

TECHNIQUES DE LABORATOIRE

Procédé chromatographique rapide pour l'étude de la fluorescence des aflatoxines

par J. P. PETIT

(avec la collaboration technique de Mlle M. BARBRON).

RÉSUMÉ

La chromatographie en couche mince sur plaque de verre permettait aux laboratoires équipés en conséquence d'obtenir des résultats très intéressants dans l'étude de la fluorescence des aflatoxines. Voici une méthode que n'importe quel laboratoire peut employer, sans aucun matériel spécial. Il suffit d'utiliser selon le protocole indiqué des couches minces déjà étalées sur supports souples analogues à ceux des plans-films. La discussion porte sur le choix du système de solvant ; le meilleur pour séparer les aflatoxines est un mélange chloroforme méthanol (98,9 : 1,1). On en conclut qu'il n'est pas possible de transposer directement les résultats obtenus sur plaque de verre puisqu'alors c'est le mélange 95 : 5 qui permet les meilleures séparations et qu'il faut rechercher systématiquement la combinaison de solvant qui donne le résultat optimum.

Cette recherche devient possible avec ces nouveaux supports et on peut même aborder l'étude des phénomènes présidant à la séparation chromatographique d'une façon précise ainsi que le montrent les représentations graphiques des R_F (relatifs ou non) en fonction du pourcentage de méthanol ajouté au chloroforme.

L'intérêt que présente la chromatographie en couche mince pour l'étude des aflatoxines n'est plus à démontrer, cette méthode va se perfectionnant, de nouvelles techniques voient le jour à un rythme accéléré.

Un matériel plus simple est ici utilisé et on recherche dans une série éluotrope le meilleur système de solvant. On mesure alors les variations du R_F , dans le système à deux solvants ainsi déterminé, en fonction des proportions du mélange.

Cette méthode a permis de trouver les meilleures conditions de séparation, les plus simples aussi, compte tenu du matériel utilisé.

I. — MATÉRIEL

1) **Echantillons.** — On utilise un extrait de tourteau d'arachide toxique provenant de Madagascar, réalisé selon la méthode classique du T. P. I. mais non passé sur colonne d'alumine neutre, extrait qui représente le standard du

laboratoire pour ses études concernant les aflatoxines.

2) Support pour chromatographie en couche mince (C. M.).

a) *Inconvénients des plaques de verre comme support de la C. M.*

Une des plus grandes limitations à cette méthode venait de la nécessité de préparer soi-même des plaques de verre recouvertes de la C. M. ; on sait l'importance, parmi tous les facteurs qui interviennent au cours d'une chromatographie de son épaisseur et en particulier de sa régularité pour l'obtention de séparations reproductibles. Malgré le grand nombre d'appareils offerts par le commerce pour cet usage, le contrôle de l'épaisseur de couche reste peu précis. La préparation des plaques représente en outre un travail long et fastidieux. Ne seront cités que pour mémoire, l'encombrement et le poids, les lavages et dégraissages spéciaux, le stockage délicat des résultats (fig. 5) (chromatogrammes), etc...

b) *Support utilisé.*

C'est un produit qui se présente sous l'aspect d'un plan-film recouvert de la couche mince (très mince ici : autour de $50\ \mu$), que l'on trouve dans le commerce au format 10×10 ou 20×20 cm. Les travaux ont été faits sur un de ces films recouvert de gel de silice référence « PE3516 » type K 301 V (*).

Les avantages recherchés ainsi étaient les suivants : une épaisseur de couche aussi rigoureusement constante que possible, une plus grande maniabilité des chromatogrammes, enfin leur réalisation plus aisée et surtout plus rapide dans des cuves de format réduit exigeant peu de solvant.

II. — MÉTHODES

Les feuilles sont simplement découpées avec des ciseaux au format désiré : 5×1 , ou 5×10 cm, ou tout autre format utile. Elles sont ensuite activées juste avant le dépôt des échantillons en étuve à 105° pendant 35 minutes. Puis le plus rapidement possible, on procède au développement dans un simple becher fermé her-

métiquement par un bouchon en caoutchouc supportant en son centre une pince pour suspendre le chromatogramme. Le volume utile de la cuve ainsi réalisée est de 400 ml ou 600 ml, donc extrêmement réduit par rapport aux cuves classiques pour C. M. sur plaque de verre. On peut même le réduire encore en diminuant le format du chromatogramme.

