Ce document constitue un outil de documentation et n'engage pas la responsabilité des institutions

►**B**

SEPTIÈME DIRECTIVE DE LA COMMISSION

du 1er mars 1976

portant fixation de méhodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux

(76/372/CEE)

(JO L 102 du 15.4.1976, p. 8)

Modifiée par:

		Journal officiel		
		nº	page	date
►**M1**	Directive 81/680/CEE de la Commission du 30 juillet 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Directive 92/95/CEE de la Commission du 9 novembre 1992	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Directive 94/14/CE de la Commission du 29 mars 1994	L 94	30	13.4.1994

▼B

SEPTIÈME DIRECTIVE DE LA COMMISSION

du 1er mars 1976

portant fixation de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux

(76/372/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu la directive du Conseil, du 20 juillet 1970, concernant l'introduction de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux [1], modifiée en dernier lieu par l'acte d'adhésion [2] et notamment son article 2,

considérant que la directive susvisée prévoit que les contrôles officiels des aliments des animaux visant à constater que les conditions prescrites en vertu des dispositions législatives, réglementaires ou administratives concernant la qualité et la composition des aliments des animaux sont respectées, sont effectués selon des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse communautaires;

considérant que les directives 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/CEE, 73/46/CEE, 74/203/CEE et 75/84/CEE de la Commission, des 15 juin 1971 [3], 18 novembre 1971 [4], 27 avril 1972 [5], 5 décembre 1972 [6], 25 mars 1974 [7] et 20 décembre 1974 [8] ont déjà fixé un certain nombre de méthodes d'analyse communautaires; que, compte tenu de l'état d'avancement des travaux effectués depuis lors, il convient d'arrêter une septième série de méthodes;

considérant que les mesures prévues à la présente directive sont conformes à l'avis du comité permanent des aliments des animaux,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

Les États membres prescrivent que les analyses pour les contrôles officiels des aliments des animaux, en ce qui concerne leur teneur en aflatoxine B_1 sont effectuées selon les méthodes décrites à l'annexe de la présente directive.

▼M1

▼B

Article 2

Les États membres mettent en vigueur, le 1er octobre 1976 au plus tard, les dispositions législatives, réglementaires ou administratives nécessaires pour se conformer aux dispositions de la présente directive. Ils en informent immédiatement la Commission.

Article 3

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

---

(1) JO nº L 170 du 3. 8. 1970, p. 2.
(2) JO nº L 73 du 27. 3. 1972, p. 14.
(3) JO nº L 155 du 12. 7. 1971, p. 13.
(4) JO nº L 279 du 20. 12. 1971, p. 7.
(5) JO nº L 123 du 29. 5. 1972, p. 6.
(6) JO nº L 83 du 30. 3. 1973, p. 21.
(7) JO nº L 108 du 22. 4. 1974, p. 7.
(8) JO nº L 32 du 5. 2. 1975, p. 26.

▼B

ANNEXE

DOSAGE DE L'AFLATOXINE B_1

A. MÉTHODE PAR CHROMATOGRAPHIE MONODIMENSIONNELLE SUR COUCHE MINCE

▼M2

1. **Objet et domaine d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en aflatoxine B_1 des matières premières et des aliments simples pour les animaux. Cette méthode ne s'applique pas en présence de pulpes d'agrumes. La limite inférieure du dosage est de 0,01 mg/kg (10 ppb).

En présence de substances interférentes qui entravent les déterminations, il y a lieu de recommencer l'analyse selon la méthode B (par chromatographie en phase liquide haute performance).

▼B

2. **Principe**

L'échantillon est soumis à l'extraction par du chloroforme. L'extrait est filtré, une partie aliquote en est prélevée et purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice. L'éluat est évaporé et le résidu est repris par un volume déterminé de chloroforme ou d'un mélange de benzène et d'acétonitrile. Une partie aliquote de cette solution est soumise à la chromatographie sur couche mince. La quantité d'aflatoxine B_1 est déterminée sous irradiation UV du chromatogramme soit visuellement, soit par fluorodensitométrie, par comparaison avec des quantités connues d'aflatoxine B_1-étalon. L'identité de l'aflatoxine B_1 extraite de l'aliment doit être confirmée par les procédés indiqués.

3. **Réactifs**

NB: Tous les réactifs doivent être de qualité «pour analyse» dans la mesure où aucune autre indication n'est donnée.

3.1. Acéton

3.2. Chloroforme, stabilisé par 0,5 à 1,0 pour cent d'éthanol à 96 pour cent (v/v).

3.3. n-Hexane

3.4. Méthanol

3.5. Éther diéthylique anhydre, exempt de peroxydes.

3.6. Mélange de benzène et d'acétonitrile: 98/2 (v/v).

3.7. Mélange de chloroforme (3.2) et de méthanol (3.4): 97/3 (v/v).

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

3.9. Coton hydrophile, préalablement dégraissé par le chloroforme, ou laine de verre.

3.10. Sulfate de sodium, anhydre, granulé.

3.11. Gaz inerte, par exemple azote.

3.12. Acide chlorhydrique 1 N.

3.13. Acide sulfurique à 50 pour cent (v/v).

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

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

3.16. Solution étalon à 0,1 µg environ d'aflatoxine B_1 par millilitre dans le chloroforme (3.2) ou dans le mélange benzène/acétonitrile (3.6), préparée et contrôlée comme indiqué sous le point 7.

3.17. Solution étalon qualitative à 0,1 µg environ d'aflatoxines B_1 et B_2 par ml dans le chloroforme (3.2) ou dans le mélange benzène/acétonitrile (3.6). Ces concentrations sont données à titre indicatif.

▼B

Elles doivent être ajustées de manière à obtenir la même intensité de fluorescence pour les deux aflatoxines.

3.18. Solvants de développement:

3.18.1. Chloroforme (3.2)/acétone (3.1): 9/1 (v/v), cuve non saturée;

3.18.2. Éther diéthylique (3.5)/méthanol (3.4)/eau: 96/3/1 (v/v/v), cuve non saturée;

3.18.3. Éther diéthylique (3.5)/méthanol (3.4)/eau: 94/4,5/1,5 (v/v/v), cuve saturée;

3.18.4. Chloroforme (3.2)/méthanol (3.4): 94/6 (v/v), cuve saturée;

3.18.5. Chloroforme (3.2)/méthanol (3.4): 97/3 (v/v), cuve saturée.

4. **Appareillage**

4.1. Broyeur-mélangeur.

4.2. Appareil à secouer ou agitateur magnétique.

4.3. Filtres plissés, Schleicher et Schüll nº 588 ou équivalent, diamètre: 24 cm.

4.4. Tubes pour chromatographie, en verre (diamètre intérieur: 22 mm, longueur: 300 mm), avec robinet de téflon et réservoir de 250 ml.

