
**Lait et lait en poudre — Détermination de
la teneur en aflatoxine M₁ — Purification
par chromatographie d'immunoaffinité
et détermination par chromatographie en
phase liquide à haute performance**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Milk and milk powder — Determination of aflatoxin M₁ content —
Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-
performance liquid chromatography*

ISO 14501:1998

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/10ae8f1b-c8d1-469f-8e37-
b390c68e89a6/iso-14501-1998](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/10ae8f1b-c8d1-469f-8e37-b390c68e89a6/iso-14501-1998)



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 en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 14501 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, en collaboration avec la Fédération internationale de laiterie (FIL) et l'AOAC International, et sera également publiée par ces organisations.

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1998

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse
Internet iso@iso.ch

Imprimé en Suisse

Lait et lait en poudre — Détermination de la teneur en aflatoxine M₁ — Purification par chromatographie d'immunoaffinité et détermination par chromatographie en phase liquide à haute performance

AVERTISSEMENTS

1 La méthode décrite dans la présente Norme internationale nécessite l'utilisation de solution de chloroforme et d'aflatoxine M₁. Le chloroforme est une substance appauvrissant l'ozone. Les aflatoxines présentent un danger cancérigène pour l'homme. On attire l'attention sur la déclaration de l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer (OMS) [4, 5].

2 Protéger correctement de la lumière du jour le laboratoire dans lequel sont effectuées les analyses et conserver les solutions étalons d'aflatoxine à l'abri de la lumière (par exemple, à l'aide d'une feuille d'aluminium).

3 L'utilisation d'une verrerie lavée avec des produits non acides (par exemple, tubes, flacons, ballons et fioles, béchers, seringues) pour les solutions aqueuses d'aflatoxine peut provoquer une perte d'aflatoxine. De plus, il convient de laisser tremper pendant plusieurs heures dans de l'acide dilué (par exemple de l'acide sulfurique à 2 mol/l) la verrerie neuve de laboratoire entrant en contact avec les solutions aqueuses d'aflatoxine destinées au stockage, puis de les rincer à l'eau distillée afin de retirer toute trace d'acide (vérifier que le pH se situe entre 6 et 8).

4 Utiliser une méthode de décontamination des déchets de laboratoire tels que composés solides, solutions dans les solvants organiques, verrerie, solutions aqueuses et pilules. La méthode de décontamination a été mise au point et validée dans un programme de l'Agence internationale pour la recherche contre le cancer (OMS) [4, 5].

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode pour le dosage de l'aflatoxine M₁ dans le lait et le lait en poudre. Le plus bas niveau validé se situe à 0,08 µg/kg de poudre de lait entier, ce qui correspond à 0,008 µg/l de lait liquide reconstitué. La méthode est également applicable au lait à faible teneur en matière grasse, au lait écrémé et au lait en poudre à faible teneur en matière grasse ou écrémé

2 Terme et définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, le terme et la définition suivants s'appliquent.

2.1

teneur en aflatoxine M₁

fraction massique de substances, déterminée selon le mode opératoire prescrit dans la présente Norme internationale

NOTE La teneur en aflatoxine M₁ est exprimée respectivement en microgrammes par litre (µg/l) ou en microgrammes par kilogramme (µg/kg).

3 Principe

L'aflatoxine M₁ est extraite par passage de la prise d'essai à travers une colonne d'immunoaffinité. La colonne contient des anticorps spécifiques fixés sur un support solide. Au fur et à mesure que l'échantillon traverse la colonne, les anticorps se lient de manière sélective à toute aflatoxine M₁ (antigène) présente et constituent un complexe anticorps-antigène. Tous les autres composants de la matrice échantillon sont éliminés de la colonne avec de l'eau. L'aflatoxine M₁ est ensuite éluée de la colonne et l'éluat recueilli. La quantité d'aflatoxine M₁ présente dans l'éluat est déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) associée à une détection fluorimétrique.

4 Réactifs

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

4.1 Colonne d'immunoaffinité

La colonne d'immunoaffinité doit contenir des anticorps anti-aflatoxine M₁. La capacité ne doit pas être inférieure à 100 ng d'aflatoxine M₁ (ce qui correspond à 2 µg/l pour 50 ml de prise d'essai utilisés) et son taux de récupération ne doit pas être inférieur à 80 % d'aflatoxine M₁ en cas d'utilisation d'une solution étalon contenant 4 ng de toxine (ce qui correspond à 80 ng/l pour 50 ml d'échantillon utilisés). Toute colonne d'immunoaffinité répondant aux spécifications de performance susmentionnées peut être utilisée. Les performances des colonnes doivent être contrôlées régulièrement et au moins une fois pour chaque lot de colonnes (voir 4.1.1 et 4.1.2).

