[Chem. Pharm. Bull. 21(6)1267—1271(1973)]

UDC 547.91.08 : 543.544

Recherches Toxicologiques sur les Substances Toxiques de *Fusarium nivale*. VIII.[1] Etude sur L'Analyse Quantitative de 12,13-Epoxytrichothécènes en Employant le Chromatographie en Phase Gazeuse

Yuko Nakahara et Takashi Tatsuno

L'Institute de la Recherche Physique et Chimique[2]

(Reçu le 9 Octobre, 1972)

12,13-Epoxytrichothecenes could be determined quantitatively by gas chromatography after silylation of the sample with bistrimethylsilylacetamide (BSA).

The method was applied to determine fusarenone X in fodder. The lower limit of detection of 12,13-epoxytrichothecenes was 1 μg/μl.

Dans les publications antérieures, nous avons décrit l'isolement du nivalenol, du fusarenon-X et du diacétylnivalenol, qui sont trois principaux toxiques des métabolites de *Fusarium nivale*, et puis nous avons aussi décrit les structures chimiques de ces composés.

En même temps, nous avons discuté à quelle situation nos recherches sont-ils dans les recherches toxicologiques de 12,13-époxytrichothécènes.

A partir de 1959, les composés qui contiennent le noyau de 12,13-époxytrichothécène, le diacétoxyscirpénol, le trichothécin, le trichodermin, le verrucarin, le crotocin et T-2 toxin ont été publiés et les uns de ces composés sont des antibiotics contre des moisissures et les autres sont des substances phytotoxiques.

Les résultats que nous avons obtenus ont aussi montré que ces composés provòqaient des lésions grâves dans les cellules des tissus en voie de prolifération, bien que le degré de toxicité fusse différent selon les substituants. Nous avons en plus découvert que ces composés inhibaient remarquablement les biosynthèses des proteines et de l'ADN *in vitro* et *in vivo*.

La méthode de l'analyse quantitative de petites quantites de toxines par chromatographie en phase gazeuse nous donne de bons résultats pour l'analyse de ces composés. Notre méthode d'analyse quantative fut aussi appliquée aux 12,13-époxytrichothécènes, lesquels avaient été ajoutés préalablement au fourrage de souris.

En comparant nos résultats à ceux d'Ueno, qui emploie la méthode du réticulocyte de lapin, nous obtenons des valeurs analogues.

Matériel et Méthode

Le fusarenon-X et le diacétylnivalenol employé fut isolé à partir de la solution cultivée avec *F. nivale* (Fn-2-B) pendant 2 simaines à 15°.

Pour le nivalenol, nous avons employé celui que l'on obtenait aprés saponification du fusarenon-X avec une solution méthanolique d'ammoniaque 1N.

Le diacétoxyscirpenol, T-2 toxine et neosolaniol nous furent gracieusement offerts par le Dr. Ueno qui les a isolés à partir des métabolites de F. solani. Ces composés furent utilisés après avoir été récristallisé plusieurs fois.

Les 4-déoxynivalenol, et 4-déoxy-3-acétylnivalenol nous furent offerts par le Dr. Morooka qui les a isolés à partir de blé moisi de la région de Shikoku.

Pour la chromatographie en phase gazeuse, l'appareil Shimazu GC-4APF (détecteur d'hydrogène-flamme-ionisation, 250° fut utilisé dans les conditions suivantes: colonne; 1.5% de OV-17 (support, Shimalite W, maille de 80—100), 4 mm × 2 m (colonne en verre), 220—240°; gaz transportant: N_2 (1 kg/cm²).

1) Part VII: T. Tatsuno, Y. Morita, H. Tsunoda et M. Umeda, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **18**, 1485 (1970).
2) Situation: *Wako-shi, Saitama.*

NII-Electronic Library Service

Analyses

1) Triméthylsililation: La toxine (0.1—1.0 mg) est dissoute dans 85 μl de benzène, 10μl de TMCS, sout ajouté et le sont chauffé le tube fermé à 60° pendant 15 min.

2) 1 μl des spéciments triméthylsililés est injecté dans la colonne. Le graphique est évalué selon la hauteur (mm) du pic de chromatographie pour l'ordonnée et la dose d'injectée (μg/μl) pour l'absciese.

