Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 72 (1981)

Heft: 4

Artikel: Recherche des aflatoxines et dosage de l'aflatoxine M dans les produits laitiers = Research of aflatoxins and determination of aflatoxin M in milk products

Autor: Tripet, F.-Y. / Riva, C. / Vogel, J.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-984620

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 09.12.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Trav. chim. aliment. hyg. 72, 367–379 (1981)
Présenté le 5 juin 1981. Accepté le 28 juillet 1981

Recherche des aflatoxines et dosage de l'aflatoxine M_1 dans les produits laitiers

Research of Aflatoxins and Determination of Aflatoxin M_1 in Milk Products

F.-Y. Tripet, C. Riva et *J. Vogel*
Laboratoire cantonal de chimie, Genève

Introduction

Le grand pouvoir cancérigène des aflatoxines est maintenant bien connu (1). La présence dans les produits laitiers d'aflatoxines M_1 et M_2, métabolites des aflatoxines B_1 et B_2 ingérées par le bétail avec le fourrage, doit être sévèrement limitée et contrôlée (2).

En Suisse, les teneurs maximales d'aflatoxine M_1 ont été fixées à 500 ppt dans les fromages (3), à 50 ppt dans le lait livré pour la consommation, l'industrie ou la fromagerie et à 10 ppt pour les laits mélangés destinés, à l'état frais ou transformé, à l'alimentation des nourrissons (4). (1 ppt = 1 partie par trillion = 1 ng/kg.)

N'ayant pas disposé à l'époque d'appareil de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), nous nous sommes efforcés d'affiner des méthodes connues par chromatographie sur couche mince (CCM) et fluorodensitométrie pour atteindre une limite de détection inférieure à 10 ppt.

Pons (5) a décrit une méthode d'extraction, de purification sur colonne de cellulose et de CCM permettant de doser 0,1 ppb de toxine. Améliorée par *Stubblefield* (6), elle a été adoptée comme méthode officielle par l'AOAC (7). Suffisamment sensible pour la norme américaine de 0,5 ppb fixée par la FDA, elle l'est insuffisamment pour les normes suisses.

Tuinstra (8), après purification sur une colonne de gel de silice, dose 4 ppt de toxine dans du lait grâce à une CCM bidimensionnelle. *Kiermeier* (9) décrit une méthode applicable à toutes les denrées alimentaires contaminées au niveau du ppb. *Corbion* (10), après extraction selon *Kiermeier* (9), dose l'aflatoxine M_1 dans des fromages de type «Camembert» par fluorodensitométrie après CCM en 2 dimensions, mais avec une limite de détection de 2,5 ppb. Plus récemment, *Frémy* (11) a amélioré cette méthode en l'appliquant aux poudres de lactosérum avec une limite de détection de 0,5 ppb.

Récemment *Gauch* (12) atteint une limite de détection de 5 ppt pour le lait et le lait en poudre à l'aide d'une purification sur colonne d'Extrelut et 2 ou 3 migrations sur couche mince dans la même direction.

Stubblefield (13) après une extraction simple et purification sur une colonne de silice retrouve 80% d'aflatoxine M_1 au niveau de contamination de 0,5 ppb avec une limite de détection de 0,1 ppb. Une étude internationale (14), portant sur du lait en poudre contaminé à 1 ppb et des fromages contaminés à 0,4—0,6 et 2,0 ppb, a permis de remédier à quelques problèmes d'émulsion et d'ordre d'élution des colonnes de purification.

Fukayama (15) n'ayant récupéré que 50 % de toxine après la chromatographie sur colonne de cellulose de la méthode américaine (7), la remplace par une colonne de silice et dose 0,1 ppb dans du lait et 0,2 ppb dans du lait en poudre.

Nous présentons dans cet article la méthode développée et utilisée en routine dans notre laboratoire depuis 3 ans. L'extraction selon la méthode américaine (7) n'est pas suivie de purification sur colonne, trop de problèmes ayant été rencontrés avec des denrées très différentes comme le lait et les fromages à croûte fleurie, problèmes signalés par ailleurs (14, 15). Selon la complexité de la denrée et donc de l'extrait, nous le purifions par CCM simple ou en 3 directions, impuretés et toxines pouvant être visualisées à chaque étape. Une limite de détection variant de 5 ppt pour le lait à 30 ppt pour des fromages est ainsi atteignable.

