

Coolia 25(4), oktober 1982

HET VOORKOMEN VAN MUSCARINE EN MUSCIMOL IN VERSCHILLENDE PADDESTOELEN

T. STIJVE, *Sentier de Clies no. 4, 1800 Vevey, Zwitserland.*

SUMMARY

Using a fast, sensitive high performance thin-layer chromatographic method muscarin was determined in 13 *Inocybe* species and in 7 fungi from other genera. Highest levels were found in *Inocybe*, especially in *I. patouillardii*, *I. caesariata* and *I. fastigiata*, and in three *Clitocybe* species. The low muscarin level reported in literature for *Amanita muscaria* was amply confirmed, whereas in *A. pantherina* the amount of this toxic compound was below the detection limit of 0,0005 percent. In addition, the psychoactive toxic principle muscimol was estimated in a number of lyophilised *A. muscaria* and *A. pantherina* samples, gathered between 1974 and 1980. Unlike that of muscarin, the muscimol content was found to decrease sharply with time: fresh material contained between 0,15 and 0,31 percent, calculated on dry matter, whereas in 3 - 5 year old samples the compound was often barely detectable. This demonstrates that the occurrence of muscimol in fungi cannot be studied from herbarium material. No muscimol was detected in fresh samples of *A. strobiliformis*, *Boletus satanas*, *Inocybe patouillardii* and *I. fastigiata*.

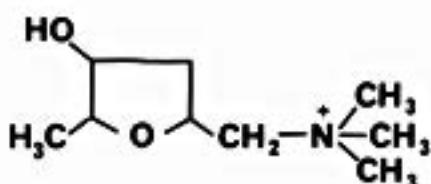
Muscarine, na een eeuw van intensieve research geïdentificeerd als 't quarternaire trimethylammoniumzout van L(+)-2-methyl-3-hydroxy-5-amino-methyl tetrahydrofuraan, ontleent haar naam aan *Amanita muscaria*, de paddestoel waaruit deze stof voor 't eerst werd geïsoleerd. De ontdekkingsgeschiedenis, de chemie en de farmacologie van muscarine zijn beschreven in uitvoerige overzichts-artikelen (1, 2, 3).

Het zij voldoende om de lezer er aan te herinneren dat de stof slechts in zeer kleine hoeveelheden in de vliegenzwam voorkomt, maar dat 't al vrij vroeg werd ontdekt door haar intensieve fysiologische werking. Voordat men muscarine chemisch enigszins betrouwbaar kon karakteriseren, werd 't veelal aangetoond en min of meer kwantitatief bepaald door de vertragende werking op een kikkerhart te meten.

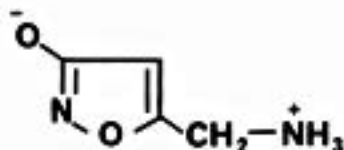
Men heeft zich eigenlijk gedurende een eeuw blindgestaard op het muscarine in de vliegenzwam, terwijl deze stof toch in veel grotere concentraties voorkomt in vele vezelkoppen (*Inocybe*) en in enkele trechterzwammen (*Clitocybe*). Hoewel de giftigheid van laatstgenoemde paddestoelen duidelijk werd aangetoond in de jaren '30, duurde 't tot 1957 voordat Eugster het muscarine in zuivere vorm uit

Inocybe patouillardii wist te isoleren (4). Het gehalte aan deze stof in menige vezelkop is 50 tot 100 maal hoger dan in *A. muscaria*, hetgeen suggereert dat het eigenlijk beter inocybine zou kunnen worden genoemd, maar het is nu eenmaal zeer moeilijk om bestaande namen te veranderen.

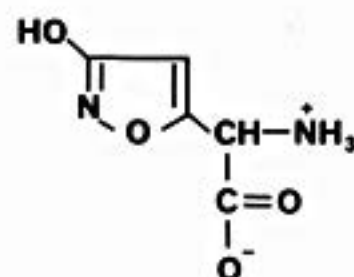
Het vergiftigingsbeeld van muscarine - het snel optreden van sterke transpiratie, verhoogde speekselafscheiding, tranenvloed, diarree, braken, vertraagde hartslag, vaatverwijding enz. is duidelijk anders dan dat van de vliegenzwam, die een meer roesachtige intoxicatie veroorzaakt. Het psychoactieve bestanddeel dat hiervoor verantwoordelijk is werd eerst in de zestiger jaren geïsoleerd en muscimol genoemd. Dit isooxazoolderivaat is een afbraakproduct van het in de paddestoel aanwezige labiele iboteenzuur (5).



