

---

---

**Produits alimentaires — Dosage de  
l'aflatoxine B<sub>1</sub> et détermination de la  
teneur totale en aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et  
G<sub>2</sub> dans les céréales, les fruits à coque et  
les produits dérivés — Méthode par  
chromatographie liquide à haute  
performance**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

*Foodstuffs — Determination of aflatoxin B<sub>1</sub>, and the total content of  
aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in cereals, nuts and derived products —  
High-performance liquid chromatographic method*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e3df688b-d44a-4c80-b120-10ee92bb1548/iso-16050-2003>



**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

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

ISO 16050:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e3df688b-d44a-4c80-b120-10ee92bb1548/iso-16050-2003>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2003

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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Version française parue en 2011

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>1</b>
<b>5</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>4</b>
<b>6</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>5</b>
<b>6.1</b> <b>Généralités</b> .....	<b>5</b>
<b>6.2</b> <b>Extraction</b> .....	<b>6</b>
<b>6.3</b> <b>Purification</b> .....	<b>6</b>
<b>6.4</b> <b>Conditions de fonctionnement de la CLHP</b> .....	<b>6</b>
<b>6.5</b> <b>Identification</b> .....	<b>7</b>
<b>6.6</b> <b>Courbe d'étalonnage</b> .....	<b>7</b>
<b>6.7</b> <b>Détermination</b> .....	<b>7</b>
<b>7</b> <b>Calcul des résultats</b> .....	<b>7</b>
<b>8</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>8</b>
<b>8.1</b> <b>Essai interlaboratoires</b> .....	<b>8</b>
<b>8.2</b> <b>Répétabilité</b> .....	<b>8</b>
<b>8.3</b> <b>Reproductibilité</b> .....	<b>9</b>
<b>9</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>10</b>
<b>Annexe A (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires</b> .....	<b>11</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>13</b>

## 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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 16050 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*. Elle est basée sur l'EN 12955:1999 élaborée par le comité technique CEN/TC 275, *Analyse alimentaire — Méthodes horizontales*.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
(standards.iteh.ai)  
ISO 16050:2003  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e3df688b-d44a-4c80-b120-10ee92bb1548/iso-16050-2003>

# Produits alimentaires — Dosage de l'aflatoxine B<sub>1</sub> et détermination de la teneur totale en aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés — Méthode par chromatographie liquide à haute performance

**AVERTISSEMENT** — L'utilisation de la présente Norme internationale peut impliquer l'emploi de produits et la mise en œuvre de modes opératoires et d'appareillages à caractère dangereux. La présente Norme internationale n'a pas pour but d'aborder tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente Norme internationale d'établir, avant de l'utiliser, des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode par chromatographie liquide à haute performance en phase inversée, avec purification sur colonne d'immunoaffinité et dérivation post-colonne, pour le dosage des aflatoxines dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés. La limite de quantification de l'aflatoxine B<sub>1</sub> et de la somme des aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> est de 8 µg/kg.

Cette méthode a été validée sur du maïs, du beurre d'arachide et des arachides brutes ayant respectivement une teneur en aflatoxines totales de 24,5 µg/kg, 8,4 µg/kg et 16 µg/kg. Il a également été démontré que la présente méthode peut être utilisée pour les produits oléagineux, les fruits secs et les produits dérivés.

## 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

## 3 Principe

L'échantillon pour essai est extrait avec un mélange d'eau et de méthanol. L'extrait d'échantillon est filtré, dilué avec de l'eau et déposé sur une colonne d'immunoaffinité contenant des anticorps spécifiques des aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>. Les aflatoxines sont isolées, purifiées et concentrées sur la colonne, puis libérées des anticorps avec du méthanol. Les aflatoxines sont quantifiées par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée avec détection par fluorescence et dérivation post-colonne.

