Makrochemische Farbreaktionen bei Großpilzen

V. Ein verbessertes Reagenz für die Kreuzungsreaktion nach Schäffer

H. M. FRANK

Amthorstraße 5
DDR-6500 Gera

Eingegangen am 20.11.1987

Frank, Harald M. (1988) – Macrochemical colour reactions of macromycetes V. An improved reagent for the cross reaction according to Schäffer. Z. Mykol. 54 (1): 103–108.
Key Words: cross reaction, Agaricus, diazonium compounds, distribution pattern.
Abstract: In 1933 Julius Schäffer found a colour reaction characterized by the simultaneous application of aniline and nitric acid on the pileus surface of species of *Agaricus* L.: Fr. It became clear that the presence of some metabolites of the nitrogen dissimilation namely the presence of diazonium compounds causes the positive reaction in case of some yellowing species. A new reagent (aniline and glacial acid are mixed 1:1 per volume as a stock solution) is proposed. It allows more precise examinations of the distribution of this constituents in the carpophore.
Zusammenfassung: Die 1933 durch Zufall von Julius Schäffer bei gleichzeitiger Anwendung von Anilin und Salpetersäure auf der Huthaut gilbender Arten der Gattung *Agaricus* L.: Fr. gefundene Farbreaktion konnte chemisch aufgeklärt werden. Bei den reagierenden Inhaltsstoffen handelt es sich um Metaboliten des Stickstoff-Stoffwechsels, namentlich um Diazonium-Verbindungen. Es wird ein neues, haltbares 1:1-Mischreagenz aus Anilin und konz. Essigsäure vorgeschlagen. Damit sind präzisere Untersuchungen zur Verteilung dieser Substanzen im Fruchtkörper möglich.

1. Einleitung

Sieht man von den makrochemisch schon ziemlich intensiv untersuchten *Russula* Pers. ex S. F. Gray ab, gibt es wohl kaum eine andere Gattung, in der eine einzelne Farbreaktion mit solch weitreichender Konsequenz herangezogen wird zur Aufspaltung in Sektionen wie die Kreuzungsreaktion nach Schäffer (SFF) bei *Agaricus* L.: Fr. In vielen Schlüsseln wird die Alternative „SFF-positiv" gegen „SFF-negativ" gleich zu Beginn des Bestimmungsganges abgefordert, z. B. bei Kreisel (1981) und Meusers (1986). In der neuesten Monographie von Cappelli (1984) gar findet überhaupt kein anderes Reagenz Erwähnung (und ein Schlüssel ist bedauerlicherweise nicht enthalten).
Trotz dieser allgemeinen Wertschätzung und Inanspruchnahme eines makrochemischen Tests war in der einschlägigen mykologischen und chemischen Literatur kein Hinweis darauf zu finden, konkrete Inhaltsstoffe der Champignons mit der Farbreaktion an der Kreuzungsstelle in Verbindung zu bringen. Der häufig erhobene Vorwurf, makrochemische Tests seien ein „Strapazieren der Pilze mit willkürlich ausgewählten Chemikalien in einer Art Black-box-Versuch" kann gerade in diesem Fall nicht von der Hand gewiesen werden, wie ein Blick in die Geschichte zeigt.

2. Historischer Überblick

Sucht man nach der Erstbeschreibung dieses chemischen Tests, wird man sowohl bei Cappelli (1984) als auch bei Singer (1986) auf eine Arbeit von Schäffer & Möller (1938) und dann dort auf einen Beitrag von Schäffer (1933) verwiesen. Dieser berichtet, daß ihm einige schwer bestimmbare Champignons vorgelegt wurden, während er gerade am Abschluß der *Russula*-Monographie arbeitete und zufällig einige Reagenzien auf dem Tisch stehen hatte.

„Warum sollen die Champignons nicht auch einmal einer Probe unterzogen werden?" (ebenda)
Die nachfolgenden Sätze sind ein schönes Beispiel für des Naturforschers Neugier, die, gepaart mit einer scharfen Beobachtungsgabe, Neues auffinden läßt.

