

Article original / Original article

Dosage des cyanures dans les amandes amères et les noyaux d'abricot par chromatographie en phase gazeuse à détecteur ionisation de flamme en mode *Head Space* (HS-CPG-FID)

Determination of cyanide in bitter almonds and apricot kernels using headspace chromatography with a flame ionization detector (HS-GC-FID)

Younes Zebbiche^{1,3,*}, Imene Rebai¹, Mohamed Azzouz², Rania Abtroun¹, Mohamed Reggabi², Barkahoum Alamir³

¹ Laboratoire de Toxicologie du Centre Hospitalo-Universitaire Bab El Oued Alger, 53 boulevard Said Touati, Alger, Algérie

² Laboratoire de Biologie-Toxicologie, Établissement Hospitalier Spécialisé Ait Idir, Boulevard Abderrezak Hadad, Alger, Algérie

³ Centre National de Toxicologie, Route petit staoueli NIPA Dely Brahim, Alger, Algérie

Résumé – Introduction : La toxicité des plantes à hétérosides cyanogènes est liée à la libération du cyanure responsable de multiples altérations neurologiques, cardiaques et respiratoires. Les intoxications aux hétérosides cyanogènes, recensées au Centre Antipoison d'Alger, occupent une part non négligeable des intoxications aux plantes (6 %). Le dosage des cyanures constitue une source importante d'informations pour évaluer la toxicité des plantes qui en contiennent. C'est à ce titre que nous avons initié une étude destinée à déterminer les teneurs en cyanure dans les amandes amères et noyaux d'abricot, recueillis dans différentes régions du pays. **Objectif :** Évaluer les teneurs en cyanure dans des échantillons d'amandes amères et des noyaux d'abricot provenant de différentes régions d'Algérie. **Méthode :** Analyse des échantillons recueillis en juin et juillet après mise en œuvre d'une méthode de dosage du cyanure par chromatographie en phase gazeuse en mode *Head Space* à détecteur ionisation de flamme (HS-CPG-FID). Après incubation (tampon phosphate à température ambiante pendant 24 h), le cyanure est libéré par hydrolyse enzymatique endogène. La teneur en cyanure a été établie, en présence de l'acétonitrile utilisé en tant qu'étalon interne, par chromatographie avec une colonne capillaire RTX 624. **Résultats :** Le taux de cyanure d'hydrogène des échantillons analysés varie de 182 ppm à 4 146 ppm (moyenne = 1 372 ppm) pour les amandes amères. Pour les noyaux d'abricot, les taux sont de 383 ppm à 2 774 ppm (moyenne = 1 533 ppm). **Conclusion :** À titre indicatif, le nombre pouvant être responsable d'une intoxication mortelle par le cyanure libéré varie de 11 à 21 amandes amères (moyenne = 16) et de 25 à 211 noyaux d'abricot (moyenne = 99).

Mots clés : Cyanure, hétérosides cyanogènes, amande amère, noyaux d'abricot, HS-CPG-FID

Abstract – Introduction: The toxicity of plants with cyanogenic glycosides is related to the release of cyanide, responsible for much neurological, cardiac and respiratory deterioration. The intoxications with cyanogenic glycosides listed in the poisons center of Algiers occupy a significant proportion of plant poisoning (6%). The determination and quantification of cyanide is an important source of information for assessing the toxicity of these plants. It is for this reason that we initiated a study to determine the level of cyanide in bitter almonds and apricot kernels collected in various regions of the country. **Objective:** To evaluate the level of cyanide in bitter almonds and apricot kernel samples collected from different areas of Algeria. **Method:** Analysis of samples collected in June and July was carried out after developing a method for the determination of cyanide using headspace chromatography with a flame ionization detector (HS-GC-FID). After incubation (phosphate buffer at room temperature for 24 h), the cyanide is released by endogenous enzymatic hydrolysis. The cyanide level was determined, in the presence of the acetonitrile used as an internal standard, by chromatography with a RTX-624 capillary column. **Results:** The hydrogen cyanide rate of samples varies from 182 ppm to 4 146 ppm (mean = 1 372 ppm) for bitter almonds. For the apricot kernels, the rates are

* Correspondance : Y. Zebbiche, pharmaklon_19@hotmail.com

from 383 ppm to 2 774 ppm (mean = 1 533 ppm). **Conclusion:** As an indication, the number that can be responsible for a fatal poisoning by released cyanide varies from 11 to 21 bitter almonds (mean = 16) and from 25 to 211 apricot kernels (mean = 99).

