

Das Vorkommen von Amavadin in Pilzen der Gattung *Amanita*

Occurrence of Amavadin in Mushrooms of the Genus *Amanita*

Eckhard Koch,* Helmut Kneifel** und Ernst Bayer*

* Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

** Institut für Biotechnologie der Kernforschungsanlage, Postfach 1913, D-5170 Jülich, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **42c**, 873–878 (1987); received January 12, 1987

Vanadium, Amavadin, *Amanita*, Mushrooms

The vanadium content of different mushrooms of the genus *Amanita* was measured by atomic absorption spectroscopy. *Amanita regalis* and *Amanita velatipes* showed high levels of vanadium comparable with the level present in the fly agaric *Amanita muscaria*. Electron paramagnetic resonance and high pressure liquid chromatography showed that in these three species amavadin, a vanadium(IV) complex with two *N*-hydroxy-2,2'-imino dipropionate ligands, was present. In the other species examined, only low levels of vanadium were found.

Natürlich vorkommende Vanadiumverbindungen haben mit dem Nachweis einer Vanadium-Nitrogenase [1] in *Azotobacter chroocum* an Aktualität gewonnen. In diesem Zusammenhang kann das einen stickstoffhaltigen organischen Liganden enthaltende Amavadin als einzige bisher rein isolierte und in der Struktur aufgeklärte Vanadiumverbindung von Interesse sein.

Vanadium wurde erstmals 1931 von Ter Meulen im Fliegenpilz, *Amanita muscaria*, nachgewiesen [2]. 1972 beschrieben Bayer und Kneifel die Isolierung eines niedermolekularen Vanadiumkomplexes aus *Amanita muscaria*, dem sie den Namen Amavadin gaben. Amavadin ist ein Komplex von Vanadium(IV) mit zwei *N*-Hydroxy-2,2'-iminodipropionatlignanden [3, 4]. *N*-Hydroxy-2,2'-iminodipropionsäure ist ein ungewöhnlich selektiver Komplexbildner für Vanadium in der Oxidationsstufe +IV [5, 6]. Weitere Untersuchungen zeigten, daß in anderen Pilzen, auch der Gattung *Amanita*, weitaus weniger Vanadium enthalten ist als in *Amanita muscaria* [7, 8]. Meisch, Reinle und Schmitt [9] berichteten jedoch 1979 über hohe Vanadiumgehalte in *A. regalis*, einem nahen Verwandten von *A. muscaria* und *A. velatipes*, einem nordamerikanischen Verwandten von *A. pantherina*. Die Frage nach dem Vorkommen von Amavadin in diesen, wie auch in anderen Pilzen, ist daher von Interesse. Der Gesamtvanadiumgehalt der untersuchten Pilze wurde zunächst mittels Atomabsorption bestimmt. Wegen der höhe-

ren Empfindlichkeit wurde die Graphitrohrfentechnik benutzt [10]. Die ausgeprägte Tendenz von Vanadium zur Bildung schwerflüchtiger Carbide macht die Verwendung von pyro-beschichteten Graphitrohren unumgänglich [11]. Der Nachweis von Amavadin erfolgt mittels Elektronenspinresonanz und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.

Experimentelles

Verwendete Geräte

Atomabsorption: Perkin Elmer, Model 2238 mit HGA 400 ESR; Varian E-lien Century und Varian E 12.

HPLC-Bedingungen: Die Trennung erfolgte an einer mit ODS-1 (LATEK, 5 µm-Partikel) gefüllten Stahlsäule (15 × 0,4 cm) unter Verwendung eines Gemisches von 20% Acetonitril und 80% einer wäßrigen Lösung (10 mM) von Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, einer Pumpe 6000 A (WATERS) und eines automatischen Injektors (WISP, Fa. WATERS, Injektionsvolumen = 10 µl). Die Flußrate betrug 1 ml/min bei Raumtemperatur. Das Eluat wurde mit einem Photodiodenarray-Detektor (1040, HEWLETT-PACKARD; λ = 235 nm) gemessen, die Identität der Amavadinpeaks wurde durch Vergleich der aufgenommenen Spektren (200–400 nm) abgesichert.

