

---

---

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

**Partie 2:**

Méthode par chromatographie liquide haute  
performance comprenant une étape  
d'extraction par une solution de bicarbonate

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.itih.ai)

*Foodstuffs — Determination of ochratoxin A in cereals and cereal  
products*

ISO 15141-2:1998

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/30fb332e-f3fa-4f05-a0a5-3f622d280194/iso-15141-2-1998>

*Part 2: High performance liquid chromatographic method with bicarbonate  
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 15141-2 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 Principe .....	.....1
4 Réactifs.....	.....1
5 Appareillage .....	.....4
6 Mode opératoire.....	.....5
7 Calculs.....	.....8
8 Fidélité .....	.....8
9 Rapport d'essai .....	.....9
Annexe A (informative) Données de fidélité .....	.....10
Annexe B (informative) Bibliographie .....	.....12

## Avant-propos

# iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

Le texte du EN ISO 15141-2:1998:1998 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".

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30fb332e-f3fa-4f05-a0a5-12182329076e/iso-15141-2-1998>

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 15141-2:1998](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30fb332e-f3fa-4f05-a0a5-3f4e82229ffe/iso-15141-2-1998)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30fb332e-f3fa-4f05-a0a5-3f4e82229ffe/iso-15141-2-1998>

## 1 Domaine d'application

La présente norme européenne décrit une méthode de dosage de l'ochratoxine A (OTA), pour des concentrations supérieures à 3 µg/kg.

La méthode a été validée selon la norme ISO 5725:1986 [1] par des analyses interlaboratoires portant sur l'orge à des teneurs de 2,9 µg/kg, 3,0 µg/kg, 7,4 µg/kg et 14,4 µg/kg en ochratoxine A, sur du maïs à des teneurs de 8,2 µg/kg et 16,3 µg/kg en ochratoxine A et sur du son de blé à des teneurs de 3,8 µg/kg et 4,5 µg/kg d'ochratoxine A.

NOTE : Plusieurs laboratoires ont montré que cette méthode peut être appliquée également sur de la farine de blé.

## 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)

(standards.iteh.ai)

## 3 Principe

L'ochratoxine A est extraite des grains par une solution d'acide phosphorique-chloroforme puis transférée par partage liquide-liquide dans une solution aqueuse de bicarbonate. La solution est appliquée à une cartouche C18 et l'ochratoxine A est éluée avec de l'acétate d'éthyle-méthanol-acide acétique. L'ochratoxine A est séparée puis identifiée par chromatographie liquide à phase inversée puis quantifiée par fluorescence. La chromatographie du dérivé ester de méthyle de l'ochratoxine A confirme l'identification [2] à [5].

**AVERTISSEMENT: L'ochratoxine A provoque des lésions au niveau des reins et du foie et elle est probablement cancérigène. Respecter les précautions de sécurité lors des manipulations de ces composants ; 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 %. Considérer avec attention les conseils prodigués par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (OMS) [7], [8].**

## 4 Réactifs

Sauf indication contraire, 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 Chloroforme**, stabilisé par exemple avec du méthyl 2-butène 2, ou de l'éthanol.

**4.2 Solution d'acide phosphorique**, à  $c(\text{H}_3\text{PO}_4) \approx 0,1 \text{ mol/l}$

**4.3 Terre de diatomées**

Laisser tremper une nuit dans du méthanol (4.7) environ 900 g de Celite 545<sup>®1)</sup> lavé à l'acide. Filtrer au travers d'une double couche de papier dans un entonnoir Büchner (5.6) puis laver avec 8 l d'eau et sécher pendant 12 h à 150 °C.