L'analyse quantitative des nivalenol, fusarenon-X et diacétylnivalenol, peut se faire à partir d'une courbe standard.

3) Une quantité arbitraire de nivalenol, de fusarenon-X et de diacétylnivalenol est analysée par chromatographie en phaze gazeuse après avoir été triméthylsilisée. En comparant les résultats calculés par la courbe standard aux doses arbitrairement pesés de ces composés, on a vérifié si on pourrait utiliser la courbe standard à l'analyse quantitative.

4) On examine aussi le temps de rétention des toxine T-2, diacétoxyscirpenol, neosolaniol, 4-déoxynivalenol et 3-acétyl-4-déoxynivalenol en traitane de la manière mentionnée sons (1).

Pour la trichothecine, la chromatographie est la même, mais sans triméthylsililation parce qu'il n'y a pas de groupe OH.

5) 0.2 mg de fusarenon-X est mélangé à 5 g de fourrage commercial de souris (CE-2). Une partie du matériel a été tout de suite traitée de la manière mentionnée ci-dessus, l'autre a été traité après avoir été conservé 48 heures à température ambiante.

Chaque spécimen est dissous dans le mélange de 20 ml de NaCl aq 10% et 20 ml du méthanol. Après avoir été suffisamment agité, on l'a laissé reposer pendant une nuit.

Du méthanol est ajouté à la solution filtrée jusqu' à équivalence de 50 ml. La matière grasse est extraite deux fois dans la solution de NaCl aq-méthanol avec 50 ml du *n*-hexane. Ensuite, la substance toxique de la solution de NaCl aq-méthanol est extraite deux fois avec 50 ml de chloroforme et une fois avec 30 ml de chloroforme.

Resultat

1) Courbe Standard des Nivalenol, Fusarenon-X et Diacétylnivalenol

Le Tableau I et 1a Figre 1 nous donne les résultats suivants:

2) Vérification de la Courbe Standard

Le Tableau II nous indique que les chiffres que l'on a calculés selon 1a courbe standard coincident bien avec les dose préalablement pesés.

3) Temps de Rétention de Chaque 12;13-Époxytrichothécène

Le Tableau III nous montre que l'on peut détecter chaque 12,13-époxytrichothécène au moyen de chromatographie en phase gazeuse. Ceci n'est pourtant pas isolable pour la distinction de toxine T-2 et de trichothécine dans les conditions mentionnées sous (1), parce que le temps de rétention du TMS-T-2 et du trichothécine est le même. Mais si on change la colonne SE-30 au lieu de OV-17, et utilise une température de 100°, il est possible de séparer TMS-T-2 à partir du trichothécine: la difference du temps de rétention entre les deux est de 3.5 min. Si on pouvait employer spéctrométrie de masse gazeuse à cet effet, on pourrait détecter dans les conditions mentionnées sous (1) que: M^+ de TMS-T-2 est 538, et M^+ du trichothécine est 332.

4) Test de Récupération du Fusarenon-X à Partir du Fourrage Commercial Additionné de Fusarenon-X

On obtient le résultat que l'on a présenté dans le fig. 3; la quantité que l'on a récupéré après 48 heures et 75% de la quantité initiale. C'est-à-dire, que 25% de fusarenon-X a été détrui en 48 heures dans le fourrage.

Discussion

1) Triméthylsililation du Nivalenol

Quand on a fait la triméthylsililation du nivalenol selon la méthode décrite, on peut voir seulement un pic, mais si on prolonge l'action de 24 heures dans les mêmes conditions,

NII-Electronic Library Service

Tableau I. Hauteur des Pics Pour les Doses Respectives

	(mg/100 μl)	(%)
Nivalenol	0.1	7.5
	0.2	15.5
	0.3	25.0
	0.4	44.5
	0.5	50.0
	0.6	57.5
	0.7	61.5
	0.8	71.5
	0.9	77.0
	1.0	89.0
Fusarenon-X	0.1	8.5
	0.2	20.0
	0.3	28.0
	0.4	39.5
	0.5	50.0
	0.6	60.5
	0.7	68.0
	0.8	83.0
	0.9	90.5
	1.0	101.0
Diacétylnivalenol	0.1	9.5
	0.2	20.5
	0.3	32.0
	0.4	46.5
	0.5	50.0
	0.6	58.0
	0.7	72.5
	0.8	96.0
	0.9	102.0
	1.0	106.5

