

Norme internationale



6651

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Aliments des animaux — Dosage de l'aflatoxine B₁

Animal feeding stuffs — Determination of aflatoxin B₁ content

Première édition — 1983-04-01

CDU 636.085 : 543.544

Réf. n° : ISO 6651-1983 (F)

Descripteurs : produit d'alimentation animale, analyse chimique, dosage, aflatoxine.

Prix basé sur 8 pages

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 6651 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et a été soumise aux comités membres en mars 1981.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée:

Afrique du Sud, Rép. d'	France	Philippines
Australie	Hongrie	Pologne
Autriche	Inde	Portugal
Brésil	Iran	Roumanie
Canada	Iraq	Sri Lanka
Chili	Irlande	Tanzanie
Corée, Rép. de	Israël	Thaïlande
Danemark	Italie	Turquie
Dominicaine, République	Kenya	URSS
Égypte, Rép. arabe d'	Malaisie	Yougoslavie
Espagne	Mexique	
Éthiopie	Nouvelle-Zélande	

Les comités membres des pays suivants l'ont désapprouvée pour des raisons techniques:

Royaume-Uni
USA

Cette Norme internationale a également été approuvée par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA).

Aliments des animaux — Dosage de l'aflatoxine B₁

1 Objet

La présente Norme internationale spécifie deux procédés de dosage de l'aflatoxine B₁ dans les aliments des animaux.

2 Domaine d'application

2.1 Procédé A, applicable aux aliments simples suivants:

- graines oléagineuses et tourteaux, et, en particulier d'arachide, de coprah, de lin, de soja, de sésame, de babassu;
- farine de manioc;
- tourteaux de germes de maïs;
- céréales et produits céréaliers;
- farine de pois;
- pulpe et fécule de pommes de terre.

En présence de substances interférentes qui entravent les déterminations selon le procédé A, il est recommandé d'effectuer la détermination selon le procédé B.

2.2 Procédé B, applicable aux aliments composés ainsi qu'aux aliments simples non mentionnés en 2.1.

Ce procédé ne s'applique pas aux aliments contenant des pulpes d'agrumes.

2.3 La limite de détection de l'aflatoxine B₁ se situe à 0,01 mg/kg.

3 Référence

ISO 6498, *Aliments des animaux — Préparation des échantillons pour essai*.¹⁾

4 Principe

Extraction au chloroforme sur une prise d'essai, filtration puis purification d'une partie aliquote sur colonne de gel de silice. Évaporation de l'éluat et dissolution du résidu dans un volume déterminé de chloroforme ou d'un mélange benzène-acétonitrile.

Chromatographie sur couche mince, monodimensionnelle pour le procédé A et bidimensionnelle pour le procédé B, d'une partie aliquote de cette solution.

Détermination de la teneur en aflatoxine B₁, par mesure visuelle ou à l'aide d'un fluorodensitomètre, de l'intensité de fluorescence du chromatogramme examiné à la lumière UV, par comparaison avec des quantités connues d'un étalon d'aflatoxine B₁ placé sur la même plaque que l'échantillon.

Confirmation de l'identité de l'aflatoxine B₁ par formation du dérivé hémiacétal.

5 Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

5.1 Chloroforme, stabilisé par 0,5 à 1,0 % d'éthanol à 96 % (V/V).

5.2 *n*-Hexane.

5.3 Oxyde diéthylique, anhydre, exempt de peroxydes.

5.4 Mélange benzène/acétonitrile (98 + 2).

Mélanger 98 volumes de benzène avec 2 volumes d'acétonitrile.

5.5 Mélange chloroforme/méthanol (97 + 3).

Mélanger 97 volumes de chloroforme avec 3 volumes de méthanol.

5.6 Solvants de développement.²⁾

5.6.1 Mélange chloroforme/acétone (90 + 10).

Mélanger 90 volumes de chloroforme avec 10 volumes d'acétone, en cuve non saturée.

5.6.2 Mélange oxyde diéthylique/méthanol/eau (96 + 3 + 1).

Mélanger 96 volumes d'oxyde diéthylique avec 3 volumes de méthanol et 1 volume d'eau, en cuve non saturée.

1) Actuellement au stade de projet.

2) Les solvants doivent être utilisés dans des cuves couvertes. Lorsque des cuves saturées sont spécifiées, ceci est réalisé en les recouvrant intérieurement avec du papier filtre et en laissant la cuve se saturer avec les vapeurs de solvant.

5.6.3 Mélange oxyde diéthylique/méthanol/eau (94 + 4,5 + 1,5).

Mélanger 94 volumes d'oxyde diéthylique avec 4,5 volumes de méthanol et 1,5 volumes d'eau, en cuve saturée.

5.6.4 Mélange chloroforme/méthanol (94 + 6).

Mélanger 94 volumes de chloroforme avec 6 volumes de méthanol, en cuve saturée.