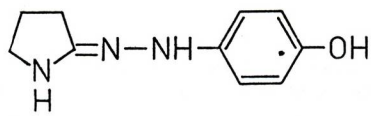
„Einen frischen *silvicola*-Hut bekritzele ich mit Salpetersäure und mit Anilin, ohne Erfolg; am anderen Morgen finde ich den Hut auf meinem Schreibtisch mit leuchtend-feuerroten Striemen bedeckt, am feurigsten immer da, wo zwei Striche sich berührt oder gekreuzt hatten, von der Kreuzungsstelle aus nach beiden Seiten abklingend. Ich kreuze absichtlich Salpetersäure und Anilinöl: wahrhaftig, an der Kreuzungsstelle entsteht nach kurzer Zeit eine chromgelbe, dann orangefarbene, schließlich mennigrote Spur: die Kreuzungsreaktion." (ebenda)

Die von Schäffer verwendete Salpetersäure war konzentriert.
Nun hat leider in den über 50 Jahren seit der Bekanntgabe diese Reaktion nicht mehr die Neugier der Chemiker und Mykologen erweckt, so daß bis jetzt nur festzustellen ist:

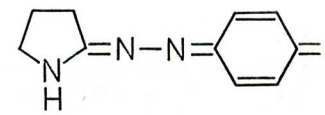
1. die positive Kreuzungsreaktion geht parallel zum Gilben der Fruchtkörper, ist aber viel empfindlicher und im Zweifelsfalle meist eindeutig
2. die ebenfalls gilbenden Arten der Sektion *Xanthodermatei* Sing. verfärben sich an der Kreuzungsstelle nicht
3. offensichtlich ist die richtige Reihenfolge der Chemikalien maßgebend für reproduzierbare Ergebnisse. Meusers (1986) verlangt, die Linie aus Anilin anschließend mit einer Linie aus Salpetersäure zu kreuzen, ebenfalls so Singer (1986) auf S. 486, während er auf S. 100 schreibt „... a transversal streak with HNO_3 is made, and then crosswise, another streak with aniline oil ...", wie es eigentlich der ursprünglichen Version entspricht.

3. Zur Chemie der Kreuzungsreaktion

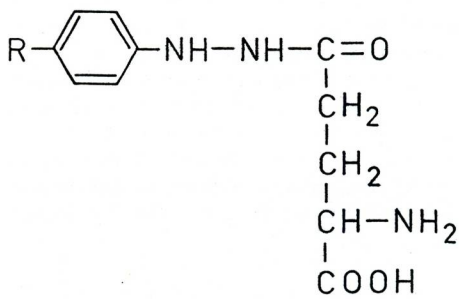
Da ein positives Ergebnis nur bei den ± gilbenden Arten der Sektionen *Arvenses* Konrad & Maublanc und *Minores* Fr. zu beobachten ist, vermuteten bereits Schäffer & Möller (1938), daß für beide Verfärbungen die gleichen Inhaltsstoffe verantwortlich sind. In den letzten Jahren konnten aus Arten der *Arvenses, Bitorques* (K. & R. ex Hein) Bon & Cappelli und *Xanthodermatei* eine ganze Reihe von Inhaltsstoffen isoliert und strukturell als Arylhydrazin-Derivate aufgeklärt werden.



1

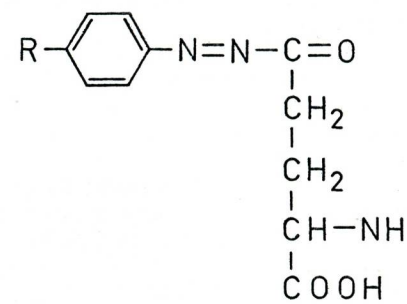


2



3, R = OH

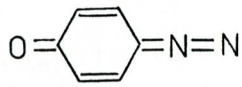
4, R = CH_2OH



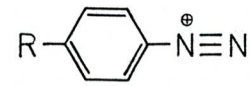
5, R = OH

6, R = CH_2OH

H i l b i g et al. (1985) erkannten die Verbindungen Leucoagaricon **1** und Xanthodermin **3** als Chromogene in *A. xanthoderma* Genevier. Aus **1** entsteht durch Lufteinwirkung (Oxidation) Agaricon **2**, aus **3** durch Natronlauge die Arylazoverbindung **5**. Übrigens beruht auch die orange Verfärbung der Huthaut mit Anilin allein auf dieser letztgenannten Reaktion. Hier wie in anderen Fällen (z. B. bei *Hapalopilus rutilans* (Pers. ex Fr.) Karst.) wirkt Anilin als organische Base. Bereits L e v e n b e r g (1961) wies in *A. bisporus* (Lange) Imbach Agaritin **4** nach, welches durch die nur geringfügig andere Substitution strukturell und vom Reaktionsvermögen her dem Xanthodermin **3** sehr ähnlich ist und mit Laugen **6** bilden sollte.