Mode opératoire

Réactifs

- Acétone rectifiée.
- Chloroforme rectifié.
- Hexane rectifié.
- Dichlorométhane p. a.
- Iso-propanol p. a.
- Méthanol p. a.
- Acétate d'éthyle p. a.
- Ether diéthylique fraîchement distillé.
- Acide trifluoracétique pour spectroscopie (Merck 8262).
- Solution de chlorure de sodium à 5%.
- Solution de sulfate de sodium saturée: dissoudre 130 g de Na_2SO_4 dans 500 ml d'eau. A préparer 3 jours à l'avance.
- Solution d'acétate de plomb à 10%: dissoudre à chaud 100 g de $Pb(OAc)_2 \cdot 3\,H_2O$ dans 500 ml d'eau, ajouter 3 ml d'acide acétique 100% et compléter à 1 litre après refroidissement.
- Sulfate de sodium anhydre très pur en poudre très fine (Merck No. 6645).
- Filtres plissés ∅ 24 cm, Schleicher & Schuell No. 593 1/2.
- Plaques pour la CCM, gel de silice 60, épaisseur 0,25 mm (Merck No. 5721).
- Feuilles d'aluminium pour la CCM, gel de silice 60, épaisseur 0,2 mm (Merck No. 5553).
- Aflatoxine M_2: Applied Science Laboratories Inc. No. 17652.
- Aflatoxine M_1: Senn No. 8055 ou Roth No. 4034.

- Aflatoxine M_1-solution mère: à partir d'un échantillon du commerce, préparer une solution-mère à 5 μg/ml dans du chloroforme. Déterminer la concentration exacte selon (7) à chaque préparation de solution diluée. A conserver au congélateur.
- Aflatoxine M_1-solution diluée pour CCM: diluer une prise de la solution-mère pour obtenir une solution à environ 0,5 μg/ml de chloroforme, de titre exactement connu. A conserver au congélateur. A renouveler après 2 semaines.

Appareillage

- Agitateur magnétique avec barreaux recouverts de PTFE de 40 mm.
- Homogénéisateur Sorvall Omni-Mixer 17220 avec flacons en verre Mason de 800 ml.
- Evaporateur rotatif avec courant d'azote pur.
- Colonne à chromatographie, hauteur 18 cm, diamètre intérieur 22 mm, avec disque de porosité 3 à la base.
- Flacons de 3,5 ml avec bouchon à vis et rondelle d'étanchéité garnie de PTFE.
- Lampe UV 254 et 366 nm.
- Linomat III (Camag), seringues de 100 μl, pour dépôt des extraits sur plaque de CCM.
- Densitomètre pour plaques de CCM: TLC-Scanner (Camag); lampe à mercure pour l'excitation avec monochromateur à 365 nm ou filtre 366 nm; filtre de blocage spécial pour aflatoxines (M440); enregistreur et calculatrice pouvant effectuer une régression linéaire.

Principe de la méthode

Les aflatoxines sont extraites d'un échantillon homogène du produit à analyser par un mélange eau-acétone (1+3) ce qui élimine caséine et lactose. Après précipitation d'autres protéines et phospholipides par un sel de plomb, la solution est dégraissée à l'hexane et les toxines sont extraites au chloroforme. L'extrait est déshydraté et le solvant évaporé.

Pour des extraits de produits simples (lait, lait en poudre, beurre), l'aflatoxine M_1 est séparée par chromatographie sur couche mince, identifiée par sa valeur de hRf et la couleur bleue de sa fluorescence et dosée par densitométrie. Les aflatoxines M_1 et M_2 sont dosées ensemble; les aflatoxines B et G peuvent être dosées séparément.

Pour des denrées plus complexes (fromages, aliments pour enfants), l'extrait est purifié par CCM dans 3 directions. Cette technique permet la séparation des aflatoxines M_1 et M_2.

