
Aliments des animaux — Dosage semi-quantitatif de l'aflatoxine B₁ — Méthodes par chromatographie sur couche mince

Animal feeding stuffs — Semi-quantitative determination of aflatoxin B₁ — Thin-layer chromatographic methods

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6651:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d1b66045-3c4c-44c1-ab6b-b0c34e07bb40/iso-6651-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d1b66045-3c4c-44c1-ab6b-b0c34e07bb40/iso-6651-2001>



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 6651:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d1b66045-3c4c-44c1-ab6b-b0c34e07bb40/iso-6651-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d1b66045-3c4c-44c1-ab6b-b0c34e07bb40/iso-6651-2001>

© ISO 2001

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 au 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.ch
Web www.iso.ch

Imprimé en Suisse

Sommaire

	Page
1	1
2	1
3	1
4	2
5	4
6	5
7	5
8	12
9	12
10	13
Annexe	
A	14

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6651:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d1b66045-3c4c-44c1-ab6b-b0c34e07bb40/iso-6651-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d1b66045-3c4c-44c1-ab6b-b0c34e07bb40/iso-6651-2001>

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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente Norme internationale 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.

La Norme internationale ISO 6651 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 6651:1987), dont elle constitue une révision mineure.

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d1b66045-3c4c-44c1-ab6b-b0c34e07bb40/iso-6651-2001>

Aliments des animaux — Dosage semi-quantitatif de l'aflatoxine B₁ — Méthodes par chromatographie sur couche mince

1 Domaine d'application

1.1 La présente Norme internationale spécifie deux méthodes pour le dosage de l'aflatoxine B₁ dans les aliments des animaux. Ces méthodes se prêtent uniquement aux dosages semi-quantitatifs.

1.2 Méthode A, applicable aux aliments simples suivants:

- graines oléagineuses et tourteaux, en particulier d'arachide, de coprah, de lin, de soja, de sésame, de babassu;
- farine de manioc;
- tourteaux de germes de maïs;
- céréales et produits céréaliers;
- farine de pois;
- pulpe et fécule de pommes de terre.

En présence de substances interférentes qui entravent les déterminations selon la méthode A, il est recommandé d'effectuer la détermination selon la méthode B.

1.3 Méthode B, applicable aux aliments composés ainsi qu'aux aliments simples non mentionnés en 1.2.

Cette méthode n'est pas applicable aux aliments contenant des pulpes d'agrumes.

2 Référence normative

Le document normatif suivant contient des dispositions qui, par suite de la référence qui y 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 l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

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

3 Principe

Extraction au chloroforme sur une prise d'essai, filtration puis purification d'une partie aliquote sur colonne de gel de silice.

Évaporation de l'éluat et dissolution du résidu dans un volume déterminé de chloroforme ou d'un mélange benzène-acétonitrile.

Chromatographie sur couche mince, monodimensionnelle pour la méthode A et bidimensionnelle pour la méthode B, d'une partie aliquote de cette solution.

Détermination de la teneur en aflatoxine B₁, par mesure visuelle ou à l'aide d'un fluorodensitomètre, de l'intensité de fluorescence du chromatogramme examiné à la lumière UV, par comparaison avec des quantités connues d'un étalon d'aflatoxine B₁ placé sur la même plaque que l'échantillon.

Confirmation de l'identité de l'aflatoxine B₁ par formation du dérivé hémiacétal.

4 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

4.1 Chloroforme, stabilisé par 0,5 % à 1,0 % d'éthanol à 96 % (fraction volumique).

4.2 n-Hexane.

4.3 Oxyde diéthylique, anhydre, exempt de peroxydes.

4.4 Benzène/acétonitrile, mélange (98 + 2).

Mélanger 98 volumes de benzène avec 2 volumes d'acétonitrile.

4.5 Chloroforme/méthanol, mélange (97 + 3).

Mélanger 97 volumes de chloroforme avec 3 volumes de méthanol.

4.6 Solvants de développement.

Il convient d'utiliser les solvants dans des cuves couvertes. Lorsque des cuves saturées sont spécifiées, ceci est réalisé en les recouvrant intérieurement avec du papier-filtre et en laissant la cuve se saturer avec les vapeurs de solvant.

