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 dünnschichtchromatographischen 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 gesammelt[1], 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 µl des Überstandes punktförmig auf Umdruckpapier aufgetragen. α-Amanitin (Boehringer; Mannheim) ergab mit konzentrierter Salzsäure eine blaugraue Farbreaktion (Nummer 23 B 4 der Farbtafeln von Kornerup und Wanscher, 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 (Stijve und Seeger, 1979), und zwar jeweils vierfach, nämlich in zwei verschiedenen Fließmittelsystemen und mit zwei verschiedenen Farbreagentien. Je 2, 3 und 4 µl Extrakt wurde mit einer Hamilton-Mikrolitersprite (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 blaugrüne 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.

Diskussion

Der Zeitungspapiertest ist einfach, erfordert keine Laboreinrichtung und liefert schnell das Resultat. Er gelingt mit frischen, tiefgefrorenen und getrockneten Pilzen – nicht mit Speiseresten oder Mageninhalt – und eignet sich auch für Abfall etwa von Pilzstielen, der botanisch kaum bestimmbar ist. Der Test ist außerdem hoch empfindlich; wird er richtig ausgeführt – auf ligninhaltigem! Papier –, so sollte er Pilze mit tödlichem Amanitingehalt erfassen. Sein Wert als Orientierungshilfe steht außer Frage.

Erwartungsgemäß ist der Test nicht spezifisch. Er wird aber negativ mit verschiedenen eßbaren *Agaricus*-Arten und mit *Leucoagaricus pudicus,* also jenen Pilzen, die am häufigsten mit Knollenblätterpilzen verwechselt werden; er wird auch mit *Kuehneromyces mutabilis* negativ, der gelegentlich mit *Galerina marginata* verwechselt wird.

Wendet man den Test bei beliebigen Lamellenpilzen an, so muß man nach unserer Erfahrung mit 20 % falsch-positiven Resultaten rechnen. Nichtblätterpilze wurden in unsere Untersuchung nicht einbezogen, da sie kaum mit den amanitinhaltigen *Amanita-, Galerina-* und *Lepiota*arten zu verwechseln sind. Falsch-positive Resultate kommen bei bekannten Speisepilzen wie *Clitocybe nebularis* ebenso vor wie bei Giftpilzen, z. B. allen untersuchten Varietäten von *Russula emetica.* Da wir auf Filterpapier keine positiven Reaktionen erhielten, lassen sie sich auch nicht mit Autooxidationsvorgängen erklären, die zu erwarten sind bei Pilzen, deren Fleisch blaut oder deren Milchsaft sich an der Luft verfärbt (Beutler und Verger, 1980). Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, waren unsere falschpositiven Reaktionen meist um Farbnuancen verschieden von denen, die bei *Amanita phalloides* oder *Amanita verna* auftraten; auch verblaßten manche der Flecke schneller oder färbten sich erst sekundär nach blau um. Es ist bekannt, daß sich 5-substituierte Tryptamine, etwa das in *Amanita citrina* vorkommende Bufotenin, im Zeitungspapiertest zunächst rotbraun färben um dann allmählich die blaue Farbe der Amanitine anzunehmen (Beutler und Verger, 1980). Unter den Bedingungen der Praxis sind solche feinen Unterschiede allerdings kaum verwertbar.

Praktisch geht es meist darum, eine Knollenblätterpilzvergiftung zu bestätigen oder auszuschließen. Auf den Zeitungspapiertest wird man vor allem zurückgreifen, wenn man schwer definierbaren Abfall vorliegen hat; oft stammt er von mehreren Pilzarten. Eine negative Zeitungspapierreaktion spricht hier gegen amanitinhaltige Pilze, eine positive ist aber noch kein Beweis dafür.

Literatur

BEUTLER, J. A. & P. P. VERGER (1980) – Amatoxins in American mushrooms: evaluation of the Meixner test. Mycologia 72, 1142–1149.

KORNERUP, A. & J. H. WANSCHER (1981) – Taschenlexikon der Farben. Muster-Schmidt Verlag, Zürich/Göttingen.

