Isolierung und Charakterisierung einiger saurer Gifte des grünen Knollenblätterpilzes

DIPLOMARBEIT

vorgelegt von
Stefan Welch
Heidelberg 1973

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Theodor Wieland in der Zeit von April 1972 bis Februar 1973 im Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Theodor Wieland danke ich herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine wertvollen Ratschläge.

Herrn Dr. Heinz Faulstich danke ich besonders für die vielen nützlichen Anregungen und Hinweise.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung 1

I. Überblick über die bisherigen Forschungen 1

II. Problemstellung 4

B. Hauptteil 5

I. Anreicherung der sauren Gifte 5

II. Isolierung des Amanins 8

1. Sephadex LH 20 Methanol-Säule 8

2. Sephadex LH 20 Säule mit Wasser-Methanol-Gemisch als Laufmittel 10

3. Merckogel-Säule mit Methanol als Laufmittel 13

III. Isolierung des Phallisacins (PHSC) 16

1. Trennversuche 16

2. Sephadex LH 20 Säule mit essigsaurem Laufmittel 17

3. Dünnschichtchromatographische Isolierung des Phallisacins (PHSC) 19

IV. Isolierung des Phallacins (PHCN) 21

V. Toxizität und ORD-Spektren 23

C. Experimenteller Teil 27

1. Dünnschichtchromatographie 27

2. Praeparative Dünnschichtchromatographie 27

3. Sprühreagenzien 27

4. Säulenchromatographie 28

5. Ionenaustauschchromatographie 28

6. UV-Absorptionsspektrographie 28

7. ORD-Spektroskopie 28

8. Aminosäureanalyse 29

9. Toxizitätsbestimmungen 29

D. Zusammenfassung 30

E. Literaturverzeichnis 31

A Einleitung

I. Überblick über die bisherigen Forschungen

Das wissenschaftliche Interesse an den grünen Knollenblätterpilzen (Amanita phalloides) war schon im letzten Jahrhundert geweckt worden, da fast alle der schweren Pilzvergiftungen auf den Genuß dieses Pilzes zurückzuführen sind. Die Versuche, die Giftstoffe zu isolieren, waren allerdings noch sehr sporadisch und nicht sehr erfolgreich.

Systematische Untersuchungen begannen erst vor 40 Jahren durch H. Raab[1]. 1937 isolierten F. Lynen und H. Wieland[2] kristallines Phalloidin und 1941 H. Wieland[2] und R. Hallermeyer[3] Amanitin, das Th. Wieland et al.[4] 1949 papierelektrophoretisch in das α- und β-Amanitin auftrennten. Das vierte Gift, das γ-Amanitin, wurde von Th. Wieland und Chr. Dudensing[5] 1956 isoliert und ein Jahr später das Phalloin von Th. Wieland und K. Mannes[6]. Als weitere giftige Bestandteile des Pilzes konnten Phallacidin[7], Phallin B[8], ε-Amanitin[9], Amanin, Phallisin und das ungiftige Amanullin[10] bestimmt werden.

Bei der Konstitutionsaufklärung[10-21] wurde festgestellt, daß es sich um cyclische Oligopeptide handelte, die man in zwei Gruppen einteilen konnte. Sie unterscheiden sich durch ihre Aminosäure-Zusammensetzung, UV-Spektren, Zimtaldehyd-HCl-Farbreaktion und Toxizität.

Die erste Gruppe umfaßt die Phallotoxine, die aus bicyclischen Heptapeptiden bestehen (Abb.1)

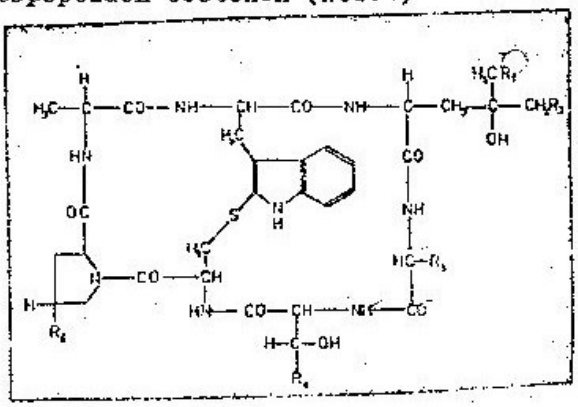


Abb.1. Konstitutionsformel der Phallotoxine

		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
a) Phalloin	(PHN)	H	H	CH_3	CH_3	OH
b) Phalloidin	(PHD)	OH	H	CH_3	CH_3	OH
c) Phallisin	(PHS)	OH	OH	CH_3	CH_3	OH
d) Phallacidin	(PHCD)	OH	H	$CH(CH_3)_2$	CO_2H	OH
e) Phallin B (probeweise)		H	H	$CH_2C_6H_5$	CH_3	H

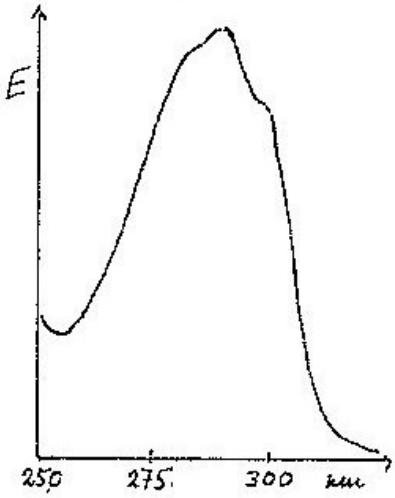


Abb. 2 UV-Spektrum des Phallacidins

Der Chromophor der Phallotoxine ist ein α-Indolylthioäther, der ein Maximum bei 292 nm (Abb.2) zeigt. Die Zimtaldehyd / HCl-Reaktion ruft eine Blauförbung hervor.

Die Gifte wirken rasch, bei weißen Mäusen innerhalb weniger Stunden, und die LD_{50} liegt bei 1,25 mg/kg (PHCD) bis 2 - 3 mg/kg (PHD).

Die zweite Gruppe umfaßt die Amatoxine, die aus bicyclischen Oktapeptiden bestehen (Abb.3)

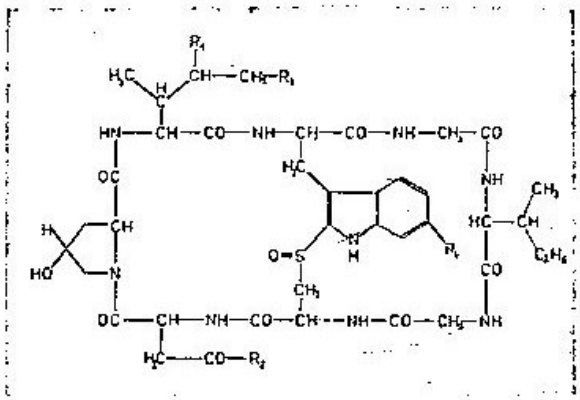


Abb.3. Konstitutionsformel der Amatoxine

		R_1	R_2	R_3	R_4
a)	α-Amanitin	OH	OH	NH_2	OH
b)	β-Amanitin	OH	OH	OH	OH
c)	γ-Amanitin	OH	H	NH_2	OH
d)	ε-Amanitin	OH	H	OH	OH
e)	Amanin	OH	OH	OH	H
f)	Amanullin	H	H	NH_2	OH

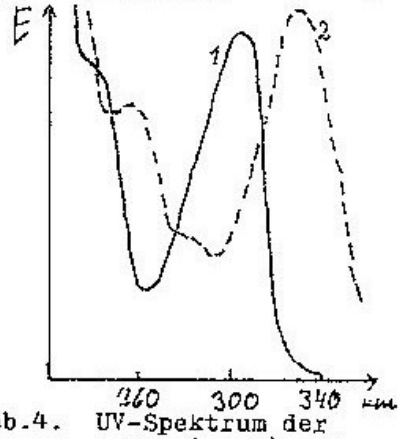


Abb.4. UV-Spektrum der Amatoxine 1)neutrales - 2) alk.medium

Bei den Amatoxinen ist der Chromophor ein 6-Hydroxy-α-indolylsulfoxid. Im Neutralen liegt das Maximum bei 302 nm und im Alkalischen bildet sich das Phenolat, das bei 320 nm absorbiert. (Abb.4)

Die Zimtaldehyd /HCl-Reaktion bewirkt eine Violettfärbung. Die Gifte wirken bei weißen Mäusen nicht so rasch wie die Phallotoxine, aber ihre LD_{50} liegt mit 0,5 - 1,0 mg/kg niedriger.

