

Über die Inhaltsstoffe des grünen Knollenblätterpilzes, LXI¹⁾

δ -Aminophalloin, ein 7-Analoges des Phalloidins, und biochemisch nützliche, auch fluoreszierende Derivate

Theodor Wieland*, Miklos Hollosi und Michael Nassal

Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung,
Jahnstraße 29, D-6900 Heidelberg

Eingegangen am 9. März 1983

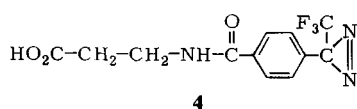
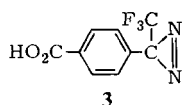
Der Tosyloxyrest des durch Tosylierung der primären Alkoholfunktion der γ,δ -Dihydroxyleucineitenkette (Aminosäure 7) des Phalloidins (**1a**) erhaltenen $O^{\delta 7}$ -Tosylphalloidins (**1b**) wird durch Ammoniak, Anilin, *p*-Hexyloxyanilin und 4'-Aminofluorescein ersetzt. δ -Aminophalloin (**1c**) dient als Ausgangssubstanz für 12 weitere Aminoderivate **1h–q** sowie die Bis(phallotoxine) **2a,b**. Die fluoreszierenden Phalloinderivate **1p,q** sind zur spezifischen Anfärbung von F-Aktin sehr gut geeignet. Toxizitäten und R_F -Werte der Aminoderivate werden in Tab. 1 angegeben.

Components of the Green Deathcap Mushroom (*Amanita phalloides*), LXI¹⁾. – δ -Aminophalloin, a 7-Analogue of Phalloidin, and Some Biochemically Useful, Including Fluorescent Derivatives

The tosyloxy group of $O^{\delta 7}$ -tosylphalloidin (**1b**) obtained by tosylation of the primary alcohol function of the γ,δ -dihydroxyleucine side chain (amino acid no. 7) of phalloidin (**1a**) is replaced by ammonia, aniline, *p*-hexyloxyaniline, or 4'-aminofluorescein. From δ -aminophalloin (**1c**) 12 new derivatives [**1h–q** and the bis(phallotoxins) **2a,b**] are prepared. The fluorescent phalloidins **1p,q** are valuable stains for visualization of F-actin. Toxicities and R_F values of the phallotoxin derivatives are indicated in Table 1.

Um das Molekül des Phalloidins (**1a**) mit einer Aminofunktion zu versehen, die für die Anknüpfung von Reporter-, Haft- und anderen Gruppen geeignet ist, wurde kürzlich die Seitenkette des γ,δ -Hydroxyleucins (Aminosäure 7) über ein Keton in ein Aminomethyldithiolan verwandelt²⁾. Zurückgreifend auf das altbekannte δ -Tosylphalloidin³⁾ (**1b**) haben wir jetzt in einer einfachen Reaktion, durch Umsetzung mit Ammoniak in Methanol, [7-(2,5-Diamino-4-hydroxy-4-methylvaleriansäure)]Phalloidin (= $C^{\delta 7}$ -Aminophalloin) (**1c**) hergestellt. Da sich diese Verbindung formal durch Substitution eines Wasserstoffatoms der Methylgruppe (= $C^{\delta 7}$) des Phalloins (**1d**) herleitet, nennen wir sie δ -Aminophalloin (APHN). Die Substitution des Tosyloxyrests verläuft über das γ,δ -Epoxid³⁾, das sich zunächst unter Einwirkung der Base durch intramolekulare nucleophile Substitution des δ -Tosylrests durch die γ -Hydroxygruppe bildet. Man beobachtet dünnschichtchromatographisch zuerst das Auftreten des Epoxids neben unverändertem Tosylat und dann das Verschwinden beider zugunsten der Bildung der Aminoverbindung im Verlauf einiger Stunden bei Raumtemperatur. Wird die Substitution des Tosyloxyrests mit Anilin vorgenommen, so erhält man die entsprechende Phenylaminoverbindung **1e**, mit *p*-Hexyloxyanilin den lipophilen Hexylether **1f** und mit

neuerlicher Reaktion mit **1j** das Bis(phallotoxin) **2b**. Mit dem Monomethylester der Adipinsäure wurde **1c** nach der MA-Methode zum Methylesterderivat **1l** verknüpft. Aus physiologisch-chemischem Interesse stellten wir auch das Konjugat **1m** von **1c** mit Desoxycholsäure her.



Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, ein radioaktives toxisches Derivat des Phalloidins zu erhalten, das durch eine empfindliche photolabile Gruppe eine kovalente Bindung an mögliche Phallotoxin-bindende Stellen der äußeren Membran von Gewebszellen schaffen sollte. Hierzu wurde – nicht radioaktives – **1c** mit Boc- β -Alanin zum Amid **1n** verknüpft. Nach Abspaltung des Boc-Rests wurde mit 4-(1-Azi-2,2,2-trifluorethyl)benzoesäure⁵⁾ (**3**) zu **1o** kondensiert. Dasselbe Phalloinderivat ließ sich auch durch Acylierung des Amins **1c** mit dem Amid **4** aus **3** und β -Alanin erhalten.

Schließlich haben wir die Aminogruppe in **1c** auch dazu benutzt, fluoreszierende Phallotoxinderivate herzustellen. Durch Reaktion mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) erhielt man dünnschichtchromatographisch homogenes, fluoreszierendes Phallotoxin **1p** mit hoher Affinität zu F-Aktin. Mit Tetramethylrhodamin-isothiocyanat stellten wir

Tab. 1. R_F -Werte in der Dünnschichtchromatographie und Toxizitäten der δ -Aminophalloinderivate

Nr.	R_F in Lösungsmittel ^{a)}			LD ₅₀ (mg/kg, weiße Maus)
	I	II	III	
1b	0.60	0.77	0.47	
1c	0.07	0.05	0.13	0.42 ^{b)} ≈ 20
1e	0.41			
1f	0.66	0.90	0.46	unlöslich
1g				0.50 ^{b)}
1h	0.40	0.44	0.25	≈ 5
1i	0.43	0.48	0.28	
1j	0.60	0.78	0.41	5
1k	0.10	0.03	0.03	
1l	0.55	0.58	0.36	< 5
1m	0.58	0.71	0.39	untoxisch bis 5
1n	0.60			
1o	0.61	0.70	0.35	< 5
1p	0.48	0.80		
1q, q'	{ 0.49 0.45			untoxisch bis 5
2a	0.20	0.12	0.12	untoxisch bis 5
2b	0.18	0.06	0.07	

^{a)} I = Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4), II = Ethylacetat/Methanol/Wasser (5:2:1), III = 2-Butanol/Ethylacetat/Wasser (14:12:5). – ^{b)} In Ethylacetat/Pyridin/Eisessig/Wasser (10:5:1:3).

aus **1c** ein Gemisch aus etwa zwei gleichen Teilen stark rot fluoreszierender „RH-Phallotoxine“ (**1q**, **1q'**) her, die sich im Dünnschichtchromatogramm voneinander trennten. Mit den Eluat aus den getrennten Flecken konnte festgestellt werden, daß beide gleich gut von F-Aktin gebunden werden. Deshalb erschien eine präparative Trennung für histologische Zwecke nicht nötig. Ihre Existenz verdanken die beiden Produkte der Uneinheitlichkeit des verwendeten Rhodamin-isothiocyanats (offenbar liegen Stellungsisomere vor). Die R_F -Werte in verschiedenen Lösungsmitteln und die Toxizitätswerte (tödliche Dosis für 50% der Versuchstiere. LD_{50} , in mg pro kg Körpergewicht, weiße Maus) sind in Tab. 1 angegeben. Die Aminoverbindung **1c** ist weniger giftig als die getesteten *N*-Acylverbindungen **1b**, **1j**, **1h** und **1o**. Die letztere, die den lichtempfindlichen Rest der Verbindung **3** trägt, erfüllt mit ihrer Toxizität von $LD_{50} < 5$ mg die Anforderungen an eine Markierungssubstanz für Phalloidin-bindende Strukturen. Das Doppelphallotoxin **2a** ist mit 5 mg/kg nicht toxisch. Unter der Annahme, daß es einen Membran-Carrier besetzen, aber nicht in die Leberzelle transportiert werden kann, wurde auf mögliche antitoxische Wirkung gegen Phalloidin geprüft, wobei jedoch keine Schutzwirkung festgestellt werden konnte.

Fräulein T. Miura danken wir für experimentelle Mitarbeit, Frau A. Schmitz, Ingelheim, und Herrn Dr. B. Agostini für Ausführung von Toxizitätsbestimmungen, Herrn Prof. Dr. W. König, Hamburg, für das FAB-Massenspektrum sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung einer Sachbeihilfe.

