
**Produits alimentaires — Dosage de
l'ochratoxine A dans les céréales et
produits dérivés —**

Partie 1:

Méthode par chromatographie liquide haute
performance comprenant une étape
d'extraction par chromatographie sur gel
de silice

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15141-1-1998/iso-15141-1-1998>
*Foodstuffs — Determination of ochratoxin A in cereals and cereal
products —*

*Part 1: High performance liquid chromatographic method with silica gel
clean up*

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 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 15141-1 a été élaborée par le Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 4, *Céréales et légumineuses*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Tout au long du texte de la présente partie de l'ISO 15141, lire «..la présente norme européenne...» avec le sens de «...la présente partie de l'ISO 15141...».

L'ISO 15141 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Produits alimentaires — Dosage de l'ochratoxine A dans les céréales et produits dérivés*:

- *Partie 1: Méthode par chromatographie liquide haute performance comprenant une étape d'extraction par chromatographie sur gel de silice*
- *Partie 2: Méthode par chromatographie liquide haute performance comprenant une étape d'extraction par une solution de bicarbonate*

Les annexes A et B de la présente partie de l'ISO 15141 sont données 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

Sommaire

Avant-propos.....iii
1 Domaine d'application.....	...1
2 Références normatives.....	..1
3 Principe1
4 Réactifs.....1
5 Appareillage3
6 Mode opératoire.....5
7 Calculs.....8
8 Fidélité9
9 Rapport d'essai9
Annexe A (informative) Données de fidélité10
Annexe B (informative) Bibliographie11

Avant-propos

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

Le texte du EN ISO 15141-1:1998 a été élaboré par le Comité Technique CEN/TC 275 "Analyse des produits alimentaires - Méthodes horizontales" dont le secrétariat est tenu par le DIN, en collaboration avec le Comité Technique ISO/TC 34 "Produits agricoles alimentaires".

Cette norme européenne devra recevoir le statut de norme nationale, soit par publication d'un texte identique, soit par entérinement, au plus tard en avril 1999, et toutes les normes nationales en contradiction devront être retirées au plus tard en avril 1999.

La présente norme européenne "Produits alimentaires - Dosage de l'ochratoxine A dans les céréales et produits dérivés" se compose de deux parties:

- | | |
|-----------|---|
| partie 1: | Méthode par chromatographie liquide haute performance comprenant une étape d'extraction par chromatographie sur gel de silice |
| partie 2: | Méthode par chromatographie liquide haute performance comprenant une étape d'extraction par une solution de bicarbonate |

Selon le Règlement Intérieur du CEN/CENELEC, les instituts de normalisation nationaux des pays suivants sont tenus de mettre cette norme européenne en application: Allemagne, Autriche, Belgique, Danemark, Espagne, Finlande, France, Grèce, Irlande, Islande, Italie, Luxembourg, Norvège, Pays-Bas, Portugal, République Tchèque, Royaume-Uni, Suède et Suisse.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 15141-1:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e0b119c3-b1fd-46e9-8dd1-58d9bd944ef3/iso-15141-1-1998>

1 Domaine d'application

La présente norme européenne décrit une méthode de détermination de la teneur en ochratoxine A supérieure à 0,4 µg/kg. La méthode a été validée selon la norme ISO 5725:1986 [1] par deux analyses interlaboratoires sur de la farine de blé contaminée à 0,4 µg/kg et 1,2 µg/kg en ochratoxine A.

NOTE : D'après plusieurs laboratoires, cette méthode est également applicable aux céréales, fruits secs, graines oléagineuses, légumineuses, au vin, à la bière, aux jus de fruits et au café [2], [3], [4].

2 Références normatives

Cette norme européenne comporte par référence datée ou non datée des dispositions d'autres publications. Ces références normatives sont citées aux endroits appropriés dans le texte et les publications sont énumérées ci-après. Pour les références datées, les amendements ou révisions ultérieurs de l'une quelconque de ces publications ne s'appliquent à cette norme européenne que s'ils y ont été incorporés par amendement ou révision. Pour les références non datées, la dernière édition de la publication à laquelle il est fait référence s'applique.

EN ISO 3696 Eau pour laboratoire à usage analytique - Spécification et méthodes d'essai (ISO 3696:1987)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

3 Principe

L'ochratoxine A est extraite par le toluène, après acidification à l'acide chlorhydrique et après augmentation de la force ionique par addition de chlorure de magnésium. L'extrait est purifié sur une mini colonne de gel de silice ; l'ochratoxine est séparée par chromatographie liquide haute performance sur une colonne phase inverse puis identifiée et quantifiée par fluorescence. La confirmation du résultat peut se réaliser, si nécessaire, par dérivation au trifluorure de bore en solution méthanolique [5], [6].