7

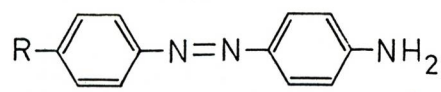


8, R=OH 9, R=CH_2OH

4-Diazo-2,5-cyclohexadien-1-on **7** wurde von H i l b i g et al. (1985) aus *A. xanthoderma,* das sich durch Protonierung und Umlagerung von **7** ergebende 4-Hydroxybenzendiazonium-Kation **8** von D o r n b e r g e r et al. (1986) aus der gleichen Art isoliert. Das 4-(hydroxymethyl)benzendiazonium-Kation **9** wurde von L e v e n b e r g (1962) in *A. bisporus* nachgewiesen. Offensichtlich enthalten diese Arten Enzyme, die die Arylhydrazin-Derivate zu den korrespondierenden Aryldiazonium-Verbindungen oxydieren (L e v e n b e r g 1962, D o r n b e r g e r et al. 1986). Es ist also ein sicherlich zulässiger Analogieschluß, anzunehmen, daß in allen gilbenden *Agaricus*-Arten diese oder ähnliche Aryldiazonium-Verbindungen als Stoffwechselprodukte erscheinen.
Makrochemisch lassen sich solche Metaboliten leicht nachweisen, indem mit geeigneten Kupplungsreagenzien Azofarbstoffe gebildet werden. Auf diesem Prinzip beruhten die Nachweise von **9** im Basalgewebe von *A. bisporus* durch Kupplung mit Naphthylethylendiamin in 0,05 N HCl bzw. mit Dimethylanilin (in der Fußnote sicher infolge Druckfehlers als Dimethylalanin bezeichnet) in Acetatpuffer bei pH 7 (L e v e n b e r g 1962) und von **8** im Gesamtextrakt von *A. xanthoderma* durch Kupplung mit Resorcin in 1 N NaOH bzw. mit 2-Naphthol (H i l b i g et al. 1985). Da Anilin als primäres, aromatisches Amin prinzipiell zur Azokupplung befähigt ist, galt es zu untersuchen, ob und unter welchen Bedingungen die auf der Verwendung von Anilin beruhende Kreuzungsreaktion letztlich eine Spezifität gegenüber Diazonium-Verbindungen aufweist.

4. Vorschlag für ein neues Tüpfelreagenz

Es ist aus der organischen Chemie bekannt, daß die Azokupplung mit Arylaminen von deren Basizität abhängt und somit über den pH-Wert des Reaktionsmediums beeinflußt werden kann (H a u p t m a n n et al. 1976). So kuppelt Anilin glatt im schwach sau-



10

ren Milieu mit einem Diazonium-Kation wie z. B. **8** oder **9** zu einem Diazoaminobenzen, welches bei niedrigem pH-Wert durch Diazoamino-Aminoazo-Umlagerung in den Azofarbstoff **10** übergeht, wobei die Art der zugegebenen Säure von untergeordneter Bedeutung ist. Mykologisch bedeutet dies, daß die Kreuzungsreaktion nicht notwendigerweise an die Verwendung von Salpetersäure gebunden sein sollte.

In vielfältigen Versuchen an *A. essettei* Bon zeigte sich tatsächlich, daß auch mit anderen Säuren (Schwefelsäure 60%ig, Salzsäure 20%ig, Essigsäure konzentriert = Eisessig) prinzipiell gleichartige Verfärbungen erzielt werden. Allerdings ist Schwefelsäure ungünstig, weil durch die Salzbildung die Azokupplung unterdrückt wird bzw. schwer zu erkennen ist. Eiseissig hingegen erwies sich als optimal und erbrachte in allen Tests gleiche Ergebnisse wie Salpetersäure, z. T. allerdings etwas schwächer im Farbton. Dabei ist sogar die Reihenfolge der Chemikalienanwendung unwichtig, also ob Anilin mit Eisessig gekreuzt wird oder umgekehrt.