Aufschluß der Pilzproben für AAS

Etwa 10 bis 50 mg des im Hochvakuum getrockneten Pilzes werden genau abgewogen, mit 1 ml konzentrierter Salpetersäure (Suprapur, Merck) versetzt und 4 Std. im Druckaufschluß-System nach Tölg auf

Reprint requests to Prof. Dr. E. Bayer.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/87/0700–0873 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

150 °C erhitzt. Die Lösung wird mit Wasser auf 10 ml verdünnt und direkt für die Analyse benutzt.

Extraktion von Amavadin aus Pilzen

10 bis 20 mg der getrockneten und pulverisierten Pilzproben werden genau abgewogen, mit 500 µl Reinstwasser versetzt und 60 Min. bei 60 °C inkubiert. Die Lösung wird über Glaswolle und anschließend über eine C-18-Kartusche (Baker) filtriert. Der Rückstand wird nochmals mit 500 µl Wasser extrahiert und die Lösung über dieselbe Glaswolle und dieselbe Baker-Kartusche filtriert. Das Volumen der vereinigten Eluate wird gemessen und jeweils 50 µl werden für die Chromatographie benutzt.

Ergebnisse

Der Gesamtvanadiumgehalt verschiedener Spezies von *Amanita muscaria* ist in Tab. I zusammengefaßt. Tab. II gibt einen Überblick über die Vana-

diumgehalte der anderen untersuchten *Amanita*-Arten.

Tab. I. Vanadiumgehalt im Fliegenpilz [*Amanita muscaria* (L. ex Fr.) Hooker] in mg/kg Trockengewicht.

Fundort		
Schönbuch 1985	77 ± 5	(H)
	85 ± 2	(S)
	213 ± 4	(K)
Schönbuch 1984	128 ± 18	(H)
	94 ± 4	(S + K)
Finnland 1985	85 ± 6	(H)
	107 ± 11	(S + K)
Massif Central/Frankreich 1983	36 ± 2	(F)
Frankreich 1977	201 ± 23	(F)
Gelbe Variante Michigan/USA	120 ± 2	(H)
	218 ± 13	(S + K)

H = Hut, S = Stiel, K = Knolle, F = gesamter Fruchtkörper.

Tab. II. Vanadiumgehalt in einigen Pilzen der Gattung *Amanita* in mg/kg Trockengewicht.

Art	Fundort	
<i>A. citrina</i> (Schff.)	Schönbuch	1,9 ± 0,6 (H)
S. F. Gray		1,2 ± 0,7 (S + K)
<i>A. citrina</i> (Schff.)	Niederlande	<1 (H)
S. F. Gray var. <i>alba</i> (Gill.)		<1 (S + K)
<i>A. citrina</i> (Schff.)	Niederlande	<1 (H)
S. F. Gray var. <i>citrina</i>		2,4 ± 0,3 (S + K)
<i>A. crocea</i> (Quél.) Singer	Wales, Great Britain	<1 (H)
		<1 (S + K)
<i>A. eliae</i> (Quél.)	—	<1 (H)
		1,7 ± 0,1 (S + K)
<i>A. frostiana</i> (Peck)	New Hampshire USA	1,4 ± 0,8 (H)
		1,2 ± 0,2 (S + K)
<i>A. frostiana</i> (Peck)	USA	<1 (H)
		<1 (S + K)
<i>A. gemmata</i> (Fr.) Gill	Niederlande	<1 (H)
		<1 (S + K)
<i>A. gemmatoides</i>		<1 (H)
		1,4 ± 0,4 (S + K)
<i>A. hyperborea</i> P. Karst.	Finnland	<1 (H)
		3,9 ± 1,7 (S + K)
<i>A. parviovata</i> (Peck)	Alabama/USA	1,1 ± 0,2 (H)
E. J. Gilb.		6,1 ± 0,9 (S + K)
<i>A. regalis</i> (Fr.)	Finnland	98 ± 6 (H)
		122 ± 7 (S + K)
<i>A. rubescens</i> (Pers. ex Fr.)		8,5 ± 0,5 (H)
S. F. Gray	Niederlande	1,1 ± 0,1 (S + K)
<i>A. rubescens</i> (Pers. ex Fr.)	Frankreich	<0,5 (H)
S. F. Gray	Frankreich	1,7 ± 0,9 (H)
		4,5 ± 0,8 (S)
<i>A. velatipes</i> Atk.	Michigan/USA	257 ± 4 (H)
		377 ± 20 (S + K)
<i>A. wellsii</i> (Murr.) Sacc.	Massachusetts USA	2,5 ± 2,4 (H)
		5,0 ± 1,0 (S + K)
	Massachusetts USA	1,6 ± 0,2 (H)
		6,1 ± 1,7 (S + K)

H = Hut, S = Stiel, K = Knolle.