Experimenteller Teil

Abkürzungen: DC = Dünnschichtchromatographie, DMF = Dimethylformamid, MA-Methode = „Mixed-Anhydride“-Methode, PHD = Phalloidin, PHN = Phalloin, TEA = Triethylamin, TFE = Trifluoressigsäure, THF = Tetrahydrofuran.

Die im folgenden beschriebenen Substanzen wurden durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 (Merck) charakterisiert. Die verwendeten Lösungsmittel sind in Tab. 1 angegeben. Nachweis des Tryptathionteils im Phallotoxin: Besprühen mit methanolischer Zimtaldehydlösung und Behandeln mit HCl-Gas; Nachweis primärer Aminoverbindungen: Besprühen mit Ninhydrinlösung. Die R_F -Werte der einzelnen Substanzen sind Tab. 1 zu entnehmen. Die Isolierung und Reinigung sämtlicher Substanzen erfolgte durch Chromatographie an Kieselgel 60 (Merck) oder an Sephadex LH-20 (Detektion UV-absorbierender Substanzen mit einem Uvicord-II-Gerät, Fa. LKB, Stockholm).

O^{δ7}-Tosylphalloidin (**1b**): 500 mg (0.634 mmol) PHD werden in 12 ml trockenem Pyridin gelöst und bei 0°C mit 1.0 g (5.26 mmol) Toluolsulfonylchlorid versetzt. Es wird 5 h bei Raumtemp. gerührt (DC-Kontrolle, Laufmittel I). Nach dem Einengen i. Vak. wird zweimal an Kieselgel 60 mit Laufmittel I sowie an Sephadex LH-20 mit CH₃OH als Laufmittel chromatographiert. Dabei werden überschüssiges Toluolsulfonylchlorid und in geringer Menge entstandene, mehrfach tosylierte PHD-Analoga mit höherem R_F -Wert abgetrennt; Ausb. 420 mg (70%).

[7-(2,5-Diamino-4-hydroxy-4-methylvaleriansäure)]Phalloidin (δ-Aminophalloin, **1c**): 100 mg (0.106 mmol) **1b** werden bei Raumtemp. mit 2 ml 2.5 N NH₃ in CH₃OH versetzt und ca. 4–6 h gerührt, bis kein **1b** oder γ,δ-Epoxid mehr nachzuweisen ist (DC-Kontrolle in Laufmittel I, R_F -Wert des Epoxids etwas kleiner als der von **1b**). Die Lösung wird i. Vak. eingengt und an Sephadex LH-20/CH₃OH chromatographiert. Das so erhaltene, DC-einheitliche Produkt ergibt mit Nin-

hydrin eine rotviolette, mit Zimtaldehyd/HCl die bekannte blaue Färbung und wird damit sowie durch Kathodenwanderung bei der Hochspannungspapierelektrophorese (pH = 6.5) als δ -Aminophalloin identifiziert; Ausb. 49 mg (59%).

1c-(*p*-Toluolsulfonat): $C_{42}H_{57}N_9O_{13}S_2 \cdot 1.5 H_2O$ (987.1) Ber. C 51.10 H 6.13 N 12.77 S 6.50
Gef. C 51.05 H 6.45 N 12.34 S 6.72

N ^{δ} -Phenyl- δ -aminophalloin (**1e**): 14.2 mg (15.06 μ mol) **1b** werden in 200 μ l CH₃OH gelöst und nach der Zugabe von 103 mg (1.1 mmol) Anilin und 100 μ l TEA 4 h bei 60 °C, dann ca. 12 h bei Raumtemp. gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Chromatographie an Sephadex LH-20 mit 10proz. Essigsäure in Wasser; Ausb. 11 mg (85%).

N ^{δ} -(4-Hexyloxyphenyl)- δ -aminophalloin (**1f**): Zur Lösung von 18 mg (22.8 μ mol) **1b** in 3 ml CH₃OH werden 180 mg (40.8 Äquivalente) 4-Hexyloxyanilin und 6 μ l TEA gegeben. Der Ansatz wird 16 h bei Raumtemp. belassen. Dünnschichtchromatographisch (Laufmittel I) läßt sich neben überschüssigem 4-Hexyloxyanilin (R_F = 0.95), das mit Zimtaldehyd/HCl intensiv gelb wird, nur eine neues, im Vergleich zu **1b** lipophileres Produkt nachweisen, das sich nach dem Einengen des Reaktionsgemisches i. Vak. durch doppelte Chromatographie an Sephadex LH-20/CH₃OH DC-einheitlich erhalten läßt; Ausb. 17 mg (77%).

