

Une méthode chimique simple d'identification de l'Amanite phalloïde

Autor(en): **Mérat, E. / Veyrat, G. / Duret, M.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizerische Zeitschrift für Pilzkunde = Bulletin suisse de mycologie**

Band (Jahr): **59 (1981)**

Heft 9

PDF erstellt am: **11.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-937200>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

presso San Giorgio d. Morbio Inferiore, ne raccolti una colonia d. diciotto individui.

Estratto dal Bollettino della Società Ticinese di Scienze Naturali, anno XLIII, 1948, pp. 17-24.

Per gentile concessione.

Une méthode chimique simple d'identification de l'Amanite phalloïde

Par E. Mérat, G. Veyrat et M. Duret

Laboratoire cantonal, Institut d'Hygiène, CP 109, 1211 Genève 4

Parmi les situations dans lesquelles peuvent se trouver tant le médecin que le contrôleur des champignons, il en est qui nécessitent des indications et des renseignements précis. Il s'agit des cas où les indications fournies par le malade ou les symptômes qu'il présente laissent penser à un syndrome phalloïdien. Pour qui a une idée de la thérapeutique mise en œuvre dans les cas d'intoxication par *Amanita phalloïdes* ou ses sœurs blanches et des conséquences d'une telle thérapeutique, il est toujours délicat de se prononcer fermement sur le fait qu'il y a eu consommation ou non de ces champignons.

Il arrive cependant que l'on puisse retrouver des restes de repas, un solde de champignons partiellement cuits, voire simplement le jus de cuisson ou la sauce. Les recherches habituelles, examens macroscopiques et microscopiques des échantillons donnent souvent de très bonnes indications, mais l'on rencontre parfois des cas où ces examens ne permettent de tirer aucune conclusion, faute d'éléments morphologiques d'appréciation suffisants. Nous nous sommes donc tournés du côté des techniques biochimiques d'examen. Nous avons cherché une méthode qui soit assez simple pour permettre sa mise en œuvre par n'importe quel laboratoire muni d'un équipement très sommaire: officine de pharmacie, cabinet médical, etc. D'autre part, le temps nécessaire à une analyse doit être raisonnablement court (moins d'une demi-journée) et ses résultats suffisamment fiables. Notre choix s'est porté sur la chromatographie sur couche mince.

Nous avons délibérément renoncé aux méthodes radio-immunologique [1] ou enzymatique [2], plus sensibles, mais trop longues et compliquées pour le but fixé. De nombreux auteurs ont traité le problème, le plus souvent d'une manière toute académique, s'attachant à un dosage précis des toxines contenues dans des champignons d'espèces parfaitement identifiées. Palyza [3], Klawitter [4], Stijve [5] ont envisagé la question de la recherche des toxines dans les liquides biologiques ou dans des mélanges de champignons. Mais le premier n'a pas publié de résultats à ce propos et la méthode employée par la seconde est extrêmement longue; le troisième, qui travaille sur des champignons secs ou lyophilisés, emploie une technique à haute performance nécessitant un appareillage peu répandu.

D'autre part, personne à notre connaissance ne s'est encore attaché à la recherche de l'Amanite phalloïde en tant que constituant partiel d'un plat cuisiné.

Après avoir testé toutes les méthodes publiées, nous avons adopté le principe préconisé par Palyza, en l'adaptant à nos besoins, l'emploi de plaques à zone de concentration permettant d'appliquer de très gros spots sans affecter le pouvoir séparateur de la couche mince.

Principe

L'échantillon est dilué avec du méthanol, lavé à l'éther de pétrole, puis, après concentration, soumis à une chromatographie sur couche mince.

Réactifs

Méthanol (p. a. Merck)

Ether de pétrole, Eb = 40–60°C

2-butoxyethanol (butyl-cellosolve) (purum, Fluka) I

Acétate d'éthyle, rectifié par distillation II

Aldéhyde cinnamique (purum, Fluka) III

Solvant de migration pour la chromatographie : 70 ml I + 30 ml II + 1 ml III, à préparer juste avant l'usage.

Acide chlorhydrique fumant.

Toxines-témoins: extrait fraîchement préparé de 1 g d'Amanite phalloïde sèche dans 10 ml de méthanol, 5 min. à ébullition. Après décantation, utiliser le surnageant, concentré à 2 ml environ.

Appareillage

Broyeur à couteaux (ex. Polytron ultrarapide).

Evaporateur rotatif, ou tout autre dispositif de distillation.

Centrifugeuse; à défaut: filtres

Matériel usuel de chromatographie sur couche mince, avec: plaques de silicagel, 80 Å, épaisseur 0,25 mm, à zone de concentration (Whatman LK 5 DF ou équivalent).

