
**Aliments des animaux — Dosage
de l'aflatoxine B₁**

Animal feeding stuffs — Determination of aflatoxin B₁

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 17375:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7ab30cab-7966-408e-afaa-ed62e0219834/iso-17375-2006)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7ab30cab-7966-408e-afaa-
ed62e0219834/iso-17375-2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7ab30cab-7966-408e-afaa-ed62e0219834/iso-17375-2006)



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 17375:2006](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7ab30cab-7966-408e-afaa-ed62e0219834/iso-17375-2006>

© ISO 2006

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
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Principe	1
4 Réactifs	1
5 Appareillage	4
6 Modes opératoires	5
6.1 Conditionnement des colonnes d'immunoaffinité	5
6.2 Extraction	6
6.3 Purification sur colonne d'immunoaffinité	6
6.3.1 Généralités	6
6.3.2 Option A (recommandée)	6
6.3.3 Option B (le cas échéant uniquement)	6
6.4 Dérivation postcolonne	7
6.5 Courbe d'étalonnage	7
6.6 Calculs	7
6.7 Modes opératoires de dopage afin de déterminer le taux de récupération	8
7 Fidélité	8
7.1 Essai interlaboratoires	8
7.2 Répétabilité	8
7.3 Reproductibilité	9
8 Rapport d'essai	9
Annexe A (informative) Résultats d'un essai interlaboratoires	10
Bibliographie	11

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 17375 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 17375:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7ab30cab-7966-408e-afaa-ed62e0219834/iso-17375-2006>

Aliments des animaux — Dosage de l'aflatoxine B₁

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de dosage de l'aflatoxine B₁ dans les aliments des animaux en utilisant la chromatographie liquide haute performance avec dérivation postcolonne.

Elle est applicable aux aliments pour animaux dont la teneur en graisse est inférieure ou égale à 50 %.

Il a été démontré que la limite de quantification de l'aflatoxine B₁ par cette méthode est inférieure à 0,5 µg/kg avec un rapport signal/bruit de 6.

NOTE La méthode est basée sur celle donnée dans la Référence [1].

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

Un échantillon d'essai est extrait avec un mélange de solvants (acétone/eau). L'extrait est filtré, puis dilué avec de l'eau ou un tampon phosphate salin (PBS) jusqu'à obtention d'une concentration en solvant spécifiée. Une aliquote est ensuite déposée sur une colonne d'immunoaffinité contenant des anticorps spécifiques à l'aflatoxine B₁. L'aflatoxine B₁ est extraite de la colonne d'immunoaffinité par du méthanol pur, puis quantifiée par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (CLHP-PI) avec dérivation postcolonne impliquant une bromuration. La dérivation postcolonne est obtenue avec du brome généré électrochimiquement ou avec du bromure de pyridinium perbromure, suivie d'une détection fluorimétrique.

4 Réactifs

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

AVERTISSEMENT — Cette méthode requiert l'utilisation de substances liquides toxiques inflammables comme l'acétone, le méthanol et l'acétonitrile. Éviter tout contact avec ces substances et les maintenir éloignées de toutes les sources de chaleur, d'étincelles ou de flammes.

NOTE Les méthodes de décontamination des déchets de laboratoire [2], [3] ont été élaborées et validées par le Centre international de recherche sur le cancer (OMS).

4.1 Eau, de qualité 3, conformément à l'ISO 3696:1987.

4.2 Tampon phosphate salin (PBS), pH 7,4.

Le PBS peut être préparé à partir de chlorure de potassium (0,20 g), de dihydrogénophosphate de potassium (0,20 g), d'hydrogénophosphate disodique anhydre (1,16 g) [ou d'hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (2,92 g)] et de chlorure de sodium (8,00 g) ajoutés à 900 ml d'eau purifiée. Après dissolution, le pH doit être ajusté à 7,4 (avec du HCl à 0,1 mol/l ou du NaOH à 0,1 mol/l, selon le cas) et la solution complétée à 1,0 l.

Il est également possible d'utiliser des comprimés de tampon phosphate, disponibles dans le commerce, présentant des propriétés équivalentes.

Le PBS n'étant pas microbiologiquement stable, il convient de le préparer extemporanément au moins une fois par semaine.