4.1.1 Contrôle de la capacité

À l'aide d'une pipette (5.4), transvaser 2,0 ml de la solution de garde d'aflatoxine M₁ (4.5.2) dans un tube conique de 20 ml (5.9). Laisser la solution s'évaporer jusqu'à siccité sous flux constant d'azote (4.3) et reprendre le résidu obtenu dans 10 ml de solution d'acétonitrile à 10 % (4.2.2) et bien mélanger.

Ajouter cette solution à 40 ml d'eau. Bien mélanger et verser la totalité du volume dans la colonne d'immunoaffinité. Veiller à suivre les recommandations données par le fabricant pour l'utilisation des colonnes. Laver la colonne, éluer la toxine et déterminer la quantité fixée sur la colonne par CLHP après dilution appropriée de l'éluat final.

Calculer le taux de récupération d'aflatoxine. Comparer le résultat à la spécification donnée en 4.1.

4.1.2 Contrôle du taux de récupération

À l'aide d'une pipette (5.4), diluer 0,8 ml de la solution de travail d'aflatoxine M₁ à 0,005 µg/ml (4.5.3) à 10 ml avec de l'eau. Bien mélanger et verser la totalité du volume dans la colonne d'immunoaffinité. Veiller à suivre les recommandations données par le fabricant pour l'utilisation des colonnes. Laver la colonne, éluer la toxine et déterminer la quantité fixée sur la colonne par CLHP après dilution appropriée de l'éluat final. Calculer le taux de récupération d'aflatoxine. Comparer le résultat à la spécification donnée en 4.1.

4.2 Acétonitrile pur, qualité pour HPLC.

4.2.1 Acétonitrile, mélange aqueux à 25 % en volume.

Ajouter 250 ml d'acétonitrile (4.2) à 750 ml d'eau.

4.2.2 Acétonitrile, mélange aqueux à 10 % en volume.

Ajouter 100 ml d'acétonitrile (4.2) à 900 ml d'eau.

4.3 Azote gaz.

4.4 Chloroforme, stabilisé par 0,5 % à 1,0 % en masse d'éthanol.

4.5 Solutions étalons d'aflatoxine M₁

4.5.1 Solution mère

Solution étalon d'aflatoxine M₁ dans du chloroforme à une concentration nominale de 10 µg/ml.

Déterminer la concentration en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde correspondant à l'absorption maximale de la manière suivante.

À l'aide du spectromètre (5.11), enregistrer l'absorbance de la solution étalon par rapport au chloroforme comme blanc entre 340 nm et 370 nm. Mesurer l'absorbance, A , à la longueur d'onde correspondant à l'absorption maximale λ_{\max} , proche de 360 nm. Calculer la concentration, c_i , exprimée en microgrammes par millilitre (µg/ml), à l'aide de l'équation suivante:

$$c_i = A \times M \times 100/\varepsilon$$

où

A est la valeur numérique de l'absorbance à λ_{\max} ;

M est la valeur numérique de la masse molaire de l'aflatoxine M₁, exprimée en grammes par mole (g/mol) ($M = 328$ g/mol);

ε est la valeur numérique du coefficient d'absorption de la toxine dans le chloroforme, exprimée en mètres carrés par mole (m²/mol) ($\varepsilon = 1\,995$ m²/mol).

4.5.2 Solution étalon

Après vérification de la solution mère (4.5.1), diluer celle-ci de façon à arriver à une teneur en aflatoxine M₁ de 0,1 µg/ml. La fiole contenant la solution étalon doit être bien bouchée et enveloppée dans une feuille d'aluminium à l'abri de la lumière.

Conserver la solution étalon dans l'obscurité au réfrigérateur à une température inférieure à 5 °C. Dans ces conditions, la solution étalon est stable pendant 2 mois environ. Au-delà de 2 mois, il convient de vérifier sa stabilité.

4.5.3 Solutions de travail d'aflatoxine M₁

Avant de préparer les dilutions de travail de la solution étalon d'aflatoxine M₁, laisser la solution étalon (4.5.2) parvenir à température ambiante avant de prélever les parties aliquotes de solution en vue de la dilution. Préparer les solutions de travail le jour de leur utilisation.

