

## Recherche des aflatoxines B<sub>1</sub> et M<sub>1</sub> dans les fromages de type « Camembert »

par

B. CORBION et J. M. FREMY\*

### INTRODUCTION

La présence de mycotoxines dans les denrées alimentaires d'origine végétale ou d'origine animale, pose un grave problème de santé publique ; plus particulièrement, la présence d'aflatoxines dans les produits laitiers, du fait de leur large consommation, doit retenir l'attention des nutritionnistes et des toxicologues.

Nous savons en effet que des spores d'*Aspergillus flavus* peuvent être rencontrées, en très faible quantité cependant, dans la mycoflore des fromages [1] et que la production d'aflatoxine B<sub>1</sub> a été réalisée expérimentalement sur certains types de fromages [2, 5].

Kiermeier a montré que 1,5 p. 100 de l'aflatoxine B<sub>1</sub> ingérée par le bétail laitier lors de la consommation de tourteaux contaminés, peut être éliminée dans le lait sous forme d'aflatoxine M<sub>1</sub> [3]. Du fait que tous les spécialistes s'accordent pour affirmer que la toxicité de l'aflatoxine M<sub>1</sub> est analogue à celle de l'aflatoxine B<sub>1</sub>, il est particulièrement intéressant de suivre le devenir de cette substance.

Tenant compte des considérations précédentes nous avons réalisé une enquête sur les fromages à pâte molle de type « Camembert » pour vérifier le niveau éventuel de contamination en aflatoxines de ces produits.

Cette étude est limitée à ce seul type de fromage mais elle a été étendue à un assez vaste territoire, ce qui paraissait souhaitable si l'on retient que les études précédentes ayant le même objet n'avaient porté que sur un faible nombre d'échantillons en provenance d'une zone bien limitée géographiquement.

---

\* Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires.

Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire - 75015 Paris (Directeur : J. Pantaléon).