N ^{δ} -(4-Fluoresceinyl)- δ -aminophalloin (**1g**): 3.7 mg (3.9 μ mol) (**1b**) werden in 200 μ l CH₃OH und 100 μ l TEA gelöst und mit 200 mg (57.6 μ mol) Fluoresceinamin (Fa. Fluka) 3 h bei 60 °C, dann ca. 12 h bei Raumtemp. stehengelassen. Dann ist laut DC (Laufmittel I) **1b** verschwunden. Der fluoreszierende, sich mit Zimtaldehyd/HCl grün färbende Fleck besteht aus **1g**. Die mit CH₃OH daraus eluierte Substanz wird von F-Aktinfilamenten fest gebunden.

N ^{δ} -Acetyl- δ -aminophalloin (**1h**): Zur Lösung von 20 mg (25.4 μ mol) **1c** in 1 ml trockenem Pyridin werden 2.6 mg (1 Äquivalent) Acetanhydrid hinzugefügt. Nach 1stdg. Rührenlassen bei Raumtemp. wird an Sephadex LH-20/CH₃OH chromatographiert; Ausb. 20 mg (95%).

N ^{δ} -Iodacetyl- δ -aminophalloin (**1i**): 20 mg (25.4 μ mol) **1c** werden in 1 ml absol. CH₃OH gelöst und mit 7 μ l TEA sowie 36 mg (5 Äquivalente) Iodessigsäure-*N*-hydroxysuccinimidester⁶⁾ versetzt. Nach 6 h bei Raumtemp. ist die Umsetzung vollständig (DC-Kontrolle in Laufmittel I). Das Reaktionsgemisch wird direkt an Sephadex LH-20/CH₃OH chromatographiert; Ausb. 19 mg (78%).

N ^{δ} -[5-[(4-Nitrophenyl)oxycarbonyl]pentanoyl]- δ -aminophalloin (**1j**): Die Lösung von 50 mg (63.5 μ mol) **1c** in 2 ml DMF wird mit 124 mg (317.5 μ mol) Adipidinsäure-bis(4-nitrophenylester) sowie 10 μ l TEA versetzt und 16 h bei Raumtemp. gerührt. Dünnschichtchromatographisch ist neben 4-Nitrophenol und nicht umgesetztem Adipinsäure-bis(4-nitrophenylester) eine weitere Verbindung nachzuweisen [$R_F(I)$ = 0.60], die mit Ammoniakdämpfen eine Gelbfärbung (durch 4-Nitrophenol) ergibt, jedoch als einzige auch mit Zimtaldehyd/HCl zur typischen Blaufärbung der Phallotoxine führt. Nach dem Einengen des Reaktionsgemisches wird über Sephadex LH-20/CH₃OH chromatographiert; Ausb. 48 mg (73%).

N ^{δ} -[5-[2-(2-Aminoethoxy)ethyl]aminocarbonylpentanoyl]- δ -aminophalloin (**1k**): Zu 15 mg (14.5 μ mol) **1j**, gelöst in 1 ml DMF, gibt man eine Lösung von 4.5 mg (43.5 μ mol) Bis(2-aminoethyl)ether – hergestellt durch Ausethern einer alkalisch gemachten wäßrigen Lösung des Dihydrochlorids – in 500 μ l THF und rührt 16 h bei Raumtemp. Danach wird an Sephadex LH-20/CH₃OH chromatographiert. Die gewünschte Aminoverbindung gibt sich bei der DC durch violette Färbung mit Ninhydrin und blaue Färbung mit Zimtaldehyd/HCl zu erkennen. Daneben wird in geringer Menge ein Produkt erhalten, das mit dem unten beschriebenen Dimeren **2a** übereinstimmt; Ausb. 11 mg (74%).

N^δ-[5-(Methoxycarbonyl)pentanoyl]-δ-aminophalloin (**1l**): 4 mg (25.0 μmol) Adipinsäuremonomethylester werden in 1 ml THF gelöst, mit 3.5 μl TEA neutralisiert und bei -15 °C 8 min mit 3 μl (23.0 μmol) Chlorameisensäure-isobutylester gerührt. Dazu gibt man eine Lösung von 10 mg (12.7 μmol) **1c** in 300 μl DMF. Anschließend wird die Kühlung entfernt. Bereits nach 15 min ist **1c** vollständig umgesetzt (DC-Kontrolle). Chromatographie an Kieselgel 60 mit Laufmittel I sowie an Sephadex LH-20/CH₃OH führt zu einheitlichem **1l**; Ausb. 8 mg (68%).

