

TECHNIQUES DE LABORATOIRE

Étude des couches minces prêtes à l'emploi pour la chromatographie des aflatoxines

par J. P. PETIT *

RÉSUMÉ

La multitude des nouveaux « films » pour chromatographie en couche mince imposait un bilan quant à leur utilisation dans le problème des aflatoxines. Après les avoir essayés avec de très nombreuses combinaisons de solvant, on peut conclure à leur inadaptation pour la chromatographie des aflatoxines et aussi à l'irrégularité des produits commerciaux proposés selon les lots. L'analyste est donc contraint de recourir aux méthodes traditionnelles en procédant lui-même à la préparation de ces couches minces sur plaque de verre. Le problème du choix d'une couche mince de référence est résolu par l'emploi de gels de silice particulièrement purifiés, et d'une grande régularité dans leurs qualités.

On peut espérer que bientôt les fabricants utiliseront pour préparer leurs couches minces un gel de silice convenable pour résoudre les problèmes que pose la chromatographie des aflatoxines et que les lots de « films » ne présenteront plus entre eux de différences gênantes.

La chromatographie en couche mince étant un procédé couramment utilisé pour l'étude des toxines d'*Aspergillus flavus*, il a paru intéressant d'examiner en détail les couches minces actuellement disponibles, pour séparer les aflatoxines.

L'extension considérable de ce type de chromatographie a poussé les fabricants à présenter aux utilisateurs des supports tout prêts. Dès la sortie des chromogrammes Kodak (K 301 V lot 1827-1-3), une étude complète avait été faite (2) pour adapter ce nouveau procédé à la chromatographie rapide et simplifiée des aflatoxines. Peu après, la présentation des chromogrammes changeait mais, comme on devait rapidement s'en rendre compte, leurs propriétés aussi.

Enfin, récemment, d'autres marques se sont mises à vendre des couches minces précouchées soit sur support souple, soit sur verre mince.

La nécessité d'un tour d'horizon complet s'im-

posait ; ce sont donc les possibilités actuelles des couches minces toutes prêtes qui seront envisagées ici. Dans la conclusion, on les comparera aux gels de silice traditionnels, à étendre sur des lames de verre.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les couches minces sont en gel de silice ; elles sont couchées sur support souple ou sur verre mince. Ce sont :

| | | |
|-------------------|---|---|
| | chromogramme Kodak K 301 V, lot 22-1-9 | A |
| support souple | Polygram MN gel de silice S (sans numéro de lot) | B |
| | Support Gelman SG, gel de silice n° 150 924 | C |
| support verre | plaques finies Merck gel de silice F 254 lot 62 792 72 | D |

Les échantillons chromatographiés proviennent d'un fourreau d'arachide toxique de Mada-

* Collaboration technique : M^{lle} M. BARBRON.

gascar. L'extraction en est réalisée au laboratoire de nutrition de l'I. E. M. V. T. selon la méthode classique du T. P. I. jusqu'à l'obtention d'un extrait brut non passé sur colonne d'alumine, extrait dont la conservation est excellente et qui réalise un standard interne intéressant par la rapidité de sa préparation et pour des études quantitatives. Cet extrait brut contient environ 25 μg d'aflatoxine B par ml ce qui correspond, rapporté au tourteau à 1 ppm.

Les échantillons de référence sont de l'aflatoxine B₁ pure Arthur D. Little inc. en flacons de 10 mg, que l'on dissout dans le solvant, ici du chloroforme.

Les feuilles sont découpées au format 5 \times 10 cm. Les plaques de verre 20 \times 20 sont coupées en 2. Des essais d'activation à 110° ont été réalisés, les résultats sont aussi bons qu'à 105°. On active donc à 105° ou à 110° pendant 35 minutes puis on procède au développement en cuve de 400 ml (becher adapté) pour les supports souples et de 4.000 ml pour les plaques de verre, en atmosphère sursaturée.

