

CHROM. 5679

CHROMATOGRAPHIE DER AMANITA-TOXINE

II. NEUE METHODE ZUR IDENTIFIZIERUNG VON AMANITA-TOXINEN DURCH DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

VLADIMÍR PALYZA

Institut für Medizinische Chemie, J. E. Purkyně-Universität, Komenius-Platz 2, Brno (Tschechoslowakei)

(Eingegangen am 14. Juli 1971)

SUMMARY

Chromatography of Amanita toxins. II. New method for the identification of Amanita toxins by means of thin-layer chromatography

A study was made of solvent systems for the thin-layer chromatography of toxins from *Amanita phalloides* on commercially prepared plates. The best results were obtained with the system Butyl Cellosolve-25% aqueous ammonia together with 0.2% cinnamaldehyde (the detection reagent as a component of the developing system) on Silufol plates.

The R_F values obtained were: α -amanitin = 0.36 ± 0.04 ($n = 186$), β -amanitin = 0.32 ± 0.03 ($n = 97$), γ -amanitin = 0.51 ± 0.07 ($n = 65$); these were all very compact spots. The fourth spot of amanitin ($R_F = 0.59 \pm 0.03$, $n = 7$) was less sharply defined. The sensitivity of the detection method with cinnamaldehyde-HCl is *ca.* ten-fold that in previously described methods. The limit of detection is $0.05 \mu\text{g}$ of α -amanitin, which is equivalent to *ca.* 1 mg of fresh mushroom.

The procedure described gives an improved separation of toxins, requires much less work and time, and has a higher specificity even in the case of materials containing large amounts of impurities.

EINLEITUNG

Mit der vorliegenden Arbeit knüpfen wir an unsere Mitteilung¹ an, in welcher wir die Trennung von Amanita-Toxinen auf den Fertigplatten Silufol unter Verwendung des Systems Methyläthylketon-Methanol (1:1) nach SULLIVAN *et al.*² beschrieben haben.

Bei der Kontrolle von Rohextrakten aus den Pilzen *Amanita phalloides* (Ernte 1970) hat sich gezeigt, dass der R_F -Wert von β -Amanitin (β -AMA) bei der obenerwähnten Chromatographie bedeutend von der Menge einiger Begleitstoffe—vielleicht Salze—abhängig ist, die sich in den Beginnphasen des Isolationsverfahrens konzentrieren. Die Begleitstoffe haben den β -AMA-Fleck vor sich gepresst, der auf diese Weise die beschriebene hufeisenähnliche Form mit der zur Chromatogrammfront

gerichteten Konvexität bekommen hat. Weiterhin ist es hier zu einem Zusammendrängen von β -AMA-Flecken auf eine kleinere Fläche gekommen. Der Fleck wurde auf diese Weise farbig ausdrucksvoller, was bei dem schrittweisen Verdünnen von Toxinen in der aufgetragenen Probe zu einer irrtümlichen Schlussfolgerung der β -AMA-Überlegenheit führen könnte. (Der β -AMA-Fleck war, noch deutlich, der α -AMA-Fleck nicht mehr.)

Auch die Produktionstechnologie von Silufol-Fertigfolien wurde inzwischen etwas verbessert. Die erwähnten Tatsachen hatten uns gezwungen neue Lösungsmittelsysteme zu suchen.

EXPERIMENTELLES

Lösungsmittelsysteme

Lösungsmittelsysteme wurden durch die Kombination folgender Stoffe zubereitet: Methylalkohol, Isopropylalkohol, *n*-Butylalkohol, Azeton, Methyläthylketon (2-Butanon), Methylpropylketon (2-Pentanon), Diäthyläther, Äthylformiat, Formamid, Dimethylformamid, Diäthanolamin, Dimethylsulfoxid, Chloroform, Dichlormethan, Benzol, Essigsäure, 25% Ammoniak in wässriger Lösung (im Text als NH_4OH angegeben), Methyl-Cellosolve (Äthylenglycolmonomethyläther), Äthyl-Cellosolve (Äthylenglycolmonoäthyläther), Butyl-Cellosolve (Äthylenglycolmonobutyläther) und Wasser.

