

CHROM. 9605

DOSAGE DES AMATOXINES PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE DIRECTE SUR CHROMATOGRAMME CHEZ *AMANITA PHALLOIDES* FRIES (BASIDIOMYCETES)

C. ANDARY, F. ENJALBERT et G. PRIVAT

Laboratoire de Botanique et Cryptogamie, Faculté de Pharmacie, 34060-Montpellier Cedex (France)

et

B. MANDROU

Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, 34060-Montpellier Cedex (France)

(Reçu le 30 juillet 1976)

SUMMARY

Assay for amatoxins in Amanita phalloides Fries (Basidiomycetes) with direct spectrometric measurements of chromatograms

An assay for the main three amanitins, α -, β - and γ -, of *Amanita phalloides* Fries is proposed. These amatoxins are the strongest and the most stable toxins in mushroom. After a simple, reliable extraction procedure, with a high recovery, they are determined by simultaneous reflectance and transmittance spectrometric measurements on thin-layer chromatograms.

INTRODUCTION

L'intérêt croissant porté à la toxicologie de l'*Amanite phalloïde*, responsable de 95% des empoisonnements mortels dûs aux champignons^{1,2}, nous a incité à mettre au point une méthode de dosage rapide, sensible et reproductible des principales toxines de cette espèce.

Les méthodes de dosage appliquées jusqu'alors^{3,4} ont recours à la spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet des toxines séparées par chromatographie sur colonne ou sur couche mince. Ce dosage est également effectué indirectement par évaluation des γ -lactones³, après hydrolyse acide pendant 24 h des cyclopeptides toxiques. Les γ -lactones dérivent elles-mêmes des acides aminés issus de ces peptides. Ces méthodes sont longues et nécessitent de nombreuses opérations. Elles entraînent de ce fait une perte importante de toxines et ne traduisent donc pas la concentration réelle de ces substances dans le champignon.

La méthode décrite dans ce travail permet de doser simultanément les trois principales amatoxines (α -, β - et γ -amanitines), qui sont les toxines les moins altérées par la dessiccation et le vieillissement du champignon et qui semblent être les seules directement responsables dans l'intoxication humaine. Ce dosage s'effectue au moyen

de la spectrophotométrie par transmission et par réflexion sur chromatogramme en couche mince.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Extraction et purification

Pulvériser un lot de plusieurs amanites desséchées sous rayonnement infrarouge représentant 10 g environ, à l'aide d'un broyeur à hélice. À partir de cette poudre homogénéisée, peser un échantillon de 2 g qui est ensuite porté dans 50 ml d'un mélange à parties égales de méthanol et d'eau distillée. Agiter cette suspension avec un agitateur magnétique et maintenir à 45° environ pendant 20 min. Filtrer à travers une étamine et, après expression, reprendre le marc avec une autre fraction de 50 ml du même mélange méthanol-eau chauffé dans les mêmes conditions que précédemment. Le marc est repris une troisième fois de la même façon mais par 30 ml seulement du mélange méthanol-eau. Rincer l'étamine et le bécher avec 20 ml du mélange hydro-alcoolique.

Les filtrats (au total 150 ml) qui sont troubles, sont concentrés à l'évaporateur rotatif—sans dépasser 35°—jusqu'à un volume de 20 ml. Cet extrait brunâtre versé dans un bécher est agité avec une petite portion (2 g) de cellulose MN 100 en poudre (Macherey, Nagel & Co., Düren, Allemagne fédérale) qui joue le rôle d'adjuvant de filtration. Préparer par ailleurs une petite colonne de cellulose MN 100 de 2 cm de diamètre sur 2 cm de hauteur, lavée par rinçage (en s'aidant du vide) avec de l'eau distillée puis avec le mélange hydro-méthanolique jusqu'à obtention d'un liquide de rinçage bien limpide. Faire passer l'extrait d'amanite sur cette micro-colonne maintenue tassée par aspiration. Recueillir le filtrat parfaitement limpide dans un ballon jaugé de 50 ml.