Key words: Cyanide, cyanogenic glycosides, bitter almond, apricot kernels, HS-CPG-FID

Reçu le 12 novembre 2012, accepté après modifications le 13 mai 2013

Publication en ligne le 17 septembre 2013

1 Introduction

Les plantes sont connues pour produire plus de 300 000 métabolites secondaires, produits naturels bioactifs (alcaloïdes, hétérosides, glycosilates...) responsables, notamment, de leur toxicité. Les hétérosides cyanogènes, issus du métabolisme secondaires, sont présents dans les noyaux des Rosacées (abricotier, amandier, pêcher...). Ils sont impliqués en toxicologie humaine et animale. Ces substances jouent, dans les plantes, un rôle antibactérien et antifongique naturel et servent de répulsifs contre les rongeurs, les insectes et les prédateurs. Les substances cyanogènes demeurent parmi les substances les plus toxiques pour l'homme.

La toxicité des plantes à hétérosides cyanogènes est liée à l'ion cyanure qui, après sa libération de l'hétéroside et son absorption, inhibe le cytochrome c oxydase mitochondrial et réduit la consommation de dioxygène par la cellule. Par conséquent, le cyanure entraîne une diminution de l'activité respiratoire à l'origine de multiples atteintes neurologiques, respiratoires et cardio-vasculaires à des degrés divers selon la dose absorbée [1, 2].

Les intoxications aux hétérosides cyanogènes, recensées au Centre Antipoison d'Alger (1991–2011), occupent une part non négligeable des intoxications aux plantes (6 %). Elles touchent, principalement, les jeunes enfants (97 %) en particulier de sexe masculin (73 %). L'évolution est mortelle dans 2,6 % des cas.

Bien qu'il soit difficile, le diagnostic de l'intoxication aiguë aux hétérosides cyanogènes ou à l'ion cyanure est basé sur les circonstances de l'intoxication, l'identification de la plante ou une partie de la plante ingérée avec un faisceau d'arguments anamnestiques, cliniques, biologique et toxicologique. La recherche et le dosage des cyanures constituent une source importante d'informations pour évaluer la toxicité des plantes qui en contiennent. Plusieurs méthodes colorimétriques, chromatographiques, potentiométriques d'identification et de dosage ont été développées.

C'est à ce titre que nous avons initié une étude destinée à déterminer les teneurs en cyanure dans quelques échantillons d'amandes amères et de noyaux d'abricot, recueillis dans différentes régions d'Algérie.

2 Matériel et méthode

2.1 Instrumentation

L'appareil utilisé est un chromatographe GC (Clarus 500, Perkin Elmer Instruments®) avec un module *Head Space* auto sampler (TURBO MATRIX16®) et un détecteur FID

(modèle 8310, Perkin Elmer Instruments). Les données sont exploitées par logiciel TOTALCHROM version 4.0. La colonne utilisée est une colonne RTX 624 Cross bond (6 % cyanopropylphényl/94 % diméthylpolysiloxane) de longueur 30 M, d'un diamètre interne 0,25 mm et d'une épaisseur de film de 1,4 µm. Un broyeur WERKE-IKA® (typeM20), une balance KERN® (ALS220-4N), une seringue GASTIGHT® (Hamilton à 1000 µL) et des flacons « Vials » à 22 mL dotés d'un septum en PTFE Butyl ont été utilisés pour le prétraitement des échantillons.

2.2 Réactifs

L'étalon de cyanure de potassium pur a été obtenu auprès de Merk. L'étalon interne « Acétonitrile » supra pure qualité HPLC provient du laboratoire Panréac. L'étalon d'Amygdaline a été obtenu auprès de Sigma (Pureté > 97 % pour HPLC). Les sels de Phosphate mon sodique et Phosphate di sodique ont été fournis par le laboratoire Prolabo.

2.3 Mise au point de la technique de dosage

Nous avons développé, optimisé et validé dans notre laboratoire une technique de dosage des cyanures dans les conditions reportées dans le tableau I. Les injections séparées de la solution étalon de cyanure de potassium (KCN) à une concentration de 100 mg/L de CN⁻ puis l'étalon interne acétonitrile (ACN) permettent de déterminer les temps de rétention (T_R) des deux substances ($T_{R\text{HCN}} = 3,17$ min, $T_{R\text{ACN}} = 5,31$ min). Le rapport des deux surfaces de l'acide cyanhydrique libéré et de l'acétonitrile (rapport $^{HCN}/_{ACN}$) a permis le dosage.

