

CHROM. 16,511

## Note

### Microdosage spectrofluorimétrique sur couches minces de la mono-méthylhydrazine chez *Gyromitra esculenta*

C. ANDARY\* et G. PRIVAT

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

et

M. J. BOURRIER

Laboratoire Interrégional, Service de la Répression des Fraudes, 34000 Montpellier (France)

(Reçu le 14 décembre 1983)

La gyromitrine et plus précisément la N-méthyl-N-formyl éthanalhydrazone (ou éthylidène-gyromitrine, EG) est le composé hydrazinique toxique le plus abondant chez *Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr.<sup>1</sup>, Ascomycète responsable d'intoxication mortelle lorsqu'il est consommé frais, insuffisamment cuit et en grande quantité. C'est une hydrazone volatile, qui libère spontanément, à la température ambiante, de l'acétaldéhyde et de la N-méthyl-N-formylhydrazine (MFH). Ce dernier composé est également volatil et hydrolysable à son tour en acide formique et en N-méthylhydrazine ou monométhylhydrazine (MMH). Cette MMH est un poison cytotoxique connu et utilisé dans l'industrie aéronautique avec la diméthylhydrazine comme carburants de fusées.

Les travaux concernant le dosage de ces composés dans ce champignon aboutissent à des résultats assez différents entre eux et parfois contradictoires, qui, semble-t-il, seraient dûs à la volatilité de ces toxines et également aux méthodes de dosages elles-mêmes. Il faut ajouter que la toxicité du champignon provient essentiellement de la présence de MMH libérée (très rapidement au contact du pH acide de l'estomac<sup>2</sup>, à partir de ses formes plus complexes que sont les gyromitrines ou la MFH<sup>3</sup>).

Le dosage des diverses gyromitrines se fait classiquement par chromatographie en phase gazeuse. Si la MFH est relativement facile à doser avec une limite de sensibilité à 0.2 µg, la MMH par contre se décompose dès le début de l'opération et les résultats sont souvent approximatifs même à la dose de 10 µg<sup>4</sup>.

Nous avons donc mis au point une méthode d'extraction et de dosage qui nous a fourni d'une façon simple, rapide et très sensible la quantité totale de MMH stabilisée contenue dans le champignon, que cette hydrazine soit libre ou conjuguée.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

##### *Extraction de la MMH*

Le champignon, frais ou sec, est finement broyé et l'extraction est réalisée par macération à froid avec une solution à 40% d'éthanol dans l'eau contenant 10% d'acide chlorhydrique.

Les quantités de solvant nécessaires sont variables selon que le champignon est frais ou sec: 10 g de champignon frais ou congelé pour 40 ml de solution éthanolique acidifiée, 1 g de champignon sec pour 30 ml de cette même solution.

Le dosage peut parfaitement se faire sur des prises plus faibles d'échantillon (200 ou 300 mg de champignon sec par exemple), en tenant compte des proportions indiquées ci-dessus.

La macération, aidée d'une agitation magnétique, dure deux heures à l'abri de l'air. Cette macération est suivie d'une filtration sur papier et le filtrat est recueilli dans un flacon en verre brun. Cet extrait est conservé à l'abri de l'air, au frais (+4°C) et dilué si nécessaire avant le dosage.

### Dosage

*Principe.* La MMH libérée de ses combinaisons sous l'action du pH acide est aussitôt transformée en chlorure de MMH beaucoup plus stable. L'extrait de champignon est chromatographié sur couche mince de cellulose à côté d'une gamme de chlorure de MMH. La révélation de l'hydrazine se fait par vaporisation sur les chromatoplaques d'une solution acide de *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde suivie, après un léger séchage, d'une simple vaporisation d'eau qui transforme la MMH en un fluorophore rouge-carmin intense (visible aux UV). Cette fluorescence sera dosée par spectrofluorimétrie directe sur les chromatogrammes.