Le ballon de l'évaporateur rotatif ainsi que le bécher ayant contenu l'extrait et la poudre de cellulose, doivent être rincés avec 25 ml du mélange hydro-méthanolique par petites fractions versées au fur et à mesure sur la micro-colonne. Essorer celle-ci en fin d'expérience. Compléter le volume du ballon au trait de jauge avec quelques ml du même mélange.

On obtient en définitive une solution extractive à 4% d'amanite qui servira au dosage.

Dosage

L'extrait ainsi obtenu est chromatographié sur couche mince de silice, à côté d'une gamme d' α -amanitine et les amatoxines sont dosées *in situ* sur les chromatogrammes.

Matériel et réactifs

Le matériel utilisé comprend: Chromatoplaques de gel de silice Merck GF₂₅₄ (prêts à l'emploi) de 0.25 mm d'épaisseur sur support de verre 20 × 20 cm (Merck, Darmstadt, Allemagne fédérale); micropipettes, "Microcaps, Gold label" (Drummond, Broomall, Pa., États Unis) de 1, 2, 3, 4 et 5 μ l de capacité (données pour une précision de $\pm 0.25\%$); cuve pour chromatographie en couche mince; sèche-cheveux.

Le solvant est chloroforme-méthanol-acide acétique (100%)—eau (75:33:5:7.5).

Le révélateur, réactif à l'acide sulfanilique diazoté, est obtenu par préparation de quatre solutions: (a) solution d'acide sulfanilique à 0.5% (p/v) dans une solution 2 N d'acide chlorhydrique, (b) solution de nitrite de sodium à 5% (p/v) dans l'eau distillée, (c) solution d'acétate de sodium à 20% (p/v) dans l'eau distillée et (d) solution de carbonate de sodium à 15% (p/v) dans un mélange hydro-alcoolique contenant 10% (v/v) de méthanol.

La solution étalon d' α -amanitine (poudre lyophilisée fournie par la firme Boehringer, Mannheim, Allemagne fédérale, et titrant 90% de toxine pure) est à 0.2% (p/v) dans un mélange hydroalcoolique à 10% (v/v) d'éthanol absolu.

Le Spectrophotomètre chromatographique Zeiss PM Q II fonctionne par transmission et par réflexion simultanées. Conditions de mesure: longueur d'onde du faisceau incident, 480 nm; dimensions de la fente de la tête de mesure, 8 mm \times 0.02 mm; vitesse de déplacement de la plaque, 30 mm/min; vitesse de déroulement du papier enregistreur, 60 mm/min; atténuation de bruit de fond, position II.

Mode opératoire

Déposer sur une plaque de gel de silice à l'aide de micropipettes, par petites fractions de 0.2 μ l, successivement: 8 μ l d'extrait d'amanite et 1, 2, 4 et 5 μ l de la solution étalon d' α -amanitine correspondant à 0.2, 0.4, 0.8 et 1 μ g de toxine. Placer la plaque après dessiccation des dépôts dans la cuve contenant le solvant. Laisser migrer sur une distance de 14 à 15 cm (la durée de migration est de 120 min environ). Sécher la plaque très soigneusement dans un courant d'air froid. Il est très important que les chromatogrammes soient bien débarrassés de toute trace de solvant pour obtenir, après révélation, un fond qui reste très clair. Vaporiser sur le chromatogramme le mélange obtenu par addition de 2 ml de solution a, 0.5 ml de solution b et 15 ml de solution c. Sécher la plaque dans un courant d'air froid et vaporiser ensuite la solution d. Les taches des amatoxines apparaissent colorées en rouge-brun sur fond très clair. Procéder à l'enregistrement photodensitométrique par transmission et réflexion simultanées à la longueur d'onde de 480 nm. En effet, les trois amatoxines ont, après révélation, une absorption maximale à la même longueur d'onde. Centrer la tête de mesure sur la tache à analyser. Régler le zéro et le 100% de transmission sur la plaque à 1 cm environ au-dessus de la tache. Déterminer la surface des pics obtenus et tracer la droite d'étalonnage représentant la variation des surfaces des pics en fonction des concentrations en α -amanitine. Déterminer la teneur en amatoxine de la solution à doser par report à cette droite d'étalonnage.

