

Méthode de dosage de l'aflatoxine M dans le lait et les produits laitiers

par

P. LAFONT, M. SIRIWARDANA, J. JACQUET
M. GAILLARDIN et J. SARFATI*

INTRODUCTION

La présence d'aflatoxine M dans le lait et les produits laitiers pose des problèmes de santé publique à propos desquels l'inquiétude des hygiénistes ne cesse de croître. Aussi, des normes précisant des teneurs maximales permises ont-elles été données en certains pays, ou sont en préparation dans d'autres. Pour les nations dont les services sanitaires ont adopté zéro comme tolérance, il est évident qu'ils s'en remettent, en fait, à la limite de sensibilité des analyses qui sont effectuées.

De toutes façons, dans tous les cas, toute action de prévention et de contrôle repose sur l'existence d'une bonne méthode de recherche et de dosage de ces mycotoxines.

Or, le dosage des difuranocoumarines M dans le lait et ses dérivés se montre plus délicat que celui des formes B et G dans d'autres denrées. On a besoin d'une finesse plus grande, car il faut apprécier de façon sûre des concentrations beaucoup plus faibles ; les extraits de produits laitiers contiennent fréquemment des substances qui viennent former des artefacts sur les chromatogrammes, si on n'a pas réussi à s'en débarrasser auparavant. Il y a intérêt, enfin, à ce que la méthode soit polyvalente, et puisse s'appliquer aussi bien à tous les produits laitiers, même ceux qui sont acides, qu'au lait lui-même.

Après de nombreux essais, qui ont porté sur la mise au point de chacun des temps de l'analyse, nous proposons la méthode ci-dessous.

* I.N.S.E.R.M., Service de Microbiologie Appliquée à l'Alimentation et à la Nutrition, 44, chemin de Ronde - 78110 Le Vésinet.

I. MATERIELS ET PRODUITS NECESSAIRES

A. Matériel

Ampoules à décanter de 500 ml.

Colonne à chromatographie à robinet (diamètre intérieur 18 m/m).

Evaporateur rotatif avec condensateur à neige carbonique, ballon d'évaporation de 1 000 ml et fiole conique de 250 ml.

Seringues Hamilton ou Terumo ou encore micropipettes micro-caps (Drummond Scientific C°).

Plaques de chromatographie Merck Si 60 (5721).

Papiers filtre Whatmann n° 1.

Lampe Philipps HPW 125.

Photodensitomètre PHI 5, Sté A^{me} Vernon, Paris.

B. Produits et réactifs

Alumine basique, Aluminoxid 90, aktiv-basisch Merck 70-230 mesh.

Eau distillée en appareil de verre.

Celite 545.

Sulfate de sodium RPE anhydre.

Isopropanol, méthanol, chloroforme, toluène, éther éthylique, acétone, (qualité Merck pour analyses, Carlo-Erba RPE, ou similaire).

Epichlorhydrine du glycérol pure pour analyses.

Aflatoxines M de référence *crystallisées* Serva-Feinbiochem Heidelberg.

II. TECHNIQUE ANALYTIQUE

A. Préparations initiales

1° COLONNE A CHROMATOGRAPHIE (à préparer soi-même et avec le plus grand soin, aucune colonne disponible actuellement dans le commerce ne donnant, à notre connaissance, de résultats satisfaisants). On introduit successivement dans la colonne, 10 g de sulfate de sodium anhydre pulvérulent, un disque de papier filtre, 1 g d'alumine basique. On remplit partiellement la colonne avec du toluène ; par une légère agitation avec une tige de verre on élimine l'air contenu dans l'alumine. On superpose, alors, à la couche d'alumine un disque de papier-filtre, puis 2 g de silice en suspension dans le toluène. Le matériel introduit dans la colonne est tassé en exerçant une pression avec de l'azote. Un disque de papier-filtre est déposé sur la silice, puis recouvert de 2 g de sulfate de sodium anhydre.