*Matériel et réactif.* Chromatoplaque de cellulose sur support de verre (20 × 10 cm), prête à l'emploi (réf. Merck, 5716); solvant: N-butanol-éthanol-eau (4:1:2); micropipettes: "Microcaps, Gold label", Drummond, Broomal, PA, U.S.A.; gamme étalon: solution alcoolique (éthanol à 95%) de MMH à  $5 \cdot 10^{-5}\%$  (v/v) et contenant 1% d'acide chlorhydrique concentré; dépôts: 1, 2, 3, 4 et 5  $\mu$ l de solution étalon de chlorure de MMH correspondant à 0.43, 0.87, 1.3, 1.74 et 2.17 nanogrammes de MMH; révélateur: (a) solution de *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde à 0.5% dans l'éthanol à 95% contenant 4% d'acide sulfurique concentré; (b) eau; appareil de mesure: analyseur chromatographique Farrand UV-Vis-2 (Optical, New York, U.S.A.) à deux monochromateurs et fonctionnant en fluorescence et par réflexion;  $\lambda$  excitation = 340 nm et  $\lambda$  émission = 610 nm.

*Mode opératoire.* Le chromatogramme est développé sur une hauteur de 4 à 5 cm (durée = 35 min) séché et révélé par vaporisation du réactif (a), qui est répétée deux fois en séchant légèrement la plaque après chaque vaporisation dans un courant d'air chaud. Puis on vaporise avec l'eau (b) à deux reprises également et en séchant légèrement la chromatoplaque.

Les taches de chlorure de MMH apparaissent en rose-violacé à la lumière et sont, après exposition aux UV (360 nm) d'une fluorescence rouge-carmin intense. L'intensité des taches ainsi révélées reste stable pendant plusieurs heures, à l'abri de la lumière. La teneur en MMH est déterminée en se rapportant à la droite d'étalonnage représentant la variation des surfaces des pics de la gamme étalon en fonction des concentrations.

### RESULTATS ET DISCUSSION

L'épuisement des phases aqueuses extractives par le chloroforme indiqué par Stijve<sup>4</sup> pour la purification de la MMH est efficace mais avec un rendement moyen.

