

Über die Inhaltsstoffe des grünen Knollenblätterpilzes, XXXIII¹⁾

Die Konstitution von Amanin und Phallisin

von Ulrich Gebert, Theodor Wieland und Hans Boehringer

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

Eingegangen am 21. Dezember 1966

Amanin (4) gehört aufgrund seines Molekülbaus und seiner toxikologischen Eigenschaften zur Klasse der Amanitine und unterscheidet sich vom β -Amanitin lediglich durch das Fehlen der Hydroxylgruppe in 6-Stellung des UV-chromophoren Indol-Systems. Phallisin (9) besitzt dasselbe Ringgerüst wie Phalloin und Phalloidin, enthält aber in seinem bicyclischen Peptidverband anstelle des γ - bzw. des γ - und δ -hydroxylierten Leucin-Bausteins das bisher unbekannte γ . δ . δ' -Trihydroxy-leucin (8).

In der vorhergehenden Abhandlung dieser Reihe¹⁾ wurde unter anderem die Entdeckung, Isolierung und Charakterisierung der beiden Nebentoxine Amanin und Phallisin aus *Amanita phalloides* geschildert. Im folgenden soll über die Aufklärung ihrer Konstitution berichtet werden.

Amanin²⁾ (4)

Das bei der Papierelektrophorese im neutralen Puffer zur Anode wandernde, also saure Amanin zeigt Merkmale der Phalloidine, wirkt aber im toxikologischen Mäuse-test wie ein Vertreter der Amanitine, d. h. in kleiner Dosis ($LD_{50} = 0.5 \text{ mg/kg}$) innerhalb von 3–4 Tagen. Aufgrund seines UV-Spektrums (a in Abb. 1) könnte man hingegen vermuten, daß es weder zu dieser noch zu jener Toxingruppe gehört. So liegt sein Absorptionsmaximum bei 289 $m\mu$ kürzerwellig als das der Phalloidine (b) und Amanitine (c in Abb. 1). Darüber hinaus fällt besonders im Vergleich mit dem Phalloidin-Spektrum der ungliederte Verlauf seiner Absorptionskurve auf. Vom Amanitin unterscheidet es sich außerdem durch das Ausbleiben einer bathochromen Verschiebung seines Absorptionsmaximums bei Zusatz von Laugen³⁾.

Wir wurden in der Annahme, daß man es auch hier mit einer den bisher bekannten Pilz-Peptiden analog gebauten Verbindung zu tun habe, durch das Ergebnis der hydrogenolytischen Desulfurierung mit Raney-Nickel bestärkt. Hierbei entstand unter

1) 32. Mitteilung: Th. Wieland, D. Rempel, U. Gebert, A. Buku und H. Boehringer, Liebigs Ann. Chem. 704, 226 (1967).

2) Vgl. Th. Wieland, Pure appl. Chem. 9, 145 (1964).

3) Th. Wieland und U. Gebert, Liebigs Ann. Chem. 700, 157 (1966).

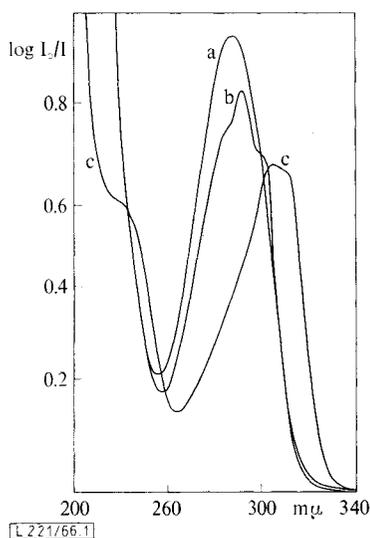


Abbildung 1

Absorptionsspektren (in Methanol) von
 a: Amanin ($\epsilon = \text{ca. } 9500$), b: Phalloidin ($\epsilon = \text{ca. } 12000$) und c: α -Amanitin ($\epsilon = \text{ca. } 11900$)
 Die Konzentrationen sind so eingestellt, daß die Spektren gut getrennt sichtbar sind.

den früher⁴⁾ für Phalloidin gewählten Bedingungen aus Amanin ein Ninhydrin-negatives Desthioamanin, das das Indol-Spektrum des Tryptophans aufweist. Somit war auch für Amanin die Verknüpfung eines Schwefel-Atoms mit dem Indol-Ring bewiesen. Ein chemischer Beweis für die 2-Position des Aromaten als Verknüpfungsstelle wurde aus dem Ergebnis der Totalhydrolyse des Amanins erhalten.