Extraction des aflatoxines

Homogénéiser échantillon à analyser et eau selon les données du tableau 1. Pour les denrées liquides ou facilement dispersables (lait, lait en poudre, yoghourts), utiliser un flacon de Philips de 500 ml et un agitateur magnétique; pour les autres denrées, employer un mixer et un flacon de 800 ml. Ajouter 300 ml d'acétone à l'aide d'un cylindre gradué de 500 ml et agiter 5 minutes. Eventuellement, opérer en parallèle avec un échantillon auquel une quantité connue d'aflatoxine M_1 est ajoutée avec l'acétone.

Filtrer à travers un filtre S & S No. 593 1/2 dans le même cylindre de 500 ml. Transférer 300 ml de filtrat dans un bécher de 600 ml contenant 40 ml d'acétate de plomb à 10%. Rincer le cylindre avec 100 ml d'eau, les transvaser dans le bécher, remuer et laisser reposer 5 minutes. Ajouter 10 ml de sulfate de sodium saturé et filtrer dans le cylindre de 500 ml.

Transférer 300 ml dans une ampoule à décanter de 500 ml, extraire les lipides en agitant vigoureusement pendant 1 minute avec 100 ml d'hexane. Verser la phase aqueuse dans un bécher de 600 ml propre et jeter la phase organique (pour les produits très gras, beurre, fromage, crème, etc., répéter une fois l'extraction par l'hexane).

Remettre la phase aqueuse dans l'ampoule, rincer le bécher par 50 ml de solution de chlorure de sodium à 5% et extraire pendant 1 minute par 100 ml de chloroforme. Récupérer la phase inférieure dans le même bécher et extraire à nouveau par 50 ml de chloroforme. Récupérer la phase inférieure dans le bécher, jeter la phase aqueuse, rincer l'ampoule avec un peu d'eau, y introduire la phase organique.

Pour les denrées formant une émulsion lors de l'extraction par le chloroforme (fromages, aliments pour enfants, etc.): ajouter 100 ml de solution de chlorure de sodium à 5%, agiter pendant une minute et décanter comme ci-dessus.

Laisser s'écouler la phase organique à travers une colonne (voir appareillage) remplie aux trois quarts de sulfate de sodium anhydre (environ 40 g) dans un ballon rodé de 250 ml. Rincer la colonne avec 3 portions de 15 ml de chloroforme. Appliquer 3 fois une légère pression sur la colonne avec une poire en caoutchouc (le passage par une fritte de porosité 3 est rendue nécessaire par la finesse ($<$ 0,0035 mm) de l'aiguille des seringues utilisées pour le dépôt des extraits sur plaques de CCM.

Concentrer le chloroforme sous pression réduite d'azote sans dépasser 50 °C.

A l'aide d'une pipette de Pasteur, transvaser le contenu du ballon de 250 ml dans un ballon poire de 20 ml. Rincer par 3 fois 3 portions d'environ 1,5 ml de chloroforme.

Evaporer à sec dans les mêmes conditions que ci-dessus. Conserver l'extrait sec au congélateur.

Chromatographie sur couche mince simple

Méthode applicable aux denrées simples: lait, lait en poudre, beurre, yoghourt, crème, fromage frais.

Tableau 1. Préparation de l'échantillon

Produit laitier	Volume ou poids de l'échantillon	Eau ajoutée (ml)	Volume ou poids d'échantillon correspondant dans l'extrait final
Lait	100 ml	10	50 ml
Lait en poudre	10 g	100	5,0 g
Crème	100 ml	*(en gén. 60)	50 ml
Beurre	50 g	90	25 g
Fromage	50 g	*(en gén. 80)	25 g
Fromage frais, Petit suisse, etc.	50 g	*(en gén. 65)	25 g

* Calculer l'eau à ajouter de manière à avoir 100 ml H_2O dans tout échantillon:

$$\text{ml } H_2O = 100 - \frac{P \cdot H}{100}$$

P = poids de l'échantillon
H = % d'eau dans le produit laitier analysé

Préparation des solutions

Reprendre l'extrait sec par 200 μl de chloroforme et transvaser dans des petits flacons étanches.

Préparation de la plaque

Sur une plaque de gel de silice 60, à 20 mm du bas, en commençant à 10 mm du bord, déposer des bandes de 10 mm avec des espacements de 5 mm. Déposer 40 μl de solution à analyser et au moins 3 bandes de solution standard diluée (2, 4, 6 μl); une plaque de 20 x 20 cm permet dans ces conditions l'analyse simultanée de 9 échantillons.