4.3 Bromure de pyridinium perbromure (PBPB, CAS: 39416-48-3).

Si du brome généré électrochimiquement est utilisé, ce réactif n'est pas nécessaire.

4.4 Bromure de potassium.

Si du PBPB est utilisé, ce réactif n'est pas nécessaire.

4.5 Acétonitrile de qualité CLHP.

4.6 Méthanol de qualité CLHP.

4.7 Acétone, pure.

4.8 Eau de qualité CLHP, conforme à la qualité 1 de l'ISO 3696:1987.

4.9 Solvant d'extraction, solution d'acétone (4.7) et d'eau [85+15 (par volume)].

4.10 Acide nitrique, $c(\text{HNO}_3) = 4 \text{ mol/l}$.

Si du PBPB est utilisé, ce réactif n'est pas nécessaire.

4.11 Colonne d'immunoaffinité.

Il convient que la colonne d'immunoaffinité contienne des anticorps spécifiques à l'aflatoxine B₁. Il convient que la colonne d'immunoaffinité présente une capacité d'au moins 40 ng d'aflatoxine B₁ et donne un taux de récupération d'au moins 80 % d'aflatoxine B₁, lorsque l'on dépose une solution étalon contenant 0,25 ng d'aflatoxine B₁ dans une solution de solvants acétone/eau.

4.12 Phase mobile CLHP, solvant A, à utiliser uniquement avec le PBPB.

Utiliser un mélange de solvants eau (4.8)/acétonitrile (4.5)/méthanol (4.6) [6+2+3 (par volume)]. Pour garantir une meilleure séparation, il est possible d'ajuster le rapport des solvants.

4.13 Phase mobile CLHP, solvant B, à utiliser uniquement avec du brome généré électrochimiquement.

Utiliser un mélange de solvants eau (4.8)/acétonitrile (4.5)/méthanol (4.6) [6+2+3 (par volume)] contenant 120 mg de bromure de potassium (4.4) et 350 µl d'acide nitrique à 4 mol/l (4.10) par litre de phase mobile. Pour garantir une meilleure séparation, il est possible d'ajuster le rapport des solvants.

Il convient de dégazer les phases mobiles (4.12/4.13).

4.14 Réactif postcolonne, à utiliser uniquement avec le PBPB.

Dissoudre 25 mg de PBPB (4.3) dans 500 ml d'eau. La solution peut être conservée quatre jours dans une pièce à l'abri de la lumière, à température ambiante. Ce réactif postcolonne doit être utilisé uniquement avec la phase mobile A (4.12) et non avec la phase mobile B (4.13).

NOTE Le réactif postcolonne n'est stable que pendant 3 jours.

4.15 Toluène/acétonitrile, [98+2 (par volume)].

4.16 Étalon d'aflatoxine B₁, sous forme de cristaux ou de film en ampoule pour des besoins d'analyse.

AVERTISSEMENT 1 — Cette méthode requiert l'utilisation de solutions d'aflatoxine B₁. Les aflatoxines sont cancérigènes pour l'homme. Une attention particulière doit être portée aux recommandations du Centre internationale de recherche sur le cancer (OMS) [2].

AVERTISSEMENT 2 — Les aflatoxines sont sujettes à une dégradation par la lumière. Protéger de la lumière du jour le laboratoire où sont réalisées les analyses et conserver les solutions étalons d'aflatoxine à l'abri de la lumière en utilisant des flacons ambrés ou du papier aluminium.

4.17 Solutions d'étalonnage pour CLHP.

4.17.1 Solution mère.

Préparer une solution mère d'aflatoxine B₁ (4.16) à 10,0 µg/ml dans un mélange de toluène/acétonitrile (4.15).

NOTE Cette solution est stable pendant au moins un an, à condition qu'elle soit conservée dans de la verrerie préalablement lavée à l'acide et à l'abri de la lumière, à une température de -18 °C. La solution mère peut aussi être préparée dans le méthanol (4.6) si elle est conservée pendant une période plus brève (durée maximale de 3 mois). En effet, les solutions préparées dans le méthanol sont plus sensibles à la lumière du jour et au pH alcalin de la surface du verre.

