
**Aliments des animaux — Détermination de
la teneur en aflatoxine B₁ dans les aliments
composés — Méthode par chromatographie
liquide à haute performance**

*Animal feeding stuffs — Determination of aflatoxin B₁ content of mixed
feeding stuffs — Method using high-performance liquid chromatography*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14718:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8bf3b2a6-8782-432c-b1cb-4b5a755641fc/iso-14718-1998>



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 14718 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

Les annexes A et B de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 14718:1998](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8b3b2a6-8782-432c-b1cb-4b5a755641fc/iso-14718-1998)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8b3b2a6-8782-432c-b1cb-4b5a755641fc/iso-14718-1998>

© 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

Aliments des animaux — Détermination de la teneur en aflatoxine B₁ dans les aliments composés — Méthode par chromatographie liquide à haute performance

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) pour la détermination de la teneur en aflatoxine B₁ dans les aliments pour animaux, y compris ceux contenant de la pulpe d'agrumes.

La limite inférieure de détection est de 1 µg/kg d'aflatoxine B₁.

NOTE 1 La présente Norme internationale peut s'appliquer à la détermination de la teneur en aflatoxine B₁ dans un grand nombre de matières premières et d'aliments simples, tels que gluten de maïs, arachide, cœur de palmier, coprah, pulpe d'agrumes, farine de manioc, soja, son de riz, son, graines de colza, graines de niger et graines de coton (voir les références [1] et [2]). Ces matériaux n'ont cependant pas été inclus dans l'essai interlaboratoires de la méthode.

NOTE 2 La présente Norme internationale peut également s'appliquer à la détermination de l'ensemble des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂. La méthode n'a cependant pas été validée pour ce paramètre par des essais interlaboratoires.

2 Référence normative

ISO 14718:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8b3b2a6-8782-432c-b1cb-4b5a755641fc/iso-14718-1998>

Le document normatif suivant contient des dispositions qui par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente du document normatif indiqué ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 6498:1998, *Aliments pour animaux — Préparation des échantillons pour essai*.

3 Principe

L'échantillon est extrait au chloroforme. L'extrait est filtré et une partie aliquote est purifiée sur une cartouche de Florisil®¹⁾ et sur une cartouche de C₁₈. La séparation finale et la détermination sont réalisées par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), en utilisant une colonne C₁₈ à polarité de phases inversée, suivie, à la sortie de la colonne, de la formation de dérivés avec de l'iode ou du brome, et d'une mesure de la fluorescence.

¹⁾ Florisil® est l'appellation commerciale d'un produit disponible 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 du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

4 Réactifs et matériaux

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

4.1 Eau, déminéralisée ou désionisée, d'une résistivité d'au moins 10 MΩ·cm, ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

4.2 Acide sulfurique concentré, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 18 \text{ mol/l}$, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/ml}$.

4.3 Acide sulfurique, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$.

Ajouter avec précaution 105 ml d'acide sulfurique concentré (4.2) à 895 ml d'eau, puis mélanger soigneusement. Éviter de chauffer la solution de façon excessive.

4.4 Échantillon témoin.

Préparer un échantillon témoin d'environ 2 kg d'aliments composés, présentant une teneur en aflatoxine B₁ d'environ 5 µg/kg, en combinant des échantillons ayant subi un dosage préalable et présentant une teneur en aflatoxine B₁ d'environ 5 µg/kg. Mélanger soigneusement.

Il est souhaitable que la teneur en aflatoxine B₁ de l'échantillon témoin soit déterminée cinq fois par deux analystes, en suivant le mode opératoire décrit à l'article 8. Il convient ensuite, à partir des résultats, de calculer la teneur moyenne en aflatoxine B₁, l'écart-type et le coefficient de variation.