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

4.6. Fioles coniques de 500 ml, à bouchon rodé.

4.7. Appareillage pour chromatographie sur couche mince.

4.8. Plaques de verre pour chromatographie sur couche mince, 200 × 200 mm, préparées comme suit (les quantités indiquées conviennent pour recouvrir cinq plaques): introduire 30 g de gel de silice G-HR (3.15) dans une fiole conique, ajouter 60 ml d'eau, boucher et agiter une minute. 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 dessicateur muni de gel de silice. Au moment de l'emploi, activer les plaques en les maintenant durant 1 heure dans l'étuve à 110 ºC.

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.

4.9. Lampe UV à ondes longues (360 nm). L'intensité d'irradiation doit permettre de distinguer encore nettement une tache de 1,0 ng d'aflatoxine B_1 sur une plaque pour chromatographie sur couche mince, à une distance de 10 cm de la lampe.

4.10. Tubes de 10 ml, gradués, avec bouchons de polyéthylène.

4.11. Spectrophotomètre UV.

4.12. Fluorodensitomètre (éventuellement).

5. **Mode opératoire**

5.1. *Préparation de l'échantillon (voir observations, partie C, point 1)*

Broyer l'échantillon de façon qu'il passe en totalité au travers d'un tamis à mailles de 1 mm (conforme à la recommandation ISO R 565).

5.2. *Extraction*

Introduire 50,0 g de l'échantillon moulu et homogénéisé dans une fiole conique de 500 ml (4.6). Ajouter 25 g de terre de diatomées (3.14), 25 ml d'eau et 250 ml de chloroforme (3.2). Boucher le flacon, secouer ou agiter durant 30 minutes à l'aide de l'appareil (4.2) et filtrer sur filtre plissé (4.3). Éliminer les 10 premiers ml de filtrat et recueillir ensuite 50 ml.

5.3. *Purification sur colonne*

Munir l'extrémité inférieure d'un tube pour chromatographie (4.4) d'un tampon de coton ou de laine de verre (3.9), remplir les deux tiers du tube de chloroforme (3.2) et ajouter 5 g de sulfate de sodium (3.10).

▼B

Vérifier que la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium est plane puis ajouter par petites fractions 10 g de gel de silice (3.8). Remuer avec précaution après chaque addition pour éliminer les bulles d'air. Laisser déposer durant 15 minutes et ajouter ensuite avec précaution 15 g de sulfate de sodium (3.10). Laisser descendre le liquide jusqu'à proximité immédiate de la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium.

Mélanger les 50 ml d'extrait recueillis en 5.2 à 100 ml de n-hexane (3.3) et transvaser quantitativement le mélange dans la colonne. Laisser descendre le liquide jusqu'à la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium. Éliminer le liquide écoulé. Ajouter ensuite 100 ml d'éther diéthylique (3.5) et laisser à nouveau descendre le liquide jusqu'à la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium. Au cours de ces opérations, veiller que le débit d'écoulement soit de 8 à 12 ml par minute et que la colonne ne soit pas mise à sec. Éliminer les liquides écoulés. Éluer ensuite par 150 ml du mélange chloroforme/méthanol (3.7) et recueillir la totalité de l'éluat.

Évaporer celui-ci presque à sec, sous un courant de gaz inerte (3.11) et à une température ne dépassant pas 50 ºC, au moyen de l'appareil rotatif à évaporation sous vide (4.5). Amener quantitativement le résidu à l'aide de chloroforme (3.2) ou du mélange benzène/acétonitrile (3.6) dans un tube de 10 ml (4.10). Concentrer la solution sous un courant de gaz inerte (3.11) et amener ensuite le volume à 2,0 ml à l'aide de chloroforme (3.2) ou du mélange benzène/acétonitrile (3.6).

5.4. *Chromatographie sur couche mince*

Déposer ponctuellement sur une plaque pour chromatographie sur couche mince (4.8), à 2 cm du bord inférieur et à des intervalles de 2 cm, les volumes indiqués ci-après de la solution étalon et de l'extrait:

— 10, 15, 20, 30 et 40 µl de la solution étalon d'aflatoxine B_1 (3.16);

— 10 µl de l'extrait obtenu en 5.3 et, *en superposition sur le même point*, 20 µl de la solution étalon (3.16);

— 10 et 20 µl de l'extrait obtenu en 5.3.

Développer le chromatogramme à l'abri de la lumière, à l'aide de l'un des solvants de développement (3.18). Le choix du solvant doit être établi au préalable en déposant sur la plaque 25 µl de la solution étalon qualitative (3.17) et en s'assurant que, lors du développement, les aflatoxines B_1 et B_2 sont complètement séparées.

Laisser évaporer les solvants à l'abri de la lumière et irradier ensuite par la lumière UV en plaçant la plaque à 10 cm de la lampe (4.9). Les taches d'aflatoxine B_1 donnent une fluorescence bleue.

5.5. *Déterminations quantitatives*

Procéder aux déterminations soit visuellement, soit par fluorodensitométrie comme indiqué ci-après:

5.5.1. Mesures visuelles

Déterminer la quantité d'aflatoxine B_1 de l'extrait en comparant l'intensité de fluorescence des taches de l'extrait à celle des taches de la solution étalon. Interpoler si nécessaire. La fluorescence obtenue par superposition de l'extrait à l'étalon doit être plus forte que celle des 10 µl d'extrait et elle ne doit donner lieu qu'à la perception d'une seule tache. Si l'intensité de fluorescence donnée par les 10 µl d'extrait est plus forte que celle des 40 µl de solution étalon, diluer l'extrait 10 ou 100 fois par du chloroforme (3.2) ou par le mélange benzène/acétonitrile (3.6) avant de le soumettre à une nouvelle chromatographie sur couche mince.

5.5.2. Mesures par fluorodensitométrie

Mesurer l'intensité de fluorescence des taches d'aflatoxine B_1 au fluorodensitomètre (4.12) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 365 nm et une longueur d'onde d'émission de 443 nm. Déterminer la quantité d'aflatoxine B_1 des dépôts de l'extrait en comparant les intensités de fluorescence des taches de l'extrait et de la solution étalon.

▼B

5.6. *Confirmation de l'identité de l'aflatoxine B_1*

Confirmer l'identité de l'aflatoxine B_1 de l'extrait par les procédés ci-après:

5.6.1. Traitement par l'acide sulfurique

Pulvériser de l'acide sulfurique (3.13) sur le chromatogramme obtenu en 5.4. La fluorescence des taches d'aflatoxine B_1 doit virer du bleu au jaune sous irradiation UV.

5.6.2. Chromatographie bidimensionnelle impliquant la formation d'aflatoxine B_1 — hémiacétal (aflatoxine B_{2a})

NB: Les opérations décrites ci-après doivent être effectuées en suivant le schéma présenté dans la figure 3.