Muscarine



Muscimol



Iboteenzuur

Desondanks kan men vandaag de dag nog in allerlei handboeken lezen dat muscarine het giftige principe van de vliegenzwam en de pantheramaniet is. Onder oudere medici is de gedachte nog zeer levend dat alle paddestoelenvergiftigingen op de hevige fysiologische werkingen van deze stof zijn terug te voeren. Gelukkig staan hier tegenover een tweetal recentelijk verschenen artikelen (6, 7), die zeer goede en up to date informatie geven omtrent de verschillende paddestoeltoxinen.

Toen schrijver dezes enkele jaren geleden werd gevraagd een serie simpele bepalingsmethoden voor de belangrijkste toxinen in hogere fungi uit te werken, had hij eigenlijk de meeste moeite om een bruikbare techniek voor muscarine te vinden. De in gebruik zijnde methoden bleken weinig selectieve biologische tests te zijn. Zo ekstraheerden Girre en G rault (8) de te onderzoeken paddestoelen met ethanol, dampten het extract in en namen het residu op in isotonische zoutoplossing, die zij vervolgens intraperitonaal inspoten bij een guinees biggetje. Het snel optreden van speekselvloed en diarree bij het dier werd als specifiek aangenomen voor muscarine, vooral indien de symptomen konden worden bestreden door middel van een atropineinjectie. Voor een chemicus is een dergelijke test weinig aantrekkelijk. Het zelfde kan worden gezegd van de methode gebruikt door Porte en zijn medewerkers (9), die de waterige infusies van een aantal min of meer zeldzame *Clitocybe*-soorten op muscarineactiviteit onderzochten door de samentrekkende

werking op het geïsoleerde duodenum van een rat te meten. De selektiviteit van deze test werd verhoogd door de werking van eventueel aanwezige acetylcholine en histamine uit te schakelen. De auteurs beschikten niet over een muscarine standaard om daarmee de aktiviteit van de paddestoelextrakten te vergelijken, maar dat belette hen niet om hun resultaten berekend per gram droge stof tot in drie decimalen op te geven! Ondanks dergelijke overdrijvingen hebben biologische tests wel degelijk waarde: ze tonen aan dat de paddestoel waarschijnlijk zeer giftig is, maar ze bewijzen niet onomstotelijk de aanwezigheid van muscarine. Hiervoor zijn chromatografische methoden beter geschikt. Reeds in 1956 gebruikte Eugster (10) papierchromatografie om de hoeveelheid muscarine in min of meer gezuiverde vliegenzwammenextrakten te bepalen. Ofschoon deze techniek voor dit doel zeer bruikbaar was, voldoet zij niet voor het snel en gevoelig aantonen van geringe concentraties muscarine in aanwezigheid van vele andere stoffen. Hiertoe is dunne laagchromatografie beter geschikt, zoals werd aangetoond door Hughes en medewerkers, die de techniek o.a. gebruikten voor het karakteriseren van muscarine in *Clitocybe dealbata* (11).

Toen we deze methode in ons laboratorium uitprobeerden, gebruik makend van de kortelings in de handel verkrijgbaar gekomen "high performance" kant en klaar platen van Merck, bereikten we een 10 maal hogere gevoeligheid dan die in 1966 door genoemde auteurs werd gerapporteerd (12). Onlangs hadden we de gelegenheid om de techniek uit te proberen op een kollektie gevriesdroogde vezelkoppen, waarvan het grootste gedeelte welwillend beschikbaar werd gesteld door Professor Ruth Seeger van het farmakologisch-toxikologisch instituut van de universiteit te Würzburg (BRD).