Les autres opérations ont déjà été exposées. On peut cependant souligner que seul le mélange chloroforme-méthanol donnant des résultats intéressants, c'est le seul à avoir été utilisé.

Les solvants sont distillés au laboratoire. Pour le chloroforme on ne retient que celui qui passe entre 60,4° et 61 °C, pour le méthanol celui qui distille de 64° à 66 °C. Dans ces conditions et en repérant de façon rigoureuse le niveau du liquide de développement par rapport à la ligne de dépôt des échantillons, on réalise des chromatogrammes reproductibles.

On utilise comme étalon une couche de gel de silice MN-NHR, préparé au laboratoire (50 g pour 120 ml d'eau). On obtient ainsi, même à de très longs intervalles, un R_F de 0,48 pour l'aflatoxine B₁ pure. De légères variations qui n'excèdent pas 2 p. 100 peuvent être observées quand on change de lot de gel de silice (R_F allant de 0,46 à 0,50), alors qu'on ne décèle aucune variation quand on utilise le même lot.

II. — RÉSULTATS

Ils sont rassemblés dans les tableaux I et II qui permettent de comparer les moyennes des R_F mesurés, selon les supports utilisés.

La grande souplesse des supports plastiques a permis de travailler avec des pourcentages de méthanol variant de façon très progressive. Par contre, dès que le verre redevient le support de la couche mince, on doit se borner à un nombre d'expériences plus réduit (moins de solvants étudiés), ce qui rend une comparaison plus difficile.

Si on retient comme critères de bonne migration chromatographique un R_F voisin de 0,5 pour l'aflatoxine B₁ pure ainsi que la bonne séparation des aflatoxines B et G, on peut conclure qu'aucun des supports étudiés n'est utilisable dans l'état actuel de leur fabrication.

Une position aussi rigide si elle était justifiée quand on ne possédait pas d'aflatoxine de référence, peut certainement être assouplie maintenant qu'on en dispose. La présence d'un témoin constant permet en effet de lire des chromatogrammes où les R_F peuvent avoir des valeurs très différentes de 0,50 à condition que la résolution soit bonne ; c'est le cas quand on peut obtenir une variation de R_F d'au moins 0,09, les taches correspondantes des aflatoxines B et G étant à la limite bien séparées.

Le tableau III montre que l'on pouvait facilement utiliser l'ancienne fabrication des chromatogrammes Kodak K 301 V (lot 1827-1-3) tandis que depuis leur nouvelle présentation (lot 22-1-9), la résolution est moins bonne et on obtient des R_F encore plus bas. Le seul avantage de ce nouveau lot est la planéité plus grande du support, mais il était préférable d'avoir des supports qui se gondolent et de pouvoir s'en servir dans le problème qui nous préoccupe.

En fait, cette transformation du comportement des chromatogrammes K 301 V correspond à la présence d'un gel de silice différent en particulier quant à sa granulométrie.

III. — DISCUSSION

Il est regrettable que de tels changements puissent se produire dans une fabrication où seule la constance des propriétés peut offrir un intérêt pour l'utilisateur. Les changements devraient être connus et n'intervenir que dans le sens d'une amélioration générale des propriétés.

Dans le cas particulier des aflatoxines, le grand intérêt suscité dès leur sortie par les couches minces toutes prêtes disparaît actuellement puisqu'aucun des produits testés ne convient.

TABLEAU N°1

Résultats obtenus en utilisant dans les meilleures conditions, selon les fabricants, les couches minces prêtes à l'emploi caractérisées par un support souple

