

Über die Inhaltsstoffe des grünen Knollenblätterpilzes, XXXV¹⁾

Umwandlung des Phalloidins in das ebenfalls giftige Desoxy-desmethylphalloin (Norphalloin)

von Theodor Wieland und Rüdiger Jeck²⁾

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

Eingegangen am 10. Oktober 1967

Das durch Perjodatodoxydation aus Phalloidin (**1a**) erhältliche Ketophalloidin (**1e**) wird über sein Thioketal **1f** mit Raney-Nickel ohne Angriff auf die Thioäther-Brücke des Bicyclus zum γ -Hydroxyl-freien „Norphalloin“ (**1h**) reduziert. Norphalloin ist mit $LD_{50} = 1.8$ mg/kg an der Maus etwas giftiger als Phalloidin (2 mg/kg).

Phalloidin (**1a**) und weitere Phallotoxine – Phalloin (**1b**), Phallacidin (**1c**), Phallisin (**1d**) – sowie eine Anzahl von Abwandlungsprodukten dieser Phytotoxine³⁾, z. B. Ketophalloidin (**1e**) oder sein Dithiolan **1f**⁴⁾, entfalten eine relativ rasch einsetzende, auf das endoplasmatische Reticulum der Leber gerichtete, zerstörende Wirkung⁵⁾. Die LD_{50} von **1a** an der weißen Maus beträgt 2 mg/kg. Als *Strukturelemente*, die zur *Giftwirkung* unerlässlich sind, wurden die Thioäther-Brücke und der Heptapeptid-Ring ermittelt⁶⁾.

Da alle in der Natur vorkommenden Phallotoxine eine *Hydroxyl-Funktion in γ -Stellung* der Leucin-Seitenkette haben und auch die wirksamen synthetischen Abwandlungsprodukte analog funktionell substituiert sind, haben wir geprüft, ob auch dieses Strukturmerkmal für die Giftwirkung der Phallotoxine maßgebend ist. In der Reihe der Amanitine wurde vor kurzem Amanullin entdeckt⁷⁾, das untoxisch ist, weil es Isoleucin anstelle von γ -Hydroxy-isoleucin enthält⁶⁾. Da der analoge Fall bei den Phallotoxinen in der Natur offenbar nicht vorkommt, wurde die *Deshydroxylierung* chemisch vorgenommen.

1) XXXIV. Mitteilung: H. Faulstich, Th. Wieland und Ch. Jochum, Liebigs Ann. Chem. 713, 186 (1968), voranstehend.

2) Dissertation R. Jeck, Univ. Frankfurt a. M. 1967, D 30.

3) Th. Wieland und A. Schöpf, Liebigs Ann. Chem. 626, 174 (1959).

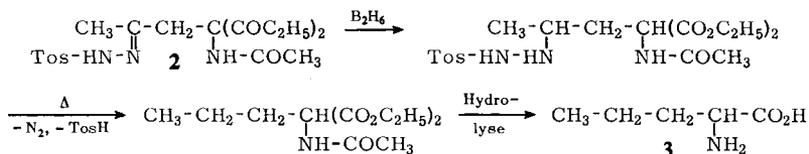
4) Th. Wieland und D. Rehbinder, Liebigs Ann. Chem. 670, 149 (1963).

5) F. Matschinsky, U. Meyer und O. Wieland, Biochem. Z. 333, 48 (1960).

6) Siehe z. B. Th. Wieland, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] 25, 214 (1967).

7) Th. Wieland und A. Buku, Liebigs Ann. Chem., im Druck (1968).

Dagegen ließ sich sogar aus Ketophalloidin (**1e**) das toxische *Tosylhydrazon 1g* herstellen. Am Tosylhydrazon **2** von Acetonyl-acetaminomalonsäure-diäthylester als Modell erprobt wir die von *Caglioti* und *Graselli*¹⁰⁾ sowie von *Djerassi* und Mitarbeitern¹¹⁾ angegebene Diboran-Reduktion mit anschließender Zersetzung des Tosylhydrazin-Derivats in siedendem Methanol:



Die Ausbeuten an Norvalin (**3**) aus **2** lagen nur bei wenigen Prozenten. Mit NaBH₄ in Dioxan gelang die Reduktion nicht.

