Zeitschrift: Mycologia Helvetica
Herausgeber: Swiss Mycological Society
Band: 3 (1988-1990)
Heft: 3

Artikel: Eine einfache, empfindliche Methode zum makrochemischen Nachweis von Orellanin

Autor: Pöder, R. / Moser, M.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-1036538

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 18.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

MYCOLOGIA HELVETICA

Vol. 3 No 3 pp. 283—290 1989

(Manuskript eingegangen am 28. Februar 1989)

EINE EINFACHE, EMPFINDLICHE METHODE ZUM MAKROCHEMISCHEN NACHWEIS VON ORELLANIN

R. Pöder und M. Moser

Institut für Mikrobiologie der Universität Innsbruck
Technikerstr. 25, A-6020 Innsbruck, Österreich

ZUSAMMENFASSUNG

Eine einfache, ökonomische Methode zum Nachweis von Orellanin in Pilzfruchtkörpern wird vorgestellt. Tests an Herbar- und Frischmaterial von 27 Cortinarius spp. (vorwiegend aus der Untergattung Leprocybe Mos.) haben keine falsch positiven Resultate ergeben.

SUMMARY

A simple and economic method for the macrochemical detection of orellanine in fungal carpophores is presented. Tests on dried and fresh material of 27 Cortinarius spp. (mainly of the subgen. Leprocybe Mos.) did not give any false positive results.

RESUME

Une méthode simple et économique est presentée pour la preuve macrochimique d'Orellanine dans des carpophores de champignons. Des tests sur matériel d'herbier et frais de 27 Cortinarius spp. (principalement issus du sousgenre Leprocybe Mos.) n'ont pas montré un résultat faux positive.

EINLEITUNG

Im Zusammenhang mit taxonomischen Untersuchungen innerhalb der Untergattung Leprocybe Mos. bzw. deren Sektion Orellani (vgl. MOSER 1983) entdeckten wir eine charakteristisch erscheinende Farbreaktion mit $FeSO_4$ auf dünnen, rehydrierten Stielfleischschnitten von Cortinarius orellanus (Fr.) Fr. (vgl. PÖDER & PIPITZ 1986).
Bei weiteren Versuchen mit Herbarmaterial stellten wir fest, daß diese blau-roten Reaktionen mit Eisen(III)-chlorid-Lösungen noch wesentlich stärker ausfielen. Da uns bekannt war, daß Fe^{2+}-Ionen mit Orellanin einen roten Komplex bilden (ANTKOWIAK & GESSNER 1979) und sich andererseits mit einem Eisenchlorid-Sprühreagenz (STAHL 1967) nur die Orellaninfraktionen (eines Gesamtextraktes) auf Dünnschicht-Chromatogrammen violett färben, vermuteten wir einen stoffspezifischen Nachweis.
SCHUMACHER & HOILAND wiesen schon 1983 darauf hin, daß die Fe^{3+}-Orellanin-Reaktion für diagnostische Zwecke brauchbar sein könnte. Gleichzeitig stellten sie kurz ein Nachweisverfahren vor. Unabhängig davon erarbeiteten wir ein vergleichbares, einfaches Verfahren, das mit äußerst geringem Zeit- und Materialaufwand durchführbar ist. Bereits 1937 beschreibt HENRY eine mit Eisensalzen erzielte, violettliche Farbreaktion im Stielfleisch von C. orellanoides. Zu diesem Zeitpunkt konnte er freilich nicht ahnen, daß diese Reaktion einen hochspezifischen Nachweis für ein potentes Pilzgift darstellt.

MATERIAL UND METHODEN

Hohlschliff-Objektträger, Filterpapierstreifen, Pipetten, 2%-ige Eisen (III)-chlorid-Lösung in 0.5 N HCl (w/w) nach STAHL, aqua dest., Präparier-nadel, Glasstab.

Reines Orellanin aus C. orellanoides Hry. (= C. speciosissimus Kühn. & Romagn.) wurde an unserem Institut nach RUEDL (1988) isoliert. Die hell-beigen Kristalle wurden in 2%-iger KOH gelöst und mit aqua dest. weiter-verdünnt.

Ein ca. 2 x 2 mm großes, dünnes Fragment (ca. 1 - 2 mg) aus der oberen Stielhälfte (Herbarmaterial) wird am Objektträger ca. 2 - 3 min. in 30 µl (1 Tropfen) aqua dest. rehydriert. Durch ein- bis zweimaliges, vor-sichtiges Wenden der Probe kann dieser Prozeß beschleunigt werden. Mit der Nadel (Pinzette) wird das Fragment aus dem nunmehrigen Extrakt gehoben, auf einen Filterpapierstreifen (Glasunterlage) übertragen und mit dem Glasstab leicht angedrückt, sodaß keine Geweberückstände am feuchten Papier verbleiben. Das so behandelte Fragment wird verworfen.