Bausteine

Nach 15stündiger Salzsäurehydrolyse von Amanin findet man folgende Aminosäuren: Asparaginsäure, Glycin, Hydroxyprolin, Isoleucin, γ, δ -Dihydroxy-isoleucin sowie in geringerer Menge β -[Oxindolyl-(3)]-alanin (**1**), Cystein und Cysteinsäure. Mit Ausnahme des aromatischen Bausteins sind dies die Hydrolyseprodukte des β -Amanitins³⁾. Das durch quantitative Aminosäureanalyse ermittelte Molverhältnis Asp : Gly : Ile beträgt 1 : 2 : 1 wie bei den Amanitinen.

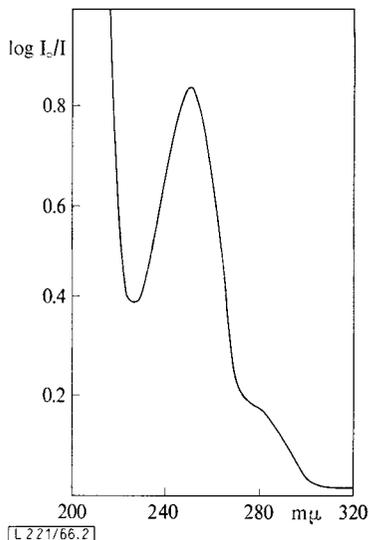
Bei gleichartiger Hydrolyse des Phalloidins tritt bekanntlich⁵⁾ β -Oxindolyl-alanin (**1**) als einziges Spaltprodukt des chromophoren Systems auf und kann daher direkt in dem Aminosäuregemisch UV-spektroskopisch nachgewiesen werden. Beim Amanin hingegen, wo es in etwas geringerer Menge neben wenig *Tryptophan* gebildet wird, mußte zu seiner exakten Identifizierung eine Trennung der Aminosäuren vorangehen. Diese gelang vorteilhaft mit einem 3-Stunden-Hydrolysat durch Adsorptionschromatographie an Sephadex G-25 in Wasser, wobei die nicht-aromatischen Aminosäuren zuerst, dann **1** und zuletzt Tryptophan die Säule verließen.

⁴⁾ Th. Wieland und G. Schmidt, Liebigs Ann. Chem. **577**, 215 (1952).

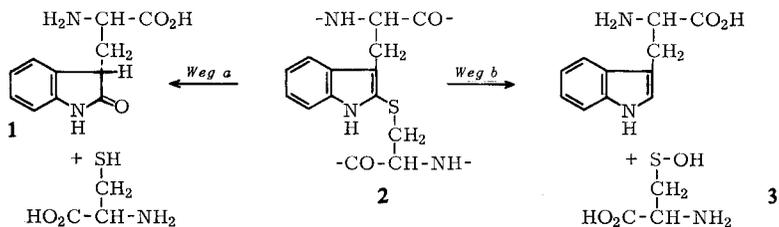
⁵⁾ Th. Wieland und W. Schön, Liebigs Ann. Chem. **593**, 157 (1955).

Die Identifizierung der Oxoverbindung **1** (Abb. 2) und des Tryptophans geschah durch UV-Spektroskopie und papierchromatographischen Vergleich.

Abbildung 2
Absorptionsspektrum (in Wasser) von
 β -[Oxindolyl-(3)]-alanin (**1**) aus Amanin-Hydrolysat
Unbestimmte Einwaage.



Bei der sauren Hydrolyse des Amanins wird, wie die Bruchstücke zeigen, die 2-Thioäther-Brücke des Tryptathionins **2** auf zweierlei Weise gespalten: Das Proton greift sowohl am Schwefel [Bildung von Cystein und **1**; *Weg a*] als auch am C-2 des Indol-Rings an [Bildung von Tryptophan und Cysteinsulfensäure (**3**), die zu Cysteinsäure und Cystin disproportioniert; *Weg b*]*).



Beim Phalloidin, das den Chromophor (**2**) enthält, und bei den synthetischen Indolyl-(2)-thioverbindungen⁶⁾ findet die Säurehydrolyse fast ausschließlich nach *Weg a* statt; das gleichzeitige Auftreten der anderen Spaltungsweise (*Weg b*) sowohl beim Amanin als

*¹⁾ Zusatz bei der Korrektur (9. 5. 1967): Nach Versuchen von Dr. H. Faulstich ist es wahrscheinlich geworden, daß die Schwefelbrücke im Amanin in oxydierter Form (Sulfoxid oder Sulfon) vorliegt, was einige schwer verständliche Beobachtungen plausibler macht. Eine ausführliche Publikation erfolgt zu gegebener Zeit.

