

DECISION

**du Comité de Ministres de l'Union économique Benelux
concernant l'application de méthodes d'analyse de référence Benelux
en matière d'aflatoxine dans les noix d'arachide et produits dérivés**

M (77) 5

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu l'article 1 b du Protocole du 29 avril 1969, relatif à la suppression des contrôles et formalités aux frontières intérieures du Benelux et à la suppression des entraves à la libre circulation,

Considérant que les aflatoxines produites par la moisissure *Aspergillus flavus* sont très cancérigènes et à ce titre interdites dans les trois pays,

Considérant que l'aflatoxine peut se développer dans les denrées alimentaires entreposées dans des conditions défavorables,

Considérant que certaines des denrées alimentaires en cause font l'objet d'échanges commerciaux intra-Benelux intensifs,

Constatant que les législations des trois pays concernant les noix d'arachide et produits dérivés ne donnent pas lieu à entraves à la libre circulation intra de ces denrées,

Considérant qu'il y a lieu d'éviter des contestations nées de l'application de techniques d'analyse différentes ou de l'emploi de normes différentes,

Considérant qu'en particulier l'harmonisation du contrôle des denrées alimentaires exige la mise en œuvre de techniques identiques ou équivalentes et l'emploi de modes d'expression semblables et le recours à des normes identiques ou équivalentes,

A pris la décision suivante :

Article unique

1. Les Gouvernements des trois pays du Benelux prendront les mesures nécessaires pour que les dispositions reprises dans le Règlement annexé à la présente Décision soient considérées à partir du 1^{er} octobre 1977 comme seule méthode de référence.
2. Dans les 6 mois qui suivent l'expiration du délai prévu au § 1, chacun des trois Gouvernements fait rapport au Comité de Ministres sur les mesures qui ont été prises pour l'exécution de cette Décision. Le texte des mesures d'exécution nationales sera joint à ce rapport.

FAIT à Bruxelles, le 2 juin 1977.

Le Président du Comité de Ministres,

R. VAN ELSLANDE

REGLEMENT

concernant l'application de méthodes d'analyse de référence Benelux
en matière d'aflatoxine dans les noix d'arachide et produits dérivés
M (77) 5, Annexe

AFLATOXINE**1. Objectif**

La présente méthode décrit la façon de déterminer la présence d'aflatoxine B₁ dans les noix d'arachide (*Arachis hypogaea*) et produits dérivés.

2. Champ d'application

La méthode d'analyse décrite est applicable aux noix d'arachide et produits dérivés.

3. Définition

Le présent règlement entend par quantité d'aflatoxine B₁ « identifiable », la quantité d'aflatoxine dont l'intensité de fluorescence correspond à celle d'au moins 2,5 nanogrammes (ng) de l'aflatoxine B₁ de référence.

4. Principe

L'aflatoxine B₁ est extraite de la denrée au moyen d'un mélange de méthanol et d'eau. Après centrifugation de l'extrait, agiter une partie aliquote en présence de chloroforme de sorte que les aflatoxines passent dans la couche de chloroforme. Après avoir fait évaporer le solvant, le résidu est dissous dans une quantité connue de chloroforme. Une partie aliquote de cette solution est soumise à une séparation chromatographique bidimensionnelle sur couche mince. Une évaluation visuelle de la teneur s'obtient par comparaison des spots B₁ éventuellement présents sur l'échantillon et les spots de référence B₁ déposés également sur le chromatogramme.

5. Réactifs

Tous les réactifs doivent être analytiquement purs.

5.1. Acétone.**5.2. Chloroforme :** stabilisé en présence de 0,5 - 1 % d'éthanol 96 %.

Conserver en un endroit frais et obscur.

Contrôler avant CHAQUE dosage la qualité comme suit :

- 1) Agiter dans une éprouvette 5 ml de chloroforme en présence de deux gouttes d'une solution d'iodure de potassium n et d'une solution d'empois d'amidon 0,5 %. Après séparation des couches, la phase supérieure ne peut pas être bleue (absence de chlore libre).

