

---

---

**Céréales et produits céréaliers —  
Dosage de l'ochratoxine A — Méthode  
par chromatographie en phase liquide  
à haute performance avec purification  
sur colonne d'immunoaffinité et  
détection par fluorescence**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

*Cereals and cereal products — Determination of ochratoxin A — High performance liquid chromatographic method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection*

ISO 15141:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6e115469-96f5-445f-9e11-e4881acc3f6d/iso-15141-2018>



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

ISO 15141:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6e115469-96f5-445f-9e11-e4881acc3f6d/iso-15141-2018>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8  
CH-1214 Vernier, Genève  
Tél.: +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)

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>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>5</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Appareillage et équipement</b> .....	<b>4</b>
<b>7</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>5</b>
7.1    Généralités.....	5
7.2    Échantillonnage.....	5
7.3    Préparation des échantillons pour essai.....	5
7.4    Extraction de l'ochratoxine A de l'échantillon.....	5
7.4.1    Extraction.....	5
7.4.2    Dilution.....	5
7.5    Purification sur colonne d'immunoaffinité.....	5
7.6    Conditions de fonctionnement de la CLHP.....	6
7.7    Courbe d'étalonnage.....	6
7.8    Identification.....	6
7.9    Détermination.....	6
7.10    Confirmation.....	7
<b>8</b> <b>Calculs</b> .....	<b>7</b>
<b>9</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>8</b>
9.1    Généralités.....	8
9.2    Répétabilité.....	8
9.3    Reproductibilité.....	8
<b>10</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>8</b>
<b>Annexe A (informative) Résultats des essais interlaboratoires</b> .....	<b>9</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>12</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 (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](http://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 ne saurait être tenue pour responsable 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](http://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.

(standards.iteh.ai)

Pour une explication de la nature volontaire des normes, 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: [www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, Sous-comité SC 4, *Céréales et légumineuses*.

Cette première édition annule et remplace l'ISO 15141-1:1998 et l'ISO 15141-2:1998 qui ont fait l'objet d'une révision technique.

Le principal changement par rapport à l'édition précédente réside dans le fait que le principe de l'extraction et de la purification a été modifié.

# Céréales et produits céréaliers — Dosage de l'ochratoxine A — Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance avec purification sur colonne d'immunoaffinité et détection par fluorescence

## 1 Domaine d'application

Le présent document expose en détail une méthode par chromatographie liquide à haute performance avec purification sur colonne d'immunoaffinité pour le dosage de l'ochratoxine A dans les céréales et les produits céréaliers.

Le seuil de quantification est de 0,2 µg/kg. La limite de la méthode de détection dépend de la matrice de l'échantillon ainsi que de l'instrument.

## 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).

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

ISO 15141:2018

## 3 Termes et définitions

Aucun terme n'est défini dans le présent document.

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

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

## 4 Principe

L'ochratoxine A (OTA) est extraite par un mélange acétonitrile/eau. L'extrait est purifié en utilisant une colonne d'immunoaffinité, et l'ochratoxine A est déterminée par chromatographie liquide à haute performance sur colonne en phase inverse, avec détection par fluorescence. Le résultat peut être vérifié, si nécessaire, par dérivation avec du trifluorure de bore en solution dans du méthanol.

**AVERTISSEMENT** — L'ochratoxine A provoque des lésions au niveau des reins et du foie, et elle est probablement cancérigène. Il est nécessaire de respecter les précautions de sécurité<sup>[1]</sup> lors des manipulations de ce produit et d'éviter notamment toute manipulation du produit sous forme déshydratée du fait de sa nature électrostatique qui peut occasionner une dispersion et une inhalation. Il est possible de décontaminer la verrerie avec une solution d'hypochlorite de sodium à 4 %. L'attention du lecteur est attirée sur la déclaration formulée par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (OMS)<sup>[2][3]</sup>.

## 5 Réactifs

Au cours de cette analyse et sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée de qualité 1, conformément à l'ISO 3696. Les solvants doivent être de qualité pour analyse CLHP.

5.1 Acétonitrile.

5.2 Méthanol.

5.3 Chlorure de sodium (NaCl).

5.4 Acide acétique glacial,  $\varphi(\text{CH}_3\text{COOH}) \geq 98 \%$ .

5.5 Tween 20.

5.6 Bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ).

5.7 Hydrogénophosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

5.8 Dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

5.9 Chlorure de potassium (KCl).

5.10 Acide chlorhydrique,  $c(\text{HCl}) = 12 \text{ mol/l}$ .

5.11 Ochratoxine A, sous forme de cristaux ou de film en ampoule.

5.12 Solvant d'extraction, mélanger 60 volumes d'acétonitrile (5.1) et 40 volumes d'eau.

5.13 Tampon phosphate salin (tampon PBS), dissoudre 8 g de NaCl (5.3), 1,2 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (5.7), 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5.8) et 0,2 g de KCl (5.9) dans environ 990 ml d'eau. Ajuster le pH à 7 avec du HCl (5.10) et compléter à 1 l avec de l'eau.