Von den erwähnten, zumeist redestillierten Stoffen, wurden fast 100 Lösungsmittelgemische zubereitet.

Fertigplatten

Silufol UV₂₅₄ (150 × 150 mm, Schichtdicke 0.1 mm, Stärke als Bindemittel), Produktionsnummer 731.511, 7.904.714, 8.802.712, 8.803.713, 9.539.701 und Silufol ohne UV-Indikator, Nr. 5.839.705 wurden von der Firma Kavalier, Tschechoslowakei, bezogen.

Versuchsweise wurden die Platten Polygram Cel 300 (Macherey, Nagel und Co., Düren, B.R.D.) und Alufolien Kieselgel F₂₅₄ Merck (E. Merck, A.G., Darmstadt, B.R.D.) benutzt.

Plattengestaltung und Probenauftragung

Solange die Platten in die Streifen für Trennung von einzelnen Proben geteilt wurden, sind die Streifen nicht mehr im unteren Teil durch runde Einschnitte nach RAAEN³ verengt. Der Probenauftragungsort ist also die ganze Streifenbreite 15 mm vom unteren Plattenrand entfernt. (Aufgetragen wurde mit halbsteifer Polyäthylenpipette, 5–10 μl .)

Wir haben auch nicht durch Streifen geteilten Platten benutzt. (Punktförmige Auftragung mit Kalibrationskapillare, 2 μl , ebenfalls 15 mm vom unteren Plattenrand. Die gegenseitige Entfernung der einzelnen Proben war 10–15 mm.)

In beiden Fällen wurden die Platten 7–8 mm in die Lösungsmittelschicht eingetaucht und liess man die Laufmittelfront bis zur horizontalen Rille 120 mm vom Start entfernt, wandern. Bei Platten wurden 2-mm breite Kieselgelstreifen an beiden Rändern entfernt.

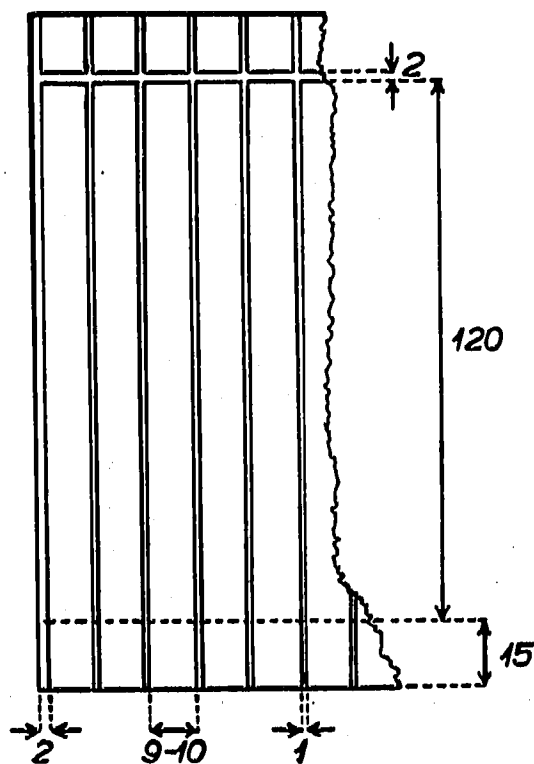


Fig. 1. Schematische Darstellung der in Streifen geteilten Platte.

Vorbereitung von Pilzextrakten

Extrakte aus Amanita phalloides. Die Extrakte wurden wie in der vorigen Mitteilung¹ beschrieben zubereitet.

Orientationstoxinennachweis in 1 g Pilzgewebe. 1 g frisches Pilzgewebe zerreiben wir etwa 1 min lang mit 5 ml Methylalkohol in der Reibeschale. Wir filtrieren, und konzentrieren den methanolischen Extrakt auf einem Wasserbad bis auf 1 ml Volumen. Die Konzentration der Lösung ist auch für die Auftragung von 2- μ l Volumen mit Kalibrationskapillare geeignet.