⁶⁾ Th. Wieland, O. Weiberg, W. Dilger und E. Fischer, Liebigs Ann. Chem. **592**, 69 (1955).

auch bei den Amanitinen, wo sie sogar den Vorrang gewinnt³⁾, hat seine noch ungeklärte Ursache entweder in der andersartigen molekularen Umgebung des aromatischen Systems in den aus den Amanitin-Bausteinen aufgebauten Cyclopeptiden oder in einer Divergenz des Chromophors (vgl. Anmerkung auf S. 229).

Das ungiftige *Desthioamanin* lieferte nach 3ständiger Säurehydrolyse nur noch Tryptophan als aromatischen Baustein. Anstelle von Cystein fanden wir Alanin im Hydrolysat.

Obwohl diese Befunde für die Tryptathionin-Struktur **2** des Chromophors im Amanin sprachen, stand dem immer noch die Diskrepanz zwischen den UV-Spektren von Amanin und Phalloidin (Abb. 1) entgegen. Hier ergab sich weitgehende Übereinstimmung durch Übergang in ein anderes Lösungsmittel (Abb. 3). In Solventien wie Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder Tetramethylharnstoff, die Wasserstoffbrücken aufsprengen, erfährt das UV-Spektrum des Amanins nämlich eine Änderung, die darin besteht, daß im ansteigenden und abfallenden Teil der Absorptionskurve Schultern wie im Phalloidin-Spektrum zutage treten; ferner ist das Maximum von 289 nach 292 m μ verschoben.

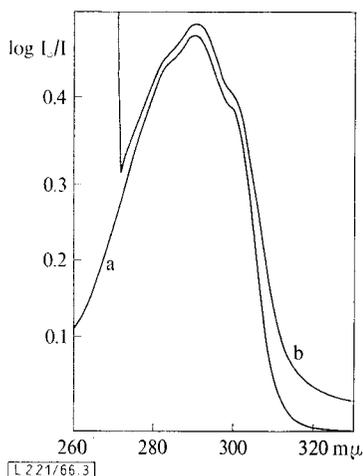


Abbildung 3
Absorptionsspektren von
a: Phalloidin in Wasser
b: Amanin in Tetramethylharnstoff

Der Amanin-Chromophor entpuppte sich damit als zumindest sehr nahe verwandt mit dem des Phalloidins.

Reihenfolge der Aminosäuren

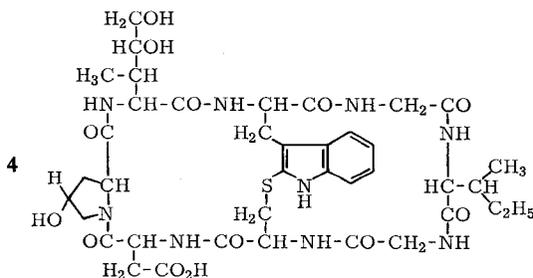
Das für die Sequenzanalyse nach *Edman*⁷⁾ erforderliche lineare Octapeptid stellten wir aus *Desthioamanin* (S. 228) durch Hydrolyse der bevorzugt spaltbaren, von der Carboxylgruppe der lactonisierenden Aminosäure ausgehenden Peptidbindung her.

⁷⁾ P. Edman, Acta chem. scand. **4**, 283 (1950); **7**, 700 (1953).

Dazu war 80-proz. Trifluoressigsäure (bei 20°) nötig, da die zur Lacton-Bildung führende, Protonen-katalysierte Abspaltung der γ -ständigen Hydroxyl-Funktion von einem sekundären C-Atom schwieriger verläuft als beim tertiären Kohlenstoff der Phalloidin-Seitenkette; dort genügt schon 50-proz. Trifluoressigsäure zur Partialhydrolyse.

Das so erhaltene *seco-Desthioamanin* konnte als lineares Peptid stufenweise (in der Papierstreifenmodifikation⁸⁾) abgebaut werden. Dabei fielen die dünn-schichtchromatographisch identifizierten Phenylthiohydantoine der Aminosäuren in folgender Reihenfolge an: Tryptophan, Glycin, Isoleucin, Glycin, Alanin (entstanden aus dem ursprünglichen Cystein durch Nickel-Hydrogenolyse), Asparaginsäure und Hydroxyprolin. Außer diesen 7 Aminosäuren mußte noch das γ,δ -Dihydroxy-isoleucin eingesetzt werden, an dessen Carboxylgruppe die Aufspaltung des Desthioamanins zur Secoverbindung erfolgt war, und das demzufolge das Carboxylende des Octapeptids bildete.

