NORME INTERNATIONALE

ISO 18465

Première édition
2017-01

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Détermination quantitative de la toxine émétique (céreulide) par CL-SM/SM

Microbiology of the food chain — Quantitative determination of emetic toxin (cereulide) using LC-MS/MS

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/893ed60d-fca1-4d9c-9a6a-38e5c7345bdf/iso-18465-2017

Numéro de référence
ISO 18465:2017(F)

© ISO 2017

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/893ed60d-fca1-4d9c-9a6a-38e5c7345bdf/iso-18465-2017

DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos ..... **iv**
Introduction ..... **v**
1 Domaine d'application **1**
2 Références normatives **1**
3 Termes et définitions **1**
4 Principe général **1**
5 Réactifs **2**
6 Appareillage et matériel **3**
7 Mode opératoire **4**
7.1 Préparation de l'échantillon 4
7.2 Préparation des étalons 4
7.3 Analyse par CL-SM 5
7.3.1 Conditions CL 5
7.3.2 Conditions SM et paramètres d'optimisation 5
7.3.3 Transitions (MRM, multiple reaction monitoring) 6
8 Calcul **7**
9 Contrôles de la qualité **8**
10 Fidélité **8**
10.1 Généralités 8
10.2 Répétabilité 9
10.3 Reproductibilité 10
Annexe A (informative) **Résultats de l'étude interlaboratoires** **11**
Annexe B (informative) **Transitions possibles du céreulide en spectrométrie de masse (SM)[3]** **13**
Bibliographie **15**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/893ad69d-fa1-4d9c-9a6a-38e5c7345bdf/iso-18465-2017

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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 et l'IEC ne sauraient être tenues pour responsables de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: http://www.iso.org/iso/fr/foreword.html.

ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/893ed60d-fca1-4d9c-9a6a-38e3e7345bdf/iso-18465-2017

Le présent document a été élaboré par le comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

 © ISO 2017 – Tous droits réservés

Introduction

Le céreulide, la toxine émétique produite dans les aliments par certaines souches de *Bacillus cereus*, est une toxine stable à la chaleur et aux acides qui entraîne des nausées et des vomissements lorsqu'elle est ingérée. Dans des cas très rares, l'ingestion de la toxine peut entraîner la mort. En raison de sa stabilité, la toxine peut être toujours présente même lorsque *B. cereus* ne peut plus être détecté. La présence de céreulide semble liée aux aliments riches en amidon tels que le riz (et les plats à base de riz) et les pâtes (et les plats à base de pâtes). Toutefois, des données récentes tendent à indiquer que la survenue de toxi-infections alimentaires dues au céreulide est plus fréquente dans les aliments d'une manière générale[9]. La toxine, de structure cyclique, est constituée de 12 monomères au total, sous la forme d'une répétition de la séquence (D-O-Leucine-D-Alanine-L-O-Valine-L-Valine). Plusieurs méthodes ont été développées pour détecter et/ou quantifier la toxine. Certaines de ces méthodes sont des dosages biologiques non spécifiques[3, 4] et d'autres sont basées sur l'analyse chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM/SM) pour détecter et quantifier la toxine[5, 6, 7, 8]. Les méthodes chimiques étant plus spécifiques pour le céreulide, elles ont été choisies comme point de départ pour la normalisation d'une méthode de quantification du céreulide. Récemment, des recherches ont été menées sur la diversité chimique du céreulide. Au moins 18 variants de céreulide ont été détectés par séquençage par SM^n à piège ionique et CLHUP-TOF-SM, parmi lesquels les isocéreulides A–G[10] précédemment inconnus.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/893ed60d-fca1-4d9c-9a6a-38e5c7345bdf/iso-18465-2017

© ISO 2017 – Tous droits réservés

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/893ed60d-fca1-4d9c-9a6a-38e5c7345bdf/iso-18465-2017

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Détermination quantitative de la toxine émétique (céreulide) par CL-SM/SM

1 Domaine d'application

Le présent document décrit l'analyse quantitative de la toxine émétique céreulide par chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à la chromatographie liquide ultra performance (CLUHP), connectée à un système de spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM).