De paddestoelen werden met warme methanol geëxtraheerd en de gekoncentreerde ekstrakten zonder enige zuivering aan de chromatografie onderworpen. De resultaten van dit onderzoek, uitgevoerd aan 25 monsters van totaal 13 soorten, zijn gegeven in tabel 1. De concentraties gevonden in *I. patouillardii*, *I. fastigiata*, *I. geophylla*, *I. pudica* en *I. hirtella* komen ongeveer overeen met eerder gerapporteerde cijfers (4, 13, 14). *I. bongardi* en *I. godeyi* gelden als niet of nauwelijks giftig en bevatten dan ook nagenoeg geen muscarine.

De dunne laag-chromatografische techniek is dus zeer waardevol om vezelkoppen snel op hun eventueel muscarinegehalte te onderzoeken, vooral omdat zij weinig materiaal vergt en snel uitvoerbaar is. In één geval was er niet meer dan 50 mg. gedroogde paddestoel beschikbaar, hetgeen echter ruim voldoende bleek voor een analyse. De meeste *Inocybe*-ekstrakten waren arm aan mede-geëxtraheerde stoffen. Alle soorten bevatten choline, een natuurlijk in zowel hoger als lagere planten voorkomende niet giftige stof, maar het gehalte was verrassend laag en stoorde de muscarinebepaling niet.

TABEL I - MUSCARINE IN VEZELKOPPEN

Soort	Herkomst	Muscarine in procenten op droge stof	gehalte berekend	Soort	Herkomst	Muscarine in procenten op droge stof	gehalte berekend
<i>I. patouillardii</i>	Steinbachtal BRD 1977	0,33		<i>I. cervicolor</i>	Höhefeld BRD september 1980	0,038	
idem	Edelmannswald BRD 1980	0,55		<i>I. geophylla</i>	Châtel-St-Denis CH oktober 1978	0,10	
idem	La Tour-de-Peilz CH 1980	0,50		<i>I. geophylla</i> var. <i>lilacina</i>	idem	0,13	
<i>I. caesariata</i>	Gamburg BRD 1980	0,52		<i>I. geophylla</i>	Gamburg BRD oktober 1980	0,09	
<i>I. fastigiata</i>	Geesdorf BRD 1977	0,22		idem	Höhefeld BRD oktober 1980	0,10	
idem	Gstaad CH juli 1979	0,42		<i>I. geophylla</i> var. <i>lilacina</i>	idem	0,16	
idem	Gamburg BRD juli 1980	0,50		<i>I. pudica</i>	Châtel-St-Denis CH 1978	0,07	
idem	idem september 1980	0,42		<i>I. godeyi</i>	Höhefeld BRD september 1980	< 0,01	
idem	Steinbachtal BRD	0,30		idem	Hauteville CH oktober 1981	< 0,003	
idem	Höhefeld BRD september 1980	0,25		<i>I. hirtella</i>	Höhefeld BRD september 1980	0,17	
<i>I. maculata</i>	Gamburg BRD juli 1980	0,08		idem	idem oktober 1980	0,07	
<i>I. dulcamara</i>	Höhefeld BRD oktober 1980	0,05		<i>I. lucifuga</i>	idem	0,23	
<i>I. bongardi</i>	idem september 1980	0,01					

Hierdoor aangemoedigd besloten we ook een aantal paddestoelen uit andere genera te onderzoeken. Natuurlijk namen wij daar eerst *A. muscaria* en *A. pantherina* voor om na te gaan of onze methode gevoelig genoeg zou blijken om het geringe muscarinegehalte in deze soorten te meten. Voorts betrokken we ook *Boletus satanas*, *Mycena pura*, *Clitocybe dealbata*, *C. serotina* en *C. festiva* in ons onderzoek, waarvan de resultaten zijn aangegeven in tabel 2. De analyse van de drie trechterzwammen leverde geen enkele moeilijkheid op. Het ekstrakt van de satansboleet bevatte stoffen die het aantonen van muscarine onder de 0,01 procent (berekend op droge stof) verhinderden. De 20 mg/kg (0,002%) die Eugster (15) gas-chromatografisch bepaalde in *Mycena pura* werd gekamoufleerd door een enorme hoeveelheid van een stof, die voorlopig werd geïdentificeerd als betaïne.