L'atmosphère de la cuve est saturée au préalable par le même solvant qui sert au développement pendant au moins 30 minutes, mais on ne procède à aucune saturation des feuilles chromatographiques avant d'entamer le développement qui se fait par la méthode ascendante dès l'introduction de la feuille.

Les échantillons de 0,002 ml déposés à 0,6 mm du bas de la feuille sont distants de 10 mm entre eux et du bord ; ils sont déposés avec des micropipettes de 0,01 ml divisées en 0,001 ml.

Les migrations durent de 20 à 25 minutes, les températures variant de 21° à 25° C, pour des migrations de solvant allant de 50 à 65 mm. Les résultats indiqués ici ont tous été obtenus pour une migration de 62 mm.

On déposait sur chaque chromatogramme 0,002 ml d'un mélange de colorants test composé d'azobenzol, de paraméthoxyazobenzol, d'aminoozotoluol, d'aminoozobenzol-azo- β -naphthol (Rouge Soudan III), de p-amino azobenzol et de p-hydroxyazobenzol pour contrôler et comparer les conditions de travail, en particulier l'activité de la couche et mesurer des R_F relatifs.

Ces R_F relatifs présentent l'avantage de permettre l'élimination de l'effet de cuve due aux conditions particulières qui président à chaque analyse chromatographique malgré tous les efforts de standardisation.

III. — CHOIX DU SYSTÈME DE SOLVANT

L'étude de ce même extrait ayant déjà été réalisée en C. M. sur plaque de verre, il était facile de comparer aux résultats déjà obtenus, ceux que la méthode ici utilisée permettra d'obtenir et surtout d'apprécier la qualité des séparations selon le système de solvant.

Le solvant de développement servait toujours à dissoudre l'échantillon dans les proportions constantes de 20 gouttes d'extrait brut pour 0,5 ml.

Les critères retenus étaient la séparation ainsi

(*) Société KODAK-PATHÉ.

que la migration des deux taches fluorescentes bleu turquoise et bleu violette des aflatoxines, dont on mesurait les R_F , ainsi que les R_F relatifs au Rouge Soudan III.

Les résultats peuvent être présentés en décrivant une série éluotrope par classement des solvants selon la migration de plus en plus grande de la tache bleue fluorescente ; on suit ainsi un ordre croissant de la force d'éluotion. Dans cette première phase, une seule tache bleue était révélée : (Tableau I).

Il faut noter que ces résultats sont obtenus avec un gel de sicile d'activité II d'après les teneurs en eau et la migration des colorants témoins. Comme sur les plaques de verre, c'est le mélange chloroforme méthanol qui semble permettre les migrations les plus grandes. C'est donc lui qui va être étudié plus en détail.

Le tableau (II) et les graphiques qui s'y rapportent (fig. 1 et 2) permettent de choisir le système de solvant pour la chromatographie en fonction du résultat désiré.

Si on veut obtenir le maximum de résolution, c'est-à-dire séparer au maximum les spots correspondant aux aflatoxines tout en ayant une migration moyenne qui corresponde à un R_F moyen d'environ 0,45 on choisira un mélange chloroforme méthanol 98,9 : 1,1, mais on saura alors qu'une faible erreur dans les proportions du mélange introduira une grande erreur dans les déterminations des R_F .

Si par contre on cherche surtout la reproductibilité des résultats, on choisira un mélange allant de 2 à 3,5 p. 100 de méthanol car alors une variation dans la quantité de méthanol n'introduira qu'une faible erreur dans la détermination des R_F .

Les courbes semi-logarithmiques (fig. 3 et 4) permettent d'avoir un aperçu global des variations de R_F en fonction de pourcentage de méthanol allant de 0 à 100 p. 100. La portion la plus intéressante du graphique étant avant 10 p. 100

de méthanol a pu être représentée directement (fig. 1 et 2).

La transposition pure et simple des résultats obtenus sur plaque de verre est donc impossible puisque dans ce cas c'est avec 5 p. 100 de méthanol que les R_F mesurés sont les plus grands et les deux spots correspondant aux aflatoxines les plus nettement distincts.

Cette différence peut être due à la nature de la couche active ici établie sur un support film souple, et surtout à sa minceur.