Le présent document s'applique à l'analyse de la toxine dans les produits destinés à la consommation humaine.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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).

iTeh STANDARD PREVIEW

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

(standards.iteh.ai)

ISO 1042, *Verrerie de laboratoire — Fioles jaugées à un trait*

ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/893ed60d-fca1-4d9c-9a6a-38e5c7345bdf/iso-18465-2017

3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse http://www.electropedia.org/

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse http://www.iso.org/obp

3.1
céreulide
toxine cyclo[D-O-Leucine-D-Alanine-L-O-Valine-L-Valine]$_3$ produite par certaines souches des espèces de *B. cereus*

4 Principe général

Le céreulide est extrait de la matrice alimentaire par agitation de l'échantillon avec de l'acétonitrile. Le $^{13}C_6$-céreulide est utilisé en tant qu'étalon interne. Les composants en solution sont séparés par CLHP ou CLUHP, puis détectés par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM). Le spectromètre de masse est équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation (ESI) utilisée en mode positif. Le taux de toxine émétique (céreulide) est exprimé en µg de céreulide par kg de produit.

© ISO 2017 – Tous droits réservés

5 Réactifs

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

5.1 Eau, conformément à l'ISO 3696.

5.2 Acétonitrile, de qualité CL-SM.

5.3 Méthanol, de qualité CL-SM.

5.4 Acide formique, 98 % à 100 %, de qualité analytique.

5.5 $^{13}C_6$-céreulide synthétique.[1)]

5.6 Céreulide synthétique.[1)]

5.7 Formiate d'ammonium, de qualité analytique.

5.8 Phase mobile A, constituée de 10 mmol/l de formate d'ammonium (5.7) avec 0,1 % (v/v) d'acide formique (5.4) dans l'eau (5.1).

5.9 Phase mobile B, constituée de 0,1 % (v/v) d'acide formique (5.4) dans l'acétonitrile (5.2).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.10 Solution mère IS-A de $^{13}C_6$-céreulide, ρ = 100 000 ng/ml (dans le méthanol).

Introduire 10 mg à 0,01 mg près de $^{13}C_6$-céreulide (5.5) dans une fiole jaugée en verre (6.11) de 100 ml, dissoudre le produit et ajuster au volume avec du méthanol (5.3). Cette solution n'est pas corrigée en fonction de la pureté du composé. Conserver la solution au congélateur (6.15).

ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8925d60d-fea1-4d9c-9a6a-38e5c7345bdf/iso-18465-2017

NOTE Les solutions mères et étalons (marquées et non marquées) de céreulide sont extrêmement stables, c'est-à-dire pendant plus de trois ans lorsqu'elles sont conservées au congélateur (6.15).

5.11 Solution étalon IS-B de $^{13}C_6$-céreulide, ρ = 1 000 ng/ml (dans le méthanol).

Introduire à la pipette (6.10) 1 000 µl de solution mère IS-A (5.10) de $^{13}C_6$-céreulide dans une fiole jaugée en verre (6.11) de 100 ml. Ajuster au volume avec du méthanol (5.3) et homogénéiser la solution. Conserver la solution au congélateur (6.15).

5.12 Solution étalon IS-C de $^{13}C_6$-céreulide, ρ = 100 ng/ml (dans l'acétonitrile).

Introduire à la pipette (6.10) 500 µl de solution mère IS-A (5.10) de $^{13}C_6$-céreulide dans une fiole jaugée en verre (6.11) de 500 ml. Ajuster au volume avec de l'acétonitrile (5.2) et homogénéiser. Conserver la solution au congélateur (6.15).

5.13 Solution étalon IS-D de $^{13}C_6$-céreulide, ρ = 10 ng/ml (dans l'acétonitrile).

Introduire à la pipette (6.10) 1 000 µl de solution étalon IS-B (5.11) de $^{13}C_6$-céreulide dans une fiole jaugée en verre (6.11) de 100 ml. Ajuster au volume avec de l'acétonitrile (5.2) et homogénéiser. Conserver la solution au congélateur (6.15).

---

1) Chiralix est un exemple de produit adéquat et disponible dans le commerce. 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.

© ISO 2017 – Tous droits réservés

5.14 Solution mère Cer-A de céreulide, ρ = 100 000 ng/ml (dans le méthanol).

Introduire 5 mg à 0,01 mg près de céreulide synthétique (5.6) dans une fiole jaugée en verre (6.11) de 50 ml, dissoudre le produit et ajuster au volume avec du méthanol (5.3). Cette solution n'est pas corrigée en fonction de la pureté du composé. Conserver la solution au congélateur (6.15).

5.15 Solution étalon Cer-B de céreulide, ρ = 100 ng/ml (dans l'acétonitrile).

Introduire à la pipette (6.10) 500 µl de solution mère A de céreulide (5.14) dans une fiole jaugée en verre (6.11) de 500 ml. Ajuster au volume avec de l'acétonitrile (5.2) et homogénéiser la solution. Conserver la solution au congélateur (6.15).

