

CHROM. 4921

ÜBER DIE CHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE VON TOXINEN
AUS *AMANITA PHALLOIDES*

VLADIMÍR PALYZA UND VÁCLAV KULHÁNEK

Institut für Medizinische Chemie der Universität in Brünn, Brno (Tschechoslowakei)

(Eingegangen am 6. Juli 1970)

SUMMARY

Chromatographic analysis of toxins from Amanita phalloides

A review of the recent literature and a comparison of the various methods served as the basis for the development of a rapid procedure in which commercially prepared Silufol plates (150 × 150 mm, 0.1 mm silica gel layer) were used together with a methyl ethyl ketone-methanol (1:1) system for the successful thin-layer chromatographic separation of amanita toxins. By observing the recommended parameters the following R_F values for separate toxins were obtained: α -amanitin = 0.65 ± 0.06 ($n = 249$), β -amanitin = 0.47 ± 0.06 ($n = 85$), γ -amanitin = 0.75 ± 0.05 ($n = 27$), phalloidin = 0.55 ± 0.02 ($n = 10$). In addition, it was possible to identify two spots which showed a phallotoxin character with R_F values of 0.20 ± 0.02 ($n = 14$) and 0.47 ± 0.06 ($n = 7$), respectively. The detection was made by cinnamaldehyde-HCl (sensitivity 1–2 μg of α -amanitine) and by Pauly's reagent; some stable diazotates were also examined experimentally.

EINLEITUNG

Das Bedürfnis des Nachweises toxischer Polypeptiden in verschiedenen verarbeiteten Extrakten aus *Amanita phalloides* und die Bemühung, bei menschlichen Vergiftungen Pilzreste zu identifizieren, führte uns zum chromatographischen Studium der Amanita-Toxine.

Unser Ziel war die Ausarbeitung einer schnellen, arbeitsmässig anspruchslosen, aber dabei doch verlässlichen Methodik.

Eine Übersicht der bisherigen chromatographischen Verfahren zur Trennung von Amanita-Toxinen gibt die Tabelle I.

Nach SULLIVAN und Mitarbeitern⁶ haben die älteren Methoden^{1–4}, gewisse Mängel und ihre Verwendung bei Pilzextrakten erfordert erhebliche Erfahrung, um einem Fehlschluss zu verhindern. Die Auftragung grosser Mengen konzentrierter methanolischen Extrakten, wie BLOCK und Mitarbeitern³ empfohlen haben, gab oft gestreifte und schiefe Chromatogramme, vielleicht durch die Anwesenheit begleitender Lipide verursacht. Die von WIELAND *et al.*¹ benutzte Lösungsmittelmischung bildet eine Emulsion, die vor der Verwendung zentrifugiert sein muss und weder diese, noch das modifizierte System nach BLOCK *et al.*³ geben reproduzierbare Ergebnisse. Die R_F -Werte der Amanitine schwanken stark mit der Grösse der aufgetragener Menge,

TABELLE I

ÜBERSICHT VON CHROMATOGRAPHISCHEN METHODEN ZUR TRENNUNG VON AMANITA-TOXINEN

Abkürzungen: PHD = Phalloidin, PHN = Phalloin, AMA = Amanitin.

Abschnitt im Text	Autor	Literatur	Träger- material	Trägerregelung	Chromatogra- art
A	TH. WIELAND G. SCHMIDT L. WIRTH	1	Papier Schleicher & Schüll 2043 b	—	zweidimen- sional ↑ ↓
	TH. WIELAND CH. DUDENSING	2	Papier Schleicher & Schüll 2043 b	Impregnation durch 0.05 M Boratpuffer (pH = 8.6)	eindimensior ↑
B	S. S. BLOCK R. L. STEPHENS A. BARRETO W. A. MURRILL	3	Papier Schleicher & Schüll 2043 b oder Whatman No. 1	Die Streifen etwa 2.5 × 25 cm oder 35 cm lang	eindimensior ↑
	S. S. BLOCK R. L. STEPHENS W. A. MURRILL	4	Cellulosesäule	5 g Papier Whatman No. 1 standard zermalmt und mit Azeton durchgewaschen	Säulenchron- tographie ↓
C	G. SULLIVAN L. R. BRADY V. E. TYLER, JR.	6	Kieselgel G, Schichtdicke 0.2 mm	30 g Kieselgel G + 60 ml Wasser; 20 × 20 cm; Aktivation 90 Min. bei 105°	eindimensior ↑
	H. P. RAAEN	9	Kieselgel G, Schichtdicke 0.2 mm	Dasselbe und weiter die Kieselgelschichtregelung auf die Streifen für einzelne Proben	eindimensior ↑
D	P. E. KAMP W. M. DE WIT	10	Cellulose L (Merck)	—	zweidimensior ↑ ↑

ausserdem wurden mit frisch vorbereiteten Lösungsmittelmischungen andere Ergebnisse erzielt, als mit den einige Tage alten Lösungsmitteln.

Die von SULLIVAN *et al.*⁶ erarbeitete Dünnschichtchromatographie sollte die oben erwähnten Mängel der vorgehenden Verfahren vermeiden.