Der Vanadiumgehalt in *A. muscaria* ist außerordentlich starken Schwankungen unterworfen und variiert von 36 bis 220 mg/kg Trockengewicht. Dabei zeigen Stiel und Knolle eine höhere Akkumulation als der Hut. Von den anderen untersuchten Spezies treten nur in *A. regalis* (98 (Hut) und 122 (Stiel + Knolle) mg V/kg Trockengewicht) und in *A. velatipes* (257 (Hut) und 377 (Stiel + Knolle) mg V/kg Trockengewicht) erhöhte Vanadiumgehalte auf. In allen anderen untersuchten Arten ist der Vanadiumgehalt wesentlich geringer. Die Ergebnisse stimmen gut mit den Werten von Meisch, Reinle und Schmitt [8, 9] überein.

Einen ersten Hinweis auf die Struktur der Vanadiumkomplexe in *A. regalis* und *A. velatipes* geben die Elektronenspinresonanzspektren (ESR). Elektronenspinresonanz ist eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis und zur Charakterisierung von Vanadium(IV)komplexen und wurde bereits früher für Untersuchungen an *A. muscaria* benutzt [12, 13]. Teile des Pilzes können sowohl im frischen, wie auch getrockneten Zustand direkt untersucht werden. Die Nachweisempfindlichkeit für getrocknetes Material liegt unter 5 mg V(IV)/kg. Elektronenspinresonanzspektren von getrockneten Teilen von *A. muscaria*, *A. velatipes* und *A. regalis* zeigt Abb. 1. Die Spek-

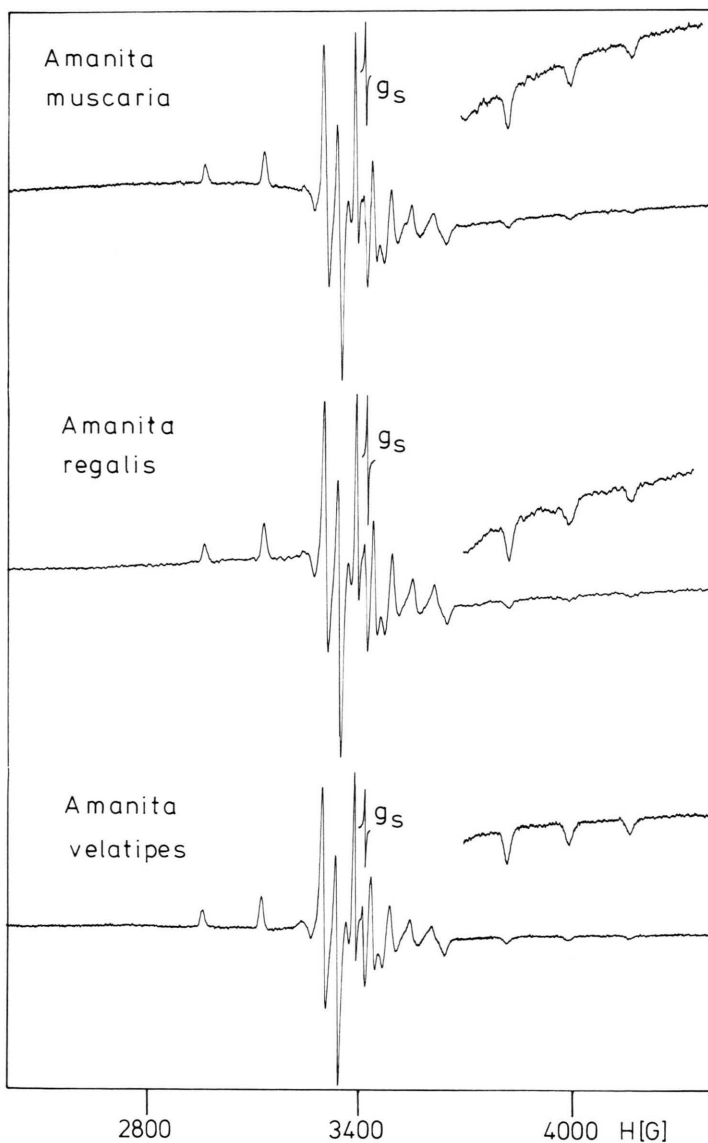


Abb. 1. Elektronenspinresonanzspektren der getrockneten Proben von *A. muscaria*, *A. regalis* und *A. velatipes*, X-Band, Modulationsfrequenz 25 kHz, Mikrowellenenergie 5 mW, Modulationsamplitude 2 G, $T = 298$ K.