Die voranstehend geschilderten Ergebnisse zusammenfassend, ergibt sich für Amanin die Struktur 4 (vgl. jedoch Zusatz bei der Korrektur, S. 229). Amanin ist folglich nahe verwandt mit β -Amanitin³⁾. Der einzige Unterschied besteht im Fehlen der 6-ständigen Hydroxylgruppe am Indol-Ring.



Phallisin (9)

Dieses Nebentoxin¹⁾ weist physikalisch, chemisch und toxikologisch mit den Giftstoffen der Phalloidingruppe²⁾ eine enge Verwandtschaft auf. So gibt es mit Zimtaldehyd/HCl über Braun eine blaue Farbe und zeigt ein UV-Spektrum, das in allen Einzelheiten mit dem des Phalloidins (b in Abb. 1) übereinstimmt. Die LD₅₀ an der weißen Maus beträgt, wie beim Phalloidin, 2,4 mg/kg und entfaltet ihre tödliche Wirkung bereits innerhalb weniger Stunden. Phallisin ist in Wasser leicht löslich, reagiert neutral und Ninhydrin-negativ. Im Papierchromatogramm (Lösungsmittel G, S. 236) wandert es weniger weit als Phalloidin¹⁾ und gibt damit seinen hydrophileren Charakter zu erkennen.

⁸⁾ W. A. Schroeder, J. R. Shelton und J. B. Shelton, Analytic. Biochem. 2, 87 (1961).

Eine neue Aminosäure

Bei der Hydrolyse mit Salzsäure liefert Phallisin die ebenfalls aus Phalloin und Phalloidin entstehenden Aminosäuren: Alanin, Cystein, *allo*-Hydroxyprolin, Threonin (vermutlich die *D*-Form) und β -Oxindolyl-alanin (**1**), wobei das durch quantitative Bausteinanalyse ermittelte Molverhältnis von Alanin : Threonin auch hier 2 : 1 beträgt. Ein sich gleichfalls bildendes, basisches Aminolacton erwies sich als nicht identisch mit den γ -Lactonen von γ -Hydroxy-leucin aus Phalloin⁹⁾ und von γ,δ -Dihydroxy-leucin aus Phalloidin⁵⁾, da es sowohl im Papierpherogramm (Abb. 4) als auch im

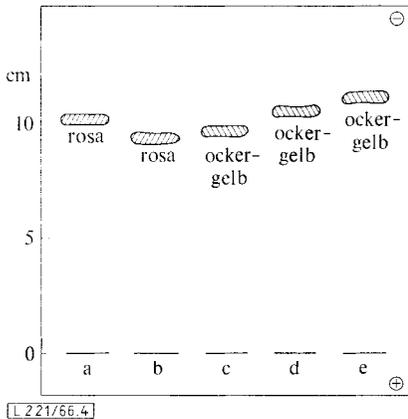


Abbildung 4
Papierpherogramm
der γ -Lactonhydrochloride aus
a: γ -Amanitin, b: α -Amanitin, c: Phallisin,
d: Phalloidin und e: Phalloin
pH 6.5, 1 Stde., 60 V/cm; Ninhydrin-Reaktion.

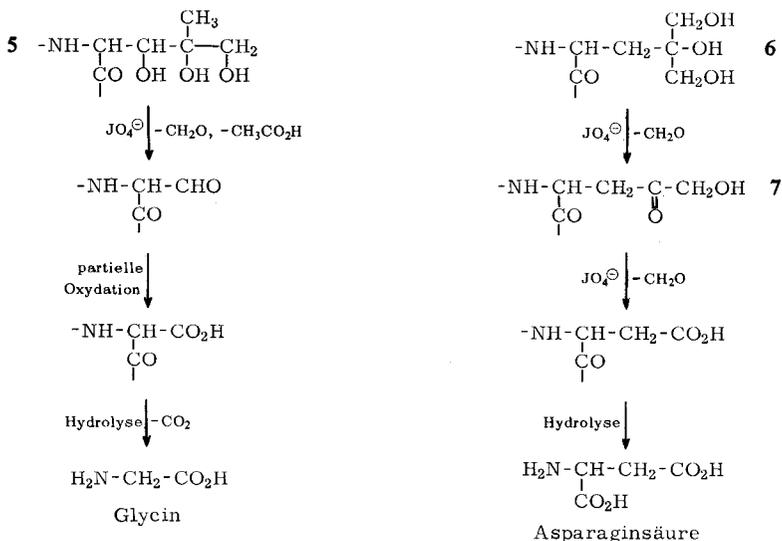
Papierchromatogramm langsamer wanderte. Hierbei verhielt es sich auch verschieden von den aus den Amanitinen³⁾ isolierten γ -Lactonen, die als Isoleucin-Derivate von Ninhydrin rosa angefärbt werden. Das Aminolacton des Phallisins gab dagegen eine ockergelbe Ninhydrinreaktion, wie sie bei lactonisierenden Aminosäuren, die sich vom Leucin ableiten, beobachtet wurde¹⁰⁾. Legte man aufgrund dieser Farbe auch ihm das Leucin-Skelett zugrunde, so ließ sich das stärker hydrophile Verhalten (Papierchromatogramm) und das größere Molekulargewicht (Papierpherogramm) am einfachsten durch die Annahme erklären, daß das neue Lacton eine Hydroxylgruppe mehr als das des γ,δ -Dihydroxy-leucins enthalte.