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

Nachweis

10 ml 1% frisch zubereitete Zimtaldehyd-Lösung in Methanol wurde zum Besprühen der 150 \times 150 mm Platte benutzt. Nach dem Trocknen wurde die Platte 15 min lang HCl-Dämpfen ausgesetzt.

Pauly's Reagens (diazotierte Sulfanilsäure) wurde verwendet in Übereinstimmung mit der vorigen Arbeit¹.

Der Nachweis mit Zimtaldehyd als Bestandteil des Laufmittels wird weiter beschrieben. (Der Zimtaldehyd wurde geliefert von Halewood Chemical Co., Ltd., Great Britain.)

ERGEBNISSE

Trennungssysteme

Von den geprüften Lösungsmittelsystemen waren für Silufol-Platten vor allem die Kombinationen unbrauchbar, die enthielten: Formamid und Dimethylformamid (späteres Loslassen der Kieselgelschicht), weiterhin Chloroform, Dichlormethan, Benzol, Dimethylsulfoxid und Diäthyläther (schlechte Trennung) und Essigsäure (deformierte Chromatogramme).

Methyläthylketon und Methylpropylketon mit höherer Methylalkoholmenge gemischt, zeigten zwei bis drei Amanitin-Flecke, deren R_F -Wert von den Mengen Begleitstoffe abhängig war, was mit der in der Einleitung erwähnten Tatsache übereinstimmt.

Begleitstoffabtrennung war bei den Kombinationen deutlich, die Methyl-, Äthyl- oder Butyl-Cellosolve enthielten. Von diesen Cellosolven war für die weitere Arbeit Butyl-Cellosolve am geeignetsten. Es ergab eine etwas bessere Fleckenunterscheidung und Begleitstoffabtrennung als Methyl- und Äthyl-Cellosolve.

Ungewöhnlich intensive und scharf begrenzte Amanitin-Flecke entstanden mit dem Gemisch Butyl-Cellosolve-25% wässrige Ammoniaklösung.

Die Optimalergebnisse wurden mit dem Gemisch Butyl-Cellosolve-NH₄OH (7:3) erreicht. Die Trennungszeit dauerte fast 2 h. In einigen Fällen wurde jedoch die α -AMA- und β -AMA-Abtrennung nicht erreicht, da beide Flecke in einander überliefen, obwohl in der Probe eine genügende Menge von β -AMA vorhanden war. Bei der statistischen Ergebnissverarbeitung der Chromatographie von 125 Proben wurden folgende R_F -Werte gefunden: α -AMA = 0.33 ± 0.05 ($n = 99$), β -AMA = 0.29 ± 0.05 ($n = 60$) und γ -AMA = 0.43 ± 0.05 ($n = 53$).

Zimtaldehyd als Bestandteil des Trennungssystems

Auf Grund des Befundes des oben angewandten Lösungsmittelsystems wurde noch die Vereinfachungsmöglichkeit von Toxindetektion mit Hilfe Zimtaldehyd-HCl untersucht. Der weitere Grund für die Zugabe von Zimtaldehyd zum Trennungssystem war die Annahme einer möglichen Reaktion zwischen dem Aldehyd und dem Tryptophan-Rest des Toxinmoleküls schon während der Chromatographie. Die R_F -Werte der Reaktionsprodukte sollten von selbstständigen Toxinen zu unterscheiden sein, was zur besseren α - und β -AMA-Fleckenabtrennung bzw. ausgenützt werden könnte.

Dem Trennungssystem wurde Zimtaldehyd in Konzentrationen von 0.1 bis 3% zugegeben. (Das Volumen Butyl-Cellosolve + NH₄OH ist hier als 100% ermesen.) Nach Einlegung der getrockneten Platte in die HCl-Dämpfe (15 min) zeigte Zimtaldehyd in einer Konzentration von 1% und höher ausser violett gefärbten Flecken auch einen diffusen gelben Chromatogramm hintergrund. Schrittweiser Konzentrationsabbau des Zimtaldehyds hat gezeigt, dass die zur Toxindetektion noch genügende Konzentration 0.1% ist. Als Endwert haben wir 0.2% gewählt. Diese Konzentration des Zimtaldehyds war sicher genügend zur Toxindetektion. Der Farbunterschied zwischen dem Hintergrund der entwickelten Platten und der ungefärbten Platten wurde vernachlässigt.

