

CHROM. 643I

Note

Chromatographie der Amanita-Toxine

III. Nachweis der Amanitine mit Phosphorsäure

Im Mai 1972 hat BOCTOR¹ den Nachweis von Tryptophan (Trp), Indol und Indol-3-Essigsäure auf dem Dünnschichtchromatogramm mit Hilfe von Phosphorsäure beschrieben. Weil bisher keine Reaktionen der Phosphorsäure mit in den Peptiden gebundenem Trp beschrieben wurden und weil Amanita-Toxine ein selten vorkommendes im Molekül gebundenes Trp enthalten (siehe Text), wurde der Nachweis der Amanita-Toxine mit Phosphorsäure studiert.

Material und Methode

Butyl-Cellosolve (Äthylenglycolmonobutyläther) und reiner Äthylalkohol waren von der Firma Lachema (Č.S.S.R.), 85% sirupartige Phosphorsäure und 25% wässriges Ammoniak hat die Firma E. Merck (B.R.D.) geliefert. Fertigplatten Silufol® UV₂₅₄ (150 × 150 mm, Kieselgelschichtdicke 0.1 mm, Stärke als Bindemittel), Produktionsnummer 305.014, und Silufol® ohne UV-Indikator, Nr. 202.429, wurden von der Firma Kavalier (Č.S.S.R.) bezogen.

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.

Die Chromatographie der Extrakte aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) wurde im System Butyl-Cellosolve-25% Ammoniak (7:3) auf den Fertigplatten Silufol® so, wie in der vorigen Mitteilung² beschrieben wurde, durchgeführt. (Das Zimtaldehyd als Bestandteil des Trennungssystems wurde nicht benutzt).

Zum Besprühen von chromatographischen Platten wurden frisch zubereitete Phosphorsäure-Lösungen benutzt. Es folgte Warmlufttrocknung und Plattenerwärmung auf 110° auf verschieden lange Zeitabschnitte.

Ergebnisse und Diskussion

Die Chromatogramme mit den Pilzextrakten und mit dem α -Amanitin-Standard (α -AMA) zeigten, dass sich in gegebener Anordnung die Amanitine (AMA) mit Phosphorsäure als feine graublau bis blauviolette Flecke färbten, die in 3-5 min nach der Plattenabkühlung an der Luft verschwanden.

Die Optimalkonzentration der alkoholischen Lösung, in Übereinstimmung mit BOCTOR¹, war 20%. Zum Besprühen einer Platte wurde 8.5 ml dieser Lösung benutzt. Die vorteilhafteste Erwärmungszeit vom Chromatogramm bei 110° beträgt 15-20 min. Die alkoholische Lösung H₃PO₄ muss vorher getrocknet werden. Eine längere Chromatogrammerwärmung führt zum milden Braunwerden des Hintergrundes, welches hauptsächlich die Bewertung der weniger intensiven AMA-Flecke verschlechtert. (BOCTOR¹ gibt eine längere Erwärmungszeit—40 min—an, die Temperatur ist jedoch identisch.)

Als Lösungsmittel für die Phosphorsäure kann man nicht nur reines Äthanol,

sondern auch z.B. Methanol oder Azeton benutzen. Dieselben Ergebnisse erreichten wir auch mit ca. 96%-igem Äthanol, das durch 1% Benzin denaturiert wurde. Die wässrige Lösung der Orthophosphorsäure dagegen bot nur eine schwache Farbreaktion. Mit der wässrigen Lösung der Meta- oder Pyrophosphorsäure boten die Toxine keine Farbreaktionen.

Das Chromatogramm kann man nach dem H_3PO_4 -Nachweis mit Zimtaldehyd/HCl (ZA/HCl), das ist Besprühen mit 1% Zimtaldehyd in Methanol, 15 min in der HCl-Atmosphäre (siehe Lit. 2), färben. So wurde gefunden, dass in der Nähe der α - und β -AMA-Flecke noch ein anderer Stoff vorkommt, der sich in gegebener Anordnung mit H_3PO_4 , aber nicht mit ZA/HCl, färbt. Durch eine Wiederholung der Chromatographie ist es möglich, eine gute Abtrennung des neuen "X"-Flecks zu erreichen, wie aus Tabelle I ersichtlich ist. Bei der Wiederchromatographie von konzentrierten Proben (wenn man γ -AMA nachweisen kann), wurde es möglich, auch einen weiteren, weniger intensiven Fleck "Y" nachzuweisen.

