodor Wieland und Juan X. de Vries<sup>2)</sup>

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

Eingegangen am 16. Mai 1966

---

Die nach Isolierung der Hauptgifte von *Amanita phalloides* zurückbleibenden Mutterlaugen enthalten noch weitere, bisher nicht rein gewonnene, Peptid-artige Inhaltsstoffe. Aus dem lipophilen Anteil sind durch vielfache Chromatographie an Aluminiumoxid, Kieselgel und Sephadex G-25 zwei neue Verbindungen, das ungiftige Phallin A und das toxische Phallin B, herausgearbeitet worden.

---

*Amanita phalloides* enthält<sup>3)</sup> außer den giftigen Inhaltsstoffen des Phalloin-Typs (Phalloin [PHN], Phalloidin [PHD], Phallacidin [PHC]) und des Amanitin-Typs ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Amanitin [AMA]) weitere Cyclopeptide in geringerer Konzentration<sup>4)</sup>. Diese sind über das ganze Papierchromatogramm ziemlich gleichmäßig verteilt.

In der vorliegenden Abhandlung berichten wir über einige durch mehrfache Chromatographie an verschiedenen Adsorbentien aus dem *lipophileren Anteil* ( $R_F > 0.5$ ) isolierte Inhaltsstoffe.

Das Schema 1 gibt eine Übersicht über den komplizierten Aufarbeitungsgang. Auf der *Chromatographiestufe 3* waren bei der früheren<sup>5-7)</sup> Bearbeitung 87 g lipophiles Stoffgemisch angefallen, die als Ausgangsmaterial für die vorliegende Untersuchung dienten. Sie enthielten laut Papierchromatogramm  $\alpha$ -AMA,  $\gamma$ -AMA, PHD, PHN, Amanin<sup>3)</sup> (jetzt als Phallisin bezeichnet)<sup>8)</sup>, einen Amanitin-artigen „X-Körper“ und weitere rasch wandernde Substanzen (mit Zimtaldehyd/HCl positiv reagierend und durch tert.-Butylhypochlorit/*o*-Toluidin<sup>9)</sup> nachweisbar). Chromatographie (*Stufe 4*)

---

1) XXX. Mitteilung: Th. Wieland und U. Gebert, Liebigs Ann. Chem. **700**, 157 (1966), voranstehend.

2) Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung 1962/1963. — Jetzige Anschrift: Facultad de Química, Univ. Montevideo/Uruguay.

3) Letzte Übersicht: Th. Wieland, Pure appl. Chem. **9**, 145 (1964).

4) Vgl. Th. Wieland, Angew. Chem. **75**, 1105 (1963).

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

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

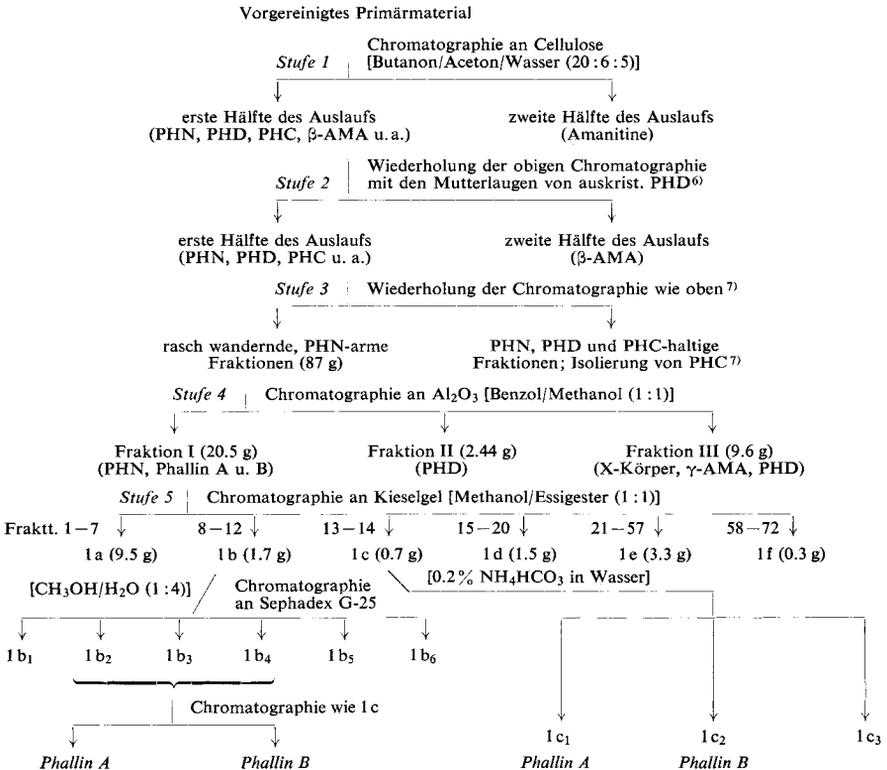
7) Th. Wieland und H. W. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. **657**, 218 (1962).