Als Position für eine dritte OH-Funktion im C-Gerüst des γ,δ -Dihydroxy-leucins kam entweder die β -Stellung (**5**) oder die δ' -Stellung (**6**) in Betracht. Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten sollte sich durch das Ergebnis der oxydativen Glykol-Spaltung mit Perjodat treffen lassen. Da Substanzmangel die vorherige Isolierung des Lactonbausteins in größerer Menge verbot, führten wir seine Oxydation im Peptidverband des Desthiophallisins aus. Dabei war im ersten Fall (**5**) Oxydation

⁹⁾ Th. Wieland, K. Mannes und A. Schöpf, Liebigs Ann. Chem. **617**, 152 (1958).

¹⁰⁾ V. Georgi und Th. Wieland, Liebigs Ann. Chem. **700**, 149 (1966).

zum Aminomalonaldehyd zu erwarten, der die anschließende Hydrolyse mit Säure nicht überstehen sollte und, allenfalls nach teilweiser Weiteroxydation im Perjodat-Ansatz zur Aminomalonsäure, als Glycin erscheinen konnte. Im zweiten Fall (6) war mit der Bildung der Asparaginsäure-Seitenkette zu rechnen, die über die der α -Amino- δ -hydroxy-lävulinsäure (7) verlaufen mußte.



Das für den Oxydationsversuch erforderliche *Desthiophallisin* wurde in bewährter Weise⁴⁾ durch Hydrogenolyse des Naturstoffs mit Raney-Nickel in siedendem 80-proz. Methanol erhalten. Zur Isolierung des Oxydationsproduktes wurde der Ansatz an Sephadex G-25 mit Wasser als Laufmittel chromatographiert, wobei eine Auftrennung in drei UV-aktive Stoffe *A*, *B* und *C* (Uvicord-Diagramm in Abb. 5) erfolgte. Von

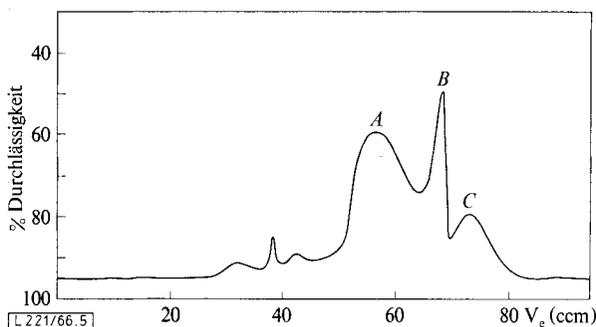
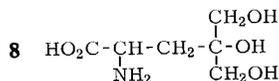


Abbildung 5. Uvicord-Diagramm der Chromatographie von Perjodat-oxydiertem Desthiophallisin an Sephadex G-25 fine mit Wasser