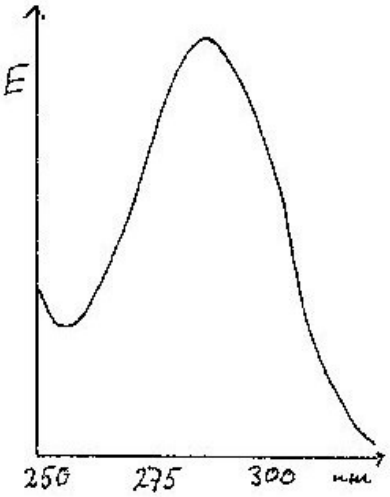


Abb.5 UV-Spektrum des Amanins

Eine Ausnahme bildet das Amanin, dessen Indolkern nicht hydroxyliert ist. Sein Maximum liegt bei 286 nm (Abb.5).

Die Zimtaldehyd / HCl-Reaktion ruft erst nach einiger Zeit der HCl-Einwirkung eine Blaufärbung hervor.

Einen genauen Überblick über die giftigen Peptide und ihre toxikologischen Wirkungen findet man in einem Artikel von Th. Wieland und O. Wieland (1971)[22].

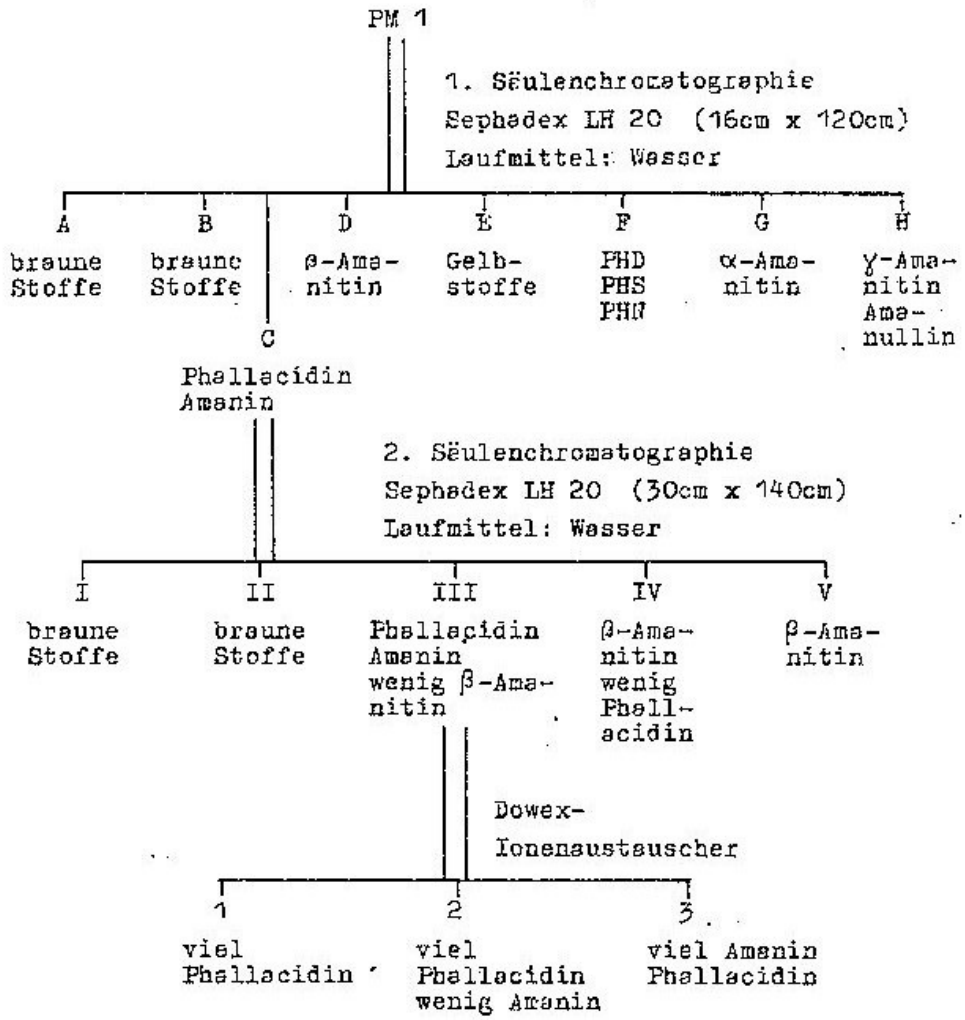
II. Problemstellung

Die von O. Brodner[23] benutzte Methode der Anionenaustausch-Chromatographie, bei der hauptsächlich das Phallacidin und das Amanin angereichert werden konnten, versprach die Möglichkeit, weitere unbekannte saure Gifte zu isolieren und evtl. bekannte Gifte auf eine neue Art rein zu gewinnen.

B Hauptteil

I. Anreicherung der sauren Gifte

Zur Anreicherung der sauren Gifte wurde eine Säulenchromatographie an Dowex - Anionenaustauscher - Harz durchgeführt. Das Ausgangsmaterial stammte aus Fraktion III, die von PM 1[12] der Pilzernte 1969 durch zweimalige Säulenchromatographie von O. Brodner[23] gewonnen worden war (vgl. Schema).



Zur Austauschchromatographie wurden fünf Säulen (1,5 cm x 40 cm) mit insgesamt 150 g Dowex - Harz, das zuvor gebrauchsfertig umgeladen worden war, gefüllt, mehrere Stunden mit einem Laufmittelgemisch (H_2O : MeOH 7 : 3) gespült und mit insgesamt 6 g Rohsubstanz (Fraktion III), die in 15 ml Laufmittel gelöst waren, beladen. Nach weiterem zweistündigem Spülen wurde dem Elutionsmittel 2 Vol% Essigsäure zugesetzt und weitere drei Stunden eluiert, bis Braun- und Gelbstoffe ausgewaschen und das Eluat wieder farblos war und keine UV-Absorption zeigte. Jetzt wurde die Essigsäurekonzentration auf 5 Vol% erhöht und mit 22 l Laufmittel die sauren Gifte eluiert.

Die Ausbeute betrug bei drei Ansätzen mit 18,5 g Rohsubstanz 6,51 g Giftgemisch, das noch durch Fremdstoffe und Abbauprodukte verunreinigt war.

Bei einem vierten Ansatz wurde die 2 %-ige Essigsäurekonzentration nicht erhöht und weiter eluiert, wodurch das Auswaschen unter milderen Bedingungen durchgeführt wurde. Bei 6,6 g Rohsubstanz konnten 2,68 g saure Gifte gewonnen werden. Neben der geringfügigen Erhöhung der Ausbeute wurde die Trennung von Phallacidin und Amanin etwas verbessert und die Zersetzung von Amanin war nicht so stark eingetreten wie bei den Ansätzen mit 5 %-iger Essigsäurekonzentration.

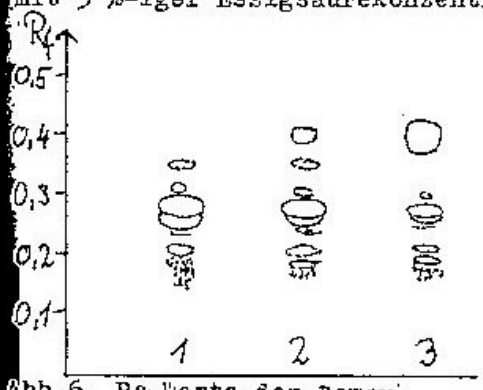


Abb.6. Rf-Werte der Dowex-Fraktionen

Die gewonnenen Giftgemische wurden in drei Fraktionen zusammengefaßt (Tab.1), nachdem sie dünnschichtchromatographisch mit dem Laufmittel sek.Butanol : 3 % NH_3 100 : 44 untersucht worden war. (Abb.6)..