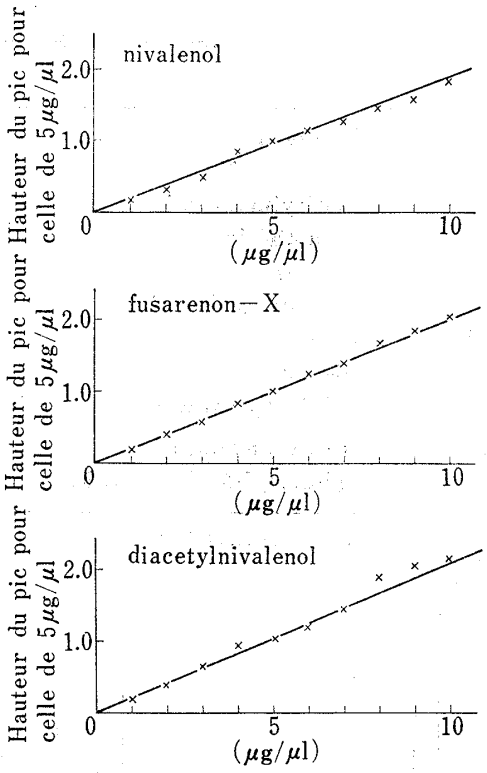

Fig. 1. Courbe Standard aux Doses Arbitrairement Pesés des Toxines

un autre pic apparait. Son temps de rétention est 0.65 min plus rapide. De même, si on traite le nivalenol avec une quantité identique de BSA et de TMSC, pendant 20 min à 75°, on voit deux pics à 3.55 min et 2.9 min.

En examinant chaque pic par la méthode de spectrométrie de masse, M^+ du pic à 2.90 min coincide avec tétra-TMS-nivalenol et M^+ du pic à 3.55 min coincide avec tri-TMS-nivalenol.

Nous avons mesuré RMN de chaque TMS-nivalenol. Les résultats de RMN de TMS-nivalenol sont présenté dans la Fig. 4.

Comme on peut voire dans la Fig. 4, pour le TMS-nivalenol chauffé à 60° pendant 15 min avec BSA et TMSC, le pic de proton à C-7 ce trouve à 5.30 ppm (d, J=2 cps) et le pic de proton à C-7-OH à 4.39 ppm, mais le TMS-nivalenol que l'on a laissé prolonger la reaction pendant

Tableau II. Verification de la Courbe Standard

Sample	Doses arbitrairement pesés (μg/μl)	Doses observés (μg/μl)
Nivalenol	3.0	2.9
	8.0	7.9
Fusarenon-X	3.0	3.1
	8.0	7.9
Diacétylnivalenol	3.0	2.7
	8.0	7.8

NII-Electronic Library Service

Tableau III. Temp. de Retention des Trichothécenes

Sample	(min)
Nivalenol	3.55
Fusarenon-X	3.95
Diacétylnivalenol	8.95
Trichothécin	8.55
T-2 toxin	8.55
Diacétoxyscirpenol	5.95
Neosolaniol	7.50
Rd-toxin (4-deoxynivalenol)	13.25
Rd-toxin acétate (3-acétyl-4-déoxynivalenol)	12.70