Préparer une solution à 0,005 µg/ml. À l'aide d'une pipette (5.4), introduire 1,0 ml de solution étalon (4.5.2) dans un tube conique de 20 ml (5.9). Laisser s'évaporer la solution jusqu'à siccité sous un faible courant d'azote (4.3) et dissoudre le résidu obtenu dans 20,0 ml d'acétonitrile dilué (4.2.2). Agiter de temps en temps pendant 30 min.

Un soin particulier doit être apporté lors de l'évaporation de la solution pour éviter toute perte de toxine et s'assurer qu'aucune baisse de température ne provoque de la condensation.

Utiliser cette solution diluée pour la préparation d'une série de dilutions appropriées de solution étalon d'aflatoxine M_1 , afin de permettre, en fonction du volume de la boucle d'injection, l'injection de 0,05 ng, 0,1 ng, 0,2 ng et 0,4 ng d'aflatoxine M_1 . Diluer à l'aide d'acétonitrile dilué (4.2.2).

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

- 5.1 **Seringues à usage unique**, de 10 ml et 50 ml de capacité respective.
- 5.2 **Installation de vide** (c'est-à-dire ballon de Büchner, système Vac-Elute¹) ou pompe péristaltique).
- 5.3 **Centrifugeuse**, pouvant provoquer une accélération radiale de $4\,000 \times g$.
- 5.4 **Pipettes**, de 1,0 ml, 2,0 ml et 50,0 ml de capacité respective.
- 5.5 **Béchers en verre**, de 250 ml de capacité.
- 5.6 **Fiole jaugée**, de 100 ml de capacité.
- 5.7 **Bains d'eau**, capable de fonctionner à $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, $50\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et entre 35 °C et 37 °C .
- 5.8 **Papier filtre** (Whatman n° 41) ou équivalent).
- 5.9 **Tubes en verre coniques gradués**, à col et bouchon en verre rodé, de 5 ml, 10 ml et 20 ml de capacité respective.
- 5.10 **Appareillage pour CLHP**
 - 5.10.1 **Pompe à flux régulier**, convenant pour un débit-volume constant d'environ 1 ml/min.
 - 5.10.2 **Système d'injection**, dont le volume est fixe ou variable, convenant pour une injection de 50 µl à 500 µl.
 - 5.10.3 **Colonne analytique pour chromatographie à polarité de phase inversée**, garnie de gel de silice octadécyle de 3 µm ou 5 µm, et avec colonne de garde remplie de matériau à polarité de phase inversée.
 - 5.10.4 **Détecteur de fluorescence**, pouvant, à des longueurs d'onde d'excitation d'environ 365 nm et d'émission de 435 nm, permettre la détection ($5 \times$ bruit de fond) de 0,02 ng d'aflatoxine M_1 injectée dans des conditions chromatographiques appropriées.
 - 5.10.5 **Enregistreur à papier déroulant**, ou intégrateur électronique ou système de traitement des données informatisé.
- 5.11 **Spectromètre**, pouvant mesurer des longueurs d'onde comprises de 200 nm à 400 nm, avec cellules en quartz de 1 cm de parcours optique.
- 5.12 **Balance**, pouvant peser à 0,1 g près et ayant une résolution de 0,01 g.

1) Le système Vac-Elute et Whatman sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

6 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. L'ISO 707 [1] présente une méthode d'échantillonnage recommandée.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon qui soit représentatif et qui n'ait pas été endommagé ou modifié pendant le transport ou le stockage.

7 Mode opératoire

7.1 Généralités

Dans la mesure du possible, réaliser le mode opératoire à l'abri de la lumière du jour.

Les méthodes de reconstitution du lait à partir de la poudre, de chargement dans les colonnes d'affinité, de lavage de la colonne et d'éluion varient légèrement en fonction des fabricants de colonnes. Suivre scrupuleusement les instructions spécifiques fournies avec les colonnes. En règle générale, les modes opératoires impliquent la reconstitution du lait en poudre avec de l'eau ou une solution tampon, une centrifugation, un chargement dans une colonne sous pression (si possible prélevée), un lavage de la colonne à l'eau et une éluion de l'aflatoxine avec du méthanol ou de l'acétonitrile. Suivre soigneusement les instructions relatives aux débits.