RÉSULTATS

Nous avons dosé, par la technique décrite ci-dessus, les amanitines dans 2 g d'un lot homogène correspondant à 20 g de champignons entiers et secs d'*Amanita phalloides* récoltés dans une même station (Bois-Madame à Vauvert (Gard), Octobre 1973) et séchés sous un rayonnement infra-rouge. Il était également intéressant de doser ces trois cyclopeptides individuellement dans le chapeau et le stipe du carpophore (volve comprise). Pour cela, nous avons préparé des échantillons de 2 g de chacune des deux parties du champignon à partir de 10 g de poudre homogène d'amanites provenant de la même récolte.

La Fig. 1 représente la chromatographie d'extraits de champignons entiers, de

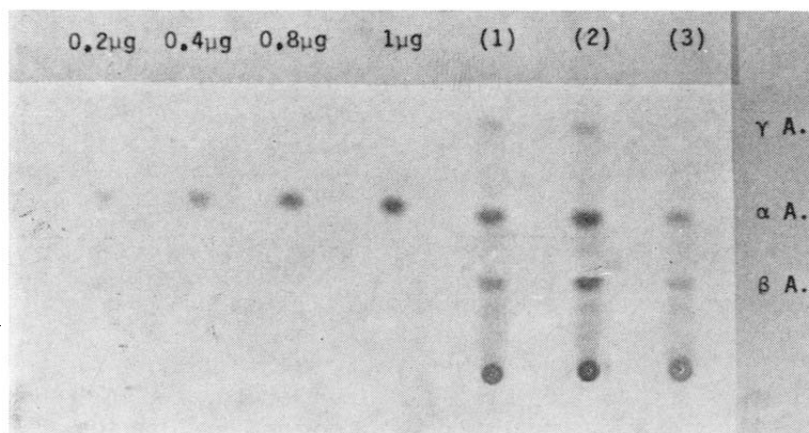


Fig. 1. Chromatographie sur gel de silice de trois extraits d'*Amanita phalloides* à l'état sec et d'une gamme étalon d' α -amanitine. Solvant, chloroforme-méthanol-acide acétique (100%) - eau (75:33:5:7.5); révélateur, acide sulfanilique diazoté. 1 = Extrait de champignon entier; 2 = extrait de chapeau; 3 = extrait de stipe. γ A = γ -amanitine, $R_f = 0.28 \pm 0.02$; α A = α -amanitine, $R_f = 0.18 \pm 0.01$; β A = β -amanitine, $R_f = 0.10 \pm 0.01$.

TABLEAU I

TENEUR EN mg DES TROIS AMANITINES POUR 1 g DE CHAMPIGNON SEC

| Amanitine | Champignon entier | Chapeau | Stipe | Champignon entier - (chapeau + stipe)/2 |
|---------------------|-------------------|---------|-------|--|
| α -Amanitine | 1.88 | 2.65 | 0.95 | + 0.08 |
| β -Amanitine | 1.26 | 1.93 | 0.67 | - 0.04 |
| γ -Amanitine | 0.30 | 0.54 | 0.13 | - 0.03 |

chapeaux et de stipes d'*Amanita phalloides* obtenus selon la méthode décrite. Le Tableau I rassemble les taux moyens de chaque amanitine, en milligramme par gramme de champignon sec.

D'après ces résultats, le chapeau est l'organe le plus riche en amatoxines et le stipe le plus pauvre. Par ailleurs, l' α -amanitine est la toxine dont le taux est le plus élevé tandis que la γ -amanitine celle dont le taux est le plus bas. Signalons, à titre de comparaison les teneurs en toxines trouvées par Faulstich *et al.*³ dans le champignon entier et sec: α -amanitine, 1 mg/g, β -amanitine, 1.15 mg/g et γ -amanitine, 0.10 mg/g. D'autre part, l'écart constaté entre les teneurs en amanitines rapportées à 1 g de champignon entier et de l'ensemble chapeau + stipe est compris entre 3 et 8%. Ces résultats mettent en évidence la bonne reproductibilité de la méthode d'extraction et de dosage (écart moyen de l'ordre de 5%).