- 2) Agiter 20 ml de chloroforme pendant 10 sec. en présence de 20 ml d'eau et filtrer la phase aqueuse. Le pH du filtrat doit être compris entre 6.0 - 8.0.
 - 3) Dissoudre 50 mg de benzidine *) dans 10 ml de chloroforme. Conserver la solution dans un récipient fermé à l'abri de la lumière. Après 15 min., la solution doit être limpide et jaune clair (absence de phosgène).
- 5.3. Ether de pétrole; P.E. 28 - 40° C; moins de 1% d'hydrocarbures aromatiques exprimés en benzène (transmission supérieure à 2% si mesuré en cuvettes de quartz de 1 cm à 254 nm).
 - 5.4. Méthanol.
 - 5.5. Ether diéthylique: exempt de peroxyde.
 - 5.6. Acide sulfurique dilué: mélanger 1 volume d'acide sulfurique concentré et 1 volume d'eau distillée.
 - 5.7. Sulfate de sodium anhydre.
 - 5.8. Gaz inerte, par exemple azote.
 - 5.9. Solution de référence d'aflatoxine B₁ (R.I.V. - Postbus 1 à Bilthoven), contenant 20,0 µg B₁/ml de chloroforme.
Prescription relative à la dilution et à la conservation
Transférer le contenu de l'ampoule (2,5 ml) quantitativement dans un ballon jaugé de 100 ml et compléter par du chloroforme.
(Rangées dans un endroit frais et obscur, la solution initiale ainsi que la solution diluée de 1 à 40 à l'aide de chloroforme stabilisé, peuvent se conserver deux mois).
Diluer ensuite 2 ml de cette solution (1 : 40) dans un ballon jaugé de 10 ml en présence de chloroforme. (Cette solution diluée (1 : 200) peut se conserver 14 jours au maximum et contient 0,1 µg d'aflatoxine B₁ par ml).
 - 5.10. Solution de référence d'aflatoxine qualitative (R.I.V. - Postbus 1 à Bilthoven) contenant les aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂. Utiliser cette solution dans la concentration indiquée par la R.I.V. (Conserver cette solution en un endroit frais et obscur).
 - 5.11. Gel de silice G.
On peut se servir de plaques de gel de silice G préparées fraîchement (voir 7.2.1.) ou industriellement. Vérifier la qualité de ces plaques à couche mince comme suit.
Déposer en un point A de la plaque pour chromatographie sur couche mince 10 µl de la solution de référence d'aflatoxine qualitative. Déposer ensuite dans les points B, C et D la quantité prescrite de la solution de référence d'aflatoxine, comme indiqué sous 7.2.2. (voir figure 1). Développer la plaque en deux dimensions conformément à la méthode décrite sous 7.2.3. Interpréter le chromatogramme d'après 7.2.4.

*) La benzidine est suspecte d'être cancérigène. La pesée et les autres opérations doivent se faire avec les précautions qui s'imposent.

Vérifier si une séparation intégrale est obtenue entre les aflatoxines B₁ et B₂ et si les valeurs R_f pour les spots de référence de l'aflatoxine B₁ dans la migration chloroforme-acétone se situent entre 0,50 et 0,80. S'il n'est pas répondu à un des deux critères précités, il faut faire de nouvelles plaques pour la chromatographie sur couche mince avec du nouveau gel de silice ou prendre une nouvelle série de plaques toutes prêtes. Ces plaques doivent être contrôlées comme décrit ci-dessus. Cette opération est à répéter jusqu'à obtention d'une plaque répondant aux critères précités.

5.12. Acide chlorhydrique ; 1 N

6. Appareillage et ustensiles

- 6.1. Homogénéisateur - Ultra Turrax ou Waring Blendor.
- 6.2. Evaporateur rotatif à vide.
- 6.3. Centrifugeuse 2.500 à 3.000 t/m.
- 6.4. Equipement de laboratoire classique pour la chromatographie sur couche mince.
- 6.5. Lampe ultraviolette pour radiation par longueur d'onde d'environ 360 nm et d'une intensité telle qu'un spot de 2,5 ng d'aflatoxine soit encore nettement apparent sur la plaque à couche mince à une distance de 10 cm.
- 6.6. Bêchers de 250 ml.
- 6.7. Eprouvettes graduées de 25, 50 et 100 ml.
- 6.8. Tubes à centrifugation de 250 ml (en verre ou plastique).
- 6.9. Ampoules à décantation de 250 ml.
- 6.10. Ballons jaugés de 100 et 10 ml.
- 6.11. Matras d'Erlenmeyer de 300 ml avec bouchon rodé.
- 6.12. Tubes calibrés d'environ 10 ml avec bouchon rodé ou fermeture teflôn.
- 6.13. Pipette calibrée.

7. Mode opératoire

7.1. *Extraction*

- 7.1.1. Peser 50,0 g du produit de base moulu et homogénéisé dans un bêcher de 250 ml ou dans le vase d'un Waring Blendor. (Evaporer autant que possible au bain-marie les produits comme les sauces d'arachides contenant de l'eau.) Ajouter 100 ml de méthanol et 10 ml d'eau distillée à l'aide d'épruvettes graduées. Homogénéiser le mélange pendant 2 minutes avec un Ultra Turrax ou Waring Blendor.