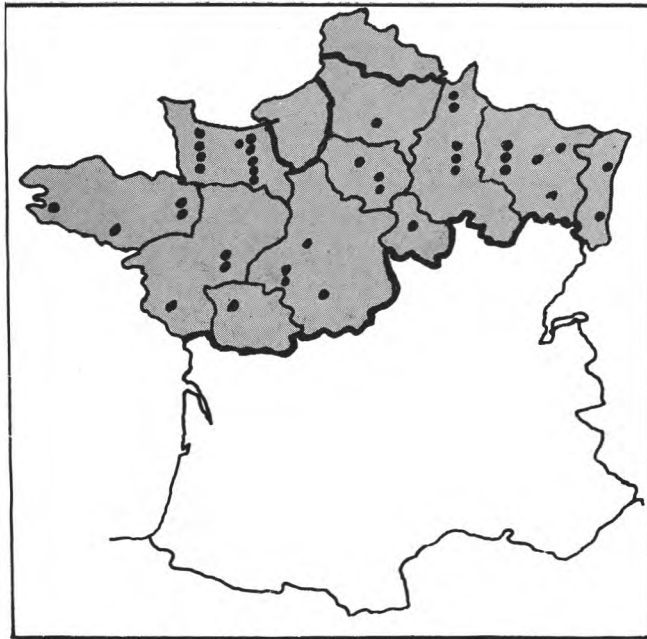


fig.1

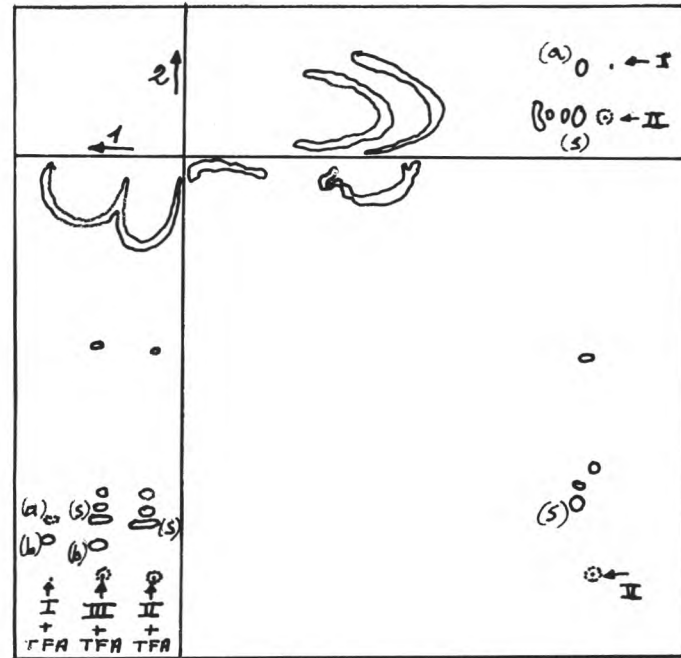


fig.2

Figure 1 : Zone soumise à l'étude et différents lieux de prélèvements.

Figure 2\* : Test de confirmation par réaction à l'ac. trifluoroacétique (T.F.A.), seule l'aflatoxine M<sub>1</sub> (tache a) répond au test par formation du produit dérivé (b). Le métabolite suspect du fromage (tache s) est insensible au test.

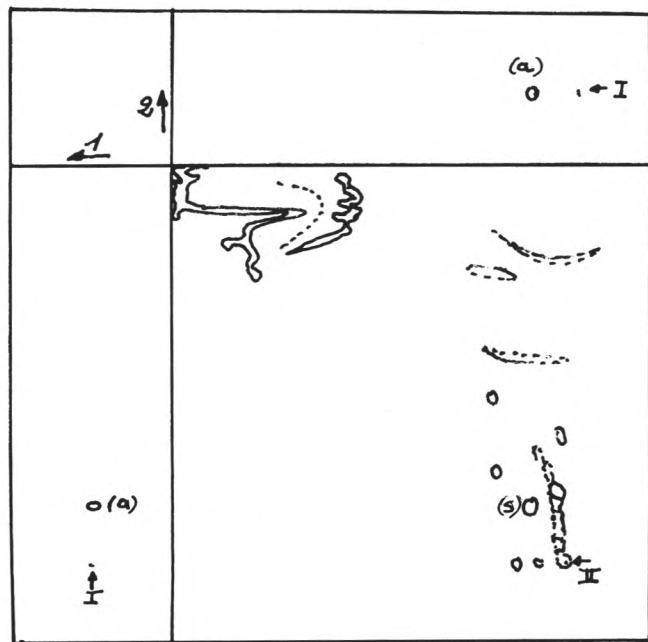


fig. 3

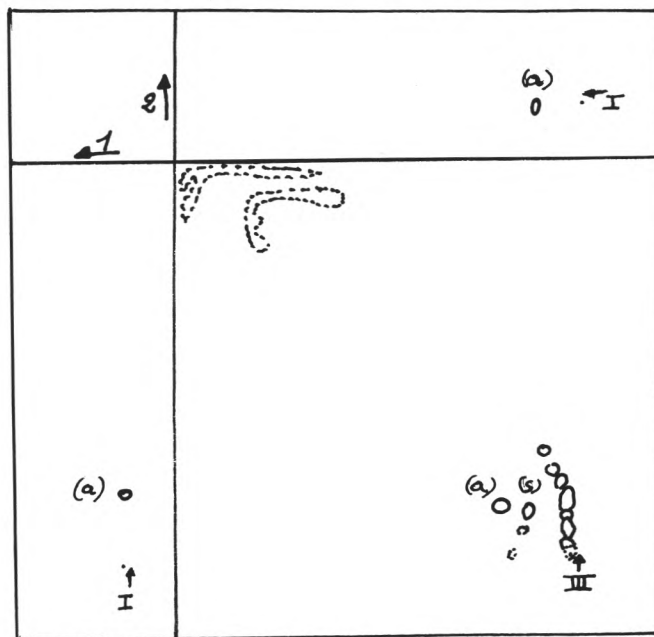


fig. 4

Figures 3 et 4\* : Test de confirmation par application du standard interne : dans la figure 3, le métabolite suspect du fromage (tache s) semble correspondre aux standards de  $M_1$  (tache a). Dans la figure 4, le doute est levé du fait de la non-concordance des taches (a) et (s).

