



**FWC SIEA 2018 LOT 1 « SUSTAINABLE MANAGEMENT OF NATURAL RESOURCES AND RESILIENCE »**

**DEMANDE DE PRESTATION : SIEA – 2018 - 16733**

**MISSION D'APPUI A LA MISE EN ŒUVRE DES ACTIVITES THEMATIQUES  
ET TRANSVERSALES DU PROGRAMME REGIONAL SANOI**

**GUIDE TECHNIQUE**

**METHODES DE DETECTION HARMONISEES POUR LA DETECTION DES  
MYCOTOXINES, DANS LE CADRE DU RESEAU DE LABORATOIRES  
OFFICIELS DE LA COI.**

Document préparé par M. Benoit Glaud, Expert en laboratoires

Octobre 2024

Les opinions exprimées dans ce rapport sont celles des consultants et ne sauraient en aucun cas refléter la position officielle de la Commission européenne, ni celle des bénéficiaires du projet susmentionné.



## TABLE DES MATIERES

1	Introduction.....	1
2	Contexte.....	1
3	Méthodes de détection .....	2
	ELISA et CHARM II.....	2
	Test Bandelettes/rapide .....	2
	Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) .....	2
	Chromatographie liquide à haute performance - spectrométrie de masse (LC-MS/MS).....	3
	Méthodes de chromatographie sur couche mince (TLC) .....	3
4	Réglementations internationales pour les mycotoxines .....	4
5	Méthodes d'analyse utilisées dans l'Océan Indien .....	5
	Annexe 1 : Exemple de kit rapide .....	6
	Annexe 2 : Method LC-MS/MS utilisé au FTL (Maurice).....	7
	Annexe 3 : Méthode ELISA.....	8
	Annexe 4: Méthode CHARM II .....	9
	Annexe 5: Méthode HPLC pour la détermination de la teneur en Aflatoxines dans les céréales.....	10
	Domaine d'Application .....	11
	Equipement.....	11
	Produits chimiques et réactifs.....	11
	Solution tampon saline phosphatée (PBS –Phosphate Buffer Saline).....	12
	Phase mobile HPLC.....	12
	Préparation Standard .....	12
	Solution Mère (100 ng/ml ou ppb) .....	12
	Solution de calibration (1, 5, 10 et 20 ppb).....	13
	Préparation, extraction et purification des échantillons.....	13
	Purification de l'extrait avec colonne immunoaffinité .....	14
	Analyse HPLC.....	14
	Calcul des résultats.....	17
	Contrôle Qualité.....	18
	Organigramme de la procédure .....	19

## 1 INTRODUCTION

Le présent guide a été préparé en réponse à une recommandation des experts nationaux des états de la COI réunis lors de l'atelier régional sur les mesures sanitaires et phytosanitaires applicables aux filières maïs et volailles dans les états de la COI, qui s'est déroulé à Madagascar, du 16 au 18 avril 2024, dans le cadre du projet SANOI (Programme d'appui à la Sécurité Alimentaire et Nutritionnelle dans l'Océan Indien).

Il s'inscrit dans le cadre des activités identifiées sous l'axe stratégique « M.1 Législation commune sur les mycotoxines ».

Axe stratégique	Composante du plan d'actions	Activité concernée dans le plan d'actions
<b>M.1</b> Législation commune sur les mycotoxines	<b>M.1.4</b> Méthodes de détection (labo.) communes	<b>M.1.4.0</b> Préparation d'un texte sur les méthodes de détection harmonisées pour la détection des mycotoxines, dans le cadre du réseau de laboratoires officiels de la COI

## 2 CONTEXTE

La détection des mycotoxines dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux est essentielle pour assurer la sécurité sanitaire. Les mycotoxines sont des composés toxiques produits par certaines espèces de moisissures, principalement des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Elles contaminent fréquemment les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, constituant une menace pour la santé humaine et animale. Les mycotoxines les plus courantes sont les aflatoxines (B et G dans les aliments, M1 dans le lait), l'ochratoxine A (OTA), la fumonisine, la zéaralénone (ZEN), et la déoxynivalénol (DON).