5.6.5 Mélange chloroforme/méthanol (97 + 3).

Mélanger 97 volumes de chloroforme avec 3 volumes de méthanol, en cuve saturée.

5.7 Gel de silice, pour chromatographie sur colonne, granulométrie : 0,05 à 0,20 mm.

5.8 Gel de silice, G-HR ou équivalent, pour chromatographie sur couche mince.

5.9 Terre de diatomées (Hyflosupercel), lavée à l'acide.

5.10 Sulfate de sodium, granulés anhydres.

5.11 Acide trifluoroacétique.

5.12 Gaz inerte, par exemple azote.

5.13 Acide sulfurique, solution à 50 % (V/V).

5.14 Aflatoxine B₁, solution étalon contenant environ 0,1 µg d'aflatoxine B₁ par millilitre dans le chloroforme (5.1) ou dans le mélange benzène/acétonitrile (5.4).

AVERTISSEMENT — Les aflatoxines sont fortement cancérogènes et doivent être manipulées avec beaucoup de précaution.

Préparer et contrôler la solution comme indiqué ci-après.

5.14.1 Préparation de la solution mère et détermination de sa concentration

Préparer une solution d'aflatoxine B₁, dans le chloroforme (5.1) ou dans le mélange benzène/acétonitrile (5.4), de concentration comprise entre 8 et 10 µg/ml. Déterminer son spectre d'absorption entre 330 et 370 nm à l'aide du spectrophotomètre (6.9).

Relever l'absorbance (A) à 363 nm dans le cas d'une solution chloroformique, ou à 348 nm dans le cas d'une solution dans le mélange benzène/acétonitrile.

Calculer la concentration d'aflatoxine B₁, en microgrammes par millilitre de solution, à partir des formules suivantes :

a) pour la solution chloroformique :

$$\frac{312 \times A \times 1\,000}{20\,600}$$

b) pour la solution dans le mélange benzène/acétonitrile :

$$\frac{312 \times A \times 1\,000}{19\,800}$$

5.14.2 Dilution

Effectuer à l'abri de la lumière les dilutions convenables de la solution mère (5.14.1) pour obtenir une solution étalon dont la concentration en aflatoxine B₁ soit d'environ 0,1 µg/ml.

Conservée au réfrigérateur à 4 °C, cette solution est stable durant 2 semaines.

5.14.3 Contrôle de la pureté chromatographique de la solution

Déposer sur une plaque (6.7) une tache de 5 µl de la solution mère d'aflatoxine B₁ de concentration 8 à 10 µg/ml (5.14.1). Développer le chromatogramme comme indiqué en 8.5.1. Sous lumière UV, la fluorescence ne doit donner lieu qu'à la perception d'une seule tache et aucune fluorescence ne doit être perçue dans la zone du dépôt d'origine.

5.15 Aflatoxines B₁ et B₂ (voir l'avertissement en 5.14), solutions pour l'essai qualitatif, contenant environ 0,1 µg d'aflatoxines B₁ et B₂ par millilitre dans le chloroforme (5.1) ou dans le mélange benzène/acétonitrile (5.4).

Ces concentrations sont données à titre indicatif. Elles doivent être ajustées de manière à obtenir la même intensité de fluorescence pour les deux aflatoxines (voir 8.5.1).

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment

6.1 Broyeur.

6.2 Tamis, de 1,0 mm d'ouverture de maille (voir ISO 565).

6.3 Appareil à secouer ou agitateur magnétique.

6.4 Tube pour chromatographie, en verre (diamètre intérieur 22 mm, longueur 300 mm), avec robinet de PTFE et réservoir de 250 ml, muni à son extrémité d'un tampon de coton ou de laine de verre.

6.5 Appareil rotatif à évaporation sous vide, avec ballon à fond rond de 500 ml.

6.6 Appareillage pour chromatographie sur couche mince, à savoir matériel nécessaire à la préparation des plaques (6.7) et au dépôt des taches (pipettes capillaires ou microseringues), cuve de développement et appareil pour pulvériser l'acide sulfurique (5.13) sur les plaques.

6.7 Plaques de verre pour chromatographie sur couche mince, 200 mm × 200 mm préparées comme suit (les quantités indiquées conviennent pour recouvrir cinq plaques).

Introduire 30 g de gel de silice (5.8) dans une fiole conique, ajouter 60 ml d'eau, boucher et agiter durant 1 min. Étendre la suspension sur les plaques, de manière à obtenir une couche uniforme de 0,25 mm d'épaisseur. Laisser sécher à l'air et conserver ensuite dans un dessiccateur garni de gel de silice. Au moment de l'emploi, activer les plaques en les maintenant durant 1 h dans une étuve à 110 °C.