- 7.1.2. Ajouter ensuite, également au moyen d'une éprouvette graduée, 30 ml d'eau distillée et homogénéiser à nouveau complètement. Transférer la masse homogénéisée dans un tube à centrifugation, fermer soigneusement pour éviter l'évaporation du solvant et centrifuger pendant 5 minutes à une vitesse de 2.500 à 3.500 t/min.
- 7.1.3. Prélever 70 ml de l'extrait limpide à l'aide d'une éprouvette graduée. (Veiller à ne pas entraîner des globules d'huile). Transférer cette quantité dans une ampoule à décantation de 250 ml et ajouter 50 ml d'éther de pétrole. Agiter ce mélange pendant 1 minute et éliminer la couche (supérieure) d'éther de pétrole après séparation des phases.
- 7.1.4. Ajouter ensuite successivement 20 ml d'eau distillée et 90 ml de chloroforme à l'aide d'une éprouvette graduée. Agiter ensuite pendant au moins 1 min.
Laisser reposer le mélange après agitation jusqu'à obtention d'une nette séparation des deux couches apparues et jusqu'à ce que les deux couches soient limpides.
Prélever la couche de chloroforme (couche inférieure) et sécher pendant quelques minutes sur sulfate de sodium anhydre.
- 7.1.5. Evaporer complètement l'extrait chloroformique à l'aide d'un évaporateur rotatif à vide sans air. Conserver (au besoin) l'extrait évaporé dans l'obscurité jusqu'immédiatement avant l'analyse chromatographique sur couche mince. Redissoudre le résidu dans du chloroforme et transférer cette solution dans un tube calibré de verre de 10 ml, tel que visé sous 6.12. Evaporer cette solution jusqu'à un volume final de 1 ml à l'abri de l'air.

7.2. Chromatographie

- 7.2.1. *Préparation des plaques pour chromatographie sur couche mince*
Peser pour la préparation de 5 plaques, 30 g de gel de silice (5.11.) dans un erlenmeyer de 300 ml (6.11.).
Ajouter 60 ml d'eau distillée, placer le bouchon sur le matras et homogénéiser en agitant pendant 1 minute. Etaler la suspension sur les plaques en verre de 200 x 200 mm à l'aide d'un appareil adéquat (6.4.) en couches de 0,25 mm. Faire sécher les plaques à l'air et les activer immédiatement avant emploi pendant 1 h dans une étuve à 110° C.
Conserver les plaques dans un dessiccateur sur gel de silice.
- 7.2.2. *Dépôts des spots*
Tracer sur une plaque pour chromatographie sur couche mince, des lignes dans la couche, conformément au dessin ci-joint (voir figure 1). A l'aide de micropipettes, déposer les solutions suivantes sur les points A, B, C et D (indiqués dans la figure 1) situés sur les lignes de départ (c'est-à-dire une ligne imaginaire tirée à 2 cm au droit du bord inférieur de la plaque) :

A : 20 μ l de l'extrait d'échantillon obtenu sous 7.1.5.

B : 25 μ l de la solution de référence d'aflatoxine B₁ (1 : 200).

C : 25 μ l de la solution de référence d'aflatoxine B₁ (1 : 200).

D : 10 μ l de la solution de référence d'aflatoxine qualitative.

Evaporer la solution pendant l'apposition avec un courant de gaz inerte. Veiller à ce que les spots de départ soient de grandeur égale et que leur diamètre n'excède pas 5 mm environ.

7.2.3. Développement du chromatogramme

Développer la plaque dans le premier sens de migration dans une cuve saturée placée dans l'obscurité et remplie d'environ 1 cm d'un éluant frais (c'est-à-dire non encore utilisé) composé d'un mélange d'éther diéthylique - méthanol - eau 94 : 4,5 : 1,5 v/v. Eluer jusqu'à ce que tout le front liquide ait atteint la ligne sur la plaque à couche mince.

Retirer la plaque de la cuve et évaporer l'éluant dans l'obscurité pendant 15 min. à la température ambiante. Tourner ensuite la plaque de 90° et développer ensuite la plaque dans le deuxième sens de migration dans une cuve **non** saturée établie dans l'obscurité et remplie comme ci-dessus au moyen d'un mélange de chloroforme-acétone 90 : 10 v/v. Développer la plaque jusqu'à ce que tout le front liquide ait atteint la ligne limite de migration.