Tabelle 1

Fraktion	Inhaltsstoffe	R_f-Wert	Zimtaldehyd/ HCl-Reaktion	UV-Spektrum	Menge (g)
	viel PHCD	0,28	braun-blau		
	hypothet. Tri-OH-PHCD	0,26	"		
1	1. Blaukörper	0,30	sofort blau	PHCD-Spektrum	7,10
	2. Blaukörper	0,22	"		
	sehr wenig β-Amanitin?	0,35	schwach violett		
	PHCD	0,28	s.o.		
	hypothet. Tri-OH-PHCD	0,26	"		
	1. Blaukörper	0,30	"	PHCD-Spektrum mit Amanin-Schulter	
2	2. Blaukörper	0,22	"		1,25
	3. Blaukörper	0,19	"		
	wenig Amanin	0,40	langsam braun-blau		
	sehr wenig β-Amanitin?	0,35	s.o.		
	Amanin	0,40	s.o.		
	PHCD	0,28	"		
	hypothet. Tri-OH-PHCD	0,26	"	Amanin-Spektrum	0,84
3	1. Blaukörper	0,30	"		
	2. Blaukörper	0,22	"		
	3. Blaukörper	0,19	"		

II. Isolierung des Amanins

1. Sephadex LH 20 Methanol-Säule

Bei den ersten Trennversuchen zeigte es sich, daß Amanin relativ gut von den anderen Giften zu trennen war. Es wurden 60 mg der Dowex-Fraktion 3 auf eine Sephadex-LH 20-Säule (1,8 x 250 cm) aufgetragen und Methanol als Laufmittel benutzt. Das Eluat wurde in drei Fraktionen unterteilt und dünnschicht-chromatographisch und UV-spektroskopisch untersucht. (Abb.7 u.8)

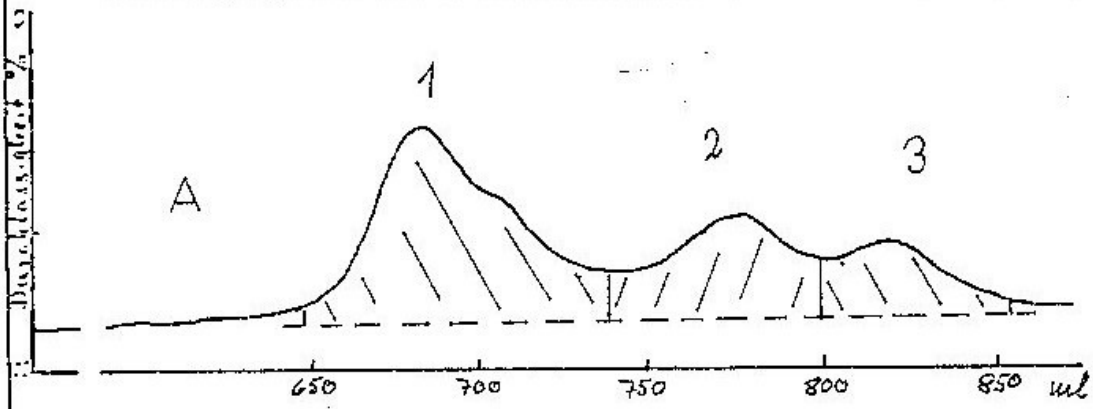


Abb.7. Elutionsdiagramm der Sephadex LH 20 Methanol-Säule

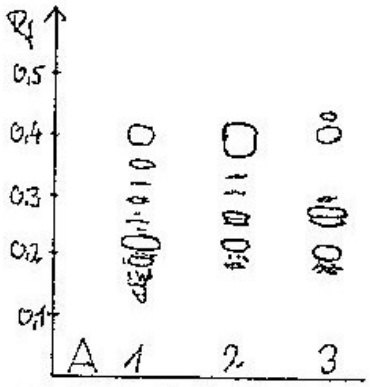


Abb.8. R_f-Werte der A-Fraktionen

Später konnte durch Vergleich festgestellt werden, daß es sich bei den Hauptsubstanzen der Fraktion A1 um Abbauprodukte des Amanins handelte.

Tabelle 2

Fraktion A	Inhaltsstoffe	R_f-Wert	UV-Spektrum	Menge (µg)
	Abbauprodukte des Amanins	0,15 - 0,30		
1	wenig Amanin	0,40	Amanin	26,2
	sehr wenig β-Amanitin	0,35		
	viel Amanin	0,4		
2	wenig PHCD	0,28	Amanin	8,3
	wenig Tri-OH-PHCD	0,26		
	PHCD	0,28		
	Tri-OH-PHCD	0,26		
3	Amanin	0,40	PHCD	11,4
	Abbauprodukte	0,20		

2. Sephadex LH 20 Säule mit Wasser-Methanol-Gemisch als Laufmittel

Eine etwas verbesserte Trennwirkung konnte mit einem Wasser : Methanol 3 : 1 - Gemisch, geringerem Säulendurchmesser (Ø 1,4cm) und durch Verminderung der aufgetragenen Substanzmenge erreicht werden. Bei drei Durchläufen à 30 mg der Fraktion 3 der Dowex-Serie wurde 30 mg amaninreiche Substanz gewonnen. (Abb. 9 u. 10, Tab. 3)

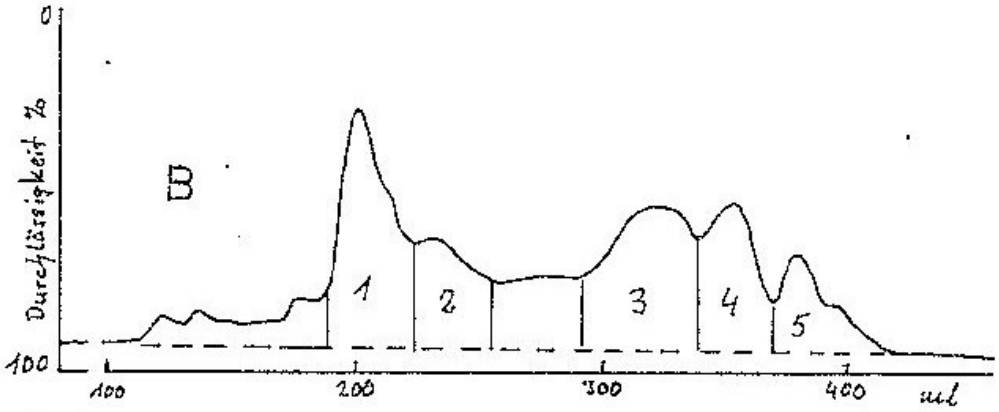


Abb.9. Elutionsdiagramm

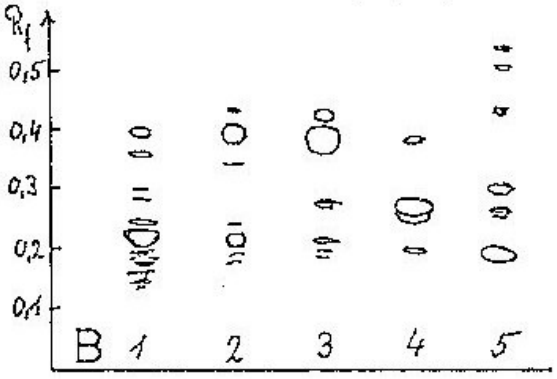


Abb.10. R_f-Werte der B-Fraktionen

Aus Fraktion B-3 konnte nach zweimaligem Chromatographieren und Fraktionieren an derselben Säule insgesamt 8 mg reines Amanin isoliert werden.

Tabelle 3

Fraktion B	Inhaltsstoffe	R_f-Wert	UV-Spektrum	Menge (mg)
	Abbauprodukte des Amanins	0,15-0,30		
1	wenig Amanin	0,40	Amanin	16,4
	sehr wenig β-Amanitin?	0,35		
	Amanin	0,40		
2	Abbauprodukte des Amanins	0,15 - 0,30	Amanin	11,9
	viel Amanin	0,40		
	Blaukörper (vermutlich Amaninabbau)	0,43		
3			Amanin	30,6
	sehr wenig PHCD	0,28		
	sehr wenig Tri-OH-PHCD	0,26		
	viel PHCD	0,28		
4	viel Tri-OH-PHCD	0,26	PHCD	12,5
	sehr wenig Amanin	0,40		
	Seco-PHCD	0,22		
	PHCD-Abbau	0,30	Seco-PHCD	3,1
5	sehr wenig PHCD	0,28		
	sehr wenig Tri-OH-PHCD	0,26		

Abb.11 UV-Spektrum der Fraktion B5

Bei Fraktion B5 war durch die deutliche Veränderung der Schulter bei 300 nm das für Seco-Phallotoxine charakteristische UV-Spektrum zu erkennen (Abb.11). Später konnte gezeigt werden, daß es sich bei den Substanzen mit den R_f-Werten 0,22 und 0,30 um Abbauprodukte der sauren Phallotoxine handelte. Charakteristisch ist für sie das UV-Spektrum, die schnelle Blaufärbung bei der Zimtaldehyd / HCl-Reaktion und die positive Ninhydrin-Reaktion.