Bien envelopper les fioles dans du papier aluminium et les conserver à une température inférieure à 4 °C. Pour déterminer la concentration exacte des aflatoxines de la solution mère, enregistrer le spectre d'absorption entre 330 nm et 370 nm dans des cuves en quartz de 1 cm (5.21) à l'aide d'un spectrophotomètre (5.20), avec le mélange toluène-acétonitrile dans la cuve de référence. Calculer la concentration massique des aflatoxines, c_a , en microgrammes par millilitre, à l'aide de l'Équation (1):

$$c_a = A_{\max} \times \frac{M_a \times 100}{\varepsilon_a \times d} \quad (1)$$

où

- A_{\max} est l'absorbance maximale déterminée sur le spectre d'absorption;
- M_a est la masse molaire d'aflatoxine B₁, en grammes par mole (312 g/mol);
- ε_a est le coefficient d'absorption de l'aflatoxine B₁, en mètres carrés par mole (1 930 m²/mol pour le mélange toluène/acétonitrile et 2 150 m²/mol pour les solutions à base de méthanol);
- d est le trajet optique de la cuve, en centimètres.

4.17.2 Solution étalon.

À partir de la solution mère (4.17.1), préparer une solution étalon d'aflatoxine B₁ (4.16) contenant 50,0 ng/ml dans un mélange toluène/acétonitrile (4.15) ou dans du méthanol (4.5).

4.17.3 Option A (voir 6.3).

À l'aide d'une pipette, prélever dans la solution étalon (4.17.2) les volumes indiqués dans le Tableau 1 (Option A) et les placer dans différentes fioles jaugées de 20 ml. Évaporer à sec la solution de toluène/acétonitrile sous un courant d'azote, à température ambiante. Si du méthanol a été utilisé lors de la préparation de la solution mère, l'évaporation n'est pas nécessaire. Ajouter dans chaque fiole 7 ml de méthanol, laisser les aflatoxines se dissoudre, puis compléter au trait de jauge avec de l'eau et bien mélanger.

NOTE Le mélange du méthanol et de l'eau aboutit à une contraction de volume.

4.17.4 Option B (voir 6.3).

À l'aide d'une pipette, prélever dans la solution étalon (4.17.2) les volumes indiqués dans le Tableau 1 (Option B) et les placer dans au moins cinq fioles jaugées de 20 ml. Évaporer à sec la solution de

toluène/acétonitrile sous un courant d'azote, à température ambiante. Si du méthanol a été utilisé lors de la préparation de la solution mère, l'évaporation n'est pas nécessaire. Ajouter dans chaque fiole environ 10 ml de méthanol, laisser les aflatoxines se dissoudre, puis compléter au trait de jauge avec du méthanol pur (pas avec un mélange eau/méthanol) et bien mélanger. Transférer ensuite exactement 1 ml de cette solution étalon de travail dans un flacon en verre préalablement lavé à l'acide (voir Avertissement en 5.7), évaporé à sec conformément à l'Option B (6.3.3), puis redissous dans un volume identique au volume initial ayant servi à redissoudre les échantillons (6.3). Calculer la concentration d'aflatoxine B₁ dans les solutions évaporées et redissoutes en nanogrammes par millilitre. Utiliser ces valeurs de concentration pour effectuer les calculs conformément à 6.6. Dans ce cas, le domaine d'étalonnage restera inchangé.

Tableau 1 — Préparation des solutions étalons de travail

Étalon de travail	Option A		Option B	
	Aliquote de solution étalon µl	Concentration d'aflatoxine B ₁ ng/ml	Aliquote de solution étalon µl	Concentration d'aflatoxine B ₁ ng/ml
1	20	0,050	100	0,250
2	70	0,175	350	0,875
3	120	0,300	600	1,500
4	170	0,425	850	2,125
5	220	0,550	1 100	2,750

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7ab30cab-7966-408e-afaa-752006>

- 5.1 **Agitateur mécanique à oscillations verticales ou horizontales**, réglable.
- 5.2 **Papier-filtre**, d'un diamètre de 24 cm, préalablement plié (par exemple cellulose pour les précipités fins).
- 5.3 **Erlenmeyer**, avec col rodé ou à vis.
- 5.4 **Papier-filtre en microfibres de verre**, d'un diamètre de 5 cm (par exemple rétention de particules > 1,6 µm).
- 5.5 **Réservoir**, de 75 ml avec adaptateur Luer pour fixation sur colonnes d'immunoaffinités.
- 5.6 **Seringue**, de 20 ml avec embout à verrouillage ou bouchon en caoutchouc pour fixation sur colonnes d'immunoaffinité.
- 5.7 **Fioles jaugées**, d'une capacité de 5 ml, de 10 ml et de 20 ml avec une exactitude d'au moins 0,5 %.