2.4 Échantillonnage

Treize échantillons d'amandes amères et de noyaux d'abricots de différentes régions du pays ont été collectés durant la période de juin à juillet 2011. Ces échantillons ont été conservés dans leurs coques à température ambiante du laboratoire. Le numéro d'identification à chaque région, la longueur moyenne ($n = 10$) des amandes ainsi que leur poids moyen ($n = 10$) sont présentés dans le tableau II. La figure 1 présente quelques échantillons recueillis.

2.5 Hydrolyse et extraction

2.5.1 Principe

Il existe plusieurs méthodes d'hydrolyse des hétérosides cyanogènes [3]. L'hydrolyse enzymatique peut être effectuée par deux types d'enzymes; enzyme exogène apportée

Tableau I. Conditions analytiques du dosage de l'acide cyanhydrique par HS-CPG-FID.

Compartment	Paramètres	Valeurs
L'espace de tête <i>Head Space</i>	Température de l'aiguille (°C)	80
	Température d'équilibre des flacons (°C)	85
	Température de ligne de transfert (°C)	110
	Temps d'incubation des flacons (min)	10
	Temps de pressurisation (min)	3
Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	Temps d'injection (min)	0,14
	Température du four (°C)	55
	Gaz vecteur	N ₂
	Débit du gaz (psi)	9
	Température de l'injecteur (°C)	160
	Mode Split (mL/min)	10
Detecteur à ionisation de flamme (FID)	Temps d'analyse (min)	6
	Température (°C)	200
	Débit des gaz H ₂ /Air (psi)	45/450
	Atténuation	-5
	Off set (milli Volt)	5

Tableau II. Caractéristiques, teneurs en cyanures et nombre mortel des amandes amères et des noyaux d'abricot.

Échantillons	Provenance		Caractéristique		Taux de cyanure T _{CN} (ppm)	Nombre d'amandes toxiques		
	Commune	Wilaya	Poids moyen (g)	Longueur moyenne (cm)		Absolu	Par poids corporel	
Amandes amères	5	Maghnia	TLEMCEN	1,09	2,11	4146,08	11	1
	6	Sidi Aiche	BEJAIA	0,77	2,11	3521,14	18	2
	7	Ain Oulmène	SETIF	0,78	1,97	3628,38	18	2
	8	Maghnia	TLEMCEN	0,62	1,88	3741,37	21	2
	9	Ngaoues	BATNA	1,15	2,4	3386,9	13	1
	10	Biskra	BISKRA	0,86	2,04	3837,78	15	2
	12	Ferjioua	MILA	1,15	2,22	2828,41	15	2
Noyaux d'abricots	22	Sabra	TLEMCEN	0,51	1,6	2774,56	35	4
	24	BirmouradRais	ALGER	0,49	1,57	556,98	180	18
	26	Messad	DJELFA	0,55	1,87	2112,6	42	4
	27	Ain Oulmène	SETIF	0,61	1,86	382,86	211	21
	31	Tiziouzou	TIZI OUZOU	0,47	1,39	2461,61	43	4
	36	Arris	BATNA	0,65	1,91	914	84	8



Fig. 1. Échantillons d'amandes amères et de noyaux d'abricot recueillis.

comme réactif ou enzyme endogène propre à l'amande. Dans notre travail, nous nous sommes référés à des techniques publiées sur les différentes conditions d'hydrolyse enzymatique sur d'autres plantes [4] et nous avons développé une méthode par l'utilisation de l'enzyme propre à l'amande, c'est-à-dire qu'après broyage des amandes et lésion des tissus végétaux, les hétérosides cyanogènes – principalement l'amygdaline – entrent en contact avec les glucuronidases (émulsine) présentes pendant une durée déterminée.

2.5.2 Protocole

Après broyage des noyaux d'abricot et des amandes amères, une quantité de 500 mg est mise dans le flacon type *Head Space* et 5 mL du tampon phosphate à pH 7 est ajouté. 0,3 mL d'étalon interne d'acétonitrile (ACN) sont ensuite rajoutés. Une incubation à la température ambiante du laboratoire pendant 24 h est nécessaire pour une hydrolyse complète.

Tableau III. Étude du rendement d'hydrolyse enzymatique (CPG).

Concentration d'Amygdaline ajoutée (g/L)	0,25	0,5	1	2
Concentration de cyanure équivalente théorique ajoutée (mg/L)	14,21	28,42	56,8	113,7
Concentration en cyanure totale mesurée (mg/L)	392,2	403,2	438,8	490,8
Concentration de cyanure ajoutée mesurée (mg/L)	14,6	25,6	61,2	113,3
Rendement d'hydrolyse	103 %	90 %	108 %	100 %

3 Résultats

3.1 Validation de la technique

3.1.1 Linéarité

L'intervalle de dosage choisi est de 50–600 mg/L de CN⁻. Après étude de la linéarité sur trois jours, un coefficient de corrélation excellent $R^2 = 0,999$ et une équation moyenne de la droite $y = 0,0073 x - 0,083$ ont été obtenus.