2° LIQUIDE D'ÉLUTION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE (doit être préparé 2 h avant son emploi). Mélanger *en volumes* les quantités suivantes :

— éther éthylique	90	— méthanol	3
— épichlorhydrine	6	— eau	1

3° PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR L'ANALYSE.

50 ml de *lait* sont portés au bain-marie bouillant pendant 5 min, puis refroidis à la température du laboratoire.

Les *laits fermentés*, comme le yaourt, seront préparés comme les laits liquides.

S'il s'agit de *poudre de lait*, on pèse 10 g que l'on mettra en solution dans 30 ml d'eau distillée.

Pour les *fromages*, peser 20 g que l'on broiera dans 10 ml d'eau dans un flacon de 250 ml.

B. Description de la méthode

1. EXTRACTION DES AFLATOXINES. Introduire l'échantillon tel qu'il a été préparé au § II A 3° dans une ampoule à décanter de 500 ml*. Y verser ensuite *lentement et en agitant* 60 ml d'isopropanol par apports *successifs* de quelques millilitres. Le mélange est, alors, secoué vigoureusement pendant 1 min. On ajoute, ensuite, 50 ml de méthanol, 10 g de célite, 250 ml de chloroforme, le mélange étant soumis à une agitation violente de 1 min après l'introduction de chacun de ces produits. Après un repos de 5 à 10 min, la phase liquide inférieure, limpide, est soutirée, filtrée sur papier supportant 10 g de sulfate de sodium anhydre. On prélève 300 ml du filtrat. On les concentre dans un appareil rotatif d'évaporation sous vide, muni d'un condenseur à neige carbonique, la température du bain-marie étant réglée à 45° C. Lorsqu'il reste environ 5 ml de liquide (il s'agit alors d'un mélange riche en isopropanol), on introduit dans le ballon d'évaporation 30 ml de chloroforme et on poursuit la concentration jusqu'à environ 0,5 ml. Ce résidu est additionné de 30 ml de toluène. On concentre à nouveau à 0,5 ml ; on introduit encore une fois 30 ml de toluène dans le ballon d'évaporation et on concentre à 5 ml.

2° PURIFICATION DE L'EXTRAIT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE. L'extrait obtenu au § précédent II B 1° est versé dans la colonne à chromatographie préparée selon le mode précisé au § II A 1° ; on lave le ballon d'extraction avec 15 ml de toluène que l'on transporte dans la même colonne. On procède ensuite à des éluions successives par 50 ml de toluène, par 50 ml de chloroforme et par 100 ml du mélange chloroforme-acétone (4/1, v/v).

* Dans le cas du fromage, c'est dans le flacon qui a servi au broyage que se font les adjonctions d'isopropanol, méthanol, célite et chloroforme, conformément aux indications du § II B 1. Après repos, on récupère la phase *supérieure* non aqueuse qui est filtrée (voir 10^e ligne du paragraphe) ; le reste des manipulations sans changement.

L'éluat obtenu avec cette dernière phase est concentré à moins de 1 ml dans un appareil rotatif d'évaporation fonctionnant dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (B 1°). Le résidu et le produit de lavage de la fiole d'évaporation par 1 ml de chloroforme sont transportés dans un tube à hémolyse. Le solvant est évaporé sous courant d'azote (le tube étant placé dans un bain-marie à 45° C) jusqu'à 100 µl.

3° DOSAGE DES AFLATOXINES EN CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE. On dépose sur gel de silice activé (110° C/20 min) :

- 20 µl de l'extrait ;
- des volumes égaux de solutions d'aflatoxine M1 contenant 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 et 0,7 ng de la toxine ;
- en un même point, 10 µl de l'extrait et 0,5 ng d'aflatoxine M1 (témoin interne). On a donc disposé 9 points de dépôt.

Le développement est réalisé sur 12 cm environ, en cuve à atmosphère non saturée, en utilisant la phase éluante préparée selon le § II A 2°. Le chromatogramme est examiné sous irradiation ultra-violette.

La fluorescence de la difuranocoumarine M est bleue violacée. Son R_f est $2,4 \pm 0,2$.