MEIXNER, A. (1979) – Amatoxin-Nachweis in Pilzen. Z. Mykol. 45, 137–139.

STIJVE, R. & R. SEEGER (1979) – Determination of α-, β- and γ-amanitin by high performance thin-layer chromatography in *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr. from various origin. Z. Naturforsch. 34c, 1133–1138.

WIELAND, Th. (1949) – Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes VII. β-Amanitin, eine dritte Komponente des Knollenblätterpilzgiftes. Liebigs Ann. Chem. 564, 152–160.

– (1978) – Zeitungspapier-Test für Giftpilze. Umschau 78, 611.

Tabelle 1: 63 Arten mit falsch-positiver Zeitungspapierreaktion.

Table 1: 63 Species with false-positive newspaper test.

Spezies	Farbnummer	Farbe
Gomphidiaceae		
Gomphidius glutinosus	23 C 3	blaugrau
Tricholomataceae		
Clitocybe nebularis	26 A 2–3	blaßgrün
Lepista sordida	25 B 4–5	graugrün
Tricholoma inamoenum	26 A 2	grünweiß
Tricholoma lascivum	26 B 4	graugrün
Tricholoma pardinum	25 B 4	graugrün
Lyophyllum infumatum	25 B 4–5	graugrün
Lyophyllum loricatum	25 B 4–5	graugrün
Lyophyllum decastes	28 B 4	graugrün
Calocybe chrysenteron	27 B 4–5	graugrün
Leucopaxillus giganteus	26 B 3	graugrün
Entolomataceae		
Entoloma clypeatum	27 A 3–4	pastellgrün
Pluteaceae		
Pluteus pellitus	20 A 2	blauweiß
Amanitaceae		
Amanita citrina	19 B 4	grauviolett
Amanita porphyria	23 B 4	graublau
Amanita strobiliformis	27 A 2	grünweiß
Coprinaceae		
Coprinus atramentarius	25 B 4	graugrün
Coprinus lagopus	25 B 4	graugrün
Coprinus hemorobius	27 B 3–4	graugrün
Panaeolus sphinctrinus	26 B 3	graugrün
Psathyrella velutina	24 B 3–4	grautürkis
Psythyrella hydrophila	25 B 4–5	graugrün
Psathyrella obtusata	26 A 3	blaßgrün
Cortinariaceae		
Inocybe hirtella	25 A 2	grünweiß
Hebeloma radicosum	26 A 2	grünweiß
Hebeloma mesophaeum	26 B 3–4	graugrün
Hebeloma sinuosum	26 B 3	babyblau
Hebeloma claviceps	25 C 3–4	graugrün
Hebeloma crustuliniforme	26 B 3–4	graugrün

Hebeloma sinapizans	26 B 3	graugrün
Cortinarius multiformis	24 A 4	helltürkis
Cortinarius amoenolens	25 B 3	graugrün
Cortinarius subtortus	26 B 3	babyblau
Cortinarius camphoratus	23 C 3	nebelblau
Cortinarius decoloratus	25 B 4	graugrün
Leucocortinarius bulbiger	25 B 5–6	graugrün
Russulaceae		
Russula laurocerasi	25 B 3	graugrün
Russula fellea	25 B 4	graugrün
Russula turci	25 B 3–4	graugrün
Russula rosea	20 B 4	graublau
Russula paludosa	24 B 3	grautürkis
Russula luteotacta	26 C 3	graugrün
Russula emetica	26 B 3	graugrün
R. emetica var. silvestris	25 B 3	graugrün
R. emetica var. betularum	24 C 3	grautürkis
Russula fragilis	25 B 4	graugrün
Lactarius vellereus	25 B 3	graugrün
Lactarius piperatus	25 B 3	graugrün
Lactarius pergamenus	25 B 3–4	graugrün
Lactarius scrobiculatus	24 C 3	grautürkis
Lactarius necator	23 B.4	graublau
Lactarius torminosus	26 B 3	graugrün
Lactarius pubescens	25 B 3–4	graugrün
Lactarius uvidus	23 C 3	blaugrau
Lactarius acerrimus	26 B 3	graugrün
Lactarius pallidus	25 B 3	graugrün
Lactarius circellatus	26 B 3	graugrün
Lactarius tithymalinus	26 B 2–3	blaßgrün
Lactarius mitissimus	25 B 3	graugrün
Lactarius aurantiacus	25 C 4	graugrün
Lactarius quietus	24 B 3	grautürkis
Lactarius blumei	25 B 4	graugrün
Poriales mit lamelligem Hymenophor		
Lentinellus cochleatus	25 B 3	graugrün

Tabelle 2: 272 Arten mit negativer Zeitungspapierreaktion.