8) Hierüber wird noch berichtet werden.

9) R. H. Mazur, B. W. Ellis und P. S. Cammarta, J. biol. Chemistry **237**, 1619 (1963).

von je 22 g lipophilem Gemisch an 17 kg Aluminiumoxid (2mal verwendbar) lieferte jeweils 140 Fraktionen (je 250 ccm), die so vereinigt wurden, daß Fraktion I PHN und die rascher wandernden Stoffe, Frakt. II hauptsächlich PHD und Frakt. III PHD,  $\gamma$ -AMA und X-Körper enthielten (Mengenangaben im Schema). 20,5 g I wurden an 1,7 kg Kieselgel (*Stufe 5*) in 72 Fraktionen (je 220 ccm) zerlegt und durch entsprechende Vereinigung aufgrund ähnlicher papierchromatographischer Analyse die Substanzen 1a–1f erhalten (Mengenangaben in Schema 1).

Schema 1. Chromatographische Aufarbeitung von „Primärmaterial“ (PM I und PM II der Pilzernten bis 1958)<sup>5)</sup> zu den Phallinen A und B  
Vorreinigung durch elektrolytisches Entsalzen und Entfernung unlöslicher Ballaststoffe durch Ausfrieren ( $-20^{\circ}$ ) der methanol. Lösung<sup>6)</sup>.



1a war ein dickflüssiges Öl ohne physiologische Wirkung. 1b lag als hellbraunes Pulver vor, das an der weißen Maus untoxisch war, jedoch, wie später festgestellt wurde, eine toxische Substanz (Phallin B) enthielt, deren Wirkung durch Begleitstoffe

unbekannter Natur aufgehoben wird. *Ic* verhielt sich ähnlich wie *1b*. *1d* und *1e*, hellbraune Pulver, bestanden laut Dünnschichtchromatogramm fast ganz aus reinem PHN; aus den 3.28 g *1d* wurden durch Kristallisation aus Methanol mit vorsichtigem Zusatz von Wasser 2.22 g chromatographisch *reines PHN* erhalten. Das uncharakteristische *1f* wurde verworfen.

Bei der Chromatographie von *1b* an Sephadex G-25 mit Methanol/Wasser (1:4) wurde im UV-Durchflußschreiber das ziemlich scharfe Auftreten von Einzelkomponenten (*1b<sub>1</sub>*–*1b<sub>6</sub>*) beobachtet (Abb. 1). Die Auftrennung konnte dünnschichtchromatographisch (auf Kieselgel G mit Essigester/Methanol = 1:1) bestätigt werden, wenn auch die  $R_F$ -Unterschiede der bis zu dieser Stufe zusammen angereicherten Substanzen klein sind.

