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)

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.

Les dispositions générales figurant à la partie 1 (introduction) de l'annexe de la première directive 71/250/CEE de la Commission du 15 juin 1971, à l'exception de la partie concernant la préparation de l'échantillon à analyser, sont applicables aux méthodes décrites à l'annexe de la présente directive.

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.

Fait à Bruxelles, le 1er mars 1976.

Par la Commission

P. J. LARDINOIS

Membre de la Commission

(1) JO n° L 170 du 3. 8. 1970, p. 2.
(2) JO n° L 73 du 27. 3. 1972, p. 14.
(3) JO n° L 155 du 12. 7. 1971, p. 13.
(4) JO n° L 279 du 20. 12. 1971, p. 7.
(5) JO n° L 123 du 29. 5. 1972, p. 6.
(6) JO n° L 83 du 30. 3. 1973, p. 21.
(7) JO n° L 108 du 22. 4. 1974, p. 7.
(8) JO n° L 32 du 5. 2. 1975, p. 26.

ANNEXE

DOSAGE DE L'AFLATOXINE B_1

A. MÉTHODE PAR CHROMATOGRAPHIE MONODIMENSIONNELLE SUR COUCHE MINCE

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

La méthode permet de déterminer la teneur en aflatoxine B_1 des aliments suivants: tourteaux d'arachides, de copra, de lin, de soja, de sésame, de babassu et de germes de maïs, céréales et produits céréaliers, farine de pois, pulpe et fécule de pommes de terre. 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 bidimensionnelle sur couche mince).

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. 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 n° 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 °C.

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).

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 °C, 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.

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

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

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 °C, 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.

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.

B. MÉTHODE PAR CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR COUCHE MINCE

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de déterminer la teneur en aflatoxine B_1 des aliments des animaux qui ne tombent pas dans le domaine d'application de la méthode A. La limite inférieure du dosage est de 0,01 mg/kg (10 ppb). La méthode ne s'applique pas aux aliments contenant des pulpes d'agrumes.

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 bidimensionnelle 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 le procédé indiqué.

3. Réactifs

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

3.1. Acétone.

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

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

3 15 Solvants de développement.

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

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

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 de la méthode A.

4. Appareillage

Voir point 4 de la méthode A.

5. **Mode opératoire**

5.1. *Préparation de l'échantillon*
5.2. *Extraction*
5.3. *Purification sur colonne*

} voir points 5.1, 5.2 et 5.3 de la méthode A.

5.4. *Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince*

5.4.1. Application des solutions (suivre le schéma présenté dans la figure 1)

Tracer sur une plaque (4.8) deux droites parallèles à deux côtés contigus (à des distances respectives de 5 et 6 cm de ces côtés), destinées à délimiter la migration des fronts de solvants. Déposer sur la plaque à l'aide de pipettes capillaires ou de microseringues les solutions indiquées ci-après:

— *au point A,* 20 µl de l'extrait purifié de l'échantillon, obtenu en 5.3,
— *au point B,* 20 µl de la solution étalon (3.16),
— *au point C,* 10 µl de la solution étalon (3.16),
— *au point D,* 20 µl de la solution étalon (3.16),
— *au point E,* 40 µl de la solution étalon (3.16).

Sécher à l'aide d'un léger courant d'air ou de gaz inerte (3.11). Les taches obtenues doivent avoir un diamètre de 5 mm environ.

5.4.2. Développement (suivre le schéma présenté dans la figure 1)

Développer le chromatogramme dans la direction I à l'aide du solvant de développement (3.15.1) [couche de 1 cm dans une cuve 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 quinze minutes au moins à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

Développer ensuite le chromatogramme dans la direction II à l'aide du solvant de développement (3.15.2) [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 l'abri de la lumière et à la température ambiante.

5.4.3. Interprétation du chromatogramme (suivre le schéma présenté dans la figure 2)

Irradier le chromatogramme par la lumière UV en plaçant la plaque à 10 cm de la lampe (4.9). Localiser l'emplacement des taches de fluorescence bleue B, C, D et E d'aflatoxine B_1 provenant de la solution étalon et tracer deux droites imaginaires passant par ces taches et perpendiculaires aux directions de développement. Le point d'intersection P de ces droites est l'emplacement où l'on devrait s'attendre à trouver la tache d'aflatoxine B_1 provenant de l'extrait de l'échantillon déposé en A (figure 1). Toutefois, l'emplacement réel de cette tache peut se trouver en un point Q situé à l'intersection de deux droites imaginaires formant entre elles un angle de 100 degrés environ et passant respectivement par les taches B et C. Déterminer la quantité d'aflatoxine B_1 de l'extrait de l'échantillon comme indiqué en 5.5.