BENEDICT *et al.*⁷ haben durch Chromatographie nach SULLIVAN *et al.*⁶ in Fermentationsprodukten von *Galerina marginata* (*Pholiota marginata* Batsch) Amanitine nachgewiesen, als Vergleichversuch hat ein methanolischer Extrakt aus pulver-trocknem *Amanita phalloides* gedient. Sie haben hier andere R_F -Werte gefunden. Tabelle II gibt die R_F -Werte der Dünnschichtchromatographie. Dabei wurde die Amanitin-Identität durch andere chromatographische Methoden mit denselben Ergebnissen für die beiden Muster beglaubigt.

ngsmittel	Auftragungs- menge	Trennungs- zeit	R_F -Werte	Bemerkungen
obere Phase der nnten Emulsion: äthyläthylketon-Azeton- ser (20:2:5) äthylformiat-Azeton- ser (100:145:40)	etwa 10 μ l	↑ 3 Std. Lösungs- mittel B ↓ 2 Std. Lösungs- mittel A	PHD = 0.50 α -AMA = 0.41 β -AMA = 0.24 PHN = 0.6-0.65	R_F -Werte gelten für eindimensionale Chromatographie im System A
obere Phase der nnten Emulsion: äthyläthylketon- on-Wasser (20:2:8)	etwa 10 μ l		PHD = 0.17 α -AMA = 0.17 β -AMA = 0.05 γ -AMA = 0.28	Durch die Papierimpregnation wurden die verschiedenen R_F -Werte für PHD und γ -AMA erreicht, die anders zusammenfließen würden
äthyläthylketon- on-Wasser- <i>n</i> -Butanol 5:5:1)	etwa 300 μ l	40 Min. oder 2 Std.	nicht angeführt	Anwendung der Methode: P. CATALFOMO UND V. E. TYLER, JR. ⁶
			α -AMA = 0.43 β -AMA = 0.17	
anol-Methyläthyl- n (1:1)	etwa 5-100 μ l		α -AMA = 0.46 β -AMA = 0.23	Anwendung der Methode: BENEDICT <i>et al.</i> ⁷ TYLER <i>et al.</i> ⁸
	wiederholt 2 μ l		(Lösungsmittelüber- fluss: $\beta < \alpha < \gamma$)	
ethyläthylketon- on-Wasser (30:3:5) ethyläthylketon- on-Wasser- <i>n</i> -Butanol 5:5:1)	5-20 μ l		nicht angeführt	

TYLER *et al.*⁸ erforschten mit dieser Methode die Anwesenheit von Amanita-Toxinen in den amerikanischen giftigen Knollenpilzen *A. phalloides*, *A. verna*, *A. virosa* und *A. bisporigera*, Durchschnittliche R_F -Werte sind auch in der Tabelle II angegeben.

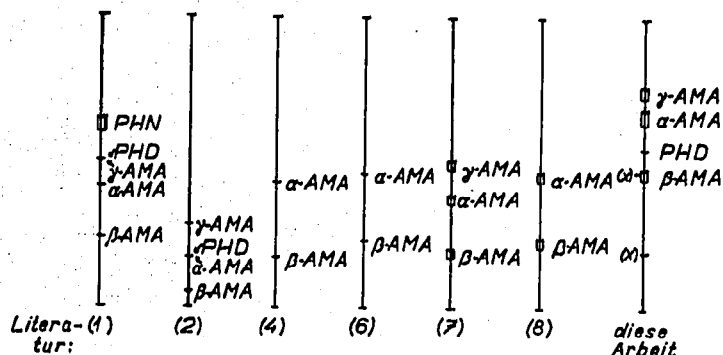
RAAEN⁹ bewirkte einige Verbesserungen an SULLIVAN's⁶ Verfahren, und zwar vor allem durch die Formung der Kieselgelschichten: durch Rillen Verteilte sie die Platte in Streifen für die Trennung der einzelnen Proben. Die Streifen wurden im unteren Teil von beiden Seiten durch runde Einschnitte verengt. Die so gemachten Chromatogramme geben schärfer gefärbte Flecken, wie man durch Vergleichen einer farbigen Beilage in der Originalarbeit beurteilen kann. Für die Chromatographie wurden hier die nach SULLIVAN *et al.*⁶ zubereiteten Platten benutzt. Kommerzielle

TABELLE II

 R_F -WERTE DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

	Sullivan et al. ⁶	Benedict et al. ⁷		Tyler et al. ⁸
		<i>A. phalloides</i>	<i>G. marginata</i>	
α -AMA	0.46	0.38	0.36	0.44-0.47
β -AMA	0.23	0.20	0.18	0.21-0.24
γ -AMA	—	0.51	0.48	—

Fertigplatten gaben keine befriedigende Ergebnisse. RAAEN⁹ hat die dünn-schichtchromatographische Methode nach SULLIVAN *et al.*⁶ eingehend kritisiert und betonte, dass die R_F -Werte der einzelnen Amanitine nicht konstant waren, sondern mit der Form, dem Aktivationsgrad und dem Alter der chromatographischen Platten schwankten. Auch die Menge des extrahierten Materials im getesteten Teil beeinflusst die R_F -Werte. Eine schematische Übersicht von allen erwähnten R_F -Werten zeigt die Fig. 1.

Fig. 1. Schematische Übersicht von allen erwähnten R_F -Werten.

VORBEREITUNG VON PILZEXTRAKTEN

Die Autoren benutzten folgendes Verfahren zu Vorbereitung von Pilzextrakten.

(A) Die Probe war ein methanolischer Pilzextrakt, im Vakuum getrocknet¹. Im Niederschlag wurde die Peptidfraktion von Salzen (vorwiegend KCl) durch Pyridin getrennt, das Pyridin-Supernatant wurde verdampft und aus dem Residuum eine wässrige oder methanolische Lösung hergestellt, so dass die Konzentration für jede Komponente ungefähr 1/2 % war.