Damit scheint auch klar zu sein, warum Meusers (1985) so auf die Reihenfolge Anilin, dann Salpetersäure, drängt. Anilin kann bereits in die Huthaut eindringen, und es wird eine gewisse Sättigung des Gewebes erreicht. Die anschließend aufgetragene starke Salpetersäure mischt sich mit dem oberflächlich haftenden Anilin und dringt langsam in die Huthaut ein, wodurch die für die Azokupplung optimalen pH-Werte aufgebaut bzw. über einen längeren, zur Erzielung satter Verfärbungen notwendigen, Zeitraum aufrechterhalten bleiben. Dies wäre nicht gegeben, wenn im 1. Schritt durch Auftragen von reichlich Salpetersäure die Huthaut zu stark versauert würde. Die Kupplungsreaktion könnte dann nur noch in weniger stark beeinflußten Randbereichen ablaufen, nicht mehr aber dominierend an der entscheidenden Kreuzungsstelle.

Nachteilig bei der „klassischen" Durchführung der Kreuzungsreaktion sind:
1. die unbequeme Handhabung und z. T. komplizierte Aufbewahrung der aggressiven Salpetersäure.
2. die Gefahr der wechselseitigen Verschmutzung der Chemikalien.
3. die Notwendigkeit, relativ große Teile des Pilzes zum „Kreuzen" vorliegen zu haben und opfern zu müssen.

Da Eiseissig als relativ schwache Säure mit Anilin keine Salze bildet, können nun vorteilhafterweise diese beiden Chemikalien vorab zu einer gebrauchsfertigen Lösung gemischt werden. Als günstige Zusammensetzung erwies sich ein 1:1-Gemisch (Volumen), welches in allen Fällen (meist wiederum getestet bei *A. essettei,* deren reichhaltiges Vorkommen im heimischen Sammelgebiet im Herbst 1987 die Untersuchungen ermöglichte) identische Ergebnisse zur Kreuzungsreaktion, sowohl klassisch mit Salpetersäure als auch mit Eisessig, lieferte. Bevor jedoch die bisherige Verfahrensweise durch das neue Mischreagenz abgelöst werden kann, muß die völlige Kongruenz der Ergebnisse bewiesen oder zumindest glaubhaft gemacht werden. Neben den theoretischen Ausführungen zum Reaktionsmechanismus sollen dies die nachfolgenden Beispiele mit dem Mischreagenz tun. Die Notation der Farben erfolgt wie bereits vorgestellt (Frank 1986, Frank 1987).

nach Cappelli (1984) SFF-negative Arten

A. silvaticus Schaeff.: Fr.	– negativ
A. xanthoderma Genevier	– negativ bis (selten) kartonbräunlich 30.20.20
A. placomyces Peck	– negativ bis ganz schwach gelblich-orange 20.05.00
A. cf. *fusco-fibrillosus* (Möller) Pilat	– negativ
A. campestris L.: Fr.	– negativ

nach Cappelli (1984) SFF-positive Arten

A. augustus Fr.	– rasch knallig rot 50.85.05
A. essettei Bon	– orange 65.50.00, ± rötlich orange 70.60.00, z. T. mit bräunlichem Stich 70.50.20
A. arvensis Schaeff.: Fr.	– orange 65.55.00, ± rötlich orange 60.70.00, einmal auch dunkel purpurrot 50.99.40
A. semotus Fr.	– Randbereich des Tropfens orange bis ± rötlich orange 65.65.00, sonst ± undeutlich

Die z. T. vorhandenen Unterschiede in der Verfärbung an der Tüpfelstelle können eventuell erklärt werden durch zur Zeit noch nicht identifizierte, anders substituierte Derivate der Aryldiazonium-Verbindungen **8** und **9**. Der Grundfarbton bei positiver Reaktion bleibt jedoch immer im Rahmen orange bis satt rot. Allein bei trockenem Material, auch bei Exsikkaten, kann die Verfärbung dunkel rotbraun werden. In diesen Fällen ist es besser, entweder das Pilzteil vor der Reaktion mit Wasser zu befeuchten oder ein Reagenz folgender Zusammensetzung zu verwenden:

1 Teil Anilin + 1 Teil Eisessig + 2 Teile Wasser (Volumen)

5. Schlußfolgerung

Durch Analogieschlüsse und Experimente konnte nachgewiesen werden, daß die die positive Kreuzungsreaktion mit Anilin und Salpetersäure hervorrufenden Pilzinhaltsstoffe als Diazonium-Verbindungen anzusprechen sind. Diese 1933 gefundene Reaktion ist somit ein Verfahren zum selektiven Nachweis derartiger Substanzen und ein frühes Pendant zum Diazotierungsreagenz auf Arylamine nach Micka (1954). Die klassische Durchführung auf der Huthaut ist aber auch ein erster Schritt zur Untersuchung der Verteilung solcher Stoffwechselprodukte im Fruchtkörper. Trotz gleicher „gilbender Prinzipien" in Vertretern der *Arvenses, Minores* und *Xanthodermatei* fallen die Ergebnisse auf der Huthaut unterschiedlich aus. Nach Hilbig et al. (1985) ist die reaktionsfähige Diazonium-Verbindung **7** bei *A. xanthoderma* in den Lamellen konzentriert. Damit wird plausibel, daß gilbende Arten mit dem Potential, Diazonium-Verbindungen zu bilden, genau dann eine negative „klassische" Schäffer - Reaktion geben können, wenn diese Substanzen zumindest in der Huthaut nicht enthalten sind.

Das vorgestellte Mischreagenz aus Anilin und Eisessig ist wesentlich leichter anwendbar und ermöglicht auch die Untersuchung einzelner Pilzteile (Fleisch, Huthaut, Stielhaut, Lamellen) und damit des Verteilungsmusters dieser Inhaltsstoffe mit größerer Präzision durch einfaches Tüpfeln.

Nicht vergessen werden soll, daß gerade einiger dieser Hydrazin-Derivate, namentlich **9**, in den Verdacht der Cancerogenität geraten sind (Bresinsky & Besl 1985 und dort auf S. 182 zitierte Literatur). Nach den hier vorgestellten Ergebnissen bedeutet dies, daß nicht nur *A. bisporus* verdächtig ist, sondern alle gilbenden Arten der Champignons und insbesondere die SFF-positiven kritischer als bisher zu betrachten sind. Auch wenn Bresinsky & Besl (1985) schreiben: „Es konnte bis jetzt nicht festgestellt werden, daß für den Menschen hieraus eine Gefahr abgeleitet werden kann", muß man berücksichtigen, daß gerade cancerogene Effekte auf den Menschen nicht experimentell untersuchbar sind, sondern immensen epidemiologischen Aufwand erfordern. Deshalb sollten die Ergebnisse der Tierversuche (wie auch z. B. die Analyse der Inhaltsstoffe des Weißen Raslings, Fugmann & Steglich 1984) zumindest ein Signal sein nachzudenken, ob nicht allzu leichtfertig Arten als „eßbar" eingestuft werden, wenn nur kein Vergiftungsfall bekannt ist. Bei vielen anthropogenen Schadstoffen entzündet sich eine heiße Diskussion, obwohl oft auch nicht mehr als chemische Analogieschlüsse und Tierversuche Aussagen zur Gefährdung des Menschen erlauben. Diazonium-Verbindungen im beliebten Champignon sind nicht automatisch harmloser als z. B. der als Verschönerungsmittel tierischer Fette verwendete, inzwischen aber längst verbotene Azofarbstoff „Buttergelb".

Diese persönliche Meinung soll die Eignung der Pilze für die menschliche Ernährung nicht in Frage stellen, nur ist eben jeder Fruchtkörper eine kleine „chemische Fabrik" mit häufig noch unbekannten „Produktionsprozessen" und nur sporadisch aufgeklärter „Produktpalette", von „Entsorgung" ganz zu schweigen.

