

---

---

**Lait et lait en poudre — Détermination de la teneur en aflatoxine M<sub>1</sub> — Purification par chromatographie d'immunoaffinité et détermination par chromatographie en phase liquide à haute performance**

*Milk and milk powder — Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> content — Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 14501:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2d28e8b0-ed43-454a-a3d4-a9a6541276c5/iso-14501-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2d28e8b0-ed43-454a-a3d4-a9a6541276c5/iso-14501-2007>



Numéros de référence  
ISO 14501:2007(F)  
FIL 171:2007(F)

**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 et la FIL déclinent 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 et les comités nationaux de la FIL. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central de l'ISO à l'adresse donnée ci-dessous.

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

[ISO 14501:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2d28e8b0-cd43-454a-a3d4-a9a6541276c5/iso-14501-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2d28e8b0-cd43-454a-a3d4-a9a6541276c5/iso-14501-2007>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO et FIL 2007

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 soit de l'ISO soit de la FIL, à l'une ou l'autre des adresses ci-après.

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)

Fédération Internationale de Laiterie  
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Bruxelles  
Tel. + 32 2 733 98 88  
Fax + 32 2 733 04 13  
E-mail [info@fil-idf.org](mailto:info@fil-idf.org)  
Web [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

Publié en Suisse

## 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 14501|FIL 171 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de laiterie (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette deuxième édition de l'ISO 14501|FIL 171 annule et remplace la première édition (ISO 14501:1998), qui a fait l'objet d'une révision technique.

## Avant-propos

La **FIL (Fédération internationale de laiterie)** est une fédération mondiale du secteur laitier avec un Comité National dans chacun de ses pays membres. Chaque Comité National a le droit de faire partie des Comités permanents de la FIL auxquels sont confiés les travaux techniques. La FIL collabore avec l'ISO pour l'élaboration de méthodes normalisées d'analyse et d'échantillonnage pour le lait et les produits laitiers.

Les projets de Normes internationales adoptés par les Équipes d'Action et les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux de la FIL 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. La FIL ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 14501|FIL 171 a été élaborée par la Fédération internationale de laiterie (FIL) et le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Elle est publiée conjointement par la FIL et l'ISO.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO/FIL, *Contaminants biologiques*, du Comité permanent chargé des *Méthodes analytiques pour additifs et contaminants*, sous la conduite de son chef de projet, Monsieur L. Sørensen (DK).

Cette édition de l'ISO 14501|FIL 171 annule et remplace la FIL 171:1995, qui a fait l'objet d'une révision technique.

[ISO 14501:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2d28e8b0-ed43-454a-a3d4-a9a6541276c5/iso-14501-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2d28e8b0-ed43-454a-a3d4-a9a6541276c5/iso-14501-2007>

# Lait et lait en poudre — Détermination de la teneur en aflatoxine M<sub>1</sub> — Purification par chromatographie d'immunoaffinité et détermination par chromatographie en phase liquide à haute performance

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode pour le dosage de l'aflatoxine M<sub>1</sub> dans le lait et le lait en poudre. La limite de détection se situe à 0,08 µg/kg de poudre de lait entier, ce qui correspond à 0,008 µg/l de lait liquide reconstitué.

La méthode est également applicable au lait à faible teneur en matière grasse, au lait écrémé et au lait en poudre à faible teneur en matière grasse ou écrémé.

### AVERTISSEMENT

- 1 La méthode décrite dans la présente Norme internationale nécessite l'utilisation de solutions d'aflatoxine M<sub>1</sub>. Les aflatoxines présentent un danger cancérigène pour l'homme. On attire l'attention sur la déclaration de l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer (OMS) [4], [5].
- 2 Protéger correctement de la lumière du jour le laboratoire dans lequel sont effectuées les analyses et conserver les solutions étalons d'aflatoxine à l'abri de la lumière (par exemple à l'aide d'une feuille d'aluminium).
- 3 L'utilisation d'une verrerie pour les solutions aqueuses d'aflatoxine (par exemple tubes, flacons, ballons et fioles, béchers, seringues) lavée avec des produits non acides peut provoquer une perte d'aflatoxine.

De plus, il convient de laisser tremper pendant plusieurs heures dans de l'acide dilué (par exemple de l'acide sulfurique à 2 mol/l) la verrerie neuve de laboratoire entrant en contact avec les solutions aqueuses d'aflatoxine, puis de la rincer à l'eau distillée afin de retirer toute trace d'acide (vérifier que le pH se situe entre 6 et 8).

- 4 Utiliser une méthode de décontamination des déchets de laboratoire tels que composés solides, solutions dans les solvants organiques, verrerie, solutions aqueuses et pilules. La méthode de décontamination a été mise au point et validée dans le cadre d'un programme de l'Agence internationale pour la recherche contre le cancer (OMS) [4], [5].