Table 2: 272 Species with negative newspaper test.

Paxillaceae: *Paxillus involutus. P. atrotomentosus. P. panuoides. Hygrophoropsis aurantiaca. Omphalotus olearius.*

Gomphidiaceae: *Chroogomphus rutilus.*

Hygrophoraceae: *Hygrophorus chrysodon. H. penarius. H. eburneus. H. melizeus. H. erubescens. H. queletii. H. poetarum. H. pudorinus. H. nemoreus. H. discoideus. H. hypothejus. H. lucorum. H. olivaceoalbus. Hygrocybe persistens. H. psittacina. H. conica. H. acutoconica.*

Tricholomataceae: *Laccaria amethystina. L. laccata. L. proxima. Clitocybe hydrogramma. C. phyllophila. C. odora. C. clavipes. C. inornata. C. geotropa. C. gibba. C. cerussata. C. pithiophila. C. dealbata. C. obsoleta. C. suaveolens. C. ditopa. Lepista nuda. L. personata. L. gilva. L. inversa. Tricholomopsis decora. T. rutilans. Tricholoma batschii. T. albobrunneum. T. vaccinum. T. imbricatum. T. portentosum. T. sejunctum. T. sulfureum. T. impolitum. T. saponaceum. T. irinum. T. virgatum. T. orirubens. T. scalpturatum. T. atrosquamosum. T. terreum. Armillariella mellea. Calocybe ionides. Pseudoclitocybe cyathiformis. Melanoleuca strictipes. M. subalpina. M. melaleuca. M. tristis. Collybia peronata. C. hariolorum. C. confluens. C. ingrata. C. acervata. C. dryophila. C. butyracea. C. fusipes. C. maculata. Hohenbuehelia petaloides. Oudemansiella platiphylla. O. mucida. O. radicata. Marasmius rotula. M. alliaceus. M. oreades. Mycena pelianthina. M. pura. M. inclinata. M. galericulata. M. chlorinella. M. zephirus. M. alcalina. Flammulina velutipes.*

Entolomataceae: *Clitopilus prunulus. Entoloma sinuatum. E. rhodopolium. E. nidorosum.*

Pluteaceae: *Volvariella speciosa. V. speciosa* var. *gloiocephala. Pluteus pellitus. P. atricapillus. P. leoninus. P. romelli.*

Amanitaceae: *Amanita inaurata. A. vaginata. A. mairei. A. crocea. A. umbrinolutea. A. lividopallescens. A. muscaria. A. pantherina. A. spissa. A. rubescens. A. echinocephala.*

Agaricaceae: *Agaricus bisporus. A. bitorquis. A. maleolens. A. aestivalis. A. langei. A. haemorrhoidarius. A. silvaticus. A. vaporarius. A. subperonatus. A. campester. A. augustus. A. perrarus. A. silvicola. A. abruptibulbus. A. arvensis. A. excellens. A. macrosporus. A. comtulus. A. lutosus. A. xanthoderma. A. placomyces. A. placomyces var. meleagris. Lepiota acutesquamosa. L. aspera. L. cristata. L. subgracilis. L. clypeolaria. Macrolepiota procera. M. rhacodes. M. gracilenta. M. mastoidea. Leucoagaricus pudicus. Cystoderma amiantinum. C. carcharias.*

Coprinaceae: *Coprinus comatus. C. picaceus. C. micaceus. C. domesticus. C. disseminatus. Psathyrella candolleana.*

Bolbitiaceae: *Conocybe cryptocystis. Pholiotina vestita. Bolbitius vitellinus. Agrocybe praecox. A. vervacti.*