7.2.4. Interprétation du chromatogramme

Examiner le chromatogramme bidimensionnel sur couche mince ainsi obtenu, après évaporation du liquide de développement, sous lumière ultraviolette à 360 nm à 10 cm de la source lumineuse (fluorescence bleue des spots d'aflatoxine B₁). Vérifier si une séparation totale a été obtenue entre les aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ dans le sens de migration chloroforme-acétone provenant de D.

Localiser les deux spots B₁ de référence B et C, et tracer deux lignes imaginaires par ces spots perpendiculairement au sens de développement (voir figure 2). Autour de l'intersection P de ces deux lignes imaginaires se trouve la zone où peut être attendue l'aflatoxine B₁ provenant de l'extrait d'échantillon. Dans la pratique, ce spot d'aflatoxine B₁ se trouve dans la zone autour de Q sous un angle de $\pm 120^\circ$ limité par deux lignes imaginaires tirées à partir des spots de référence B et C (voir figure 2). L'extrait est bien séparé dans les deux sens de migration si la zone autour de P et Q est exempte d'interférence de fond.

Comparer les intensités observées des deux spots de référence B₁ et l'intensité du spot d'aflatoxine B₁ provenant de l'extrait tiré de l'échantillon. Si la fluorescence observée du spot d'aflatoxine B₁ provenant de l'extrait d'échantillon égale ou dépasse en intensité celle des spots de référence B₁ provenant d'une solution de référence de 25 μ l (1 : 200) (resp. spots C et B), la présence de

l'aflatoxine B₁ dans le matériel de départ est jugée « identifiable ». La localisation du spot d'aflatoxine B₁ dans le chromatogramme bidimensionnel peut être facilitée en posant successivement sur une nouvelle plaque en un point A (voir figure 1): 20 µl de l'extrait d'échantillon obtenu sous 7.1.5. et 25 µl de la solution de référence d'aflatoxine B₁ (1 : 200).

7.3. Réaction de confirmation pour l'aflatoxine B₁

Confirmer l'identité de l'aflatoxine B₁ dans l'extrait au moyen de la technique décrite ci-après.

7.3.1. Chromatographie bidimensionnelle avec formation de l'hémiacétal d'aflatoxine B₁ (aflatoxine B_{2a})

Les opérations décrites ci-après doivent être exécutées comme l'indique la figure 3.

7.3.1.1. Sur une plaque (5.11.) tracer deux lignes parallèles aux côtés (à 6 cm de ces côtés) qui doivent délimiter la migration des phases mobiles. A l'aide de pipettes capillaires ou de micro-seringues, déposer sur la plaque les solutions suivantes :

- au point A : une quantité d'extrait purifié de l'échantillon, obtenu selon 7.1.5. et renfermant environ 2,5 nanogrammes d'aflatoxine B₁.
- aux points B et C : 25 µl de solution de référence (5.9.).

7.3.1.2. Développer le chromatogramme dans la direction I à l'aide de la phase mobile chloroforme-acétone = 9 : 1 (v/v) (couche de 1 cm dans une cuve de développement non saturée) dans l'obscurité jusqu'à ce que le front de solvant atteigne la ligne-limite. Retirer la plaque de la cuve et la laisser sécher pendant 5 minutes dans l'obscurité à la température ambiante. Nébuliser ensuite de l'acide chlorhydrique 1 N (5.12.) sur une bande de 2,5 cm de largeur (représentée par des hachures à la figure 3) dans laquelle sont situés les points A et B jusqu'à ce qu'elle devienne foncée et protéger le reste de la plaque par une plaque de verre. Laisser réagir pendant 10 minutes dans l'obscurité puis sécher sous courant d'air à la température ambiante. Développer ensuite le chromatogramme dans la direction II à l'aide de la phase mobile chloroforme-acétone = 9 : 1 (v/v) (couche de 1 cm dans une cuve de développement non saturée) également dans l'obscurité jusqu'à ce que le front de solvant atteigne la ligne-limite. Retirer la plaque de la cuve et la laisser sécher à la température ambiante.