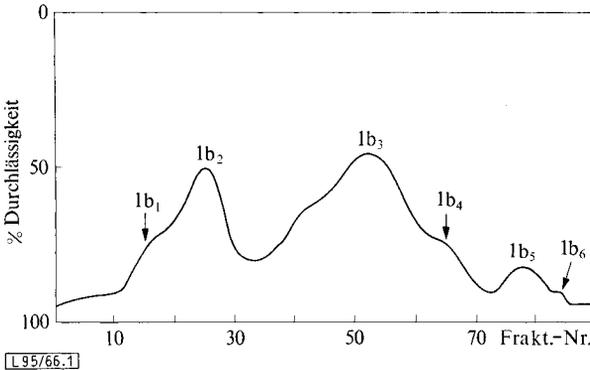


Abbildung 1. Auftrennung der Substanz *1b* (Schema 1) an Sephadex G-25 mit Methanol/Wasser (1:4)

Registrierung mit dem Uvicord-Durchflußschreiber bei  $\lambda = 254 \text{ m}\mu$ .

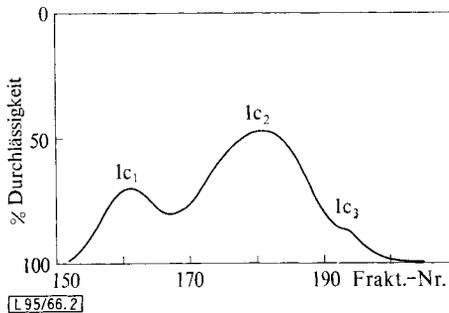
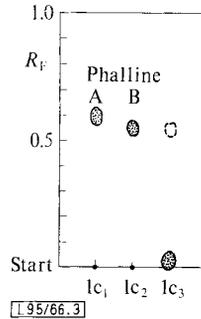


Abbildung 2. Auftrennung der Substanz *1c* (Schema 1) an Sephadex G-25 mit 0.2-proz. wäßriger  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung

Registrierung mit dem Uvicord-Durchflußschreiber bei  $\lambda = 254 \text{ m}\mu$ .

Ein weniger vielfältiges Bild bot die Chromatographie von *Ic* an Sephadex G-25 in 0,2-proz. wäßriger  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung. Wie Abbildung 2 zeigt, erhielt man dabei im wesentlichen zwei Substanzen ( $1c_1$  und  $1c_2$ ), die dünn-schichtchromatographisch einheitlich waren (Abb. 3).  $1c_1$  wurde als Phallin A,  $1c_2$  als Phallin B bezeichnet. Dieselben Substanzen erhielten wir bei der analogen Chromatographie der Mischung von Fraktionen  $1b_2-1b_4$ .

Abbildung 3  
Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G,  
Essigester/Methanol = 1 : 1) der  
Fraktionen  $1c_1-1c_3$  von Abb. 2  
Markierung mit Chlor/*o*-Toluidin.



*Phallin A* gibt keine Ninhydrin-Reaktion, reagiert nicht mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol und wandert, unabhängig vom pH-Wert, bei der Papierelektrophorese nicht. Es zeigt das UV-Spektrum des Phenylalanins und zerfällt bei der Säurehydrolyse in Alanin (1 Mol), Glycin (1 Mol), Prolin (1 Mol), Phenylalanin (2 Mol) und Valin (1 Mol). Demnach dürfte es sich um ein cyclisches Hexapeptid handeln. Es besitzt keine toxische Wirkung.

*Phallin B* zeigt Giftwirkung ( $\text{LD}_{50} = 15 \text{ mg/kg}$  weiße Maus) und das UV-Spektrum der Phalloin-Gruppe ( $\lambda_{\text{max}} = 292 \text{ m}\mu$ , Indol-Typ)<sup>10</sup>. Es ist neutral, Ninhydrin-negativ und gibt mit Zimtaldehyd/HCl die blaue Farbreaktion. Bei der Hydrolyse mit Säure entstehen die Aminosäuren Cystein,  $\gamma$ -Hydroxy-leucin, Phenylalanin, Prolin, Threonin und Alanin (wahrscheinlich doppelte Menge). Beim Behandeln mit 50-proz. Trifluoressigsäure entsteht aus Phallin B unter Spaltung einer Peptid-Bindung eine elektrophoretisch bei pH 6.5 zur Kathode wandernde *seco*-Verbindung, deren Bildung auf die Existenz der  $\gamma$ -Hydroxyaminosäure zurückzuführen ist. Wie PHD gibt Phallin B bei der Behandlung mit Raney-Nickel unter Ersatz der Schwefel-Brücke durch Wasserstoff eine Desthio-Verbindung, die das UV-Spektrum des Tryptophans aufweist. Es dürfte sich beim Phallin B um eine bicyclische Verbindung handeln, die vielleicht vom PHN nur durch den Ersatz von Hydroxyprolin durch Prolin und von Valin durch Phenylalanin verschieden ist. Seine Konzentration im Pilz ist so gering, daß es nicht einmal im Papierchromatogramm des stark angereicherten Primärmaterials (PM I) zu sehen ist. In Butanon/Aceton/Wasser (60:6:10) muß es, seinem  $R_F$ -Wert (0.70) nach, in der Gegend von PHN auftreten.