TABEL 2 - MUSCARINEGEHALTE VAN PADDESTOELEN UIT DIVERSE GENERA

<i>Clitocybe dealbata</i>	Vevey, CH, 1977	0,08
<i>C. serotina</i>	Haute Savoie, F. 1979	0,11
<i>C. festiva</i>	idem, 1980	0,15
<i>Boletus satanas</i>	Lausanne, CH, 1978	<0,01
<i>Mycena pura</i>	Puidoux, Ch, 1977	<0,01
<i>Amanita muscaria</i>	Puidoux, CH, 1975	0,009
<i>A. pantherina</i>	Helmstadt, BRD, 1975	<0,0005

Alle waarden in procenten, berekend op de droge stof.

De directe muscarinebepaling in de ruwe amanietekstrakten was eenvoudig onmogelijk: zowel in *A. muscaria* als in *A. pantherina* bleek zo'n 0,3 procent choline aanwezig, waardoor de geringe muscarineconcentraties volledig werden overdekt. Gelukkig kon het grootste deel van de storende substantie worden verwijderd door kolomchromatografie over aluminiumoxyde (12).

De door ons gevonden 0,009 procent muscarine (berekend op de droge stof) ligt duidelijk wat boven de door Eugster aangegeven concentratie van 0,0003% op de verse paddestoel (10). Laatstgenoemd cijfer betreft echter de opbrengst van een moeizame en verliesrijke isolatietechniek, die natuurlijk altijd onder die van een analysemethode blijft. Evengoed is ook de in dit artikel gerapporteerde concentratie te laag om toxikologische betekenis te hebben.

Verrassenderwijs bevatte de panteramaniëet geen aantoonbare hoeveelheden muscarine. Dat deze paddestoel zoveel giftiger is dan de vliegenzwam kan waarschijnlijk worden verklaard uit haar hoger muscimol- c.q. iboteenzuurgehalte.

Daar wij beschikten over een serie gevriesdroogde amanieten van verschillende jaren, leek het ons interessant om een vergelijkend onderzoek in te stellen naar het muscarine en muscimolgehalte. Daartoe analyseerden we ook *A. strobiliformis*, omdat het voorkomen van muscimol in deze soort omstreden is: Japanse onderzoekers (16) vonden het, maar Eugster kon hun resultaten niet bevestigen. Een suggestie volgende van Seeger (17), dat muscarine producerende fungi mogelijk ook muscimol zouden kunnen synthetiseren, betrokken wij ook twee *Inocybe*-soorten met een hoog muscarinegehalte, en de centraalnerveuze vergiftigingssymptomen veroorzakende satansboleet in ons onderzoek. Het muscimol werd bepaald naar een in referentie 12 beschreven methode. De resultaten van de vergelijkende analyses zijn te vinden in tabel 3. Het is interessant om vast te stellen dat muscarine een veel stabielere stof is dan muscimol. In oude monsters gevriesdroogde *A. muscaria* vonden wij ongeveer gelijke concentraties muscarine als in recentelijk geplukt en gedroogd materiaal. In dezelfde oude monsters bleek echter nog maar zeer weinig muscimol aanwezig te zijn.

Dit verklaart ook waarom de in de literatuur gerapporteerde concentraties van dit isooxazoolderivaat zover uiteenlopen.

TABEL 3 - VERGELIJKEND ONDERZOEK NAAR MUSCIMOL EN MUSCARINE IN ZES VERSCHILLENDE SOORTEN PADDESTOELEN

Soort	Herkomst	Muscimol	Muscarine
<i>A. muscaria</i>	Kühlsheim BRD sept. '74	0,015	0,007
	Himmelstadt BRD sept. '74	<0,01	0,005
	Gramschatz BRD okt. '74	<0,01	0,11
	Neuwirtshaus BRD sept. '75	0,02	0,005
	Helmstadt BRD okt. '75	0,02	0,009
	Chamonix F. sept. '79	0,15	0,009
	Lally CH sept. '79	0,22	0,008
	idem okt. '80	0,16	0,01
	Gamburg BRD sept. '77	0,025	< 0,0005
<i>A. pantherina</i>	idem sept. '80	0,19	< 0,0005
	Puidoux CH sept. '79	0,31	< 0,0005
	Höhefeld BRD sept. '80	< 0,01	< 0,0005
<i>A. strobiliformis</i>	Gamburg BRD juni '80	< 0,01	< 0,005
	Lausanne CH 1978	< 0,01	< 0,01
<i>Boletus satanas</i>	La Tour-de-Peilz CH 1980	< 0,01	0,50
<i>I. patouillardii</i>	Gamburg BRD 1980	< 0,01	0,42

Alle waarden in procenten op de droge stof.