4.6.1 Chloroforme/acétone, mélange (90 + 10).

Mélanger 90 volumes de chloroforme avec 10 volumes d'acétone, en cuve non saturée.

4.6.2 Oxyde diéthylique/méthanol/eau, mélange (96 + 3 + 1).

Mélanger 96 volumes d'oxyde diéthylique avec 3 volumes de méthanol et 1 volume d'eau, en cuve non saturée.

4.6.3 Oxyde diéthylique/méthanol/eau, mélange (94 + 4,5 + 1,5).

Mélanger 94 volumes d'oxyde diéthylique avec 4,5 volumes de méthanol et 1,5 volumes d'eau, en cuve saturée.

4.6.4 Chloroforme/méthanol, mélange (94 + 6).

Mélanger 94 volumes de chloroforme avec 6 volumes de méthanol, en cuve saturée.

4.6.5 Chloroforme/méthanol, mélange (97 + 3).

Mélanger 97 volumes de chloroforme avec 3 volumes de méthanol, en cuve saturée.

4.7 Gel de silice, pour chromatographie sur colonne, granulométrie: 0,05 mm à 0,20 mm.

4.8 Gel de silice, G-HR ou équivalent, pour chromatographie sur couche mince.

4.9 Terre de diatomées (Hyflosupercel), lavée à l'acide.

4.10 Sulfate de sodium, granulés anhydres.

4.11 Acide trifluoroacétique.

4.12 Gaz inerte, par exemple azote.

4.13 Acide sulfurique, solution à 50 % (fraction volumique).

4.14 Aflatoxine B₁, solution étalon contenant environ 0,1 µg d'aflatoxine B₁ par millilitre dans le chloroforme (4.1) ou dans le mélange benzène/acétonitrile (4.4).

AVERTISSEMENT — Les aflatoxines sont fortement cancérigènes et doivent être manipulées avec beaucoup de précaution.

Préparer et contrôler la solution comme indiqué ci-après.

4.14.1 Préparation de la solution mère et détermination de sa concentration

Préparer une solution d'aflatoxine B₁, dans le chloroforme (4.1) ou dans le mélange benzène/acétonitrile (4.4), de concentration comprise entre 8 µg/ml et 10 µg/ml. Déterminer son spectre d'absorption entre 330 nm et 370 nm à l'aide du spectromètre (5.9).

Relever l'absorbance (*A*) à 363 nm dans le cas d'une solution chloroformique, ou à 348 nm dans le cas d'une solution dans le mélange benzène/acétonitrile.

Calculer la concentration d'aflatoxine B₁, en microgrammes par millilitre de solution, à partir des formules suivantes:

a) pour la solution chloroformique

$$\frac{312 \times A \times 1\,000}{22\,300}$$

ISO 6651:2001
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d1b66045-3c4c-44c1-ab6b-b0c34e07bb40/iso-6651-2001>

b) pour la solution dans le mélange benzène/acétonitrile

$$\frac{312 \times A \times 1\,000}{19\,800}$$

4.14.2 Dilution

Effectuer à l'abri de la lumière les dilutions convenables de la solution mère (4.14.1) pour obtenir une solution étalon dont la concentration en aflatoxine B₁ soit d'environ 0,1 µg/ml.

Conservée au réfrigérateur à 4 °C, cette solution est stable durant 2 semaines.

4.14.3 Contrôle de la pureté chromatographique de la solution

Déposer sur une plaque (5.7) une tache de 5 µl de la solution mère d'aflatoxine B₁ de concentration 8 µg/ml à 10 µg/ml (4.14.1). Développer le chromatogramme comme indiqué en 7.5.1. Sous lumière ultraviolette, la fluorescence ne doit donner lieu qu'à la perception d'une seule tache et aucune fluorescence ne doit être perçue dans la zone du dépôt d'origine.

4.15 Aflatoxines B₁ et B₂ (voir l'avertissement en 4.14), solutions pour l'essai qualitatif, contenant environ 0,1 µg d'aflatoxines B₁ et B₂ par millilitre dans le chloroforme (4.1) ou dans le mélange benzène/acétonitrile (4.4).

Ces concentrations sont données à titre indicatif. Elles doivent être ajustées de manière à obtenir la même intensité de fluorescence pour les deux aflatoxines (voir 7.5.1).