<sup>10</sup> Siehe bei *Th. Wieland*, *Helv. chim. Acta* **44**, 919 (1962).

## Beschreibung der Versuche

Der Aufarbeitungsgang von Primärgift (PM I und PM II) zu den Phallinen A und B geht aus Schema 1 (S. 175) hervor.

*Chromatographie an Aluminiumoxid* (Schema 1, Stufe 4): 87 g der von früheren Aufarbeitungen<sup>5-7)</sup> stammenden rasch wandernden, PHN-armen Fraktionen wurden in Portionen von 22 g an einer Säule (17 × 95 cm) von 17 kg Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Giulini, annähernd neutral, Aktiv.-Stufe I) in Methanol/Benzol (1 : 1) unter automatischer Sammlung von je 250 ccm chromatographiert. (Eine Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Säule kann zweimal benutzt werden.) Entsprechende Fraktionen wurden nach dem Papierchromatogramm (Butanon/Aceton/Wasser = 30 : 3 : 5; Markierung mit Zimtaldehyd/HCl) vereinigt. Man erhielt nach dem Abdampfen der Lösungsmittel die *Fractionen I—III* (20.5 bzw. 2.44 bzw. 9.6 g).

*Chromatographie an Kieselgel* (Schema 1, Stufe 5): 20.5 g *Fraktion I* wurden in 60 ccm Methanol/Essigester (1:1) gelöst und an einer Säule (10 × 50 cm) von 1.7 kg Kieselgel (Merck, zur Chromatographie, 0.2–0.5 mm) chromatographiert. Eluiert wurde mit demselben Gemisch. Man fing Fraktionen von je 220 ccm auf. Nach der 32. Fraktion wurde weiter mit Methanol/Essigester (3 : 1) eluiert. Laut dem Ergebnis der Papierchromatographie wurden entsprechende Fraktionen (vgl. Schema 1) vereinigt. Man erhielt nach dem Abdampfen i. Vak. die Substanzen bzw. Substanzgemische *1a* (9.5 g Öl), *1b—1e* (1.7 bzw. 0.7 bzw. 1.5 bzw. 3.3 g, hellbraune Pulver) und *1f* (0.3 g, verworfen).

*Chromatographie an Sephadex* (vgl. Schema 1): *Sephadex G-25 M* (Pharmacia, Uppsala) wurde nach 12stdg. Quellung mit Methanol/Wasser (1 : 4) bzw. 0.2-proz. wäbr. NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung in die Chromatographierohre (4 × 100 bzw. 200 cm) eingeschlämmt und mit mehreren Litern des gleichen Lösungsmittels gewaschen. (Eine Säule von 4 × 100 cm vermochte 100–200 mg Substanz befriedigend aufzutrennen und konnte 5–10mal benutzt werden.) Dann gab man die Lösung von 1.7 g *1b* bzw. von 0.7 g *1c* in möglichst wenig Lösungsmittel auf und eluierte mit Methanol/Wasser (bei *1b*) bzw. mit der NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung (bei *1c*). Das Eluat wurde mit dem Durchflußgerät Uvicord (LKB, Stockholm) bei 254 m $\mu$  laufend registriert, während gleichzeitig Fraktionen von 15 ccm automatisch aufgefangen wurden. Nach dem Abdampfen der sinngemäß vereinigten Fraktionen i. Vak. wurden die Rückstände in wasserfreiem Methanol aufgenommen. Reste von Dextran oder NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> wurden abzentrifugiert und die klaren Lösungen wieder i. Vak. eingetrocknet: Substanzen *1b<sub>1</sub>—1b<sub>6</sub>* bzw. *1c<sub>1</sub>* (*Phallin A*), *1c<sub>2</sub>* (*Phallin B*) und *1c<sub>3</sub>* (verworfen). Aus den Substanzgemischen *1b<sub>2</sub>—1b<sub>4</sub>* (200 mg) erhält man bei erneuter Trennung an Sephadex G-25 M, wie voranstehend, aber mit 0.2-proz. wäbr. NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung, die reinen *Phalline A* (100 mg) und *B* (80 mg).