\* Schémas réalisés à partir des plaques de C.C.M. observées sous U.V. longs (366 nm) :

- I. Dépôt des standards d'aflatoxine  $M_1$ .
- II. Dépôt de l'extrait du fromage.
- III. Dépôt de l'extrait du fromage avec standard interne d'aflatoxine  $M_1$ .

## MATERIEL - METHODES

L'enquête porte sur une centaine d'échantillons de fromages de type commercial prélevés dans quarante établissements laitiers de la moitié nord de la France, pendant la période hivernale 1976 (fig. 1).

Les échantillons ont été conservés à + 4° C sous feuille d'aluminium, les analyses ont été réalisées sur une période de 6 mois. La prise d'essai, comprenant la pâte et la croûte du fromage, est de 50 g. Les techniques expérimentées sont celles de Stubblefield [7], de Kiermeier [3] et de Shih et Marth [5] légèrement modifiée (voir annexe).

Tous les échantillons ont été analysés par cette dernière technique mais les trois méthodes ont été appliquées à l'analyse de quelques échantillons afin de les comparer entre elles et principalement dans le but de mettre en œuvre la technique de Kiermeier publiée au cours de l'année 1976 [4].

La séparation est réalisée en chromatographie en couche mince (C.C.M.) sur plaque Merck G<sub>25</sub> par la technique bidimensionnelle avec les solvants suivants :

- sens de migration 1 : chloroforme/acétone : 90/10 ;
- sens de migration 2 : eau/méthanol/éther : 1/3/96.

Les tests de présomption par pulvérisation à l'acide sulfurique 50 p. 100, sont effectués systématiquement : une réaction positive se traduit au niveau des taches d'aflatoxine B<sub>1</sub> et M<sub>1</sub> par un changement de coloration qui peut s'observer sous éclairage U.V. (366 nm). Les tests de confirmation par réaction à l'acide trifluoroacétique (T.F.A.) sont réalisés pour les cas suspects : en présence de T.F.A., on assiste à la formation du produit dérivé de l'aflatoxine M<sub>1</sub> (forme hémiacétal) ayant un R<sub>f</sub> inférieur au produit initial.

Enfin, un autre mode de confirmation consiste à effectuer un dépôt avec standard interne.

Les solutions étalons sont préparées à 1 µg/ml pour l'aflatoxine B<sub>1</sub> à partir de standard du commerce et à 2 µg/ml pour l'aflatoxine M<sub>1</sub> obtenue après purifications successives d'un extrait chloroformique d'urines de singe nourri avec des aliments contaminés en aflatoxine B<sub>1</sub>.

Dans le cas où les différents tests précités confirment la présence d'aflatoxine, le dosage quantitatif peut être réalisé au fluorodensitomètre « Vernon ».

## RESULTATS

Afin de pouvoir interpréter convenablement nos résultats analytiques, nous avons au préalable déterminé pour la méthode de

Shih et Marth, le rendement et la limite de détection de l'analyse à l'aide d'ajouts effectués dans un échantillon de l'ordre de 10 µg d'aflatoxine B<sub>1</sub> et de 20 µg d'aflatoxine M<sub>1</sub>.

L'enquête ainsi présentée donne les résultats suivants : sur cent échantillons examinés, l'aflatoxine B<sub>1</sub> n'a pas été détectée ; l'aflatoxine M<sub>1</sub> n'a été décelée qu'une fois à l'état de traces.

Aflatoxines	Rendement	Limite de détection
B <sub>1</sub>	80 p. 100	1,5 ppb
M <sub>1</sub>	65 p. 100	2,5 ppb

## DISCUSSION

En ce qui concerne le rendement des méthodes d'extraction : les trois méthodes paraissent donner des résultats très voisins, toutefois ceux obtenus avec la méthode Stubblefield se sont révélés être les plus faibles.

En ce qui concerne la commodité d'exécution, la nouvelle méthode de Kiermeier s'avère à la fois simple et rapide d'exécution, alors que les deux autres présentent une exécution longue et relativement complexe.