Nun können drei Varianten der Reaktion in einem Arbeitsgang durchge-führt werden:

Variante 1:

5 µl Reagenz (ein winziger Tropfen) werden auf den noch feuchten Extrakt am Papier zentral aufgetropft. Die Reaktion erfolgt augenblicklich und verstärkt sich noch innerhalb weniger Sekunden. Der ursprünglich blaßgelb-liche, wäßrig-ockerliche Tropfen verfärbt sich im zentralen Bereich mehr oder weniger blau- bis grauviolettlich (Farbbereiche nach KORNERUP & WANSCHER (1981): "greyish violet", "bluish violet", "violet", "deep violet"), die Randzone rötlich ("greyish red", "dull red", "brownish red", "dark red"). Bei dieser Variante können sich auf Grund des Auftragungsmodus (An-drücken des Fragmentes) die Blau- und Rottöne untermischen und unter-schiedlich stark auftreten. Für die Untersuchung von Frischmaterial wird Preßsaft verwendet.

Variante 2:

Diese Variante stellt in etwa das Negativverfahren der obigen Vorgangsweise dar und führt bezüglich einer gleichmäßigen Verteilung der Reaktionsfarben zu deutlich besseren Ergebnissen.
5 µl des Extraktes (vom Objektträger) werden auf einen mit Eisenchlorid präparierten Filterpapierstreifen (ca. 10 µl Lösung eintrocknen lassen) zentral aufgetropft. Die Reaktion erfolgt sofort, aber in umgekehrter Reihenfolge. Das Zentrum ("Pupille") reagiert rot, eine breite Randzone ("Iris") blauviolett (Farbbereiche w. o.).

Variante 3:

Dies ist die empfindlichste Variante mit konstanten Reaktionsfolgen.
5 µl Reagenz werden vorsichtig auf den am Objektträger verbliebenen Extrakt zentral aufgetropft. Es entsteht sofort ein blauviolettes Zentrum mit einem bis mehreren, eng aneinander grenzenden, peripheren Ringen, welche sich durch ihre Rotfärbung deutlich abgrenzen. Die Ausprägung dieser roten Ringe ist von der Konzentration des gelösten Orellanins abhängig.

ERGEBNISSE

Von den in Tabelle 1 angeführten Herbarbelegen standen uns einige Kollektionen schon als Frischmaterial zur Verfügung. Frischer Preßsaft reagiert ebenso deutlich, aber etwas schwächer (geringere Orellaninkonzentration). Bei unseren Testserien mit Herbarmaterial (alle 3 Var.) konnten wir feststellen, daß die Reaktion innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches immer bichromatisch (blauviolett - rot) ausfällt. Bei schwacher Vergrößerung (Lupe) ist sofort eine körnig-flockige Struktur der konzentrischen roten Ringe zu erkennen, während der zentrale, blauviolette Bereich unstrukturiert erscheint. In der unmittelbaren Kontaktzone in der Tropfenmitte fällt zuerst das rote Präzipitat aus, welches durch die Dynamik der Reaktion in Wellen an den Tropfenrand befördert wird (Var. 3). Am Papier (Var. 2) kann das Präzipitat nicht zur Peri-

pherie diffundieren und färbt somit in umgekehrter Weise das Zentrum rot.

Zusätzliche Versuche mit Verdünnungsreihen von reinem Orellanin (0.2%-ige wäßrige Stammlösung) bestätigten diese Beobachtung. Bei geringeren als ca. 1 x 10^{-2} M Orellaninkonzentrationen treten (Var. 2 und 3) nur mehr blauviolette Verfärbungen auf (KORNERUP & WANSCHER (1981): "violet", "light violet", "pastel violet", "pale violet", "violet white"). Die Nachweisgrenze ("violet white") liegt bei 2 x 10^{-4} M.

Bezüglich der Extrahierbarkeit von Orellanin in reinem aqua dest. konnten wir zeigen, daß innerhalb 1 h (unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur) mehr als 75% Orellanin in Lösung gehen. Für diesen Versuch verwendeten wir einen 1%-igen Ansatz (w/v) von pulverisiertem Trockenmaterial (1 reifer Fruchtkörper von C. orellanoides IB 87/-). Der Filterrückstand wurde mehrere Tage, zuerst in aqua dest., dann in 50%-igem Methanol weiterextrahiert. In diesem Extrakt konnten wir nur mehr weniger als 25% Orellanin nachweisen.