À l'échelle mondiale, les aflatoxines sont probablement les plus dangereuses et sont souvent retrouvées dans les arachides, les céréales (maïs, riz, sorgho), et les épices, en particulier dans les pays tropicaux et subtropicaux où les conditions climatiques favorisent le développement des moisissures. L'Afrique subsaharienne, l'Asie du Sud et certaines régions d'Amérique latine sont des zones à forte prévalence. Les fumonisines et la zéaralénone affectent surtout les cultures de maïs, tandis que la déoxynivalénol et les toxines T-2 et HT-2 sont plus souvent associées aux céréales comme le blé et l'orge en climat tempéré.

Dans la région de l'Océan Indien, notamment à Madagascar, aux Comores, à Maurice, et aux Seychelles, les conditions tropicales favorisent particulièrement la contamination des cultures. Les aflatoxines sont une préoccupation majeure dans ces pays, affectant notamment les productions de maïs, de riz, d'arachides et de noix de coco. Les conditions de stockage et de transport, souvent inadéquates en raison de la chaleur et de l'humidité, accentuent la prolifération des moisissures productrices de mycotoxines. De plus, ces pays dépendent en partie de l'importation de céréales et d'autres aliments qui peuvent être contaminés par des mycotoxines dans les pays exportateurs. Les systèmes de surveillance sont souvent peu développés (en particulier à Madagascar et aux Comores). Ce document peut contribuer aux efforts en cours pour mettre en place des systèmes de détection et de contrôle afin de réduire l'incidence des mycotoxines.

### 3 METHODES DE DETECTION

À travers le monde, il existe plusieurs méthodes officielles pour la détection des mycotoxines, normalisées par différentes organisations nationales et internationales :

#### ELISA ET CHARM II

- **Description** : Basé sur la reconnaissance des mycotoxines par des anticorps spécifiques. Cette méthode est souvent utilisée pour le dépistage rapide (objectif : identifier les échantillons potentiellement non-conformes).
- **Avantages** : Rapide et peu coûteux, bon pour les tests de routine en dépistage.
- **Inconvénients** : Moins précis que la chromatographie et peut donner des faux positifs ou négatifs. Les résultats positifs (typiquement > à 50% de la MRL) doivent être confirmés par HPLC ou LC-MS/MS avant d'être utilisés pour prendre des décisions officielles dans les pays européens.
- **Utilisation** : Recommandé par l'UE, utilisé dans de nombreux pays pour un contrôle rapide des lots.

#### TEST BANDETTES/RAPIDE

- **Description** : De très nombreux tests dits « rapides » sont présent sur la marche pour une détection rapides des mycotoxines (voir annexe 1 pour exemples de kits). Ces kits bandelette peuvent donner une réponse qualitative, semi-quantitative ou quantitative, parfois en fonction de si la lecture se fait manuellement ou avec un appareil spécifique. Ces tests sont le plus souvent réservé aux tests de dépistage sur le terrain, mais certain pays les utilise à grande échelle pour la surveillance. Tous résultats présumés positifs doivent être confirmés par une méthode de référence (HPLC dans les pays européens par exemple).
- **Avantages** : Rapide et peu coûteux, peut être mis en place très rapide sur un bout de table.
- **Inconvénients** : Résultats souvent qualitatif ou semi quantitatif. La facilité initiale du test porte parfois les manipulateurs à ne pas apporter assez d'attention au respect de la procédure, ce qui affecte la fiabilité des résultats.
- **Utilisation** : Surtout pour « petits » laboratoires ou les laboratoires qui ne maîtrise pas encore des appareils plus complexes comme HPLC ou ELISA. Approche qui peut être très utile et facile pour mettre rapidement en place un plan de surveillance initiale.

#### CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

- **Description** : Méthode très couramment utilisée pour la détection et la quantification des mycotoxines. La comprend une étape de dérivation pré ou post colonne (par système Cobra Cell, UVE ou Pickering) afin que certaines mycotoxines soient détectables par détecteur à fluorescence.
- **Avantages** : Haute sensibilité et précision.
- **Inconvénient** : chers (système HPLC, solvants colonne immunoaffinité pour extractions des échantillons, consommables HPLC)
- **Utilisation**: Utilisée par des organismes comme l'UE, l'US FDA et l'OMS pour confirmation des test de dépistage, mais aussi pour dépistage si aucunes autres méthodes n'est disponible.

**CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE - SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS)**

- **Description** : Combinaison de la HPLC avec la détection par spectrométrie de masse en tandem, permettant d'analyser plusieurs mycotoxines (jusqu'à plus d'une vingtaine) en une seule étape.
- **Avantages** : Très sensible et capable de détecter plusieurs mycotoxines simultanément avec une très haute spécificité. Pas besoin de l'étape fastidieuse de chère pour la préparation des échantillons (méthode « dilute & shoot »). Relativement facile à mettre en place pour un laboratoire qui analyse les résidus de pesticide par LC-MS/MS car utilise une méthode similaire (ESI+ et colonne C18). L'analyse peut se faire 24/7 avec échantillonneur automatiques.
- **Inconvénients** : LC-MS/MS cher et complexe à mettre en place, nécessite une expertise avancée pour la maîtrise de l'appareil.
- **Utilisation** : Utilisée par de nombreux pays EU et autre pays qui dispose de LC-MS/MS.

**METHODES DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (TLC)**

- **Description** : Méthode classique mais moins utilisée actuellement, la TLC consiste en la séparation des composés sur une plaque mince suivie d'une détection visuelle ou par fluorescence.
- **Avantages** : Simple et peu coûteux.
- **Inconvénients** : Moins sensible et moins précise que les méthodes chromatographiques modernes.
- **Utilisation** : Méthode de référence dans le passé, et encore parfois encore utilisée dans certains pays en développement (mais de plus en plus rare), cette méthode est désormais largement tombée en désuétude.

Le Règlement CE n° 401/2006<sup>1</sup> indique les critères de performance pour la quantification des mycotoxines pour les analyses officielles. Par Exemple, pour aflatoxines :

Critère	Plage de concentration	Valeur recommandée	Valeur maximale autorisée
Valeurs à blanc	Toutes	Négligeable	—
Récupération — Aflatoxine M1	0,01-0,05 µg/kg	De 60 à 120 %	
	> 0,05 µg/kg	De 70 à 110 %	
Récupération — Aflatoxines B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	< 1,0 µg/kg	De 50 à 120 %	
	1-10 µg/kg	De 70 à 110 %	
	> 10 µg/kg	De 80 à 110 %	
Fidélité RSD <sub>R</sub>	Toutes	Dérivée de l'équation d'Horwitz	2 × la valeur dérivée de l'équation d'Horwitz

On peut calculer la fidélité RSD<sub>F</sub> en multipliant par 0,66 la fidélité RSD<sub>R</sub> à la concentration présentant un intérêt.

**Note:**

- Valeurs à appliquer à la fois à B<sub>1</sub> et à la somme de B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>.
- Si les sommes des différentes aflatoxines B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub> doivent être enregistrées, la réponse de chacune d'elles au système d'analyse doit être soit connue, soit équivalente.

<sup>1</sup> Règlement (CE) n o 401/2006 de la Commission du 23 février 2006 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?qid=1728664997667&uri=CELEX%3A32006R0401>

## 4 REGLEMENTATIONS INTERNATIONALES POUR LES MYCOTOXINES

Les niveaux de mycotoxines admissibles sont strictement régulés par plusieurs organismes, et les méthodes de détection doivent souvent suivre les normes définies par ces autorités :