4.5 Celite®²⁾ 545, lavé à l'acide, ou produit de qualité équivalente.

4.6 Cartouche de type Florisil® Sep-Pak n° 51960, de Waters³⁾, ou produit de qualité équivalente.

4.7 Cartouche de type C₁₈ Sep-Pak n° 51910, de Waters³⁾, ou produit de qualité équivalente.

4.8 Acétone.

4.9 Méthanol.

4.10 Acétonitrile.

4.11 Chloroforme, stabilisé avec de l'éthanol (fraction massique de 0,5 % à 1,0 %).

AVERTISSEMENT — Le chloroforme est une substance toxique. Éviter l'inhalation de chloroforme et l'exposition au chloroforme. Travailler sous hotte ventilée lors de la manipulation du solvant ou de ses solutions.

Les caractéristiques d'adsorption de la cartouche de Florisil® (4.6) peuvent varier si des stabilisants autres que l'éthanol sont utilisés. Lorsque le chloroforme décrit n'est pas disponible, il convient de vérifier ses propriétés conformément à l'article 8.

²⁾ Celite® est l'appellation commerciale d'un produit disponible sur le marché.

³⁾ Florisil® l'appellation commerciale d'un produit disponible sur le marché. La cartouche Florisil® Sep-Pak, numéro de référence 51960 et la cartouche C₁₈ Sep-Pak, numéro de référence 51910, de Waters Associates (Milwaukee, USA) 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. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

4.12 Mélange d'acétone et d'eau, 98 + 2 (par volume).

Combiner 980 ml d'acétone (4.8) et 20 ml d'eau (4.1). Mélanger soigneusement.

4.13 Mélange d'acétone et d'eau, 15 + 85 (par volume).

Combiner 150 ml d'acétone (4.8) et 850 ml d'eau (4.1). Mélanger soigneusement.

4.14 Mélange d'acétone et d'eau, 5 + 95 (par volume).

Combiner 50 ml d'acétone (4.8) et 950 ml d'eau (4.1). Mélanger soigneusement.

4.15 Mélange de méthanol et d'eau, 20 + 80 (par volume).

Combiner 200 ml de méthanol (4.9) et 800 ml d'eau (4.1). Mélanger soigneusement.

4.16 Acide nitrique concentré, $c(\text{HNO}_3) = 14 \text{ mol/l}$, $\rho(\text{HNO}_3) = 1,40 \text{ g/ml}$, pour CLHP avec formation de dérivés de brome.

4.17 Bromure de potassium (KBr), pour CLHP avec formation de dérivés de brome.

4.18 Phase mobile pour CLHP.**4.18.1 Phase mobile pour CLHP avec formation de dérivés d'iode.**

Mélanger 120 ml d'acétonitrile (4.10), 210 ml de méthanol (4.9) et 390 ml d'eau (4.1), puis homogénéiser. Filtrer l'éluant sur un filtre à membrane de PTFE de 0,45 μm en utilisant le système de filtration de solvant (5.1), puis dégazer pendant 10 min dans le bain à ultrasons (5.2) avant utilisation.

NOTE La composition du solvant de la phase mobile peut nécessiter un ajustement en fonction des caractéristiques de la colonne pour CLHP utilisée.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8b3b2a6-8782-432c-b1cb->

4.18.2 Phase mobile pour CLHP avec formation de dérivés de brome.

Mélanger 400 ml d'acétonitrile (4.10), 700 ml de méthanol (4.9) et 1 300 ml d'eau (4.1), puis homogénéiser. Ajouter à ce mélange 286 mg de bromure de potassium (4.17) et 152 μl d'acide nitrique (4.16). Mélanger soigneusement et dégazer sous un courant de gaz inerte pendant 15 min.

4.19 Solution aqueuse saturée en iode pour CLHP avec formation de dérivés d'iode.

Ajouter 2 g d'iode à 400 ml d'eau. Mélanger pendant au moins 90 min, puis filtrer sur un filtre à membrane de PTFE de 0,45 μm (voir 5.1). Préparer une solution fraîche le jour de son utilisation.

Protéger la solution saturée de la lumière afin d'empêcher toute décomposition photochimique.

4.20 Solution d'hypochlorite de sodium (qualité domestique), $\rho(\text{chlore actif}) = 100 \text{ g/l}$.**4.21 Solution d'hypochlorite de sodium**, à 1 % de fraction volumique.

Diluer 10 ml de solution d'hypochlorite de sodium (4.20) avec 990 ml de mélange acétone-eau (4.14).