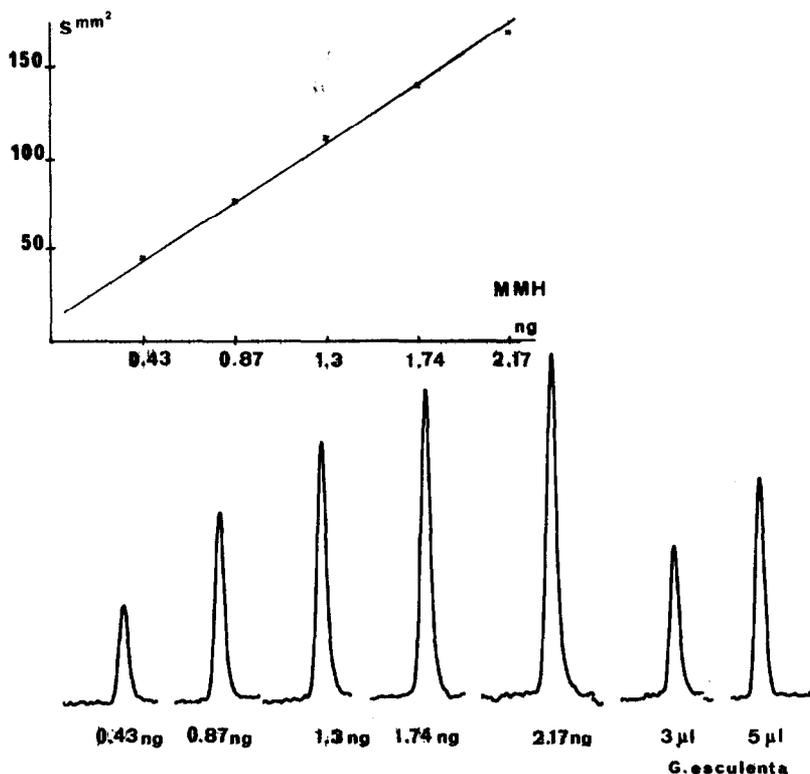


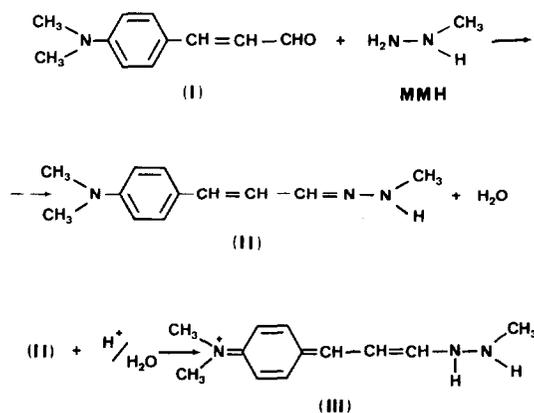
Fig. 1. Enregistrement graphique et courbe d'étalonnage après lecture par fluorodensitométrie ( $\lambda_{ex.} = 340$  nm,  $\lambda_{em.} = 610$  nm) des taches correspondant à la chromatographie sur plaque de cellulose d'une gamme de chlorure de MMH et d'un extrait de *G. esculenta*.

Nous préférons le mélange éthanol-eau seul, en évitant de faire une extraction liquide-liquide supplémentaire avec un solvant organique qui entrainerait de grosses pertes en MMH. De plus, la proportion de 40% en éthanol convient parfaitement à la chromatographie de l'extrait et à un bon rendement en hydrazine. En réalité, ce rendement n'est maximum que si l'on ajoute l'acide chlorhydrique directement dans le solvant d'extraction, au contact du champignon. En effet, celui-ci, comme nous avons pu le constater sur de vieux exsiccata, contient des combinaisons hydraziniques non volatiles extractibles avec l'eau et l'alcool et hydrolysables en milieu acide en libérant de la MMH. Cette dernière substance est immédiatement transformée en chlorure stable qui est alors chromatographié. Enfin, l'extraction à la chaleur, avec ou sans acide, donne de moins bons résultats que celle effectuée à la température ambiante (deux heures de contact est un temps optimum d'extraction). Il faut en effet tenir compte d'une certaine dégradation de la MMH à la chaleur.

La migration sur 4 à 5 cm est suffisante et donne, dans les conditions opératoires indiquées et pour le chlorure de MMH, des taches compactes et arrondies de  $R_F = 0.45$  en moyenne.

Quant à la révélation, nous avons essayé différents aldéhydes (cinnamaldéhyde, anisaldéhyde, *p*-diméthylaminobenzaldéhyde) en présence d'acide (chlorhydrique,

sulfurique, phosphorique, acétique) et c'est la *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde en milieu sulfurique suivie d'une aspersions d'eau qui permet d'obtenir pour la MMH une sensibilité remarquable, de l'ordre de 0.2 nanogramme.



L'hydrazone aromatique (II) obtenue, de nature basique se dissout très facilement en milieu acide pour donner un cation quinoïdal (III) qui s'adsorbe sur la cellulose en produisant un fluorophore intense<sup>5</sup>.

Nous n'avons pas retrouvé cette fluorescence rouge avec les autres aldéhydes testées dans les mêmes conditions. La *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde (I) est particulièrement indiquée pour obtenir une bonne révélation.

Le chromatogramme révélé, se conserve quatre heures environ à l'obscurité, laps de temps durant lequel on peut effectuer le dosage.

TABLEAU I

DOSAGES RÉPÉTÉS DE LA MMH RÉALISÉS SUR UN MÊME LOT HOMOGÈNE DE *G. ESCULENTA* SÉCHÉ

	Déshydratation* (%)	MMH champignon sec (mg/kg)
a	93.7	934
b	93.7	994
c	93.7	935

\* Température du laboratoire: 25 ± 2°C, durée de séchage: 14 jours.

Nous avons recherché à retenir une certaine humidité sur la chromatoplaque par addition à l'eau de vaporisation de sulfate de sodium, de carbonate de sodium ou de mannitol, de manière à conserver plus longtemps la coloration, sans aboutir à un meilleur résultat.

La sensibilité de la révélation est maximale sur plaque de cellulose développée avec un solvant neutre\*. L'utilisation de couche mince de cellulose à haute perfor-

\* Nous avons rencontré durant nos dosages un lot de plaques de cellulose sur lesquelles la révélation ne s'est pas produite, vraisemblablement en raison d'impuretés contenues dans l'adsorbant.