Migration

Développer par un mélange chloroforme-acétone-isopropanol (85+10+5), en cuve saturée, à l'abri de la lumière. Durée de la migration sur toute la hauteur de la plaque: 60 minutes.

Identification

Sécher la plaque sous un courant d'air froid et observer la fluorescence bleue de l'aflatoxine M_1 (hRf = 25) sous irradiation à 366 nm.

Densitométrie

Mesurer l'émission de fluorescence vers 440 nm après excitation à 365 ± 5 nm.
Réglages du TLC-Scanner
longueur d'onde d'excitation: 365 nm

fente d'excitation: 6 mm x 0,3 mm
filtre secondaire: M 440
sensibilité: 12
span: 5,00 à 10,00 selon les quantités d'aflatoxines.

Procéder à la régression de la hauteur des pics de standard sur la quantité d'aflatoxine déposée. Interpoler les quantités d'aflatoxine dans les dépôts d'analyses.

Confirmation de la présence d'aflatoxine M_1 par formation de son hémiacétal (aflatoxine M_{2a})

Déposer comme ci-dessus une bande d'analyse, une bande de solution standard diluée et une bande d'analyse et de standard superposés. Recouvrir chaque bande de 10 μl d'acide trifluoracétique.

Couvrir la plaque de CCM par une plaque de verre, chauffer 15 minutes dans une étuve à 100 °C. Refroidir et déposer des bandes comme ci-dessus sans acide trifluoracétique. Développer par de l'acétate d'éthyle saturé d'eau.

Sous irradiation à 366 nm, observer la disparition de l'aflatoxine M_1 et l'apparition de l'hémiacétal à fluorescence bleue ayant un hRf de 10.

Chromatographie sur couche mince en 3 directions

Méthode applicable aux denrées élaborées: fromages (pâte dure et molle, à croûte fleurie), aliments pour enfants, aliments diététiques.

Préparation des solutions

Comme ci-dessus.

Préparation de la feuille

Couper en deux une feuille d'aluminium pour CCM (gel de silice 60). Déposer jusqu'à 80 μl de la solution analysée et 4 μl de solution standard diluée sous forme de spots selon les indications de la figure 1.

Première migration

Ether-méthanol-eau (96+3+1), en cuve saturée, dans l'obscurité, sur toute la feuille (60 min).

Sécher sous un courant d'air froid et couper au-dessus des dépôts (fig. 2).

Deuxième migration

Chloroforme-acétone-iso-propanol (75+15+10), en cuve saturée, sur toute la feuille restante (20 min).

Tirer un trait a 16 mm du bord latéral de la feuille pour empêcher l'élution suivante de déborder sur la tache du standard. A 20 mm de l'autre bord latéral, déposer des spots de solution standard diluée (1, 2, 4 μl) (fig. 3).

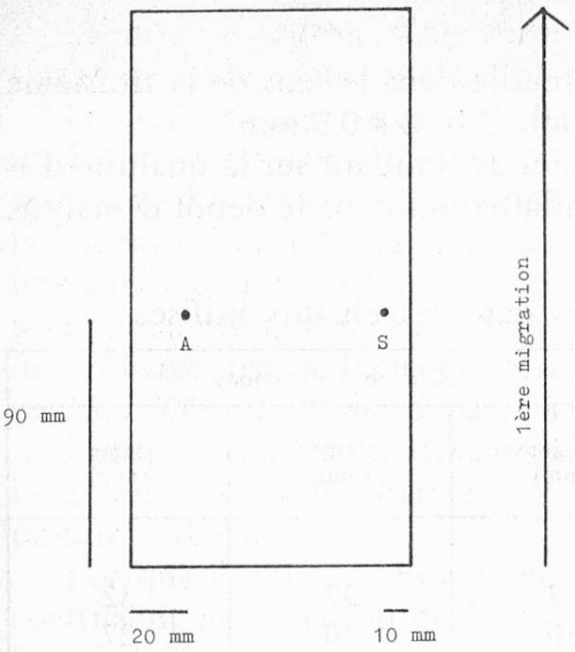

Fig. 1. CCM en 3 directions: dépôt des spots et première migration
A = analyse S = standard