column temp. 240°

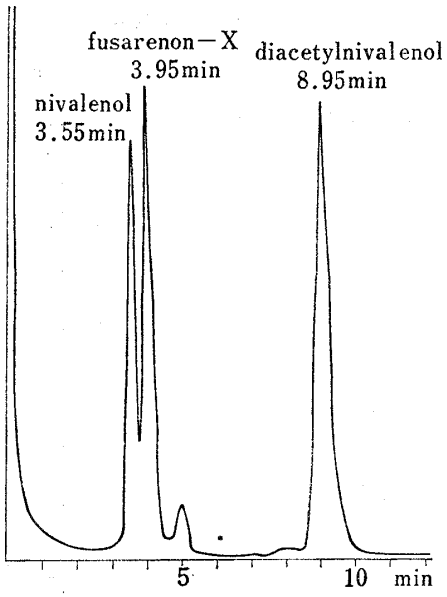

Fig. 2. Chromatographie en Phase Gazeuse de Mélange de Trios Trichothécenes

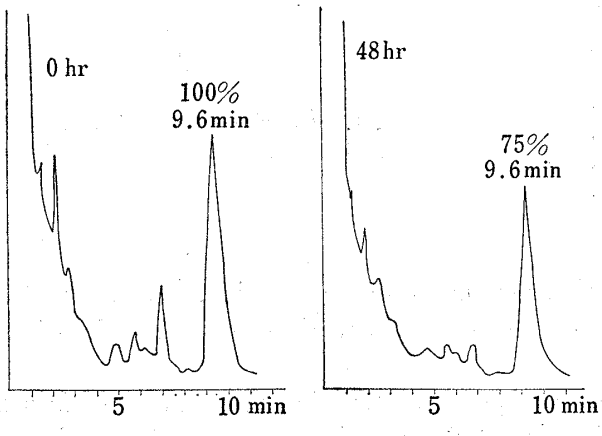

Fig. 3. l'analyse Quantitative du Fusarenon-X à Partir de Fourrage

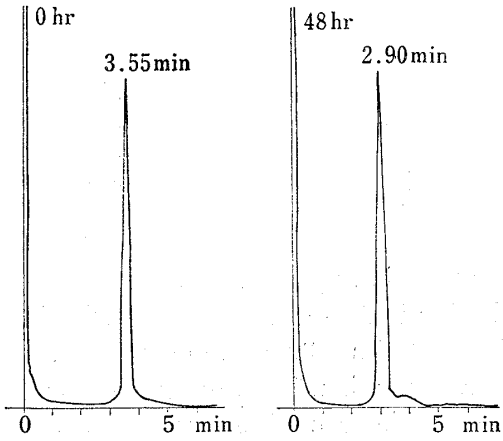

Fig. 4. Chromatographie en Phase Gazeuse de TMS-nivalenol

48 heures, on ne trouve pas le pic à 4.39 ppm, mais seulement un pic de proton à C-7 5.24 ppm (Fig. 5).

Cela veut dire que le premier est le tétra-TMS-nivalenol, 3α,4β,7α,15-tétra-TMS-nivalenol et le second est le tri-TMS-nivalenol, 3α, 4β,15-tri-TMS-nivalenol.

$$\text{niv.} \xrightarrow[60°,\,15']{\text{TMSC+BSA}} \text{tri-TMS-niv.} \quad \text{(I)}$$

$$\xrightarrow[\text{r.t.}]{48\,\text{hr}} \text{tetra-TMS-niv.} \quad \text{(II)}$$

RMN (ppm) I: 4.39 (1H, d, J=2 cps, C-7-OH), 5.30 (1H, d, J=2 cps, C-7-H)
II: 5.24 (1H, s, C-7-H)

2) Test de Récupération du Fusarenon-X à Partir du Fourrage Commercial Additionné Préalablement de Fusarenon-X

En calculant la dose de fusarenon-X selon la hauteur du pic de chromatographie, le dose du fusarenon-X récupéré est 85% du fusarenon-X ajouté préalablement.

De plus, nous avons pu détecter que 25% du fusarenon-X a été détruit pendant les 48 heures de concervation dans le fourrage. Ce résultat correspond bien au données d'Ueno, détectés par l'essai biologique de la toxicité.