## 2 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

### 2.1

#### teneur en aflatoxine M<sub>1</sub>

concentration ou fraction massique de substances, déterminée selon le mode opératoire spécifié dans la présente Norme internationale

NOTE La concentration en aflatoxine M<sub>1</sub> est exprimée en microgrammes par litre et la fraction massique en microgrammes par kilogramme.

### 3 Principe

L'aflatoxine M<sub>1</sub> est extraite par passage de la prise d'essai à travers une colonne d'immunoaffinité qui contient des anticorps spécifiques fixés sur un support solide.

Au fur et à mesure que l'échantillon traverse la colonne, les anticorps se lient de manière sélective à toute aflatoxine M<sub>1</sub> (antigène) présente et constituent un complexe anticorps-antigène. Tous les autres composants de la matrice échantillon sont éliminés de la colonne avec de l'eau. L'aflatoxine M<sub>1</sub> est ensuite éluée de la colonne et l'éluat recueilli. La quantité d'aflatoxine M<sub>1</sub> présente dans l'éluat est déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) associée à une détection fluorimétrique.

### 4 Réactifs

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

#### 4.1 Colonne d'immunoaffinité.

La colonne d'immunoaffinité doit contenir des anticorps anti-aflatoxine M<sub>1</sub>. La capacité ne doit pas être inférieure à 100 ng d'aflatoxine M<sub>1</sub> (ce qui correspond à 2 µg/l pour 50 ml d'une prise d'essai utilisés). Son taux de récupération ne doit pas être inférieur à 80 % d'aflatoxine M<sub>1</sub> en cas d'utilisation d'une solution étalon contenant 4 ng de toxine (ce qui correspond à 80 ng/l pour 50 ml d'échantillon utilisés). Toute colonne d'immunoaffinité répondant aux spécifications de performance susmentionnées peut être utilisée. Les performances des colonnes doivent être contrôlées régulièrement et au moins une fois pour chaque lot de colonnes (voir le mode opératoire en 4.1.1 et en 4.1.2).

##### 4.1.1 Contrôle de la capacité.

Diluer 1,0 ml de solution étalon de garde d'aflatoxine M<sub>1</sub> (4.4.2) à 50 ml avec de l'eau. Bien mélanger et verser la totalité du volume dans la colonne d'immunoaffinité en suivant soigneusement les recommandations données par le fabricant pour l'utilisation des colonnes. Laver la colonne et éluer la toxine. Déterminer la quantité d'aflatoxine M<sub>1</sub> éluée de la colonne par CLHP après avoir préparé la dilution appropriée de l'éluat final.

Calculer la capacité d'aflatoxine. Comparer le résultat à la spécification donnée en 4.1.

##### 4.1.2 Contrôle du taux de récupération.

À l'aide d'une pipette (5.4), diluer 0,8 ml de la solution étalon de travail d'aflatoxine M<sub>1</sub> à 0,005 µg/ml (4.4.3) à 10 ml avec de l'eau. Bien mélanger et verser la totalité du volume dans la colonne d'immunoaffinité en suivant soigneusement les recommandations données par le fabricant pour l'utilisation des colonnes. Laver la colonne et éluer la toxine. Déterminer la quantité d'aflatoxine M<sub>1</sub> éluée de la colonne par CLHP après avoir préparé la dilution appropriée de l'éluat final.

Calculer le taux de récupération d'aflatoxine. Comparer le résultat à la spécification donnée en 4.1.

#### 4.2 Acétonitrile, pur, qualité pour CLHP.

##### 4.2.1 Solution d'acétonitrile, 25 %.

Ajouter 250 ml d'acétonitrile (4.2) à 750 ml d'eau et mélanger. On peut utiliser d'autres volumes dans les mêmes proportions. Dégazer la solution (éluant) avant usage.

##### 4.2.2 Solution d'acétonitrile, 10 %.

Ajouter 100 ml d'acétonitrile (4.2) à 900 ml d'eau et mélanger. On peut utiliser d'autres volumes dans les mêmes proportions. Dégazer la solution avant usage.

### 4.3 Azote gazeux.

### 4.4 Solutions étalons d'aflatoxine M<sub>1</sub>.

#### 4.4.1 Solution étalon mère d'aflatoxine M<sub>1</sub>.

Préparer la solution étalon mère d'aflatoxine M<sub>1</sub> en diluant de l'aflatoxine M<sub>1</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>) dans de l'acétonitrile (4.2) de manière à obtenir une solution ayant une concentration nominale de 10 µg/ml. Déterminer sa concentration réelle en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde correspondant à l'absorption maximale de la manière suivante.