5.6.2.1. Application des solutions

Tracer sur une plaque (4.8) deux droites parallèles à deux côtés contigus (à des distances de 6 cm de ces côtés), destinées à délimiter la migration des fronts de solvants. Déposer sur une plaque à l'aide de pipettes capillaires ou de microseringues les solutions indiquées ci-après:

— *au point A:* un volume d'extrait purifié de l'échantillon obtenu en 5.3, contenant 2,5 nanogrammes environ d'aflatoxine B_1;

— *aux points B et C:* 25 µl de la solution étalon (3.16).

5.6.2.2. Développement

Développer le chromatogramme dans la direction I à l'aide du solvant de développement (3.18.1) [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 durant cinq minutes à l'abri de la lumière et à la température ambiante. Pulvériser ensuite de l'acide chlorhydrique (3.12) sur une bande de 2,5 cm de hauteur couvrant les points A et B (indiquée en traits hachurés dans la fig. 3), jusqu'à assombrissement, en protégeant le reste de la plaque par une feuille de verre. Laisser réagir durant dix minutes à l'obscurité et sécher à l'aide d'un courant d'air à la température ambiante.

Développer ensuite le chromatogramme dans la direction II à l'aide du solvant de développement (3.18.1) [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 la température ambiante.

5.6.2.3. Interprétation du chromatogramme

Examiner le chromatogramme sous lumière UV (4.9) et vérifier les observations indiquées ci-après:

a) Apparition d'une tache fluorescente bleue d'aflatoxine B_1 provenant de la solution étalon déposée en C (migration dans la direction I).

b) Apparition d'une tache fluorescente bleue d'aflatoxine B_1 (n'ayant pas réagi avec l'acide chlorhydrique) et d'une tache fluorescente bleue plus intense d'aflatoxine B_1-hémiacétal, provenant de la solution étalon déposée en B (migration dans la direction II).

c) Apparition de taches similaires à celles indiquées sous b), provenant de l'extrait de l'échantillon déposé en A. L'emplacement de ces taches est défini par la distance de migration de l'aflatoxine B_1 à partir du point A dans la direction I (même distance que celle parcourue par l'étalon déposé en C) suivie des distances de migration parcourues dans la direction II par l'aflatoxine B_1 (n'ayant pas réagi avec l'acide chlorhydrique) et par l'aflatoxine B_1-hémiacétal (mêmes distances que celles parcourues par l'étalon déposé en B). Les intensités de fluorescence des taches d'hémiacétal provenant de l'extrait et de l'étalon déposé en B devraient correspondre.

6. **Calcul des résultats**

6.1. *À partir de mesures visuelles*

La teneur en microgrammes d'aflatoxine B_1 par kilogramme d'échantillon (ppb) est donnée par la formule

▼B

$$\frac{S \cdot Y \cdot V}{W \cdot X}$$

dans laquelle:

Y et X sont respectivement les volumes en microlitres de solution étalon d'aflatoxine B_1 (3.16) et de l'extrait, ayant une intensité de fluorescence semblable;

S = concentration en microgrammes d'aflatoxine B_1 par ml de la solution étalon (3.16);

V = volume final de l'extrait en microlitres, compte tenu des dilutions éventuelles;

W = poids en grammes de la prise d'essai correspondant au volume d'extrait soumis à la purification sur colonne.

6.2. *À partir des mesures fluorodensitométriques*

La teneur en microgrammes d'aflatoxine B_1 par kilogramme d'échantillon (ppb) est donnée par la formule

$$\frac{S \cdot V}{W \cdot Y}$$

dans laquelle:

Y = volume en microlitres de l'extrait déposé sur la plaque (10 ou 20 µl);

S = quantité en nanogrammes d'aflatoxine B_1 du dépôt de l'extrait (compte tenu du volume Y), déduite des déterminations;

V = volume final de l'extrait en microlitres, compte tenu des dilutions éventuelles;

W = poids en grammes de la prise d'essai, correspondant au volume d'extrait soumis à la purification sur colonne.

7. **Préparation et contrôle de la solution étalon (3.16)**

7.1. *Détermination de la concentration en aflatoxine B_1*

Préparer une solution d'aflatoxine B_1 étalon dans le chloroforme (3.2) ou dans le mélange benzène/acétonitrile (3.6) dont la concentration est de 8 à 10 µg par millilitre. Déterminer le spectre d'absorption entre 330 et 370 nm à l'aide du spectrophotomètre (4.11).

Relever la densité optique (A) à 363 nm dans le cas de la solution chloroformique; à 348 nm dans le cas de la solution dans le mélange benzène/acétonitrile.

Calculer la concentration en microgrammes d'aflatoxine B_1 par millilitre de solution à partir des formules ci-après:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{20\,600}$ pour la solution chloroformique;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1000}{19\,800}$ pour la solution dans le mélange benzène/acétonitrile.

Effectuer à l'abri de la lumière les dilutions convenables pour obtenir une solution étalon de travail dont la concentration en aflatoxine B_1 est de 0,1 µg environ par millilitres. Conservée en réfrigérateur à 4 ºC, cette solution est stable durant deux semaines.

7.2. *Contrôle de la pureté chromatographique*

Déposer sur une plaque (4.8) 5 µl de la solution étalon à 8 — 10 µg d'aflatoxine B_1 par millilitre (voir 7.1). Développer le chromatogramme comme indiqué en 5.4. Sous lumière UV, 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.

▼B

8. **Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon par le même analyste ne devrait pas dépasser:

— 25 pour cent du résultat le plus élevé pour les teneurs en aflatoxine B_1 de 10 à 20 µg/kg,

— 5 µg, en valeur absolue, pour les teneurs de 20 à 50 µg/kg,

— 10 pour cent du résultat le plus élevé pour les teneurs supérieures à 50 µg/kg.

9. **Reproductibilité**

Voir observations, partie C, point 2,

▼M2

B. DÉTERMINATION DE L'AFLATOXINE B_1 PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE

1. **Objet et domaine d'application**

Cette méthode permet le dosage de l'aflatoxine B_1 dans les aliments des animaux, y compris ceux contenant des pulpes d'agrumes. La limite inférieure du dosage est de 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Principe**

L'échantillon est extrait par du chloroforme. L'extrait est filtré et une fraction aliquote est purifiée sur une cartouche de Florisil puis sur une cartouche C_{18}. La séparation finale et la détection sont effectuées par chromatographie en phase liquide haute performance en utilisant une colonne C_{18} en phase inverse, puis une dérivatisation postcolonne à l'iode permet une détection fluorimétrique.

Note: Les mycotoxines sont des substances extrêmement toxiques. Les manipulations doivent être effectuées sous une hotte ventilée. Des précautions particulières doivent être prises du fait de leur nature électrostatique et par conséquent de leur tendance à se disperser sur les surfaces de travail lorsque les toxines sont à l'état sec.