Cuvette, avec support permettant de poser les plaques horizontalement, pour la révélation.

Mode opératoire

Ajouter 200 ml de méthanol à l'échantillon contenant env. 100 g de champignons, ainsi que, le cas échéant, leur jus de cuisson, sauce, etc. et homogénéiser le mélange avec le broyeur à couteaux.

Chauffer et maintenir 5 min. à ébullition.

Laisser refroidir et centrifuger (ou filtrer en prenant soin de bien rincer le filtre avec du méthanol à 50%).

Récupérer le surnageant (ou le filtrat).

Si l'échantillon est gras, diluer la solution avec 50 ml d'eau et la laver avec 50 ml d'éther de pétrole.

Concentrer par évaporation (sous vide, jusqu'à 100°C) de manière à ce que la solution reste parfaitement liquide. Si l'extrait a été trop concentré, devient visqueux et s'adsorbe mal sur la plaque de chromatographie, on peut rediluer avec un peu d'eau.

Chromatographier 40 µl de solution à analyser: les Rf pouvant être modifiés par les impuretés des plats cuisinés accompagnant les Amanites, appliquer à double l'extrait à analyser, en ajoutant du témoin à l'un des échantillons. Ne pas déposer de spot trop près du bord inférieur de la plaque, il ne doit pas tremper dans le solvant. A l'opposé, éviter qu'il ne déborde de la zone de concentration dans la zone de migration. Ne pas commencer la migration avant que l'échantillon ne soit entièrement adsorbé dans la zone de concentration, et sec.

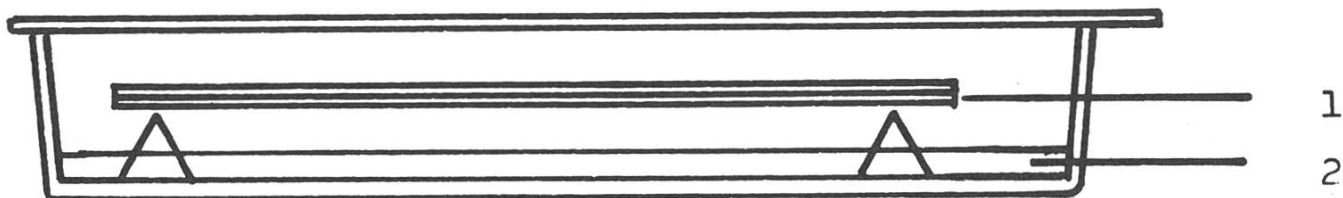
Conditions de migration: pas de saturation de la cuve

distance de migration = env. 10 cm

durée = env. 2 heures.

Avant la révélation, laisser entièrement évaporer le solvant de migration à l'air. La révélation se fait par exposition pendant 10 min. de la couche mince aux vapeurs d'acide chlorhydrique (voir schéma).

Les toxines apparaissent en rose violacé (amanitines) et bleu pâle (phalloïdines). Ces dernières étant peu stables et moins abondantes, il est rare de les retrouver dans les restes d'un plat cuisiné, surtout s'il ne contient qu'une faible quantité d'Amanite phalloïde. Parfois même dans ce cas, on ne met en évidence qu'un spot d'amanitine.



Schema du système de révélation: 1 = couche mince, 2 = acide chlorhydrique

Discussion

Nous avons appliqué cette méthode à la recherche des toxines dans des plats préparés à partir des champignons secs, avec huile, ail, oignon, fines herbes, sel, farine, vin blanc, crème.

Trois opérateurs, travaillant de façon indépendante, à l'aveugle, ont identifié l'*Amanite phalloïde* dans des mélanges de champignons en contenant moins de 10%. Aucun faux positif n'a été enregistré.

Une méthode voisine, moins élaborée que celle décrite ci-dessus [6], nous a permis au cours de l'automne 1980 de donner en trois heures confirmation au médecin du fait que ses patients avaient absorbé des *Amanites phalloïdes*. Ce premier cas pratique était simple vu qu'on disposait de champignons d'une seule espèce, qui avaient été émincés et sautés au beurre.

Zusammenfassung

Die Dünnschichtchromatographie von Methanol-Wasser-Extrakten erfolgt unter folgenden Bedingungen: Kieselgelplatten mit Konzentrierungszonen; Lösungsmittel = 2-Butoxyethanol + Essigester + Zimtaldehyd (70 + 30 + 1); Färbereaktion mit räumlicher Salzsäure.