Obwohl mit *Raney-Nickel* in siedendem, wasserhaltigem Methanol der Brücken-Schwefel von Phalloidin gegen Wasserstoff ausgetauscht werden kann, versuchten wir auf diesem Weg die beiden *S-Atome des Thioketals vom Dithiolan 1f* unter Erhaltung der S-Brücke hydrogenolytisch¹²⁾ zu entfernen. Nach 1–2stdg. Erhitzen von **1f** in ca. 80-proz. Methanol und mehrmaliger Chromatographie wurde mit ca. 20-proz. Ausbeute Norphalloin (**1h**) isoliert. Es zeigt im Papierchromatogramm einen größeren *R_F*-Wert als Phalloidin, gibt wie dieses mit Zimtaldehyd/HCl eine langsame Blaureaktion, hat ein identisches UV-Spektrum ($\lambda_{\text{max}} = 291 \text{ m}\mu$, Schulter bei $300 \text{ m}\mu$) und zerfällt bei saurer Hydrolyse in Cystein (Cystin), β -Oxindolyl-(3)-alanin („ α -Oxytryptophan“), Alanin, Threonin, *allo*-Hydroxyprolin und Norvalin.

Da sich **1h** als giftig (LD₅₀ = 1.8 mg/kg) an der weißen Maus erwiesen hat, ist die γ -ständige Hydroxylgruppe im Isoleucin-Rest der Phallotoxine kein die *Toxizität* bedingendes Strukturelement.

R. Jeck dankt für die Unterstützung durch die *Stiftung Volkswagenwerk*. Außerdem haben wir *Frl. A. Schmitz*, Ingelheim/Rh., für die Toxizitätsprüfungen sehr zu danken.

Beschreibung der Versuche

Die *analytischen Methoden* sind in den vorhergehenden Mitteilungen¹⁾ beschrieben. — Die *Schmelzpunkte* wurden im Kupferblock bestimmt und sind nicht korrigiert. — Die *UV-Spektren* wurden mit dem Beckman-Spektrophotometer DB in Methanol aufgenommen.

Hydrazine durch Reduktion mit Diboran

*Diboran*⁸⁾ wurde aus Na-borhydrid und Borfluorid-ätherat in Diäthylenglykoldimethyl-äther (Diglyme) hergestellt, doch ließ man die Lösung des Ätherats (10% Überschuß) zur

¹⁰⁾ *L. Caglioti* und *P. Graselli*, *Chem. and Ind.* **1964**, 153.

¹¹⁾ *C. Djerassi*, *D. H. Williams* und *Z. Belah*, *Mh. Chem.* **95**, 166 (1964).

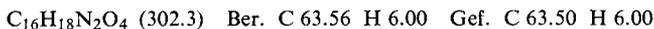
¹²⁾ Vgl. *M. L. Wolfrom* und *J. V. Karabinos*, *J. Amer. chem. Soc.* **66**, 909 (1944).

NaBH₄-Suspension tropfen. *Stickstoff* wurde durch eine Lösung aus 48 g Na₂S₂O₄ in 100 ccm Wasser + 40 g NaOH und 12 g Anthrachinon-β-sulfonat in 150 ccm Wasser geleitet, dann durch konz. Schwefelsäure und einen NaOH-Turm.

α-Phenyläthyl-hydrazin. — 33 mMol Diboran [aus 1.9 g (50 mMol) *Natrium-borhydrid* und 10.6 g (75 mMol) *Borfluorid-ätherat*] wurden mit N₂ während 1.5 Stdn. unter die Oberfläche einer Lösung von 4.25 g (32 mMol) *Acetophenon-hydrazon* in 150 ccm absol. Tetrahydrofuran bei Eiskühlung und Rühren geleitet. Nach 3 stdg. Durchleiten von N₂ wurden unter Kühlung mit Eis/NaCl 10 ccm Wasser langsam zugetropft. Nach 4–5 Stdn. bei 20° gab man 30 ccm 2*n* NaOH + 100 ccm Äther zu, trennte und ätherte 2mal nach. Nach dem Trocknen mit K₂CO₃ wurden die vereinigten Ätherlösungen auf 50 ccm eingeeengt, filtriert und mit 4.5 g wasserfreier *Oxalsäure* in 50 ccm Äther versetzt. Der farblose Niederschlag wurde abgesaugt, mit Äther gewaschen und getrocknet (7.66 g). Nach Reinigung durch Lösen in 200 ccm siedendem Äthanol und Einengen auf 50 ccm resultierten 2.86 g (40%) *α-Phenyläthyl-hydrazin-oxalat* vom Schmp. 165°. Durch zweimaliges Umlösen aus Äthanol wurde der Schmp. 170° (Lit.¹⁰) 172° erreicht.

Benzylhydrazin-oxalat. — Aus *Benzaldehyd-hydrazon* entstehen analog der voranstehenden Vorschrift 7% d. Th. des Oxalats vom Schmp. 180° (Lit.¹³) 182–183°.

N,N'-Dibenzyl-hydrazin-oxalat. — Durch Disproportionierung von *Benzaldehyd-hydrazon* zu *Dibenzalazin* entsteht es durch dessen Reduktion beim gleichen Ansatz wie voranstehend. Ausbeute 20% d. Th; Schmp. 187°.