(B) Der kleingehackte, unzerquetschte Pilz wurde mit Methanol bedeckt, das Gemisch wurde zum Sieden gebracht und weiterhin einige Minuten unter Rühren und Zerquetschen des Pilzgewebes erwärmt^{3,4}. Vom extrahierten Gewebe wurde alle Flüssigkeit entfernt, der verbliebene methanolische Extrakt bis zum Trocknen verdampft, wieder in Methanol gelöst und ungelöste Teile durch Zentrifugieren getrennt. Die so gewonnene möglichst hoch konzentrierte methanolische Lösung wurde chromatographiert. Wenn dieses Verfahren für die Trennung (nicht nur für einfache Detektion) von Toxinen benutzt werden soll, empfehlen einige Autoren³ folgende Massnahmen: (i) Pilzgewebe im Methanol 1 Std. oder auch länger extrahieren, (ii) den methanolischen

Extrakt verdampfen, die Trockensubstanz wieder in Methanol lösen. Dieser Schritt muss dreimal, bis zum Erreichen der Peptidkoagulation, wiederholt werden; (iii) einen Papierstreifen von ungefähr 35 cm Länge benutzen und das Chromatogramm 2 Std. entwickeln.

(C) Als Muster dienten methanolische Extrakte aus Pilzen, entweder roh oder wie folgt zubereitet⁶: das Pilzgewebe, 4 g, wurde mit Methanol (100 ml) im Soxhlet-Apparat extrahiert. Der Extrakt wurde bis 10° abgekühlt und von den Niederschlags-Resten durch Zentrifugieren getrennt. Reines Supernat wurde ungefähr bis zu 20 ml auf dem Glühlampenverdampfer eingedunstet, nochmals bis 10° abgekühlt und zentrifugiert. Die reine Flüssigkeit, wozu vor Ablauf der Präzipitation eine kleine Menge Wasser gegeben wurde, wurde dekantiert. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige-methanolische Flüssigkeit bis zum Trocknen verdampft und der Rest wieder in Methanol gelöst (in 4 ml). Mit so gereinigten Extrakten wurden bessere Erfolge erreicht als mit den durch vorhergehende Verfahren vorbereiteten Extrakte (B) nach BLOCK *et al.*³. RAAEN⁹ hat konzentrierte methanolische Extrakte aus pulvertrocknem *A. phalloides* durch Extraktion im Soxhlet und durch Verdampfen des Methanols aus dem Extrakt hergestellt.

(D) KAMP *et al.*¹⁰ haben zur Bereitung der Probe für die Chromatographie das Verfahren nach WIELAND *et al.*¹¹ benutzt: Frische Fruchtkörper wurden in Methanol extrahiert und nach einigen Tagen zerquetscht. Der Extrakt wurde filtriert und in Vakuum bis Sirupkonsistenz verdampft. Durch Zugabe von 5–10 Methanolvolumen formte sich ein reichlicher Niederschlag von KCl und anderen Salzen, die durch Filtrieren entfernt wurden. Das Methanol wurde nochmals verdampft, der Rest in Wasser gelöst, dazu wurden dann Pb-Azetat gegeben — solange es zum Niederschlag kam, nicht länger. Das Pb-freie Filtrat wurde mit Ammoniumsulfat gesättigt. So wurde der Hauptteil von Toxinen ausgefällt. Die Toxine wurden auf dem Filter aufgefangen und davon mit kleinen Methanolportionen ausgewaschen. Das Endvolumen wurde so eingestellt, dass 1 ml Extrakt 10 g vom Ausgangsmaterial entsprach.

EMPFINDLICHKEITSGRENZEN

Die Empfindlichkeitsgrenzen bei der Dünnschichtchromatographie können nach TYLER *et al.*⁸ zufolge der Gesamtmenge von Amanitinen und des Volumens vom aufgetragenen Muster schwanken. Doch mit Sicherheit können etwa 0.3 µg reines α- oder β-Amanitins nachgewiesen werden. Mit der Dünnschichtchromatographie auf Cellulose¹⁰ lassen sich 1–2 µg α-Amanitins nachweisen.

BLOCK *et al.* beobachteten³, dass die Papierchromatographie die Identifikation von Toxinen in weniger als 0.1 g frischen Pilzgewebes möglich macht (was ungefähr 8 µg α- und 5 µg β-Amanitins entspricht). Über die Empfindlichkeit der Papierchromatographie nach WIELAND *et al.*¹ siehe weiter bei den Reagenzien.

DIE REAGENZIEN ZUR TOXINDETEKTION

Eine Übersicht geben WIELAND *et al.*¹. Wie man aus der Tabelle III ershen kann, verhält sich Phalloidin in einigen Fällen anders als die Amanitine. Die Differenz wird durch unterschiedliche Struktur bedingt (auf dem Indolkern von Tryptophan besitzen die Amanitine an der Stelle 6 eine Hydroxylgruppe, das Phalloidin nicht).

TABELLE III

ÜBERSICHT VON REAGENZIEN ZUR AMANITA-TOXIN DETEKTION

Reagens (nach):	Farbe		Literatur
	Phalloidin	Amanitine	
(a) Folin-Denis	blau	blau	} 1
(b) Millon	gelbbraun	gelbbraun	
(c) Tollens	—	schwarz	
(d) Pauly	gelb	rot	
(e) KI-Stärke unter Verwen- dung von Cl ₂ -Gas	graublau	graublau	
(f) Zimtaldehyd-HCl-Gas	hellblau	violett	
(g) Emerson (Modifikation nach Eisdorfer, Post)	—	purpurbraun	10

Von den angeführten Reagenzien haben das System Zimtaldehyd-HCl^{1-10, 12} und die Reaktion mit Pauly's Reagens^{1, 5, 6, 8} praktische Anwendung erreicht. Zimtaldehyd haben alle Autoren deshalb benutzt, weil ungiftige Begleitstoffe mit diesem Reagens rotbraune, ockerfarbene und gelbe Flecken geben, die man gut von der blauen oder violetten Farbe des Phalloidins oder der Amanitine unterscheiden kann.