V. — CONCLUSIONS : Intérêt de cette méthode

Il réside surtout dans le support utilisé qui n'a plus besoin d'être préparé et stocké dans de grands excitateurs et qui 30 mn après le découpage au format désiré est prêt à l'emploi. En une heure on a des résultats et les chromatogrammes peuvent être directement conservés en dossier sans aucune préparation. Les quantités de solvant nécessaires sont tellement réduites que n'importe quel laboratoire en dispose sans achats spéciaux.

Le matériel est celui de tous les jours, bechers, bouchons en caoutchouc et pinces métalliques (inox).

Du point de vue personnel spécialisé, tout manipulateur un peu soigneux obtiendra d'excellents résultats dès l'abord et c'est peut-être là que réside l'avantage décisif de ce mode opératoire.

Enfin, l'étude des variations de R_F en fonction des proportions du solvant ne peut être réalisée de façon pratique que grâce à ce nouveau support, on se heurte autrement à la difficulté d'obtenir 50 plaques de verre recouvertes d'une couche mince identique et préparées en une seule fois. Cette méthode permet donc non seulement d'améliorer les résultats déjà acquis mais aussi de tenter des recherches dans de nouvelles directions.

TABLEAU N° I

Solvant		Séparation	Migration R_F moyen	Couleur et Intensité de la fluorescence**	Nombre d'essais
Nature du solvant	Qualité				
Benzène	réactif pur Merck	0	0		2
Ether éthylrique	rectifié	0	0		2
Chloroforme	rectifié redistillé	0	0,01	B +++	2
Acétone	RP	0	0,36	B ++	7
Acétone } méthanol } (95 : 5)*	RP pur 99° Osi	0	0,40	B +++	6
Méthanol	pur 99° Osi	0	0,41	B +	3
Chloroforme } méthanol } (90 : 10)	rectifié redistillé pur 99° Osi	0	0,58	BV +++	15
Chloroforme } méthanol } (85 : 15)	-id.-	0	0,65	B +++	15

*Chiffres en pourcentage du mélange en volume.

**B = bleu. BV = bleu violet.

Tableau I. — Série éluotrope des aflatoxines B et aspect correspondant des chromatogrammes en lumière ultraviolette ($\lambda = 365 \text{ m}\mu$).

TABLEAU N°II

Pourcentage de méthanol pur à 99° (en volume)	Migration*		Nombre d'analyses	Séparation des 2 taches BT et BV d'aflatoxines	Nombre et couleur des spots fluorescents**
	R_F moyens	R_F relatifs moyens			
0,1	0,16 - 0,22	0,26 - 0,36	3	Oui	1 BT et 1 BV
0,25	0,19 - 0,24	0,29 - 0,37	3	"	" "
0,4	0,19 - 0,25	0,28 - 0,37	3	"	" "
0,5	0,19 - 0,26	0,29 - 0,39	3	"	" "
0,6	0,22 - 0,29	0,35 - 0,47	12	"	" "
0,7	0,24 - 0,31	0,36 - 0,45	10	"	" "
0,9	0,24 - 0,30	0,33 - 0,43	17	"	" "
1	0,26 - 0,30	0,33 - 0,44	28	"	" "
1,1	0,27 - 0,36	0,40 - 0,52	3	"	" "
1,5	0,30 - 0,34	0,42 - 0,52	18	"	" "
2	0,28 - 0,35	0,48 - 0,58	14	"	" "
3	0,30 - 0,36	0,50 - 0,60	12	"	" "
3,5	0,38	0,51	12	Non	1 B
4	0,39	0,64	12	"	"
5	0,50	0,72	3	"	"
10	0,58	0,81	15	"	"
15	0,65	0,83	15	"	"
40	0,63	0,87	12	"	"
50	0,45	0,73	12	"	"

Nombre moyen d'analyses : 10,31. Ecart type moyen pondéré : 0,027

*Quant il ya deux chiffres dans la colonne R_F , ils correspondent le premier au spot BT, le second au spot BV; quand il n'y en a qu'un, il correspond à un spot unique bleu.