5 Appareillage

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

5.1 Broyeur.

5.2 Tamis, de 1,0 mm d'ouverture de maille.

Pour plus de détails, voir l'ISO 565¹⁾.

5.3 Appareil à secouer ou agitateur magnétique.

5.4 Tube pour chromatographie, en verre (diamètre intérieur 22 mm, longueur 300 mm), avec robinet en polytétrafluoroéthylène (PTFE) et réservoir de 250 ml, muni à son extrémité d'un tampon de coton ou de laine de verre.

5.5 Appareil rotatif à évaporation sous vide, avec ballon à fond rond de 500 ml.

5.6 Appareillage pour chromatographie sur couche mince, à savoir matériel nécessaire à la préparation des plaques (5.7) et au dépôt des taches (pipettes capillaires ou microseringues), cuve de développement et appareil pour pulvériser l'acide sulfurique (4.13) sur les plaques.

5.7 Plaques de verre pour chromatographie sur couche mince, 200 mm × 200 mm, préparées comme suit (les quantités indiquées conviennent pour recouvrir cinq plaques).

Introduire 30 g de gel de silice (4.8) dans une fiole conique, ajouter 60 ml d'eau, boucher et agiter durant 1 min. Étendre la suspension sur les plaques, de manière à obtenir une couche uniforme de 0,25 mm d'épaisseur. Laisser sécher à l'air et conserver ensuite dans un dessiccateur garni de gel de silice. Au moment de l'emploi, activer les plaques en les maintenant durant 1 h dans une étuve à 110 °C.

Les plaques prêtes à l'emploi conviennent dans la mesure où elles donnent des résultats semblables à ceux des plaques préparées comme indiqué ci-dessus.

5.8 Lampe à ultraviolet à ondes longues (360 nm).

L'intensité d'irradiation doit permettre de distinguer encore nettement une tache de 1,0 ng d'aflatoxine B₁ sur une plaque pour chromatographie sur couche mince, à une distance de 10 cm de la lampe.

AVERTISSEMENT — La lumière ultraviolette étant dangereuse pour les yeux, il y a lieu de porter des lunettes protectrices.

5.9 Spectromètre, permettant d'effectuer les mesures dans l'ultraviolet.

5.10 Fluorodensitomètre (éventuellement).

5.11 Papier-filtre à plis.

5.12 Tube gradué, de 10,0 ml de capacité, avec bouchon de polyéthylène.

5.13 Fiole conique, de 500 ml de capacité, à bouchon rodé.

5.14 Pipette, de 50 ml de capacité.

5.15 Balance analytique.

1) ISO 565, *Tamis de contrôle — Tissus métalliques, tôles métalliques perforées et feuilles électroformées — Dimensions nominales des ouvertures.*

6 Échantillonnage

Prélever l'échantillon pour laboratoire sur le produit à échantillonner, en se conformant à la Norme internationale relative au produit concerné, sauf si l'échantillonnage en vue de la détermination de l'aflatoxine est exclu de son domaine d'application. S'il n'existe pas de Norme internationale appropriée, les parties concernées doivent se mettre d'accord, en tenant compte des caractéristiques du produit à échantillonner.

7 Mode opératoire

7.1 Préparation de l'échantillon pour essai

7.1.1 Si l'échantillon contient plus de 5 % de matières grasses, il doit être dégraissé à l'éther de pétrole avant d'effectuer le broyage.

Les résultats devront alors être rapportés à la masse d'échantillon non dégraissé.

7.1.2 Broyer l'échantillon pour laboratoire, de façon qu'il passe en totalité au travers du tamis (5.2). Bien homogénéiser. Voir l'ISO 6498.

7.2 Prise d'essai

Peser, à 0,01 g près, 50 g de l'échantillon pour essai dans la fiole conique (5.13).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

7.3 Extraction

Ajouter à la prise d'essai (7.2) 25 g de terre de diatomées (4.9), puis 25 ml d'eau et 250 ml de chloroforme (4.1) mesurés avec soin à l'aide d'une éprouvette. Boucher la fiole, secouer ou agiter durant 30 min à l'aide de l'appareil (5.3). Filtrer sur papier-filtre (5.11) en ayant soin d'éliminer les 10 premiers millilitres de filtrat et de recueillir une quantité de filtrat supérieure à 50 ml.