Les plaques prêtes à l'emploi conviennent dans la mesure où elles donnent des résultats semblables à ceux des plaques préparées comme indiqué ci-dessus.

6.8 Lampe UV à ondes longues (360 nm).

L'intensité d'irradiation doit permettre de distinguer encore nettement une tache de 1,0 ng d'aflatoxine B₁ sur une plaque pour chromatographie sur couche mince, à une distance de 10 cm de la lampe.

AVERTISSEMENT — La lumière UV étant dangereuse pour les yeux, il y a lieu de porter des lunettes protectrices.

6.9 Spectrophotomètre, permettant d'effectuer les mesures dans l'ultra-violet.

6.10 Fluorodensitomètre (éventuellement).

6.11 Papier filtre à plis.

6.12 Tube gradué, de 10,0 ml de capacité, avec bouchon de polyéthylène.

6.13 Fiole conique, de 500 ml de capacité, à bouchon rodé.

6.14 Pipette, de 50 ml de capacité.

6.15 Balance.

7 Échantillonnage

Prélever l'échantillon pour laboratoire sur le produit à échantillonner, en se conformant à la Norme internationale relative au produit concerné, sauf si l'échantillonnage en vue de la détermination de l'aflatoxine est exclu de son domaine d'application. S'il n'existe pas de Norme internationale appropriée, les parties concernées doivent se mettre d'accord, en tenant compte des caractéristiques du produit à échantillonner.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon pour essai

8.1.1 Si l'échantillon contient plus de 5 % de matières grasses, celui-ci doit être dégraissé à l'éther de pétrole avant d'effectuer le broyage.

Les résultats devront alors être rapportés à la masse d'échantillon non dégraissé.

8.1.2 Broyer l'échantillon pour laboratoire, de façon qu'il passe en totalité au travers du tamis (6.2). Bien homogénéiser. (Voir ISO 6498.)

8.2 Prise d'essai

Peser à 0,01 g près, 50 g de l'échantillon pour essai dans la fiole conique (6.13).

8.3 Extraction

Ajouter à la prise d'essai (8.2) 25 g de terre de diatomées (5.9), puis 25 ml d'eau et 250 ml de chloroforme (5.1) mesurés avec soin à l'aide d'une éprouvette. Boucher la fiole, secouer ou agiter durant 30 min à l'aide de l'appareil (6.3). Filtrer sur papier filtre (6.11) en ayant soin d'éliminer les 10 premiers millilitres de filtrat et de recueillir une quantité de filtrat supérieure à 50 ml.

8.4 Purification

8.4.1 Préparation de la colonne

Remplir les deux tiers du tube pour chromatographie (6.4) avec du chloroforme (5.1) et ajouter 5 g de sulfate de sodium (5.10). S'assurer que la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium est plane, puis ajouter par petites fractions 10 g de gel de silice (5.7). Remuer avec précaution après chaque addition pour éliminer les bulles d'air. Laisser décanter durant 15 min et ajouter ensuite avec précaution 10 g de sulfate de sodium (5.10). Ouvrir le robinet et laisser s'écouler le liquide jusqu'à proximité immédiate de la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium. Fermer le robinet.

8.4.2 Purification

Prélever à la pipette (6.14) 50 ml du filtrat recueilli en 8.3 dans une fiole conique de 250 ml, ajouter 100 ml de *n*-hexane (5.2). Mélanger et transvaser quantitativement le mélange dans la colonne en rinçant avec du *n*-hexane. Ouvrir le robinet et laisser s'écouler le liquide à une vitesse de 8 à 12 ml/min, jusqu'à la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium. Fermer le robinet. Éliminer le liquide récupéré et ajouter dans la colonne 100 ml d'oxyde diéthylique (5.3). Ouvrir le robinet et éliminer à nouveau le liquide jusqu'à la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium. Veiller lors de ces opérations à ce que la colonne ne soit pas mise à sec.

Verser ensuite 150 ml du mélange chloroforme/méthanol (5.5) et récupérer la totalité de l'éluat dans le ballon de 500 ml de l'évaporateur rotatif (6.5). Évaporer à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif, de préférence sous un courant de gaz inerte (5.12), à pression réduite et à une température ne dépassant pas 50 °C.

NOTE — En l'absence d'un évaporateur rotatif, ajouter un régularisateur d'ébullition et évaporer presque jusqu'à sec sur un bain d'eau.

Transvaser quantitativement le résidu dans le tube gradué de 10 ml (6.12) à l'aide de chloroforme (5.1) ou du mélange benzène/acétonitrile (5.4). Évaporer à nouveau la solution, par exemple dans un bain d'eau, de préférence sous un courant de gaz inerte (5.12), et amener ensuite le volume à 2,0 ml avec du chloroforme (5.1) ou du mélange benzène/acétonitrile (5.4).