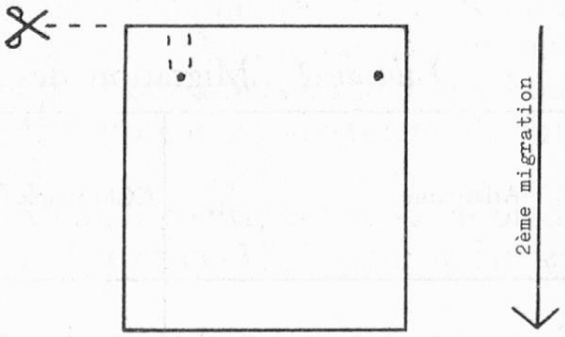

Fig. 2. CCM en 3 directions: après la première migration élimination des impuretés et deuxième migration

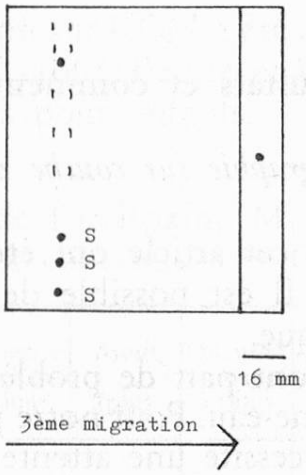

Fig. 3. CCM en 3 directions: dépôt de solutions standard et troisième migration

Troisième migration

Acétate d'éthyle saturée d'eau, cuve non saturée (20 min).

Identification

Sécher sous un courant d'air froid et observer sous irradiation à 366 nm. L'identification des aflatoxines se fait selon les indications du tableau 2.

Densitométrie

Mesurer l'émission de fluorescence de la feuille dans le sens de la troisième élution comme ci-dessus, sauf, fente d'excitation: 2 mm x 0,3 mm.

Procéder à la régression de la surface des pics de standard sur la quantité d'aflatoxine déposée. Interpoler les quantités d'aflatoxines dans le dépôt d'analyse.

Tableau 2. Migration des aflatoxines dans les éluants utilisés

Aflatoxine	CCM simple (hRf)	CCM en 3 directions		
		1ère migration (mm)	2ème (mm)	3ème (mm)
M_1	25	2	32	32
M_2	23	0	30	27
M_{2a}	10	0	10	14
B_1	50	12	45	45
B_2	46	7	45	42
G_1	42	2	43	40
G_2	38	0	43	38

Résultats et commentaires

Chromatographie sur couche mince simple

Les résultats donnés dans cet article ont été obtenus avec le chloroforme comme solvant d'extraction. Il est possible de le remplacer par le dichlorométhane qui est moins toxique.

Plusieurs auteurs (14, 15) font part de problèmes d'émulsion entre la phase chloroforme et la phase acétone-eau. Pour notre part, seuls quelques fromages et aliments pour enfants ont nécessité une attente de 30 minutes ou un jet d'air chaud sur l'ampoule à décanter pour obtenir une séparation de phases nette.

Cette méthode a été appliquée à près de 600 échantillons de laits de producteurs au cours de 3 saisons d'hiver (où les risques de contamination par le fourrage sont les plus élevés) et à plus de 100 produits laitiers: lait, lait en poudre, beurre, crème, yoghourt, fromage.

Malgré l'interdiction datant d'août 1977 (16) d'utiliser en Suisse des tourteaux d'arachides pour le bétail laitier, nous devons néanmoins déplorer chaque hiver quelques laits de mélange de village contaminés (de 20 à 600 ppt) par le lait de quelques producteurs (70—3000 ppt) utilisant «par erreur» des tourteaux d'arachides (pouvant contenir jusqu'à 1800 ppb d'aflatoxine B_1 et 1500 ppb de B_2, G_1 et G_2).

La mesure répétée d'un chromatogramme ne montre aucune variation du signal de fluorescence de la toxine.

La droite de régression de la hauteur du signal de fluorescence sur la quantité d'aflatoxine est linéaire entre 0,5 et 20 ng d'aflatoxine M_1. Le recouvrement moyen de l'aflatoxine M_1 ajoutée à des concentrations de 25 à 150 ppt dans du lait dépasse 90% (tableau 3). Pour des laits en poudre contaminés à 300 ppt (calculées sur la poudre sèche), le recouvrement est de 92%. Dans le cas de fromages non contaminés, le recouvrement atteint 84% pour des ajouts de 300 ppt. Pour des fromages naturellement contaminés (200—1500 ppt), le recouvrement d'ajouts de 300, 500 et 1000 ppt dépasse 84% (tableau 3).