DISCUSSION

Cette méthode a été mise au point après une recherche des meilleures conditions pour chacune des étapes. Ainsi le choix du solvant d'extraction, celui de la

méthode de purification, du solvant de migration et du révélateur seront discutés dans les lignes suivantes.

Nous avons tout d'abord comparé différents solvants en vue de l'extraction des toxines phalloïdiennes: l'eau, le méthanol, le méthanol aqueux, l'alcool isoamylique, l'alcool isopropylique et le butanol. Le méthanol est le solvant d'extraction le plus utilisé⁵⁻⁹ dans la préparation des divers extraits d'amanite, mais c'est le mélange méthanol-eau, à parties égales, qui nous a donné les extraits les plus riches en amanitines.

Nous avons vérifié en effet que les marcs résiduels, à la suite de la troisième macération par le méthanol aqueux, sont complètement épuisés et ne libèrent plus d'amatoxines. Grâce à la cellulose, dont la qualité MN 100 correspond à une certaine dimension des fibres, l'extrait d'amanite subit une micro-filtration qui permet d'obtenir un filtrat limpide, débarrassé des particules en suspension et de certaines grosses molécules.

Nous avons essayé au préalable la purification des extraits obtenus par macération dans le mélange méthanol-eau (après élimination du méthanol) par extraction des toxines au moyen de l'alcool isoamylique ou butanolique. Des macérations aqueuses ont été également purifiées par relargage avec du chlorure de sodium ou du sulfate de sodium au contact d'un solvant miscible à l'eau comme l'isopropanol. On obtient deux phases et l'on soutire la phase hydro-alcoolique surnageante. En répétant l'extraction plusieurs fois, on aboutit à des extraits isopropanoliques contenant essentiellement les amatoxines très convenablement purifiées. Mais ces phases isopropanoliques, ainsi que les extraits isoamyliques ou butanoliques, sont beaucoup plus pauvres en toxines que les solutions hydro-méthanoliques obtenues par la méthode proposée. Cette purification très simple a l'avantage d'éviter de longues manipulations (délipidation, précipitation par le sulfate d'ammonium, etc.) qui entraînent inévitablement des pertes de toxines, et de donner des extraits de bonne reproductibilité. De plus, avec ce mode d'extraction et de purification, associé au choix du solvant de migration pour la séparation des amanitines, on obtient des chromatogrammes avec des taches bien délimitées et qui se prêtent parfaitement au dosage photodensitométrique.

Nous avons, là aussi, repris les différents solvants et les différents révélateurs indiqués par les auteurs qui ont étudié la chromatographie en couche mince des toxines phalloïdiennes^{3,5-7,9-12}. C'est le mélange à base de chloroforme, méthanol, acide acétique et eau qui nous a donné les meilleurs résultats, c'est à dire une bonne séparation des trois principales amanitines entre elles et par rapport aux autres taches du chromatogramme. Sur ce dernier point, la silice est moins sensible que la cellulose aux impuretés résiduelles des extraits déposés.

Quant à la révélation, c'est l'acide sulfanilique diazoté qui nous a paru le plus adéquat pour un dosage direct sur les chromatoplaques, c'est à dire un dosage suffisamment sensible, reproductible, basé sur une coloration stable, proportionnelle à la concentration (Fig. 2a). Ce révélateur, déjà utilisé par certains auteurs, réagit avec les groupements phénoliques d'une façon assez générale en donnant des couleurs jaunes, orangées ou roses. Avec les noyaux hydroxy-indoliques, la coloration —assez sensible— est toujours rouge brunâtre. De ce fait, seules les amanitines (qui possèdent ce noyau hydroxy-indolique et donc absorbent toutes —une fois révélées— à 480 nm)