Zimtaldehyd (0.2%) ist im System Butyl-Cellosolve-NH₄OH relativ stabil. Toxinennachweis war noch nach drei Tagen Stehen des Gemisches bei Labortemperatur

TABELLE I

STATISTISCHE AUSWERTUNG VON R_F -WERTEN

System: Butyl-Cellosolve-NH₄OH-Zimtaldehyd.

	Toxin	$R_F (\pm S.D.)$	n
Standard	α -AMA	0.36 (\pm 0.02)	73
Verschieden vorbereitete	α -AMA	0.36 (\pm 0.04)	186
	β -AMA	0.32 (\pm 0.03)	97
Extrakte aus <i>Amanita phalloides</i>	γ -AMA	0.51 (\pm 0.07)	65
	π -AMA	0.59 (\pm 0.03)	7

möglich. Regelmässig haben wir aber das täglich frisch zubereitete System benutzt. Die Chromatographieergebnisse von fünf bis sechs Platten in demselben System während ca. 10–12 h ergaben keine Unterschiede, weder in der Toxinnachweismöglichkeit, noch in den R_F -Werten. Erst Chromatographie nach 24 und mehr Stunden führte zu leichter R_F -Wertenerhöhung und erkennbarer Färbung des Chromatogrammhin-tergrunds.

Mittels der beschriebenen Chromatographie gefundene R_F -Werte von 186 verschiedenen vorbereiteten Proben aus *Amanita phalloides* sind zusammen mit den Werten des α -AMA-Standards in der Tabelle I angeführt.

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, dass man in sieben Fällen sogar den vierten Fleck von Amanitinnatur (π -AMA) identifizieren konnte. Die Trennungszeit dauerte ca. 2¼–2½ h bei 20–23°.