8.5 Chromatographie sur couche mince

8.5.1 Procédé A — Chromatographie mono-dimensionnelle

8.5.1.1 Choix du solvant

Le choix du solvant (5.6.1, 5.6.2, 5.6.3, 5.6.4 et 5.6.5) doit être effectué au préalable afin de s'assurer que les aflatoxines B₁ et B₂ sont complètement séparées lorsque la plaque est développée, ce qui dépend du lot de plaques en cours d'utilisation.

Déposer 25 µl de la solution qualitative (5.15) sur la plaque préparée (6.7) (pour chaque solvant, une plaque doit être contrôlée).

Suivre le mode opératoire spécifié en 8.5.1.2 pour le développement, l'évaporation et l'irradiation.

Deux taches distinctes sont obtenues lorsque le solvant convient.

8.5.1.2 Mode opératoire

Déposer ponctuellement à l'aide de pipettes capillaires ou de microseringues sur une plaque (6.7) pour chromatographie sur couche mince, à 20 mm du bord inférieur et à des intervalles de 20 mm, les volumes indiqués ci-après de la solution étalon d'aflatoxine B₁ et de l'extrait :

- 10, 15, 20, 30 et 40 µl de la solution étalon d'aflatoxine B₁ (5.14);
- 10 µl de l'extrait obtenu en 8.4.2 et, en superposition sur le même point, 20 µl de la solution étalon d'aflatoxine B₁ (5.14);
- 10 et 20 µl de l'extrait obtenu en 8.4.2.

Développer le chromatogramme à l'abri de la lumière, à l'aide de l'un des solvants de développement choisi (voir 8.5.1.1).

Retirer la plaque de la cuve, laisser évaporer les solvants de la plaque à l'abri de la lumière et examiner ensuite à la lumière UV en plaçant la plaque à 10 cm de la lampe (6.8). Les taches d'aflatoxine B₁ donnent une fluorescence bleue.

8.5.2 Procédé B — Chromatographie bidimensionnelle

8.5.2.1 Application des solutions (voir figure 1)

Tracer sur une plaque (6.7) deux droites parallèles à deux côtés contigus (à des distances respectives de 50 et 60 mm de ces côtés), destinées à délimiter la migration des fronts de solvants. Déposer sur la plaque à l'aide de pipettes capillaires ou de microseringues les solutions indiquées ci-après :

- au point A : 20 µl de l'extrait purifié de l'échantillon, obtenu en 8.4.2;
- au point B : 20 µl de la solution étalon (5.14);
- au point C : 10 µl de la solution étalon (5.14);

— au point D : 20 µl de la solution étalon (5.14);

— au point E : 40 µl de la solution étalon (5.14).

Sécher à l'aide d'un léger courant d'air ou de gaz inerte (5.12). Les taches obtenues doivent avoir un diamètre de 5 mm environ.

8.5.2.2 Développement (voir figure 1)

Développer le chromatogramme dans la direction I à l'aide du solvant de développement (5.6.3) (couche de 1 cm dans une cuve saturée), à l'abri de la lumière, jusqu'à ce que le front de solvant atteigne la ligne de délimitation. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher durant 15 min au moins à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

Développer ensuite le chromatogramme dans la direction II à l'aide du solvant de développement (5.6.1) (couche de 1 cm dans une cuve non saturée), à l'abri de la lumière, jusqu'à ce que le front de solvant atteigne la ligne de délimitation. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

8.5.2.3 Interprétation du chromatogramme (voir figure 2)

Examiner le chromatogramme à la lumière UV en plaçant la plaque à 10 cm de la lampe (6.8). Localiser l'emplacement des taches de fluorescence bleue B, C, D, et E d'aflatoxine B₁ provenant de la solution étalon et tracer deux droites imaginaires passant par ces taches et perpendiculaires aux directions de développement. Le point d'intersection P de ces droites est l'emplacement où l'on devrait s'attendre à trouver la tache d'aflatoxine B₁, provenant de l'extrait de l'échantillon déposé en A (voir figure 1). Toutefois, l'emplacement réel de cette tache peut se trouver en un point Q situé à l'intersection de deux droites imaginaires formant entre elles un angle de 100° environ et passant respectivement par les taches B et C.

8.5.2.4 Chromatographie complémentaire

Tracer sur une nouvelle plaque (6.7) deux droites parallèles à deux côtés contigus, comme indiqué sur la figure 1, et déposer au point A, 20 µl de l'extrait purifié de l'échantillon obtenu en 8.4.2 et, en superposition, 20 µl de la solution étalon (5.14). Développer comme indiqué en 8.5.2.2. Examiner le chromatogramme à la lumière UV et vérifier que

- les taches d'aflatoxine B₁ de l'extrait et de la solution étalon se superposent;
- la fluorescence de cette tache est plus intense que celle de la tache d'aflatoxine B₁ développée au point Q de la première plaque.