Die Reaktion mit Zimtaldehyd in gasförmigem Chlorwasserstoff genügt auch für den Beweis von Phalloidin, wenn bei der Reaktion eine hohe Konzentration von Chlorwasserstoff gewährleistet ist. Das Phalloidin gibt eine gelbbraune Farbe, die sich ausserhalb der HCl-Atmosphäre vorübergehend in hellblau ändert, jedoch bald verschwindet. Die Amanitine färben sich im HCl-Gas violett, ausserhalb der HCl-Atmosphäre verschwindet die Farbe ebenfalls langsam. In einem Flecken mit einem Durchmesser von etwa 1 cm auf dem Papier kann man noch 1 µg Amanitin und 10 µg Phalloidin nachweisen.

Zur Reaktion mit Pauly's Reagens (= diazierte Sulfanilsäure) verwenden wir nur frisch bereitetes Reagens. Mit Amanitinen entstehen rote Flecken, mit Phalloidin tritt nur bei höheren Konzentrationen eine nicht sehr empfindliche Gelbreaktion ein. SULLIVAN *et al.*⁶ haben beschrieben, dass auf Dünnschicht die mit Pauly's Reagens gefärbten Amanitin-Flecken rosafarbig sind und dass diese Reaktion ungefähr 10 mal empfindlicher ist als die Reaktion mit dem System Zimtaldehyd-HCl.

Toxikologischen Nachweis mit Hilfe der Papierchromatographie nach WIELAND *et al.*¹ haben ABUL-HAJ *et al.*¹² nach Verarbeitung von 400 g Lebergewebe eines Verstorbenen gegeben. Die Anwesenheit von α- und γ-Amanitin wird als umstritten angeführt; soweit es den Autoren bekannt ist, wurden Amanita-Toxine in Menschen-gewebe nach tödlicher Vergiftung das erste Mal identifiziert.

VERSUCHSTEIL

Wir haben die in der Einleitung angeführte chromatographische Methoden sowohl auf Papier, als auch mit Hilfe der Dünnschichtmethode geprüft. Die Dünnschichtchromatographie hat sich bei uns am besten bewährt. Die Plattenvorbereitung mit der Aktivierung ist langwierig, deshalb beschränkten wir uns schliesslich auf die Benützung von Fertigplatten.

Kieselgelplatten

Von den Fertigplatten haben wir uns nach der Erprobung der Platten "DC Alufolien Kieselgel F 254 Merck" und "Silufol", resp. "Silufol UV 254" für die beiden letzt genannten entschieden. Die Platten "Silufol" haben nämlich eine genügend feste Kieselgel-Schicht, die während ihrer Formierung nicht loskommt. (Die Platten "Silufol" erzeugt in der ČSSR die Firma "Kavalier", in der B.R.D. die Firma "Serva-Feinbiochemica" u. Co. GmbH, Heidelberg.)

Plattengestaltung

Zuerst haben wir die nicht formierten Platten benutzt, später haben wir verschiedene Formungsweisen geprüft, von welchen sich die auf der Fig. 2. dargestellte Streifenform bestens bewährt hat.

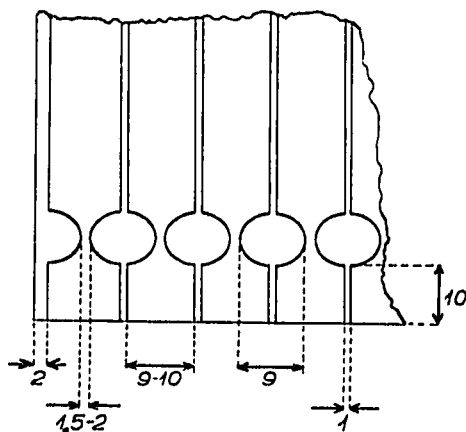


Fig. 2. Der untere linke Rand der Regelungsplatte.

Die angegebene Anordnung stimmt, was den Abstand des aufgetragenen Musters vom unteren Rand, die Fleckenbreite und das Eintauchen der Platte in das Lösungsmittelsystem anbelangt, mit der Firmenanweisung der Silufol-Platten überein. Die eigentliche Gestaltung führt man mit Hilfe eines Korkbohrers durch: die Streifen graviert man mit der Spitze, deren angeschliffene Fläche 1 mm breit ist. Von den runden Flächen entfernt man durch Abkratzen und folgendes Absaugen mit einem weichem PVC-Schlauch das Kieselgel völlig, bis die spiegelglatte Aluminiumfolie zum Vorschein kommt. Bei der Streifengravierung ist darauf zu achten, dass die Aluminiumfolie nicht auf die Papierschicht durchreibt. Um den "Randeffekt", der ein ungleichmäßiges Aufsteigen des Laufmittels in verschiedenen Plattenteilen verursacht, zu verhindern, muss man auch mindestens 2 mm von der Kieselgelschicht auf jedem senkrechten Plattenrand abkratzen.

Die Probenauftragung

Die Proben trägt man üblicherweise auf, und zwar an der schmalsten Stelle des Streifens oder ein wenig darunter. Wir haben die halbsteife Polyäthylenpipette benutzt, bei welcher das Volumen der durch die Kapillarität angesaugten Proben 5 μ l (die Hälfte der Pipette) bis 10 μ l (die volle Pipette) betrug.

Waschen der Pipette vor Auftragung. Vor der Auftragung einer neuen Probe wurde die Pipette nacheinander mit Wasser und weiter mit Methanol (Lösung even-

tueller Toxispuren) durchgewaschen und schliesslich mit Azeton unter Absaugen durch eine Wasserstrahlpumpe getrocknet.