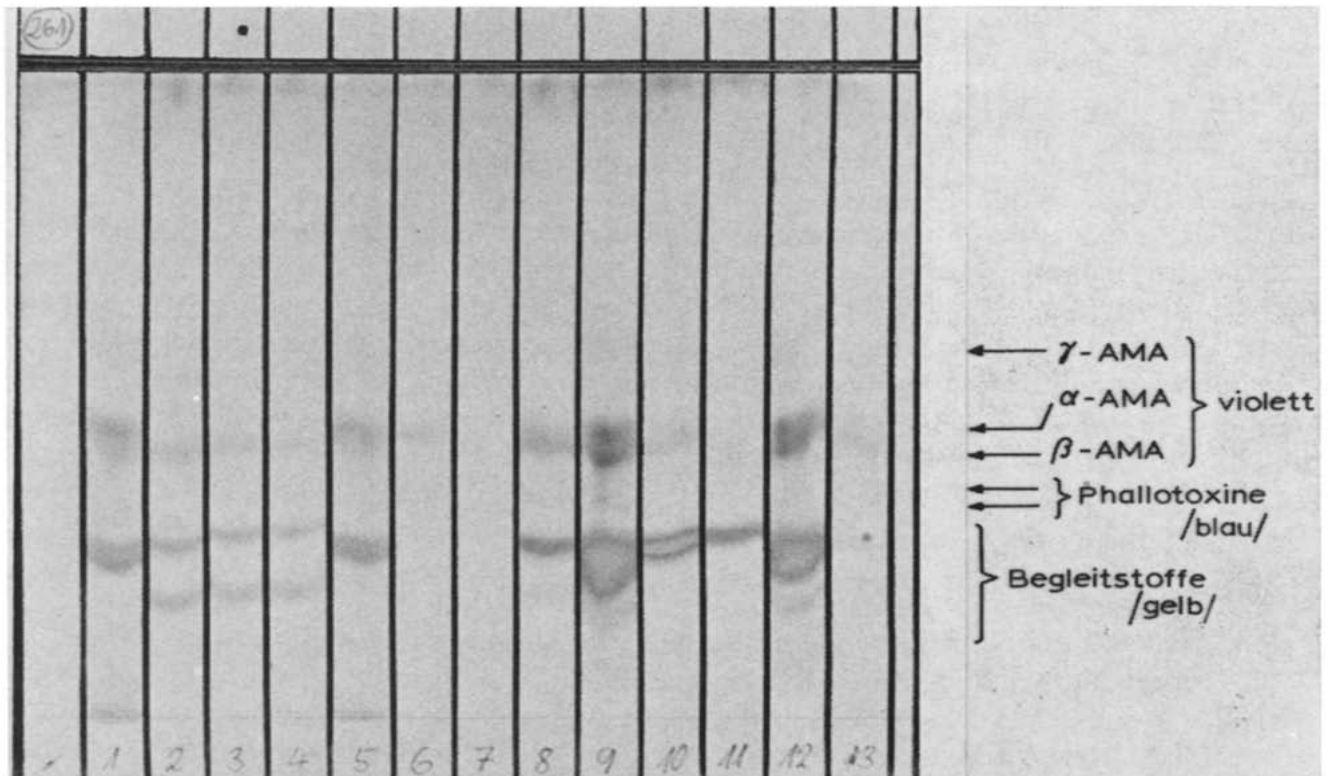


Fig. 2. Die Amanita-Toxinentrennung im System Butyl-Cellosolve-NH₄OH-Zimtaldehyd auf der in Streifen geteilten Platte.