7.4 Purification

7.4.1 Préparation de la colonne

Remplir les deux tiers du tube pour chromatographie (5.4) avec du chloroforme (4.1) et ajouter 5 g de sulfate de sodium (4.10). S'assurer que la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium est plane, puis ajouter par petites fractions 10 g de gel de silice (4.7). Remuer avec précaution après chaque addition pour éliminer les bulles d'air. Laisser décanter durant 15 min et ajouter ensuite avec précaution 10 g de sulfate de sodium (4.10). Ouvrir le robinet et laisser s'écouler le liquide jusqu'à proximité immédiate de la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium. Fermer le robinet.

7.4.2 Purification

Prélever à la pipette (5.14) 50 ml du filtrat recueilli en 7.3 dans une fiole conique de 250 ml, ajouter 100 ml de *n*-hexane (4.2). Mélanger et transvaser quantitativement le mélange dans la colonne en rinçant avec du *n*-hexane. Ouvrir le robinet et laisser s'écouler le liquide à une vitesse de 8 ml/min à 12 ml/min, jusqu'à la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium. Fermer le robinet. Éliminer le liquide récupéré et ajouter dans la colonne 100 ml d'oxyde diéthylique (4.3). Ouvrir le robinet et éliminer à nouveau le liquide jusqu'à la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium. Veiller lors de ces opérations à ce que la colonne ne soit pas mise à sec.

Verser ensuite 150 ml du mélange chloroforme/méthanol (4.5) et récupérer la totalité de l'éluat dans le ballon de 500 ml de l'évaporateur rotatif (5.5). Évaporer à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif, de préférence sous un courant de gaz inerte (4.12), à pression réduite et à une température ne dépassant pas 50 °C.

En l'absence d'un évaporateur rotatif, ajouter un régularisateur d'ébullition et évaporer presque jusqu'à sec sur un bain d'eau.

Transvaser quantitativement le résidu dans le tube gradué de 10 ml (5.12) à l'aide de chloroforme (4.1) ou du mélange benzène/acétonitrile (4.4). Évaporer à nouveau la solution, par exemple dans un bain d'eau, de préférence sous un courant de gaz inerte (4.12), et amener ensuite le volume à 2,0 ml avec du chloroforme (4.1) ou du mélange benzène/acétonitrile (4.4).

7.5 Chromatographie sur couche mince

7.5.1 Méthode A — Chromatographie monodimensionnelle

7.5.1.1 Choix du solvant

Le choix du solvant (4.6.1, 4.6.2, 4.6.3, 4.6.4 ou 4.6.5) doit être effectué au préalable afin de s'assurer que les aflatoxines B₁ et B₂ sont complètement séparées lorsque la plaque est développée, ce qui dépend du lot de plaques en cours d'utilisation.

Déposer 25 µl de la solution qualitative (4.15) sur la plaque préparée (5.7) (pour chaque solvant, une plaque doit être contrôlée).

Suivre le mode opératoire spécifié en 7.5.1.2 pour le développement, l'évaporation et l'irradiation.

Deux taches distinctes sont obtenues lorsque le solvant convient.

7.5.1.2 Mode opératoire

Déposer ponctuellement à l'aide de pipettes capillaires ou de microseringues sur une plaque pour chromatographie sur couche mince (5.7), à 20 mm du bord inférieur et à des intervalles de 20 mm, les volumes indiqués ci-après de la solution étalon d'aflatoxine B₁ et de l'extrait: <https://standards.iteh.ai>

- 10 µl, 15 µl, 20 µl, 30 µl et 40 µl de la solution étalon d'aflatoxine B₁ (4.14);
- 10 µl de l'extrait obtenu en 7.4.2 et, en suspension sur le même point, 20 µl de la solution étalon d'aflatoxine B₁ (4.14);
- 10 µl et 20 µl de l'extrait obtenu en 7.4.2.

Développer le chromatogramme à l'abri de la lumière, à l'aide de l'un des solvants de développement choisi (voir 7.5.1.1).

Retirer la plaque de la cuve, laisser évaporer les solvants de la plaque à l'abri de la lumière et examiner ensuite à la lumière UV en plaçant la plaque à 10 cm de la lampe (5.8). Les taches d'aflatoxine B₁ donnent une fluorescence bleue.