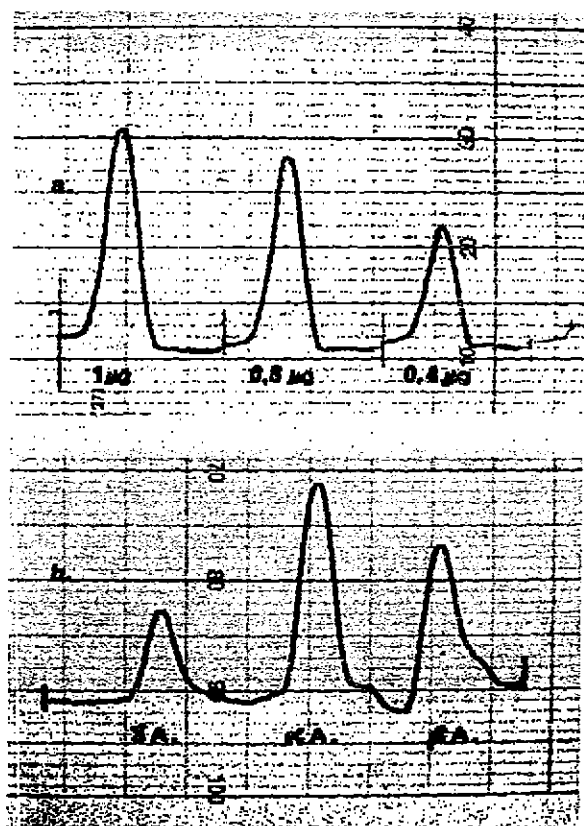


Fig. 2. (a) Enregistrement graphique à 480 nm après lecture par transmission/réflexion des taches correspondant à la chromatographie de trois concentrations différentes d' α -amanitine. (b) Enregistrement graphique dans les mêmes conditions que pour (a), des taches correspondant à la chromatographie d'un extrait de chapeau d'*Amanita phalloides* à l'état sec.

ressortent parfaitement sur les chromatogrammes. Le fond des plaques (très soigneusement débarrassées des traces de solvant) reste très clair, et les autres taches, peu colorées, ne perturbent pas le dosage.

La Fig. 2b nous montre l'enregistrement des trois amanitines lorsque la chromatoplaque défile sous le faisceau de lecture de la γ -amanitine vers la β -amanitine. Il faut préciser que l'emplacement des deux amanitines γ et β (dont nous n'avons pas d'échantillon de référence) a été vérifié en comparant à nos propres résultats les R_F , les colorations et les concentrations relatives donnés pour ces substances par différents auteurs^{3,6-12}. Il en ressort que les R_F des trois amanitines se trouvent toujours classés dans cet ordre: $\beta < \alpha < \gamma$.

Durant ces recherches comparatives, nous n'avons jamais observé l'apparition des phallotoxines dans les extraits de champignons secs que nous avons analysés.

En faisant migrer, en même temps, un étalon de phalloïdine pure* nous nous

* Aimablement fourni par le Professeur Th. Wieland de qui nous avons également reçu un échantillon d' α -amanitine pure et que nous sommes très heureux de remercier encore une fois.

sommes mieux rendu compte de la faible réactivité de cette molécule vis à vis des révélateurs utilisés classiquement (aldéhyde cinnamique, acide sulfanilique diazoté et *p*-aminobenzaldéhyde) ainsi que le signale Wieland².

C'est en chromatographiant des extraits d'*Amanita phalloïdes* congelées (durée de congélation, 8 mois) que nous avons pu retrouver ces phalloïdines. Le solvant que nous préconisons pour une bonne séparation de l'ensemble des toxines est une variante de celui utilisé pour le dosage des amanitines: chloroforme-méthanol-acide acétique (100%)—eau (57:33:5:8). Pour la révélation, nous utilisons couramment l'une des deux formules indiquées ci-après plus sensibles que les formules classiques: (1) Mélanger 15 ml de méthanol et 5 ml d'acide chlorhydrique concentré, refroidir, ajouter 0.3 ml d'aldéhyde cinnamique. (2) Mélanger 8 ml de méthanol et 2 ml d'acide orthophosphorique concentré, refroidir, ajouter 0.5 ml d'aldéhyde anisique. Ces deux révélateurs devront être préparés extemporanément avec des produits "pour analyse". L'une ou l'autre de ces solutions sont vaporisées sur les chromatogrammes qui seront portés à l'étuve à 100° pendant 5 à 10 min. L'aldéhyde anisique colore les amatoxines en violet-pourpre et les phallotoxines en bleu-mauve. Ce réactif est plus sensible que celui qui est à base d'aldéhyde cinnamique qui colore les amatoxines en violacé et les phallotoxines en gris-bleu. Mais ces colorations sont fugaces, en particulier pour les phalloïdines, et de ce fait, ne se prêtent pas à un dosage photodensitométrique.