En conclusion, la recherche de l'aflatoxine B<sub>1</sub> est relativement aisée et ne présente aucune difficulté d'interprétation. Par contre, la détection de l'aflatoxine M<sub>1</sub> s'avère plus délicate en raison de la présence de composés interférant. En effet, lors de l'analyse, on a pu constater qu'environ 30 p. 100 des échantillons ont présenté une tache analogue à l'aflatoxine M<sub>1</sub>, c'est-à-dire de même R<sub>f</sub>, de même couleur sous U.V. avant et après pulvérisation à l'acide sulfurique. Néanmoins les tests de confirmation rassemblant la mise en place du standard interne (fig. 3 et 4) et la réaction au T.F.A. (fig. 2) ont permis de lever le doute pour ces échantillons à l'exception d'un seul qui présentait donc des traces d'aflatoxine M<sub>1</sub>. Insistons sur le fait qu'une grande prudence est donc de rigueur lors de l'interprétation des résultats.

## CONCLUSION

En dépit de l'aspect plutôt négatif de l'enquête que nous avons menée, nous considérons cependant que le problème de la présence

éventuelle d'aflatoxines et plus particulièrement de l'aflatoxine M<sub>1</sub> dans les produits laitiers doit encore retenir toute l'attention des analystes et des hygiénistes.

### Résumé

Une enquête portant sur une centaine d'échantillons de fromages de type commercial prélevés dans quarante établissements laitiers et visant à déterminer le niveau de contamination de ces produits par les aflatoxines a été réalisée. Les analyses dont on a calculé au préalable le rendement et la limite de détection pour ce type d'aliment ont donné les résultats suivants : l'aflatoxine B<sub>1</sub> n'a jamais été détectée tandis que l'aflatoxine M<sub>1</sub> n'a été décelée que dans un seul échantillon et seulement à l'état de traces. La recherche de l'aflatoxine B<sub>1</sub> est relativement facile, par contre la détection de l'aflatoxine M<sub>1</sub> est rendue plus délicate du fait de la présence de composés interférant avec cette dernière.

### Summary

This study concerns 40 dairy factories from which 100 samples of commercial type cheese were taken. An estimation of the yield and detection limits was calculated for this type cheese. The investigation gives the following results: aflatoxin B<sub>1</sub> was not detected, aflatoxin M<sub>1</sub> was only detected in one sample and as a trace element. The determination of aflatoxin B<sub>1</sub> is relatively easy, however the detection of aflatoxin M<sub>1</sub> is rendered more difficult by the presence of substances interfering with it.

