NORME INTERNATIONALE

ISO 14501

FIL 171

Troisième édition
2021-05

Lait et lait en poudre — Détermination de la teneur en aflatoxine M_1 — Purification par chromatographie d'immunoaffinité et détermination par chromatographie en phase liquide à haute performance

Milk and milk powder — Determination of aflatoxin M_1 content — Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography

Numéros de référence
ISO 14501:2021(F)
FIL 171:2021(F)

© ISO et FIL 2021



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2021

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

E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

International Dairy Federation
Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B
B-1030 Brussels
Tél.: + 32 2 325 67 40
Fax: + 32 2 325 67 41
E-mail: info@fil-idf.org
Web: www.fil-idf.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos ..... **iv**
1 Domaine d'application **1**
2 Références normatives **1**
3 Termes et définitions **1**
4 Principe **2**
5 Réactifs **2**
6 Appareillage **4**
7 Échantillonnage **5**
8 Mode opératoire **5**
8.1 Généralités 5
8.2 Préparation des échantillons pour essai 5
8.2.1 Lait 5
8.2.2 Lait en poudre 6
8.3 Préparation de la colonne d'immunoaffinité 6
8.4 Purification de l'échantillon pour essai 6
8.5 Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) 7
8.5.1 Réglage de la pompe 7
8.5.2 Performances chromatographiques 7
8.5.3 Courbe d'étalonnage de l'aflatoxine M_1 7
8.5.4 Analyse des extraits purifiés et programme d'injection 7
9 Calcul et expression des résultats **8**
9.1 Lait écrémé 8
9.1.1 Calcul 8
9.1.2 Expression des résultats 8
9.2 Poudre de lait écrémé 8
9.2.1 Calcul 8
9.2.2 Expression des résultats 8
10 Fidélité **8**
10.1 Essai interlaboratoires 8
10.2 Répétabilité 9
10.3 Reproductibilité 9
11 Rapport d'essai **9**
Annexe A (informative) **Résultats d'un essai interlaboratoires** **10**
Bibliographie **11**

© ISO et FIL 2021 – Tous droits réservés

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 attirée 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).

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.

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 www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale du lait (FIL), en collaboration avec le comité technique CEN/TC 302, *Lait et produits laitiers - Méthodes d'échantillonnage et d'analyse*, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne). Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 14501 | FIL 171:2007), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

— le manque d'explications détaillées dans certains articles conduisait à une variabilité de la manière d'exécuter la méthode d'un laboratoire à l'autre. Des informations pratiques fournies par des utilisateurs finals qualifiés connaissant bien l'analyse de routine et utilisant ce protocole ont été prises en compte lors de la révision afin de clarifier ces articles ambigus.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

© ISO et FIL 2021 – Tous droits réservés

La **FIL (Fédération internationale du lait)** est une organisation privée à but non lucratif qui représente les intérêts des divers acteurs de la filière laitière au niveau international. Les membres de la FIL sont organisés en comités nationaux, qui sont des associations nationales composées de représentants de groupes d'intérêt nationaux dans le secteur des produits laitiers, incluant des producteurs laitiers, des acteurs de l'industrie de transformation des produits laitiers, des fournisseurs de produits laitiers, des universitaires et des représentants des gouvernements/autorités chargées du contrôle des aliments.

L'ISO et la FIL collaborent étroitement à toutes les activités de normalisation concernant les méthodes d'analyse et d'échantillonnage du lait et des produits laitiers. Depuis 2001, l'ISO et la FIL publient conjointement leurs Normes internationales en utilisant les logos et les numéros de référence des deux organisations.

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. La FIL ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. 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.

Le présent document a été élaboré par le Comité permanent chargé des Méthodes d'analyse des additifs et contaminants (SCAMC) de la Fédération internationale du lait (FIL) et le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

L'ensemble des travaux a été confié à l'équipe d'action mixte ISO-FIL (A12) du Comité permanent chargé des Méthodes d'analyse des additifs et contaminants, sous la conduite de son chef de projet, monsieur Paul Jamieson.

© ISO et FIL 2021 – Tous droits réservés

Lait et lait en poudre — Détermination de la teneur en aflatoxine M_1 — Purification par chromatographie d'immunoaffinité et détermination par chromatographie en phase liquide à haute performance

AVERTISSEMENT 1 — La méthode décrite dans le présent document nécessite l'utilisation de solutions d'aflatoxine M_1. Les aflatoxines sont cancérigènes pour l'homme. L'attention est attirée sur les recommandations du Centre international de Recherche sur le Cancer de l'OMS[1][2].