5.16 Solution mère Cer-C de céreulide, ρ = 10 ng/ml (dans l'acétonitrile).

Introduire à la pipette (6.10) 10 ml de solution étalon B de céreulide (5.15) dans une fiole jaugée en verre (6.11) de 100 ml. Ajuster au volume avec de l'acétonitrile (5.2) et homogénéiser la solution. Conserver la solution au congélateur (6.15).

5.17 Échantillon témoin positif ou **échantillon dopé** (niveau 10 ng/g environ).

6 Appareillage et matériel

6.1 Spectromètre de masse en tandem, équipé d'une interface ESI (en mode positif) et du mode de suivi de réactions multiples (multiple reaction monitoring, ou MRM).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Système CL, système de pompe (CLHP ou CLUHP), dégazeur, passeur d'échantillons, four pour colonne.

Logiciel CL-SM, adapté pour collecter et intégrer les données.

ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/893ed60d-fca1-4d9c-9a6a-38e5c7345bdf/iso-18465-2017

6.2 CL colonne (C-18)

Pour l'CLHP, colonne Supelco Discovery®[2] C-18, 100 mm × 2,1 mm de 5 µm ou équivalente.

Pour l'CLUHP, colonne Waters BEH C-18,[3] 100 mm ou 50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm ou équivalente.

6.3 Centrifugeuse, capable de centrifuger des tubes de 50 ml entre 1 000*g* et 1 500*g*.

6.4 Centrifugeuse, capable de centrifuger des tubes de 2 ml entre 10 000*g* et 12 000*g*.

6.5 Tubes à centrifuger, (en plastique) avec bouchon obturateur, 2 ml, jetables.

6.6 Tubes à centrifuger, (en verre) avec bouchon vissé sans fuite, 50 ml.

6.7 Agitateur mécanique horizontal, pouvant contenir des tubes à centrifuger de 50 ml.

6.8 Balance analytique, permettant des pesées à 0,01 mg.

6.9 Broyeur, par exemple mixeur, broyeur-mélangeur, broyeur cryogénique.

---

2) Supelco Discovery® est un exemple de produit adéquat et disponible dans le commerce. 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.

3) Waters BEH C-18 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. 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.

© ISO 2017 – Tous droits réservés

6.10 Pipettes à piston étalonnées, de capacités 10 µl à 100 µl, 100 µl à 1 000 µl et 1 000 µl à 5 000 µl, 2 000 µl à 10 000 µl.

6.11 Fioles jaugées en verre, de volumes 50 ml, 100 ml et 500 ml, etc. conformes à l'ISO 1042.

6.12 Flacons en verre pour passeur d'échantillons, avec bouchon vissé/à pression, 2 ml.

6.13 Filtres à membrane en PTFE, diamètre de 25 mm et taille de pore de 0,45 µm.

6.14 Agitateur vortex.

6.15 Congélateur, pouvant atteindre des températures inférieures à −15 °C, de préférence inférieures à −18 °C.

7 Mode opératoire

7.1 Préparation de l'échantillon

Conserver les échantillons (avant et pendant l'expérience) au congélateur (6.15) afin d'éviter la croissance des micro-organismes.

Prélever (100 ± 25) g d'une portion représentative de l'échantillon et les placer dans un flacon à échantillon. Lorsque la quantité d'échantillon disponible est limitée (par exemple lorsque les échantillons sont liés à une intoxication alimentaire), prélever autant d'échantillon que possible et procéder comme pour les autres échantillons. Dans ce cas, il convient d'ajouter une note lors de l'expression du résultat. Homogénéiser l'échantillon par broyage (6.9).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/893ed00d-fca1-4d5c-9a6a-38c3e7345bdf/iso-18465-2017

Introduire 2,5 g, au mg près (6.8), d'échantillon homogénéisé dans un tube à centrifuger (6.6). Ajouter à la pipette (6.10) 500 µl de solution étalon interne IS-C (5.12) et boucher le tube avec le bouchon à vis. Mélanger (6.14) pendant environ 10 s puis le laisser reposer pendant 30 min. Il convient d'utiliser des tubes en verre, en particulier lorsque les solutions sont conservées longtemps. Quand le temps de contact est réduit, des tubes en plastique peuvent également être employés. Ajouter 29,5 ml d'acétonitrile (5.2) et fermer de nouveau le tube avec le bouchon vissé.