8.6 Détermination

Deux techniques de détermination peuvent être utilisées, soit par mesures visuelles, soit par fluorodensitométrie.

8.6.1 Mesures visuelles

8.6.1.1 Procédé A

Déterminer la quantité d'aflatoxine B₁ de l'extrait en comparant l'intensité de fluorescence des taches de l'extrait à celle des taches de la solution étalon. Interpoler si nécessaire.

La fluorescence obtenue par superposition de l'extrait à la solution étalon doit être plus forte que celle des 10 µl d'extrait et elle ne doit donner lieu qu'à la perception d'une seule tache. Si l'intensité de fluorescence donnée par les 10 µl d'extrait est plus forte que celle des 40 µl de solution étalon, diluer l'extrait 10 ou 100 fois avec du chloroforme (5.1) ou avec le mélange benzène/acétonitrile (5.4) avant de le soumettre à une nouvelle chromatographie sur couche mince.

8.6.1.2 Procédé B

Déterminer la quantité d'aflatoxine B₁ de l'extrait en comparant l'intensité de fluorescence de la tache de l'extrait à celle des taches C, D et E de la solution étalon. Interpoler si nécessaire.

Si l'intensité de fluorescence donnée par les 20 µl d'extrait est plus forte que celle des 40 µl de solution étalon, diluer l'extrait 10 ou 100 fois avec du chloroforme (5.1) ou avec le mélange benzène/acétonitrile (5.4) avant de le soumettre à une nouvelle chromatographie sur couche mince.

8.6.2 Mesures par fluorodensitométrie

Mesurer l'intensité de fluorescence des taches d'aflatoxine B₁ au fluorodensitomètre (6.10) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 365 nm et une longueur d'onde d'émission de 443 nm.

Déterminer, dans le cas du procédé A, la quantité d'aflatoxine B₁ des dépôts de l'extrait en comparant les intensités de fluorescence des taches de l'extrait et de la solution étalon et, dans le cas du procédé B, la quantité d'aflatoxine B₁ du dépôt de l'extrait en comparant les intensités de fluorescence de la tache de l'extrait à celles des taches C, D et E de la solution étalon.

8.7 Confirmation de l'identité de l'aflatoxine B₁

Confirmer l'identité de l'aflatoxine B₁ en effectuant le test de présomption à l'acide sulfurique (8.7.1) puis, si le résultat est positif, le test de confirmation proprement dit (8.7.2). Si le résultat du test de présomption est négatif, il est inutile d'effectuer le test de confirmation, car dans ce cas, il n'y a pas d'aflatoxine B₁.

8.7.1 Test de présomption à l'acide sulfurique

Pulvériser de l'acide sulfurique (5.13) sur le chromatogramme obtenu en 8.5.1 ou 8.5.2. La fluorescence des taches d'aflatoxine B₁ doit virer du bleu au jaune sous lumière UV.

8.7.2 Test de confirmation : formation d'aflatoxine B₁-hémicétal (aflatoxine B_{2a})

Dans le cas des aliments simples et peu pigmentés, utiliser la technique par chromatographie monodimensionnelle décrite en

8.7.2.1. Dans le cas des aliments simples pigmentés, des aliments composés ou en cas de doute par la technique précédente, utiliser la technique par chromatographie bidimensionnelle décrite en 8.7.2.2.

8.7.2.1 Chromatographie monodimensionnelle

Tracer un trait sur une plaque (6.7) pour la diviser en deux parties égales. Déposer ponctuellement sur chaque partie, à 20 mm du bord inférieur et à des intervalles de 15 mm, les volumes indiqués ci-après de la solution étalon et de l'extrait :

- 25 µl de la solution étalon d'aflatoxine B₁ (5.14);
- un volume de l'extrait obtenu en 8.4.2 contenant 2,5 ng environ d'aflatoxine B₁;
- 25 µl de la solution étalon d'aflatoxine B₁ (5.14) et, en superposition sur le même point, un volume de l'extrait obtenu en 8.4.2 contenant 2,5 ng environ d'aflatoxine B₁.

Déposer sur une des deux parties de la plaque, en superposition sur les dépôts effectués, 1 à 2 µl d'acide trifluoroacétique (5.11). Sécher ensuite à l'aide d'un courant d'air à la température ambiante.

Développer le chromatogramme à l'abri de la lumière à l'aide de l'un des solvants de développement (5.6). Le choix du solvant doit être établi au préalable. Le système de solvants doit permettre de séparer nettement l'aflatoxine B₁-hémicétal (aflatoxine B_{2a}) des interférences. Le front de solvant doit s'étendre sur environ 120 mm.

Laisser évaporer les solvants à l'abri de la lumière, pulvériser ensuite de l'acide sulfurique (5.13) sur la partie de la plaque non traitée par l'acide trifluoroacétique et examiner la plaque à la lumière UV.