TABLEAU II

TENEUR EN MMH D'ÉCHANTILLONS DE *G. ESCULENTA* COMMERCIALISÉ À L'ÉTAT SEC

	<i>MMH</i> <i>champignon sec</i> (mg/kg)	<i>MMH</i> <i>champignon</i> <i>frais reconstitué</i> (mg/kg)
No. 1*	398	23.8
No. 2**	308	≈ 18.5
No. 3**	310	≈ 18.6

\* Champignon déshydraté à la température du laboratoire ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) pendant 70 jours. Pourcentage de déshydratation: 94%.

\*\* Champignon sec commercialisé en sachet. Pourcentage de déshydratation supposé être ≈ 94%.

mance (HPTLC) n'améliore dans ce cas, ni la résolution ni la sensibilité de la méthode. La fluorescence rouge-carmin de la MMH obtenue dans les conditions expérimentales préconisées est caractéristique de la molécule. En effet, nous avons synthétisé différentes hydrazones par addition de la MMH en milieu étheré aux aldéhydes suivants: aldéhyde cinnamique, aldéhyde benzoïque, aldéhyde vanillique, aldéhyde anisique, *p*-diméthylaminobenzaldéhyde, *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde et que nous avons chromatographiées et révélées avec notre révélateur. Pour chaque hydrazone, on retrouve sur les chromatogrammes cette même fluorescence rouge aux UV qui vire au bleu-vert en milieu alcalin et signale la présence de MMH.

Sur gel de silice la MMH, après révélation, reste sombre aux UV et la sensibilité de la coloration dans le visible des sels de MMH est de ses hydrazones est nettement moins grande que sur cellulose.

Nous avons vérifié la reproductibilité de la méthode préconisée en réalisant plusieurs dosages à partir d'un même lot réunissant plusieurs carpophores secs (température du laboratoire:  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , durée de séchage: 14 jours) broyés finement et rendus homogènes (Tableau I).

L'écart moyen entre les teneurs en MMH est de l'ordre de 3%.

Nous avons également dosé des échantillons de *G. esculenta* commercialisés soit à l'état sec en sachet plastique, soit en boîte de conserve après déshydratation

TABLEAU III

TENEUR EN MMH D'ÉCHANTILLONS DE *G. ESCULENTA* SÉCHÉ ET COMMERCIALISÉ EN BOÎTE DE CONSERVE APRES RÉHYDRATATION

	<i>MMH</i> (mg/kg)	<i>MMH</i> (mg/boîte)
<i>No. 2125</i>		
Champignon égoutté (205 g)	3.4	—
Liquide de conservation (204 g)	4.8	—
Contenu total de la boîte (409 g)	—	1.6
<i>No. 2128</i>		
Champignon égoutté (198 g)	4.4	—
Liquide de conservation (178 g)	9.2	—
Contenu total de la boîte (376 g)	—	2.4

puis réhydratation (Tableaux II et III). Les taux de MMH se stabilisent dans le champignon après une durée de séchage assez longue, de l'ordre de deux mois<sup>6</sup>.

C'est le liquide de conservation qui est le plus riche en MMH et qui est en général rejeté au moment de la consommation du champignon.

Les doses de MMH décelées dans le champignon sec ou en conserve sont nettement inférieures à la DL<sub>50</sub> de la MMH chez l'homme: 5 à 8 mg/kg<sup>3,7</sup>.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. Pyysalo et A. Niskanen, *J. Agric. Food Chem.*, 25 (1977) 644.
- 2 D. Nagel, L. Wallcave, B. Toth et R. Kupper, *Cancer Research*, 37 (1977) 3458.
- 3 A. Wright, H. Pyysalo et A. Niskanen, *Toxicology Letters*, 2 (1978) 261.
- 4 T. Stijve, *Trav. Chim. Aliment. Hyg.*, 69 (1978) 492.
- 5 F. Feigl et V. Anger, *Spot Tests in Organic Analysis*, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 7me éd., 1975, p. 277.
- 6 C. Andary, G. Privat et M. J. Bourrier, *Mycologia*, (1984) soumis pour publication.
- 7 J. Schmidlin-Meszaros, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 65 (1974) 453.