## 4 Réactifs

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

**4.1 Eau**, de qualité 1 selon l'ISO 3696:1987.

4.2 Chlorure de sodium.

4.3 Iode, cristalline, ou en alternative, hydrobromure perbromure de pyridium (PBPB)<sup>1)</sup>.

4.4 Aflatoxine, sous forme de cristaux ou de film en ampoule.

**AVERTISSEMENT — Les aflatoxines sont cancérigènes pour l'homme. L'attention est attirée sur les recommandations du Centre international de recherche sur le cancer de l'OMS (voir Références [1] et [2]).**

**Protéger de manière adéquate le laboratoire où sont effectuées les analyses de la lumière du jour. Pour y parvenir efficacement, il est possible d'utiliser une feuille absorbant les ultraviolets (UV) placée sur les fenêtres, associée à une lumière tamisée (pas de lumière solaire directe), ou des rideaux ou des stores associés à une lumière artificielle (les tubes fluorescents sont acceptables).**

4.5 Acétonitrile, de qualité pour CLHP.

4.6 Méthanol, de qualité pour analyse.

4.7 Méthanol, de qualité pour CLHP.

4.8 Toluène, de qualité pour analyse.

**AVERTISSEMENT — Le toluène est très inflammable et nocif. La préparation des étalons avec ce solvant doit être effectuée sous une hotte aspirante. Les opérations réalisées hors de la hotte, telles que le mesurage des étalons par spectrométrie UV, doivent se faire en plaçant les étalons dans des récipients fermés.**

4.9 Mélange toluène/acétonitrile

Mélanger 98 parties en volume de toluène (4.8) avec 2 parties en volume d'acétonitrile (4.5) (voir l'Avertissement en 4.8).

4.10 Solvant d'extraction

Mélanger 7 parties en volume de méthanol (4.6) avec 3 parties en volume d'eau (4.1).

D'autres mélanges de solvant d'extraction, compatibles avec la phase mobile, peuvent également être utilisés à condition qu'il ait été prouvé qu'ils sont plus efficaces ou qu'ils aient été recommandés par le fabricant de la colonne d'immunoaffinité (IA).

4.11 Phase mobile

Mélanger 3 parties en volume d'eau (4.1) avec 1 partie en volume d'acétonitrile (4.5) et 1 partie en volume de méthanol (4.7). Dégazer la solution avant de l'utiliser.

4.12 Réactif de dérivation post-colonne

Dissoudre 100 mg d'iode (4.3) dans 2 ml de méthanol (4.6). Ajouter 200 ml d'eau (4.1), agiter pendant 1 h puis filtrer avec un filtre à membrane (5.8) de 0,45 µm de porosité. Préparer la solution la semaine même de l'utilisation et la conserver à l'obscurité ou dans un flacon en verre brun. Agiter la solution pendant 10 min avant utilisation.

En guise d'alternative, dissoudre 50 mg de PBPB (4.3) dans 1 000 ml d'eau. Cette solution peut être utilisée pendant 4 jours si elle est conservée dans l'obscurité à température ambiante.

1) CAS: 39416-48-3 (CAS = Chemical Abstracts Service).

#### 4.13 Solutions mères d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>

**AVERTISSEMENT** — Dans la mesure du possible, protéger les solutions d'aflatoxines de la lumière (les conserver dans l'obscurité, utiliser une feuille d'aluminium ou de la verrerie ambrée).

Dissoudre de l'aflatoxine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> séparément dans le mélange toluène/acétonitrile (4.9) afin d'obtenir des solutions séparées contenant 10 µg/ml.