diesen zeigten nur *A* und *C* das für den Chromophor des Desthiophallisins bezeichnende Tryptophan-Spektrum und die entsprechende braunrote Zimtaldehyd/HCl-Reaktion^{*)}. Sie wanderten im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel HF₂₅₄; Methanol/Essigester = 4 : 1) als einheitliche Flecke: Das Hauptprodukt *A* lief langsamer ($R_F = \text{ca. } 0.15$), die Verbindung *C* hingegen schneller ($R_F = \text{ca. } 0.50$) als das Desthiophallisin ($R_F = \text{ca. } 0.37$). Bei der Papierelektrophorese im neutralen Puffer verriet das Cyclopeptid *A* durch anodische Wanderung seinen sauren Charakter, während Cyclopeptid *C* als neutraler Stoff an der Startlinie verharrete. Beide Verbindungen wurden mit Salzsäure totalhydrolysiert und die erhaltenen Aminosäure-Gemische analysiert. Im Hydrolysat von *A* fand man: Alanin (vermehrt um das bei der Nickel-Hydrogenolyse aus dem Cystein-Baustein entstandene Alanin), *allo*-Hydroxyprolin, Threonin, Tryptophan und — anstelle des basischen Aminolactons — Asparaginsäure. Das im Aminosäureanalysator ermittelte molare Verhältnis von Asp : Thr : Ala war 1 : 1 : 3. Das Hydrolysat von Peptid *C* war analog zusammengesetzt, nur daß anstelle von Asparaginsäure eine neutrale Aminosäure auftrat, die ähnlich wie α -Aminolävulinsäure mit Ninhydrin auf Papier unter Gelbfärbung reagierte. Ihr schreiben wir die Struktur der als Zwischenprodukt bei der Oxydation anzunehmenden α -Amino- δ -hydroxy-lävulinsäure (**7**) zu.

Aus diesen Befunden geht mit größter Wahrscheinlichkeit hervor, daß die lactonisierende Aminosäure des Phallisins das γ . δ . δ' -Trihydroxy-leucin (**8**) ist.



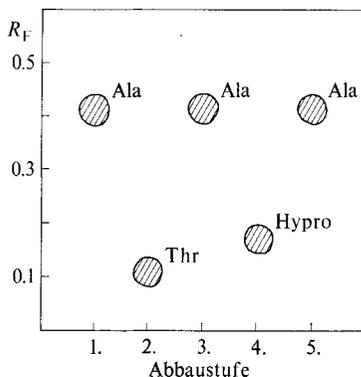
Die Aminosäuresequenz

Die Bildung von β -Oxindolyl-alanin (**1**) neben Cystein einerseits und von Tryptophan neben Alanin andererseits bei der Säurehydrolyse des Phallisins bzw. seiner Desthioverbindung beweist, daß auch dieses Toxin über den allen Phalloidinen eigenen Tryptathionin-Chromophor **2** verfügt und damit ebenfalls bicyclisch aufgebaut ist. Der S-freie Monocyclus läßt sich auch hier unter der Einwirkung von 50-proz. Trifluoressigsäure (vgl. S. 231) an der vom Carboxyl der lactonisierenden Aminosäure ausgehenden Peptidbindung selektiv aufspalten, wobei ein lineares Heptapeptid, das *seco*-Desthiophallisin, erhalten wird. Die Secoverbindung wurde, nach ihrer elektrophoretischen Abtrennung bei pH 6.5 von noch unversehrtem Desthiophallisin, dem Edman-Abbau⁷⁾ nach der Papierstreifenmethode⁸⁾ unterworfen. In Übereinstimmung mit den Befunden bei der Sequenzanalyse des Phallo-

*) Die Substanz *B*, die kein charakteristisches UV-Spektrum besaß und mit Zimtaldehyd/HCl eine gelbgrüne Farbe gab, lieferte unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse keine Aminosäuren und wurde deshalb nicht weiter untersucht.

idins^{11,12)} konnte der Abbau nur über fünf Stufen vorangetrieben werden. Wir erhielten nacheinander die Phenylthiohydantoine (PTH) des ersten Alanin-Bausteins, des Threonins, des aus dem Cystein-Teil durch Desulfurierung entstandenen Alanins, des *allo*-Hydroxyprolins und des zweiten Alanin-Bausteins (Abb. 6). Da das γ,δ,δ' -Trihydroxy-leucin (8) am Carboxylende des Heptapeptids steht, sollte man auf der sechsten Stufe das PTH-Derivat des Tryptophans erwarten. Der Edman-Abbau lieferte jedoch an dieser Stelle kein definiertes PTH-Derivat mehr. Offenbar wird der aromatische Baustein unter der wiederholten Säureeinwirkung weitgehend zerstört.

Abbildung 6
Dünnschichtchromatogramm der beim Edman-
Abbau von *seco*-Desthiophallisin erhaltenen fünf
Phenylthiohydantoin-Derivate
Träger: Kieselgel GF₂₅₄; Fließmittel Chloroform/
Ameisensäure (20 : 1).