N^δ-Desoxycholy-δ-aminophalloin (**1m**): Die Lösung von 15.8 mg (38.1 μmol) Natrium-desoxycholat in 1 ml THF wird mit 4.6 μl (35.0 μmol) Chlorameisensäure-isobutylester bei -15 °C 8 min gerührt. Anschließend gibt man eine Lösung von 15 mg (19.05 μmol) **1c** in 500 μl DMF zu, entfernt die Kühlung und rührt 2 h bei Raumtemp. Durch zweimalige Chromatographie an Sephadex LH-20/CH₃OH wird **1m** DC-einheitlich erhalten; Ausb. 16 mg (72%).

N^δ-(Boc-β-Alanyl)-δ-aminophalloin (**1n**): 20 mg (25.4 μmol) **1c** werden in 500 μl DMF gelöst und mit 10 μl TEA sowie einer Lösung von 36.4 mg (5 Äquivalente) Boc-β-Alanin-*N*-hydroxysuccinimidester in 500 μl THF versetzt. Nach 16stdg. Rührenlassen bei Raumtemp. ist laut DC (Laufmittel I) kein **1c** mehr nachzuweisen, dafür neben Boc-β-Ala-OSu (*R*_F = 0.90) ein weiteres Produkt (*R*_F = 0.6), das nach einigen min bei 110 °C mit Ninhydrin eine rotviolette Färbung ergibt, jedoch als einziges mit Zimtaldehyd/HCl zur charakteristischen Blaufärbung der Phallotoxine führt. Der Ansatz wird i. Vak. eingengt und an Sephadex LH-20/CH₃OH chromatographiert; Ausb. 20.3 mg (83%).

N^δ-[4-[(1-Azi-2,2,2-trifluorethyl)benzoyl]-β-alanyl]-δ-aminophalloin (**1o**): a) 15 mg (15.6 μmol) **1n** werden zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe 10 min bei Raumtemp. mit 500 μl TFE/CH₂Cl₂ (1:1) behandelt. Die DC zeigt anstelle von **1n** ein neues Produkt mit *R*_F = 0.10 in Laufmittel I. Der Ansatz wird dreimal mit je 5 ml Toluol i. Vak. eingengt, der Rückstand in 1 ml absol. CH₃OH aufgenommen und der pH-Wert mit TEA auf 7.5 gebracht (Tüpfelreaktion auf angefeuchtetem Indikatorpapier). Dann werden 25.5 mg (5 Äquivalente) 4-(1-Azi-2,2,2-trifluorethyl)benzoesäure-*N*-hydroxysuccinimidester⁵⁾ hinzugefügt. Der Ansatz wird ca. 12 h gerührt, dann an Sephadex LH-20/CH₃OH chromatographiert; Ausb. 12.5 mg (80%).

b) 5.7 mg (19.05 μmol) des δ-Alaninkonjugats **4** (nachfolgende Vorschrift) werden in 200 μl THF gelöst, mit 2.7 μl TEA neutralisiert und mit 2.4 μl (18.0 μmol) Chlorameisensäure-isobutylester 8 min bei -15 °C gerührt. Dazu gibt man eine Lösung von 10 mg (12.7 μmol) **1c** in 200 μl DMF, entfernt die Kühlung und rührt noch 2 h bei Raumtemp. Nach dem Einengen i. Vak. wird das Reaktionsgemisch an Sephadex LH-20/CH₃OH chromatographiert; Ausb. 10 mg (79%).

Die nach a) und b) gewonnenen Verbindungen lassen sich dünnschichtchromatographisch sowie in ihren UV/VIS-Spektren nicht unterscheiden. Mit den bekannten Extinktionskoeffizienten für PHD bei 280 nm (*ε* = 10800) und **4** bei 280 (*ε* = 1500) und 350 nm (*ε* = 420) läßt sich zeigen, daß in beiden Verbindungen der Phalloidin- und der Diazirin-Chromophor im Verhältnis 1:1 vorliegen.