** BT = bleu turquoise. BV = bleu violet.

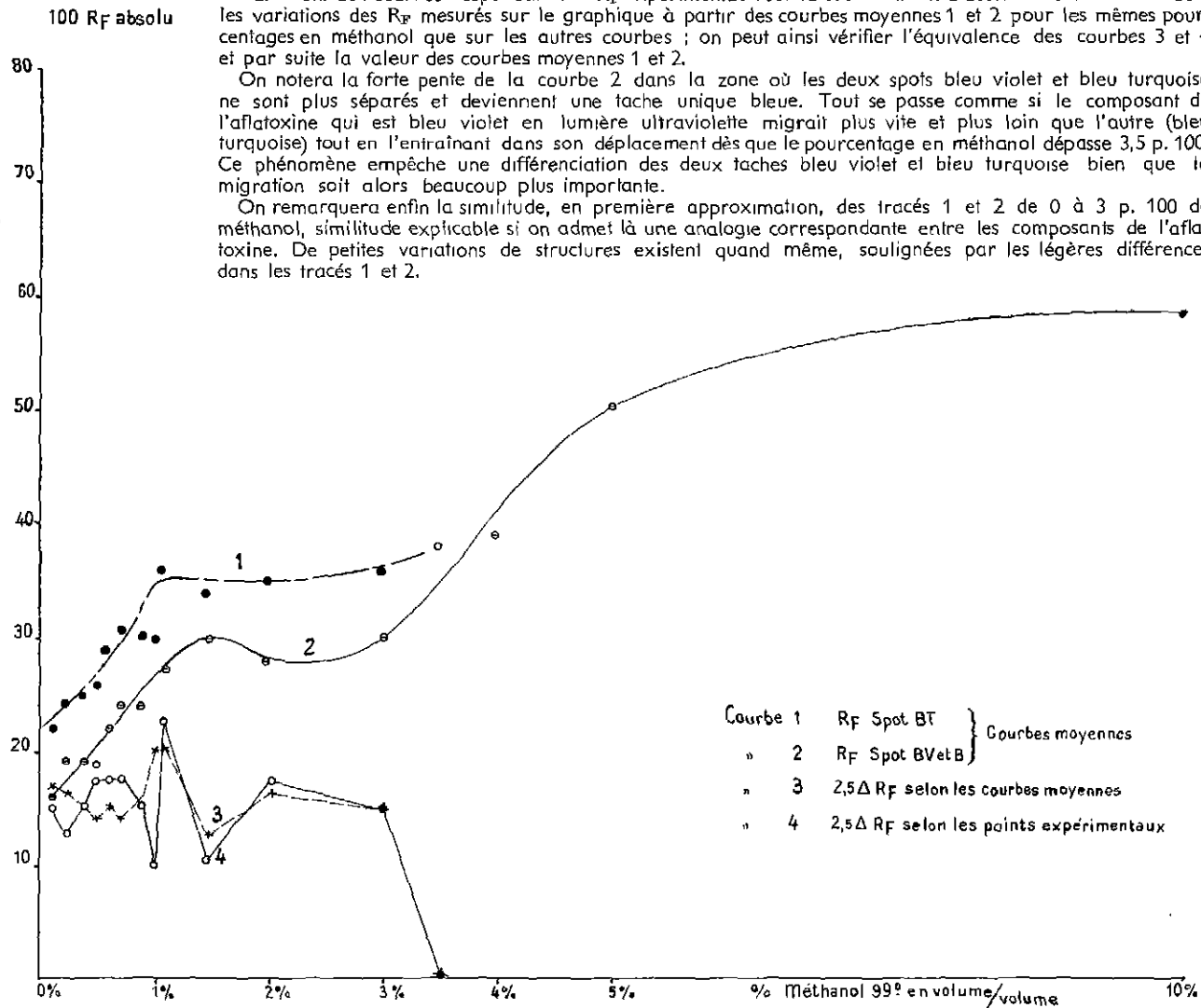
Tableau II. — Valeurs des R_F et des R_F relatifs au Rouge Soudan III, des aflatoxines B selon la richesse en méthanol du chloroforme.

Fig. 1. — Variations des R_F (colonne R_F moyen du tableau II) des aflatoxines en fonction d'une richesse en méthanol du solvant allant de 0 à 10 p. 100 sur la courbe 1 pour le spot bleu turquoise, et sur la courbe 2 pour les spots bleu violet et bleu.