Strophariaceae: *Stropharia squamosa. S. coronilla. S. rugosoannulata. S. aeruginosa. Hypholoma capnoides. H. sublateritium. H. fasciculare. Pholiota squarrosa. Ph. flammans. Ph. adiposa. Ph. subsquarrosa. Ph. lenta. Ph. gummosa. Ph. astragalina. Kuehneromyces mutabilis. Tubaria furfuracea.*

Crepidotaceae: *Crepidotus mollis.*

Cortinariaceae: *Inocybe atripes. I. terrigena. I. patouillardii. I. jurana. I. maculata. I. fastigiata. I. cervicolor. I. bongardii. I. godeyi. I. geophylla. I. geophylla var. lilacina. I. pyriodora. I. lucifuga. I. obscura. I. cincinnata. I. napipes. I. asterospora. Gymnopilus spectabilis. G. liquiritiae. G. hybridus. G. penetrans. Dermocybe cinnamomeolutea. D. malicora. D. sanguinea. Cortinarius cotoneus. C. betuletorum. C. orellanoides. C. gentilis. C. fluryi. C. glaucopus. C. praestans. C. varius. C. balteatocumatilis. C. latus. C. infractus. C. prasinus. C. auroturbinatus. C. elegantior. C. subfulgens. C. traganus. C. pholideus. C. trivialis. C. elatior. C. pangloius. C. delibutus. C. armillatus. C. colus. C. bouillardii. C. candelaris. C. duracinus. C. bivelus. C. subferrugineus. C. saturninus. C. erythrinus. C. subsertipes. C. hinnuleus. C. pachypus. C. rheubarbarinus. Rozites caperata.*

Russulaceae: *Russula delica. R. nigricans. R. densifolia. R. adusta. R. farinipes. R. foetens. R. pectinata. R. consobrina. R. flava. R. decolorans. R. virescens. R. cyanoxantha. R. vesca. R. aeruginea. R. rosacea. R. lutea. R. nauseosa. R. xerampelina. R. coerulea. R. olivacea. R. alutacea. R. integra. R. paludosa. R. aurata. R. pulchella. R. badia. Lactarius citriolens. L. lignyotus. L. fuliginosus. L. semisanguifluus. L. deterrimus. L. chrysorrheus. L. porninsis. L. blennius. L. helvus. L. volemus. L. ichoratus. L. rufus. L. serifluus.*

Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.
German Mycological Society

Dieses Werk stammt aus einer Publikation der **DGfM**.

www.dgfm-ev.de

Über Zobodat werden Artikel aus den Heften der pilzkundlichen Fachgesellschaft kostenfrei als PDF-Dateien zugänglich gemacht:

- **Zeitschrift für Mykologie**
  Mykologische Fachartikel (2× jährlich)
- **Zeitschrift für Pilzkunde**
  (Name der Heftreihe bis 1977)
- **DGfM-Mitteilungen**
  Neues aus dem Vereinsleben (2× jährlich)
- **Beihefte der Zeitschrift für Mykologie**
  Artikel zu Themenschwerpunkten (unregelmäßig)

Dieses Werk steht unter der Creative Commons Namensnennung - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz (CC BY-ND 4.0).

- **Teilen:** Sie dürfen das Werk bzw. den Inhalt vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen, sogar kommerziell.
- **Namensnennung:** Sie müssen die Namen der Autor/innen bzw. Rechteinhaber/innen in der von ihnen festgelegten Weise nennen.
- **Keine Bearbeitungen:** Das Werk bzw. dieser Inhalt darf nicht bearbeitet, abgewandelt oder in anderer Weise verändert werden.

Es gelten die vollständigen Lizenzbedingungen, wovon eine offizielle deutsche Übersetzung existiert. Freigebiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Zeitschrift für Mykologie - Journal of the German Mycological Society

Jahr/Year: 1984

Band/Volume: 50_1984

Autor(en)/Author(s): Seeger Ruth

Artikel/Article: Zeitungspapiertest für Amanitine - falsch-positive Ergebnisse 353-359