Lorsqu'on répète l'analyse par CCM d'un extrait, le coefficient de variation de la moyenne de 2 résultats est de 4,7% pour le lait et de 3,3 % pour le lait en poudre (tableau 4).

Lorsque l'analyse complète est répétée deux fois sur le même échantillon, le coefficient de variation de la moyenne des deux résultats est de 6,6% pour le lait, de 7,7% pour le lait en poudre et de 9,0% pour le fromage (tableau 5).

La grande dispersion des coefficients de variation obtenus montre que la précision que l'on peut attendre d'un résultat dépend du genre de denrée analysée, de l'échantillon prélevé de denrée et du niveau de contamination.

Chromatographie sur couche mince en 3 directions

Cette méthode de purification sur CCM a été appliquée à plus de 100 fromages à pâte dure, à pâte molle et à croûte fleurie, et à plus de 50 laits en poudre, aliments énergétiques et aliments pour enfants.

Tableau 3. Recouvrement de l'aflatoxine M_1 dans des produits laitiers artificiellement contaminés — CCM simple

Denrée	Nombre d'échantillons	Ajout (ppt)	Quantité retrouvée $\bar{x}$ (ppt)	Recouvrement ($\bar{x}$ %)	Etendue (ppt)	Coefficient de variation (%)
Lait	2	25	22,5	90,0	27— 18	28,3
	2	50	46,4	92,8	50— 42,8	11,0
	6	100	90,1	90,1	102— 84	8,7
	10	150	135,3	90,2	161,5—112,5	14,5
Lait en poudre	4	300	275	91,7	315—248,5	10,3
Fromage non contaminé	2	300	252,5	84,2	265—240	7,0
Fromage contaminé						
(200—1500 ppt)	6	300	266	88,7	310—249	8,8
(200—870 ppt)	6	500	424	84,8	480—360	10,1
(1400 ppt)	1	1000	910	91,0	—	—

Tableau 4. Variations observées lors de la répétition de l'analyse d'un extrait par CCM simple

Denrée	Contamination en aflatoxine M_1 x (ppt)	Nombre d'échantillons n	Nombre de répétitions k	$\overline{c.v.}$ (%)	Etendue des $c.v._k$ (%)	$s_{\overline{c.v.}}$ (%)
Lait	100— 2300	6	2	4,7	8,0—1,1	3,2
Lait en poudre	200—10000	6	2	3,3	6,6—0,8	2,4

Tableau 5. Variations observées lors de la répétition de l'analyse complète d'une denrée — CCM simple

Denrée	Contamination en aflatoxine M_1 x (ppt)	Nombre d'échantillons n	Nombre de répétitions k	$c.v._k$ (%)	$\overline{c.v.}$ (%)	Etendue des $c.v._k$ (%)	$s_{\overline{c.v.}}$ (%)
Lait	50	1	6	9,7	—	—	—
	1000	1	3	5,1	—	—	—
	50— 1600	21	2	—	6,6	14,0—0,3	3,9
Lait en poudre	500—10000	5	3	—	4,2	12,4—1,2	4,6
	250— 4100	8	2	—	7,7	16,5—2,8	5,7
Fromage	250— 1450	5	2	—	9,0	12,9—4,9	3,7

$c.v._k$ = Coefficient de variation de la moyenne de k répétitions de l'analyse d'un échantillon
$\overline{c.v.}$ = Moyenne des n coefficients de variation $c.v._k$
$s_{\overline{c.v.}}$ = Ecart-type de $\overline{c.v.}$

Des quantités d'aflatoxine M_1 de 30 à 2200 ppt ont été dosées. La présence d'aflatoxine M_2 a été rarement observée, et toujours en présence d'au moins 5 fois plus d'aflatoxine M_1. La présence d'aflatoxines B et G n'a pratiquement jamais été observée. La droite de régression de la surface des pics de fluorescence sur la quantité d'aflatoxine éluée dans la troisième direction est linéaire entre 0,5 et 10 ng d'aflatoxine M_1.