tren sind sehr ähnlich, und die experimentellen Elektronenspinresonanzparameter stimmen innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen völlig überein (vergleiche Tab. III). Proben von *A. frostiana*, *A. hyperborea*, *A. rubescens* und *A. wellsi*, die geringfügig erhöhte Vanadiumgehalte besitzen, wurden ebenfalls untersucht. Die Elektronenspinresonanzspektren geben jedoch keinen Hinweis auf das Vorhandensein von paramagnetischen Vanadiumspezies.

Eine quantitative Bestimmung von Amavadin in dem untersuchten Pilzmaterial ist durch Hochlei-

stungsflüssigkeitschromatographie möglich. Optimal für eine Extraktion aus der biologischen Matrix ist eine einstündige Behandlung mit Wasser bei leicht erhöhter Temperatur. Nach Filtrieren ist die Lösung direkt für die Chromatographie verwendbar. Durch Einspritzen definierter Mengen und Integration des Amavadinpeaks ist eine Quantifizierung möglich. Die Eichung erfolgt mittels synthetischem Amavadin. Ein typisches Chromatogramm zeigt Abb. 2.

In allen untersuchten Proben von *A. muscaria* tritt nach 7,3 Min. ein Peak auf. Die Retentionszeit und das mit Hilfe eines Photodiodenarraydetektors aufgezeichnete Ultraviolettpektrum sind vollkommen mit einer Probe von synthetischem Amavadin identisch. Auch in Proben von *A. regalis* und *A. velatipes* tritt ein entsprechender Peak auf. In den Proben von *A. rubescens*, *A. parviculata* und *A. wellsi* treten nach einer Retentionszeit von etwa 7 Min. mehrere sehr kleine Peaks auf, die aber nicht vollständig getrennt sind. Wegen des zu hohen Untergrundes und der wenig charakteristischen Ultraviolettpektren ist unklar, ob es sich hierbei um Amavadin handelt. Die Konzentration ist in diesen Pilzen aber mit Sicherheit kleiner als 2 mg/kg Trockengewicht. Die Ergebnisse der quantitativen Messungen für *A. muscaria*, *A. regalis* und *A. velatipes* sind in Tab. IV zusammengefaßt. Zusätzlich sind in Tab. IV die Gesamtvanadiumgehalte aufgenommen, die durch Atomabsorption bestimmt wurden.

Tab. III. Elektronenspinresonanzparameter von synthetischen Amavadin und der Vanadium(IV)-Komplexe in einigen Pilzen. X-Band sämtliche Werte nicht korrigiert nach 2. Zuordnung.

Probe	$A_{ }$ [G]	$g_{ }$	A_{\perp} [G]	g_{\perp}
Amavadin, synthetisch	170,0	1,929	51,6	1,990
<i>A. muscaria</i>	170,7	1,928	50,5	1,990
<i>A. muscaria</i>	170,8	1,926	53,6	1,993
<i>A. muscaria</i>	171,4	1,923	53,7	1,993
<i>A. muscaria</i>	169,9	1,923	50,4	1,992
<i>A. regalis</i> (H)	169,3	1,929	52,1	1,992
<i>A. regalis</i> (S + K)	169,3	1,929	51,4	1,993
<i>A. velatipes</i> (H)	168,9	1,923	50,5	1,992
<i>A. velatipes</i> (S + K)	170,0	1,923	49,2	1,993

H = Hut, S = Stiel, K = Knolle.

Tab. IV. Amavadin- und Gesamtvanadiumgehalt in den Pilzen *A. muscaria*, *A. regalis* und *A. velatipes*.