Alle Vertreter der Sektion Orellani, darunter 60 Jahre altes Material, zeigten eine deutlich positive Reaktion. Eine ursprünglich als C. brunneofulvus Fr. ss. Bresadola (IB 81/464) bestimmte Kollektion reagierte negativ und konnte als Cortinarius sp. (Telamonia) erkannt werden. C. orellanus und C. orellanoides enthalten durchschnittlich mehr Orellanin in den Lamellen als im Stielfleisch. C. fluorescens hingegen scheint höhere Konzentrationen im Stiel aufzuweisen. Von letzterem haben wir allerdings nur eine 25 Jahre alte Kollektion (Typusmaterial) untersucht.

Bei allen weiteren geprüften Arten konnten wir keine positiven bzw. falsch positiven Reaktionen beobachten. Eine zum Teil ähnliche, sehr schwache Reaktion zeigte 30 Jahre altes Material von C. humicola (Var. 3: blaß violettliche Mitte, rötlichbraune Randzone ohne Ausfällungen). Ein gegenüber den Standardbedingungen 4-fach ankonzentrierter Extrakt reagierte jedoch im Vergleich mit einer echt positiven Reaktion unterschiedlich (breite, bräunliche Randzone).

DISKUSSION

Das oben dargestellte makrochemische Verfahren ist gut reproduzierbar,

Tab. 1. Orellaninnachweis in Cortinarien-Arten (Subgen. Leprocybe und Phlegmacium): Orellanin-positive Arten sind unterstrichen.

Art	Koll. Nr.	Fundort	Datum
C. betuletorum (Mos.) Mos.	IB 51/147	Mutters, A	Sept. 1951
	IB 85/133	Abisko, S	Aug. 1985
C. bolaris (Pers.:Fr.) Fr.	IB 51/107	Steingaden, D	Sept. 1951
	IB 87/400	Femsjö, S	Sept. 1987
C. brunneofulvus Fr. ss. Bres.	B/13	Piné, Trient, I	Aug. 1927
C. brunneofulvus Fr. ss. Bres. *	IB 81/464	St. Konrad, A	Okt. 1981
C. callisteus (Fr.) Fr.	IB 65/80	St. Leonhard, A	Sept. 1965
	IB 86/235	Paneveggio, I	Sept. 1986
C. citrinofulvescens Mos. ined.	IB 75/143	Almsee, A	Aug. 1975
C. cotoneus Fr.	IB 49/215	Halltal, A	Sept. 1949
	IB 86/257	Val di Sella, I	Sept. 1986
C. fluorescens Horak	IB PN46	Pto. Natales, Chile	März 1963
C. gentilis (Fr.) Fr.	IB 71/220	Champagny le Haut, F	Sept. 1971
	IB 81/368	Femsjö, S	Sept. 1981
C. humicola (Quél.) R. Mre.	IB 52/-	Dornbirn, A	Sept. 1952
C. isabellinus Fr.	IB 69/-	Matrei, A	Juli 1969
C. limoneus (Fr. ex Fr.) Fr.	IB 55/-	Pitztal, A	Aug. 1955
	IB 72/159	Femsjö, S	Aug. 1972
C. melanotus Kalchbr.	IB 75/341	Bodental, A	Okt. 1975
	IB 80/613	Porquerolle, Var, F	Nov. 1980
C. nothoraphanoides Mos. ined.	IB 65/108	Imst, A	Sept. 1965
	IB 68/95	Passo Vezzena, I	Sept. 1968
C. nothosaniosus Mos.	IB 51/120	Vikartal, A	Sept. 1951
C. orellanus (Fr.) Fr.	IB 65/220	Sattnitz, A	Sept. 1965
	IB 65/312	Habsheim, Elsaß, F	Okt. 1965
	IB 74/-	Provitin, CSSR	Okt. 1974
	IB 79/403	Hunneberg, S	Aug. 1979
	IB 86/293	Linari, Mte. Penato, I	Okt. 1986
	IB 87/524	St. Hilari-Sacalm, E	Nov. 1987
C. orellanoides Hry.	IB 75/77	Almtal, A	Aug. 1975
(= speciosissimus Kühn. & R.)	IB 87/-	Gnadenwald, A	Sept. 1987
	IB 88/312	Lanzo Intelvi, I	Aug. 1988
C. psittacinus Mos.	IB 79/399	Munkängarna, S	Aug. 1979
C. raphanoides (Fr.) Fr.	IB 86/277	Sattnitz, A	Sept. 1986
C. rubicundulus (Rea) Pearson	IB 82/435	Borgotaro, I	Okt. 1982
C. saniosus Fr.	IB 78/239	Femsjö, S	Aug. 1978
C. tophaceoides Mos. ad int.	IB 80/706	Tulfes, A	Okt. 1980
C. tophaceus (Fr.) Fr.	IB 86/171	Wildmoos, A	Sept. 1986
C. valgus Fr.	IB 84/-	Hof Paras, N	Aug. 1984
C. venetus var. montanus Mos.	IB 73/103	Scharnstein, A	Sept. 1973
C. splendens Hry.	IB 77/235	Ile de Cros, F	Okt. 1977
C. vitellinus (Mos.) Mos.	IB 77/121	Brienz, CH	Sept. 1977