4.22 Gaz inerte, par exemple azote.

4.23 Aflatoxine B₁ étalon ($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$), 2,3,6 α ,9 α -tétrahydro-4-méthoxycyclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][1]benzopyran-1,11-dione; numéro 1162-65-8 du Registre du Chemical Abstracts Service (CAS).

AVERTISSEMENTS

1 Les mycotoxines sont des substances extrêmement toxiques. Il convient d'effectuer toutes les manipulations dans une hotte fermée conçue à cet effet. Il est recommandé de prendre des précautions particulières lorsque les toxines sont sous forme sèche, en raison de leur nature électrostatique qui fait qu'elles ont tendance à se disperser dans les zones de travail.

2 Étant donné la sensibilité des aflatoxines aux ultraviolets, réaliser tous les essais à l'abri de la lumière du jour ou de toute lumière blanche artificielle. Utiliser un éclairage suffisant, mais non excessif, avec des lampes à filament de tungstène. Des lampes basse énergie ou des tubes fluorescents peuvent être utilisés, mais l'utilisation de verrerie ambrée (fioles, fioles jaugées) est recommandée.

3 La verrerie ayant été en contact avec des solutions d'aflatoxine B₁ doit être plongée pendant toute une nuit dans une solution d'hypochlorite (4.21), avant d'être nettoyée, afin de supprimer toute trace d'aflatoxine B₁.

4.24 Solution étalon d'aflatoxine B₁, ρ (aflatoxine B₁) \approx 10 μ g/ml.

Transférer le contenu d'une ampoule d'aflatoxine B₁ (4.23) dans une fiole et dissoudre à l'aide de chloroforme (4.11). Transvaser cette solution dans une fiole jaugée d'un volume permettant d'obtenir une solution à une teneur en aflatoxine B₁ d'environ 10 μ g/ml. Diluer au trait avec du chloroforme (4.11). Mélanger.

Transférer dans des fioles ambrées ou dans un récipient à bouchon vissé étanche à l'air. Conserver bien fermé et enroulé dans une feuille d'aluminium et dans un endroit frais (4 °C) et dans l'obscurité.

4.25 Solution mère étalon d'aflatoxine B₁.

Transférer quantitativement 2,5 ml de la solution étalon d'aflatoxine B₁ (4.24) dans une fiole jaugée de 50 ml, puis diluer au trait avec du chloroforme (4.11).

Transférer cette solution dans des fioles ambrées ou dans un récipient à bouchon vissé étanche à l'air. Conserver bien fermé et enroulé dans une feuille d'aluminium et dans un endroit frais (4 °C) et dans l'obscurité.

4.26 Solutions d'étalonnage d'aflatoxine B₁ pour CLHP.

4.26.1 Solution d'étalonnage I, ρ (aflatoxine B₁) \approx 4 ng/ml.

Laisser la fiole jaugée, contenant la solution mère étalon (4.25) et placée dans une feuille d'aluminium, atteindre la température ambiante (quelques heures).

Transférer 400 μ l de solution mère étalon (équivalent à 200 ng d'aflatoxine B₁) dans une fiole jaugée de 50 ml lavée à l'acide, et évaporer la solution jusqu'à siccité sous un courant de gaz inerte (4.22). Dissoudre le résidu dans 20 ml de mélange acétone-eau (4.13). Diluer au trait avec du mélange acétone-eau et mélanger soigneusement.

4.26.2 Solution d'étalonnage II, ρ (aflatoxine B₁) \approx 3 ng/ml.

Transférer quantitativement 7,5 ml de la solution d'étalonnage I (4.26.1) dans une fiole jaugée de 10 ml lavée à l'acide, compléter au trait avec du mélange acétone-eau (4.13) et mélanger soigneusement.

4.26.3 Solution d'étalonnage de référence, ρ (aflatoxine B₁) \approx 2 ng/ml.

Transférer quantitativement 25 ml de la solution d'étalonnage I (4.26.1) dans une fiole jaugée de 50 ml lavée à l'acide. Diluer au trait avec du mélange acétone-eau (4.13) et mélanger soigneusement.