| Pourcentage Méthanol | Support souple | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------------------------|-------------------|----------------------|-----------------|------------------------|------------------|----------------------|-----------------|
| | A K 301 V Nouvelle fabrication | | | | B MN liant amidon | | | | C Gelman SG | | |
| | Nombre essais | R _F moyen | | | Nombre essais | R _F moyen | | | Nombre essais | R _F moyen | |
| | | BT ⁺ | BV ⁺ | Aflatoxine B ₁ pure | | BT ⁺ | BV ⁺ | B ₁ pure | | BT ⁺ | BV ⁺ |
| 0 | | | | | | | | 3 | 0,82 | 0,80 | |
| 0,1 | 9 | 0,06 ⁺⁺ | | 0,07 | | | | | | | |
| 0,5 | 6 | 0,10 | 0,15 | 0,13 | 8 | 0,10 | 0,14 | 0,14 | | | |
| 1 | 3 | 0,16 | 0,20 | 0,20 | 6 | 0,17 | 0,22 | 0,22 | | | |
| 1,1 | 3 | 0,16 | 0,20 | | 3 | 0,19 | 0,24 | | | | |
| 1,2 | 2 | 0,16 | 0,22 | 0,22 | 3 | 0,19 | 0,24 | | | | |
| 1,3 | 2 | 0,19 | 0,25 | | 3 | 0,20 | 0,25 | | | | |
| 1,4 | 2 | 0,19 | 0,25 | 0,25 | 3 | 0,19 | 0,24 | | | | |
| 1,5 | 3 | 0,22 | 0,29 | 0,30 | 6 | 0,20 | 0,25 | 0,28 | | | |
| 1,6 | 3 | 0,24 | 0,29 | 0,30 | 3 | 0,22 | 0,27 | | | | |
| 1,7 | 3 | 0,24 | 0,29 | | 3 | 0,22 | 0,27 | | | | |
| 1,8 | 3 | 0,24 | 0,29 | 0,30 | 3 | 0,27 | 0,31 | | | | |
| 1,9 | 3 | 0,29 ⁺⁺ | | | 3 | 0,30 | 0,37 | | | | |
| 2 | 3 | 0,29 | | | 6 | 0,31 | 0,38 | 0,37 | | | |
| 2,2 | 3 | | | | 3 | 0,32 | 0,38 | | | | |
| 3 | 3 | 0,37 | | | 6 | 0,37 | 0,40 | | 3 | 0 0 | |
| 3,2 | 3 | | | | 3 | 0,38 ⁺⁺ | | | | | |
| 4 | 3 | | | | 3 | 0,39 | | | 3 | 0 0 | |
| 5 | 3 | 0,47 | | 0,56 | | | | 0,53 | 3 | 0 0 | |
| 6 | | | | | | | | | | | |

+ BT : Spot bleu turquoise des aflatoxines G ;
+ BV : Spot bleu violet des aflatoxines B ;

++ Spot bleu unique, les aflatoxines ne sont pas ou plus séparées.

Pour les chromatogrammes K 301 V la résolution a diminué et dans les meilleures conditions (1,1 p. 100 de méthanol), la différence des R_F devient si faible qu'elle ne permet plus la distinction des deux taches d'aflatoxine B et G. En même temps le R_F de l'aflatoxine B diminue presque de moitié.

On peut remarquer que les seules C. M. permettant de retrouver un R_F voisin de 0,5 avec mélange à 5 p. 100 de méthanol sont sur support souple (aflatoxine B₁ pure support K 301 V

R_F = 0,56 ; Polygram MN R_F = 0,53) mais il n'y a plus de séparation des aflatoxines B et G quand on analyse un mélange complexe.

On est donc contraint de recourir aux méthodes traditionnelles avec leurs inconvénients quant aux manipulations mais on obtient des chromatogrammes reproductibles et ayant un grand pouvoir de résolution ; enfin, on est assuré, dans les qualités très pures des gels, de ne trouver que de faibles variations d'un lot de produit à l'autre.