**4.4 Bicarbonate de sodium**,  $\rho(\text{Na HCO}_3) = 30 \text{ g/l}$ .

**4.5 Acétate d'éthyle**

**4.6 Toluène**

**4.7 Méthanol**

**4.8 Acide acétique glacial**,  $\varphi(\text{CH}_3 - \text{COOH}) \approx 98 \%$ .

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

**4.9 Acétonitrile.**

**4.10 Dichlorométhane** <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30fb332e-f3fa-4f05-a0a5-3f4e82229ffe/iso-15141-2-1998>

**4.11 Solution d'élution**

Ajouter 95 volumes d'acétate d'éthyle (4.5), 5 volumes de méthanol (4.7) et 0,5 volumes d'acide acétique glacial (4.8).

**4.12 Phase mobile pour CLHP**

Mélanger de l'acétonitrile (4.9), de l'eau et de l'acide acétique glacial (4.8), 99 + 99 + 2 (V + V + V) et dégazer.

**4.13 Mélange toluène/acide acétique**

Toluène (4.6) et acide acétique glacial (4.8), 99 + 1 (V + V).

**4.14 Trifluorure de bore**

---

<sup>1)</sup> Céliste 545<sup>®</sup> 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.

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

**AVERTISSEMENT** : Utiliser une hotte d'extraction en bon état de marche. Éviter le contact avec la peau, les yeux et les voies respiratoires.

**4.16 Ochratoxine A**, sous forme de cristaux, ou de film en ampoule.

#### 4.17 Solution mère d'ochratoxine A

Dissoudre 1 mg d' ochratoxine A (cristaux) (4.16) ou le contenu d'une ampoule (si l' ochratoxine A est sous forme de film) dans le mélange de solvants (4.13) pour obtenir une solution contenant environ 20  $\mu\text{g/ml}$  à 30  $\mu\text{g/ml}$  d' ochratoxine A. Pour déterminer la concentration précise, enregistrer la courbe d'absorption entre 300 nm et 370 nm tous les 5 nm dans une cellule en quartz d'1 cm (5.4) avec le mélange de solvants (4.13), comme référence. Identifier la longueur d'onde de l'absorption maximale en enregistrant tous les nm autour du maximum comme référence. Calculer la teneur en ochratoxine  $\rho_{\text{OTA}}$ , exprimée en microgrammes par millilitre, à l'aide de l'équation (1) :

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

où :

$A_{\text{max}}$  est l'absorbance déterminée au maximum de la courbe d'absorption (ici à : 33 nm) ;

$M$  est la masse moléculaire de l'ochratoxine A ( $M = 403 \text{ g/mol}$ ) ;

$\kappa$  est le coefficient d'absorption moléculaire de l'ochratoxine A, dans le mélange de solvants (ici : 544  $\text{m}^2/\text{mol}$ ) ;

$\delta$  est la longueur du trajet optique, en centimètres.

#### 4.18 Solution étalon d'ochratoxine A

Diluer la solution mère (4.17) dans le mélange de solvants (4.13) pour obtenir une solution étalon de concentration d' ochratoxine A 4  $\mu\text{g/ml}$ .

Cette solution peut être stockée dans un réfrigérateur à 4 °C. La stabilité doit être vérifiée.

#### 4.19 Solutions d'étalonnage d'ochratoxine A

Transférer dans des petits flacons de 4 ml à 5 ml (5.15) des volumes de 5  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$ , 25  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$  et 100  $\mu\text{l}$  de solution étalon d'ochratoxine A (4.18) en utilisant des pipettes à volume fixe (5.16). Évaporer à sec sous azote. Ajouter 1,0 ml de phase mobile (4.12) dans chaque flacon afin d'obtenir les concentrations finales en ochratoxine suivantes : 0,5 ng/25  $\mu\text{l}$ , 1 ng/25  $\mu\text{l}$ , 2,5 ng/25  $\mu\text{l}$ , 5 ng/25  $\mu\text{l}$  et 10 ng/25  $\mu\text{l}$ .

**4.20 Solution d'hypochlorite de sodium**,  $\rho(\text{NaOCl}) = 4 \text{ g/100 ml}$ .

## 5 Appareillage

Appareillage courant de laboratoire et, en particulier :

**5.1 Broyeur de laboratoire et tamis** d'une ouverture de maille d'1 mm.

### 5.2 Mixeur à grande vitesse

Bol de 1 250 ml avec couvercle.