À l'aide du spectrophotomètre (5.14), enregistrer l'absorbance de la solution étalon par rapport à l'acétonitrile (4.2) comme blanc entre 340 nm et 370 nm. Mesurer l'absorbance, *A*, à la longueur d'onde correspondant à son absorption maximale, λ<sub>max</sub>, qui est proche de 350 nm.

Calculer la concentration, *c*<sub>1</sub>, exprimée en µg/ml, à l'aide de l'Équation (1):

$$c_1 = A \times M \times \frac{100}{d \times \varepsilon} \quad (1)$$

où

*A* est la valeur numérique de l'absorbance à λ<sub>max</sub>;

*M* est la masse molaire de l'aflatoxine M<sub>1</sub> (*M* = 328);

*d* est le parcours optique (*d* = 1 cm);

*ε* est la valeur numérique du coefficient d'absorption de la toxine dans l'acétonitrile, en m<sup>2</sup>·mol<sup>-1</sup> (*ε* = 1 985 m<sup>2</sup>·mol<sup>-1</sup>).

#### 4.4.2 Solution étalon de garde d'aflatoxine M<sub>1</sub>.

Après avoir vérifié sa concentration, diluer la solution étalon mère d'aflatoxine M<sub>1</sub> (4.4.1) avec de l'acétonitrile (4.2) de façon à obtenir une solution étalon de garde d'aflatoxine M<sub>1</sub> de 0,1 µg/ml. La fiole contenant la solution étalon de garde doit être bien bouchée et enveloppée dans une feuille d'aluminium à l'abri de la lumière.

Conserver la solution étalon de garde d'aflatoxine M<sub>1</sub> dans l'obscurité au réfrigérateur à une température comprise entre 1 °C et 5 °C. Dans ces conditions, la solution étalon est stable pendant 2 mois au moins. Après deux mois, avant tout emploi de la solution, déterminer la concentration en aflatoxine M<sub>1</sub>. Si celle-ci a varié, rejeter la solution et en préparer une nouvelle.

#### 4.4.3 Solutions étalons de travail d'aflatoxine M<sub>1</sub>.

Avant de préparer les solutions étalons de travail d'aflatoxine M<sub>1</sub>, laisser la solution étalon de garde (4.4.2) parvenir à température ambiante avant de prélever les parties aliquotes de solution en vue de la dilution. Préparer les solutions étalons de travail le jour de leur utilisation.

Diluer la solution étalon de garde (4.4.2) avec la solution d'acétonitrile 10 % (4.2.2), de façon à arriver à une teneur en aflatoxine M<sub>1</sub> de 0,005 µg/ml.

Utiliser cette solution étalon de garde diluée pour la préparation d'une série de dilutions appropriées de solutions étalons de travail d'aflatoxine M<sub>1</sub>, afin d'obtenir, en fonction du volume de la boucle d'injection, des solutions étalons de travail de 0,05 ng, de 0,1 ng, de 0,2 ng et de 0,4 ng d'aflatoxine M<sub>1</sub> par ml. Diluer à l'aide de la solution d'acétonitrile 10 % (4.2.2).

## 5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, notamment, les éléments suivants.

- 5.1 **Seringues à usage unique**, de 10 ml et de 50 ml de capacité respective.
- 5.2 **Installation de vide** (par exemple ballon de Büchner, système Vac-Elut<sup>1)</sup> ou pompe péristaltique).
- 5.3 **Centrifugeuse**, pouvant provoquer une accélération radiale de 2 000g au minimum.
- 5.4 **Pipettes**, de 1,0 ml, de 2,0 ml et de 50,0 ml de capacité respective, ou **pipette automatique appropriée**.
- 5.5 **Béchers en verre**, de 250 ml de capacité.
- 5.6 **Fiole jaugée à un trait**, de 100 ml de capacité.
- 5.7 **Bains d'eau**, capables de fonctionner à 30 °C ± 2 °C, entre 35 °C et 37 °C et à 50 °C ± 5 °C.
- 5.8 **Papier-filtre**, Whatman n° 4<sup>1)</sup> ou équivalent.
- 5.9  **Tubes en verre coniques gradués**, à col et à bouchon en verre rodé, de 5 ml, de 10 ml et de 20 ml de capacité respective.
- 5.10 **Appareillage pour CLHP**, équipé d'une pompe à flux régulier, convenant pour la production d'un débit constant d'environ 1 ml/min, et d'un système d'injection, dont le volume est fixe ou variable, convenant pour l'injection de volumes de 20 µl à 500 µl.
- 5.11 **Colonne analytique pour chromatographie à polarité de phase inversée**, garnie de silice octadécyle de 3 µm ou de 5 µm, et avec colonne de garde remplie de matériau à polarité de phase inversée.
- 5.12 **Détecteur de fluorescence**, pouvant, à des longueurs d'onde d'excitation d'environ 365 nm et d'émission de 435 nm, permettre la détection (rapport du signal au bruit de fond: 5) de 0,02 ng d'aflatoxine M<sub>1</sub> injectée dans des conditions chromatographiques adéquates.
- 5.13 **Enregistreur à papier déroulant**, ou **intégrateur électronique** ou **système de traitement des données informatisé**.
- 5.14 **Spectrophotomètre**, pouvant mesurer des longueurs d'onde comprises entre 200 nm et 400 nm, avec cellules en quartz de 1 cm de parcours optique.
- 5.15 **Balance analytique**, pouvant peser à 0,01 g près.