5.14 Solution de lavage, dissoudre 25 g de NaCl (5.3), 5 g de  $\text{NaHCO}_3$  (5.6) et 0,1 ml de Tween 20 (5.5) dans 1 l d'eau.

5.15 Phase mobile, mélanger 48 volumes d'acétonitrile (5.1), 51 volumes d'eau et 1 volume d'acide acétique glacial (5.4). Dégazer cette solution avant utilisation.

5.16 Toluène.

5.17 Mélange de solvants, mélanger 99 volumes de toluène (5.16) avec 1 volume d'acide acétique glacial (5.4).

5.18 Solution-mère d'ochratoxine A

Dissoudre 1 mg d'ochratoxine A (cristaux) (5.11) ou le contenu d'une ampoule (si l'ochratoxine A est sous forme de film) (5.11) dans le mélange de solvants (5.17) pour obtenir une solution contenant environ 20  $\mu\text{g/ml}$  à 30  $\mu\text{g/ml}$  d'ochratoxine A.

Pour déterminer la concentration exacte, enregistrer la courbe d'absorption entre une longueur d'onde de 300 nm et 370 nm par pas de 5 nm dans une cuve en quartz de 1 cm (6.12) avec le mélange de

solvants (5.17), comme référence. Identifier la longueur d'onde de l'absorption maximale en effectuant un enregistrement par palier de 1 nm autour du maximum comme référence. Calculer la concentration massique d'ochratoxine A,  $\rho_{OTA}$ , exprimée en microgrammes par millilitre de solution, à l'aide de la Formule (1):

$$\rho_{OTA} = A_{\max} \times \frac{M \times 100}{K \times \delta} \quad (1)$$

où

$A_{\max}$  est l'absorbance déterminée au maximum de la courbe d'absorption (ici: à 333 nm);

$M$  est la masse moléculaire relative de l'ochratoxine A ( $M = 403$  g/mol);

$\kappa$  est le coefficient d'absorption moléculaire de l'ochratoxine A, dans le mélange de solvants (ici: 544 m<sup>2</sup>/mol);

$\delta$  est la longueur du trajet optique de la cellule, en centimètres.

Stocker cette solution à une température d'environ -18 °C. Une solution stockée dans ces conditions peut généralement rester stable pendant 12 mois. Contrôler la concentration de la solution si celle-ci date de plus de 6 mois.

#### 5.19 Solution étalon d'ochratoxine A, $\rho_{OTA}=1$ µg/ml.

Évaporer jusqu'à siccité sous courant d'azote 1 ml de la solution-mère (5.18) ou la portion aliquote qui est équivalente à 100 µg d'ochratoxine A en valeur absolue, puis diluer jusqu'à 100 ml avec la phase mobile (5.15).

Cette solution peut être stockée dans un réfrigérateur à 4 °C. La stabilité doit être vérifiée.

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6e115469-96f5-445f-9e11-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6e115469-96f5-445f-9e11-4891bc385d/iso-15141-2018)

#### 5.20 Solutions d'étalonnage d'ochratoxine A

Pipeter des volumes adéquats de la solution étalon d'ochratoxine A (5.19), par exemple 0,05 ml, 0,1 ml, 0,25 ml, 0,5 ml et 1 ml dans une fiole jaugée de 100 ml par exemple (6.15), et diluer en complétant jusqu'au trait de jauge avec de la phase mobile (5.15). Il convient que la teneur en ochratoxine A des solutions d'étalonnage couvre la gamme de 0,05 ng à 1,0 ng pour 100 µl de volume d'injection. Il est recommandé de préparer les solutions d'étalonnage extemporanément à partir de la solution étalon d'ochratoxine A (5.19) avant chaque analyse CLHP.

#### 5.21 Solution d'hypochlorite de sodium, $\rho(\text{NaOCl}) = 4$ g/100 ml.

#### 5.22 Trifluorure de bore.

#### 5.23 Trifluorure de bore en solution dans le méthanol, $\rho(\text{BF}_3) = 14$ g/100 ml.

#### 5.24 Dichlorométhane

#### 5.25 Sulfate de sodium, anhydre.

5.26 Solvant d'élution, mélanger 98 volumes de méthanol (5.2) et 2 volumes d'acide acétique glacial (5.4).

**AVERTISSEMENT — Utiliser une hotte d'extraction en bon état de fonctionnement. Éviter le contact avec la peau, les yeux et les voies respiratoires.**

## 6 Appareillage et équipement

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

6.1 **Balance analytique**, d'une précision de 10 mg.

6.2 **Mixeur**, avec un bol de 1 l et un couvercle, antidéflagrant.

6.3 **Papier filtre**,

a) Papier filtre plissé, ou

b) Filtre en microfibres de verre.