3. **Réactifs**

3.1. Chloroforme, stabilisé par 0,5 % à 1,0 % d'éthanol, en masse. Voir l'observation 10.2.

3.2. Méthanol, de qualité HPLC pour la prépararation de 3.6.

3.3. Acétone.

3.4. Acétonitrile, de qualité HPLC.

3.5. Solvants d'élution: les préparer la veille de l'utilisation ou les dégazer dans une cuve à ultrasons.

3.5.1. Acétone (3.3)/eau, 98 + 2 (v + v).

3.5.2. Eau/méthanol (3.2), 80 + 20 (v + v).

3.5.3. Eau/acétone (3.3), 85 + 15 (v + v).

3.6. Phase mobile pour HPLC.

La phase mobile est composée d'eau, de méthanol (3.2) et d'acétonitrile (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

NB: La composition de la phase mobile peut être ajustée en fonction des caractéristiques de la colonne HPLC utilisée.

3.7. Solution aqueuse saturée en iode. Ajouter 2 g d'iode à 400 ml d'eau. Agiter pendant au moins 90 minutes et filtrer sur une membrane filtrante (4.15). Protéger la solution saturée de la lumière pour empêcher la photodégradation.

3.8. Célite 545, lavée à l'acide, ou équivalent.

3.9. Cartouche de Florisil (SEP-PAK Waters ou équivalent).

3.10. Cartouche C_{18} (SEP-PAK Waters ou équivalent).

3.11. Gaz inerte, par exemple azote.

▼M2

3.12. Solution étalon d'aflatoxine B_1, à une concentration de 10 µg/ml, dans le chloroforme. Vérifier la concentration de la solution de la manière suivante: déterminer le spectre d'absorption de la solution entre 330 et 370 nm au moyen du spectrophotomètre (4.23). Mesurer l'absorbance (A) au maximum d'absorption proche de 363 nm. Calculer la concentration de l'aflatoxine B_1 en microgramme par millilitre de solution selon la formule:

$$\text{Concentration } (\text{èmg/ml}) = \frac{312 \times A \times' \ 1\,000}{22\,300} = 13,991 \times A.$$

3.12.1. Solution mère de la solution étalon d'aflatoxine B_1 dans le chloroforme.

Transférer quantitativement 2,5 ml de la solution étalon d'aflatoxine B_1 (3.12) dans une fiole jaugée de 50 ml et ajuster au volume avec du chloroforme (3.1). Conserver cette solution au froid (4 ºC), à l'obscurité, dans un flacon bien fermé et enveloppé d'une feuille d'aluminium.

3.13. Solutions d'aflatoxine B_1 pour l'étalonnage en HPLC.

NB: Utiliser de la verrerie lavée à l'acide pour la préparation de ces solutions (voir 4, matériel).

3.13.1. Solution d'étalonnage à 4 ng/ml.

Laisser la solution mère (3.12.1) revenir à la température ambiante à l'obscurité (pendant quelques heures). Transférer 400 µl de la solution mère (200 ng d'aflatoxine B_1) dans une fiole jaugée de 50 ml et évaporer la solution à sec sous un courant de gaz inerte (3.11). Dissoudre le résidu obtenu dans environ 20 ml d'eau/acétone (3.5.3), ajuster au trait de jauge avec de l'eau/acétone (3.5.3) et bien agiter.

3.13.2. Solution d'étalonnage à 3 ng/ml.

Transférer quantitativement 7,5 ml de la solution d'étalonnage (3.13.1) dans une fiole jaugée de 10 ml, compléter au volume avec de l'eau/acétone (3.5.3), bien agiter.

3.13.3. Solution d'étalonnage à 2 ng/ml.

Transférer quantitativement 25 ml de la solution d'étalonnage (3.13.1) dans une fiole jaugée de 50 ml, ajuster au volume avec la solution eau/acétone (3.5.3) et bien agiter.

Cette solution est une solution d'étalonnage qui servira également aux répétitions d'injections en HPLC (5.5).

3.13.4. Solution d'étalonnage à 1 ng/ml.

Transférer quantitativement 2,5 ml de la solution d'étalonnage (3.13.1) dans une fiole jaugée de 10 ml, ajuster au volume avec la solution eau/acétone (3.5.3) et bien agiter.

3.14. Ampoule contenant 1 millilitre du mélange d'aflatoxines B_1, B_2 et G_2 dans le chloroforme aux concentrations approximatives de 1; 0,5; 1 et 0,5 µg/ml respectivement.

3.14.1. Solution d'essai de séparation chromatographique.

Transférer le contenu de l'ampoule (3.14) dans un tube à essai en verre muni d'un bouchon ou dans un flacon à vis. Transférer 40µl de cette solution dans un tube à essai muni d'un bouchon (rincé à l'acide) (4.22). Évaporer le chloroforme sous un courant de gaz inerte (3.11) et redissoudre dans 10 ml de mélange eau/acétone (3.5.3).

3.15. Réactifs pour le test de confirmation (6).

3.15.1. Solution saturée de chlorure de sodium.

3.15.2. Sulfate de sodium, anhydre, granulé.

4. **Matériel**

Attention: L'utilisation de vaisselle non rincée à l'acide pour les solutions aqueuses d'aflatoxine peut être la cause de pertes. Un soin particulier doit être pris avec la verrerie neuve et la verrerie à usage unique telles que les flacons d'injecteur automatique et les pipettes Pasteur. Par conséquent, la verrerie devant contenir les

▼M2

solutions aqueuses d'aflatoxine B_1 doit être trempée dans de l'acide dilué (exemple: acide sulfurique à 2 moles/l) pendant plusieurs heures, puis bien rincée à l'eau distillée pour enlever toutes les traces d'acide (exemple: trois rinçages, vérifier au papier pH). En pratique, ce traitement doit être appliqué aux ballons piriformes (4.4), aux fioles jaugées, aux éprouvettes, aux flacons ou aux tubes utilisés pour les solutions d'étalonnage et les extraits finals (particulièrement les flacons de l'injecteur automatique), et les pipettes Pasteur, si celles-ci sont utilisées pour transférer des solutions d'étalonnage ou des extraits.

4.1. Broyeur-mélangeur.

4.2. Tamis à mailles de 1,0 mm (ISO R 565).

4.3. Agitateur mécanique.

4.4. Évaporateur rotatif, avec ballons piriformes de 150 ml à 250 ml.

4.5. Chromatographe en phase liquide haute performance avec injecteur muni d'une boule permettant d'injecter 250 µl. Voir les instructions du fabricant concernant le remplissage partiel ou complet de la boucle.

4.6. Colonne analytique HPLC remplie de particules de 3 µm ou 5 µm C_{18}.

4.7. Pompe sans pulsation pour le réactif postcolonne à l'iode.

4.8. Raccord en T sans volume mort, en acier inoxydable (1/16″ × 0,75 mm).

4.9. Capillaire de réaction en Téflon ou en acier inoxydable. Les dimensions suivantes: 3 000 × 0,5 mm à 5 000 × 0,5 mm sont appropriées en combinaison avec les colonnes HPLC à 5µm ou à 3µm.

