

Zeitungspapiertest für Amanitine – falsch-positive Ergebnisse

RUTH SEEGER

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg
Versbacher Straße 9, D-8700 Würzburg

Eingegangen am 4.10.1983

Seeger, R. (1984) – Newspaper Test for Amanitins – False Positive Results. Z. Mykol. 50 (2): 353–359.

Key Words: *Amanita phalloides*. Amanitin, detection of Newspaper Test. Thin-Layer Chromatography.

Abstract: In addition to *Amanita phalloides* and *Amanita verna*, 63 of 335 species of gill-bearing fungi, i.e. 19 %, gave a positive newspaper test. Among these were species of *Gomphidiaceae*, *Tricholomataceae*, *Entolomataceae*, *Pluteaceae*, *Amanitaceae*, *Coprinaceae*, *Cortinariaceae*, *Russulaceae* and *Lentinellus*. Amanitins were not detectable by high performance thin-layer chromatography in any of them, despite the greater sensitivity of this method.

Zusammenfassung: Neben *Amanita phalloides* und *Amanita verna* ergaben weitere 63 von 335 Lamellenpilzarten, d. h. 19 %, im Zeitungspapiertest ein positives Resultat. Es handelte sich um *Gomphidiaceae*, *Tricholomataceae*, *Entolomataceae*, *Pluteaceae*, *Amanitaceae*, *Coprinaceae*, *Cortinariaceae*, *Russulaceae* und *Lentinellus*. In keiner dieser Species war mit einer dünn-schichtchromatographischen Methode, die empfindlicher ist als der Zeitungspapiertest, ein Amanitin nachweisbar.

Zur Identifizierung von Knollenblätterpilzen und anderen amanitinhaltigen Giftpilzen wurde ein einfacher Amanitin-Nachweis entwickelt (Wieland, 1949; 1978). Dieser „Zeitungspapiertest“ beruht auf einer säurekatalysierten Reaktion des im Amanitinmolekül enthaltenen hydroxylierten Indols mit Lignin. Er eignet sich auch für Pilzgewebe, das botanisch kaum zu bestimmen ist, etwa für Abfall aus dem Pilzstiel. Ein Tropfen Pilzpreßsaft wird auf ligninhaltiges Papier, am einfachsten auf den unbedruckten Rand einer Zeitung, gebracht und an der Luft eintrocknen lassen. Darauf gibt man einen Tropfen hochkonzentrierter Salzsäure (8 bis 12 normal). Amanitine ergeben innerhalb einer Viertelstunde eine blaue Farbreaktion. Auf ligninfreiem Papier, z. B. Filterpapier, tritt keine Blaufärbung auf. Mit frischem Pilzpreßsaft und Extrakt getrockneter Pilze wurden identische Resultate erhalten (Beutler und Verger, 1980), und eine positive Reaktion soll beweisend für Amanitine sein (Meixner, 1979); zumindest seien falsch-positive Resultate sehr selten (Beutler und Verger, 1980).

Im folgenden berichten wir über das Ergebnis des Zeitungspapiertests bei 335 Arten von Lamellenpilzen. Wo wir eine positive Reaktion sahen, nahmen wir Kontrollen auf Filterpapier vor und unterzogen die Pilzextrakte einer Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (Stijve und Seeger, 1979) mit *Amanita phalloides*-Extrakt und Amanitinen als Standard.

Material und Methoden

Die Pilze wurden von 1967 bis 1983 vorwiegend in Süddeutschland gesammelt¹, gefriergetrocknet oder – ausnahmsweise – luftgetrocknet, zu feinem Pulver gemahlen und in verschlossenen Glasflaschen dunkel aufbewahrt.

Für den Zeitungspapiertest wurde jeweils 50 mg Pilzpulver mit 1 ml Methanol (p. A.; Merck) bei Raumtemperatur 1 h extrahiert, der Rückstand abzentrifugiert und 25 μ l des Überstandes punktförmig auf Umdruckpapier aufgetragen. α -Amanitin (Boehringer; Mannheim) ergab mit konzentrierter Salzsäure eine blaugraue Farbreaktion (Nummer 23 B 4 der Farbtafeln von K o r n e r u p und W a n s c h e r, 1981); die Nachweisgrenze (innerhalb von 15 min) lag bei 100 bis 250 ng. Die amanitinhaltigen Giftpilze *Amanita phalloides* und *Amanita verna* zeigten blaugrüne bzw. pastellgrüne Reaktionen (Nummer 26 B 4 bzw. 25 A 4 der Farbtafeln). Als positiv werteten wir alle blauen und blaugrünen Farbentwicklungen.