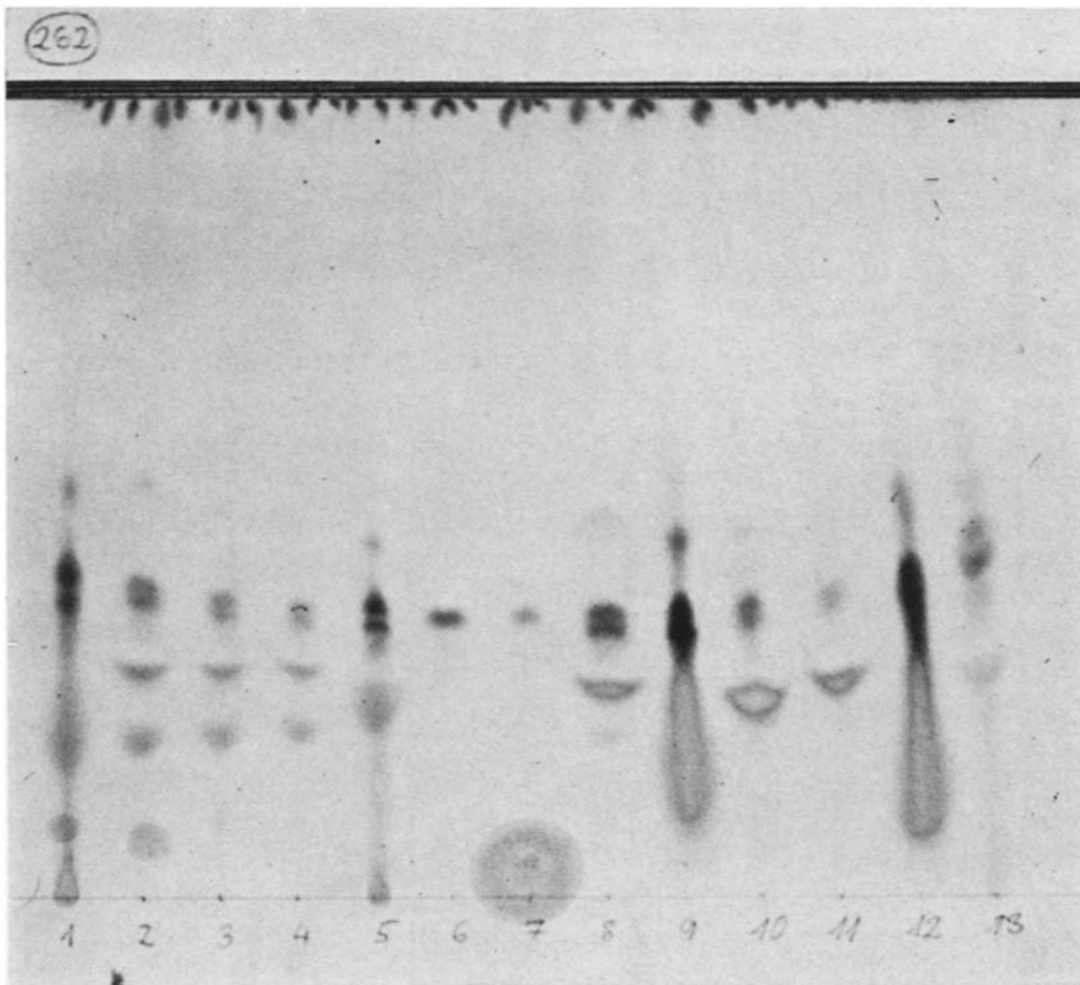


Fig. 3. Die Amanita-Toxinentrennung im System Butyl-Cellosolve- NH_4OH -Zimtaldehyd auf der nicht gestalteten Platte.

Die Amanita-Toxinentrennung dokumentieren wir ausserdem durch Photographien, welche die Chromatographie auf der in Streifen geteilten Platte (Fig. 2) und auf der nicht gestalteten Platte (Fig. 3) zeigt. Auf der Fig. 2 können wir bei den Proben 9 und 12 (höhere Konzentration) ausser drei violetter Amanitinen-Flecke und noch ein bis zwei blaue Phallotoxin-Flecke unterscheiden. Auch die Phallotoxine, die zwischen violetterm β -AMA-Fleck und gelbem Fleck der Begleitstoffe liegen, sind von Begleitstoffen gut getrennt. Die einzelnen Proben wurden verschiedenartig zubereitet, die Proben 6 und 7 sind der α -AMA-Standard (ca. 1.6 und 0.8 μg). Die Chromatogramme wurden etwa 10 min nach Herausnehmen aus der HCl-Atmosphäre photographiert.

Empfindlichkeit der Chromatographie-Methode in Bezug auf den α -Amanitin-Standard

Durch die wiederholte schrittweise Verdünnung und Chromatographie der kristallinen α -AMA-Probe wurde die kleinste Nachweismenge als 0.05 μg α -AMA festgestellt. (Der R_F -Wert des Standards wurde in der Tabelle I angegeben.) Die gefundene Empfindlichkeit ist etwa zehnmal höher als bisher erreicht wurde (siehe Übersicht in Lit. 1). Wenn wir als Nachweisgrenze 0.08 μg α -AMA nehmen, dann

entspricht diese Menge theoretisch 1 mg des frischen Pilzes (durchschnittlicher α -AMA-Gehalt 8 mg%). Die α -AMA-Mengen, die sich 0.1 μ g nähern oder sogar überschreiten, kann man schon mit Sicherheit identifizieren.

DISKUSSION

Die bisherigen chromatographischen Verfahren zur *Amanita*-Toxinentrennung waren aus den verschiedensten Gründen wenig befriedigend, z.B. durch schlechte Fleckenunterscheidung, kleine Fleckenkompaktheit, manchmal beträchtliche R_F -Werte-Schwankungen, Abhängigkeit von verschiedenem Aktivationsgrade der Dünnschicht, Notwendigkeit anspruchsvoller Plattengestaltung. Die Langwierigkeit des Verfahrens wurde durch die Schichtvorbereitung beeinflusst. Fast bei allen bisherigen Methoden war die Abtrennung der Begleitstoffe ein ungelöstes Problem. Diese Stoffe haben die *Amanita*-Toxinenchromatographie beträchtlich beeinflusst. Die Notwendigkeit die Begleitstoffe wenigstens teilweise vor der eigentlichen Chromatographie abzutrennen, hat verhältnismässig viel arbeitsintensive und zeitraubende Verfahren zur Extraktreinigung gefordert. Der Toxinnachweis im angereicherten biologischen Material im Harn war nicht zuverlässig, denn die Toxine konnten bei der Zimtaldehyd-HCl-Detektion mit Stoffe fast gleicher R_F -Werte und ähnlicher Verfärbung verwechselt werden.