Cyclohexylhydrazin-oxalat. — Aus *Cyclohexanon-hydrazon* entstehen 43% d. Th. Oxalat vom Schmp. 188–189° (Lit.¹⁴) 188–190°.

Tosylhydrazone

Tosylhydrazon von Acetyl-α-acetamino-malonsäurediäthylester (2). — 2.73 g *Acetyl-α-acetaminomalonester*¹⁵ in 20 ccm Methanol wurden mit 2.42 g *p-Toluolsulfonylhydrazin* 20 Min. unter Rückfluß gekocht. Nach Zugabe von Wasser bis zur beginnenden Trübung kristallisierten bei 4° 3.95 g (90%) farblose Kristalle vom Schmp. 132–134°.



Tosylhydrazon des Ketophalloidins (1g). — 100 mg *Ketophalloidin*³⁾ wurden in 0.5 ccm absol. Methanol mit 31 mg *p-Toluolsulfonylhydrazin* 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Zugabe von 1.25 ccm Wasser fiel 1 g aus, das durch Dekantieren mit wenig Wasser gewaschen wurde. Man nahm in 0.5 ccm Methanol auf, fällte mit 1.5 ccm Wasser, zentrifugierte und trocknete i. Vak.: 89 mg (81%). — *Dünnschichtchromatogramm*: R_F = 0.58 (Kieselgel HF, Methanol/Essigester = 3 : 1). — *Papierchromatogramm*: R_F = 0.88 (Butanon/Aceton/Wasser = 30 : 3 : 5); mit Zimtaldehyd/HCl grün. — LD₅₀ = 2.0 mg/kg (weiße Maus).

¹³) R. Huisgen, F. Jakob, W. Siegel und A. Cadus, Liebigs Ann. Chem. **590**, 33 (1954).

¹⁴) E. Schmitz und R. Ohme, Chem. Ber. **94**, 2172 (1961).

¹⁵) O. Wiss und H. Fuchs, Helv. chim. Acta **35**, 407 (1952).

Norphalloin (1h). — 53 mg *Phallothiolan*⁴ (**1f**) wurden in 30 ccm 83-proz. Methanol mit 3.43 g Methanol-feuchtem *Raney-Nickel* (4 mal mit Methanol ausgekocht) 105 Min. unter Rühren und Rückfluß gekocht. Nach Dekantieren und viermaligem Auskochen des Nickels mit je 30 ccm absol. Methanol wurde filtriert und die Lösung i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde an einer Säule (150 × 1.9 cm) von *Sephadex LH-20* mit Methanol/Wasser (1 : 1) unter Uvicord-Anzeige chromatographiert. Nach 250 ccm Vorlauf erschienen im Eluat *Ketophalloidin (1e)*, eine unbekannte Substanz (wenig; mit Zimtaldehyd/HCl braun. R_F im DC auf Kieselgel HF mit Butanon/Aceton/Wasser = 30 : 3 : 5 geringfügig höher als **1e** und **1b**) sowie *Norphalloin (1h)*. Die *Norphalloin-Fraktion* wurde nach Einengen i. Vak. auf zwei DC-Platten durch zweimaliges Entwickeln mit dem obigen Lösungsmittelgemisch chromatographiert, die im UV-Licht gut erkennbare Zone von **1b** herausgeschabt und mehrmals mit heißem Methanol eluiert. Zur Abtrennung des gelösten Kieselgels wurde mit Methanol an *Sephadex LH-20* chromatographiert und die im UV-Recorder erkennbare Hauptkomponente nach Eindampfen des Eluats i. Vak. durch mehrmaliges Extrahieren mit wenig absol. Methanol vom *Sephadex* befreit. Nach Abdunsten des Lösungsmittels, Aufnehmen des Rückstands in wenig Wasser und Gefriertrocknen resultierten 10 mg *Norphalloin (1h)*. — *Papierchromatogramm*: $R_F = 0.78$ mit Butanon/Aceton/Wasser (30 : 3 : 5); Phalloidin: $R_F = 0.54$, Ketophalloidin: $R_F = 0.68$. Mit Zimtaldehyd/HCl nach 20 Min. violett, nach 2 Stdn. blau. — Das UV-Spektrum ist mit demjenigen der Phallotoxine⁷⁾ identisch. — Nach 12stdg. *Hydrolyse* mit 6*n* HCl bei 110° fand man *Alanin*, *allo-Hydroxyprolin*, *Cystin*, *Threonin* und *Norvalin*; die Konzentration des letzteren gegenüber Threonin betrug nur ca. 70%. — $LD_{50} = 1.8$ mg/kg (weiße Maus).

[219/67]