Placer le ou les tubes horizontalement sur l'agitateur (6.7) et agiter fermement pendant environ 1 h. Après agitation, centrifuger les tubes pendant 10 min entre 1 000*g* et 1 500*g* (6.3). Si la solution est claire sans particules flottantes, aucune étape de filtration n'est nécessaire. Sinon, filtrer la phase liquide sur des filtres à membrane en PTFE (6.13), ou transférer 2 ml dans un tube à centrifuger (6.5) et centrifuger la solution entre 10 000*g* et 12 000*g* (6.4) pendant 10 min.

Remplir un flacon pour passeur d'échantillons (6.12) et boucher le flacon. L'échantillon est alors prêt à être analysé.

7.2 Préparation des étalons

Il convient de préparer les étalons directement dans les flacons. Transférer à la pipette (6.10) les volumes précisés dans le Tableau 1 de solution mère Cer-C (5.16) de céreulide, d'acétonitrile (5.2) (voir NOTE) et de solution mère IS-D (5.13) de $^{13}C_6$-céreulide dans un flacon (6.12). Boucher le flacon. Mélanger (6.14) la solution pendant 20 s.

NOTE Si une clarification supplémentaire est nécessaire, il est possible d'utiliser une extraction à l'heptane afin de réduire les composants produisant des interférences (gras). Après avoir ajouté 29,5 ml d'acétonitrile, ajouter 10,0 ml d'heptane et boucher les tubes avec un bouchon vissé. Placer le ou les tubes horizontalement sur l'agitateur (6.7) et agiter fermement pendant environ 1 h. Centrifuger les tubes pendant 10 min entre 1 000*g* et 1 500*g* (6.3). Poursuivre la préparation de l'échantillon avec la couche d'acétonitrile inférieure.

 © ISO 2017 – Tous droits réservés

Tableau 1 — Préparation des solutions étalons pour l'étalonnage

Norme	Cer-C (5.16)	Acétonitrile (5.2)	IS-D (5.13) [a]	Concentration étalon céreulide
	µl	µl	µl	ng/ml
Étalon 0	0	1 000	200	0,00
Étalon 1	10	990	200	0,08
Étalon 2	50	950	200	0,4
Étalon 3	100	900	200	0,8
Étalon 4	200	800	200	1,7
Étalon 5	500	500	200	4,2
Étalon 6	1 000	0	200	8,3

[a] La concentration du $^{13}C_6$-céreulide dans la solution étalon pour étalonnage est de 1,7 ng/ml lors de l'ajout de 200 µl de solution IS-D (5.13) aux étalons (1 000 µl).

Lorsqu'un résultat d'analyse se trouve hors plage d'étalonnage en raison d'une concentration trop élevée, analyser de nouveau l'échantillon concerné en pesant une quantité moindre d'échantillon, inférieure à 2,5 g.

Si la quantité d'échantillon disponible est limitée, adapter en conséquence la proportion d'étalon interne et de solution.

La concentration finale de $^{13}C_6$-céreulide (l'étalon interne) dans l'extrait d'échantillon et les étalons est ρ = 1,7 ng/ml.

iTeh STANDARD PREVIEW

Les concentrations indiquées dans le Tableau 1 dépendent des quantités exactes de céreulide Cer-A (5.14) et de $^{13}C_6$-céreulide IS-A (5.10) pesées.

(standards.iteh.ai)
ISO 18465:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/893ed60d-fca1-4d9c-9a6a-38e5c7345bdf/iso-18465-2017

7.3 Analyse par CL-SM

7.3.1 Conditions CL

N'importe quel système CL adapté peut être utilisé. Les paramètres, le débit, le temps de rétention et les gradients, qui dépendent de l'instrument, de la colonne et du fabricant, doivent être déterminés en procédant à l'optimisation du système CL. Des méthodes isocratiques ou à gradient peuvent être employées. Les paramètres indiqués ci-dessous peuvent servir de conditions initiales pour l'optimisation.

Volume d'injection: 1 µl à 20 µl

Colonne: Type C-18 pour CLHP ou CLUHP (6.2)

Four pour colonne: 30 °C à 50 °C

Température du bac pour passeur d'échantillons: 5 °C à 10 °C

Phase mobile A: Formiate d'ammonium (5.7) 10 mmol avec de l'acide formique à 0,1 % (v/v) dans l'eau (5.1)

Phase mobile B: Acétonitrile (5.2) avec de l'acide formique à 0,1 % (v/v) (5.4)

7.3.2 Conditions SM et paramètres d'optimisation

Les paramètres SM, qui peuvent varier et dépendent de l'instrument et du fabricant, doivent être déterminés en réglant l'instrument avant analyse. Les paramètres indiqués ci-dessous peuvent servir

© ISO 2017 – Tous droits réservés