Cette solution est utilisée pour toutes les injections prévues lors de l'analyse CLHP (8.5).

4.26.4 Solution d'étalonnage II , ρ (aflatoxine B₁) \approx 1 ng/ml.

Transférer quantitativement 2,5 ml de la solution d'étalonnage I (4.26.1) dans une fiole jaugée de 10 ml lavée à l'acide. Diluer au trait avec du mélange acétone-eau (4.13) et mélanger soigneusement.

4.27 Solution d'essai pour chromatographie.

, B Préparer une ampoule contenant un mélange d'aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ dans 1 ml de chloroforme, à des concentrations respectives d'environ 1,0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml et 0,5 µg/ml.

Transvaser le contenu de l'ampoule dans un tube à essai bouché à l'émeri ou dans une fiole à bouchon à vis. Transvaser 40 µl de cette solution dans un tube à essai lavé à l'acide (5.4) et bouché à l'émeri. Évaporer le chloroforme sous un courant de gaz inerte (4.22) et dissoudre dans 10 ml de mélange acétone-eau (4.13).

5 Appareillage

Avant son utilisation, la verrerie de laboratoire entrant en contact avec des solutions aqueuses d'aflatoxines doit être plongée pendant plusieurs heures dans de l'acide sulfurique (4.3), puis rincée soigneusement (par exemple trois fois) à l'eau afin d'éliminer toutes les traces d'acide. Vérifier l'absence d'acide à l'aide d'un papier indicateur de pH.

En pratique, ce traitement est requis pour les ballons à fond rond de l'évaporateur rotatif (5.12), les fioles jaugées, les éprouvettes graduées, les flacons ou tubes utilisés pour les solutions d'étalonnage et les extraits finaux (en particulier les flacons autoéchantillonneurs), et les pipettes de Pasteur, si elles sont utilisées pour transvaser les solutions d'étalonnage ou les extraits.

NOTE Il convient que la verrerie de laboratoire entrant en contact avec des solutions aqueuses d'aflatoxines soit plongée dans un acide dilué, car l'utilisation d'une verrerie non lavée à l'acide peut engendrer des pertes d'aflatoxine B₁. Il convient de prendre des précautions particulières lorsqu'on utilise une verrerie neuve ou une verrerie à usage unique telle que des flacons autoéchantillonneurs et des pipettes Pasteur.

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

5.1 Système de filtration du solvant, adapté pour les filtres membrane en PTFE de 0,45 µm de porosité.

5.2 Bain à ultrasons.

5.3 Microseringue, de capacité 100 µl, pour la préparation des solutions d'étalonnage.

Vérifier par pesée que l'inexactitude n'est pas supérieure à 2 % de la masse.

5.4 Tubes gradués à bouchon en verre rodé, de capacité 10 ml.

5.5 Spectromètre, permettant d'effectuer des mesures dans la région ultraviolette du spectre, muni de cuves en quartz de 10 mm \pm 0,1 mm de parcours optique.

5.6 Fiole conique, de capacité 500 ml, en verre borosilicaté avec un large col, à bouchon rodé ou à bouchon vissé avec joint en PTFE.

5.7 Agitateur mécanique, à rotation horizontale ou à mouvement alternatif, présentant une fréquence de 250 min⁻¹ à 300 min⁻¹.

5.8 Papier-filtre plissé, de 24 cm de diamètre.

5.9 Robinet d'arrêt Luer®⁴⁾, à trois voies, résistant au chloroforme.

5.10 Seringue, de capacité 10 ml, résistante aux attaques chimiques, et munie d'un connecteur Luer®⁴⁾.

5.11 Colonne en verre, de 10 mm à 15 mm de diamètre intérieur, d'environ 30 cm à 50 cm de longueur, et munie à son extrémité d'un bout de tube Luer®⁴⁾.

NOTE Quand une colonne de verre de 10 mm de diamètre interne et d'environ 30 cm de longueur est utilisée, il est conseillé d'utiliser un réservoir en plastique (corps de seringue chimiquement résistante) d'au moins 70 ml de capacité.