La migration dans 3 éluants ne décompose pas l'aflatoxine M_1, à condition d'effectuer les migrations à l'obscurité.

Le recouvrement moyen de l'aflatoxine M_1 ajoutée au lait est de 86% pour des teneurs de 25 à 200 ppt (tableau 6). Pour le lait en poudre contaminé artificiellement à 300 ppt le recouvrement est de 87%. Pour le fromage non

contaminé, le recouvrement moyen est de 86% pour des ajouts de 300, 500 et 1000 ppt.

Le coefficient de variation de la moyenne de deux analyses d'un même extrait est de 7,1% pour le lait, de 4,0% pour les aliments pour enfants, de 3,7% pour le lait en poudre et de 7,4% pour le fromage (tableau 7).

En répétant l'analyse complète d'un même échantillon, le coefficient de variation de la moyenne de deux résultats est de 5,3% pour le lait en poudre et de 7,4% pour le fromage (tableau 8). Pour un aliment pour enfant contaminé à 250 ppt, le coefficient de variation d'un échantillon analysé quatre fois est de 10,3% et d'un autre échantillon analysé trois fois est de 3,4%.

La grande dispersion des coefficients de variation obtenus montre que la précision d'un résultat que l'on peut atteindre par cette méthode dépend aussi du niveau de contamination, du genre de denrée analysée et de l'échantillon prélevé de denrée.

Tableau 6. Recouvrement d'aflatoxine M_1 de produits laitiers artificiellement contaminés — CCM tridirectionnelle

Denrée	Nombre d'échantillons	Ajout (ppt)	Quantité retrouvée $\bar{x}$ (ppt)	Recouvrement $\bar{x}$ (%)	Etendue (ppt)	Coefficient de variation (%)
Lait	2	25	26,0	104	27,7—24,3	9,2
	7	50	41,2	82,4	45,5—37,2	6,9
	5	100	76,4	76,4	88,4—68,4	10,1
	4	150	122	81,0	148—107	16,0
	3	200	175	87,7	208—156	15,9
Lait en poudre	4	300	262	87,4	308—247	11,5
Fromage non contaminé	2	300	253	84,2	275—230	12,6
	2	500	430	86,0	460—400	9,9
	2	1000	888	88,8	910—865	3,6

Tableau 7. Variations observées lors de la répétition de l'analyse d'un extrait par CCM tridirectionnelle

Denrée	Contamination en aflatoxine M_1 x (ppt)	Nombre d'échantillons n	Nombre de répétitions k	$\overline{c.v.}$ (%)	Etendue des $c.v._k$ (%)	$\overline{s_{c.v.}}$ (%)
Lait	70— 100	4	2	7,1	9,1—2,6	3,1
Aliment pour enfant	900—1500	4	2	4,0	7,4—1,9	2,4
Lait en poudre	200—1100	5	2	3,7	11,0—0,6	4,8
Fromage	900—1110	3	2	7,4	7,4—5,1	1,2

Tableau 8. Variations observées lors de la répétition de l'analyse complète d'une denrée — CCM tridirectionnelle

Denrée	Contamination en aflatoxine M_1 x (ppt)	Nombre d'échantillons n	Nombre de répétitions k	$c.v._k$ (%)	$\overline{c.v.}$ (%)	Etendue des $c.v._k$ (%)	$s_{\overline{c.v.}}$ (%)
Aliment pour enfant	250	1	4	10,3	—	—	—
	250	1	3	3,4	—	—	—
Lait en poudre	130—1800	7	2	—	5,3	14,6—0,8	5,3
Fromage	235— 920	4	2	—	7,4	9,0—5,4	1,7

Abréviations: voir tableau 5.

Résumé

Une méthode d'analyse de l'aflatoxine M_1 dans les produits laitiers est décrite. Après des étapes d'extraction et de purification simples, l'aflatoxine est dosée dans les extraits de laits par fluorodensitométrie sur plaque de CCM. Une limite de détection de 5 ppt et, pour une contamination de 50 ppt, un taux de recouvrement de 93% sont obtenus. Les extraits de denrées plus complexes telles que fromages et aliments pour enfants sont purifiés au préalable par CCM à 3 directions, ce qui permet la séparation des aflatoxines M_1 et M_2.