7.3.1.3. Examiner le chromatogramme sous lumière UV (6.5.) et puis vérifier les particularités ou caractéristiques suivantes :

- a) Un spot d'aflatoxine B_1 à fluorescence bleue devient visible, provenant de la solution de référence déposée au point C (migration dans le sens I).
- b) Un spot d'aflatoxine B_1 à fluorescence bleue (qui n'a pas réagi à l'acide chlorhydrique) devient visible ainsi qu'un spot à fluorescence bleue plus intense d'hémiacétal d'aflatoxine B_1 , tous deux provenant de la solution de référence déposée au point B (migration dans le sens II).
- c) Des spots tels que ceux cités sous b), provenant de l'extrait d'échantillon déposé au point A, deviennent visibles. La place de ces spots est déterminée par la distance de migration de l'aflatoxine B_1 à partir du point A dans le sens I (la même distance que celle parcourue par la solution de référence déposée au point C) et par les distances de migration parcourues dans le sens II par l'aflatoxine B_1 (qui n'a pas réagi à l'acide chlorhydrique) et par l'hémiacétal d'aflatoxine B_1 (les mêmes distances que celles parcourues par la solution de référence déposée au point B). L'intensité de fluorescence des spots d'hémiacétal provenant de l'extrait et celle de la solution de référence déposée au point B doivent approximativement concorder.

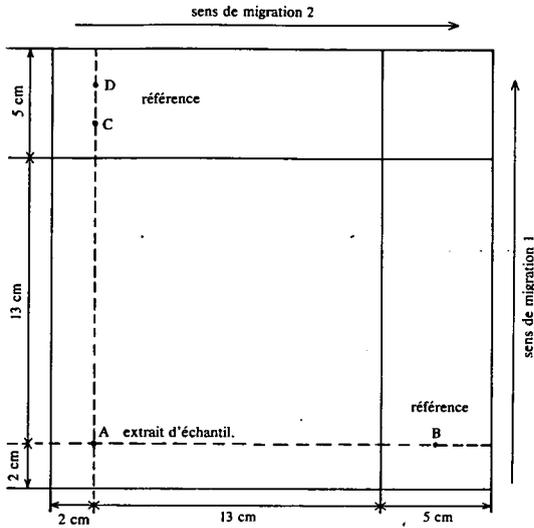


Figure 1 : Reproduction schématique de la répartition de la plaque à couche mince pour chromatographie bidimensionnelle.

Phase mobile 1 : éther diéthylique : méthanol : eau . (94 : 4,5 : 1,5).

Phase mobile 2 : chloroforme : acétone . (90 : 10).

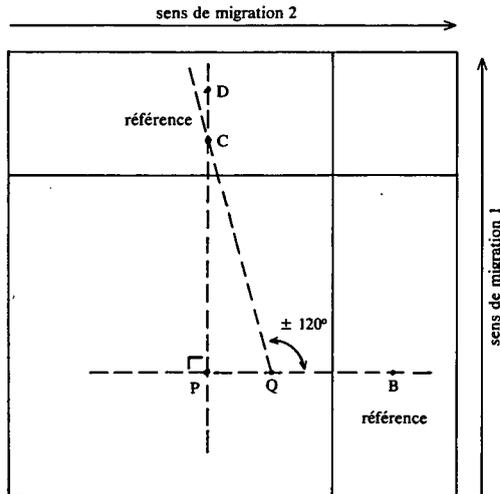


Figure 2 : Localisation d'aflatoxine B₁ dans extrait d'échantillon après chromatographie bidimensionnelle sur couche mince.

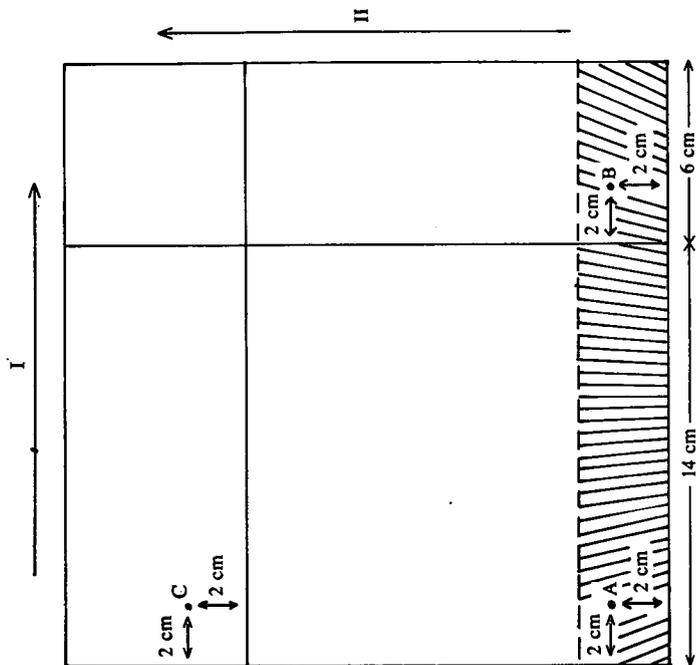


Figure 3 : Schéma du partage de la plaque pour la chromatographie bidimensionnelle avec formation de l'hémiacétal d'aflatoxine B₁.