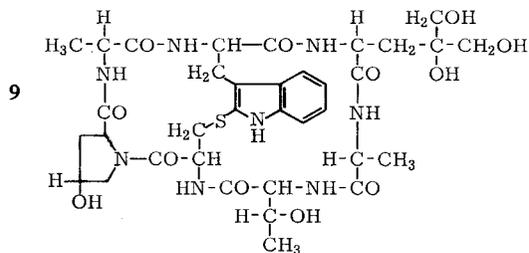


L 2 21/66.6

Das *seco*-Desthiophallisin besitzt somit folgende Aminosäuresequenz:



Daraus ergibt sich für das Phallisin die Struktur 9:



¹¹⁾ Th. Wieland und H. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. **657**, 225 (1962).

¹²⁾ Th. Wieland und U. Gebert, Analytic. Biochem. **6**, 201 (1963).

Beschreibung der Versuche

Papierchromatographie: Absteigend mit *Lösungsmittel G* (Butanon/Aceton/Wasser = 30:3:5) oder *H* (sek.-Butanol/Ameisensäure/Wasser = 75:15:10). — **Dünnschichtchromatographie:** Auf *Kieselgel GF₂₅₄* (Merck) mit Chloroform/Ameisensäure (20:1) für Phenylthiohydantoine¹³⁾. — **Säulenchromatographie:** An *Sephadex G-25 fine* (Deutsche Pharmacia, Frankfurt a. M.) in Wasser, das durch Sättigen mit Chloroform sterilisiert wurde; Verfolgung der Trennung mit dem Uvicord (LKB-Producter, Stockholm). — **Papierelektrophorese:** Verwendet wurde der Pherograph „Frankfurt“ (Hormuth und Vetter, Heidelberg-Wiesloch); Puffer vom pH 6.5 (Pyridin/Eisessig/Wasser = 10:1:89) oder pH 1.9 (Eisessig/Ameisensäure/Wasser = 15:5:80), Sprühreagentien analog Lit.³⁾.

Identifizierung der Aminosäuren: Nach *Totalhydrolyse* (5.7*n* HCl, 110°, 15 Stdn., wenn nicht anders vermerkt) wurden die erhaltenen Aminosäuren durch zweidimensionale Hochspannungspapierelektrophorese (bei pH 1.9) und Papierchromatographie (*Lösungsmittel H*) getrennt. Die α -Aminolacton-hydrochloride wurden mit authent. Proben verglichen. Über γ , δ -Dihydroxy-isoleucinlacton-hydrochlorid (Baustein des α -Amanitins) siehe Lit.^{3,10)}, über die weiteren zum Vergleich herangezogenen Aminolactone siehe Lit.²⁾.

β -Oxindolyl-(3)-alanin (1). — 5 mg *Amanin* (4) bzw. *Phallisin* (9) wurden 3 Stdn. mit 5.7*n* HCl bei 110° hydrolysiert. Nach Eindunsten im Exsikkator über NaOH wurde der Rückstand in 1 ccm Wasser aufgenommen und an einer Säule von *Sephadex G-25* (1 × 95 cm) mit Wasser chromatographiert. In den Eluat-Fractionen 70–90 ccm erschien im Uvicord-Registriergerät der Gipfel von 1, beim *Amanin* nach 100 ccm derjenige von Tryptophan. Beide Fractionen wurden i. Vak. eingedampft und die Aminosäuren durch die UV-Spektren (Abb. 2, S. 229) sowie papierchromatographisch mit *Lösungsmittel H* identifiziert.

Desthioamanin. — Zur hydrogenolytischen Entschwefelung wurden 22 mg *Amanin* (4) in 50 ccm 80-proz. Methanol mit 1 g *Raney-Nickel* (4 mal je 1 Stde. mit 100 ccm 80-proz. Methanol/5 g Katalysator ausgekocht) 6 Stdn. gekocht (Rückfluß). Dann wurde das abfiltrierte oder abzentrifugierte Nickel mit einigen ccm heißem Methanol gewaschen und Filtrat + Waschlösung i. Vak. verdampft. Die Lösung des Rückstands in 1 ccm Wasser wurde über eine Säule von *Sephadex G-25* (2 × 68 cm) mit Wasser chromatographiert. Die aus dem Uvicord-Diagramm ersichtliche Hauptfraction war reines Desthioamanin. Ausbeute 17 mg farbloses Pulver vom R_F -Wert 0.29 (in *Lösungsmittel G*); Farbreaktion mit Zimtaldehyd/HCl braunrot. Vergleich: *Amanin* $R_F = 0.18$, mit Zimtaldehyd/HCl nach vielen Stunden blau über braune Zwischenstufe.