5.4.4. Chromatographie complémentaire

Tracer sur une nouvelle plaque (4.8) deux droites parallèles à deux côtés contigus, comme indiqué dans le schéma de la figure 1, et déposer au point A (voir figure 1) 20 µl de l'extrait purifié de l'échantillon obtenu en 5.3 et, *en superposition,* 20 µl de la solution étalon (3.16). Développer comme indiqué en 5.4.2. Irradier le chromatogramme par la lumière UV (4.9) et vérifier que:

— les taches d'aflatoxine B_1 de l'extrait et de la solution étalon se superposent,
— la fluorescence de cette tache est plus intense que celle de la tache d'aflatoxine B_1 développée au point Q de la première plaque.

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 de la tache de l'extrait à celle des taches C, D et E de la solution étalon. Interpoler si nécessaire. Si l'intensité de fluorescence donnée par les 20 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 du dépôt de l'extrait en comparant l'intensité de fluorescence de la tache de l'extrait à celle des taches C, D et E de la solution étalon.

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

Voir point 5.6 de la méthode A.

6. **Calcul des résultats**

Voir point 6 de la méthode A.

7. **Répétabilité**

Voir point 8 de la méthode A.

8. **Reproductibilité**

Voir observations, partie C, point 2.

C. OBSERVATIONS CONCERNANT LES MÉTHODES A ET B

1. **Dégraissage**

Les échantillons contenant plus de 5 pour cent de matières grasses doivent être dégraissés par de l'éther de pétrole (éb. 40 — 60 °C) après la préparation indiquée en 5.1. Dans ces cas, les résultats d'analyse doivent être rapportés au poids de l'échantillon non dégraissé.

2. **Reproductibilité des résultats**

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:

± 50 pour cent de la valeur moyenne des résultats pour les valeurs moyennes en aflatoxine B_1 de 10 à 20 μg/kg;