N-[4-(1-Azi-2,2,2-trifluorethyl)benzoyl]-β-alanin (**4**): 9 mg (100 μmol) β-Alanin werden in 100 μl 1 *N* NaOH gelöst und mit einer Lösung von 34 mg (104 μmol) des *N*-Hydroxysuccinimidesters von **3** in 400 μl CH₃OH 8 h bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wird an Kieselgel 60 mit CHCl₃/CH₃OH/AcOH (95:5:3) getrennt (*N*-Hydroxysuccinimidester von **3**: *R*_F = 0.90; **4**: *R*_F = 0.28; *N*-Hydroxysuccinimid: *R*_F = 0.10). Beim Eindampfen einer methanolischen Lösung fällt die Verbindung als farblose Nadelchen an; Ausb. 24 mg (80%); Schmp. 124 °C. - ¹H-NMR ([D₆]Aceton): δ = 8.00 und 7.34 (je 2H, AA'BB'-System, aromat. H), 3.60 (t, 2H), 2.64 (t, 2H). UV/VIS: λ_{max} (*ε*) = 234 (18000), 350 nm (420), langwellige Schulter um 365 nm,

kurzwellige Schulter um 336 nm. – MS: m/z = 273 (M^+ – N_2 , 70%), 185 (100%), 184 (25%), 157 (35%).

$C_{12}H_{10}F_3N_3O_3$ (301.2) Ber. C 47.85 H 3.35 N 13.95 Gef. C 48.00 H 2.96 N 13.92

C^{67} -[N' -(4-Fluoresceinyl)thioureido]phalloin (**1p**): 20 mg (25.4 μ mol) **1c** und 20 mg (51.4 μ mol) Fluorescein-isothiocyanat (Fa. Serva) werden in 500 μ l absol. CH_3OH gelöst und mit 10 μ l TEA versetzt. Nach 7stdg. Rührenlassen bei Raumtemp. ist dünnschichtchromatographisch (Laufmittel I) kein **1c** mehr nachzuweisen. Neben nicht umgesetztem Fluorescein-isothiocyanat (R_F = 0.72) sind neue Flecken bei R_F = 0.68, 0.50, 0.38 und 0.31 zu erkennen. Nur die Verbindung mit R_F = 0.38 ergibt mit Zimtaldehyd/HCl eine grüne Färbung (Mischfarbe aus dem Gelb des Fluorescein- und dem Blau des Phallotoxin-Anteils). Durch Chromatographie an Kieselgel 60 mit Laufmittel I und Sephadex LH-20/ CH_3OH wird **1p** rein erhalten; Ausb. 21 mg (75%).

C^{67} -[N' -(Tetramethylrhodaminyl)thioureido]phalloin (**1q** und **1q'**): 20 mg (25.4 μ mol) **1c** werden in 1 ml CH_3OH/C_2H_5OH (1:1) gelöst und mit 20 mg (45.1 μ mol) Tetramethylrhodamin-isothiocyanat sowie 10 μ l TEA 16 h bei Raumtemp. gerührt. Dabei bildet sich ein tief rotvioletter Niederschlag. Dünnschichtchromatographisch lassen sich 2 Hauptprodukte (R_F -Werte in Laufmittel I: 0.49 und 0.54) erkennen, daneben eine Vielzahl weiterer rot fluoreszierender, lipophiler Verbindungen (abhängig vom eingesetzten Isothiocyanat; am besten bewährte sich das Produkt der Fa. Becton und Dickinson, Wieblingen bei Heidelberg). Die Isolierung der beiden Hauptprodukte gelingt durch Chromatographie an Kieselgel 60 mit Laufmittel I (in dem auch der Niederschlag sehr gut löslich ist) und nachfolgende Gelfiltration über Sephadex LH-20/ CH_3OH . Eine kleine Menge des Gemisches aus **1q** und **1q'** wurde durch präparative DC getrennt, und beide Verbindungen wurden einzeln auf ihre Tauglichkeit zur Aktinanfärbung überprüft. Dabei war kein Unterschied festzustellen, so daß auf eine Trennung von **1q** und **1q'** verzichtet wurde; Ausb. 23 mg (74%).