4.10. Bain thermostaté réglé à 60 ºC permettant une régulation de température d'au moins 0,1 ºC.

4.11. Détecteur fluorimétrique, assurant des longueurs d'onde d'excitation à 365 nm et des longueurs d'onde d'émission à 435 nm (pour les appareils à filtre: longueur d'onde d'émission > 400 nm). La détection de 0,05 ng d'aflatoxine B_1 au moins doit être possible. Il est recommandé d'appliquer une certaine contre-pression (par exemple en employant un régulateur de pression ou une spirale en Téflon ou en acier inoxydable relié à la sortie du détecteur) pour supprimer les bulles d'air dans la cellule de mesure.

4.12. Enregistreur.

4.13. Intégrateur électronique (facultatif).

4.14. Papier filtre plissé de diamètre 24 cm, Machery-Nagel 617 1/4 ou équivalent.

4.15. Membrane filtrante de porosité 0,45 µm, Millipore HAWP 04700 ou équivalent.

4.16. Fiole conique de 500 ml munie d'un bouchon.

4.17. Colonne de verre (diamètre interne d'environ 1 cm, longueur d'environ 30 cm) munie d'un embout Luer.

4.18. Robinet, résistant au chloroforme, avec embout Luer (par exemple Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514 ou équivalent).

4.19. Seringue de 10 ml résistant aux produits chimiques, avec embout Luer.

4.20. Seringue de 250 µl pour l'injection HPLC (voir 4.5).

4.21. Microseringue de 100 µl pour la préparation des solutions d'étalonnage (vérifier par pesée que la précision est de 2 % au plus).

4.22. Tubes gradués en verre de 10 ml, avec un bouchon.

4.23. Spectrophotomètre pouvant être utilisé dans la zone UV du spectre d'absorption.

4.24. Matériel pour le test de confirmation (6).

4.24.1. Ampoule à décanter de 100 ml, avec un robinet en Téflon et rincée à l'acide.

4.24.2. Bloc chauffant à 40-50 ºC.

▼M2

5. **Procédure**

5.1. *Préparation de l'échantillon*

Broyer l'échantillon de façon à ce qu'il passe au travers du tamis (4.2).

5.2. *Prise d'essai*

Peser 50,0 g de l'échantillon ainsi préparé dans la fiole conique (4.16).

5.3. *Extraction*

Ajouter 25 g de Célite (3.8), 250 ml de chloroforme (3.1) et 25 ml d'eau, à la prise d'essai (5.2). Boucher la fiole et agiter pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur (4.3). Filtrer sur filtre plissé (4.14). Recueillir 50 ml du filtrat. Si nécessaire, prendre une fraction aliquote et diluer à 50 ml avec du chloroforme de façon à ce que la concentration en aflatoxine B_1 ne soit pas supérieure à 4 ng/ml.

5.4. *Purification (les opérations doivent être menées sans interruption significative)*

Précautions à prendre:

— protéger le laboratoire où les analyses sont faites de la lumière du jour. Cela peut être réalisé en utilisant:

1) des films absorbant les UV sur les fenêtres en combinaison avec une lumière tamisée (pas de lumière solaire directe!);

2) des rideaux ou des stores en association avec la lumière artificielle (les tubes fluorescents sont acceptables),

— les solutions contenant de l'aflatoxine doivent être protégées de la lumière le plus possible (les conserver à l'obscurité, utiliser des feuilles d'aluminium).

5.4.1. Purification sur SEP-PAK Florisil.

5.4.1.1. Préparation de l'assemblage colonne-cartouche.

Attacher un robinet (4.18) à la plus courte tige de la cartouche de Florisil (3.9) (voir figure 1). Laver la cartouche et enlever l'air en prenant 10 ml de chloroforme (3.1) et en faisant passer rapidement 8 ml de chloroforme par le robinet à travers la cartouche avec une seringue (4.19). Attacher la plus longue tige de la cartouche à une colonne de verre (4.17) et introduire les 2 ml de chloroforme restant à travers la cartouche dans la colonne. Fermer le robinet. Enlever la seringue.

5.4.1.2. Purification.

Introduire le filtrat recueilli en 5.3 dans l'assemblage colonne-cartouche et le laisser s'écouler par gravité. Rincer avec 5 ml de chloroforme (3.1), suivis de 20 ml de méthanol (3.2). Écarter ces éluats. Pendant ces opérations, s'assurer que l'assemblage colonne-cartouche n'aille pas à sec. Éluer l'aflatoxine B_1 par 40 ml du mélange acétone/eau (3.5.1) et recueillir la totalité de l'éluat dans le ballon piriforme de l'évaporateur rotatif (4.4). Concentrer l'éluat à l'aide de l'évaporateur rotatif à 40-50 ºC jusqu'à ce que la distillation de l'acétone soit terminée. (*NB:* Il reste, à ce stade, 0,5 ml environ de liquide dans le ballon. L'expérience a montré qu'une évaporation prolongée n'est pas nuisible et que, s'il reste 0,5 ml de liquide, il n'y a plus alors de quantité significative d'acétone. Des résidus d'acétone peuvent conduire à des pertes d'aflatoxine B_1 sur la cartouche C_{18}). Ajouter 1 ml de méthanol (3.2). Agiter le ballon pour dissoudre l'aflatoxine B_1, ajouter 4 ml d'eau et mélanger. Déconnecter et jeter la cartouche. Rincer la colonne de verre à l'eau et la garder pour la purification sur C_{18}.

5.4.2. Purification sur SEP-PAK C_{18}.

5.4.2.1. Préparation de l'assemblage colonne-cartouche.

Attacher un robinet (4.18) à la plus courte tige de la cartouche C_{18} (3.10) (voir figure 1). Amorcer la cartouche et enlever l'air en passant rapidement 10 ml de méthanol (3.2) dans la cartouche à l'aide d'une seringue (4.19) par le robinet (les bulles d'air dans la cartouche sont visibles sous forme de taches claires sur un fond grisâtre). Prendre 10 ml d'eau et en injecter 8 ml à travers la cartouche (éviter d'introduire de l'air dans la cartouche lors du passage du méthanol à l'eau). Attacher la tige la plus longue de la cartouche à une colonne de verre (4.17) et passer les 2 ml d'eau

▼**M2**

restant à travers la cartouche dans la colonne. Fermer le robinet. Enlever la seringue.

5.4.2.2. Purification.

Transférer quantitativement dans la colonne (4.17) l'extrait collecté en 5.4.1.2, en rinçant le ballon deux fois avec 5 ml du mélange eau/méthanol (3.5.2) et le laisser s'écouler par gravité. Pendant ces opérations, s'assurer que l'assemblage colonne-cartouche n'aille pas à sec. (Si des bulles d'air se forment dans le rétrécissement près de la cartouche, arrêter le débit et tapoter légèrement le sommet de la colonne de verre pour éliminer les bulles d'air. Puis continuer.) Éluer avec 25 ml du mélange eau/méthanol (3.5.2). Jeter les éluats. Éluer l'aflatoxine B_1 par 50 ml d'eau/acétone (3.5.3) et collecter la totalité de l'éluat dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajuster au volume avec de l'eau et mélanger: la solution d'essai ainsi obtenue est utilisée pour la chromatographie (5.5).