Variations de l'écart correspondant aux R_F expérimentaux sur la courbe 4. On a aussi tracé sur la courbe 3 les variations des R_F mesurés sur le graphique à partir des courbes moyennes 1 et 2 pour les mêmes pourcentages en méthanol que sur les autres courbes ; on peut ainsi vérifier l'équivalence des courbes 3 et 4 et par suite la valeur des courbes moyennes 1 et 2.

On notera la forte pente de la courbe 2 dans la zone où les deux spots bleu violet et bleu turquoise ne sont plus séparés et deviennent une tache unique bleue. Tout se passe comme si le composant de l'aflatoxine qui est bleu violet en lumière ultraviolette migrerait plus vite et plus loin que l'autre (bleu turquoise) tout en l'entraînant dans son déplacement dès que le pourcentage en méthanol dépasse 3,5 p. 100. Ce phénomène empêche une différenciation des deux taches bleu violet et bleu turquoise bien que la migration soit alors beaucoup plus importante.

On remarquera enfin la similitude, en première approximation, des tracés 1 et 2 de 0 à 3 p. 100 de méthanol, similitude explicable si on admet là une analogie correspondante entre les composants de l'aflatoxine. De petites variations de structures existent quand même, soulignées par les légères différences dans les tracés 1 et 2.