**5.3 Spectromètre**, adapté pour des mesures entre 300 nm et 370 nm, d'une largeur de bande ne dépassant pas  $\pm 2$  nm.

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

**5.5 Filtres en fibre de verre**, de 0,3 mm d'épaisseur, de porosité 1,5  $\mu\text{m}$  et d'un diamètre de 9,0 cm, ou équivalent.

**5.6 Entonnoirs Büchner**, par exemple de 9 cm et 25 cm de diamètre.

(standards.iteh.ai)

**5.7 Papier filtre plissé.**

ISO 15141-2:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30fb332e-f3fa-4f05-a0a5-1008729ffe/iso-15141-2-1998>

**5.8 Ampoule à décanter**, de 25 ml et 100 ml.

**5.9 Centrifugeuse**, avec pots ou flacons de 100 ml.

**5.10 Cartouche d'adsorption**, à usage unique, avec tube en polypropylène de 3 ml, contenant 500 mg de silice greffée en C<sub>18</sub> de 40  $\mu\text{m}$ .

**5.11 Extracteur sous vide**, avec robinet d'arrêt à chaque sortie pour maintenir les colonnes C<sub>18</sub>. Peut être remplacé par une seringue (de 5 ml à 10 ml) avec adaptateur (Luer) adéquat.

**5.12 Tubes à essai**, par exemple de 10 ml, avec bouchon à vis en PTFE.

**5.13 Membrane filtrante**, d'une grosseur de pore de 0,45  $\mu\text{m}$ .



**5.14 Chaîne de CLHP**, comprenant les éléments suivants :

**5.14.1** Chromatographie liquide haute performance, réservoir d'éluants, pompe à débit réglable de 0,5 ml/min à 5 ml/min, vanne d'injection munie par exemple d'une boucle de 25 µl, détecteur de fluorescence, enregistreur ou intégrateur compatible.

**5.14.2** Colonne analytique CLHP à phase inversée, par exemple Supelco <sup>2)</sup> :

- longueur : 250 mm ;
- diamètre interne : 4,6 mm ;
- support : particules sphériques de 5 µm, de silice greffée en C<sub>18</sub>, ou équivalent.

NOTE : Des colonnes plus courtes peuvent aussi être employées (par exemple de 120 mm à 150 mm de long).

**5.15 Flacons**, d'environ 5 ml avec bouchon à vis, en PTFE, ou flacons similaires.

**5.16 Pipettes à volume fixe.**

## 6 Mode opératoire

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

**6.1** Il convient d'appliquer l'ensemble du mode opératoire analytique en une journée de travail. Si plusieurs échantillons sont traités en même temps, il convient de les analyser tous la nuit suivante en utilisant un injecteur automatique d'échantillons.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30fb332e-f3fa-4f05-a0a5-3f4e82229ffe/iso-15141-2-1998>

### 6.2 Préparation des échantillons

Moudre l'échantillon jusqu'à ce qu'il passe par un tamis d'1 mm (5.1) en utilisant un moulin (5.1) ou un mixeur, et mélanger soigneusement.

### 6.3 Extraction de l'ochratoxine A à partir de l'échantillon

Placer 50 g de prise d'essai (6.2), pesé à 0,1 g près, dans un bol-mixeur (5.2). Ajouter successivement 250 ml de chloroforme (4.1) puis 25 ml d'acide phosphorique (4.2). Mixer pendant 3 min à vitesse moyenne. Vers la fin du mixage, ajouter 10 g (45 ml) de terre de diatomées (4.3). Filtrer l'extrait sur du papier en fibre de verre (5.5), recouvert d'environ 10 g de terre de diatomées (4.3), sur un entonnoir Büchner de 9 cm (5.6), dans un papier plissé de 32 cm (5.7). Recueillir au moins 50 ml de filtrat.

<sup>2)</sup> Supelco 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.