5.12 Évaporateur rotatif à vide, muni d'un ballon à fond rond de capacité 150 ml à 250 ml.

5.13 Appareillage pour CLHP.

Se reporter aux Figures 1 et 2 pour une représentation schématique des appareillages pour CLHP utilisés respectivement pour la formation de dérivés avec l'iode et le brome.

5.13.1 Pompe, sans pulsation, capable de maintenir un débit-volume compris entre 0,1 ml/min et 1,0 ml/min.

5.13.2 Système d'injection à boucle, adapté pour l'injection de 250 µl.

5.13.3 Détecteur de fluorescence, caractérisé par une excitation à une longueur d'onde de 365 nm et une émission à une longueur d'onde de 435 nm (pour les instruments à filtre, la longueur d'onde d'émission est supérieure à 400 nm). La limite de détection doit au moins être de 0,05 ng d'aflatoxine B₁. Il est recommandé d'exercer une contre-pression [par exemple en installant un réducteur ou un serpentin en acier inoxydable ou en polytétrafluoréthylène (PTFE), raccordé à la sortie du détecteur] afin de supprimer les bulles d'air dans la cellule de mesure.

5.13.4 Enregistreur.

5.13.5 Colonne de garde, garnie de C₁₈, de 37 µm à 50 µm de dimensions de particules, de 10 mm à 20 mm de longueur, et de 3,9 mm de diamètre intérieur, ou colonne de garde de qualité équivalente.

5.13.6 Colonne analytique, garnie de C₁₈, de 3 µm ou 5 µm de dimensions de particules, de 200 mm de longueur, de 3,0 mm de diamètre intérieur, ou colonne analytique de qualité équivalente.

5.13.7 Intégrateur électronique (facultatif).

5.14 Appareillage pour CLHP avec formation de dérivés d'iode.

5.14.1 Pompe, sans pulsation, pour le réactif post-colonne à l'iode.

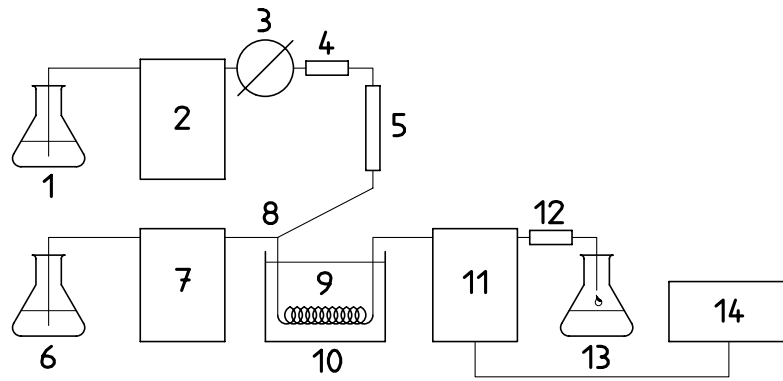
5.14.2 Pièce en T, à volume mort nul, en acier inoxydable, de 1,59 mm × 0,75 mm.

5.14.3 Bobine de réaction, en polytétrafluoréthylène (PTFE) ou en acier inoxydable.

Les dimensions comprises entre 3 000 mm × 0,5 mm et 5 000 mm × 0,5 mm se sont avérées adaptées en combinaison avec des colonnes CLHP de 5 µm ou de 3 µm.

5.14.4 Bain-marie ou bloc de chauffage, thermorégulé à 60 °C et pouvant être réglé à 0,1 °C près.

⁴⁾ Luer® est l'appellation commerciale d'un produit disponible 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 du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