3. Merckogel - Säule mit Methanol als Laufmittel

Die beste Anreicherung und Isolierung von Amanin gelang mit einer Merckogel OR-PVA 2000 - Säule mit Methanol als Laufmittel und daran anschließend mit einer zweiten Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 mit Wasser-Methanol-Gemisch als Laufmittel. Die Merckogelsäule (2,0 cm x 250 cm) wurde mit 46 mg der amaninreichen Dowex-Fraktion beladen und mit Methanol eluiert (Abb.12).

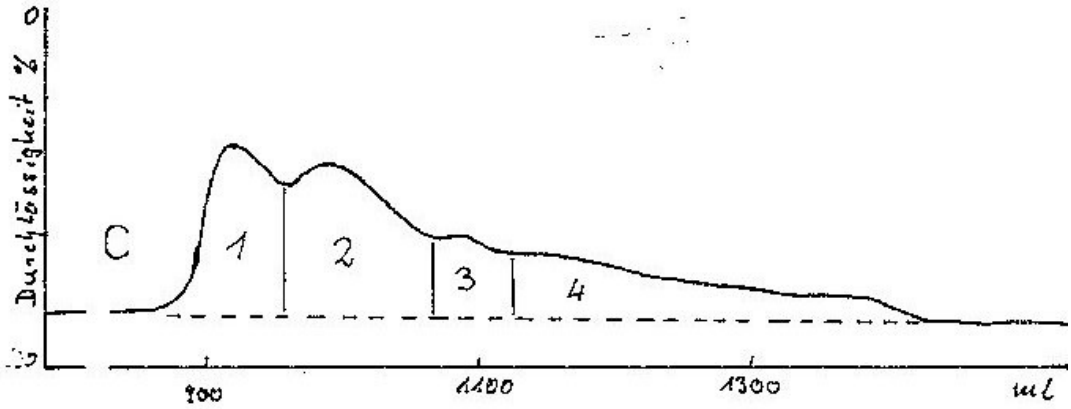


Abb.12. Elutionsdiagramm der Merckogel-Säule

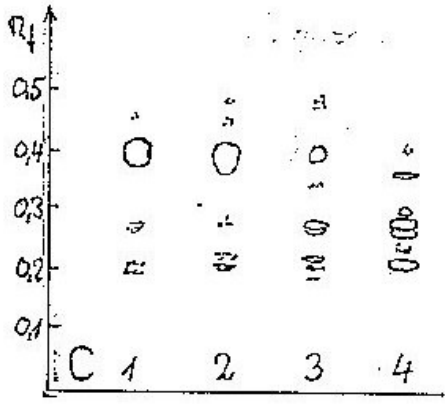


Abb.13. Rf-Werte der C-Fraktionen

Aus dem Eluat wurden vier Fraktionen gebildet (Tab.4). Das Dünnschichtchromatogramm (Abb.13) zeigte, daß in den Fraktionen C 1 und 2 das Amanin schon sehr stark angereichert und mit relativ wenig Abbauprodukten verunreinigt war.

Tabelle 4

Fraktion C	Inhaltsstoffe	R_f-Wert	UV-Spektrum	Menge (mg)
1	Amanin sehr wenig Abbauprodukte	0,40	Amanin	5,4
2	Amanin wenig Abbauprodukte	0,40	Amanin	8,6
	wenig Amanin	0,40		
3	wenig PHCD	0,28	Amanin-PHCD- Mischspektrum	2,7
	wenig Tri-OH-PHCD	0,26		
	PHCD	0,28		
	Tri-OH-PHCD	0,26		
4	Abbauprodukte des PHCD	0,30 0,22	PHCD	6,4
	wenig β-Amanitin?	0,35		

Reines Amanin konnte durch nochmaliges Chromatographieren der Fraktionen C1 und C2 an einer Sephadex LH 20 Säule (1,4 cm x 250 cm) mit Wasser-Methanol 3 : 1 - Gemisch erhalten werden. (Abb.14) Aus 13 mg (C1 und C2) wurden 5,4 mg Amanin isoliert.

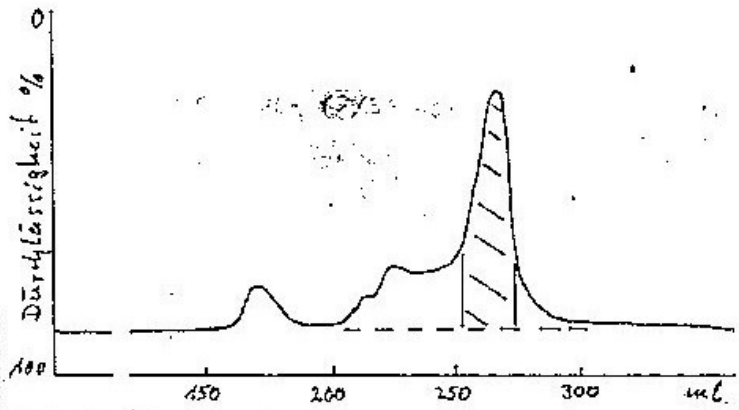


Abb.14. Elutionsdiagramm

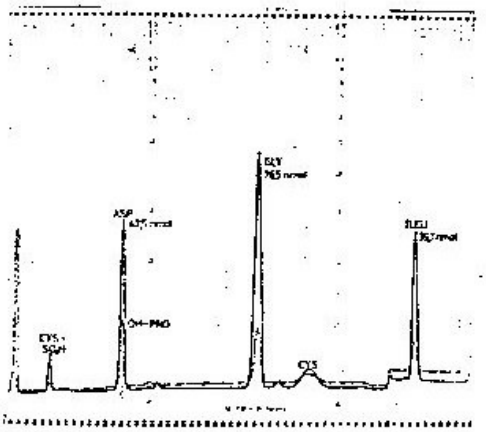


Abb.15. Aminosäureanalyse von Amanin

Die Aminosäureanalyse zeigte

Ile	Gly	Asp
1,00	1,93	1,07.

Außerdem wurden Hydroxy-Prolin, Cystein und Cysteinsäure gefunden.

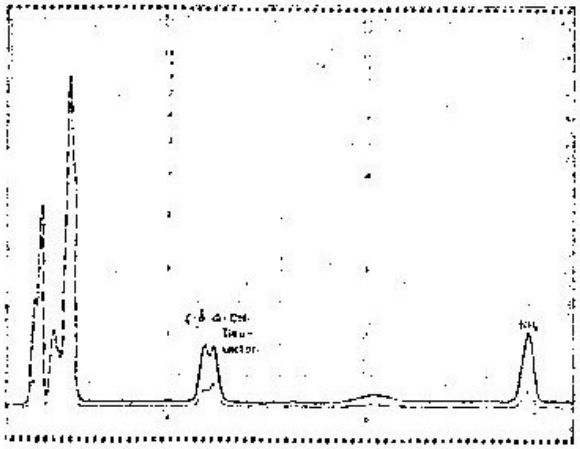


Abb.16. Lactonanalyse von Amanin

Der Vergleich der Lactonanalyse (Abb.16) mit bekannten Lactonen[24] zeigte in Übereinstimmung mit α-Amanitin die beiden Epimeren des γ-δ-Dihydroxy-Isoleucinlactons.

Die LD_{50} des hochgereinigten Amanins liegt zwischen 0,1 mg/kg (0/3) und 0,5 mg/kg (3/3) bei der weißen Maus. Sie war früher mit 0,625 mg/kg angegeben worden.

III. Isolierung des Phallisacins (PHSC)

1. Trennversuche

Bei den Lactonanalysen des Phallacidins (PHCD) und dem Vergleich mit synthetisierten Hydroxy-Leucin-Lactonen hatte H. Faulstich[24] neben γ - δ-Dihydroxy-Leucin-Lacton des Phallacidins γ - δ - δ'-Trihydroxy-Leucin-Lacton gefunden, das er einem bisher noch nicht isolierten Trihydroxy-Phallacidin zuschrieb. Später war O. Brodner[23] bei der Isolierung des Phallacidins aufgefallen, daß das bisher als rein angesehene Gift dünnschichtchromatographisch mit dem Laufmittel sek. Butanol: 3% NH_3 100 : 44 in verschiedene Komponenten getrennt wurde, wobei er als Hauptprodukte das Phallacidin und das hypothetische Trihydroxy-Phallacidin erkannte. Das Phallacidin (PHCD) trennte er durch mehrfaches Chromatographieren an Sephadex LH 20 Säulen rein ab.