AVERTISSEMENT: L'ochratoxine A provoque des lésions au niveau des reins et du foie et elle est probablement cancérigène. Respecter les précautions de sécurité [7] lors des manipulations de ce produit ; éviter notamment toute manipulation du produit sous une forme sèche, du fait de sa nature électrostatique qui peut occasionner une dispersion et une inhalation. Il convient de décontaminer la verrerie avec une solution d'hypochlorite de sodium à 4 %. Se référer également aux conclusions du Centre International de Recherche sur le Cancer de l'OMS [8], [9].

4 Réactifs

Sauf indication différente, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau de qualité 1, conformément à l'EN ISO 3696.

Les solvants doivent être de qualité pour CLHP.

4.1 Sulfate de sodium, anhydre

4.2 Acide acétique glacial, ϕ (CH₃COOH) \simeq 98 %.

4.3 Solution d'acide chlorhydrique c (HCl) = 2 mol/l.

- 4.4 **Solution de chlorure de magnésium** $c(\text{MgCl}_2) = 0,4 \text{ mol/l}$.
- 4.5 **Acétonitrile**
- 4.6 **Toluène**
- 4.7 **N-hexane**
- 4.8 **Dichlorométhane**
- 4.9 **Acétone**
- 4.10 **Méthanol**
- 4.11 **Mélange de solvants I** : toluène (4.6) et acide acétique (4.2) 99 + 1 (V + V).
- 4.12 **Mélange de solvants II** : acétone (4.9) et toluène (4.6) 5 + 95 (V + V).
- 4.13 **Mélange de solvants III** : toluène (4.6) et acide acétique (4.2) 90 + 10 (V + V).
- 4.14 **Phase mobile pour CLHP**

Mélanger 99 volumes d'acétonitrile (4.5) à 99 volumes d'eau et 2 volumes d'acide acétique (4.2).
Dégazer cette solution avant utilisation.

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

4.15 **Trifluorure de bore**

4.16 **Trifluorure de bore en solution méthanolique**, $\rho(\text{BF}_3) = 14 \text{ g/100 ml}$.

ATTENTION ! Utiliser une hotte d'extraction adéquate. Éviter le contact avec la peau, les yeux et les voies respiratoires.

4.17 **Ochratoxine A**, sous forme de cristaux ou de film lyophilisé.

4.18 **Solution mère d'ochratoxine A**

Dissoudre 1 mg d'ochratoxine A (cristaux) (4.17) ou le contenu d'une ampoule (si l'ochratoxine A est sous forme de film) dans le mélange de solvants I (4.11) pour obtenir une solution contenant environ 20 µg/ml à 30 µg/ml d'ochratoxine A.

Pour déterminer la concentration exacte de la solution mère, enregistrer à l'aide d'un spectromètre le spectre d'absorption de l'ochratoxine A entre 300 nm et 370 nm par pas de 5 nm, avec le mélange de solvants I comme solution de référence, en utilisant des cuves en quartz (5.5) de 1 cm de côté. Calculer la concentration ρ_{OTA} en ochratoxine A, exprimée en microgrammes par millilitre, à l'aide de l'équation 1 :

$$\rho_{\text{OTA}} = \frac{A_{\text{max}} \times M \times 100}{\kappa \times \delta} \quad (1)$$

où :

- A_{\max} est l'absorbance déterminée au maximum de la courbe d'absorption (ici, à : 33 nm) ;
- M est la masse molaire de l'ochratoxine A ($M = 403 \text{ g/mol}$) ;
- κ est le coefficient d'absorption molaire de l'ochratoxine A, dans le mélange de solvants I (ici : $544 \text{ m}^2/\text{mol}$) ;
- δ est la longueur du trajet optique, en centimètres.

4.19 Solution étalon d'ochratoxine A $\rho_{\text{OTA}} = 1 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Évaporer à sec sous courant d'azote 1 ml de la solution-mère (4.18) ou une aliquote équivalant à $100 \text{ } \mu\text{g}$ d'ochratoxine, en valeur absolue, puis reprendre le résidu dans 100 ml de phase mobile (4.14).

Cette solution peut être stockée dans un réfrigérateur à $4 \text{ } ^\circ\text{C}$. Sa stabilité doit être vérifiée.

4.20 Solutions d'étalonnage d'ochratoxine A

Pipeter des volumes adéquats de la solution étalon d'ochratoxine A (4.19), par exemple 1 ml, 2,5 ml, 4 ml et 5 ml dans une fiole jaugée de 100 ml (5.12), et compléter jusqu'au trait de jauge avec de la phase mobile (4.14). Les teneurs en ochratoxine A des solutions d'étalonnage doivent recouvrir la gamme de $0,2 \text{ ng}$ à $1,0 \text{ ng}$ par volume de $20 \text{ } \mu\text{l}$ d'injection.