TABLEAU N°II

Résultats obtenus en utilisant dans les meilleures conditions, selon les fabricants, les couches minces prêtes à l'emploi, caractérisées par un support verre.

| Pourcentage Méthanol | Support verre | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|----------------------|------|-----------------------------------|---|----------------------|------|------------------------|---|----------------------|------|------------------------|
| | D Merck F 252 tout prêt | | | | E MNG liant plâtre préparé au laboratoire | | | | F MNSHR liant amidon préparé au laboratoire | | | |
| | Nombre essais | R _F moyen | | | Nombre essais | R _F moyen | | | Nombre essais | R _F moyen | | |
| | | BT + | BV + | Aflatoxine B ₁ pure | | BT + | BV + | B ₁ pure | | BT + | BV + | B ₁ pure |
| 1 | 5 | 0,07 ⁺⁺ | | | 4 | 0,08 | 0,10 | | 5 | 0,06 ⁺⁺ | | |
| 1,8 | 3 | 0,17 | | | | | | | | | | |
| 2 | 5 | 0,18 | | | 4 | 0,15 | 0,20 | | 5 | 0,10 | 0,12 | |
| 3 | | | | | 4 | 0,23 | 0,33 | | 5 | 0,20 | 0,26 | |
| 4 | 3 | 0,28 | 0,31 | 0,31 | 6 | 0,29 | 0,38 | | 5 | 0,24 | 0,28 | |
| 5 | 5 | 0,31 | 0,36 | 0,36 | 9 | 0,37 | 0,47 | 0,48 | 5 | 0,30 | 0,37 | |
| 6 | 6 | 0,33 | 0,38 | | 6 | 0,40 | 0,50 | | 2 | 0,33 | 0,37 | |
| 7 | 2 | 0,40 ⁺⁺ | | | 3 | 0,46 | 0,55 | | 2 | 0,38 | 0,46 | |
| 8 | 2 | 0,40 | | | 6 | 0,57 | 0,65 | | 5 | 0,41 | 0,52 | |
| 8,5 | | | | | 6 | 0,55 | 0,63 | | | | | |
| 9 | | | | | 6 | 0,56 | 0,63 | | 5 | 0,53 | 0,61 | |
| 9,5 | | | | | 5 | 0,56 | 0,64 | | | | | |
| 10 | | | | | 3 | 0,63 | 0,67 | | 2 | 0,56 | 0,63 | |
| 15 | | | | | 6 | 0,67 | | | 5 | 0,71 | 0,75 | |
| 20 | | | | | | | | | 5 | 0,76 | | |

+ BT : Spot bleu turquoise des aflatoxines G ; + BV : Spot bleu violet des aflatoxines B ;

++ Spot bleu unique, les aflatoxines ne sont pas ou plus séparées.

En conclusion, on peut dire qu'actuellement aucune des couches minces précouchées étudiées ici n'est convenable pour étudier les aflatoxines. Les méthodes traditionnelles restent donc les seules disponibles. Il faut signaler en ce qui concerne le gel de silice pris comme gel de référence, qu'actuellement, seuls les gels MN NHR et HR très pur Merck ont des variations faibles d'un lot à l'autre. Tout récemment la Maison Camag vient de sortir à son tour des gels de silice précouchés sur plaque de verre, l'épaisseur de la couche étant rigoureusement uniforme et valant 250 μ . Les séparations obtenues sont excellentes tant par leur résolution que par la valeur des R_F quand on utilise le Kieselgel DF-A avec amidon comme liant.

Il est possible que d'autres lots de ces produits « de confection » sortent dans un avenir plus ou moins proche, lots qui présenteront des propriétés différentes de celles qui sont exposées ici. Les chiffres indiqués peuvent servir de base à un étalonnage plus serré réalisé dans les conditions précises du laboratoire qui le fera. On devra encore longtemps posséder un stock du produit de référence et rester très prudent lors de son renouvellement.

On peut cependant espérer que des gels convenables seront bientôt couchés sur support souple, le plus intéressant, et permettront d'élargir le domaine d'utilisation de la chromatographie sur couche mince, au moins en ce qui concerne l'étude des aflatoxines.