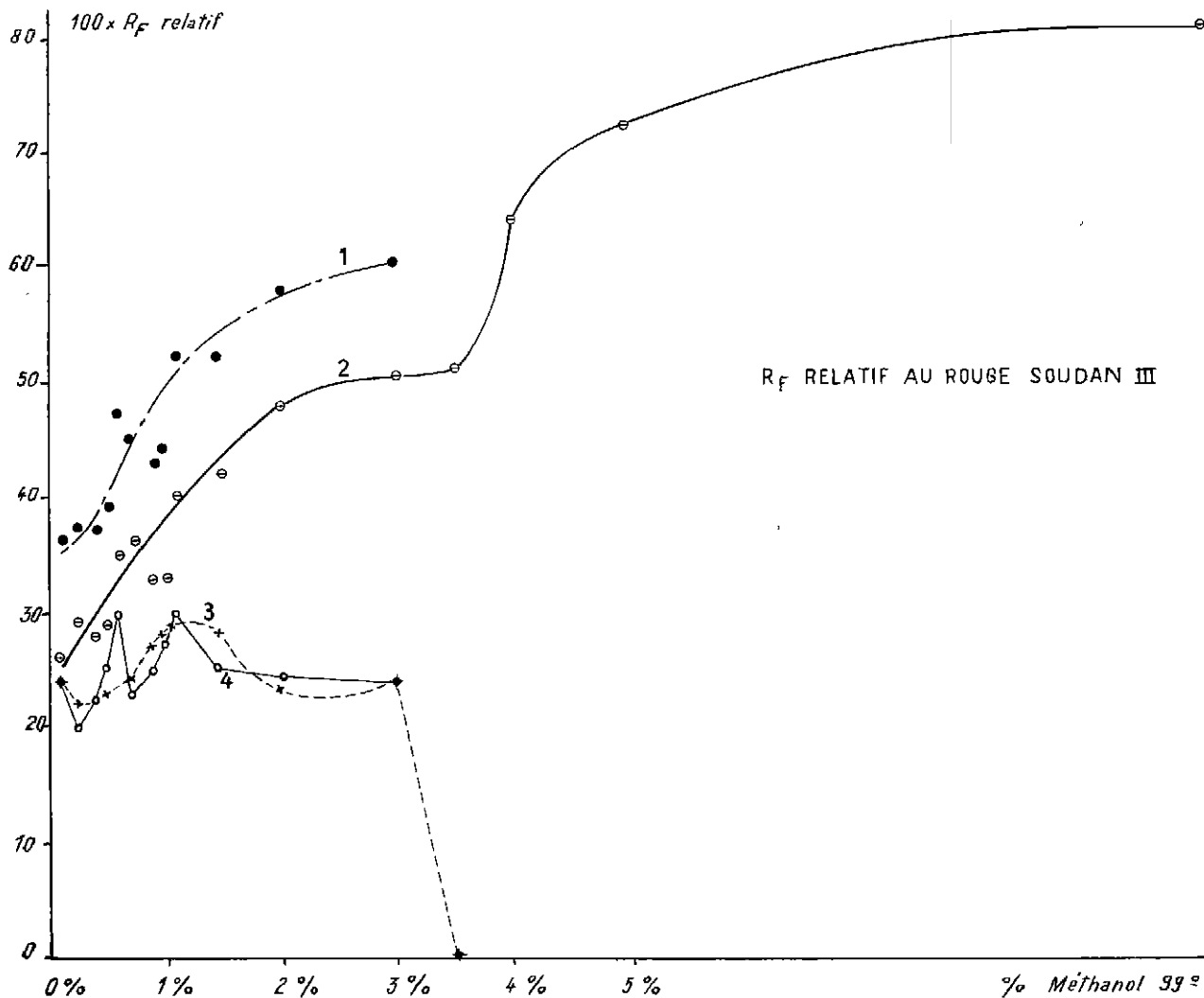


Fig. 2. — De la même façon que sur la figure 1, sont représentés ici les R_F relatifs au rouge Soudan III (colonne R_F relatifs du tableau II.)

Les courbes 1 et 2 de ces deux figures sont très voisines avec toutefois beaucoup moins d'accidents dans le cas des R_F relatifs ce qui permet une utilisation plus aisée des résultats mais ne rend pas compte aussi exactement de la migration des aflatoxines.

On voit ici nettement que la plus grande résolution est obtenue avec 1,1 p. 100 de méthanol, tandis que les mesures les plus facilement reproductibles sont faites de 2 à 3 p. 100 de méthanol.

Avec 5 p. 100 de méthanol (solvant utilisé pour chromatographie en couche mince sur plaque de verre) on n'obtient plus aucune séparation.