Pour déterminer la concentration exacte d'aflatoxine dans chaque solution mère, enregistrer le spectre d'absorption à une longueur d'onde comprise entre 330 nm et 370 nm dans des cuves en quartz de 1 cm (5.7) au moyen d'un spectromètre (5.6), en utilisant le mélange toluène/acétonitrile (4.9) comme référence. Calculer la concentration de chaque aflatoxine,  $\rho_i$ , en microgrammes par millilitre, à l'aide de l'Équation (1):

$$\rho_i = \frac{A_{\max} \times M_i \times 1000}{\varepsilon_i \times d} \quad (1)$$

où

$A_{\max}$  est l'absorbance déterminée au maximum du spectre d'absorption;

$M_i$  est la masse moléculaire de chaque aflatoxine, en grammes;

$\varepsilon_i$  est le coefficient d'absorption molaire de chaque aflatoxine dans le mélange toluène/acétonitrile;

NOTE Cette valeur est déterminée dans une solution contenant  $c = 1$  mol/l d'aflatoxine et dans une cuve de trajet optique  $d = 1$  cm. Le coefficient d'absorption molaire ( $\varepsilon$ ) est généralement indiqué sans unité de mesure, mais l'équation  $A = \varepsilon \times c \times d$  permet d'obtenir l'unité suivante: l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

$d$  est le trajet optique de la cuve, en centimètres.

$M_i$  et  $\varepsilon_i$  sont indiqués dans le Tableau 1.

**Tableau 1 — Masse moléculaire et coefficient d'absorption molaire des aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>**

Aflatoxine	$M_i$	$\varepsilon_i$
B <sub>1</sub>	312	19 300
B <sub>2</sub>	314	20 400
G <sub>1</sub>	328	16 600
G <sub>2</sub>	330	17 900

NOTE Un mélange de toluène et d'acétonitrile (98 + 2) est utilisé comme solvant.

#### 4.14 Solution mère d'aflatoxines mélangées

Préparer une solution mère contenant 500 ng/ml d'aflatoxine B<sub>1</sub>, 125 ng/ml d'aflatoxine B<sub>2</sub>, 250 ng/ml d'aflatoxine G<sub>1</sub> et 125 ng/ml d'aflatoxine G<sub>2</sub> dans le mélange toluène/acétonitrile (4.9). Lorsque la solution doit être conservée, peser le récipient avant le stockage. Envelopper soigneusement le récipient avec une feuille d'aluminium et le conserver à environ 4 °C. Immédiatement avant usage, peser à nouveau le récipient et enregistrer toute variation de masse survenue après stockage.

NOTE Une exposition normale aux rayons UV lors du mesurage de l'absorbance n'entraîne pas de conversion observable en photoproduits.

#### 4.15 Solution étalon d'aflatoxines mélangées

Transvaser chaque quantité spécifiée dans le Tableau 2 de la solution mère d'aflatoxines mélangées (4.14) dans une série de quatre fioles jaugées de 2 ml (5.5). Évaporer les solutions jusqu'à siccité sous un flux d'azote à température ambiante. Ajouter 1 ml de méthanol (4.6) dans chaque fiole. Dissoudre le résidu sec, diluer la solution jusqu'au trait avec de l'eau (4.1) et mélanger. Préparer la solution le jour de l'utilisation.

Tableau 2 — Préparation des solutions étalons

Solution étalon	Volume prélevé sur la solution mère µl	Concentration d'aflatoxine ng/ml			
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
1	60	15,0	3,75	7,50	3,75
2	40	10,0	2,50	5,00	2,50
3	20	5,00	1,25	2,50	1,25
4	10	2,50	0,625	1,25	0,625

NOTE Les valeurs indiquées sont données à titre indicatif. La gamme étalon couvre les concentrations des échantillons.

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

## 5 Appareillage

Plonger la verrerie de laboratoire entrant en contact avec les solutions aqueuses d'aflatoxines dans de l'acide sulfurique (4.16) pendant plusieurs heures, puis bien la rincer à l'eau (trois fois par exemple) afin d'éliminer toute trace d'acide. Vérifier l'absence d'acide avec du papier pH.