Eigene Versuche, die andere Komponente - das trihydroxyleucinhaltige Gift (Phallisacin) - dünnschichtchromatographisch mit dem Laufmittel sek. Butanol: 3% NH_3 100 : 44 präparativ rein zu isolieren, gelangen nicht. Auch die Trennversuche mit Sephadex LH 20 - und Merckogel-Säulen mit verschiedenen neutralen Methanol-Wasser-Laufmittelgemischen führten zu keiner nennenswerten An- bzw. Abreicherung eines der beiden Gifte. Auch die mit Diazomethan erhaltenen Methylester der Gifte konnten nicht getrennt werden.

2. Sephadex LH 20 Säule mit essigsaurem Laufmittel

Erst durch Zusatz von Essigsäure zu den Laufmitteln konnte eine deutliche Entmischung erreicht werden. Mit 360 mg der Fraktion 1 der Dowex-Trennung wurden an einer Sephadex LH 20 Säule (2,1 cm x 250 cm) sechs Durchläufe à 60 mg mit einem 1,5 Vol% essigsauren Elutionsmittel (Wasser : Methanol 1 : 1) durchgeführt (Abb.17).

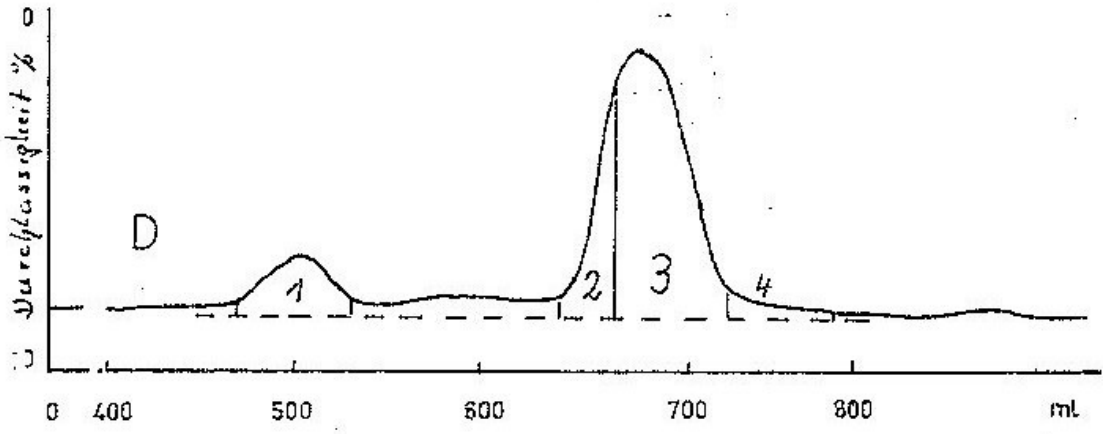
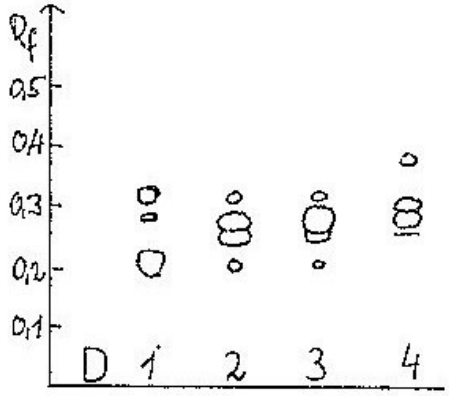


Abb.17. Elutionsdiagramm



Aus dem Eluat wurden vier Fraktionen gebildet (Abb.18 und Tabelle 5).

Abb.18. R_f-Werte der D-Fraktionen

Tabelle 5

Fraktion D	Inhaltsstoffe	R_f-Wert	UV-Spektrum	Menge (mg)
1	PHCD-Abbauprodukte	0,30 0,28 0,22	Seco-PHCD	22,0
2	PHCD	0,28	PHCD	97,6
	PHSC	0,26		
	PHCD-Abbauprodukte	0,30 0,22		
3	viel PHCD	0,28	PHCD	189,3
	wenig PHSC	0,26		
	PHCD-Abbauprodukte	0,30 0,22		
4	PHCN	0,29	PHCD	5,5
	PHCD	0,28		
	Bleukörper	0,41		

Fraktion D1 zeigte das UV-Spektrum der Seco-Verbindung (Abb.11, S.12)und alle drei Komponenten waren ninhydrinpositiv. Ferner fiel auf, daß die Blaufärbung der Zimtaldehyd / HCl-Reaktion bei allen drei Substanzen in wenigen Sekunden eintrat. In Fraktion D2 war das hypothetische Trihydroxy-Leucin-haltige Phallotoxin stark angereichert. In Fraktion D4 wurde eine weitere phallacidnähnliche Substanz entdeckt.

3. Dünnschichtchromatographische Isolierung des Phallisacins

Zum Trennerfolg führte ein bei Dünnschichtplatten angewandtes Laufmittel, das beide Gifte bei nicht allzu hoher Startkonzentration deutlich trennte (Abb.19). Bei Verwendung des Laufmittels H (sek. Butanol : Ameisensäure : Wasser 750 : 150 : 100) zeigten die Gifte im Gegensatz zu dem Laufmittel sek. Butanol : 3% NH_3 reproduzierbare R_f-Werte.

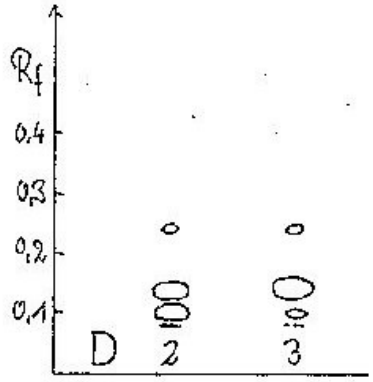


Abb.19. Rf-Werte mit dem Laufmittel H

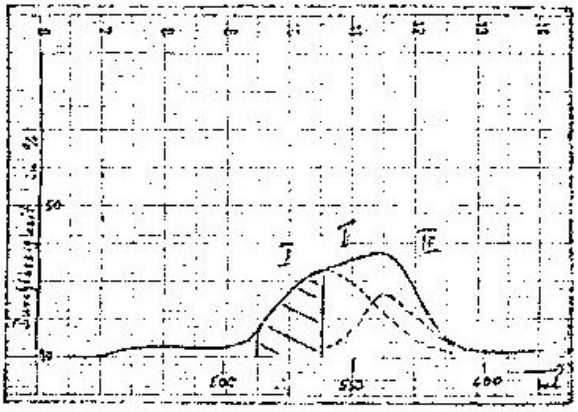


Abb.20. Elutionsdiagramm

Von 60 mg der Fraktion D2, die auf Dünnschichtplatten getrennt und an einer Sephadex LH 20 Säule (1,4 cm x 250 cm) mit dem Laufmittelgemisch Wasser : Methanol 3 : 1 chromatographiert worden war, konnten in Fraktion I 5,5 mg des neuen Giftes rein isoliert werden. (Abb.20).

Die Aminosäureanalyse entsprach der des Phallacidins (Abb.21).

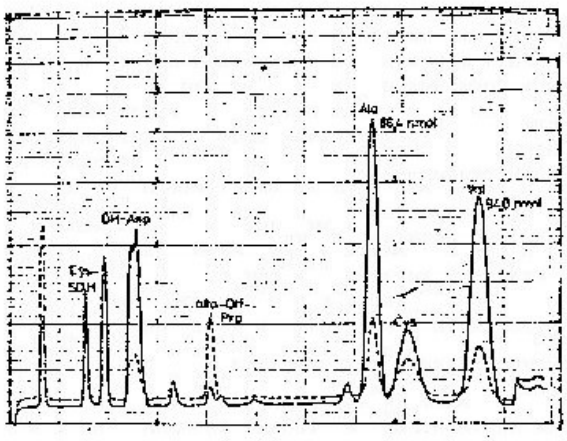


Abb.21. Aminosäureanalyse des Phallisacins

Die vergleichende Lactonanalyse[24] zeigte das γ-δ-δ'-Trihydroxy-Leucin wie bei Phallisin (Abb.22).