Lösungsmittelsystem zur Entwicklung

Wir haben einige Lösungsmittelgemische geprüft, von denen bewährte sich das System Methyläthylketon–Methanol (1:1) für "Silufol" am besten. Zur Chromatographie muss man doppelt destillierte Lösungsmittel benutzen. Massgebend ist die Reinheit des Methyläthylketons (Siedepunkt 79.6°). Da es mit 21.4 g % Wasser ein Azeotrop bildet, ist es nötig, vor der Destillation mit CaCl₂ zu trocknen. Methyläthylketon ist bei direktem Tageslicht nicht stabil. Deshalb haben wir das System in den Kammern täglich frisch zubereitet und das Methyläthylketon in dichtverschlossenen Flaschen im Dunkel gelagert.

Die Entwicklungszeit für die Platten "Silufol" 150 × 150 mm (Schichtdicke des Kieselgels mit dem Stärkeverbindungsglied 0.1 mm) bei Temperaturen von 19–22° und dem Volumen der Kammer war 40–50 Min.

Die Detektion

Zimtaldehyd–HCl. Die 1 %-ige Lösung des Zimtaldehyds im Methanol wurde jeweils frisch zubereitet. Als (*trans*-)Zimtaldehyd (= Phenylakrolein) wurde einerseits unser eigenes Erzeugnis (aus dem Benzaldehyd und Azetaldehyd bei Anwesenheit von NaOH mit Hilfe der Reaktion nach Claisen und Schmidt) und andererseits ein Erzeugnis der englischen Firma Halewood Chemical Ltd. ohne wesentliche Unterschiede benutzt.

Nach Eintrocknen der methanolischen Lösung wurde die Platte in eine Kammer, die konzentrierte HCl enthielt, eingelegt. Die vertikale Einstellung der Platte über dem HCl-Dampf, wie sie bisher angewendet wurde, hat sich bei uns wegen der sinkenden Konzentration der HCl-Dämpfen im oberen Teil der Kammer nicht bewährt. Deshalb benutzten wir eine Glaswanne mit konzentrierter, täglich frischer HCl, in die das Chromatogramm horizontal, die Kieselgelschicht nach unten, auf 4 Verdampfschalen mit rundem Boden eingelegt wurde. (Beinahe Punktkontakt mit dem Chromatogramm.) Die Färbung des Chromatogramms in der durch eine Glasplatte zugedeckten Kammer wurde mit Hilfe eines unter dem Kammergrund aufgestellten Spiegels beobachtet.

Die Anfärbung der Flecken ist gewöhnlich in 5 Min. erreicht: Die Chromatogramme haben wir den HCl-Dämpfen regelmässig 15 Min. ausgesetzt, nicht länger (nach RAAEN⁹ soll das Farbintensitätsmaximum nicht später als nach 20–30 Min. erreicht werden). Das Nachzeichnen der Farbflecken muss man unmittelbar nach dem Herausnehmen des Chromatogramms aus der HCl durchführen, weil die Flecken allmählich verschwinden (die intensivsten bleiben jedoch selbst nach einigen Stunden sichtbar).

Pauly's Reagens (diazotierte Sulfanilsäure). Wir haben mit Erfolg das folgende modifizierte Reagens benutzt: 0.9 Sulfanilsäure wurde durch Erwärmung in 9 ml konz. Salzsäure gelöst und auf 100 ml ergänzt. Weitere Lösungen waren: 4.5 % NaNO₂ und 10 % Na₂CO₃. Vor der Verwendung wurden die ersten zwei Lösungen im gleichen Verhältniss gemischt und bis zu 0°–+ 5° abgekühlt. Dieses Gemisch wurde kurz vor der Verwendung mit einer gleichen Menge abgekühlter Sodalösung gemischt. Nach dem Aufspritzen haben sich auf den Platten rote Flecke verschiedener Intensität ge-

formt, selbst an den Stellen, wo die Detektion mit Zimtaldehyd-HCl fast nicht sichtbar war. Die Flecken sind relativ beständig, erst nach einigen Tagen verbleicht die rote Farbe etwas.

Tollen's Reagens. Die Detektion durch einige Verfahren¹³ war weniger erfolgreich, gute Erfolge gab das Verfahren nach PRICE *et al.*¹⁴: das Chromatogramm bespritzt man mit 5 ml 1% AgNO₃ in Methanol, zu dem man 0.4 ml konzentriertes NH₄OH gibt. Nach UV-Bestrahlung aus einer Entfernung von 10 cm waren die Flecken bis zu 3 Min. sichtbar.

Detektion durch stabile Diazotate. Orientierend haben wir 17 Muster von stabilen Diazotaten geprüft und aus ihnen 8 entnommen, mit denen man die Toxindetektion durchführen konnte: *p*-Nitrobenzendiazoaminchlorid (Firma Bayer), Naphthanyl-Blau-Diazosalz (Firma Gurr), Echtröt-GG-Salz, Echtröt TR, Echtröt RC, Echtröt B, Echtröt GG und Echtblau B. Ungefähr 1–2 mg des stabilen Diazotats in 5 ml Wasser wurden zum Bespritzen des Chromatogramms benutzt. Eine folgende Bespritzung wurde mit 0.1 N NaOH unternommen. (Die Verwendung von Ammoniakdampf auch bei beträchtlicher Verdünnung hat sich wegen der diffusen Färbung des Chromatogramms nicht bewährt.)

Alle durch die angewendeten Detektionsweisen gefundenen Flecken waren identisch mit den durch Zimtaldehyd-HCl entstandenen Flecken, nur bei Tollen's Reagens entstehen durch unspezifische Reduktion noch weitere Flecken.

Mustervorbereitung für die Chromatographie: Standard

Für die Gabe des reinen kristallischen α -Amanitins und Phalloidins sind wir Herrn Prof. Dr. THEODOR WIELAND (Max-Planck-Institut, Chemische Abteilung, Heidelberg, B.R.D.) zu Dank verpflichtet.