## 6 Échantillonnage

Il convient qu'un échantillon représentatif ait été envoyé au laboratoire. Il convient qu'il n'ait pas été endommagé ou modifié pendant le transport ou le stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. L'ISO 707|FIL 50 présente une méthode d'échantillonnage recommandée.

---

1) Le système Vac-Elut et Whatman sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.



## 7 Mode opératoire

Dans la mesure du possible, réaliser le mode opératoire à l'abri de la lumière du jour.

Prendre en compte que le mode opératoire de reconstitution du lait à partir de la poudre, de centrifugation, de chargement de l'échantillon dans les colonnes d'affinité, de lavage de la colonne et d'éluion varieront légèrement en fonction des fabricants de colonnes. Par conséquent, suivre scrupuleusement les instructions spécifiques fournies avec les colonnes.

### 7.1 Préparation des échantillons pour essai

#### 7.1.1 Lait

Porter l'échantillon pour essai à une température comprise entre 35 °C et 37 °C, dans un bain d'eau (5.7). Filtrer l'échantillon à travers le ou les papiers-filtres (5.8), si nécessaire utiliser plusieurs filtres ou centrifuger avec une accélération radiale de 2 000 g au minimum pendant 15 min. Recueillir au moins 50 ml de l'échantillon de lait écrémé ainsi préparé. Poursuivre comme spécifié en 7.3.

#### 7.1.2 Lait en poudre

Peser, à 0,01 g près, 10 g de l'échantillon pour essai dans un bécher de 250 ml (5.5). Ajouter 50 ml d'eau préchauffée à 50 °C dans un bain d'eau (5.7) et les ajouter par petites quantités à l'échantillon pour essai. Mélanger, à l'aide d'une baguette, jusqu'à obtention d'un mélange homogène.

Dans le cas où l'échantillon pour essai n'est pas complètement en suspension, placer le bécher dans un bain d'eau (5.7) à 50 °C pendant au moins 30 min. Mélanger régulièrement.

Laisser la solution d'essai refroidir entre 20 °C et 25 °C. Puis la transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml (5.6) en utilisant de petites quantités d'eau. Compléter jusqu'au trait de jauge de 100 ml avec de l'eau. Filtrer une quantité suffisante de l'échantillon reconstitué à travers le ou les papiers-filtres (5.8) ou centrifuger à une accélération radiale de 2 000 g au minimum pendant 15 min. Recueillir au moins 50 ml de l'échantillon de lait en poudre ainsi préparé. Poursuivre comme spécifié en 7.3.

### 7.2 Préparation de la colonne d'immunoaffinité

Fixer le corps d'une seringue à usage unique de 50 ml (5.1) à la partie supérieure de la colonne d'immunoaffinité (4.1). Relier la colonne d'immunoaffinité à l'installation de vide (5.2).

### 7.3 Extraction et purification des échantillons

Déposer 50 ml de l'échantillon pour essai préparé (7.1.1 ou 7.1.2) dans le corps d'une seringue (5.1). Les laisser passer au travers de la colonne d'immunoaffinité à un débit régulier de 2 ml/min à 3 ml/min, tout en contrôlant le débit à l'aide de l'installation de vide (5.2).

Remplacer la seringue de 50 ml par une seringue propre de 10 ml. Laver la colonne avec 10 ml d'eau en faisant passer l'eau au travers de la colonne, à un débit régulier. Sécher entièrement la colonne après lavage.

Déconnecter la colonne de l'installation de vide. Éluer lentement l'aflatoxine M<sub>1</sub> de la colonne en faisant passer 4 ml d'acétonitrile pur (4.2) pendant environ 60 s à travers la colonne, à l'aide d'une seringue de 10 ml. Contrôler le débit à l'aide du piston de la seringue.

Recueillir l'éluat dans un tube conique (5.9). Réduire l'éluat à un volume,  $V_e$  compris entre 20 µl et 500 µl, en plaçant le tube dans un bain d'eau (5.7) à 30 °C et sous un faible courant d'azote (4.3).