Art	Fundort	Teil	Amavadin ^a [mg/kg TG]	Vanadium ^b aus Amavadin [mg/kg TG]	Gesamtvanadium ^c [mg/kg TG]
<i>A. muscaria</i>	Finnland	H	127	16	85
	1985	S + K	163	20	107
<i>A. muscaria</i>	Schönbuch	H	119	15	77
	1985	S	143	17	85
		K	369	45	213
<i>A. muscaria</i>	Michigan	H	135	16	120
Gelbe Variante	USA	S + K	278	34	218
<i>A. regalis</i>	Finnland	H	147	18	98
	1966	S + K	202	15	122
<i>A. velatipes</i>	Michigan	H	195	24	257
	USA	S + K	457	56	377

TG = Trockengewicht, H = Hut, S = Stiel, K = Knolle.

^a Bestimmt durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.

^b Berechnet aus dem Wert für Amavadin.

^c Bestimmt durch Atomabsorption.

File: RAWDAT

Date: 04/02/1986

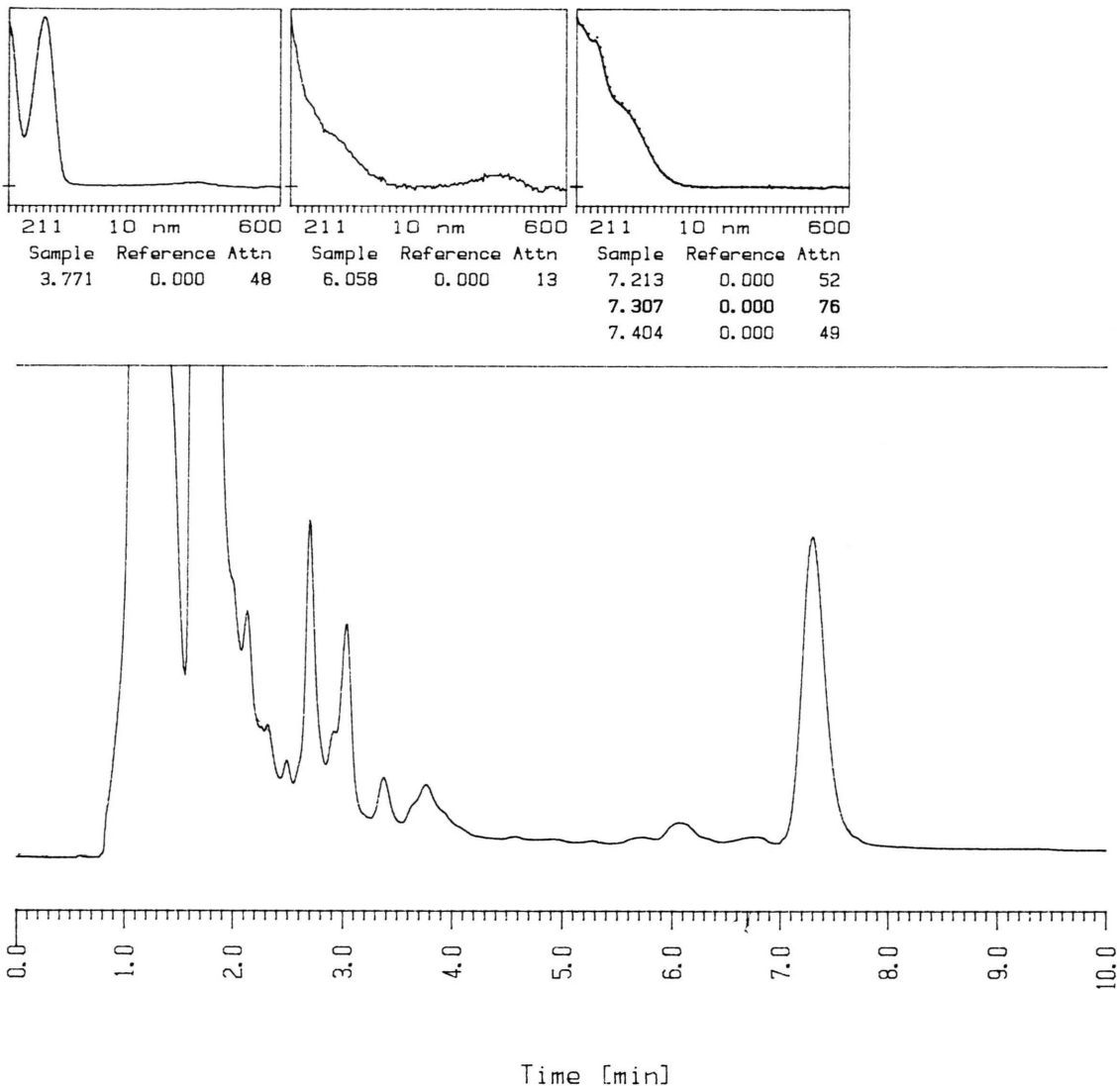


Abb. 2. Nachweis von Amavadin in einem Pilzextrakt aus *Amanita muscaria* mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Bedingungen siehe exp. Teil).