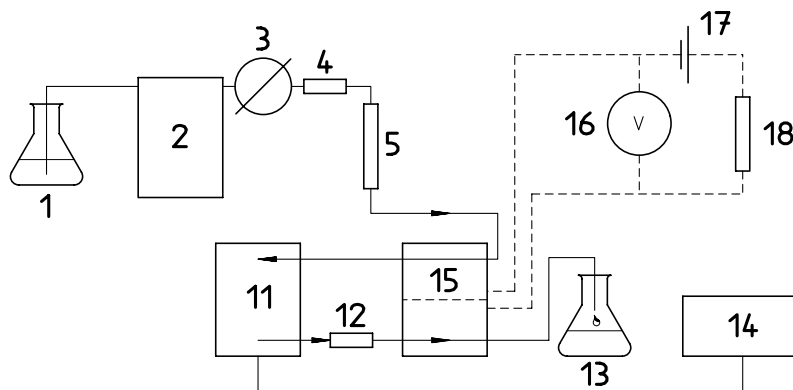


Légende

- | | |
|---------------------------|---|
| 1 Phase mobile pour CLHP | 10 Bobine de réaction |
| 2 Pompe pour CLHP | 11 Détecteur de fluorescence |
| 3 Injecteur | 12 Réducteur |
| 4 Colonne de garde | 13 Résidu |
| 5 Colonne analytique | 14 Enregistreur/intégrateur |
| 6 Solution saturée d'iode | 15 Cellule de formation de dérivés (KOBRA®) |
| 7 Pompe à réactif | 16 Voltmètre |
| 8 Raccord en T | 17 Alimentation électrique, 10 V CC |
| 9 Bain-marie (60 °C) | 18 Résistance, 100 kΩ |

Figure 1 — Représentation schématique d'un système chromatographique pour CLHP (avec formation de dérivés d'iode)

ISO 14718:1998
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8bfb2a6-8782-432c-b1cb-4b5a755641fc/iso-14718-1998>



NOTE Pour l'explication des détails du schéma ci-dessus, voir la légende de la Figure 1.

Figure 2 — Représentation schématique d'un système chromatographique pour CLHP avec formation de dérivés de brome

5.15 Appareillage pour CLHP avec formation de dérivés de brome.

5.15.1 **Cellule électrochimique de formation de dérivés:** appareillage pour brome de Kok (KOBRA®⁵).

5.15.2 **Alimentation électrique,** de 0 V à 20 V CC.

5.15.3 **Voltmètre,** dont la plage de mesure est comprise entre 0 V et 10 V CC, et présentant une impédance supérieure à 50 kΩ.

5.15.4 **Résistance,** 100 kΩ

5.16 **Seringue,** adaptée à l'injection pour CLHP, de capacité 250 µl.

6 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 6497 [7].

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 6498.

Broyer l'échantillon pour laboratoire (en général 500 g) afin qu'il passe en totalité au travers d'un tamis de 1 mm d'ouverture de maille. Bien homogénéiser.

ISO 14718:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8b3b2a6-8782-432c-b1cb-4b5a755641fc/iso-14718-1998>

8 Mode opératoire

8.1 Généralités

Ajouter, à chaque série, un échantillon pour essai à blanc dopé, présentant une teneur en aflatoxine B₁ de 10 µg/kg, et un matériau de référence certifié ou un échantillon témoin (4.4). L'ajout d'un échantillon d'essai à blanc à chaque série est vivement recommandé pour vérifier la contamination par la verrerie.

Les résultats doivent être conformes aux critères donnés à l'article 10.

8.2 Détermination du spectre d'absorption de la solution étalon d'aflatoxine B₁

Dans des cuves, déterminer le spectre d'absorption de la solution étalon d'aflatoxine B₁ (4.24) à des longueurs d'onde comprises entre 330 nm et 370 nm, à l'aide du spectromètre (5.5), et en utilisant le chloroforme comme blanc. Mesurer l'absorbance (A) au maximum d'absorption situé vers la longueur d'onde de 363 nm.

8.3 Extraction

Peser, à 0,1 g près, 50,0 g de l'échantillon pour essai préparé (voir article 7) dans une fiole conique (5.6). Ajouter successivement 25 g de Celite® (4.5), 250 ml de chloroforme (4.11) et 25 ml d'eau (4.1). Boucher la fiole, agiter en la tournant et décompresser. Reboucher et agiter pendant 30 min sur l'agitateur mécanique (5.7).

⁵) KOBRA® est l'appellation commerciale d'un produit disponible 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 du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

NOTE Afin de réduire l'utilisation de chloroforme, il est possible d'utiliser la moitié des quantités spécifiées, c'est-à-dire 25,0 g d'échantillon pour essai préparé (voir article 7), 12,5 g de Celite® (4.5), 125 ml de chloroforme (4.11) et 12,5 ml d'eau (4.1).