Sommario

La presenza di *Amanita phalloides* nei resti di cibo, anche cucinati, viene rivelata in modo rapido e sicuro mediante l'impiego della tecnica di cromatografia su strato sottile, utilizzando il sistema della zona di concentrazione.

gli estratti acquoso-metanolici sono cromatografati su piastra di gel di silice, impiegando come solvente una miscela (70/30/1) di 2-butossietanolo, acetato d'etile aldeide, cinnamica. La rivelazione delle macchie si ottiene mediante acido clorodrico gassoso. Il metodo, che non è inficiato da falso positivi, è stato impiegato con successo per l'identificazione delle tossine nel caso di un'intossicazione di *A. phalloides* (autunno 1980). (Riassunto redatto da E. Testa)

Summary

The *Amanita* toxins are detected by TLC of a methanol-water extract. Chromatographic conditions: silicagel layer with concentration zone; migration solvent = 2-butoxyethanol + ethyl acetate + cinnamaldehyde (70 + 30 + 1); revelation by exposition to hydrogen chloride vapours.

Bibliographie

- 1 Faulstich, H.; Trischmann, H.; Zobeley, S.: A radioimmunoassay for amanitin. FEBS Letters 56 (2), 312-315 (1975).
- 2 Preston, J.F.; Stark, H.J.; Kimbrough, J.W.: Quantitation of amanitins in *Amanita verna* with calf thymus RNA polymerase B. Lloydia 38 (2), 153-161 (1975).

- 3 Palyza, V.; Kulhanek, V.: Über die chromatographische Analyse von Toxinen aus *Amanita phalloides*. *J. Chromat.* 53, 545–558 (1970).
 Palyza, V.: Neue Methode zur Identifizierung von *Amanita*-Toxinen durch Dünnschichtchromatographie. *J. Chromat.* 64, 317–325 (1972).
 Palyza, V.: Schnelle Identifizierung von Amanitinen in Pilzgeweben. *Arch. Toxicol.* 32, 109–114 (1974).
- 4 Klawitter, M.; Lasota, W.: Auxiliary chemical tests relevant to the diagnosis of intoxications with *Amanita phalloides*. *Bromat. Chem. Toksykol.* XI, 345–350 (1978).
 Klawitter, M.; Lasota, W.: Study on elimination of toxic substances in rat intoxicated with *Amanita phalloides*. *Bromat. Chem. Toksykol.* XI, 351–352 (1978).
- 5 Stijve, T.; Seeger, R.: Determination of α -, β -, & γ -amanitin by high performance Thin-layer chromatography in *Amanita phalloides* from various origin. *Z. Naturforsch.* 34c, 1133–1138 (1979).
 Stijve, T.: High performance thin-layer chromatographic determination of the toxic principles of some poisonous mushrooms. *Trav. Chim. Alim. Hyg.* 72, 44–54 (1981).
- 6 Heim, R.: *Les champignons toxiques et hallucinogènes*, N. Boubée, Paris 1963.

Kurse und Anlässe Cours et rencontres Corsi e riunioni

Ausstellungen / Expositions / Esposizioni

- Bümpliz** Samstag und Sonntag, den 12. und 13. September, im Restaurant «Bären».
- Ersigen** Samstag und Sonntag, den 26. und 27. September. Einzelheiten siehe unter Vereinsmitteilungen.
- Grand Cachot** 5. September bis 10. Oktober. Siehe SZP 8/1981. Voir BSM 8/1981.
- Lugano** 12 e 13 settembre. Padiglione Conza.
- Oyonnax** Dimanche 11 octobre.
- Sierre** Dimanche et lundi, 27 et 28 septembre, au «Café de la Terrasse» (en face de la gare).

Vereinsmitteilungen Communications des sections Notiziario sezionale

Aarau und Umgebung. Sonntag, 20. September: Mitgliederexkursion, Treffpunkt 9 Uhr, Kunstseilbahn, Brügglifeld, Aarau. – 3. und 4. Oktober: MAG. – 31. Oktober: Schlussexkursion, Besammlung 13 Uhr, Brügglifeld, Aarau.

Basel. Samstag, 17. Oktober: Herbstbummel. Treffpunkt: 9 Uhr, Parkplatz unter den Linden beim Bahnhof Laufenburg AG. Wanderung dem Rheinufer entlang nach Rheinsulz, von dort hinauf zur Waldhütte auf der Ebene (Heuberg). Unser Mitglied und ausgedienter Militärküchenschef Hausi Bigler wird uns ein weiteres Mal mit Pilzschnitten verwöhnen. Marschzeit vier Stunden. Der Bummel findet bei jeder Witterung statt. Bei Regen sind wir zum Essen unter Dach.