- **Codex Alimentarius (FAO/OMS)** : Fixe des niveaux maximaux pour diverses mycotoxines (comme l'aflatoxine, l'ochratoxine, la zéaralénone) dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Les limites du Codex Alimentarius peuvent varier (ou être interprétée de manière différentes) selon les pays membres, et certaines valeurs peuvent ne pas être spécifiées pour certains produits.
- **Union Européenne (EU)** : Règlement (UE) 2023/915<sup>2</sup> (et CE n° 401/2006 pour méthode d'analyses) définissent les méthodes d'analyse et les niveaux maximums admissibles pour les mycotoxines dans les produits alimentaires. Les valeurs européennes (Reg (UE) 2023/915) sont souvent plus strictes que celles du Codex Alimentarius ou de la FDA, en particulier pour les produits destinés aux nourrissons.
- **Food and Drug Administration (FDA) (États-Unis)** : La FDA a des lignes directrices strictes sur les mycotoxines dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, avec des méthodes spécifiques comme la HPLC et l'ELISA. La FDA se concentre sur les limites de sécurité pour la consommation humaine et animale, et sa réglementation diffère selon la destination (aliments pour humains ou animaux).
- **Chine / Asie**: Les méthodes de détection suivent les lignes directrices nationales, souvent basées sur les recommandations du Codex Alimentarius.

Voici un tableau récapitulatif des limites maximales autorisées (tableau non exhaustif) pour certaines mycotoxines dans les aliments, en fonction du Règlement (UE) 2023/915 (Union Européenne), du Codex Alimentarius (FAO/OMS), et des lignes directrices de la FDA (États-Unis) :

Mycotoxine	Aliment concerné	Limite Reg (UE) 2023/915	Limite Codex Alimentarius	Limite FDA (USA)
<b>Aflatoxine B1</b>	Céréales et produits dérivés	2 µg/kg	5 µg/kg	20 µg/kg (total aflatoxines)
	Céréales pour nourrissons et enfants	0.1 µg/kg	Non spécifié	Non spécifié
	Arachides destinées à la transformation	8 µg/kg	15 µg/kg	20 µg/kg (total)
	Fruits secs, épices	5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg (total)
<b>Aflatoxines totales</b>	Céréales et produits céréaliers	4 - 10 µg/kg selon produits	10 µg/kg	20 µg/kg (total)
<b>Ochratoxine A</b>	Céréales et produits céréaliers	3 µg/kg	5 µg/kg	Non spécifié
	Raisins secs	10 µg/kg	10 µg/kg	Non spécifié
	Vins et jus de raisins	2 µg/kg	Non spécifié	Non spécifié
	Café torréfié et solubles	5 µg/kg	Non spécifié	Non spécifié
<b>Fumonisines</b>	Maïs et produits à base de maïs	1000 µg/kg	2000 µg/kg	2000-4000 µg/kg
	Aliments pour nourrissons	200 µg/kg	Non spécifié	Non spécifié

<sup>2</sup> Règlement (UE) 2023/915 de la Commission du 25 avril 2023 concernant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et abrogeant le règlement (CE) no 1881/2006 (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?qid=1728653384897&uri=CELEX%3A32023R0915>

Mycotoxine	Aliment concerné	Limite Reg (UE) 2023/915	Limite Codex Alimentarius	Limite FDA (USA)
<b>Zéaralénone</b>	Céréales et produits céréaliers	100 µg/kg	100 µg/kg	Non spécifié
	Maïs destiné à la transformation	350 µg/kg	100 µg/kg	Non spécifié
	Céréales pour nourrissons	20 µg/kg	Non spécifié	Non spécifié
<b>Déoxynivalénoïl (DON)</b>	Céréales et produits céréaliers	750 µg/kg	1000 µg/kg	1000 µg/kg
	Produits transformés à base de céréales	500 µg/kg	Non spécifié	Non spécifié
	Aliments pour nourrissons	200 µg/kg	Non spécifié	Non spécifié

## 5 METHODES D'ANALYSE UTILISEES DANS L'OCEAN INDIEN

Les méthodes suivantes ont été observées lors des visites dans les laboratoires.