7.5.2 Méthode B — Chromatographie bidimensionnelle

7.5.2.1 Application des solutions (voir Figure 1)

Tracer sur une plaque (5.7) deux droites parallèles à deux côtés contigus (à des distances respectives de 50 mm et 60 mm de ces côtés), destinées à délimiter la migration des fronts de solvants. Déposer sur la plaque à l'aide de pipettes capillaires ou de microseringues les solutions indiquées ci-après:

- au point A: 20 µl de l'extrait purifié de l'échantillon, obtenu en 7.4.2;
- au point B: 20 µl de la solution étalon (4.14);
- au point C: 10 µl de la solution étalon (4.14);

- au point D: 20 μ l de la solution étalon (4.14);
- au point E: 40 μ l de la solution étalon (4.14).

Sécher à l'aide d'un léger courant d'air ou de gaz inerte (4.12). Les taches obtenues doivent avoir un diamètre de 5 mm environ.

7.5.2.2 Développement (voir Figure 1)

Développer le chromatogramme dans la direction I à l'aide du solvant de développement (4.6.3) (couche de 1 cm dans une cuve saturée), à l'abri de la lumière, jusqu'à ce que le front de solvant atteigne la ligne de délimitation. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher durant 15 min au moins à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

Développer ensuite le chromatogramme dans la direction II à l'aide du solvant de développement (4.6.1) (couche de 1 cm dans une cuve non saturée), à l'abri de la lumière, jusqu'à ce que le front de solvant atteigne la ligne de délimitation. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

Dimensions en millimètres

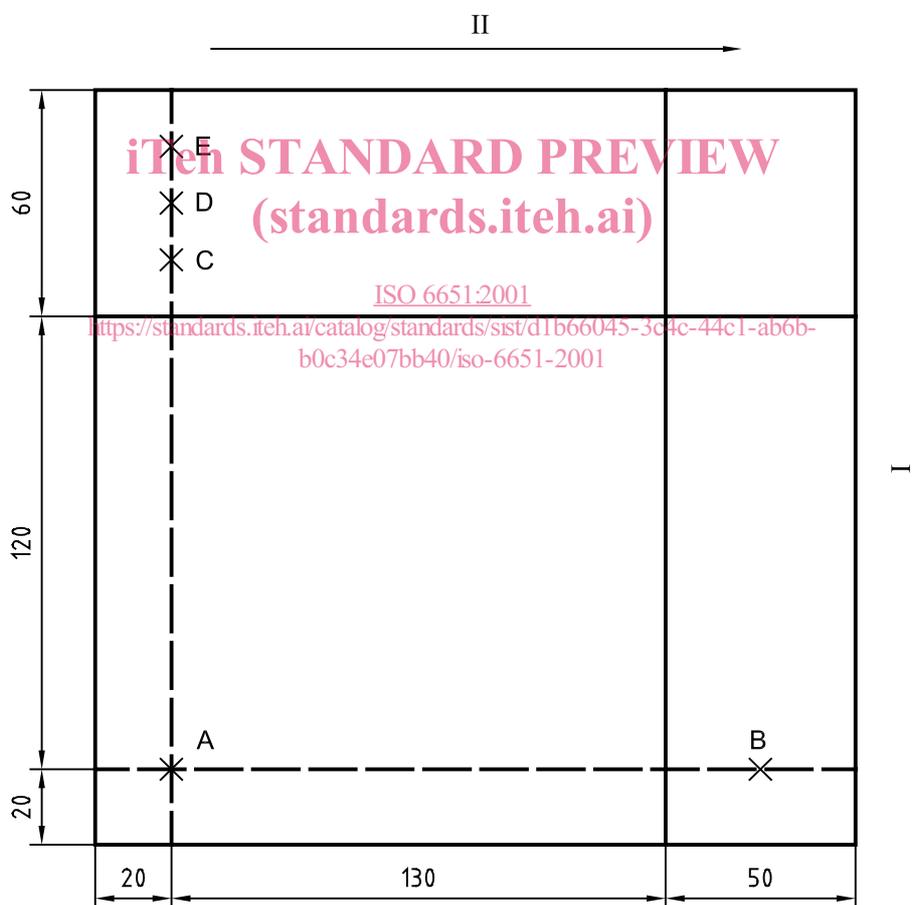


Figure 1 — Application des solutions