7.2 Préparation des échantillons pour essai

7.2.1 Lait

Porter l'échantillon pour essai, si nécessaire, à une température comprise entre 35 °C et 37 °C dans un bain d'eau (5.7). Filtrer le lait à travers le ou les papiers filtres (5.8) (si nécessaire, utiliser plusieurs filtres) ou centrifuger avec une accélération radiale de $4\,000 \times g$ pendant 15 min. Recueillir au moins 50 ml de lait ainsi préparé. Poursuivre comme spécifié en 7.4.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/10ae8f1b-c8d1-469f-8e37-b390c68e89a6/iso-14501-1998>

7.2.2 Lait en poudre

Peser, à 0,1 g près, 10 g de l'échantillon dans un bécher de 250 ml (5.5). Prélever 50 ml d'eau préchauffée à 50 °C et les ajouter par petites quantités au lait en poudre. Mélanger, à l'aide d'une baguette, jusqu'à obtention d'un mélange homogène.

Si le lait en poudre n'est pas complètement dissous, placer le bécher dans un bain d'eau (5.7) à 50 °C pendant au moins 30 min. Mélanger intimement.

Laisser la solution de lait en poudre refroidir à 20 °C, puis la transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml (5.6) en utilisant de petites quantités d'eau. Compléter jusqu'au trait de jauge de 100 ml avec de l'eau. Filtrer suffisamment de lait reconstitué à travers le ou les papiers filtres (5.8) ou centrifuger à une accélération radiale de $4\,000 \times g$ pendant 15 min. Recueillir au moins 50 ml de lait ainsi préparé. Poursuivre comme spécifié en 7.4.

7.3 Préparation de la colonne d'immunoaffinité

Fixer le corps d'une seringue à usage unique de 50 ml (5.1) à la partie supérieure de la colonne d'immunoaffinité (4.1). Relier la colonne d'immunoaffinité à l'installation de vide (5.2).

7.4 Extraction et purification des échantillons

À l'aide d'une pipette (5.4), introduire 50 ml de l'échantillon pour essai préparé (voir 7.2.1 ou 7.2.2) dans le corps d'une seringue (5.1) et les laisser passer au travers de la colonne d'immunoaffinité à un débit-volume régulier de 2 ml/min à 3ml/min, en contrôlant le débit-volume au moyen de l'installation de vide (5.2).

Retirer le corps de la seringue de 50 ml et la remplacer par une seringue propre de 10 ml. Laver la colonne avec 10 ml d'eau. Faire passer l'eau à travers la colonne, à un débit-volume régulier. Sécher entièrement la colonne après lavage.

Débrancher la colonne de l'installation de vide. Éluer lentement l'aflatoxine M_1 de la colonne en faisant passer 4 ml d'acétonitrile pur (4.2) à travers la colonne, à l'aide d'une seringue de 10 ml. Laisser environ 60 s à l'acétonitrile pour traverser la colonne. Contrôler le débit-volume à l'aide du piston de la seringue. Recueillir l'éluat dans un tube conique (5.9). Réduire le volume d'éluat à un volume V_e de 50 μ l à 500 μ l, à 30 °C, à l'aide d'un faible courant d'azote (4.3).

ATTENTION — Des pertes peuvent se produire si l'évaporation est prolongée jusqu'à sécheresse.

Diluer avec de l'eau à un volume d'éluat final V_f égal à 10 fois V_e , c'est-à-dire de 500 μ l et 5,0 ml.

NOTE Si la teneur en acétonitrile de l'extrait injecté contenant l'aflatoxine M_1 est supérieure au seuil de 10 % en volume, il se produira un élargissement du pic sur le chromatogramme CLHP. Cependant, une teneur en eau supérieure à 90 % en volume n'a aucune influence sur la forme du pic [8].

7.5 Chromatographie en phase liquide à haute performance

7.5.1 Réglage de la pompe

Pomper l'éluant (4.2.1) à un débit-volume constant à travers la colonne CLHP (5.10.3). Si nécessaire (en fonction du type de colonne utilisé) le rapport acétonitrile/eau de l'éluant CLHP (4.2.1) peut être ajusté afin d'assurer une séparation optimale de l'aflatoxine M_1 des autres composés de l'extrait.

Le débit-volume de l'éluant (4.2.1) dépend également de la colonne (5.10.3). À titre indicatif, un débit d'environ 1 ml/min donne des résultats optimaux dans le cas de colonnes classiques (d'une longueur d'environ 25 cm et d'un diamètre intérieur d'environ 4,6 mm); dans le cas de colonnes CLHP d'un diamètre intérieur de 3 mm, un débit-volume de 0,5 ml/min est optimal.