Diskussion

Amanita regalis und *A. velatipes* besitzen hohe, dem Fliegenpilz, *A. muscaria*, vergleichbare Vanadiumgehalte. Elektronenspinresonanz- und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie belegen eindeutig

das Vorkommen von Amavadin in diesen Pilzen. In anderen Pilzen der Gattung *Amanita* kommt wesentlich weniger Vanadium vor. Amavadin kann nicht nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, daß Amavadin in *Amanita muscaria*, *A. regalis* und

A. velatipes nur etwa 10–20% des totalen Vanadiumgehaltes dieser Pilze ausmacht. Mehrere Gründe sind hierfür denkbar:

1. eine unvollständige Extraktion von Amavadin aus der biologischen Matrix, 2. eine teilweise Zersetzung des vorhandenen Amavadins und 3. das Vorkommen weiterer Vanadiumspezies in diesen Pilzen. Die ersten beiden Möglichkeiten erscheinen uns als am wahrscheinlichsten. Bei den in dieser Untersuchung benutzten Pilzen handelte es sich ausschließlich um getrocknetes Herbarmaterial, welches zum Teil bereits mehrere Jahre alt war. Amavadin ist an Luft nur mäßig beständig. Die Beständigkeit in biologischer Matrix ist unbekannt. Bei der Isolierung aus frischen Pilzen werden aus 1 kg *A. muscaria* etwa 40 mg Amavadin erhalten [2]. Dies entspricht etwa 50% des totalen Vanadiumgehaltes des Pilzes. Die-

ser Wert liegt wesentlich höher, als die in dieser Arbeit an getrockneten Pilzen gemessenen Amavadin-konzentrationen. Die bisher von uns an *A. muscaria* durchgeführten Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf das Vorkommen anderer Vanadiumspezies in diesem Pilz.

Dank

Die untersuchten Pilze wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Bas, Rijksherbarium, Leiden, Niederlande, Prof. Dr. H. E. Bigelow, Universität von Massachusetts, Amherst, USA, Prof. Dr. T. Ulvinen, Universität von Oulu, Oulu, Finnland; Prof. Dr. D. Lamoure, Universität von Lyon, Villeurbanne, Frankreich, und Dr. Kost, Institut für Botanik, Universität Tübingen.

- [1] R. L. Robson, R. R. Eady, T. H. Richardson, R. W. Miller, M. Hawkins, J. R. Postgate, *Nature* **322**, 388 (1986).
- [2] H. Ter Meulen, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **50**, 491 (1931).
- [3] E. Bayer and H. Kneifel, *Z. Naturforsch.* **27B**, 207 (1972).
- [4] H. Kneifel und E. Bayer, *Angew. Chem.* **85**, 542 (1973); *J. Amer. Chem. Soc.* **108**, 3075 (1986).
- [5] G. Anderegg, E. Koch und E. Bayer, Poster auf der XXIV International Conference on Coordination Chemistry, August 1986, Athen, Griechenland.
- [6] G. Anderegg, E. Koch und E. Bayer, *Inorganica Chimica Acta* **127**, 183 (1987).
- [7] D. Bertrand, *Bull. Amer. Museum Nat. History* **94**, 409 (1950).
- [8] H. U. Meisch, J. A. Schmitt und W. Reinle, *Z. Naturforsch.* **33C**, 1 (1978).
- [9] H. U. Meisch, W. Reinle und J. A. Schmitt, *Naturwissenschaften* **66**, 620 (1979).
- [10] B. Welz, *Atomabsorptionsspektroskopie*, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim 1983.
- [11] D. C. Manning und W. Slavin, *Spectrochimica Acta* **40B**, 461 (1985).
- [12] P. Krauß, E. Bayer und H. Kneifel, *Z. Naturforsch.* **39B**, 829 (1984).
- [13] R. D. Gillard und J. R. Lancashire, *Phytochemistry* **23**, 179 (1984).