Pays	Laboratoire	Méthode
<b>Maurice</b>	GAD	Méthode par HPLC avec dérivation pré-colonne. Méthode pour Aflatoxines accréditée <sup>3</sup> .
	FTL	Méthode par HPLC avec dérivation pré-colonne. Méthode pour Aflatoxines accréditée <sup>4</sup> .  Débute de mise en place de la méthode par LC-MS/MS sur colonne C18 par extraction « dilute & shoot », voir Annex 2)
<b>Seychelles</b>	SBS	
	SPHL	
<b>Madagascar</b>	LHAE	Essai sur LC-MS/SM (Orbitrap) mais méthode pas encore en place
	LNDV	Résultats obtenus sur CHARM, méthode non validée.

Pour les méthodes ELISA et CHARM, la procédure doit suivre celle indiquée par le fabricant (voir annexes 3 et 4). Pour la méthode HPLC, la procédure est adaptée en fonction des équipements et consommables disponibles dans le laboratoire. Une méthode validée est donnée en annexe 5.

<sup>3</sup> <https://www.mauritas.org/files/T040.pdf>

<sup>4</sup> <https://www.mauritas.org/files/T035.pdf>

### ANNEXE 1 : EXEMPLE DE KIT RAPIDE

Mycotoxine	Fournisseur	Produit commercial
DON	Neogen	Veratox® DON
	R-Biopharm	Ridascreen® DON
		Ridascreen® Fast DON
	Romer	AgraQuant DON
Fumonisines	Neogen	Veratox® Fumonisin
	R-Biopharm	Ridascreen® Fumonisin
		Ridascreen® Fast Fumonisin
	Romer	AgraQuant Total
Zéaralénone	Neogen	Veratox® Zéaralénone
	R-Biopharm	Ridascreen® Zéaralénon
		Ridascreen® Fast Zéaralénon
	Romer	AgraQuant ZON
T-2	Neogen	Veratox® Toxine T2
	R-Biopharm	Ridascreen® T2 toxin
		Ridascreen® Fast T2 Toxin
	Romer	AgraQuant T2



## ANNEXE 2 : METHOD LC-MS/MS UTILISE AU FTL (MAURICE)

Voir document en entier à <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004961en.pdf>

### EXPERIMENTAL

#### Extract preparation

The extracts of different animal feedingstuffs and silage were kindly provided by RIKILT, The Netherlands and Ghent University for the purposes of this study. A generic and simplified sample extraction protocol based on 84:16 (v/v) acetonitrile: acidified water for the recovery of mycotoxins from the variety of feedingstuffs and silage was used.<sup>6</sup> Briefly, the feed samples were mechanically homogenized in the presence of the extraction solvent followed by a centrifugation step. An aliquot of the supernatant was removed and placed in autosampler vial for subsequent LC-MS/MS analysis.

#### UPLC conditions

LC system:	ACQUITY UPLC I-Class
Column:	BEH C <sub>18</sub> , 2.1 x 100 mm, 1.7 µm
Temp.:	40 °C
Injection volume:	5 µL
Flow rate:	0.4 mL/min
Mobile phase A:	Water + 0.1% formic acid
Mobile phase B:	Acetonitrile + 0.1% formic acid

#### MS conditions

MS System:	Xevo TQ-S
Ionization mode:	ES +/- switching
Capillary voltage:	3.4 kV
Source temp.:	150 °C
Desolvation temp.:	400 °C
Cone gas flow:	150 L/hr
Desolvation gas flow:	800 L/hr

Table 1. UPLC gradient.

Time	A	B	Curve
0	90	10	
3	90	10	
10	30	70	
10.1	10	90	6
12	10	90	
12.1	90	10	
15	90	10	

## ANNEXE 3 : METHODE ELISA

Extrait de la procédure d'analyse pour un test ELISA. Chaque fabricant de test ELISA fourni la procédure à appliquer

(voir document complet sur <https://www.hygiene.com/documents/76631/aflatoxin-b1-rapid-elisa-kit-instructions.pdf>).