Il est conseillé de vérifier les conditions optimales en utilisant un extrait d'échantillon (de préférence dépourvu d'aflatoxine M_1), injecté seul ou simultanément avec un étalon d'aflatoxine M_1 .

7.5.2 Performances chromatographiques

Il faut contrôler la linéarité des injections de solution étalon et la stabilité du système chromatographique. À plusieurs reprises, injecter un volume déterminé de solution étalon d'aflatoxine M_1 jusqu'à obtention d'aires ou de hauteurs de pics stables. L'aire ou la hauteur des pics des injections consécutives ne doit pas différer de plus de 5 %.

Les réponses en temps de rétention d'aflatoxine M_1 dépendent de la température. Il faut donc compenser la dérive du système de détection. En injectant une quantité fixe de solution étalon d'aflatoxine M_1 à intervalles réguliers, les résultats de ces solutions étalons peuvent faire l'objet d'une correction de la dérive observée.

7.5.3 Courbe d'étalonnage de l'aflatoxine M_1

Injecter, successivement, un volume approprié, V_i , fonction de la boucle d'injection, des solutions étalons d'aflatoxine M_1 contenant respectivement 0,05 ng, 0,1 ng, 0,2 ng et 0,4 ng d'aflatoxine M_1 . Établir une courbe d'étalonnage en portant l'aire ou la hauteur du pic en fonction de la masse d'aflatoxine M_1 injectée.

7.5.4 Analyse des extraits purifiés et du programme d'injection

Injecter un volume approprié, V_i , d'éluat (7.4) dans l'appareillage CLHP à l'aide de la boucle d'injection. Séparer toute l'aflatoxine M_1 présente dans des conditions identiques à celles existant pour les solutions étalons. Effectuer l'injection des étalons et des extraits d'échantillons selon un programme d'injection spécifié.

Lorsqu'il faut injecter une série d'éluats d'échantillons les uns après les autres, il est recommandé d'injecter un étalon d'aflatoxine M₁ toutes les cinq injections d'éluats d'échantillons.

Déterminer l'aire ou la hauteur du pic d'aflatoxine M₁ de l'éluat d'échantillon. À partir de la courbe d'étalonnage, déterminer la masse, en nanogrammes (ng), d'aflatoxine M₁ dans le volume d'extrait d'échantillon injecté.

Si l'aire ou la hauteur du pic d'aflatoxine M₁ dans l'éluat d'échantillon est supérieure à celle de la solution étalon la plus concentrée, diluer l'éluat quantitativement avec de l'eau et réinjecter l'extrait dilué dans l'appareillage CLHP.

8 Calcul et expression des résultats

8.1 Lait

8.1.1 Calcul

Calculer la teneur en aflatoxine M₁ de l'échantillon pour essai, w_m , exprimée en microgrammes par litre (µg/l), à l'aide de l'équation suivante:

$$\rho_m = m_A \times (V_f/V_i) \times (1/V)$$

où

m_A est la valeur numérique de la masse d'aflatoxine M₁, exprimée en nanogrammes (ng), représentée par le pic de l'aflatoxine M₁ de l'échantillon;

V_i est la valeur numérique du volume d'échantillon injecté, exprimée en microlitres (µl);

V_f est la valeur numérique du volume de reprise finale de l'échantillon, exprimée en microlitres (µl);

V est la valeur numérique du volume d'échantillon pour essai purifié sur la colonne, exprimée en millilitres (ml). <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/10ae8f1b-c8d1-469f-8e37-b390c68e89a6/iso-14501-1998>

8.1.2 Expression des résultats

Exprimer le résultat final en microgrammes par litre (µg/l) avec trois décimales.

8.2 Lait en poudre

8.2.1 Calcul

Calculer la teneur en aflatoxine M₁ de l'échantillon pour essai w_p , exprimée en microgrammes par kilogramme (µg/kg), à l'aide de l'équation suivante:

$$w_p = m_A \times (V_f/V_i) \times (1/m)$$

où

m est la valeur numérique de la masse de lait en poudre dans 50 ml de la solution d'essai préparée (7.4), exprimée en grammes (g);

m_A , V_f et V_i ont les mêmes significations qu'en 8.1.1.

Cette équation n'est applicable qu'en l'absence de toute dilution dont il convient, sinon, de tenir compte.

8.2.2 Expression des résultats

Exprimer le résultat final en microgrammes par kilogramme (µg/kg) avec trois décimales.