*Phallin A*. — Ausbeute aus 87 g PHN-armen Giftfraktionen: *1c<sub>1</sub>* = 34 mg, aus *1b<sub>2</sub>—1b<sub>4</sub>* = 100 mg farbloses Pulver. — *UV-Spektrum*:  $\lambda_{\max}$  = 258 m $\mu$  (entspr. Phenylalanin);  $R_F$  = 0.58 (Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel mit Methanol/Essigester = 1 : 1); Reaktion mit tert.-Butylhypochlorit positiv, reagiert aber weder mit Zimtaldehyd/HCl noch mit Ninhydrin. Im Elektropherogramm findet keine Wanderung bei pH 1.9–6.5 statt. Im Mäusetest ist *Phallin A* mit 20 mg/kg ungiftig.

Bei der *Totalhydrolyse* mit 6*n* HCl (110°/15 Stdn.) entstanden (mit dem Bender-Hobein-Analysator bestimmt) *Phenylalanin* (1.83 Mol), *Valin* (1.03 Mol), *Prolin* (1.11 Mol), *Alanin* (0.99 Mol) und *Glycin* (1.03 Mol).

*Phallin B.* — Ausbeute aus 87 g PHN-armen Giffractionen:  $1c_2 = 75$  mg, aus  $1b_2 - 1b_4 = 80$  mg farbloses Pulver. Typisches PHD-UV-Spektrum:  $\lambda_{\max} = 290$  m $\mu$  ( $\epsilon = 12400$ ) gegenüber  $\epsilon$  für PHD = 13500;  $R_F = 0.55$  (Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel mit Methanol/Essigester = 1 : 1); mit Zimtaldehyd/HCl blaue Farbreaktion. — *Toxizität*:  $LD_{50} = 15$  mg/kg weiße Maus.

Bei der *Totalhydrolyse* des Cyclopeptids mit  $6n$  HCl ( $110^\circ/15$  Std.) entstanden die nicht quantitativ bestimmten Aminosäuren *Phenylalanin*, *Prolin*, *Alanin* (vorwiegend), *Threonin*, *Cystein* und  $\gamma$ -*Hydroxy-leucin*. Daneben waren Spuren anderer, wohl aus Verunreinigungen stammender Aminosäuren zugegen.

Beim Aufbewahren in 50-proz. *Trifluoressigsäure* (ca.  $20^\circ/5$  Std.) fand Spaltung einer Peptid-Bindung statt. Die *seco-Verbindung* wanderte im Papierpherogramm bei pH 6.5 zur Kathode und gab mit Ninhydrin eine violette Farbreaktion.

*Desthiophallin A.* — Es entstand aus *Phallin A* bei der Behandlung mit *Raney-Nickel*, wie bei Lit.<sup>5)</sup> beschrieben. Das Filtrat zeigte  $\lambda_{\max} = 278$  m $\mu$  (entspr. Tryptophan, das analog auch bei hydrogenolytischer Entschwefelung PHN-artiger Verbindungen entsteht).  $R_F = 0.3$  (Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel mit Methanol/Essigester = 1 : 1); rotbraune Farbreaktion mit Zimtaldehyd/HCl. [95/66]