Schon bei den ersten Chromatogrammen im System Butyl-Cellosolve-NH₄OH waren die *Amanitinen*- R_F -Werte auffällig übereinstimmend. Ungewöhnlich kompakte Flecke bildeten die schmalen, kurzen Linien, welche auf die Bewegung der mobilen Phase senkrecht wurden. Zusatz von Zimtaldehyd zu diesem System ermöglichte eine bessere α - und β -AMA-Fleckenabtrennung, wahrscheinlich durch Bindung an das Toxinmolekül schon während der Chromatographie.

Gleichzeitiges Studium der Plattenaktivität (auch mit Hilfe der Standardfarbstoffe) hat die Unabhängigkeit des chromatographischen Verfahrens von der Kieselgel-Aktivität gezeigt. Das ist ein weiterer unumstrittener Vorteil der neuen Methode.

Auch die Aufteilung in schmale, 9–10 mm breite Streifen bedeutet Arbeitserleichterung. Obwohl man die Aufmerksamkeit der gleichmässigen Auftragungsart widmen muss, ist dieser Faktor lange nicht so kritisch als früher. Auch bei der punktförmigen Auftragung mit Hilfe der Kalibrationskapillare sind dieselben R_F -Werte gefunden.

Die α - und β -AMA-Fleckenabtrennung ist von der vollkommenen Kammer-sättigung abhängig. Da Butyl-Cellosolve ein relativ wenig flüchtiger Stoff ist, wurde die Kammer immer mit Lösungsmittelsystem gesättigtem Filtrierpapiere ausgelegt. Wegen der langsameren Butyl-Cellosolve-Verdampfung aus den Chromatographieplatten ist die Plattentrocknung mit heisser Luft vorteilhaft.

Die durch diese Methode gewonnene *Amanitin*-Flecke sind ungewöhnlich scharf begrenzt und kompakt. Ähnliche Ergebnisse haben wir weder durch andere Methoden, noch durch das erwähnte System auf den Fertigplatten von anderen Firmen erreicht (Machery, Nagel und Co.; Merck).

Die gegenseitige α - und β -AMA-Fleckennähe hat für die einfache Toxinendetektion einen Vorteil, da sie die *Amanita*-Toxinenanwesenheit betont. Das ist ein Vorteil vor allem bei evtl. Toxinendetektion in biologischem Material. Orientationsverfahren mit Toxinen angereicherten Harn haben gezeigt, dass mit Hilfe des neuen chromato-

graphischen Verfahrens rote Stoffe sicher abgetrennt werden können. (Früher lagen die R_F -Werte dieser Stoffe, welche im biologischen Material bisher Amanita-Toxine vortäuschen konnten, näher bei den Amanita-Toxinen, während jetzt ihre R_F -Werte etwa doppelt so hoch sind.) Wir lösen weiterhin das Detektionsproblem von Amanita-Toxinen im biologischen Material.

Die Verwendung von Zimtaldehyd als Bestandteil des Trennungssystems bedeutet auch Arbeitsverminderung bei dieser Methode. Die Konzentration des Zimtaldehyds für die Detektion ist genügend. Das beweist sowohl die Erscheinung des vierten AMA-Flecks auf einigen Chromatogrammen als auch die etwa $20\times$ grössere Empfindlichkeit für kristallisches α -AMA, im Vergleich mit der vorigen Arbeit¹.