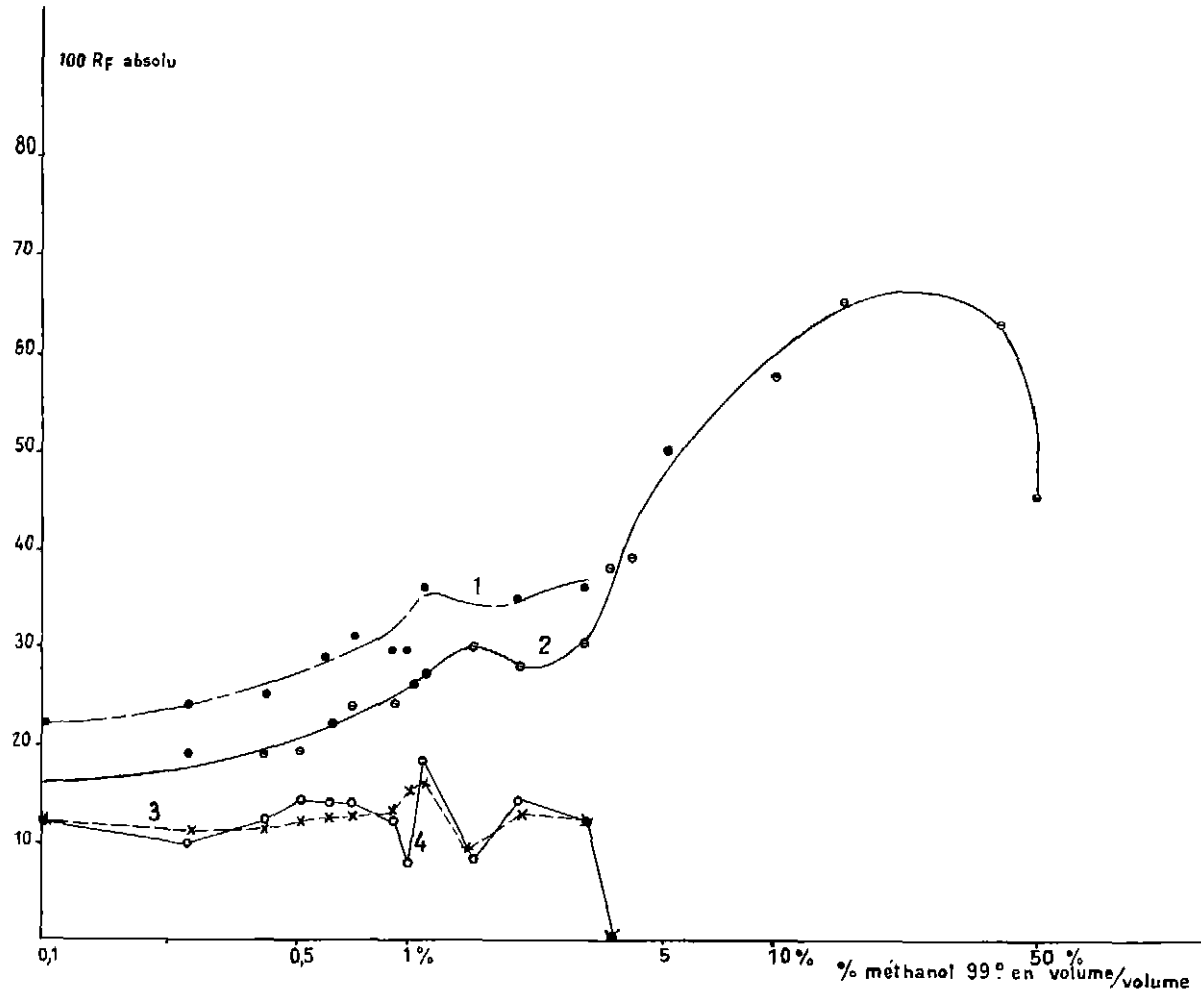


Fig. 3. — Même courbe que la figure 1 (R_F absolu) mais ici une échelle logarithmique a été utilisée pour les pourcentages de méthanol afin de les représenter de 0,1 à 100 p. 100