Si l'intensité de la fluorescence de l'aflatoxine M1 contenue dans les 20 µl déposés d'extrait excède celle du témoin le plus concentré (0,7 ng), on recommence l'opération en faisant des dilutions de l'extrait. Si aucune fluorescence n'est décelable au niveau de l'extrait, on procède à un nouvel essai. Pour les faibles concentrations d'aflatoxine M1 dans l'échantillon, le dosage ne peut être réalisé que par comparaison visuelle de l'intensité de fluorescence des spots. Pour de plus fortes concentrations, supérieures à 100 µg/k, on peut utiliser un photodensitomètre*.

4° MÉTHODE DE CONFIRMATION

La présence d'aflatoxine M1 est confirmée, sur les chromatographies en couche mince, par la méthode de Przybylski [4] modifiée selon van Egmond *et al.* [7] : traitement de chacune des taches fluorescentes d'aflatoxine témoin et des taches de R_f analogues par 5 µl du mélange hexane-acide trifluoroacétique (4/1 ; v/v) (chauffage 5 min à 75° C après avoir recouvert avec une plaque de verre) nouveau développement chromatographique.

5° CALCUL DES RÉSULTATS

Il faut se rappeler que toute l'aflatoxine se trouve pratiquement, après décantation (cf. § B 1°) dans les solvants, l'eau n'en retenant que des traces infimes. Du fait que dans les temps ultérieurs de

* Il est nécessaire de s'assurer, grâce à des manipulations témoins, de l'absence de contamination accidentelle du matériel utilisé (verrerie, micro-seringues).

l'analyse, on n'emploie, pour des raisons de facilité de soutirage, qu'une partie aliquote, il y a lieu de rapporter les valeurs obtenues en chromatographie sur couche mince à l'ensemble de ce qui était dissous dans la phase solvants organiques.

La quantité présente dans les 50 ml de lait de consommation ou de lait fermenté de départ sera donc exprimée par :

$$\text{quantité estimée sur le chromatogramme} \times \frac{345}{300} (= 1,15)$$

Pour les laits en poudre, pour les 10 g de départ, il s'agira de :

$$\text{quantité lue sur chromatogramme} \times \frac{360}{300} (= 1,2)$$

Le même coefficient de 1,2 est appliqué pour les 20 g de fromage mis en œuvre.

III. DISCUSSION

L'originalité de la méthode repose sur plusieurs points. Il y a, d'abord, la réalisation d'une extraction de l'aflatoxine par trois solvants différents absolument nécessaire lorsque l'on a affaire à de très petites quantités, ce qui est le cas avec la difuranocoumarine M, quand elle est présente dans le lait et les produits laitiers. D'une façon générale, l'analyste doit toujours avoir présente à l'esprit l'idée que, dans ce type de recherches, on ne dose jamais que ce que l'on a réussi à sortir du produit initial. On ne saurait donc apporter trop d'attention à ce premier temps du travail.

Il y a, ensuite, l'emploi de deux adsorbants dans la colonne de purification. La bonne préparation de celle-ci comme nous l'avons déjà signalé, est essentielle pour la réussite de l'ensemble.

Il y a, enfin, l'utilisation d'un nouveau liquide d'éluion donnant d'excellents résultats dans la chromatographie sur couche mince.

Une des clefs du succès du dosage des aflatoxines M dans le lait nous paraît être le choix, lors de l'extraction, d'une technique et de solvants qui ne dégradent pas et ne précipitent pas les protéines.

Le grand avantage de la méthode que nous proposons est, tout d'abord, sa polyvalence : d'une part, elle est applicable à la recherche et au dosage d'aflatoxines autres que M1 et M2 ; d'autre part, elle permet une analyse, non seulement, du lait, mais aussi, de différents produits laitiers, dont les fromages et les laits fermentés.

La sensibilité de la méthode est grande : on reconnaît la présence de quelques nanogrammes d'aflatoxine M1 dans 1 kg de lait liquide, qu'il s'agisse de lait en nature ou de lait reconstitué à partir de poudre, (2,3 à 4,6 ng/kg suivant les échantillons) et on apprécie de façon sûre des concentrations de la mycotoxine inférieures à 10 ng/kg.