$N^{\delta}, N^{\delta'}$ -Adipoylbis[δ -aminophalloin] (**2a**): a) Zur Lösung von 10 mg (9.65 μ mol) **1j** und 10 mg (12.7 μ mol) **1c** in 1 ml DMF werden 5 μ l TEA gegeben. Nach 16 h bei Raumtemp. wird das gelbe Reaktionsgemisch durch Chromatographie an Sephadex LH-20/ CH_3OH getrennt. Dabei wird vor nicht umgesetztem **1c** ein neues Produkt (R_F in Laufmittel I: 0.20) eluiert, das weder mit Ammoniakdämpfen die bei **1j** beschriebene gelbe, noch mit Ninhydrin die rotviolette Färbung von **1c** ergibt, mit Zimtaldehyd/HCl jedoch die charakteristische blaue Farbreaktion der Phallotoxine zeigt; Ausb. 11.5 mg (71%). – Im Massenspektrum (Fast Atom Bombardement, FAB) tritt sehr deutlich der Peak mit der Masse $M + H^+$ = 1685 auf ($C_{76}H_{104}N_{18}O_{22}S_2$, ber. 1685.9).

b) 15 mg (19.05 μ mol) **1c** und 3.7 mg (9.5 μ mol) Adipinsäure-bis(4-nitrophenylester) werden in 200 μ l DMF und 200 μ l THF gelöst, die Lösung wird nach Zugabe von 5 μ l TEA 16 h bei Raumtemp. gerührt. Danach enthält das Reaktionsgemisch neben **1j** ein dünnschichtchromatographisch mit dem unter a) beschriebenen Dimeren **2a** übereinstimmendes Produkt, das durch Gelfiltration über Sephadex LH-20/ CH_3OH rein erhalten wird; Ausb. 7.9 mg (49%).

c) Zur Lösung von 10 mg (12.7 μ mol) **1c** in 1 ml trockenem Pyridin gibt man bei 0°C 1.16 mg (6.35 μ mol) Adipinsäuredichlorid, gelöst in 200 μ l THF. Nach 5 h wird der Ansatz i. Vak. eingengt und über LH-20/ CH_3OH chromatographiert, wobei man dasselbe Produkt wie unter a) und b) beschrieben erhält; Ausb. 5 mg (47%).

d) Die Lösung von 0.925 mg (6.35 μ mol) Adipinsäure und 1.4 μ l (12.7 μ mol) *N*-Methylmorpholin in 200 μ l THF wird bei –15°C mit 1.65 μ l (12.7 μ mol) Chlorameisensäure-isobutylester versetzt und 8 min bei dieser Temp. gerührt. Dazu gibt man eine Lösung von 10 mg (12.7 μ mol) **1c** in 200 μ l DMF, entfernt die Kühlung und läßt noch 3 h rühren. Das Reaktionsgemisch wird durch Gelfiltration über Sephadex LH-20/ CH_3OH getrennt. Auch hier wird zuerst eine Verbindung

eluiert, die mit den nach den Methoden a), b) und c) erhaltenen Produkten laut DC identisch ist; Ausb. 6.2 mg (58%).

$N^{\delta},N^{\delta'}$ -[Oxydiethylendiiminobis(adipoyl)]bis(δ -aminophalloin) (**2b**): Zur Lösung von 10 mg (9.8 μ mol) **1k** in 1 ml Methanol gibt man 10 mg (9.7 μ mol) **1j** sowie 3 μ l TEA und rührt ca. 12 h bei Raumtemp. Anschließend wird das Reaktionsgemisch an Sephadex LH-20/CH₃OH chromatographiert. Dabei wird zuerst das Dimere eluiert (nach DC identisch mit dem bei der Synthese von **1k** beschriebenen Nebenprodukt), es folgen etwas **1k** sowie der Methylester **1l**, der sich durch Umsetzung des 4-Nitrophenylesters **1j** mit dem als Lösungsmittel verwendeten CH₃OH gebildet hat; Ausb. 10.6 mg (57%).

¹⁾ LX. Mitteilung: Th. Wieland, Ch. Götzendörfer, J. Dabrowski, W. N. Lipscomb und G. Shoham, *Biochemistry* **22**, 1264 (1983).

²⁾ Th. Wieland, A. Deboben und H. Faulstich, *Liebigs Ann. Chem.* **1980**, 416.

³⁾ Th. Wieland und D. Rehbinder, *Liebigs Ann. Chem.* **670**, 149 (1963).

⁴⁾ E. Wulf, A. Deboben, F. A. Bautz, H. Faulstich und Th. Wieland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4498 (1979).

⁵⁾ M. Nassal, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1510.

⁶⁾ M. Wilchek und D. Givol, *Methods Enzymol.* **46**, 153 (1977), dort S. 157.

[62/83]