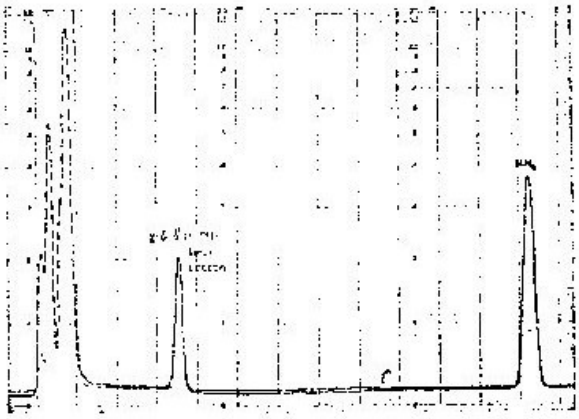


Abb.22. Lactonanalyse des Phallisacins

Analog der Phalloidin-Reihe wurde dieses Gift Phallisacin (PHSC) genannt.

Seine LD_{50} liegt bei 4,5 mg/kg (weiße Maus).

IV. Isolierung des Phallacins (PHCN)

Bei der Säulenchromatographie mit essigsaurem Elutionsmittel war ein weiterer Bestandteil in Fraktion D4 aufgefallen, der sich ähnlich dem Phallacidin verhielt und nur in sehr geringer Konzentration vorlag.

Aus den 5,5 mg der Fraktion D4 und weiteren 4,6 mg aus anderen Trennungen konnte durch zweimaliges Chromatographieren an einer Sephadex LH 20 Säule (1,4 cm x 250 cm) mit Wasser : Methanol 3 : 1 -Gemisch als Laufmittel 1,5 mg eines reinen Peptids isoliert werden (Abb.23).

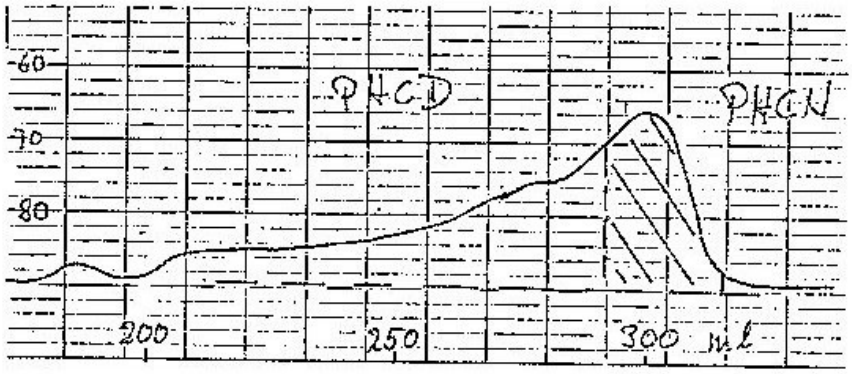
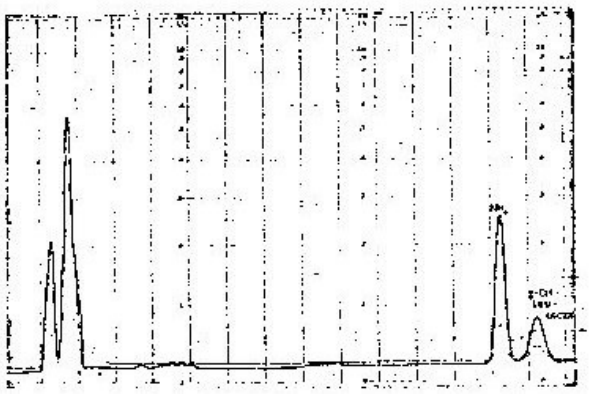


Abb.23. Elutionsdiagramm

Abb.24. Aminosäureanalyse des Phallacins

Die Aminosäureanalyse (Abb.24) entsprach der des Phallacidins und des Phallisacins. (Alanin : Valin 1,00 : 0,98)



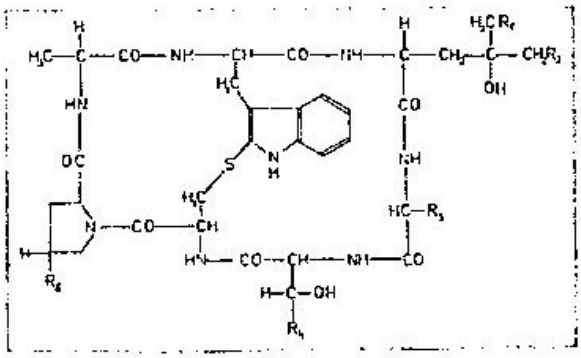
Die vergleichende Lactonanalyse[24] (Abb.25) zeigte das γ-Hydroxy-Leucin wie Phalloin.

Abb.25. Lactonanalyse des Phallacins

Analog dem Phallisacin (PHSC) wurde dieses Peptid Phallacin (PHCN) genannt.

Die LD_{50} liegt bei 1,5 mg/kg (weiße Maus).

Aufgrund der Aminosäure- und Lactonanalyse und der Ähnlichkeit mit Phallacidin wird folgende Konstitutionsformel angenommen:



		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Phallacin	(PHCN)	H	H	$CH(CH_3)_2$	CO_2H	OH
Phallisacin	(PHSC)	OH	OH	$CH(CH_3)_2$	CO_2H	OH

V. Toxizität und ORD - Spektren

Natürlich vorkommende und chemisch modifizierte Phallotoxine waren untersucht und miteinander verglichen worden. Dabei zeigten sich Zusammenhänge zwischen der Konstitution (z.B. der Anzahl der Hydroxyl-Gruppen in den Seitenketten), der Toxizität und der Konformation, verfolgt z.B. durch die optische Rotationsdispersion.[25] In Wasser als Lösungsmittel wurden bei allen giftigen Phallopeptiden zwei positive Cottoneffekte bei λ = 248 nm und λ = 300 nm gefunden, die in ungiftigen Phallopeptiden fehlten. Die Größe der positiven Drehkraft bei 253 nm und 305 nm konnte mit Toxizitätsabstufungen in Zusammenhang gebracht werden.

Der Vergleich der ORD-Spektren (Abb.26 - 28) saurer Phallotoxine und eines Gemisches von Secopeptiden mit dieser Theorie zeigt in Wasser weitgehende Übereinstimmung wie auch Phalloin, Phalloidin und Phallisin. Während in Acetonitril-Methanol und in Methanol das Phallacin als das toxischste Peptid zu erkennen ist, kann der Grad der Toxizität des Phallacidins und des Phallisacins nicht abgelesen werden.

Die Toxizitätsbestimmungen, die an weißen Mäusen durchgeführt wurden, liefern folgende LD_{50}-Werte:

Phallacin	1,5 mg/kg
Phallacidin	1,5 mg/kg
Phallisacin	4,5 mg/kg

Analog dem Phallisin ist das Phallisacin mit drei Hydroxy-Gruppen im Leucin das am wenigsten giftige Peptid.