Fiabilité de la méthode

Echantillons	Nombre d'essais sur le même échantillon	Aflatoxine M1 moyenne (ng/kg)	Coefficient de variation (p. 100)
Laits secs			
a	6	11 033	2,8
b	8	4 975	2,7
c	5	2 210	3,3
d	6	104	10,7
e	8	75	12,2
			moyenne : 6,34
Laits liquides			
1	6	510	3,0
2	8	372	2,5
3	6	122	5,3
4	8	71	6,8
5	8	44	13,3
			moyenne : 6,18

La fiabilité des dosages ressort du tableau ci-dessus, et s'avère excellente, surtout pour des analyses de ce genre. Dans des séries d'essais comparatifs, portant sur des laits naturellement contaminés, la méthode ici décrite a fourni des résultats meilleurs, soit en matière de sensibilité, soit en matière de fiabilité, que ceux obtenus en appliquant d'autres méthodes, dont celle de Pons *et al.* modifiée [3, 2], celle de Gauch *et al.* [1], celle de Tuinstra et Brongeeest [6], celle de Stubblefield [5].

Résumé

La méthode de dosage des aflatoxines M que nous décrivons est originale par l'emploi d'une colonne de chromatographie de purification contenant deux adsorbants, la réalisation d'une triple extraction des flavacoumarines, l'utilisation d'un nouveau liquide d'éluion en chromatographie sur couche mince de silice. Elle se recommande par sa polyvalence (elle est applicable au dosage des différentes aflatoxines), ses possibilités d'utilisation dans l'analyse non seulement du lait mais aussi d'autres produits laitiers, sa fidélité (coefficient moyen de variation de 6,26 p. 100), sa sensibilité (moins de 10 ng/kg de lait en nature ou reconstitué à partir de poudre).

Mots clés : Lait - Fromages - Aflatoxines - Aflatoxines M1.

Summary

AFLATOXINS M ASSAY IN MILK AND DAIRY PRODUCTS

The assay method of aflatoxins M here described is real new one by using two adsorbents in the cleaning chromatographic column, by using a triple extraction of the mycotoxins and by using also a new eluent for the thin layer chromatography. It is particularly interesting by its multiple applications (assays of several aflatoxins, use for the milk and also for other dairy products), by a high grade of reliability (mean standard error: 6,26 p.100) and by its sensibility (less than 10 ng/kg of liquid milk).

Key words: Milk - Dairy products - Aflatoxins - Aflatoxins M1.

Bibliographie

- [1] GAUCH (R.), LENENBERGER (U.) and BAUMGARTNER (E.) (1979). — Rapid and simple determination of aflatoxin M1 in milk in the low parts per 10¹² range. *J. of Chromatog.*, 178, 543-549.
 - [2] LAFONT (P.), LAFONT (J.), MOUSSET (S.) et FRAYSSINET (C.) (1980). — Etude de la contamination du lait de vache lors de l'ingestion de faibles quantités d'aflatoxine. *Ann. Nutr. Alim.*, 34, 699-708.
 - [3] PONS (W.), CUCULLU (A.) and LEE (L.) (1973). — Method for the determination of aflatoxin M1 in fluid milk and milk products. *J.A.O.A.C.*, 56, 1431-1436.
 - [4] PRZYBYLSKI (W.) (1975). — Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *J.A.O.A.C.*, 58, 163-164.
 - [5] STUBBLEFIELD (R.) (1979). — The rapid determination of aflatoxin M1 in dairy products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 800-802.
 - [6] TUINSTRAL (L.) and BRONGSEEST (J.) (1975). — Determination of aflatoxin M1 in milk at the parts per trillion level. *J. of Chromatog.*, 111, 448-451.
 - [7] VAN EGMOND (H.), PAULSCH (W.) and SHULLER (P.) (1978). — Confirmatory test for aflatoxin M1 in a thin layer plate. *J.A.O.A.C.*, 61, 809-812.
-