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

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

ANNEXE

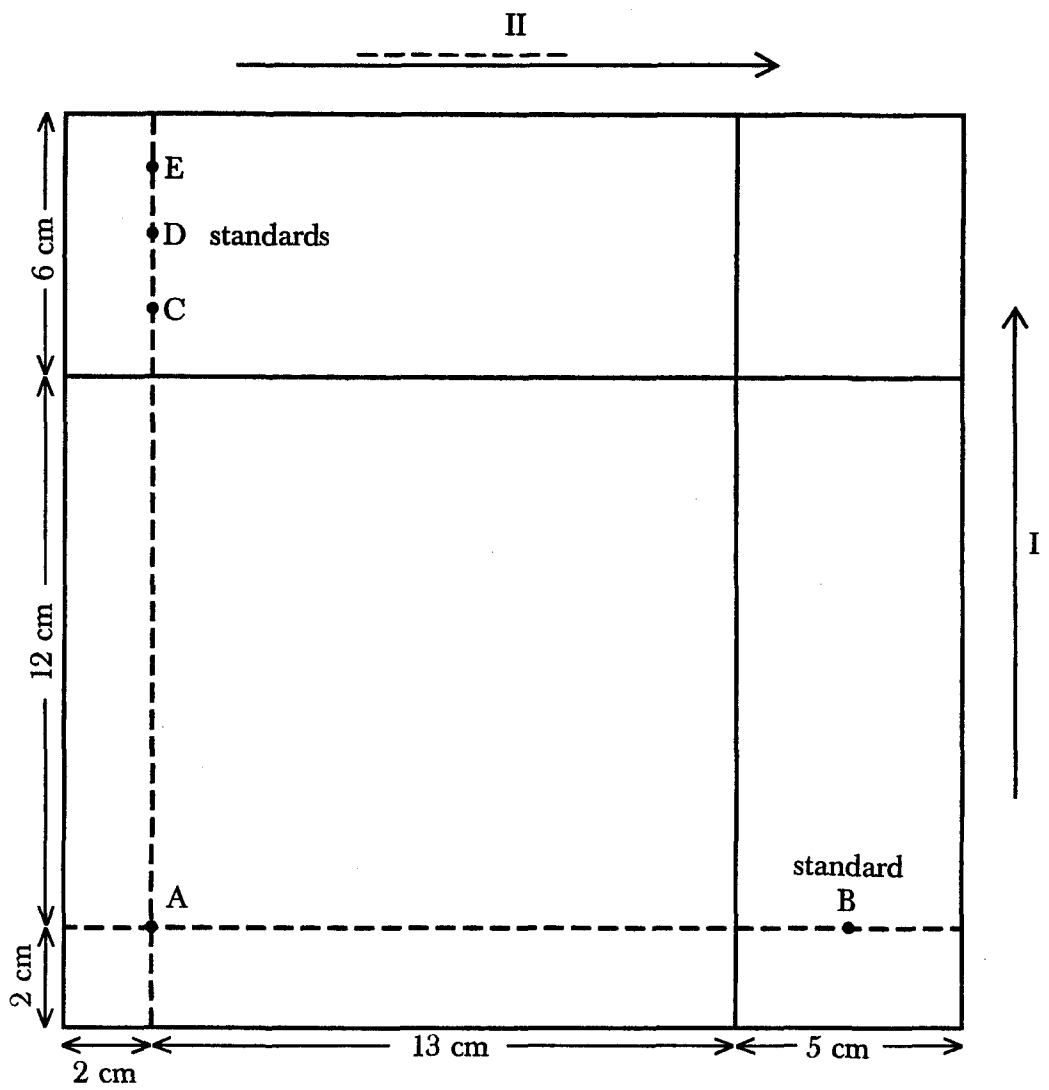


Figure 1

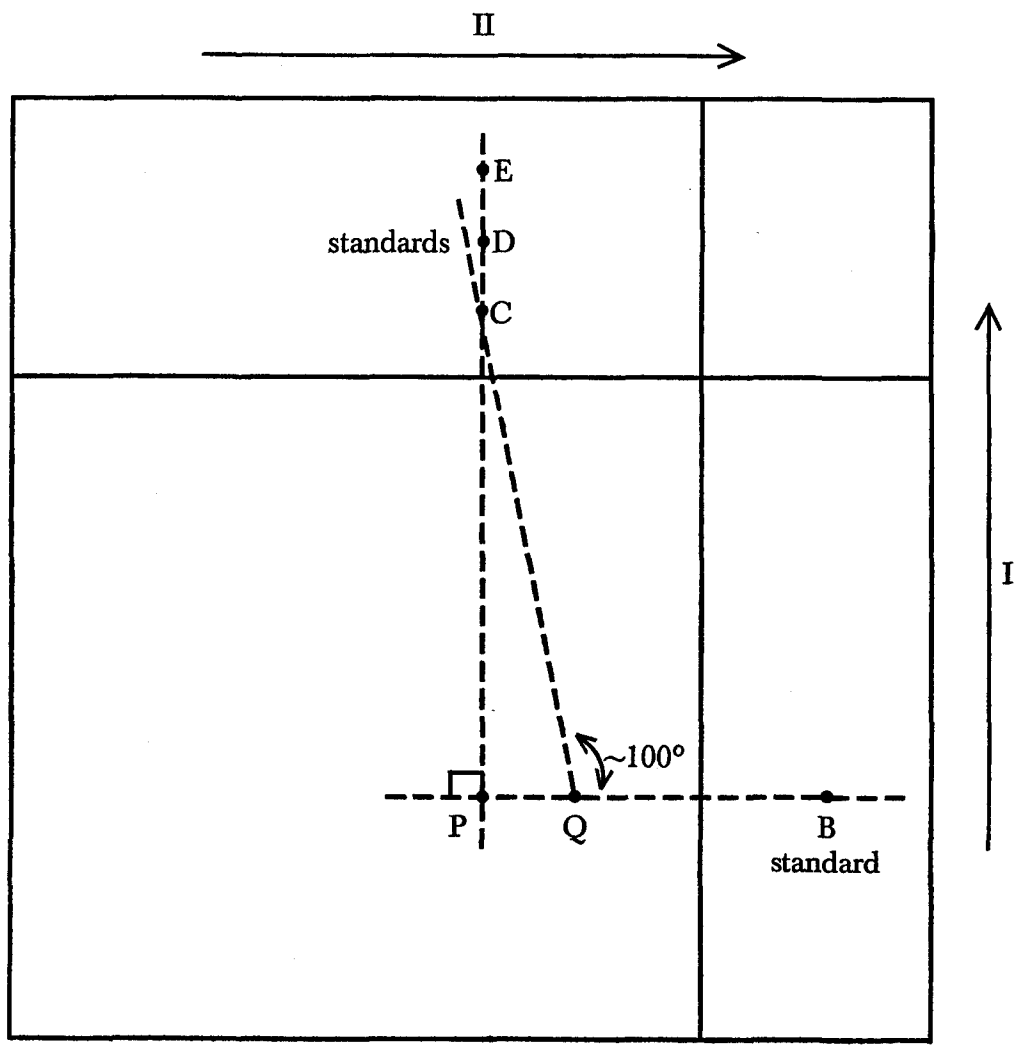


Figure 2

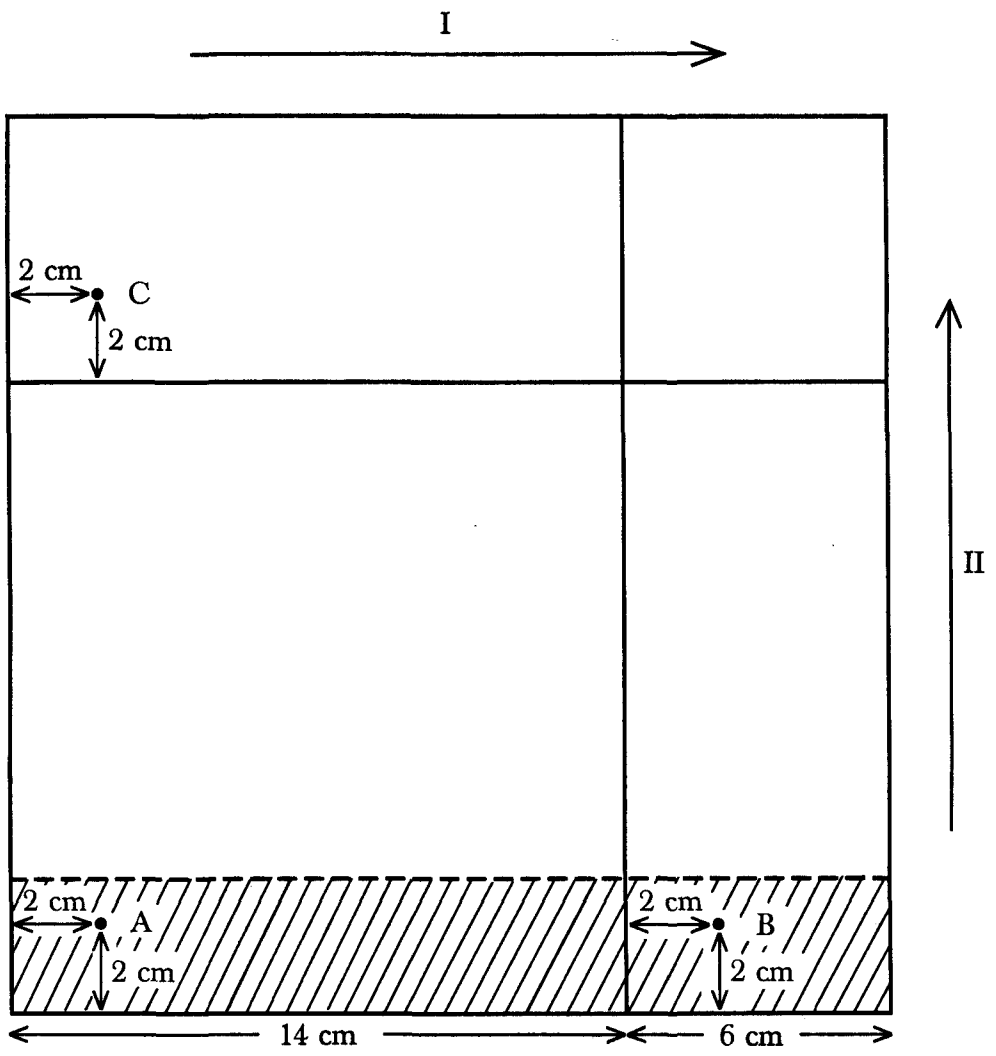


Figure 3