Filtrer sur le papier-filtre plissé (5.8). Si la filtration s'effectue lentement, couvrir l'entonnoir afin d'éviter l'évaporation de chloroforme. Recueillir 50 ml de filtrat (V_f).

Si nécessaire, prélever une partie aliquote de filtrat et la diluer à 50 ml (V_f) avec du chloroforme de telle sorte que la concentration d'aflatoxine B₁ ne soit pas supérieure à 4 ng/ml.

Utiliser ce filtrat pour la purification de l'échantillon, conformément à 8.4.

8.4 Purification

Effectuer l'ensemble des opérations suivantes sans interruptions importantes.

8.4.1 Purification du Florisil®

8.4.1.1 Préparation de l'ensemble colonne-cartouche

Fixer un robinet d'arrêt (5.9) sur l'embase la plus courte d'une cartouche de Florisil® (4.6). Laver la cartouche et éliminer l'air en prenant 10 ml de chloroforme (4.11) et en en faisant passer rapidement 8 ml, à l'aide d'une seringue (5.10), à travers la cartouche par l'intermédiaire du robinet d'arrêt.

Fixer l'embase la plus longue de la cartouche sur une colonne en verre (5.11) et faire passer les 2 ml de chloroforme restants dans la colonne, en traversant la cartouche. Fermer le robinet d'arrêt. Retirer la seringue.

8.4.1.2 Purification

Ajouter le filtrat recueilli en 8.3 (V_s ou V_f) à l'ensemble colonne-cartouche et vidanger par gravité. Rincer avec 5 ml de chloroforme (4.11), puis avec 20 ml de méthanol (4.9). Éliminer les éluats.

Durant ces opérations, veiller à ce que l'ensemble colonne-cartouche ne soit pas mis à sec.

Éluer l'aflatoxine B₁ avec 50 ml de mélange acétone-eau (4.12) et recueillir l'éluat dans le ballon à fond rond de l'évaporateur rotatif (5.12).

NOTE 1 La qualité du Florisil® varie d'un lot à l'autre. Selon cette qualité, 50 ml de mélange acétone-eau (4.12) peuvent ne pas s'avérer suffisants pour l'éluat. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser 60 ml à 70 ml de mélange acétone-eau (4.12).

Évaporer l'éluat à l'aide de l'évaporateur rotatif, à une température de 40 °C à 50 °C, jusqu'à ce que la distillation d'acétone cesse.

NOTE 2 À ce stade, environ 0,5 ml de liquide reste dans le ballon. Les expérimentations ont montré qu'une évaporation plus poussée n'est pas dangereuse et que, lorsqu'il reste 0,5 ml de liquide, la quantité d'acétone n'est plus significative. Les résidus d'acétone peuvent conduire à des pertes d'aflatoxine B₁ sur la cartouche au C₁₈.

Ajouter 1 ml de méthanol (4.9), agiter le ballon en le tournant afin de dissoudre l'aflatoxine B₁ contre les parois du ballon, ajouter 4 ml d'eau et homogénéiser. Débrancher et éliminer la cartouche. Rincer la colonne en verre à l'eau et la conserver pour l'étape de purification du C₁₈ (8.4.2).

8.4.2 Purification du C₁₈

8.4.2.1 Préparation de l'ensemble colonne-cartouche

Fixer un robinet d'arrêt (5.9) sur l'embase la plus courte d'une cartouche de C₁₈ (4.7). Amorcer la cartouche et éliminer l'air en faisant passer rapidement, à l'aide d'une seringue (5.10), 10 ml de méthanol (4.9) à travers la cartouche par l'intermédiaire du robinet d'arrêt. Les bulles d'air dans la cartouche apparaissent sous la forme de points lumineux sur le fond grisâtre. Prendre 10 ml d'eau et en faire passer 8 ml à travers la cartouche. Éviter d'introduire de l'air dans la cartouche lors du passage du méthanol à l'eau.