AVERTISSEMENT — L'utilisation d'une verrerie non nettoyée à l'acide (par exemple les flacons, les tubes, les fioles) pour les solutions aqueuses d'aflatoxines peut provoquer une perte d'aflatoxine. Il convient de faire particulièrement attention avec la verrerie neuve. Ainsi, avant de l'utiliser, la plonger dans de l'acide dilué (par exemple de l'acide sulfurique à 2 mol/l) pendant plusieurs heures, puis la rincer abondamment avec de l'eau distillée pour ôter toute trace d'acide (il est possible de le vérifier en utilisant du papier pH).

- 5.8 **Pompe CLHP**, capable de délivrer un débit de (1,000 ± 0,005) ml/min.
- 5.9 **Système d'injection**, permettant une injection en boucle complète (une boucle d'au moins 100 µl est recommandée). Il doit être garanti que l'écart-type relatif du signal de l'intégrateur pour des injections

multiples ($n = 10$) d'une solution d'aflatoxine B₁ étalon (concentration équivalente à un niveau de contamination de 1 µg/kg) donne une valeur maximale de 10 %. La traçabilité de ces données doit être conservée.

5.10 Colonne CLHP-PI, par exemple LC-18 ou ODS-2, l'utilisation d'une précolonne est facultative mais recommandée.

5.11 Système de dérivation postcolonne avec PBPB (alternative à 5.12), comprenant

- une deuxième pompe CLHP sans pulsation (non péristaltique);
- un connecteur en T sans volume mort;
- un tube de réaction en PTFE avec un diamètre intérieur d'au moins 45 cm × 0,5 mm.

Le temps de réaction doit être d'au moins 4 s avant la détection.

5.12 Système de dérivation postcolonne CLHP avec brome généré électrochimiquement.

Le dispositif doit être installé conformément aux instructions du fabricant. Pour confirmer l'aflatoxine B₁, la colonne CLHP doit être déconnectée du dispositif de bromuration et doit être directement connectée au détecteur fluorimétrique.

Il n'est pas recommandé de couper le courant électrique lorsque le dispositif de bromuration est toujours sous tension, car il est possible que des résidus de brome demeurent dans la membrane de la cellule du dispositif.

5.13 Détecteur fluorimétrique, avec un filtre d'excitation à 360 nm et un filtre de coupure d'émission > 420 nm ou équivalent.

Les réglages recommandés pour les détecteurs réglables sont: Ex = 365 nm, Em = 435 nm, BW = 18 nm.

5.14 Élément filtrant jetable (0,45 µm), avant utilisation il faut vérifier qu'aucune perte d'aflatoxine ne se produise au cours de la filtration (taux de récupération), car il est possible que divers matériaux du filtre retiennent l'aflatoxine B₁.

5.15 Pipettes à un trait, d'une capacité de 1 ml, de 2 ml, de 5 ml et de 10 ml.

5.16 Balance analytique, capable de peser à 0,1 mg près.

5.17 Balance de laboratoire, capable de peser à 0,01 g près.

5.18 Micropipette(s) ou microseringue(s), d'une capacité de 20 µl à 500 µl.

5.19 Évaporateur, facultatif, nécessaire uniquement pour l'Option B, (6.3.3).

5.20 Spectrophotomètre.

5.21 Cuve en quartz, avec trajet optique de 1 cm.

6 Modes opératoires

6.1 Conditionnement des colonnes d'immunoaffinité

Il convient que les colonnes d'immunoaffinité (4.11) soient à température ambiante avant d'être conditionnées. Concernant le conditionnement, suivre les instructions du fabricant. Sauf indication contraire, déposer 10 ml de PBS (4.2) sur la colonne d'immunoaffinité et les laisser s'écouler à travers la colonne à une vitesse de 2 ml/min à 3 ml/min (sous l'effet de la gravité). S'assurer qu'il reste un peu de PBS (0,5 ml) sur la colonne d'immunoaffinité avant le dépôt de l'échantillon.