4.21 Solution d'eau de Javel $\rho(\text{NaOCl}) = 4 \text{ g/100 ml}$

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier :

5.1 Broyeur de laboratoire, équipé pour broyer jusqu'à 1 mm.

5.2 Évaporateur rotatif, avec bain d'eau, pouvant être contrôlé entre $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ et $50 \text{ } ^\circ\text{C}$.

5.3 Agitateur mécanique

5.4 Spectromètre, pouvant enregistrer des spectres entre 300 nm et 370 nm, d'une largeur de bande spectrale ne dépassant pas $\pm 2 \text{ nm}$.

5.5 Cuves en quartz, d'une longueur de trajet optique d'1 cm et sans absorption significative entre 300 nm et 370 nm.

5.6 Tubes à centrifuger, en plastique de polyéthylène haute densité (HDPE), d'une capacité de 250 ml, avec bouchon fileté.

5.7 Centrifugeuse pouvant refroidir, de préférence réfrigérée, capable de produire une force de gravité d'au moins 3 500 *g* à la base des tubes à centrifuger (5.6).

5.8 Colonnes d'extraction en phase solide, en gel de silice, à usage unique, par exemple SEP-PAK^{®1}).

Lorsque le paquet a été ouvert, conditionner les colonnes à 105 °C pendant 2 h et entreposer en présence de gel de silice activé avec indicateur d'humidité. Préalablement à l'utilisation, laver les colonnes avec 10 ml de toluène (4.6).

Vérifier le rendement à chaque nouveau lot. En cas d'utilisation de micro-colonnes SEP-PAK, les cartouches doivent avoir les spécifications suivantes :

- poids moyen du support : 690 mg ;
- grosseur des pores : 12,5 nm ;
- granulométrie : de 55 µm à 105 µm ;

dans un tube de polypropylène de 3 ml.

5.9 Réservoir de solvant, constitué par exemple de seringues, d'une capacité de 50 ml, à embout central.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.10 Ballons à col rodé d'une capacité de 50 ml.

ISO 15141-1:1998

5.11 Ampoule à décanter, d'une capacité de 50 ml.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e0b119c3-b1fd-46e9-8dd1-38d9bd944e13/iso-15141-1-1998>

5.12 Fiole jaugée, d'une capacité de 100 ml.

5.13 Membrane de filtration pour solution aqueuse, en polytétrafluoroéthylène (PTFE), d'un diamètre de 4 mm et d'une porosité de 0,45 µm.

5.14 Tamis, d'une ouverture de maille ne dépassant pas 1 mm.

5.15 Flacons, à bouchon serti ou fileté.

5.16 Micro-seringue, d'une capacité de 500 µl.

¹) SEP PAK[®] est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente norme et ne signifie nullement que le CEN recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

5.17 Chaîne de CLHP, comprenant les éléments suivants :

5.17.1 Une chaîne de chromatographie liquide haute performance, composé d'un réservoir de phase mobile, d'une pompe, d'un système d'injection des échantillons couplée à un détecteur de fluorescence à réglage de longueur d'onde variable et d'un système d'acquisition des données (par exemple un intégrateur avec traceur).

5.17.2 Une colonne CLHP de phase inverse en C₁₈ (par exemple Lichrospher® 100 RP 18²) permettant une résolution suffisante du pic de l'ochratoxine A :

- d'une longueur de 250 mm ;
- d'un diamètre interne de 4 mm ;
- garnie de particules sphériques de 5 µm.

NOTE : Des petites colonnes peuvent aussi être utilisées (par exemple d'une longueur de 120 mm à 150 mm).

5.17.3 Une pré-colonne, de phase inverse en C₁₈ :

- d'une longueur de 40 mm ;
- d'un diamètre interne de 4 mm ;
- garnie de particules sphériques de 5 µm.

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 15141-1:1998](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e0b119c3-b1fd-46e9-8dd1-58d9bd944ef3/iso-15141-1-1998)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e0b119c3-b1fd-46e9-8dd1-58d9bd944ef3/iso-15141-1-1998>

6 Mode opératoire

6.1 Généralités

L'ensemble d'une analyse décrite dans ce mode opératoire devrait être effectué en une journée. Si plusieurs échantillons sont extraits en même temps, ils devraient être analysés la nuit suivante en utilisant un passeur automatique d'échantillons.

²) Lichrospher® 100 RP 18 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente norme et ne signifie nullement que le CEN recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.