### Kit Contents

Package/ Number	Component	Description
1X Pouch	Antibody-coated microwell plate	96 wells (12 eight-well strips) in a microwell holder coated with a mouse anti-aflatoxin monoclonal antibody, <i>Ready-to-Use</i> .
1X Plate	Dilution plate	96 non-coated wells (12 eight-well strips) in a microwell holder, <i>Ready-to-Use</i> . (Mixing wells)
6X Vials	Standards	1.5 mL/vial of Aflatoxin B1 at the following concentrations: 0.0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 ng/mL in organic solution, <i>Ready-To-Use</i> .
2X Bottles	Conjugate	2 x 12 mL of Aflatoxin B1 conjugated to peroxidase in buffer with preservative, <i>Ready-to-Use</i> .
1X Bottle	Substrate	12 mL stabilized tetramethylbenzidine (TMB), <i>Ready-to-Use</i> .
1X Bottle	Stop solution	12 mL acidic solution, <i>Ready-to-Use</i> .
1X Pouch	PBS-T powder	PBS with 0.05% Tween® 20, bring to 1 liter with distilled water and store refrigerated. (Wash buffer)

TWEEN® 20 is a registered trademark of CRODA International Plc.

### Materials Required but Not Provided

- A grinder sufficient to render sample to the particle size of fine instant coffee
- Collection container with minimum 125 mL capacity
- Balance with 20 g measuring capability
- Graduated cylinder: 100 mL
- Methanol, reagent grade: 70 mL per sample
- Distilled or deionized water: 30 mL per sample
- Filter Paper: Whatman #1 or equivalent
- Filter Funnel
- Glass tubes
- Centrifuge
- Pipettor with tips: 100 µL and 200 µL
- Timer
- Wash bottle
- Absorbent paper towels
- Microplate reader with 450 nm filter

## ANNEXE 4: METHODE CHARM II

Extrait de la procédure d'analyse pour un test CHARM II. CHARM offre aussi un test différent – CHARM ROSA WET-S3 AFLATOXIN QUANTITATIVE TEST USING CHARM EZ-M READER (voir méthode sur : <https://apps.ams.usda.gov/elearning/TestKits/Charm-LF-AFQ-WETS3-Effective-06-17-2022.pdf>) (voir document complet sur <https://www.charm.com/wp-content/uploads/2018/06/charm-II-brochure.pdf>).

### 3 Simple Steps



#### *Charm II Antibiotic and Aflatoxin*

- Dilute liquid samples
- Grind solid samples with provided buffer
- Eliminate solids by centrifugation
- Protocol available for any matrix



#### *Inctronic II Incubator/Centrifuge*

- Adjustable temperature
- Dual heating block
- Built-in timer
- Digital temperature sensor
- Same incubator for all antibiotic families and aflatoxins
- Prepare sample for counting by centrifugation



#### *6600-7600 Analyzer*

- Automated printout of date, time, assay type, sample & operator ID, Lot # and results
- Computer ready for C2Soft option
- Suitable for all Charm II applications
- Suitable for some ATP based applications

## ANNEXE 5: METHODE HPLC POUR LA DETERMINATION DE LA TENEUR EN AFLATOXINES DANS LES CEREALES.

Section : Laboratoire de Biochimie	
Titre: Détermination des Aflatoxines par HPLC	
Référence : MYC 01	
Auteur :	Version : 01
Approuvé par :	Date révisée :
Date de préparation:	Date de révision :

---

Procédure opérationnelle normalisée

---

# Détermination des Aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> dans les céréales par HPLC avec détecteur à Fluorescence

---

Procédure opérationnelle normalisée

---

### **Convention :**

*✍* Indique les données à inscrire **impérativement** dans le cahier d'analyse

Indique les informations à noter sur l'étiquette des solutions

f Indique les formules à utiliser

**DOMAINE D'APPLICATION**

Cette méthode est applicable pour la détermination des Aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dans les céréales par HPLC avec détecteur à Fluorescence.