Wat muscimol betreft, dient men dus uiterst wantrouwig te staan tegenover analyses van herbariummateriaal. Indien het gehalte aan genoemde stof in zorgvuldig gevriesdroogd en luchtdicht in glas bewaard materiaal al zo snel terugloopt, hoelang zal het dan nog aantoonbaar zijn in onder veel primitiever omstandigheden gekonserveerde paddestoelen!

A. strobiliformis bevat kennelijk geen aantoonbare hoeveelheden muscimol en het lukte ons ook niet om deze psychoactieve stof aan te tonen in de satansboleet en in de twee onderzochte vezelkoppen.

De auteur dankt Dr. Ruth Seeger (Würzburg, BRD) voor het welwillend ter beschikking stellen van een groot aantal gevriesdroogde paddestoelen en Henri Diserens (La Tour-de-Peilz, Zwitserland) voor de zorgvuldige uitvoering van de muscarine- en muscimolbepalingen.

LITERATUUR

1. Bowden, K. and Mogey, G.A. (1958) The story of muscarine. *J. Pharm.* 10, 145-156.
2. Waser, P.G. (1961) Chemistry and Pharmacology of muscarine, muscarone and some related compounds. *Pharmacol. Rev.* 13, 465-515.
3. Eugster, C.H. (1960) The chemistry of muscarine. *Adv. Org. Chem.* 2, 427-488.
4. Eugster, C.H. (1957). Isolierung von Muscarin aus *Inocybe Patouillardii* (Bres.). *Helv.* 40, 886-887.
5. Müller, G.F.R. und Eugster, C.H. (1965). Muscimol, ein pharmakodynamisch wirksamer Stoff aus *Amanita muscaria*. *Helv.* 48, 910-926.
6. Seeger, R. (1981). Giftpilze - Pilzgifte - Pilzvergiftungen. *Deutsche Apotheker Zeitung* 44, 2431 - 2438.
7. Van Tilborg, W.J.M. (1981). *Chemisch Magazine*, septembernummer, 449 - 453.
8. Girre, L. et Gérault, A. (1978). Identification des espèces ayant provoqué une intoxication. Aspect médico-légal. Champignons toxiques. Compte-rendu de la réunion du Groupement français des centres anti-poisons. Pont-A-Mousson, 26 mai 1977, 167-175. Ed. Masson, Paris.
9. Porte, M., Oddoux, L. et Villard, J. (1978). Recherche des nouvelles espèces de *Clitocybes* à activité muscarinique. Compte-rendu als aangegeven onder ref. 8., p.p. 139-143.
10. Eugster, C.H. (1956). Über Muscarin aus Fliegenpilzen. *Helv.* 39, 1002 - 1023.
11. Hughes, D.W., Genest, K. and Rice, W.B. (1966). The occurrence of muscarine in *Clitocybe dealbata*. *Lloydia* 29, 4, 328 - 332.
12. Stijve, T. (1981). High performance thin-layer chromatographic determination of the toxic principles of some poisonous mushrooms. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 72, 44 - 54.
13. Eugster, C.H. und Müller, G. (1959). Notiz über weitere Vorkommen von Muscarin. *Helv.* 42, 1189 - 1190.
14. Malone, M.H. et al. (1962). Relative muscarinic potency of thirty *Inocybe* species. *Lloydia* 25, 231 - 237.
15. Stadelmann, R.J., Müller, E. und Eugster, C.H. (1965). Über die Verbreitung der stereomeren Muscarine innerhalb der Ordnung der Agaricales. *Helv.* 59, 2432 - 2436.
16. Takemoto, T., Yokobe, T. and Nakajima, T. (1964). Isolation of the flyicidal constituent from *Amanita strobiliformis*. *Yakugaku Zasshi* 84, 1230 - 1235.
17. Seeger, R., Persoonlijke mededeling, 1980.