6.4 **Tube à centrifuger**, de 50 ml.

6.5 **Filtre à membrane pour solutions aqueuses**, en polytétrafluoroéthylène (PTFE), de 25 mm de diamètre et de 0,2 µm de porosité.

6.6 **Colonne d'immunoaffinité**, qui doit contenir des anticorps dirigés contre l'ochratoxine A, ToxinFast® colonne d'immunoaffinité d'ochratoxine A (Huaan Magnech)<sup>1)</sup> ou l'équivalent.

6.7 **Seringue en verre**, de 10 ml.

6.8 **Pompe à vide**.

6.9 **Évaporateur rotatif**, avec bain-marie, pouvant être réglé entre 20 °C et 50 °C.

6.10 **Broyeur de laboratoire**, prévu pour broyer jusqu'à 1 mm.

6.11 **Spectromètre UV**, pouvant effectuer des mesurages dans les longueurs d'onde comprises entre 300 nm et 370 nm, d'une largeur de bande spectrale ne dépassant pas ± 2 nm.

6.12 **Cuves en quartz**, d'une longueur de trajet optique de 1 cm et sans absorption significative entre les longueurs d'onde de 300 nm et 370 nm.

6.13 **Fiole conique**, de 150 ml.

6.14 **Tamis**, ayant une ouverture de maille ne dépassant pas 1 mm.

6.15 **Fiole jaugée**, de 100 ml.

6.16 **Microseringue**, d'une capacité de 500 µl.

6.17 **Appareillage CLHP**, comprenant:

a) **un chromatographe en phase liquide à haute performance**, un réservoir d'éluants, une pompe, un système d'injection, un détecteur de fluorescence à longueur d'onde réglable et un système de traitement des données (par exemple, un intégrateur avec traceur), et

---

1) Exemple de produit adapté 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. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

- b) **une colonne analytique de CLHP pour séparations en phase inverse**,  $C_{18}$ , permettant d'assurer un retour à la ligne de base entre le pic d'ochratoxine A et tous les autres pics.

longueur:	150 mm
Diamètre intérieur	4,6 mm
Particules sphériques de:	5 $\mu\text{m}$

NOTE D'autres longueurs de colonne jugées appropriées peuvent être utilisées.

**6.18 Centrifugeuse**, pouvant atteindre une force centrifuge de 8 000 *g*.

## 7 Mode opératoire

### 7.1 Généralités

Il convient d'effectuer la totalité du mode opératoire d'analyse en un jour ouvré. Si plusieurs échantillons sont traités en même temps, il convient de les analyser durant la nuit suivante en utilisant un passeur automatique d'échantillons.

### 7.2 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Des méthodes d'échantillonnage recommandées sont données dans l'ISO 24333<sup>[4]</sup>.

### 7.3 Préparation des échantillons pour essai

Broyer l'échantillon pour laboratoire à l'aide du broyeur de laboratoire (6.10) jusqu'à ce qu'il passe à travers le tamis (6.14) et le mélanger soigneusement.

### 7.4 Extraction de l'ochratoxine A de l'échantillon

#### 7.4.1 Extraction

Placer 25 g (*m*), pesés à 0,1 g près, de l'échantillon dans une fiole conique ou un mixeur (6.2), puis ajouter 100 ml de solvant d'extraction (5.12) ( $V_1$ ). Couvrir et agiter pendant 30 min ou mixer pendant 3 min. L'extrait est centrifugé à 8 000 *g* pendant 5 min ou filtré sur papier filtre plissé [6.3 a)].

NOTE Pour les échantillons peu denses (par exemple, le son de blé), la masse recommandée est de 12,5 g et le volume de solvant d'extraction est de 100 ml.

#### 7.4.2 Dilution

Pipeter 4,0 ml ( $V_2$ ) d'extrait filtré dans le tube à centrifuger de 50 ml (6.4) et diluer avec 26,0 ml ( $V_3$ ) de tampon PBS (5.13). L'extrait dilué est centrifugé à 8 000 *g* pendant 5 min, puis collecté pour constituer l'extrait A.

Une autre solution consiste à pipeter 6,0 ml ( $V_2$ ) d'extrait filtré dans le tube à centrifuger de 50 ml (6.4) et à les diluer avec 39,0 ml ( $V_3$ ) de tampon PBS (5.13). L'extrait dilué est filtré à travers un filtre en microfibrilles de verre [6.3 b)], puis collecté pour constituer l'extrait B.

### 7.5 Purification sur colonne d'immunoaffinité

Faire passer la totalité de l'extrait A ou 30 ml d'extrait B ( $V_4$ ) dans la colonne d'immunoaffinité d'ochratoxine A (OTA) à un débit d'environ 1 à 2 gouttes par seconde, suivi de 10 ml de solution de lavage (5.14) puis 10 ml d'eau distillée à un débit de 2 gouttes par seconde. Éluer l'OTA avec 1,5 ml