seco-Desthioamanin. — 3.5 mg *Desthioamanin* wurden in 2 ccm 80-proz. Trifluoressigsäure 5 Stdn. bei 20° stehengelassen. Der nach dem Abdunsten im Exsikkator gewonnene Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und die Lösung auf zwei mit Puffer vom pH 1.9 getränkte Filterpapierstreifen (10 × 30 cm) als ca. 5 cm lange Linien aufgetragen. Bei der anschließenden Elektrophorese (1.5 Stdn., 50 V/cm) wanderte das entstandene *seco*-Desthioamanin 5 cm kathodisch, während unversehrtes Cyclopeptid am Start blieb. Die die *Seco*-verbindung enthaltenden Papierbezirke wurden nach Randmarkierung mit Chlor/Tolidin ausgeschnitten und direkt zum Edman-Abbau^{7,8)} verwendet.

¹³⁾ M. Brenner, A. Niederwieser und G. Pataki, *Experientia* [Basel] **17**, 145 (1961).

Desthiophallisin. — Analog der Darstellung von Desthioamanin (S. 236) wurden aus 20 mg *Phallisin* (5) 14 mg Desthiophallisin als farbloses Pulver mit $R_F = 0.40$ (Lösungsmittel G; mit Zimtaldehyd/HCl rotbraun) erhalten. Vergleich: Phallisin, $R_F = 0.38$, mit Zimtaldehyd/HCl blau über braune Zwischenstufe.

Hydrolyse: Im Totalhydrolysat des Desthiophallisins waren 3 Moll. *Alanin* (1 Mol. anstelle von Cystein) zu finden. Im 3-Stdn.-Hydrolysat wurde *Tryptophan* nachgewiesen.

Perjodat-Abbau: Die Lösung von 3.7 mg *Desthiophallisin* in 1 ccm Wasser wurde mit 2 mg $NaJO_4$ in wenig Wasser versetzt. Nach 10 Min. wurde mit $NaHSO_3$ (fein gepulvert) reduziert, bis auf KJ/Stärke-Papier keine Blaureaktion mehr auftrat, mit $NaHCO_3$ neutralisiert und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde mehrmals mit wenig Methanol digeriert, die klare Lösung i. Vak. eingedampft, der Rückstand in 0.5 ccm Wasser aufgenommen und an *Sephadex G-25* (Säule 1×95 cm) mit Wasser chromatographiert. Entsprechend dem Diagramm (Abb. 5, S. 233) wurden die *Fractionen A und C*, nach dünnschichtchromatographischer und UV-spektroskopischer Charakterisierung der Inhaltsstoffe, i. Vak. eingedampft und die Rückstände 15 Stdn. mit je 1 ccm 5.7 n HCl bei 110° hydrolysiert. An *Aminosäuren* wurden gefunden im *Hydrolysat von A*: Ala, *allo*-Hypro, Thr, Try und Asp; Molverhältnis Asp : Thr : Ala = 1 : 1 : 3 (nach Analyse im Unichrom-Gerät von Beckman-Spinco); im *Hydrolysat von C*: Ala, *allo*-Hypro, Thr, Try und α -Amino- δ -hydroxy-lävulinsäure mit $R_F = 0.15$ (in Lösungsmittel H; vgl. S. 236) und gelber Farbreaktion mit Ninhydrin (wie α -Aminolävulinsäure⁵), die aber $R_F = 0.18$ aufweist).

seco-Desthiophallisin. — Es entsteht durch *Partialhydrolyse von Desthiophallisin*, wie beim Desthioamanin (S. 236) geschildert, jedoch mit 50-proz. *Trifluoressigsäure*. Papierelektrophoretische Abtrennung bei pH 6.5 und *Edman-Abbau* entsprechen den Angaben auf S. 236.

Nachweis von γ . δ . δ' -Trihydroxy-leucin (8): Das im *Totalhydrolysat von 9* auftretende Aminolacton-hydrochlorid wurde durch mikropräparative *Papierelektrophorese* (pH 6.5, 2 Stdn., 80 V/cm) abgetrennt und durch Elution des ausgeschnittenen Papierstreifens isoliert. Bei der absteigenden Papierchromatographie (in Lösungsmittel H) verhielt es sich am hydrophilsten von allen untersuchten Aminolactonen. Wanderungswerten: γ -Hydroxy-leucinlacton · HCl = 27 cm, γ . δ -Dihydroxy-leucinlacton · HCl = 13 cm, Lacton aus Phallisin = 8.5 cm. Ninhydrinreaktion aller 3 Lactone ockergelb; R_F -Werte = ca. 0.35 bzw. 0.25 bzw. 0.15 auf Kieselgel H mit n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5; obere Phase).

[221/66]