Die Extrakte aus *Amanita phalloides* wurden auf verschiedene Weise hergestellt: nach WIELAND *et al.*¹¹, später mit unseren verschiedenen Verfahren, von denen das definitive an einer anderen Stelle beschrieben wird¹⁵. (Das Prinzip: Extraktion des Pilzgewebes durch Methanol, Destillation, Verdünnung durch Wasser, Lipidstoffausschüttlung durch Chloroform, Zugabe von wasserfreiem Na₂SO₄, Toxinverdrängung durch (NH₄)₂SO₄, Isopropanolausschüttlung und Lösung des getrockneten Restes im Methanol.) Kleine Pilzmengen verarbeiten wir auf folgende Weise: den frischen Pilz homogenisieren wir mit Wasser, kochen ihn 10–20 Min. und filtrieren. Das kalte Filtrat schütteln wir mit Chloroform aus. Auf 100 ml der abkochten Menge geben wir 40 g wasserfreien Na₂SO₄ und nach Auflösen 20 g (NH₄)₂SO₄, zu. Sobald durch milde Erwärmung auch dieses Salz gelöst wurde, schütteln wir dreimal mit durch wasserfreiem Na₂SO₄ getrockneten Isopropanol aus, und nach Filtrieren verdampfen wir auf dem Wasserbad bis zum Trocknen. Den Rest lösen wir in einer kleinen Menge Methanols auf und chromatographieren.

Parallel wurden Muster aus anderen Pilzen hergestellt.

ERGEBNISSE

Die erreichten Ergebnisse dokumentieren wir durch Farbenphotographien der Chromatogramme und eine anschließende Tabelle IV der R_F -Werte.

Die Art und die Qualität der Platten machen keinen grossen Unterschied und auch die Aktivierung, oder umgekehrt das Belassen der Platten an der Luft äussert sich nicht wesentlich.

TABELLE IV

 R_F -WERTE VON AMANITA-TOXINEN BEI CHROMATOGRAPHIE AUF "SILUFOL"

Abkürzungen: PHD = Phalloidin; AMA = Amanitin. Die in der Säule "Andere (X)" erwähnte bl Farbe ist mit Zimtaldehyd-HCl-Detektion gewonnen.

Muster	Vorbereitung: (Literatur)	α -AMA	β -AMA	γ -AMA	PHD
α -AMA	Standard (Geschenk von Herrn Prof. Dr. TH. WIELAND)	0.64 ± 0.06	—	—	—
PHD	Standard (Geschenk von Herrn Prof. Dr. TH. WIELAND)	—	—	—	0.55 ± 0.0
<i>A. phalloides</i> Ernte 1968 frischer Pilz	nach WIELAND ¹¹	0.65 ± 0.06	0.47 ± 0.08	0.76 ± 0.05	—
<i>A. phalloides</i> Ernte 1969, frischer Pilz	unsere Methode ¹⁵	0.64 ± 0.05	0.48 ± 0.04	} 0.78 ± 0.04	—
<i>A. virosa</i> Ernte 1963 und 1969 getrockneter Pilz	unsere Methode ¹⁵	0.69 ± 0.06	—		—
<i>A. phalloides</i> Ernte 1968 frischer Pilz	Modifikation unseres Verfahrens ^a , siehe Bemerkung ^b	0.65 ± 0.06	0.45 ± 0.05	0.74 ± 0.06	—
<i>A. phalloides</i> Ernte 1968 frischer Pilz	Modifikation unseres Verfahrens ^a , siehe Bemerkung ^c	0.66 ± 0.07	—	—	—
Gesamtwerte:	—	0.65 ± 0.06	0.47 ± 0.06	0.75 ± 0.05	0.55 ± 0.0

^a Modifikation unseres Verfahrens: nach Entfernung von Lipidstoffen durch Chloroform wurde der toxinhaltige wässrige Teil zur Sirupkonsistenz auf dem Vakuumrotationsverdampfer eingedunstet und mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Folgende enthaltene Trockensubstanzen wurden gelagert und endgültig auf verschiedene Weise extrahiert.

^b Die Extraktion der Trockensubstanz Toxine- Na_2SO_4 durch Methanol unter Hitze, Pyridin-Doppel-Extraktion von Rückstand.

^c Die Extraktion der Trockensubstanz Toxine- Na_2SO_4 durch verschiedene Lösungsmittel unter Hitze und auch unter Kühlung (12 Gruppen von verschiedenartig vorbereiteten Mustern).

Von beträchtlicher Bedeutung für die Trennungsqualität ist die Plattengestaltung (einschliesslich der Randmodifikation) und eine einwandfreie Lösungsmittelreinheit. Die Lösungsmittel muss man immer doppelt destillieren und unter Standardbedingungen getrennt lagern, am besten im Kühlschrank (Kühle, Dunkelheit).

Die Reproduzierbarkeit der R_F -Werte der einzelnen Toxine ist verhältnismässig gut. Schlechte Resultate werden vor allem durch wesentlich unterschiedliche Musterkonzentrationen, durch die Menge von Nebenstoffen und Verunreinigungen und auch durch ihr gegenseitiges Verhältniss erhalten.

Aus unserer statistischen Ausarbeitung der R_F -Werte geht hervor, dass die

ere (X)	n					Plattenzahl				
	α -AMA	β -AMA	γ -AMA	PHD	X	α -AMA	β -AMA	γ -AMA	PHD	X
	41	—	—	—	—	15	—	—	—	—
	—	—	—	10	—	—	—	—	3	—
± 0.06	26	20	10	—	7	22	17	9	—	7
± 0.02	39	37	} 4	—	14	13	12	} 4	—	7
	4	—		—	—	3	—		—	—
	46	28	13	—	—	24	12	9	—	—
	93	—	—	—	—	58	—	—	—	—
± 0.06					7					
± 0.02	249	85	27	10	14	135	41	22	3	14

Trennungsfaktoren reproduzierbar sind, unter Vorbehalt möglicher Schwankung in der angewandten Breite.