L'identité de l'aflatoxine B₁ est confirmée lorsque

- a) les valeurs du R_f du dérivé de l'aflatoxine B₁ provenant de l'extrait et de la solution étalon correspondent;
- b) le dérivé de l'aflatoxine B₁ provenant de la solution étalon, superposée de l'extrait, a une fluorescence plus intense que le dérivé de l'aflatoxine B₁ provenant de l'extrait.

Étant donné que des taches fluorescentes de l'extrait ayant la même valeur R_f que l'aflatoxine B₁-hémicétal pourraient donner lieu à une interprétation faussement positive du chromatogramme, leur présence devrait être contrôlée sur la partie de la plaque traitée par l'acide sulfurique.

En cas de doute, le test de confirmation par chromatographie bidimensionnelle (8.7.2.2) doit être appliqué.

8.7.2.2 Chromatographie bidimensionnelle (voir figure 3)

8.7.2.2.1 Application des solutions

Tracer sur une plaque (6.7) deux droites parallèles à deux côtés contigus (à des distances de 60 mm de ces côtés), destinées à délimiter la migration des fronts de solvants. Déposer sur une

plaque, à l'aide de pipettes capillaires ou de microseringues, les solutions indiquées ci-après :

- au point A : un volume d'extrait purifié de l'échantillon obtenu en 8.4.2, contenant 2,5 ng environ d'aflatoxine B₁, puis une goutte (1 à 2 µl) d'acide trifluoroacétique (5.11);
- aux points B et C : 25 µl de la solution étalon d'aflatoxine B₁ (5.14), puis une goutte d'acide trifluoroacétique (5.11).

Sécher à l'aide d'un courant d'air à la température ambiante.

8.7.2.2 Développement

Développer le chromatogramme dans la direction I à l'aide du solvant de développement (5.6.2) (couche de 1 cm dans une cuve non saturée), à l'abri de la lumière, jusqu'à ce que le front de solvant atteigne la ligne de délimitation. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher durant 5 min à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

Développer ensuite le chromatogramme dans la direction II à l'aide du solvant de développement (5.6.1) (couche de 1 cm dans une cuve non saturée), à l'abri de la lumière, jusqu'à ce que le front de solvant atteigne la ligne de délimitation. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher à la température ambiante.

8.7.2.3 Interprétation du chromatogramme

Examiner le chromatogramme sous lumière UV (6.8) et vérifier les observations indiquées ci-après :

- a) apparition, au niveau de la solution étalon déposée en C (migration dans la direction I) et de celle déposée en B (migration dans la direction II), d'une tache fluorescente bleue d'aflatoxine B₁-hémiacétal, et parfois, d'une faible tache fluorescente bleue d'aflatoxine B₁ n'ayant pas réagi avec l'acide trifluoroacétique;
- b) apparition de taches similaires à celles indiquées précédemment provenant de l'extrait de l'échantillon déposé en A. L'emplacement de ces taches est défini par celles provenant des solutions étalons déposées en B et C. Les intensités de fluorescence des taches d'aflatoxine B₁-hémiacétal provenant de l'extrait et de l'étalon déposé en B et en C devraient correspondre.

8.8 Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour essai.

9 Expression des résultats

9.1 Modes de calcul et formules

9.1.1 Mesures visuelles

La teneur en aflatoxine B₁, exprimée en microgrammes par kilogramme d'échantillon, est égale à

$$\frac{C \times V_1 \times V_3}{m \times V_2}$$

où

C est la concentration, en microgrammes d'aflatoxine B₁ par millilitre, de la solution étalon (5.14) (environ 0,1 µg/ml);

m est la masse, en grammes, de la prise d'essai correspondant au volume d'extrait soumis à la purification sur colonne (10,0 g);

V₁ est le volume final de l'extrait, en microlitres, compte tenu des dilutions éventuelles;

V₂ et V₃ sont respectivement les volumes, en microlitres, de l'extrait et de la solution étalon d'aflatoxine B₁ (5.14), déposés sur la plaque et ayant une intensité de fluorescence semblable.

9.1.2 Mesures fluorodensitométriques

La teneur en aflatoxine B₁, exprimée en microgrammes par kilogramme d'échantillon, est égale à

$$\frac{m_1 \times V_1}{m \times V_2}$$

où

m est la masse, en grammes, de la prise d'essai, correspondant au volume d'extrait soumis à la purification sur colonne (10,0 g);

m₁ est la masse, en nanogrammes, d'aflatoxine B₁ du dépôt de l'extrait (compte tenu du volume V₂), déduite des déterminations;

V₁ est le volume final de l'extrait, en microlitres, compte tenu des dilutions éventuelles;

V₂ est le volume, en microlitres, de l'extrait déposé sur la plaque (10 ou 20 µl).