Zusammenfassung

Eine Methode für den Nachweis und die Bestimmung von Aflatoxin M_1 in Milch und Milchprodukten wird beschrieben. Nach einfacher Extraktion und Reinigung wird Aflatoxin M_1 in Milchextrakten durch Fluorodensitometrie auf DC-Platten bestimmt. Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei 5 ppt, und die Wiederfindungsrate beträgt 93% bei einem Gehalt von 50 ppt. Die Extrakte von Milchprodukten wie Käse und Kindernährmittel sind durch eine 3dimensionale Trennung auf DC-Alufolien gereinigt; so werden auch Aflatoxin M_1 und M_2 voneinander getrennt.

Summary

A method for the determination of aflatoxin M_1 in milk products is described. After the usual extraction and purification steps, aflatoxin M_1 in milk extracts is determined by fluorodensitometry on TLC plates. The detection limit is 5 ppt and the recovery 93% at a 50 ppt level. Extracts of milk products are purified by a 3-directional TLC procedure, which also separates aflatoxin M_1 from M_2.

Bibliographie

1. Environmental Health Criteria 11 — Mycotoxins, p. 11—85. World Health Organisation, Genève 1979.
2. *Sieber, R.* und *Blanc, B.:* Zur Ausscheidung von Aflatoxin M_1 in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten: eine Literaturübersicht. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **69**, 477—491 (1978).
3. Office fédéral de la santé publique, Berne: Aflatoxininformation 80/1 du 26 février 1980.
4. Office fédéral de la santé publique, Berne: Circulaire No. IX du 17 avril 1979.
5. *Pons, W. A., Jr., Cucullu, A. F.* and *Lee, L. S.:* Method for the determination of aflatoxin M_1 in fluid milk and milk products. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **56**, 1431—1436 (1973)
6. *Stubblefield, R. D.* and *Shannon, G. M.:* Aflatoxin M_1: Analysis in dairy products and distribution in dairy foods made from artificially contaminated milk. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **57**, 847—851 (1947).
7. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis, 12 édition, Nos. 26.009, 26.080, 26.081, 26.083. Washington D. C. 1975.
8. *Tuinstra, L. G. M. Th.* and *Bronsgeest, J. M.:* Determination of aflatoxin M_1 in milk at the parts per trillion level. J. Chromatogr. **111**, 448—451 (1975).
9. *Kiermeier, F.* und *Weiß, G.:* Zur Untersuchung von Milch und Milchprodukten auf die Aflatoxine B_1, B_2, G_1, G_2 und M_1. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. **160**, 337—344 (1976).
10. *Corbion, B.* et *Fremy, J. M.:* Recherche des aflatoxines B_1 et M_1 dans les fromages de type «Camembert». Le Lait **573—574**, 133—140 (1978).
11. *Frémy, J. M.* et *Gaymard, A.:* Recherche d'aflatoxine M_1 dans les poudres de lactosérum. Evaluation saisonnière de la contamination. Le Lait **599—600**, 635—644 (1980).
12. *Gauch, R., Leuenberger, U.* and *Baumgartner, E.:* Rapid and simple determination of aflatoxin M_1 in milk in the low parts per 10^{12} range. J. Chromatogr. **178**, 543—549 (1979).
13. *Stubblefield, R. D.:* The rapid determination of aflatoxin M_1 in dairy products. J. Am. Oil Chemists Soc. **56**, 800—803 (1979).
14. *Stubblefield, R. D., Van Egmond, H. P., Paulsch, W. E.* and *Schuller, P. L.:* Determination and confirmation of identity of aflatoxin M_1 in dairy products: collaborative study. J. Assoc. Offic. Analyst. Chemists **63**, 907—921 (1980).
15. *Fukayama, M., Winterlin, W.* and *Hsieh, D. P. H.:* Rapid method for analysis of aflatoxin M_1 in dairy products. J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists **63**, 927—930 (1980).
16. Station fédérale de recherches sur la production animale, Grangeneuve. Circulaire du 19 juillet 1977 aux fabricants de fourrage mixte.

Dr. F.-Y. Tripet
C. Riva
Dr. J. Vogel
Laboratoire cantonal de chimie
22, Quai Ernest-Ansermet
CH-1211 Genève 4