Der in der Einleitung genannte Unterschied der R_F -Werte von β -AMA in rohen und teilweise verarbeiteten Extrakten aus *Amanita phalloides*, bei der in der vorigen Mitteilung¹ beschriebenen Chromatographie war statistisch nicht signifikant; das beweisen folgende Angaben: teilweis gereinigte Toxinextrakte β -AMA = 0.47 ± 0.06 ($n = 85$), rohe Toxinextrakte β -AMA = 0.30 ± 0.04 ($n = 37$). Der ausgerechnete kritische Wert $t = 0.1491$ erreicht nicht den Tabellenwert $\alpha_{0.05} = 1.980$.

Nichtsdestoweniger ist die Tatsache, dass das System zu einer irrtümlichen Schlussfolgerung über die β -AMA-Überlegenheit führen konnte, interessant, denn mit Hilfe von Methyläthylketon-Methanol (1:1) nach SULLIVAN *et al.*² haben TYLER *et al.*⁴ die β -AMA-Überlegenheit in einigen amerikanischen Pilzen bewiesen. (Bei *Amanita phalloides* wurde auf diese Weise entdeckt, dass sie in einigen Staaten der VSA—Washington, Oregon und California—unterschiedliche chemische Art mit der β -AMA-Überlegenheit dargestellt. Bei anderen *Amanita phalloides*-Arten ist die α -AMA-Überlegenheit gewöhnlich.) Bei diesem Studien wurde ein anderer Trägermaterial (Kieselgel G, 0.2 mm) benutzt³. Mit der β -AMA-Detektion in auf diese Weise vorbereiteten Schichten befassen wir uns später.

Das neue System Butyl-Cellosolve-NH₄OH-Zimtaldehyd macht die R_F -Werte praktisch unabhängig von der Art der Extraktvorbereitung, d.h. von den Begleitstoffen.

Wesentliche Qualitätsverbesserung der Amanita-Toxinchromatographie, welche sowohl die Empfindlichkeitserhöhung, als auch einen viel höheren Spezifitätsgrad der Toxinenbeurteilung darstellt, gibt reale Voraussetzung für Studium und Nachweis von diesen Stoffen im biologischen Material. Das hat erstrangige Bedeutung in der Humantoxikologie.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Studie der Lösungsmittelsysteme für die Dünnschichtchromatographie von Toxinen aus *Amanita phalloides* auf kommerziellen Fertigplatten beschrieben. Die besten Resultate wurden mit dem System Butyl-Cellosolve-25% wässrige Ammoniaklösung (7:3) mit 0.2% Zimtaldehyd (= Detektionreagens als Bestandteil des Trennungssystems) auf den Silufol-Platten erreicht.

Die R_F -Werte der sehr kompakten Flecke betragen: α -Amanitin = 0.36 ± 0.04 ($n = 186$), β -Amanitin = 0.32 ± 0.03 ($n = 97$), γ -Amanitin = 0.51 ± 0.07 ($n = 65$); vereinzelt wurde auch der vierte Amanitin-Fleck ($R_F = 0.59 \pm 0.03$, $n = 7$) gefunden. Die Empfindlichkeit der Methode bei der Zimtaldehyd-HCl-Detektion ist

etwa zehnmal so hoch als bisher beschrieben war. Die kleinste Nachweismenge ist $0.05 \mu\text{g}$ α -Amanitin, was ungefähr 1 mg frischen Pilzes entspricht.

Das beschriebene Verfahren erlaubt bei viel kleineren Arbeits- und Zeitaufwendungen eine verbesserte Toxinentrennung und daher auch eine Nachweisspezifitätserhöhung in Materialien mit einem grossen Anteil an fremden Ballaststoffen.

LITERATUR

- 1 V. PALYZA UND V. KULHÁNEK, *J. Chromatogr.*, 53 (1970) 545.
- 2 G. SULLIVAN, L. R. BRADY UND V. E. TYLER, JR., *J. Pharm. Sci.*, 54 (1965) 921.
- 3 H. P. RAAEN, *J. Chromatogr.*, 38 (1968) 403.
- 4 V. E. TYLER, JR., R. G. BENEDICT, R. L. BRADY UND J. E. ROBBERS, *J. Pharm. Sci.*, 55 (1966) 590.

J. Chromatogr., 64 (1972) 317-325