NII-Electronic Library Service

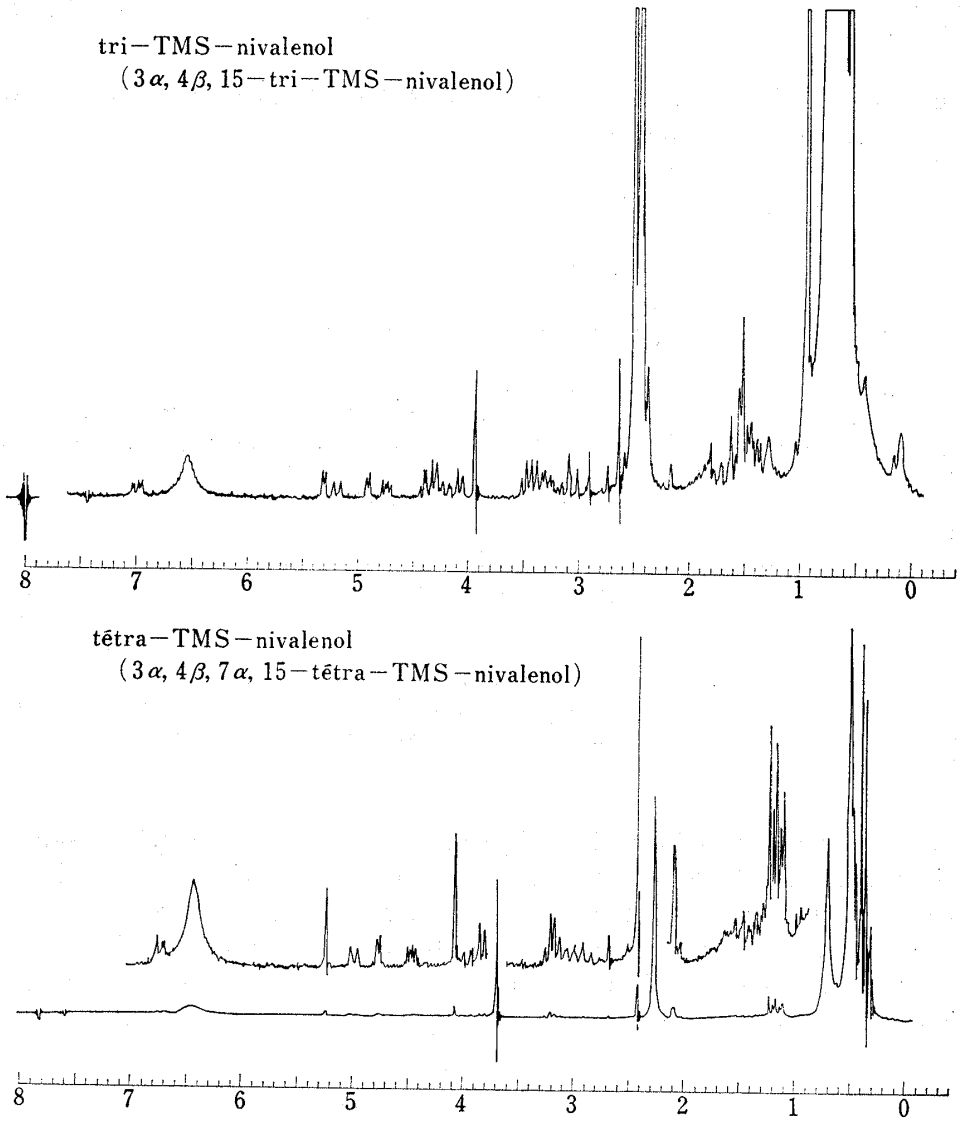

Fig. 5. RMN de TMS-nivalenol

Comme nous avons déjà décrit, nous pouvons dire que l'on peut détecter 12,13-époxytrichothécènes jusqu' à 0.1 μg/μl de specimen en employant la chromatographie en phase gazeuse.

Si l'inhibition de la synthése des protéine des réticulocytes de lapin avait été très forte comm par exemple, pour la toxine T-2, on pourrait detecter 0.1 μg de toxine par l'essai biologique, mais la réaction avait été un peu faible, comme par exemple celle du nivalenol, du neosalaaniol, *etc.*, on ne permet de détecter que jusqu' à l'équivalence de 2—20 μg.

Nous croyons que notre méthode est supérieure pour la détection de petites quantités de 12,13-époxytrichothécènes. De plus, dans cet étude, nous avons employé TMS-12,13-époxytrichothécènes pour appliquer en chromatographie en phase gazeuse, mais si on pouvait employer trihaloacyl-12,13-époxytrichothécènes au lieu de TMS-toxines, on pourrait détecter les toxins moins petites quantités si l'on pouvait applicable la chromatographie en phase gazeuse après adaptation de la capture de l'électron.

Remerciement Cette recherche a été partiellement aidé par les fonds de Recherche du Cancer (1970—1971) du Ministère de la Santé Publique. Nous sommes très reconnaisants envers les Dr. Tsunoda, Dr. Ueno, et Dr. Morooka pour nous avoir fait profiter au maximum de son expérience qu'ils nous ont donnés.

Nous remercions le Dr. Uraguche pour ses suggestions et l'encouragement qu'il nous a donné.

NII-Electronic Library Service