3.1.2 Limite de détection et de quantification

Pour le calcul, l'approche par l'écart type de répétabilité a été utilisée; six solutions de concentration de 200 mg/L ont été analysées. À partir des surfaces obtenues, on détermine la moyenne et l'écart type. La limite de détection est de 4,56 mg/L de CN⁻ et la limite de quantification est de 15,21 mg/L de CN⁻.

3.1.3 Justesse

Afin d'évaluer la justesse de notre technique, le recouvrement et le biais ont été calculés, et les tests statistiques correspondants effectués. Le recouvrement moyen est de 102,9 % ± 7,8 tandis que le biais moyen est de 2,9 % ± 7,8.

3.1.4 Fidélité intermédiaire

La fidélité est évaluée par l'écart type (ou variance) des résultats d'essais pour un ou plusieurs niveaux de concentration permettant de calculer le coefficient de variation. Nous avons choisi la concentration 200 mg/L. Nous les avons analysés 4 fois pour chaque série (J1, J2, J3). On remarque que les coefficients de variation varient entre 0,86 % et 2,05 % selon le jour. Le coefficient de répétabilité est de 1,37 % (<5 %), et le coefficient de la fidélité intermédiaire est de 2,05 (<5 %), ce qui est conforme aux limites fixées.

3.1.5 Exactitude

L'exactitude (Justesse + Fidélité), est égale à 4,95 % (norme < 5 %).

3.2 Étude de l'hydrolyse enzymatique

3.2.1 Répétabilité de l'hydrolyse

La répétabilité de l'hydrolyse enzymatique a été étudiée sur l'échantillon 5 (six hydrolyses) et le coefficient de variation obtenu CV est de 2,61 %. On peut conclure que l'hydrolyse enzymatique est répétable dans les conditions utilisées.

3.2.2 Rendement d'hydrolyse

Le rendement de l'hydrolyse enzymatique a été calculé par l'utilisation de la courbe des ajouts dosés. L'amygdaline préparée à des concentrations croissantes dans le tampon est ajoutée à 500 mg du broyat d'un échantillon (Échantillon 5 sélectionné au hasard). Après l'ajout de 0,3 mL d'étalon interne (ACN) et l'incubation à la température ambiante du laboratoire pendant 24 h nous avons mesuré l'acide cyanhydrique libéré. Le calcul du rendement d'hydrolyse est réalisé comme suit :

Concentration de cyanure équivalente théorique ajoutée (mg/L)	=	Concentration d'amygdaline ajoutée (g/L)	×	$\frac{26 \times 1000}{457,3}$
Concentration de cyanure ajoutée et mesurée (mg/L)	=	Concentration de cyanure totale mesurée (mg/L)	-	Concentration de cyanure théorique de l'échantillon seul ($b = 377,58$ mg/L)
Rendement d'hydrolyse	=	$\frac{C_{CN} \text{ ajoutée et mesurée}}{C_{CN} \text{ équivalente théorique ajoutée}}$	×	100

Le rendement de l'hydrolyse enzymatique est excellent et varie de 90 % à 108 % avec une moyenne de 100 % (tableau III).

3.3 Teneurs en cyanures dans les amandes amères et les noyaux d'abricot

Les échantillons d'amandes amères et de noyaux d'abricot ont été hydrolysés par la technique enzymatique puis analysés par notre technique. Ces échantillons ont été analysés en double puis une moyenne a été calculée. Les teneurs exprimées en ppm de cyanure (T_{CN}) dans les amandes amères et les noyaux d'abricot sont calculées comme suit :

P : La prise d'essai du broyat qui est fixée à 500 mg
 V : Volume de la solution dans les flacons 5 mL ou 0,005 L
 C : Concentration mesurée de cyanure d'hydrogène exprimée en mg/L

$$T_{CN} : \text{teneurs en cyanure (ppm)} = \frac{C \times V}{P} \times 1000.$$

Les teneurs en cyanures dans les amandes amères et les noyaux d'abricot analysés sont montrés dans le tableau II.

3.4 Estimation indicative de la dose létale au regard de nos échantillons

Dans notre travail, nous avons apprécié, à titre indicatif, le nombre d'amandes amères ou de noyaux d'abricot pouvant, potentiellement, entraîner une intoxication mortelle au cyanure.

La dose orale létale signalée pour le cyanure chez les humains est de l'ordre de 0,5 à 3,5 mg/kg de poids corporel ou de 50 à 200 mg [5, 6].