* Diese Kollektion konnte als Telamonia identifiziert werden.

weder zeit- noch kostenaufwendig und relativ empfindlich. Chemisch betrachtet liegt eine stoffspezifische Komplexierungsreaktion vor. Allgemein formuliert steht der Komplex $[(ArO)_6Fe(III)]^{3-}$ in einem Gleichgewicht mit $6ArO^- + Fe^{3+}$. Die konzentrationsabhängige Zweifärbigkeit der Reaktion vermögen wir zur Zeit nicht zu begründen. Unsere Anschauungen über die Spezifität der Reaktion werden durch Daten von RUEDL (1988) gestützt:

Die u. a. für Säuger ebenso giftigen Isomere 2,2'-Dipyridyl und 4,4'-Dipyridyl haben eine dem Orellanin ähnliche Grundstruktur, reagieren aber nicht mit Eisen(III)-chlorid.

Auf die Effektivität der Methode verweist der problemlose Nachweis von Orellanin in C. fluorescens (vgl. KELLER-DILITZ et al. 1985 und RAPIOR et al. 1988). Die Reaktion (Extrakt aus 2 mg Stielfleisch) fiel ebenso deutlich aus wie bei den europäischen Orellani.

Daß sich diese Technik auch gut für einige andere makrochemischen Reaktionen eignet, konnten wir inzwischen bei stichprobenartigen Versuchen mit Cortinarien der Untergattung Phlegmacium feststellen. Laugenreaktionen führten zu positiven Ergebnissen.

Die unterstützenswerten Bestrebungen verschiedener Autoren (vgl. FRANK 1987), die Durchführung und Bewertung makrochemischer Farbreaktionen zum Zwecke systematischer Untersuchungen zu vereinheitlichen, sollten etwas weiter gefaßt werden. So muß zum Beispiel die Forderung "Farbreaktionen sollten unbedingt am Frischpilz geprüft und angewendet werden, ..." (FRANK 1987) durch obige Ausführungen als nicht zielführende Einschränkung empfunden werden. Das beschriebene Verfahren erlaubt die Untersuchung von Herbarmaterial (und Frischmaterial), wobei die Testbedingungen weitgehend standardisiert werden können. Vor allem der unterschiedliche Wassergehalt frischer Fruchtkörper, zum Teil auch deren störende Eigenfärbung, fallen als Fehlerquellen aus. Im Tropfen (Objektträger, Tüpfelplatten) und/oder am Filterpapier können Reaktionen besser beurteilt werden. Parallel aufgetragene Kontrollen (Extrakt, Reagenz) erleichtern die Auswertung.

LITERATUR

ANTKOWIAK, W.Z. and W.P. GESSNER, 1979: The structures of orellanine and orelline. Tetrahedron Lett. 21: 1931-1934.

FRANK, H.M. 1987: Makrochemische Farbreaktionen bei Großpilzen. I. Voraussetzungen für eine systematische Untersuchung. Z. Mykol. 53(1): 93-98.

HENRY, R. 1937: Révision de quelques cortinaires. Bull. Soc. Mycol. Fr. LIII, 1: 49-80.

KELLER-DILITZ, H., M. MOSER and J.F. AMMIRATI, 1985: Orellanine and other fluorescent compounds in the genus Cortinarius, section Orellani. Mycologia 77: 667-673.

MOSER, M. 1983: Kleine Kryptogamenflora, IIb/2. 5. Aufl. Fischer, Stuttgart-New York. 533 S.

PÖDER, R. und E. PIPITZ, 1986: Cos'é il Cortinarius brunneofulvus Fr. ss. Bresadola? Gruppo Micol. G. Bresadola XXIX(5-6): 221-228.

RAPIOR, S., C. ANDARY and G. PRIVAT, 1988: Chemotaxonomic study of orellanine in species of Cortinarius and Dermocybe. Mycologia 80(5): 741-747.

RUEDL, C. 1988: Wirkungen von Orellanin, 2,2'Dipyridyl und 4,4'Dipyridyl auf drei Zellkulturlinien (LLC-PK_1, CaCo-2 und OK). Diplomarbeit an der Universität Innsbruck. 80 S.

SCHUMACHER, T. and K. HOILAND, 1983: Mushroom poisoning caused by species of the genus Cortinarius Fries. Arch. Toxicol. 53: 87-106.

STAHL, E. 1967: Dünnschichtchromatographie. 2. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 979 S.

Farbcodex:

KORNERUP, A. & J.H. WANSCHER, 1981: Methuen Handbook of Colour. Eyre Methuen, London.