TABLEAU N°III

Comparaison de deux lots de fabrication de chromatogrammes
K 301 V vis-à-vis de l'extrait B.

| Pourcentage Méthanol | K 301 V lot n° 1827-1-3 (ancienne fabrication) | | | K 301 V lot n° 22-1-9 (nouvelle fabrication) | | |
|-------------------------|--|------|------------------|--|------|------------------|
| | R _F moyen | | Δ R _F | R _F moyen | | Δ R _F |
| | BT | BV | | BT | BV | |
| 1 | 0,26 | 0,30 | 0,04 | 0,16 | 0,20 | 0,04 |
| 1,1 | 0,27 | 0,36 | 0,09 | 0,16 | 0,20 | 0,04 |
| 1,5 | 0,30 | 0,34 | 0,04 | 0,22 | 0,29 | 0,07 |
| 2 | 0,28 | 0,35 | 0,07 | 0,29 | | 0 |
| 3 | 0,30 | 0,36 | 0,06 | 0,37 | | 0 |
| 5 | 0,50 | | 0 | 0,47 | | 0 |

TABLEAU N°IV

Comparaison des R_F obtenus sur divers chromatogrammes avec le solvant chloroforme
méthanol (95 : 5) et l'extrait B comme échantillon.

| Origine des gels de silice | R _F moyen | |
|--|-------------------------------|-----------------------------|
| | tache BT des aflatoxines G | tache BV des aflatoxines |
| Supports de C.M. préparés au laboratoire | | |
| de référence MNNHR | 0,36 | 0,48 |
| Merck HR | 0,37 | 0,45 |
| MNG | 0,37 | 0,47 |
| Kieselgel Merck H | 0,30 | 0,40 |
| MNSHR | 0,30 | 0,37 |
| Kieselgel Merck G | 0,36 | 0,46 |
| Supports de C.M. tout prêts | | |
| F 252 | 0,31 | 0,36 |
| K 301 V 1827-1-3 | 0,50 | |
| K 301 V 22-1-9 | 0,47 | |
| MN liant amidon | 0,40 | |
| GeIman SG | 0 | |

SUMMARY

Study of the films ready for use in the Chromatography of aflatoxins

In view of the great number of new films for thin layer chromatography, a statement about their use in the problem of aflatoxins was needed. Trials, made with a great number of solvents, have shown their inadequacy for the chromatography of aflatoxins and the irregularity of the commercial drugs offered, according the series.

Therefore, the research worker has to prepare himself this thin layer on a glass plate. The problem of the choice of a thin layer of reference has been solved by the use of silica gel carefully purified and by the regularity of its production.

It is hoped that in a near future, the firms will prepare the thin layers with an adequate silica gel in order to face the problems of the chromatography of aflatoxins and that films will no longer show some troublesome differences.

RESUMEN

Estudio de las capas delgadas preparadas para la utilización en la cromatografía de las aflatoxinas

Las nuevas películas para la cromatografía en capas delgadas siendo muy numerosas, se necesitaba una selección en cuanto a su utilización para el estudio de las aflatoxinas. Los ensayos efectuados con disolventes mostraron la inadaptación de ellas para la cromatografía de las aflatoxinas y también la irregularidad de los productos comerciales, según las series. Pues el buscador debe emplear los métodos tradicionales, preparando el mismo estas capas delgadas sobre lamina de vidrio. Se resolvió la selección de una capa delgada de referencia utilizando silicagelas particularmente purificadas, cuya producción es muy regular. Se puede esperar que pronto los fabricantes emplearan para la preparación de las capas delgadas una silicagela adecuada, y que ya no se encontraran diferencias incómodas entre las series de las películas lo que resolvería los problemas hechos por la cromatografía de las aflatoxinas.

BIBLIOGRAPHIE

1. PETIT (J. P.), RIVIÈRE (R.), PERREAU (P.) et PAGOT (J.). — **Recherches sur l'aflatoxine.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays Trop.*, 1964, **17** (2) : 239-53.
2. PETIT (J. P.). — **Procédé chromatographique rapide pour l'étude de la fluorescence des aflatoxines.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays Trop.*, 1966, **19** (1) : 87-96.
3. RANDEATH (K.). — **Chromatographie sur couches minces.** Gauthiers-Villars Editeurs Paris, 1964.