Das Vergleichen mit einem Standard (reiner Stoff oder Standardextrakt) ist deshalb immer ratsam, besonderes bei der Einführung der Methode.

Grundsätzlich kann man sagen, dass der Chromatographische Nachweis von *A. phalloides* Toxinen auf den Nachweis von Amanitine eingestellt wird. Er ist zweifellos weit empfindlicher und zuverlässiger als der Phallotoxin Nachweis. Farbe und Form der Flecken bei den Amanitinen ist viel charakteristischer. In unserer Anordnung gibt α -Amanitin einen sehr kompakten Flecken, die typische Form des β -Amanitin-

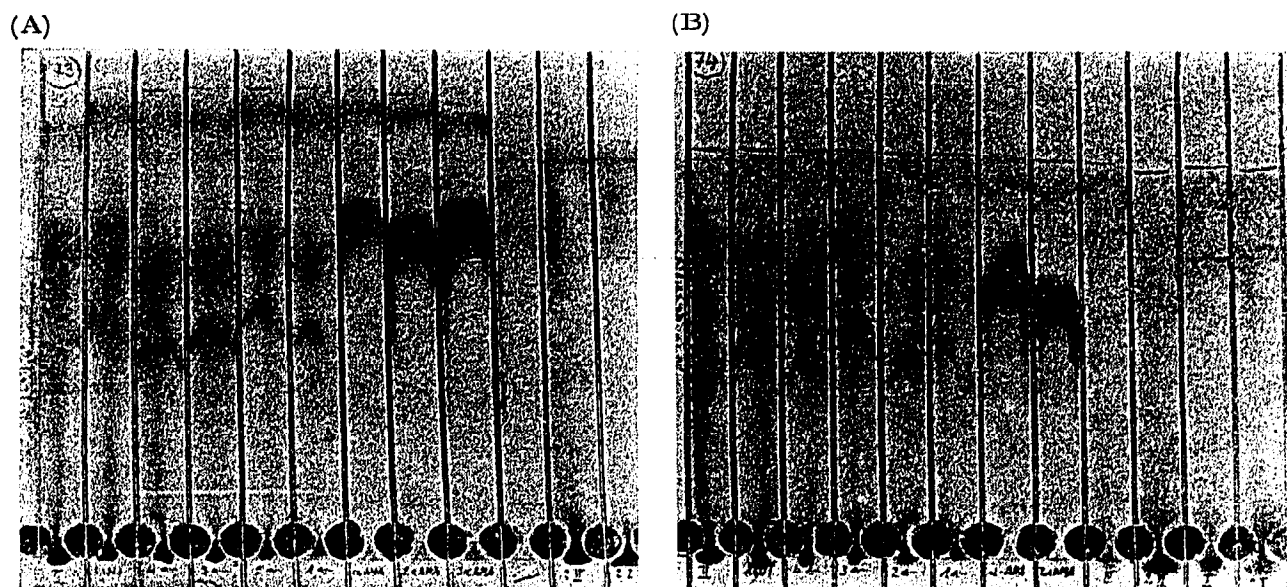


Fig. 3. Photographie von Chromatogrammen. (A) Detektion: Zimtaldehyd-HCl, etwa 15 Min. ausserhalb der HCl-Atmosphäre. 6 Streifen von links: etwa 6, 5, 4, 3, 2 und 1 μ l von dem mit unserer Methode¹⁵ vorbereiteten *A. phalloides*-Extrakt. 1 μ l entspricht hier ungefähr 2 μ g Phalloidin, 1.6 μ g α -Amanitin und 1 μ g β -Amanitin. Weitere drei Streifen: α -Amanitin-Standardlösung 5, 10 und 15 μ g. Drei letzte Streifen: negative Reaktionen. (B) Detektion: Pauly's-Reagens. 6 Streifen von links und die zwei weiteren Streifen, wie bei (A). Weitere Streifen: negative Reaktionen. Auf den Platten waren die Kieselgelrandzonen nicht entfernt ("Randeffekt" beim ersten Chromatogramm).

Fleckens ist das Hufeisen, mit der Konvexität zur Chromatogrammfront gerichtet.

Wir haben eine deutliche Toxinabnahme (vor allem von Phalloidin) in älteren getrockneten Präparaten von *A. phalloides* und auch in einige Jahre alten *A. virosa*-Trockenpräparaten, wo auch β -Amanitin nicht erfasst wurde, festgestellt. (Für die Gabe getrockneter Pilzkörper von *A. virosa* — Pilzernte 1963 — danken wir auf diesen Weg Herrn PhMr KAREL VONEŠ, Apotheke Měřín.) Die Beständigkeit der Toxine ist also nicht unbegrenzt und zeigt sich ausser im schon erwähnten Altern der Trockensubstanz auch beim längeren Sieden in Pyridin. Die Extrakterstellung mit Hilfe von Pyridin empfehlen wir nicht. Zur Toxinabnahme kommt es auch durch langfristiges Stehen von Pyridinextrakten. (Wir haben mit wasserfreiem, doppelt destilliertem Pyridin gearbeitet.)

Die Toxinabnahme haben wir auf den Einfluss der Oxydation bezogen und probeweise die Wirkung des Wasserstoffsperoxyds als Oxydationsmittel bei der Neutralreaktion geprüft. Schon nach kurzer Einwirkung des 2% H_2O_2 (die Endkonzentration) wurde das Verschwinden des blauen Fleckens mit $R_F = 0.20$ aus der Phallotoxinengruppe beobachtet. $Na_2S_2O_3$ in einer Endkonzentration von ca. 5% hatte keinen Einfluss auf die Fleckenintensität noch in Normalextrakten, noch in den Extrakten nach Peroxyd-Behandlung. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie in der erwähnten Anordnung ist es uns nicht gelungen Flecken mit R_F und Farbcharakteristik ähnlich der der Amanita-Toxine, in irgendeinem anderen Knollenpilz nachzuweisen. (Es wurden *A. muscaria*, *A. pantherina* und vor allem die verwandte *A. citrina* geprüft.)