Attention: La filtration de l'extrait final préalable à l'injection en HPLC n'est généralement pas nécessaire. Si on le considère nécessaire, les filtres en cellulose sont à éviter, car ils peuvent entraîner des pertes d'aflatoxine B_1. Les filtres en Téflon sont acceptables.

5.5. *Chromatographie en phase liquide haute performance*

(Voir la figure 2 pour le montage de l'appareillage). Prévoir suffisamment de temps pour laisser les appareils se conditionner et se stabiliser avant l'utilisation.

Note 1

Les débits donnés pour la phase mobile HPLC et pour le réactif post-colonne sont simplement indicatifs. Ils peuvent être ajustés suivant les caractéristiques de la colonne HPLC.

Note 2

La réponse de l'aflatoxine B_1 dépend de la température. Par conséquent, il faut compenser les dérives (voir figure 3). L'injection d'une quantité fixe de la solution d'étalonnage (3.13.3) à intervalles réguliers (par exemple chaque troisième injection) permet de corriger la valeur du pic de l'aflatoxine B_1 obtenu entre ces étalons de référence en utilisant la moyenne des réponses. La différence obtenue entre les solutions étalons consécutives doit être très petite (< 10 %). Par conséquent, les injections doivent se suivre sans interruption. Si une interruption est nécessaire, la dernière injection avant l'interruption et la première injection après l'interruption doivent être des injections de solution d'étalonnage (3.13.3). La courbe de calibration étant linéaire et passant par l'origine, les quantités d'aflatoxine B_1 dans les échantillons sont déterminées directement par référence aux solutions étalons les plus proches.

5.5.1. Réglage de la pompe HPLC.

Régler la pompe HPLC (4.5) à un débit de 0,5 ou de 0,3 ml/min pour une colonne HPLC de 5µm ou 3 µm (4.6) respectivement, en utilisant la phase mobile (3.6).

5.5.2. Réglage de la pompe pour la réaction postcolonne.

Régler la pompe (4.7) à un débit de 0,2-0,4 ml/min de solution aqueuse saturée en iode (3.7). À titre indicatif: les débits d'environ 0,4 ou 0,2 ml/min sont à recommander en association avec des débits respectifs de la phase mobile (3.6) de 0,5 et 0,3 ml/min.

5.5.3. Le détecteur fluorimétrique.

Régler le détecteur fluorimétrique (4.11) à la longueur d'onde d'excitation = 365 nm et la longueur d'onde d'émission = 435 nm (pour un appareil à filtre: > 400 nm). Ajuster l'atténuation du détecteur de façon à obtenir environ 80 % de déviation pleine échelle pour 1 ng d'aflatoxine B_1.

5.5.4. Injecteur.

Pour toutes les solutions, injecter 250 µl en suivant les instructions du fabricant de l'injecteur.

5.5.5. Vérification de la séparation chromatographique.

Injecter la solution d'essai de séparation chromatographique (3.14.1). La hauteur du point d'inflexion doit être inférieure à 5 % de la somme des hauteurs des pics adjacents.

▼M2

5.5.6. Vérification de la stabilité du système.

Avant chaque série d'analyses, injecter plusieurs fois l'étalon de référence (3.13.3) jusqu'à ce que des surfaces stables de pics soient obtenues (*NB:* les pics d'aflatoxine B_1, entre deux injections consécutives, doivent varier de moins de 6 %). Procéder sans attendre à la vérification de la linéarité (5.5.7).

5.5.7. Vérification de la linéarité.

Injecter les solutions d'étalonnage d'aflatoxine B_1 (3.13.1 à 3.13.4). Chaque troisième injection, utiliser l'étalon de référence (3.13.3) pour corriger la dérive dans les réponses (*NB:* les réponses des pics pour les étalons de référence ne doivent pas différer de plus de 10 % en 90 minutes). Corriger la dérive suivant la formule écrite en 7. La droite de calibration doit être linéaire et passer par l'origine à l'intérieur d'une fourchette de deux fois l'erreur standard de Y estimé. Les valeurs trouvées ne doivent pas différer de plus de 3 % des valeurs nominales. Si les conditions sont remplies, continuer sans délai. Sinon, déterminer et rectifier la cause du problème avant de continuer.

5.5.8. Injection des extraits d'échantillon.

Injecter les extraits purifiés (5.4.2.2). Toutes les deux injections d'extrait d'échantillon, répéter l'injection de l'étalon de référence (3.13.3) suivant la séquence: étalon de référence, extrait, extrait, étalon de référence, extrait, extrait, étalon de référence, etc.

6. Test de confirmation

6.1. *Traitement de l'extrait (5.4.2.2)*

Ajouter 5 ml de solution de chlorure de sodium (3.15.1) à l'extrait final obtenu en 5.4.2.2. Extraire trois fois avec 2 ml de chloroforme (3.1) pendant 1 minute dans une ampoule à décanter (4.24.1).

Filtrer l'extrait chloroformique obtenu dans un tube de 10 ml, à travers 1 g de sulfate de sodium (3.15.2). Un petit entonnoir de 4 cm de diamètre peut être utilisé avec un morceau de laine de verre recouvert de 1 g de sulfate de sodium (3.15.2).

Laver la couche de sulfate de sodium avec quelques millilitres de chloroforme et les collecter dans le même tube. Évaporer à sec l'extrait chloroformique dans le même tube en utilisant le bloc chauffant (4.24.2) et redissoudre dans 1 ml de chloroforme.

6.2. *Préparation des dérivés et chromatographie sur couche mince*

Voir la directive 76/372/CEE du Conseil, annexe, méthode A point 5.6.2.

7. Calculs des résultats

Calculer la teneur d'aflatoxine B_1 (µg/kg) présente dans l'échantillon en utilisant la formule:

$$\text{teneur en aflatoxine } B_1 \text{ exprimée en èmg/kg} = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

où:

m = quantité d'aflatoxine B_1 en ng représentée par le pic de l'aflatoxine B_1 de l'échantillon calculé comme suit:

$$m = \frac{P(\text{échantillon})}{P(st_1) + P(st_2)} \times 2\ r(st)$$

P(échantillon) = surface du pic d'aflatoxine B_1 de l'échantillon

$P(st_1)$ = surface du pic d'aflatoxine B_1 de l'étalon de référence (3.13.3) précédant l'injection de l'échantillon

$P(st_2)$ = surface du pic d'aflatoxine B_1 de l'étalon de référence (3.13.3) suivant l'injection de l'échantillon

▼**M2**

r(st) = quantité d'aflatoxine B_1 de l'étalon de référence (3.13.3) injectée en ng

V_m = volume de l'extrait d'échantillon injecté, en ml

V_{ext} = volume final de l'extrait d'échantillon, en ml, compte tenu de la dilution effectuée en (5.3)

M = masse de l'échantillon, en g

V_f = volume de filtrat transféré sur la cartouche de Florisil (5.4.1.2) en ml.