9.2 Fidélité

Trois analyses circulaires, dont deux ont été réalisées sur le plan international (n° 1 et 2), portant sur des aliments composés (procédé B), ont donné les résultats indiqués sur le tableau.

Les 11 laboratoires ayant effectué l'analyse circulaire n° 2 ont également analysé l'échantillon proposé par le procédé A, sa composition s'y prêtant, et ont obtenu des résultats très proches de ceux obtenus avec le procédé B, par mesure visuelle ou fluorodensitométrique.

Paramètre	Échantillon		
	1	2	3
Nombre de laboratoires	23	11	13
Moyenne	162,7 µg/kg	25,4 µg/kg	13,4 µg/kg
Écart-type de répétabilité (s _r)	16,9 µg/kg	2,7 µg/kg	1,7 µg/kg
Coefficient de variation de répétabilité	10 %	11 %	13 %
Répétabilité (2,83 s _r)	47,8 µg/kg	7,6 µg/kg	4,8 µg/kg
Écart-type de reproductibilité (s _R)	45,2 µg/kg	6,8 µg/kg	4,0 µg/kg
Coefficient de variation de reproductibilité	28 %	27 %	30 %
Reproductibilité (2,83 s _R)	128,0 µg/kg	19,2 µg/kg	11,3 µg/kg

10 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée (procédé A ou B), la technique de détermination (mesure visuelle ou fluorodensitométrie) et les résultats obtenus. Il doit, en

outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

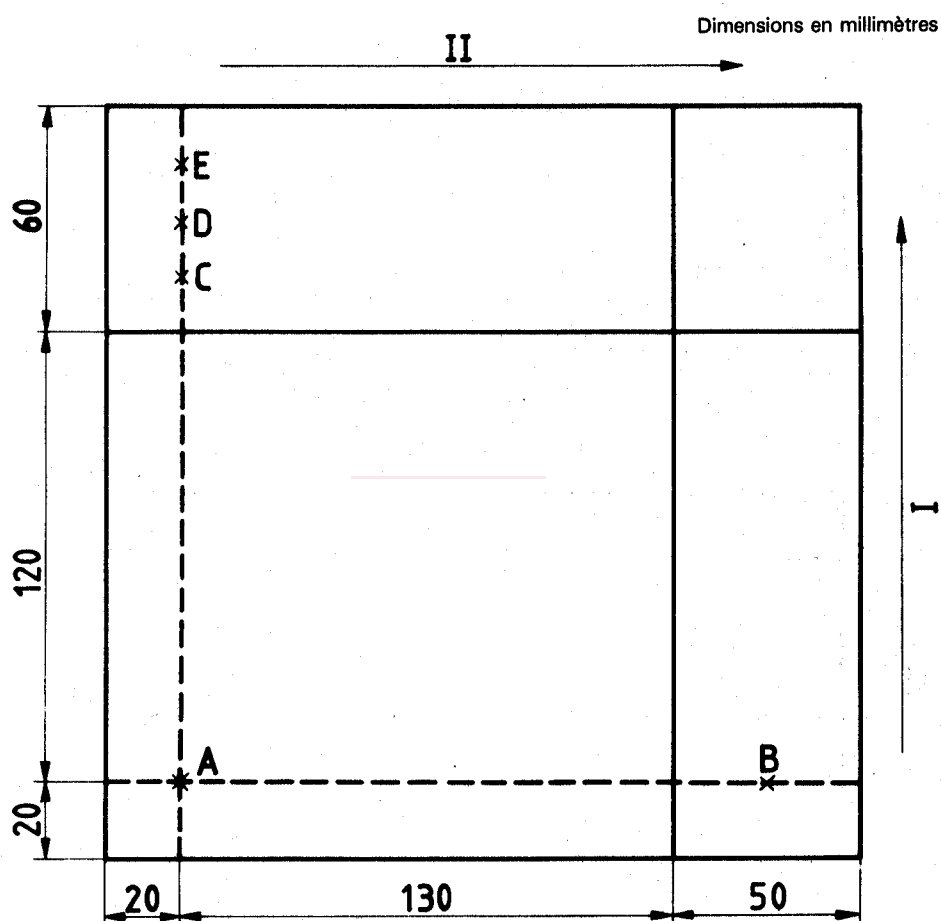


Figure 1 — Application des solutions

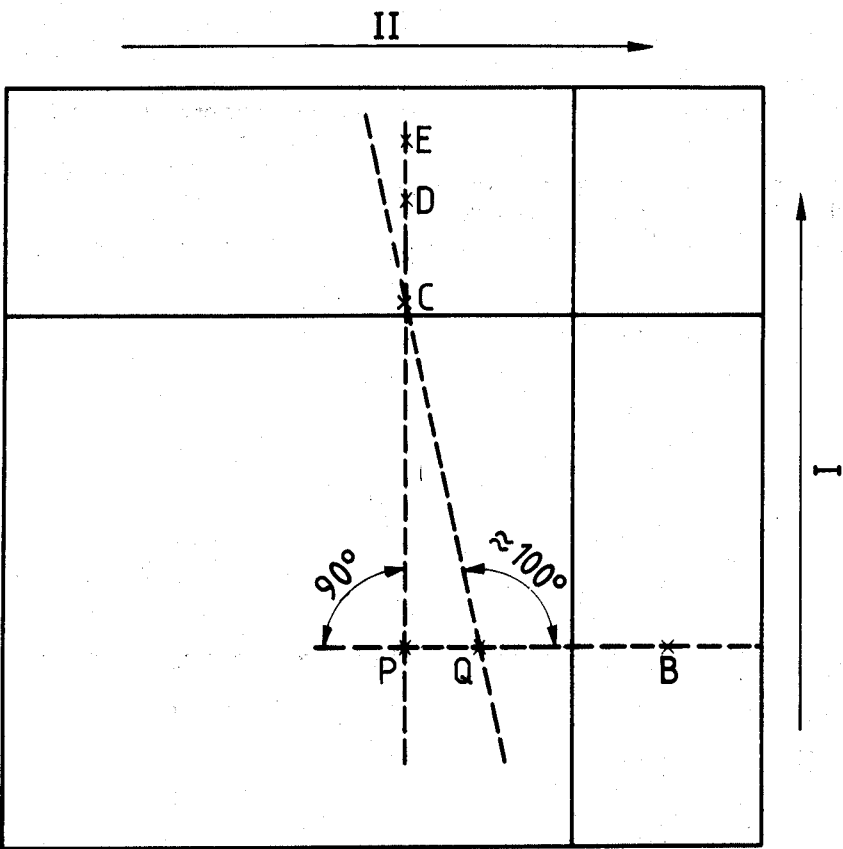


Figure 2 — Interprétation du chromatogramme

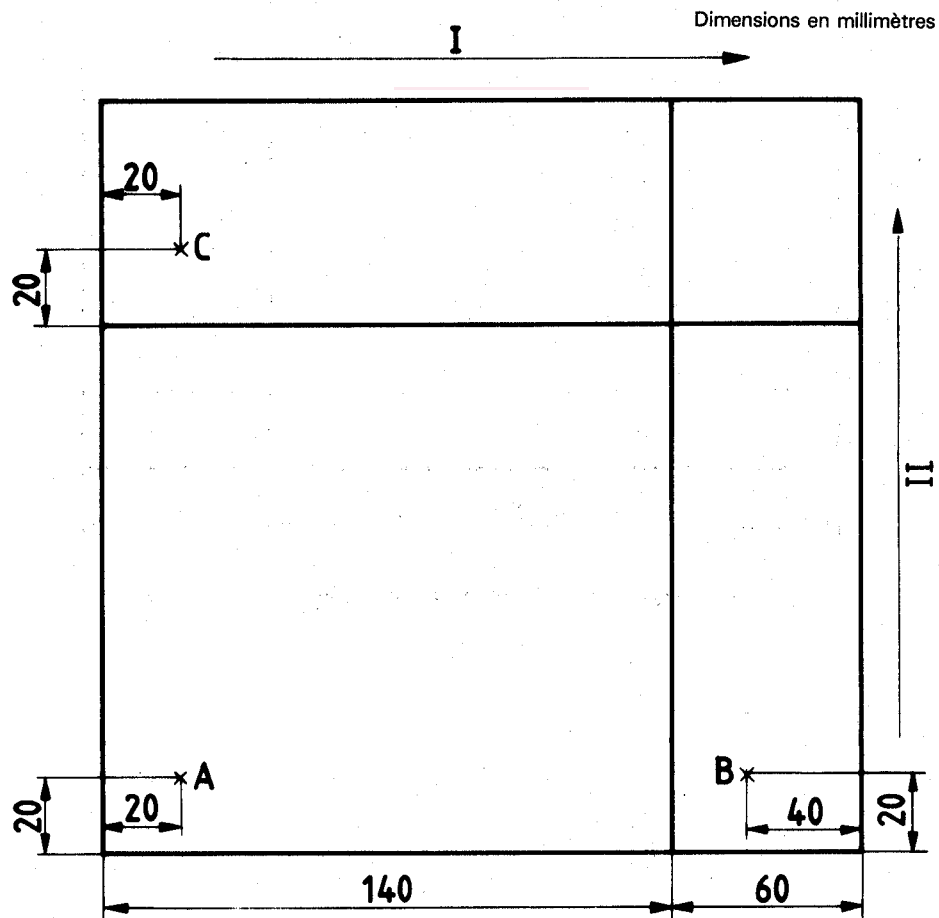


Figure 3 — Test de confirmation