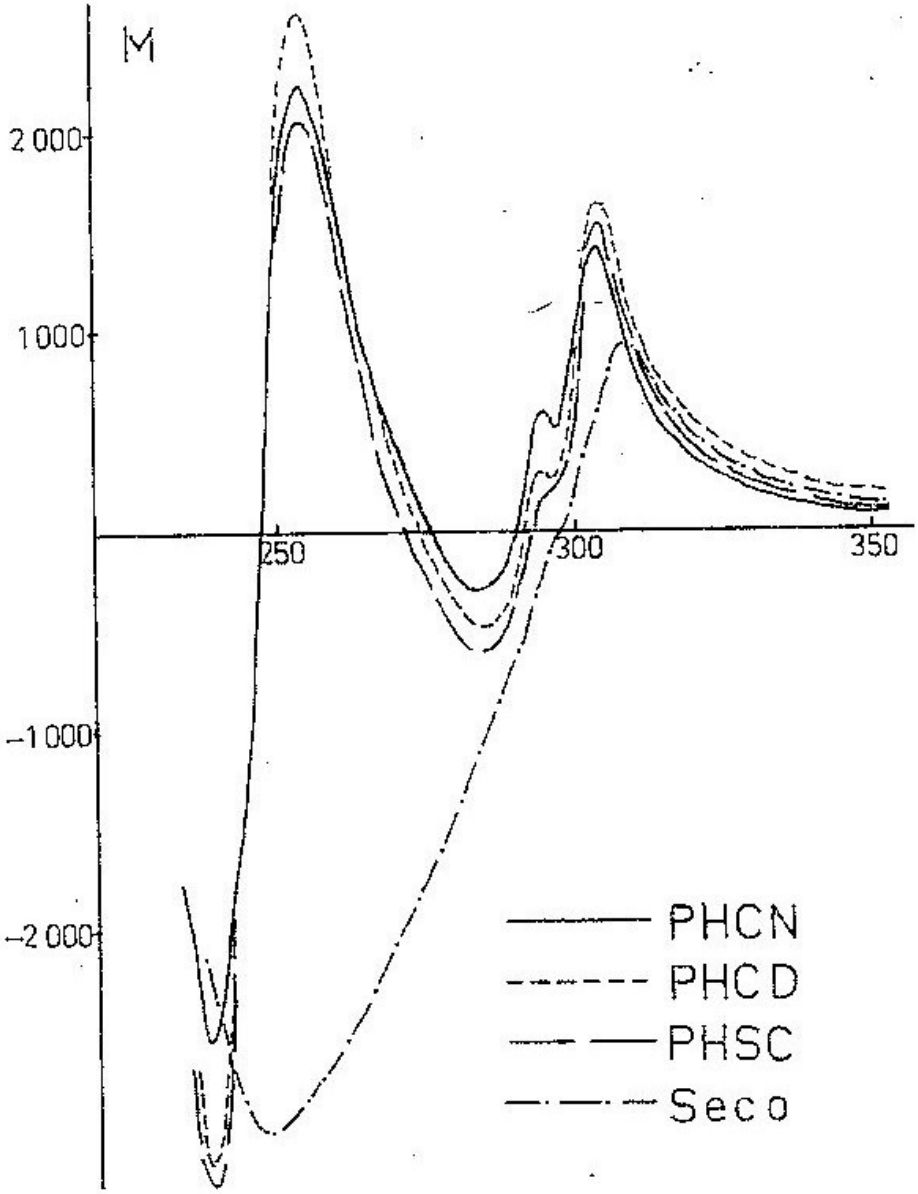


Abb.26. Wasser als Lösungsmittel

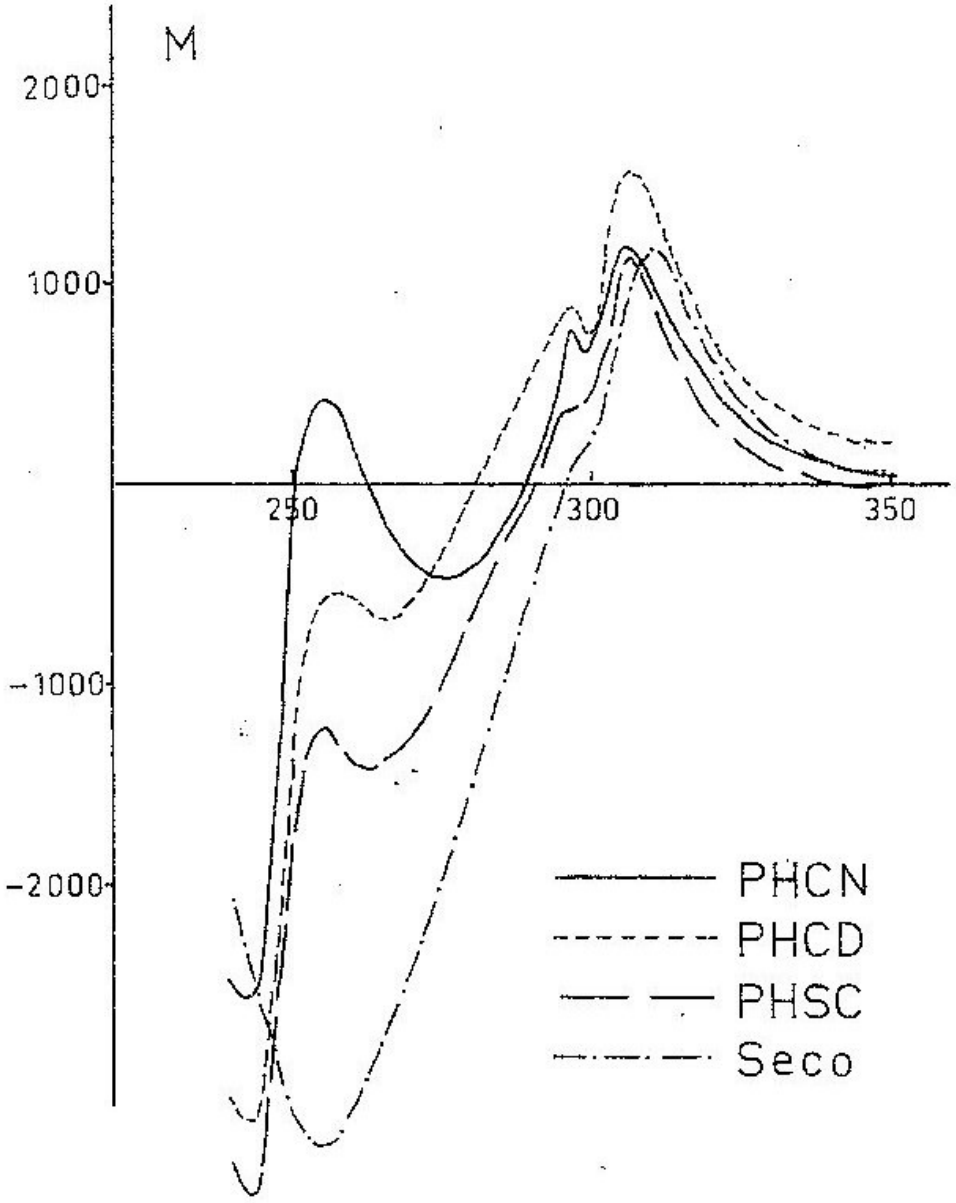


Abb.27. Acetonitril : Methanol 2,3 : 0,7 - Gemisch als Lösungsmittel

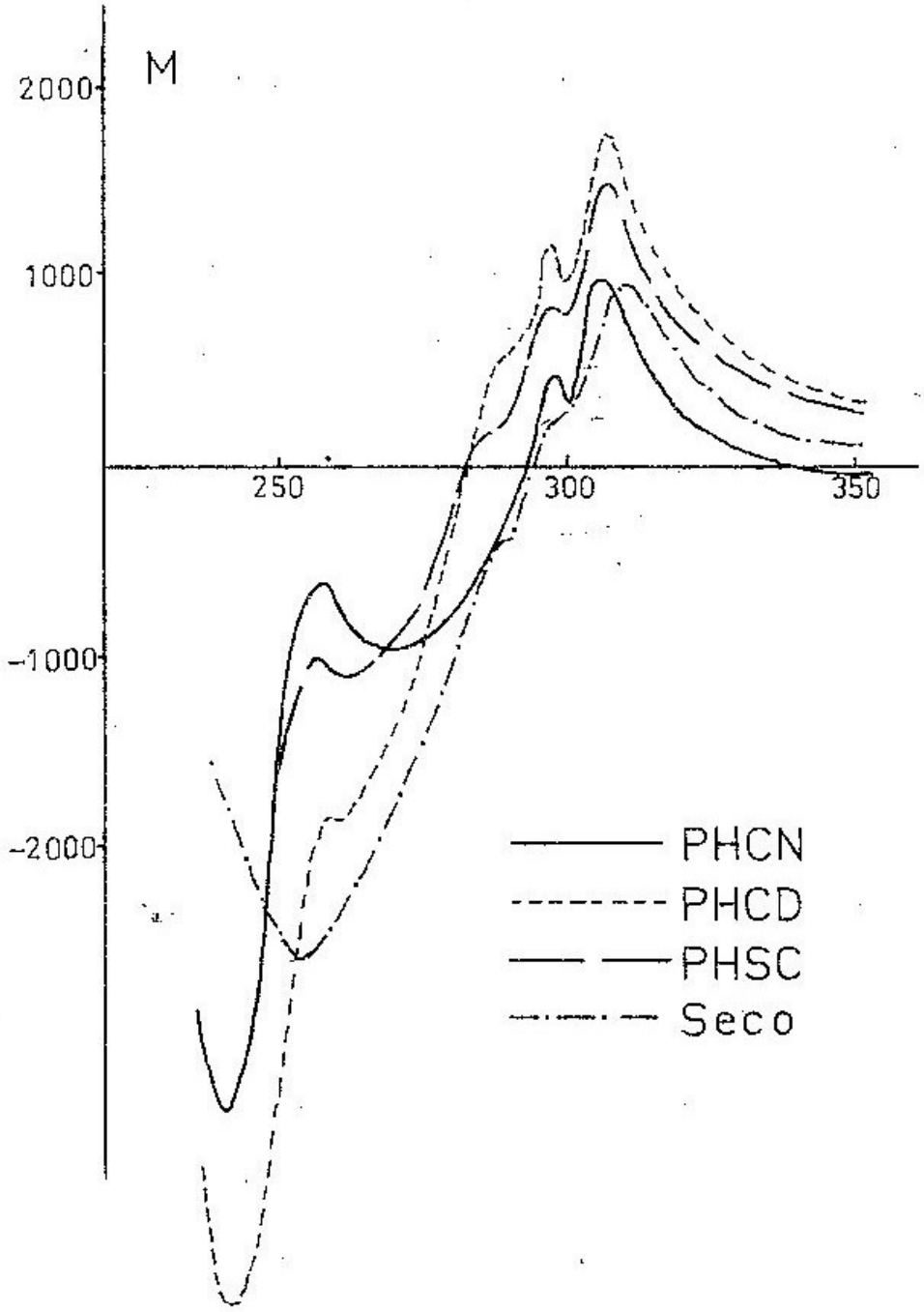


Abb.28. Methanol als Lösungsmittel

C. Experimenteller Teil

1. Dünnschichtchromatographie:

Trägersubstanz : Kieselgel HF 254 der Firma Merck, Darmstadt, Schichtdicke 0,25 mm

Laufmittel:

sek. Butanol : 3% NH_3 100 : 44

sek. Butanol : Ameisensäure : Wasser 750 : 150 : 100 (Laufmittel H)

2. Praeparative Dünnschichtchromatographie:

10 mg Substanz pro 20 x 20 cm Platte, in Methanol gelöst mit 5 µl-Pipette auf 15 Flecken verteilt, 4,5 Stunden in Laufmittel H entwickelt, Fraktion ausgekratzt, mit Methanol eluiert, abrotiert und gefriergetrocknet.

3. Sprühreagenzien:

a) Zimtaldehyd / HCl - Reagenz

Dünnschichtplatte mit 2% methanolischer Zimtaldehydlösung besprühen und 20 - 30 Minuten in HCl-Gas-Athmosphäre entwickeln.

b) Ninhydrin - Reagenz

1 g Ninhydrin, 600 ml Methanol, 350 ml n-Butanol, 30 ml 2n Essigsäure.-

Nach dem Besprühen ca 10 Minuten bei 110° entwickeln. Primäre Aminogruppen zeigen violette Farbe.

4. Säulenchromatographie:

Trägersubstanzen:

a) Sephadex LH 20 der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden

b) Mercogel OR-PVA 2000 der Firma Merck, Darmstadt

Der Verlauf der Chromatographie wurde durch kontinuierliche UV-Absorptionsmessung des Eluats bei konstanter Wellenlänge λ = 254 nm in einem Durchflußphotometer Uvicord der Firma LKB, Stockholm, verfolgt und auf einem angeschlossenen Schreiber registriert. Die entsprechenden Fraktionen wurden von einem gekoppelten LKB-Fraktionssammler aufgefangen.

5. Ionenaustauschchromatographie:

Trägersubstanz: Dowex 1 x 2 Anionenaustauscher der Firma Dow Chemical Comp., Midland, Michigan

Bereitung: 150 g Harz wurde mit 1n NaOH behandelt, neutral gewaschen, in 1n HCl digeriert, erneut neutral gewaschen und wiederum mit 1n NaOH in die OH-Form überführt. Nach abschließendem Neutralwaschen, war das Harz gebrauchsfertig.

6. UV-Absorptionsspektroskopie:

Die UV-Absorptionsspektren wurden an Leitz-Unicam UV-Spektralphotometer der Firma Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, aufgenommen.

7. ORD-Spektroskopie:

Die Messung der optischen Rotationsdispersion erfolgte am Spektrapolarimeter REPM 12 der Firma Karl Zeiss, Oberkochen. Zur ORD-Messung wurden Lösungen verwendet,

die auf dem Unicam-UV-Gerät eine Extinktion E = 1,8 zeigten. Die Spektren mit abweichendem E-Wert wurden graphisch auf die Extinktion E = 1,8 korrigiert.

8. Aminosäureanalyse:

ca 1 mg der Peptidproben wurden im abgeschmolzenen Glasröhrchen 24 Stunden mit 6n HCl bei 110° hydrolysiert. Die quantitative Bestimmung erfolgte nach der Methode von Moore und Stein mit dem Aminosäureanalysator Beckmann Multichrom, Liquid Column Chromatograph 4255.