V_c = volume de chloroforme utilisé pour l'extraction de l'échantillon en ml.

Si la procédure est suivie comme dans ce protocole, la formule se réduit à:

teneur en aflatoxine B_1 en µg/kg = 20 × m.

7.1. Les calculs peuvent aussi être faits à partir de la hauteur des pics.

8. **Répétabilité**

Voir le point 10.1 (observations).

9. **Reproductibilité**

Voir le point 10.1.

10. **Observations**

10.1. *Précision*

Une étude collaborative ([1]), menée à l'échelon international sur des aliments composés, a conduit aux données de répétabilité et de reproductibilité indiquées dans le tableau 1. Le terme de répétabilité (r) utilisé ici est défini comme la plus grande valeur du rapport, qui n'est plus significative à un niveau de probabilité de 95 %, de deux résultats obtenus pour l'analyse du même échantillon dans le même laboratoire dans des conditions similaires. Le terme de reproductibilité (R) est défini de manière semblable en comparant les résultats obtenus par deux laboratoires différents. En accord avec la norme ISO 3534-1977, 2.35 ([2]) et la décision 89/610/CEE de la Commission ([3]), r et R sont aussi donnés dans le tableau 1 en terme de coefficients de variation.

Tableau 1

Répétabilité (r) et reproductibilité (R), exprimés en rapport et en coefficients de variation

(15 laboratoires)

Teneur	r	R	CV_r (*)	CV_R (*)
(µg/kg)			(%)	(%)
8 & 14	1,4	1,7	11	18

(*) CV = coefficient de variation

10.2. *Stabilité du chloroforme (3.1)*

Les caractéristiques de l'absorption sur les cartouches de Florisil peuvent être modifiées si des stabilisants autres que l'éthanol sont utilisés. Cela doit être vérifié pour être en accord avec le point 10.3 si le chloroforme décrit n'est pas disponible.

10.3. *Exactitude*

L'application correcte de la méthode doit être vérifiée par des mesures en double effectuées sur des matériaux de référence garantis. S'ils ne sont pas disponibles, la validité de la méthode

([1]) Van Egmond, H.P., Heisterkamp, S.H. et Paulsch, W.E. (1991). *Food Additives and Contaminants* 8, 17-29.
([2]) ISO 3534-1977.
([3]) JO n° L 351 du 2. 12. 1989, p. 39.

▼**M2**

doit être vérifiée en effectuant des expériences de récupération menées sur des échantillons exempts d'aflatoxine B_1 et contaminés artificiellement. L'écart entre la moyenne et la valeur réelle exprimé en pourcentage de la valeur réelle ne doit pas se situer en dehors des limites −20 % à +10 %.

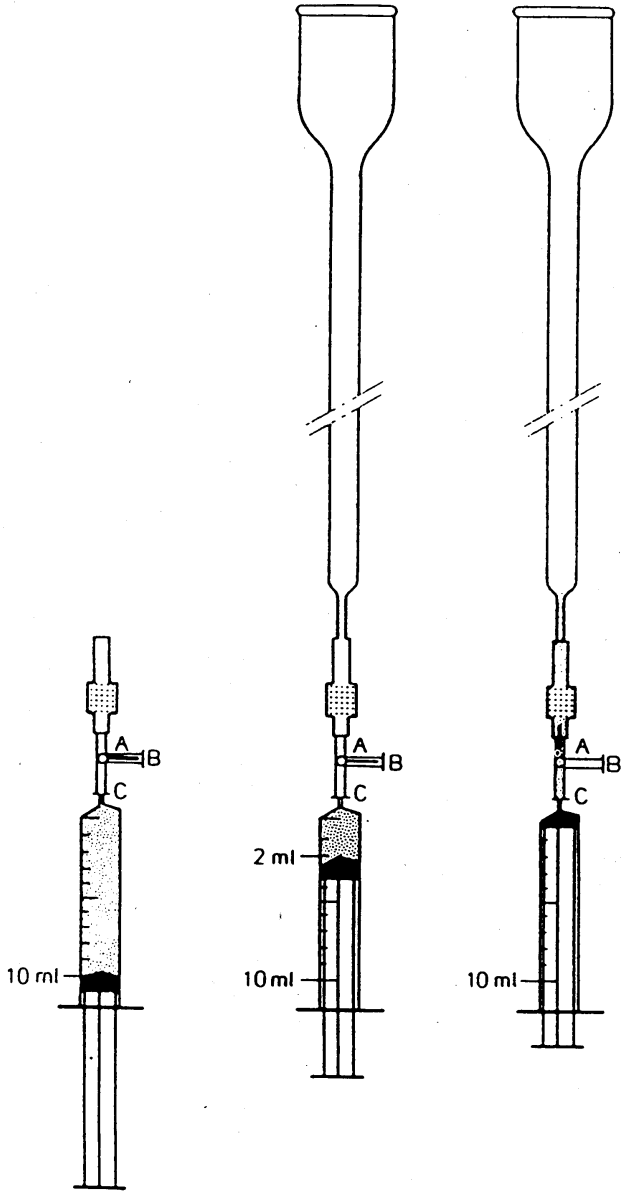
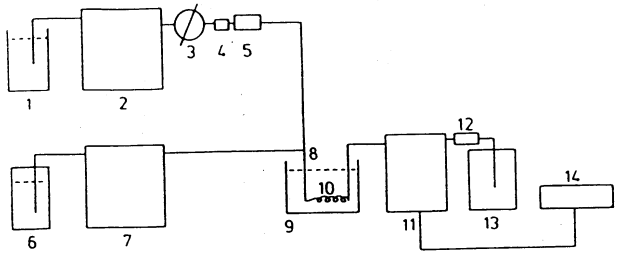


Figure 1: Assemblage colonne-cartouche

▼**M2**



1. Phase mobile
2. Pompe
3. Vanne d'injection
4. Précolonne
5. Colonne analytique HPLC
6. Solution saturée d'iode
7. Pompe à réactif postcolonne
8. Raccord en T
9. Bain thermostaté
10. Spirale de réaction
11. Détecteur fluorimétrique
12. Régulateur de pression
13. Solvants à jeter
14. Enregistreur/intégrateur

Figure 2: Montage du système chromatographique avec la dérivatisation postcolonne

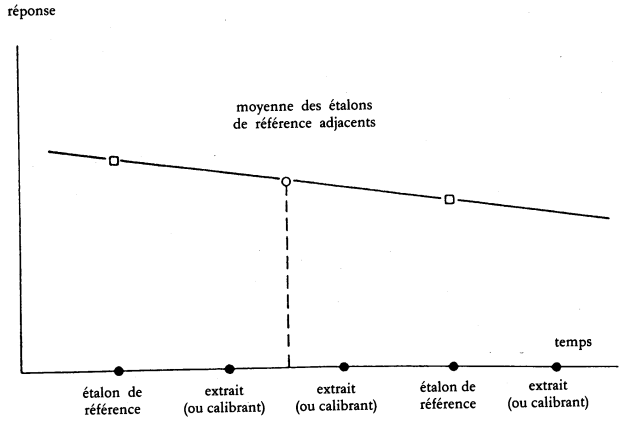


Figure 3: Compensation de la dérive de la réponse de l'aflatoxine B_1 en injectant la solution d'étalonnage (3.13.3) à intervalles réguliers

▼**M3**

C. OBSERVATIONS CONCERNANT LES MÉTHODES A ET B

1. **Dégraissage**

Les échantillons contenant plus de 5 % de matières grasses doivent être dégraissés par de l'éther de pétrole (point d'ébullition 40-60 ºC) après la préparation indiquée au point 5.1. Dans ces cas, les résultats d'analyse doivent être rapportés au poids de l'échantillon non dégraissé.