D_{Tox} : dose létale du cyanure prise pour le calcul = 0,5 mg/kg de poids corporel ou 50 mg

P : poids moyen des amandes amères et de noyaux d'abricot (mg)

T_{CN} : teneur en cyanure (ppm)

N : nombre d'amandes amères ou de noyaux d'abricot pouvant être mortels

$$N = \frac{D_{\text{Tox}}}{T_{\text{CN}} \times P} \times 10^6.$$

Les résultats de l'estimation du nombre d'amandes amères ou de noyaux d'abricot toxique sont montrés dans le tableau II.

4 Discussion

Dans notre travail, nous avons choisi et collecté, comme source d'hétérosides cyanogènes, des amandes amères (poids moyen 0,92 g et taille moyenne 2,1 cm) et des noyaux d'abricot (poids moyen 0,6 g et taille moyenne = 1,73 cm) en raison des intoxications accidentelles observés chez les enfants en Algérie. Ces plantes contiennent comme hétéroside cyanogène principal l'Amygdaline. L'analyse toxicologique a visé la détermination des teneurs en cyanure.

L'hydrolyse enzymatique, que nous avons trouvée répétable, donne de bons rendements aussi bien pour l'étalon d'amygdaline que pour les échantillons.

Le taux de cyanure d'hydrogène libéré par les amandes amères ou par les noyaux d'abricot varie de 2 828 ppm à 4 146 ppm avec une moyenne de 3 584 ppm pour les amandes amères. Pour les noyaux d'abricot, les taux étaient de 383 ppm à 2 774 ppm avec une moyenne de 1 826 ppm.

Le taux de cyanure d'hydrogène libéré par les amandes amères ou par les noyaux d'abricot varie d'une région à une autre à travers le territoire algérien :

- Pour les amandes amères, la valeur la plus élevée était de 4 146,08 ppm, trouvée à Tlemcen (Maghnia) tandis que la valeur la plus faible était de 2 828 ppm, trouvée à Mila (Ferjioua).

- Pour les noyaux d'abricot, la valeur la plus élevée était de 2 774,56 ppm trouvée à Tlemcen (Sabra) et la valeur la plus faible était de 382,86 trouvée à Setif (Ain Oulmène).

Le nombre d'amandes amères ou de noyaux d'abricot pouvant être responsable d'une intoxication mortelle par le cyanure libéré varie de 11 à 21 amandes amères (deux amandes par kilogramme de poids corporel) et de 35 à 211 noyaux d'abricot (dix amandes par kilogramme de poids corporel) dans les différentes régions.

5 Conclusion

Ce travail réalisé sur treize échantillons provenant de différentes régions est appelé à être complété par un échantillonnage plus étendu et diversifié couvrant le territoire algérien. De même qu'il convient d'étudier les facteurs d'influence (conditions climatiques, génotype...), afin d'aboutir à une meilleure estimation des teneurs en cyanures dans ces produits. La technique chromatographique d'identification et de dosage sert de référence ; cependant, il est recommandé la mise au point des techniques colorimétriques et potentiométriques qui se prêtent aux conditions routinières et de l'urgence.

Enfin, il est important de rappeler que l'analyse en milieu biologique (sang, urines...) des hétérosides, du cyanure, et de ses métabolites (thiocyanates, l'acide 2 amino thiazoline-4-carboxylique...), aux côtés du bilan biologique (glycémie, lactate...), est indispensable dans le diagnostic, le pronostic et la prise en charge thérapeutique de l'intoxication.

Références

1. Pettersen JC, Cohen SD. The effects of cyanide on brain mitochondrial cytochrome oxidase and respiratory activities. *J Appl Toxicol.* 1993; 13(1): 9–14.
2. Benaissa ML, Hantston P, Laforge M, Borron S, Baud F. Cyanure et toxiques cyanogéniques. *Encyclopédie Médico-chirurgicale, Toxicologie-Pathologie professionnelle.* Paris : Elsevier, 1999. 7 pages.
3. Seigler DS. Isolation and characterization of naturally occurring cyanogenic compounds. *Photochemistry.* 1975; 14: 9–29.
4. RezaulHaque M, Howard Bradbury J. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chemistry.* 2002: 107–114.
5. EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing Aids and Materials in Contact with food (AFC) on hydrocyanic acid in flavourings and other food ingredients with flavouring properties. Question no EFSA-Q-2003-0145. *EFSA Journal.* 2004; 105.
6. Gosselin R, Hodge H, Smith R, Gleason M. *Clinical Toxicology of Commercial Products.*