9. Toxizitätsbestimmungen:

Die Toxizitätsbestimmungen wurden freundlicherweise von der Firma Boehringer, Ingelheim, durchgeführt, indem weißen Mäusen die Lösungen i.p. injiziert wurden.

D. Zusammenfassung

Die sieben Hauptsubstanzen, die bei der Dowex-Jonenaustauschchromatographie und weiteren Trennschritten dünnschichtchromatographisch mit dem Laufmittel sek. Butanol 3% NH_3 100 : 44 zu erkennen waren, konnten folgendermaßen identifiert werden:

R_f-Wert	
0,40	Amanin
0,30	Seco-Verbindung
0,29	Phallacin
0,28	Phallacidin
0.26	Phallisacin
0,22	Seco-Verbindung
0,20	Amanin-Abbauprodukt

Die Identifikation wurde anhand von UV-Spektren und Aminosäureanalysen durchgeführt.

Mit diesem Ergebnis konnte die Gruppe der Phallotoxine mit Phallacin (PHCN) und Phallisacin (PHSC) um zwei bisher noch isolierte Gifte erweitert werden.

Ferner gelang es, mit diesen Trennschritten das Amanin in reiner Form zu gewinnen.

E Literaturverzeichnis

1. H. Raab, Z. Physiol. Chemie 207 (1932) 157
2. F. Lynen und H. Wieland, Liebigs A. 533 (1938) 93
3. H. Wieland und R. Hallermeyer, Liebigs A. 548 (1941) 1
4. Th. Wieland, E. Fischer und L. Wirth, Liebigs A. 564 (1949) 152
5. Th. Wieland und Chr. Dudensing, Liebigs A. 600 (1956) 156
6. Th. Wieland und K. Mannes, Angew. Chemie 69 (1957) 389
7. H. Schnabel, Diplomarbeit, Universität Frankfurt/Main 1960
8. Th. Wieland und J. X. de Vries, Liebigs A. 700 (1966) 174
9. Th. Wieland, D. Rempel, U. Gebert, A. Ruku und H. Boehringer, Liebigs A. 704 (1967) 226
10. H. Wieland und B. Witkop, Liebigs A. 543 (1940) 171
11. Th. Wieland und W. Schön, Liebigs A. 593 (1955) 157
12. Th. Wieland, K. Mannes und A. Schöpf, Liebigs A. 617 (1958) 152
13. Th. Wieland und A. Höfer, Liebigs A. 619 (1958) 35
14. Th. Wieland und W. Boehringer, Liebigs A. 635 (1960) 178
15. Th. Wieland und H. Schnabel, Liebigs A. 657 (1962) 218
16. Th. Wieland und H. Schnabel, Liebigs A. 657 (1962) 225
17. Th. Wieland, H. Wehrt und J. Dölling, Liebigs A. 700 (1966) 120
18. Th. Wieland und U. Geberg, Liebigs A. 700 (1966) 157
19. U. Gebert, Th. Wieland und H. Boehringer, Liebigs A. 705 (1967) 277

20. H. Faulstich und Th. Wieland, Liebigs A. 713 (1968) 186

21. Th. Wieland und A. Buku, Liebigs A. 717 (1968) 215

22. Th. Wieland und O. Wieland, Microbial Toxins VIII (1971) 249

23. O. Brodner, Diplomarbeit, Universität Heidelberg 1972

24. H. Faulstich, D. Georgopoulos und M. Blöching, J. Chromatog. (1973) in the press

25. H. Faulstich und Th. Wieland, Eur. J. Biochem. 22 (1971) 79

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig unter Verwendung der zitierten Literatur und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.