NOTE Ce traitement est nécessaire car l'utilisation de verrerie n'ayant pas subi de lavage à l'acide peut occasionner des pertes d'aflatoxines. En pratique, ce traitement est nécessaire pour les ballons à fond rond, les fioles jaugées, les éprouvettes graduées à pied, les flacons ou les tubes utilisés pour les solutions d'étalonnage et les extraits finaux (en particulier les passeurs automatiques d'échantillon), ainsi que pour les pipettes Pasteur lorsqu'elles sont utilisées pour transvaser les solutions d'étalonnage ou les extraits.

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

### 5.1 Colonne d'immunoaffinité (IA)

La colonne d'IA contient des anticorps dirigés contre les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>. La capacité minimale de liaison de la colonne ne doit pas être inférieure à 100 ng d'aflatoxine B<sub>1</sub>. La récupération pour les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et G<sub>1</sub> ne doit pas être inférieure à 80 %, et à 60 % pour l'aflatoxine G<sub>2</sub>, lorsqu'on applique sur la colonne d'IA une solution étalon de 5 ng de chaque toxine dans 15 ml d'un mélange de méthanol et d'eau [1 partie en volume de méthanol (4.6) et 3,4 parties en volume d'eau (4.1)]. Il convient que la colonne d'IA comprenne un réservoir de solvant approprié (par exemple une seringue avec un adaptateur).

Il est conseillé de réaliser les expériences de récupération sur chaque matrice pour laquelle la méthode est utilisée.

### 5.2 Broyeur, comprenant un bol de 500 ml et un couvercle.

L'utilisation d'un broyeur à grande vitesse est recommandée.

### 5.3 Papier-filtre plissé, par exemple de 24 cm de diamètre.



- 5.4 Papier-filtre à microfibres de verre**<sup>2)</sup>, par exemple de 11 cm de diamètre.
- 5.5 Fliales jaugées**, de classe A, d'une capacité de 2 ml.
- 5.6 Spectromètre**, pouvant balayer des longueurs d'onde comprises entre 200 nm et 400 nm.
- 5.7 Cuves en quartz**, avec un trajet optique de 1 cm et sans absorption sensible dans les longueurs d'onde comprises entre 300 nm et 370 nm.
- 5.8 Filtre à membrane pour les solutions aqueuses**, en polytétrafluoroéthylène (PTFE), de 4 mm de diamètre et de 0,45 µm de porosité.
- 5.9 Appareillage CLHP**, se composant des éléments suivants.
- 5.9.1 Pompe CLHP**, pouvant produire un débit de 1 ml/min.
- 5.9.2 Système d'injection**, vanne d'injection munie d'une boucle de 50 µl ou système équivalent.
- 5.9.3 Colonne analytique de séparation en phase inversée**, par exemple C<sub>18</sub>, garantissant un retour à la ligne de base entre les pics d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> et tous les autres pics, et présentant les caractéristiques suivantes:
- longueur: 250 mm;
  - diamètre intérieur: 4,6 mm;
  - particules sphériques: 5 µm.

Il est possible d'utiliser des colonnes plus courtes.

**5.9.4 Système de dérivation post-colonne**, comprenant une pompe sans pulsion et une pièce en T avec un volume mort très réduit, avec un tube en polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou en acier inoxydable d'une longueur comprise entre 3 000 mm et 5 000 mm et d'un diamètre intérieur de 0,5 mm, ainsi qu'un bain de chauffage ou un réacteur post-colonne pour la réaction à l'iode.

**5.10 Détecteur de fluorescence**, avec une longueur d'onde d'excitation réglée à 365 nm et une longueur d'onde d'émission à 435 nm (pour les instruments à filtre: longueur d'onde d'émission > 400 nm), pouvant détecter au moins 0,05 ng d'aflatoxine B<sub>1</sub> par volume d'injection (ici 50 µl).

## 6 Mode opératoire

### 6.1 Généralités

Pour l'analyse par CLHP, les solutions échantillons et les solutions étalons doivent contenir le même solvant ou le même mélange de solvants.

2) Le papier Whatman 934AH est un exemple de produit approprié. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document 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.