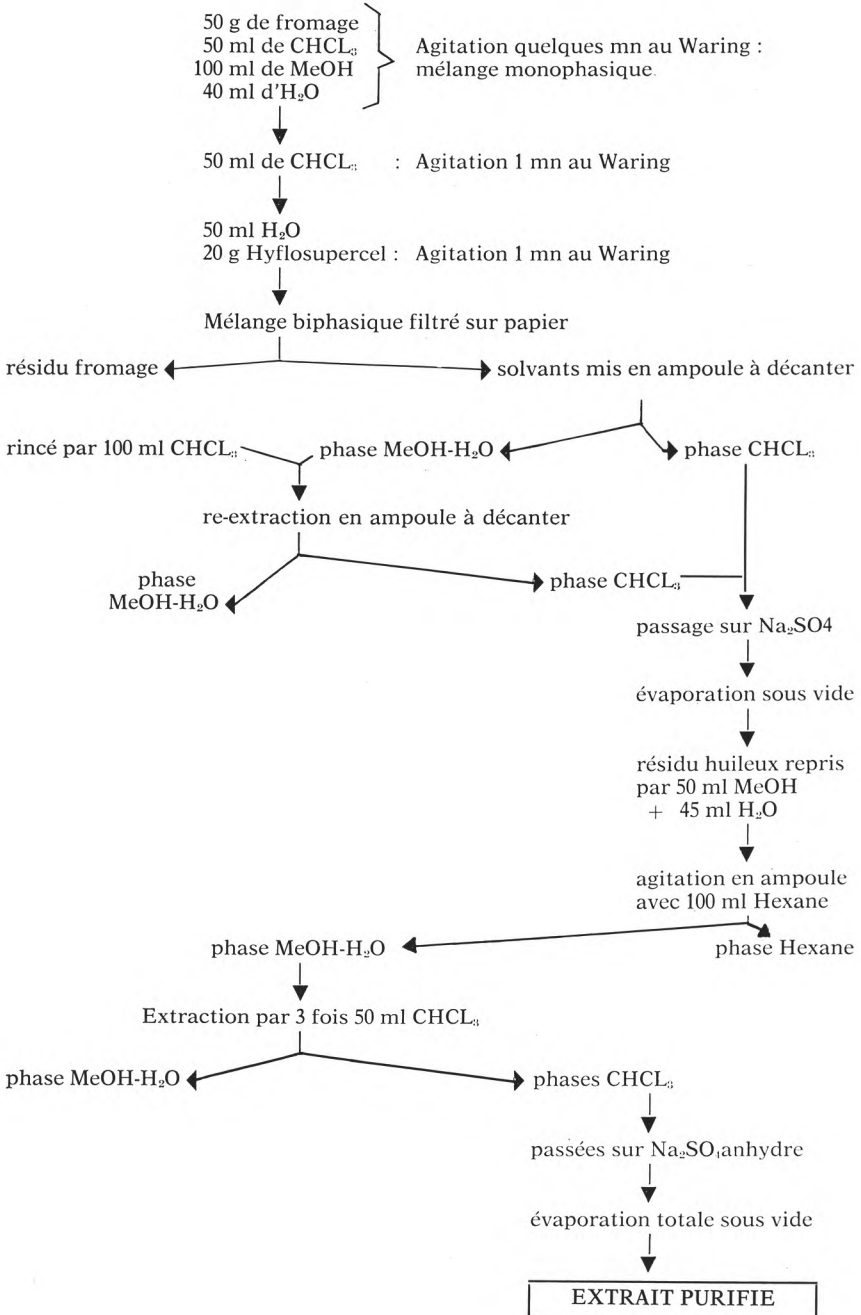
### Zusammenfassung

Hundert Proben aus Käsen in vierzig Geschäften von Milchprodukten wurden gesammelt. Die künstliche Verseuchung einer Probe bestimmt einerseits die Leistung andererseits die Nachweisgrenze. Also zugeführte untersuchung zeigt nach dieser Art da B hundert analysierten Proben Keine Aflatoxine B<sub>1</sub> enthalten, und dabnureine Probe Aflatoxinspuren M<sub>1</sub> enthält. Die Untersuchung der Aflatoxin B<sub>1</sub> ist ziemlichleicht, und für Aflatoxin M<sub>1</sub> ist Die Nachweis wegen vielen Interferenzen Schwierig.

*Reçu pour publication en novembre 1977.*

## Annexe 1

## TECHNIQUE SHIH ET MARTH MODIFIEE



### Bibliographie

- [1] BULLERMAN (L. B.) (1976). — Moisissures productrices de mycotoxines dans le fromage suisse. *J. of Food Sci.*, 41, 26-28.
  - [2] KIERMEIER (F.), GROLL (D.) (1976). — Zur Aflatoxin B<sub>1</sub> - Bildung in Käsen. *Z. Lebensm. Unters Forsch*, 160, 337-344.
  - [3] KIERMEIER (F.) (1973). — Über die Aflatoxin M<sub>1</sub> aus scheidung in Kuhmilch Abhängigkeit von der aufgenommenen Aflatoxin B<sub>1</sub> Menge. *Michshwissenschaft*, 28, 683-685.
  - [4] KIERMEIER (F.), WEISS (G.) (1976). — Zur untersuchung von Milch und Milchprodukten ouf die Aflatoxin B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> G<sub>1</sub> G<sub>2</sub> M<sub>1</sub>. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 160, 337-344.
  - [5] SHIH (C. N.), MARTH (E. H.) (1972). — Experimental production of aflatoxin in brick cheese. *J. of Milk and Food Techn.*, 35, 585.
  - [6] SHIH (C. N.), MARTH (E. H.) (1971). — A rapide recovery of aflatoxins from cheese and other foods. *J. of Milk and Food Tech.*, 34 (3), 119-123.
  - [7] STUBBLEFIELD (R. D.), SHANNON (G. M.) (1974). — Collaborative Study of Methods for determination and chemical confirmation of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Dairy products. *J. AOAC*, 57 (4), 852-857.
-