TABELLE I

DIE R_F -WERTE BEI WIEDERHOLTER ENTWICKLUNG MIT BUTYL-CELLOSOLVE-25% AMMONIAK (7:3) UND DIE FARBREAKTIONEN

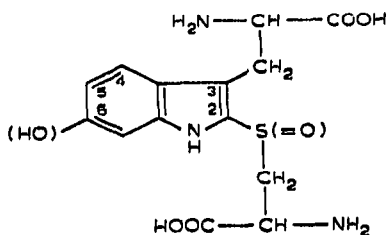
	$R_F (\pm S.D.)$	n	H_3PO_4 -Nachweis		Nachweis mit Paulys oder Millons Reagens
			Farbe nach 15 min bei 110°	Verschwanden des Flecks nach	
α -AMA	0.40 \pm 0.04	103	} graublau bis blauviolett	} 3-5 min	} +
β -AMA	0.34 \pm 0.05	69			
γ -AMA	0.51 \pm 0.04	64			
X	0.65 \pm 0.03	105	rostpurpur (bei längerer Erwärmung blauviolett)	2-3 Tage	—
Y	0.77 \pm 0.04	27	rostpurpur	3-5 min	—

Der Farbton der Trp und AMA-Flecke nach dem Orthophosphorsäure-Nachweis war fast identisch. Nach dem Verschwinden des blauvioletten Flecks an der Luft (zeitweise eine rotbraune Farbe) und nach wiederholter Erwärmung (15 min, 110°) erschien wieder ein blauvioletter Fleck bei Trp, während die AMA-Flecke nicht reagiert haben.

Der AMA-Nachweis mit Hilfe von H_3PO_4 ist ungefähr drei- bis fünfmal empfindlicher als der ZA/HCl-Nachweis, er ist aber weniger empfindlich als der Nachweis mit Paulys oder Millons Reagens (festgestellt durch allmähliche Verdünnung von rohen Pilzextrakten). Die mit H_3PO_4 gefärbten AMA-Flecke sind aber, was die Farbe anbelangt, weniger deutlich als bei dem ZA/HCl-Nachweis.

Die Amanitine sind bityklische Oktapeptide, die Phallotoxine bityklische Heptapeptide. Die Doppelring-Struktur ist bei den beiden Toxinengruppen durch die Bindung zwischen dem Trp und dem Cystein mittels Schwefelbrücke erreicht. Diese Verbindung wurde Tryptathionin³ genannt (Fig. 1).

Auf den Silufol®-Platten haben wir in der gegebenen Anordnung die blauviolette Färbung nicht nur für die AMA (einschliesslich α -AMA-Standard), sondern auch für das Trp, bei welchem Boctor¹ die Purpurfarbe beschrieben hat, erhalten.



(In Klammern die bei den Amanitinen⁴ anwesenden Substituenten.)

Fig. 1. Tryptathionin.

Die abweichende Färbung hängt offenbar mit dem ungleichen Kieselgelträger und dem ungleichen Schichtbindemittel zusammen. Die Phallotoxinenreaktion mit H_3PO_4 ist wahrscheinlich. In gegebener Anordnung konnte man nicht ohne Standard entscheiden, ob der X- oder eventuell Y-Fleck zu den Phallotoxinen gehört oder nicht.

Wir sind der Meinung, dass die leicht erhältliche Orthophosphorsäure auch zum Nachweis von anderen Trp-Peptiden Verwendung finden wird.

*Institut für Medizinische Chemie,
J. E. Purkyně-Universität,
Komenského nám. 2,
662 43 Brno (Tschechoslowakei)*

VLADIMÍR PALYZA

- 1 F. N. BOCTOR, *J. Chromatogr.*, 67 (1972) 371.
- 2 V. PALYZA, *J. Chromatogr.*, 64 (1972) 317.
- 3 T. WIELAND, K. FRETER UND E. GROSS, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 626 (1959) 154.
- 4 T. WIELAND, *Naturwissenschaften*, 59 (1972) 225.

Eingegangen am 25. September 1972