Dans ces conditions, les R_F des principales toxines sont ceux donnés dans le Tableau II.

TABLEAU II
 R_F ET COLORATIONS DES PRINCIPALES TOXINES

| Toxine | R_F | Coloration |
|---------------------|-----------|------------|
| Amatoxine | | |
| β -Amanitine | 0.33 | violette |
| α -Amanitine | 0.42 | |
| γ -Amanitine | 0.51 | |
| Phallotoxine | | |
| Toxine 1 | 0.06 | gris-bleu |
| Toxine 2 | 0.20 | |
| Toxine 3 | 0.26-0.27 | |
| Phallacidine (?) | 0.38 | |
| Phallisine (?) | 0.45 | |
| Phalloïdine | 0.52 | |

Les taches étant bien délimitées et concentrées sur une faible surface, toutes ces toxines se distinguent très nettement les unes des autres, excepté pour la phalloïdine et pour la γ -amanitine.

CONCLUSIONS

Nous avons mis au point une méthode de dosage par spectrophotométrie directe après séparation chromatographique sur couche mince des trois amanitines (α , β et γ) qui représentent les toxines les plus puissantes et les mieux conservées dans

les exsiccata. Par cette méthode, on peut doser ces amatoxines dans des extraits de champignons obtenus après filtration de macérats hydro-méthanoliques sur fibres de cellulose. Ces extraits ainsi traités, ont l'avantage d'éviter les pertes en toxines dues à des manipulations plus nombreuses et plus complexes.

Enfin, la rapidité et la bonne reproductibilité de ce dosage effectué sur de petites quantités de champignon sec (1 ou 2 g) nous permettront d'étudier le taux de ces amatoxines chez *Amanita phalloides* ou chez d'autres espèces, en fonction de leur écologie. De même, nous pourrions évaluer, d'une façon chiffrée, le potentiel de toxicité d'une quantité donnée d'amanite sèche, ou d'extraits obtenus à partir du champignon, dans un but expérimental.

RÉSUMÉ

Une méthode de dosage par spectrophotométrie par transmission et par réflexion simultanées, après séparation chromatographique sur couche mince, est proposée pour évaluer la teneur des trois principales amanitines α , β et γ chez *Amanita phalloides* Fries. Ces amatoxines représentent les toxines les plus puissantes et les mieux conservées dans le champignon. Le dosage est précédé par une extraction rapide de rendement élevé et de bonne reproductibilité.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. Privat, *Ann. Soc. Hort. Hist. Nat. Hérault.*, 1 et 2 (1974).
- 2 Th. Wieland, *Science* 159, 3818 (1968) 946.
- 3 H. Faulstich, D. Georgopoulos et M. Bloching, *J. Chromatogr.*, 79 (1973) 257.
- 4 Th. Wieland et O. Wieland, *Pharmacol. Rev.*, 11 (1959) 87.
- 5 A. Gérault et L. Girre, *C.R. Acad. Sci. Sér. D*, 281 (1975) 2841.
- 6 P. E. Kamp et W. M. de Wit, *Pharm. Weekbl.*, 103 (1968) 813.
- 7 V. Palyza et V. Kulhánek, *J. Chromatogr.*, 53 (1970) 545.
- 8 H. P. Raaen, *J. Chromatogr.*, 38 (1968) 403.
- 9 G. Sullivan, L. R. Brady et V. E. Tyler, *J. Pharm. Sci.*, 54 (1965) 921.
- 10 V. Palyza, *J. Chromatogr.*, 64 (1972) 317.
- 11 V. Palyza, *J. Chromatogr.*, 76 (1973) 499.
- 12 V. Palyza, *Arch. Toxicol.*, 32 (1974) 109.