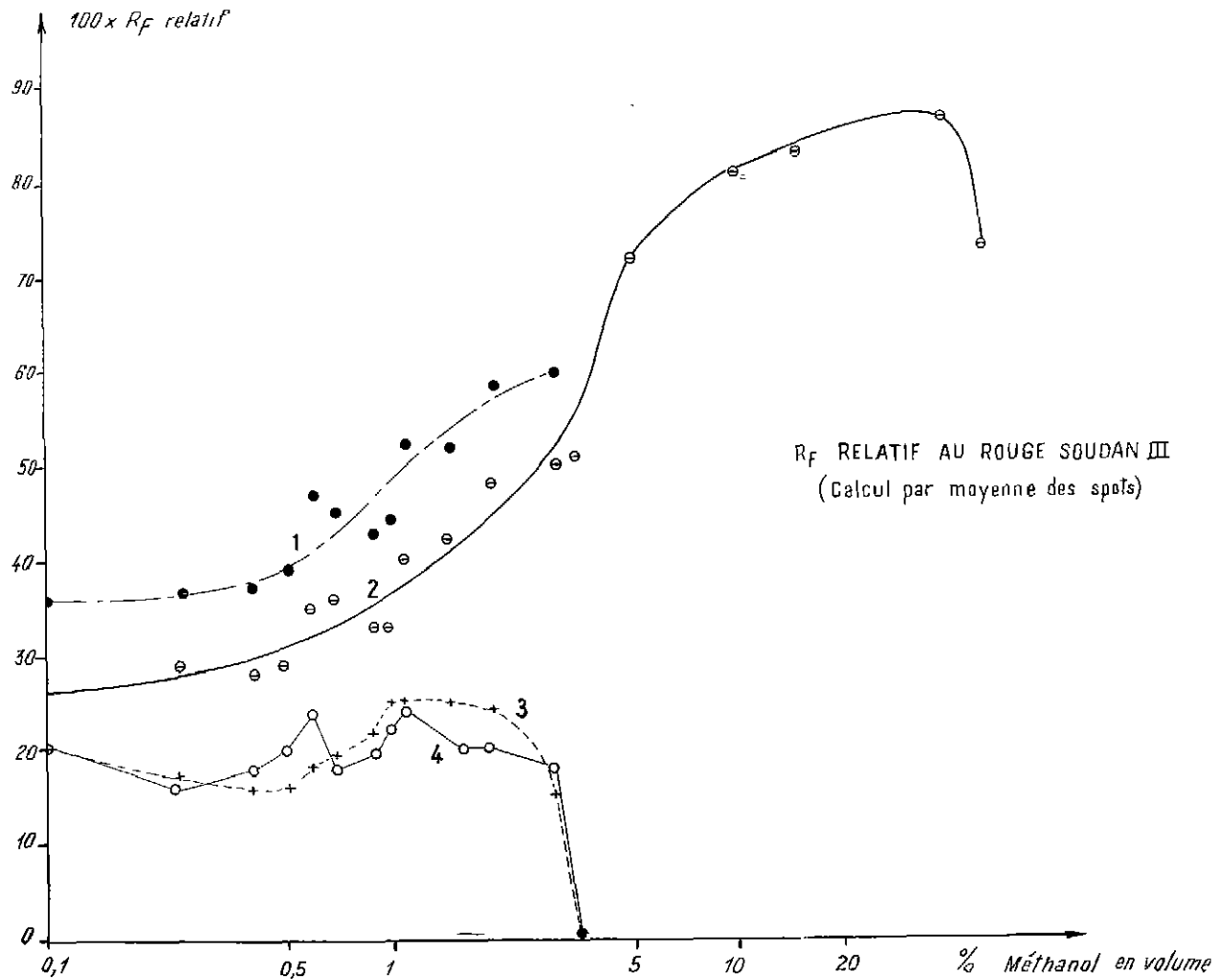


Fig. 4. — Même courbe que la figure 2 (R_F relatif) avec une échelle logarithmique pour représenter les pourcentages de méthanol de 0,1 à 100 p. 100.



Fig. 5. — Comparaison d'un chromatogramme en C. M. sur plaque de verre en bas et du support plan film en haut, vus en lumière ultraviolette à 365 m μ . Les deux chromatogrammes sont représentés à la même échelle.

SUMMARY

Quick chromatographic process for the study of aflatoxins fluorescence

Thin layer chromatography allowed adequately equipped laboratories to obtain very satisfactory results in the study of aflatoxins fluorescence. Here is a method which can be used by any laboratory without any special equipment. One just has to use thin layers spread over supple bearings similar to those of plane films according to the described process. Discussion is about the choice of the solvents system ; the best for aflatoxins separation is a mixture of chloroform and methanol (98.9 ; 1.1).

The conclusion is that it is not possible to extrapolate directly from the results obtained on a glass pane since the mixture 95.5 is the one allowing then the best separations ; one has to search systematically for the solvent combination offering the best results.

This research is made possible with these new bearings and one can even study the phenomenon of chromatographic separation in an accurate manner as shown by diagrams of R_f (relative or not) according to the percentage of methanol added to chloroform.

RESUMEN

Medio cromatográfico rápido para el estudio de la fluorescencia de las aflatoxinas

La cromatografía en capa delgada sobre lamina de vidrio permitia obtener resultados muy interesantes en el estudio de la fluorescencia de las aflatoxinas, a los laboratorios equipados para este trabajo. He aqui un método el cual puede ser empleado por cualquier laboratorio sin ningún material especial. Basta utilizar, bajo el medio ya indicado las capas delgadas extendidas ya sobre un soporte flexible, semejante a los de los planos-pellicula. La discusión cae sobre la elección del sistema de solvente ; el mejor para separar las aflatoxinas es una mezcla cloroformo-Metanol (98,9 : 1,1).

De esto concluyen que no es posible transponer directamente los resultados obtenidos sobre lamina de vidrio ya que, entonces, es la mezcla 95 : 5, que permite las mejores separaciones y que se necesita buscar sistemáticamente la combinación de solvente dando el mejor resultado.

Esta busca es posible con estos nuevos soportes y se puede aún, iniciar al estudio de los fenómenos que dirigen la separación cromatográfica, de un modo exacto, asi como lo demuestran las presentaciones gráficas de los R_F (relativos o no) función al porcentaje de Metanol añadido al cloroformo.

BIBLIOGRAPHIE

- BROADBENT (J. H.). — **A thin layer chromatographic methods.** *Analyst.*, 1963, (88), n° 1044, 209-216.
- RANDERATH (K.). — **Chromatographie sur couches minces.** Gauthiers Villars Editeurs Paris, 1964.
- PETIT (J. P.), RIVIERE (R.), PERREAU (P.) et PAGOT (J.). — **Recherches sur l'aflatoxine.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays Trop.*, 1964, 17 (2) : 239-53.
- Tropical Product Institute. — **T. P. I. A method for the detection of aflatoxin in groundnuts and groundnuts products.** — TPI report n° 36/62.