Auch unter dem Gesichtspunkt von Screening-Tests scheint das neue Reagenz bestens geeignet zu sein. Die Haltbarkeit des gebrauchsfertigen Reagenzes ist nicht schlechter als die der Einzelchemikalien; es ist also wirksam, solange die Lösung noch von heller bis gelblicher Farbe ist.

Danken möchte ich all jenen Pilzfreunden, die durch Untersuchung ihrer Funde mit bemüht waren, die anfänglichen Vermutungen auf das hier präsentierte Fundament zu stellen.

Nachtrag

Nach Abschluß des Manuskriptes erhielt ich die Literaturrecherche von Clémençon (1987) zum Thema Agaritin. Die Übersicht von 20 wesentlichen Artikeln seit 1977, davon 9 zur Toxikologie, unterstreicht nachdrücklich das Bemühen der Forscher, die für den Menschen vermutete Gefährdung abzuklären. – Interessant ist, daß nach bisherigem Wissensstand das Agaritin eine auf *Agaricus* beschränkte Substanz ist.

Literatur

BRESINSKY, A. & H. BESL (1985) – Giftpilze – Ein Handbuch für Apotheker, Ärzte und Biologen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

CAPPELLI, A. (1984) – Fungi Europaei, *Agaricus* L.: Fr. Saronno.

CLEMENÇON, H. (1987) – Toxikologische Literatur-Rückschau: Agaritin. Mycologia Helvetica 2 (2): 267–275.

DORNBERGER, K., W. IHN, W. SCHADE, D. TRESSEN, A. ZURECK & L. RADICS (1986) – Antibiotics from Basidiomycetes – Evidence for the occurence of the 4-hydroxybenzenediazonium ion in the extracts of *Agaricus xanthodermus* Genevier *(Agaricales)*. Tetrahedron Letters 27(5): 559–560.

FRANK, H. M. (1986) – Macrochemical color reactions of macromycetes II. Chemical properties and systematic position of *Bondarzewia mesenterica*. Mycotaxon 27: 503–506.

– (1987) – I. Voraussetzungen für eine systematische Untersuchung. Z. Mykol. 53(1): 93–98.

FUGMANN, B. & W. STEGLICH (1984) – Ungewöhnliche Inhaltsstoffe des Blätterpilzes *Lyophyllum connatum (Agaricales)*. Angew. Chem. 96: 71–72.

HAUPTMANN, S., J. GRAEFE & H. REMANE (1976) – Lehrbuch der Organischen Chemie. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.

HILBIG, S., T. ANDRIES, W. STEGLICH & T. ANKE (1985) – Zur Chemie und antibiotischen Aktivität des Carbolegerlings *(Agaricus xanthoderma)*. Angew. Chem. 97: 1063–1064.

KREISEL, H. (1981) – in Michael, Hennig, Kreisel, Handbuch für Pilzfreunde, Bd. IV. Fischer-Verlag, Jena.

LEVENBERG, B. (1961) – Structure and enzymatic cleavage of agaritine, a phenylhydrazide of L-glutamic acid isolated from *Agaricaceae*. J. Am. Chem. Soc. 83: 503–504.

– (1962) – An aromatic diazonium compound in the mushroom *Agaricus bisporus*. Biochim. Biophys. Acta 63: 212–214.

MEUSERS, M. (1986) – Bestimmungsschlüssel für europäische Arten der Gattung *Agaricus* L.: Fr. Beiträge zur Kenntnis der Pilze Mitteleuropas, II: 27–56.

MICKA, K. (1954) – Nové chemické reagencie v mykologii. Česka Mykol. 8 (4): 165–168.

SCHÄFFER, J. (1933) – Spezifische Merkmale bei Champignons. Schweiz. Z. f. Pilzk. 11: 137–140.

– & F. MÖLLER (1938) – Beitrag zur *Psalliota*-Forschung. Ann. Myc. 36: 64–82.

SINGER, R. (1986) – The *Agaricales* in modern taxonomy. Koeltz Scientific Books Koenigstein.

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: 1988

Band/Volume: 54_1988

Autor(en)/Author(s): Frank Harald M.

Artikel/Article: Makrochemische Farbreaktionen bei Großpilzen V. Ein verbessertes Reagenz für die Kreuzungsreaktion nach Schäffer 103-108