Den Toxinbeweis im Pilz *A. phalloides* erachten wir deshalb als zuverlässig, vorteilhaft und verhältnismässig schnell. Die Ausnutzung von fertigen dünnschicht-

chromatographischen Platten erleichtert die Arbeit sehr. Durch ihre Gestaltung (einschliesslich der Randmodifikation) kann man eine gute Trennung mit ziemlich gut reproduzierbaren R_F -Werten erreichen.

Die Dünnschichtchromatographie gewährt eine verhältnismässig schnelle und zuverlässige Auskunft über das Vorkommen von zyklischen Polypeptiden der Amanitin- und Phalloidin-Typen, unter gewissen Voraussetzungen:

(1) Der Extrakt muss aus frischen Pilzen gewonnen und standardmässig durch Isopropanol Ausschüttlung gereinigt werden.

(2) Im Gegensatz zu RAAEN⁹ benutzen wir handelsübliche chromatographische Platten "Silufol", die sich zu diesem Zwecke ausgezeichnet bewährt haben und die man nicht vor der Verwendung aktivieren muss.

(3) Die Platten gestalten wir einschliesslich der Randmodifikation.

(4) Die bewegliche Phase muss immer frisch aus gereinigten Lösungsmitteln zubereitet werden.

(5) Die Platte ordnen wir bei der Zimtaldehyd-HCl-Detektion immer horizontal mit der Kieselgelschichte zum Spiegel der konz. HCl an.

(6) Für die sichere Identifizierung auf jeder Platte benutzen wir zur Vergleichung Standardextrakt aus *A. phalloides*.

(7) Die zuverlässigste Detektionsart ist mit Zimtaldehyd-HCl, die es erlaubt, ungefähr 1–2 μg des α -Amanitins zu entdecken; die Phallotoxin-Detektion ist viel weniger empfindlich und zuverlässig.

DANK

Wir danken herzlich Frau Dr. med. HEDDA und Herrn Dr. med. NORBERT RÖMHILD aus Leipzig für die sorgfältige Korrektur der deutschen Übersetzung.

ZUSAMMENFASSUNG

Vergleich einiger Methoden und bisheriger Erfahrungen bildeten eine Basis für die Ausarbeitung schneller Verfahren, die mit Hilfe der formierten Fertigplatten "Silufol" (150 × 150 mm, 0.1 mm Kieselgelschicht) und des Systems Methyläthylketon-Methanol (1:1) eine erfolgreiche dünnschichtchromatographische Trennung von Amanita-Toxinen erlauben. Bei Einhaltung der empfohlenen Massnahmen gelten die folgenden R_F -Werte für die einzelnen Toxine: α -Amanitin: 0.65 ± 0.06 ($n = 249$), β -Amanitin 0.47 ± 0.06 ($n = 85$), γ -Amanitin 0.75 ± 0.05 ($n = 27$), Phalloidin 0.55 ± 0.02 ($n = 10$). Ausserdem war es möglich zwei Flecken mit Phallotoxin-Charakter zu identifizieren. Ihre R_F -Werte betragen 0.20 ± 0.02 ($n = 14$) und 0.47 ± 0.06 ($n = 7$). Die Detektion wurde mit Zimtaldehyd-HCl (Empfindlichkeit von 1–2 μg α -Amanitin) und Pauly's Reagens durchgeführt; versuchsweise wurden auch einige stabile Diazotate geprüft.

LITERATUR

- 1 TH. WIELAND, G. SCHMIDT UND L. WIRTH, *Ann. Chem.*, 577 (1952) 215.
- 2 TH. WIELAND UND CH. DUDENSING, *Ann. Chem.*, 600 (1956) 156.
- 3 S. S. BLOCK, R. L. STEPHENS, A. BARRETO UND W. A. MURRILL, *Science*, 121 (1955) 505.
- 4 S. S. BLOCK, R. L. STEPHENS UND W. A. MURRILL, *J. Agr. Food Chem.*, 3 (1955) 584.

- 5 P. CATALFOMO UND V. E. TYLER, Jr., *J. Pharm. Sci.*, 50 (1961) 689.
- 6 G. SULLIVAN, L. R. BRADY UND V. E. TYLER, Jr., *J. Pharm. Sci.*, 54 (1965) 921.
- 7 R. G. BENEDICT, V. E. TYLER, Jr., R. L. BRADY UND L. J. WEBER, *J. Bacteriol.*, 91 (1966) 1380.
- 8 V. E. TYLER, Jr., R. G. BENEDICT, R. L. BRADY UND J. E. ROBBERS, *J. Pharm. Sci.*, 55 (1966) 590.
- 9 H. P. RAAEN, *J. Chromatog.*, 38 (1968) 403.
- 10 P. E. KAMP UND W. M. DE WIT, *Pharm. Weekblad*, 103 (1968) 813.
- 11 TH. WIELAND UND O. WIELAND, *Pharmacol. Rev.*, 11 (1959) 87.
- 12 S. K. ABUL-HAJ, R. A. EWALD UND L. KAZYAK, *New Engl. J. Med.*, 269 (1963) 223.
- 13 *Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie*, E. Merck A.G., Darmstadt, 1968
- 14 T. D. PRICE UND L. S. DIETRICH, *Chromatog. Methods*, 1 (1956) 4.
- 15 V. KULHÁNEK UND V. PALYZA, in Vorbereitung.

J. Chromatog., 53 (1970) 545-558