Diese positiv reagierenden Extrakte wurden mit Hilfe der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (Nano-DC) auf Amanitinvorkommen geprüft wie früher beschrieben (S t i j v e und S e e g e r, 1979), und zwar jeweils vierfach, nämlich in zwei verschiedenen Fließmittelsystemen und mit zwei verschiedenen Farbregentien. Je 2, 3 und 4 μ l Extrakt wurde mit einer Hamilton-Mikroliterspritze (Bonaduz, Schweiz) auf 10 x 10 cm-Fertigplatten (Kieselgel 60 F 254 für die Nano-DC; Merck) aufgetragen; die Chromatogramme wurden entweder in Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser (75:33:5:7,5 v/v) oder in 2-Butanol-Ethylacetat-Wasser (56:48:20 v/v) entwickelt, mit einer 1 %igen methanolischen Lösung von Zimtaldehyd (Merck) oder von 1,2-Dihydroxycyclobutendion (Fluka) angesprüht und nach dem Trocknen in eine Salzsäureatmosphäre verbracht. Als Referenzsubstanzen dienten außer α -Amanitin noch β , γ - und ϵ -Amanitin, Amanin und Amanullin (freundlicherweise überlassen von Prof. H. Faulstich, Heidelberg), sowie Extrakt von gefriergetrockneter *Amanita phalloides*. Die Amanitine färbten sich mit Zimtaldehyd-Salzsäure purpurrot; die Nachweisgrenze lag bei 50 ng. Mit 1,2-Dihydroxycyclobutendion-Salzsäure färbten sie sich – schwächer – blaugrün. In Knollenblätterpilzextrakt konnten unter diesen Bedingungen α -, β - und γ -Amanitin eindeutig nachgewiesen werden (R_f -Werte in Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser 0,18 [α], 0,06 [β] und 0,26 [γ]). Die Phallotoxine ließen sich dagegen nicht erfassen; sie färben sich mit Zimtaldehyd-Salzsäure himmelblau, jedoch erst bei Applikation viel größerer Extraktmengen.

Die Toxizitätsprüfung erfolgte an weiblichen Mäusen (Stamm NMRI; Zentralinstitut für Versuchstiere; Hannover) mit einem Gewicht von 20 g. Methanolischer Extrakt wurde in Wasser überführt, gefriergetrocknet, in 0,9 %iger Kochsalzlösung aufgenommen und in einem Volumen von 0,5 ml intraperitoneal injiziert.

Ergebnisse

Von den untersuchten 335 Arten von Lamellenpilzen ergaben 63, also 19 %, im Zeitungspapiertest eine positive, d. h. blaue oder blaugüne Farbreaktion (vgl. Tabelle 1). Keiner der Extrakte reagierte entsprechend auf Filterpapier. All diese Reaktionen erwiesen sich als falsch-positiv, denn in keinem der Extrakte war ein Amanitin nachweisbar mit einer dünnschichtchromatographischen Methode, die empfindlicher ist als der Zeitungspapiertest. Wohl enthielten sie alle eine zimtaldehydpositive Substanz, die sich ähnlich einem Amanitin grauviolett färbte und in Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser dem α -Amanitin unmittelbar vorauslief (R_f -Wert 0,20 gegenüber 0,18 bei α -Amanitin). Sie wurde nicht identifiziert, erwies sich aber als ungiftig. Besonders reichlich fand sie sich in Extrakt von *Lyophyllum decastes*; davon war das 10fache der tödlichen Dosis von *Amanita phalloides*-Extrakt für Mäuse vollkommen ungiftig und auch das 20fache wurde noch überlebt.

Die 272 Pilzarten, die im Zeitungspapiertest negativ reagierten (vgl. Tabelle 2), ergaben gelbe oder gelbgrüne, manchmal auch rötliche Farbreaktionen.

1 Angaben über Fundorte auf Wunsch von der Verfasserin.