2. **Reproductibilité des résultats pour la méthode A**

La reproductibilité des résultats, c'est-à-dire la variation entre les résultats obtenus par deux ou plusieurs laboratoires sur le même échantillon, a été évaluée à:

environ 50 % de la valeur moyenne des résultats pour les valeurs moyennes en aflatoxine B_1 de 10 à 20µg/kg,

environ 10 µg/kg à partir de la valeur moyenne pour les valeurs moyennes de 20 à 50 µg/kg,

environ 20 % de la valeur moyenne pour les valeurs moyennes supérieures à 50 µg/kg.

▼B

ANNEXE

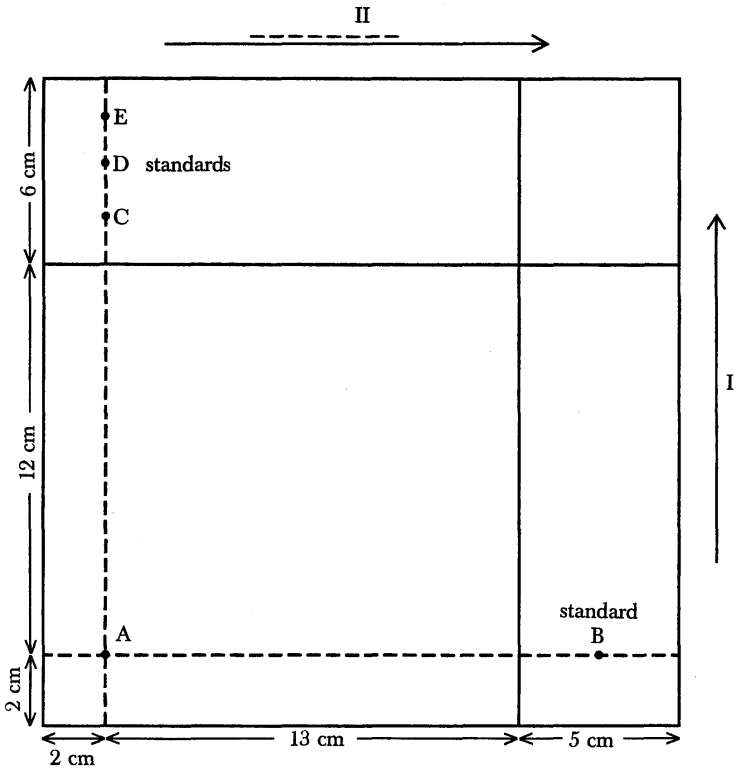


Figure 1

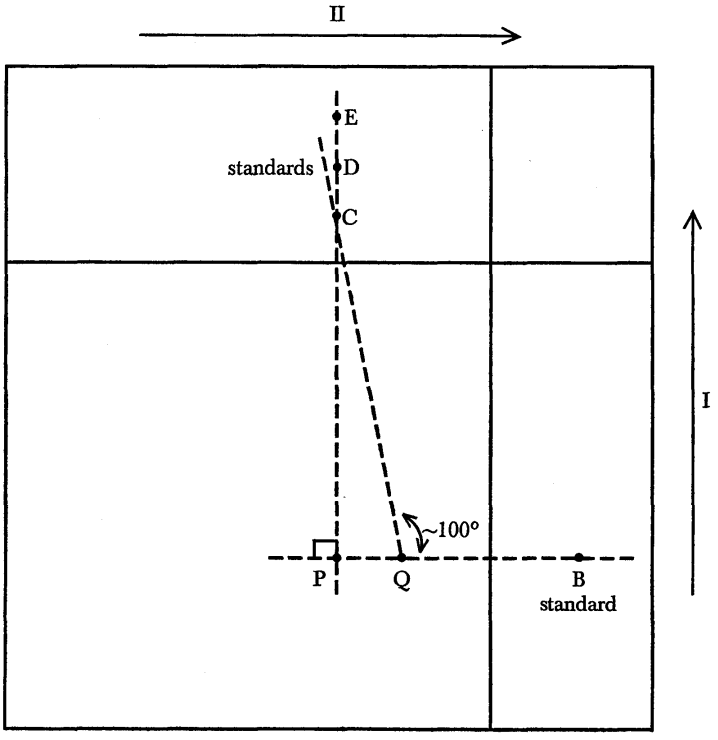


Figure 2

▼B

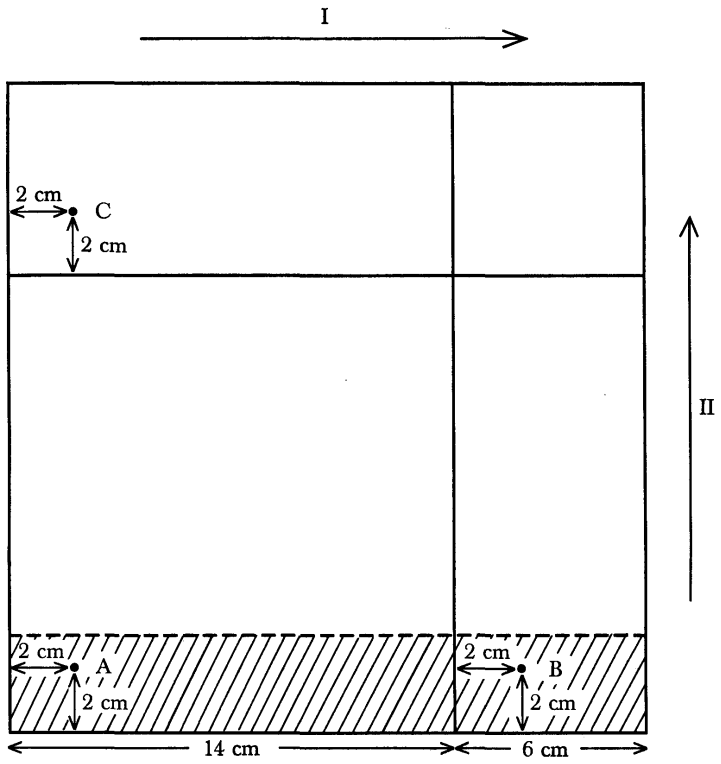


Figure 3