AVERTISSEMENT 2 — Protéger correctement de la lumière du jour le laboratoire dans lequel sont effectuées les analyses et conserver les solutions étalons d'aflatoxine M_1 à l'abri de la lumière, par exemple à l'aide d'une feuille d'aluminium.

AVERTISSEMENT 3 — L'utilisation d'une verrerie pour les solutions aqueuses d'aflatoxine (par exemple tubes, flacons, ballons et fioles, béchers, seringues) lavée avec des produits non acides peut provoquer une perte d'aflatoxine M_1. De plus, il convient de laisser tremper pendant plusieurs heures dans de l'acide dilué (par exemple de l'acide sulfurique à c = 2 mol/l) la verrerie neuve de laboratoire entrant en contact avec les solutions aqueuses d'aflatoxine M_1, puis de la rincer à l'eau distillée afin de retirer toute trace d'acide (vérifier que le pH se situe entre 6 et 8).

AVERTISSEMENT 4 — Utiliser des méthodes de décontamination pour les déchets de laboratoire, tels que les composés solides, les solutions dans des solvants organiques, les solutions aqueuses et de déversement, ainsi que pour la verrerie en contact avec des matériaux cancérigènes. Des méthodes de décontamination adaptées ont été mises au point et validées par le Centre international de Recherche sur le Cancer de l'OMS[1][2].

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode pour le dosage de l'aflatoxine M_1 dans le lait et le lait en poudre. Le niveau de validation le plus bas est de 0,08 µg/kg de poudre de lait entier, ce qui correspond à 0,008 µg/l de lait liquide reconstitué. La limite de détection (LOD) est de 0,05 µg/kg pour le lait en poudre et de 0,005 µg/kg pour le lait liquide. La limite de quantification (LOQ) est de 0,1 µg/kg pour le lait en poudre et de 0,01 µg/kg pour le lait liquide.

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

2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

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 https://www.electropedia.org/

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

© ISO et FIL 2021 – Tous droits réservés

3.1
teneur en aflatoxine M_1
concentration ou fraction massique de substances, déterminée selon le mode opératoire spécifié dans le présent document

Note 1 à l'article: La concentration est exprimée en µg/l et la fraction massique en µg/kg.

4 Principe

L'aflatoxine M_1 est extraite par passage de la prise d'essai à travers une colonne d'immunoaffinité qui contient des anticorps spécifiques fixés sur un support solide.

Au fur et à mesure que l'échantillon traverse la colonne, les anticorps se lient de manière sélective à toute aflatoxine M_1 (antigène) présente et constituent un complexe anticorps-antigène. Tous les autres composants de la matrice échantillon sont éliminés de la colonne avec de l'eau. L'aflatoxine M_1 est ensuite éluée de la colonne et l'éluat recueilli. La quantité d'aflatoxine M_1 présente dans l'éluat est déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) associée à une détection fluorimétrique.

5 Réactifs

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

5.1 Colonne d'immunoaffinité.

La colonne d'immunoaffinité doit contenir des anticorps antiaflatoxine M_1. Sa capacité ne doit pas être inférieure à 100 ng d'aflatoxine M_1 (ce qui correspond à 2 µg/l pour une prise d'essai de 50 ml). Son taux de récupération ne doit pas être inférieur à 80 % d'aflatoxine M_1 en cas d'utilisation d'une solution étalon contenant 4 ng de toxine (ce qui correspond à 80 ng/l pour un échantillon de 50 ml). Toute colonne d'immunoaffinité répondant aux spécifications de performance susmentionnées peut être utilisée [1)].

Les performances des colonnes doivent être contrôlées régulièrement et au moins une fois pour chaque lot de colonnes. La procédure est la suivante.

a) Contrôle de la capacité:

   1) diluer 2,0 ml de solution mère d'aflatoxine M_1 (5.4.2) à 50 ml avec de l'eau;

   2) bien mélanger et verser la totalité du volume dans la colonne d'immunoaffinité en suivant soigneusement les recommandations données par le fabricant pour l'utilisation des colonnes;

   3) laver la colonne et éluer la toxine;

   4) déterminer la quantité d'aflatoxine M_1 éluée de la colonne par CLHP après avoir préparé la dilution appropriée de l'éluat final;

   5) calculer la capacité d'aflatoxine;

1) Exemples de colonnes d'immunoaffinité: Afla Test P Vicam®, Aflaprep® M R-Biopharm. Des produits similaires sont également disponibles auprès de Romer Labs®, Bioo Scientific® et Neogen®. Ces produits sont des exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce. Ces informations sont données par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne sauraient constituer un engagement de l'ISO et/ou de la FIL à l'égard de ces produits.

© ISO et FIL 2021 – Tous droits réservés