**EQUIPEMENT**

- Micropipettes de 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml et pointes adaptées.
- Fioles volumétriques de 5, 50 et 100 ml.
- Balance analytique, précision de 0,001 g minimum.
- Centrifuge pour tubes de 50 ml et tubes de 50 ml (extraction for agitation manuelle et centrifugation).
- Cylindres gradués de 10, 25, 50, 100 ml et 250 ml.
- Colonnes immunoaffinité (AflaCLEAN™ de LCTech, AflaStar™ de Romer ou similaire).
- Système d'extraction sous vide (« vacuum manifold ») et pompe à vide.
- Adaptateurs et réservoirs de 10 ou 20 ml (corps de seringues).
- Flaçon HPLC de 1.8-2 ml.
- Système HPLC avec colonne Pickering MYCOTOX (ou C18 similaire), appareil de dérivation Pickering UVE et détecteur à fluorescence.

**PRODUITS CHIMIQUES ET REACTIFS**

- Eau de qualité eau distillée.
- Méthanol de qualité analyse (AR grade).
- Eau de qualité HPLC.
- Méthanol de qualité HPLC.
- Acétonitrile de qualité HPLC.
- Solution d'extraction 80% Méthanol / 20% Eau

Pour extraction par mixage mécanique et filtration :

Pour chaque échantillon, préparer la solution dans un cylindre gradué de 100 ml comme suit :

- ajouter le méthanol (qualité analyse) jusqu'à 80 ml,
- compléter avec de l'eau jusqu'à 100 ml.

Pour extraction par agitation manuelle et centrifugation :

Pour chaque échantillon, préparer la solution dans un cylindre gradué de 25 ml comme suit :

- - ajouter le méthanol (qualité analyse) jusqu'à 20 ml,
- - compléter jusqu'à 25 ml.

Pour de nombreux échantillons:

À l'aide d'un cylindre gradué propre, ajouter dans une bouteille en verre de 1 L propre 800 ml méthanol (qualité analyse) et 200 ml de d'eau (qualité distillée). Cette solution peut se garder 3 mois.

*Sur la bouteille de la solution d'extraction, indiquer le nom et la composition de la solution, la date de préparation, la date de péremption et le nom (ou initiales) de la personne qui a préparé la solution.*

**Convention :**

*Indique les données à inscrire **impérativement** dans le cahier d'analyse*

*Indique les informations à noter sur l'étiquette des solutions*

*f Indique les formules à utiliser*

**SOLUTION TAMPON SALINE PHOSPHATEE (PBS –PHOSPHATE BUFFER SALINE)**

Ajouter 0.20 g de chlorure de potassium, 0,20 g de phosphate de dihydrogène de potassium, 1.16 g de di-sodium hydrogénophosphate anhydre, et 8.00 g de chlorure de sodium ajoutés à 900 ml d'eau distillée.

Après dissolution, ajuster le pH à 7,4 (avec 0,1 M HCl ou 0,1 M de NaOH selon le cas). Compléter la solution jusqu'à 1,0 L avec de l'eau distillée.

Cette solution peut se garder 3 mois.

*Sur la bouteille de PBS, indiquer le nom et la composition de la solution, la date de préparation, la date de péremption et le nom (ou initiales) de la personne qui a préparé la solution.*

**PHASE MOBILE HPLC**

À l'aide d'un cylindre gradué de 250 ml propre, ajouter dans une bouteille en verre de 1 L propre 560 ml (250 + 250 + 60) d'eau qualité HPLC, 220 ml de d'acétonitrile (qualité HPLC) et 220 ml de méthanol (qualité HPLC). Passer au bain sonique pendant 5 minutes (jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bulles). Si possible, filtrer à travers une membrane de 0.2 µm.

Cette phase mobile peut se garder 1 mois.

*Sur la bouteille de phase mobile, indiquer le nom et la composition de la solution, la date de préparation, la date de péremption et le nom (ou initiales) de la personne qui a préparé la solution.*

Standard d'Aflatoxines, par exemple 1 µg/ml Aflatoxine B1, 1 µg/ml Aflatoxine B2, 1 µg/ml Aflatoxine G1 et 1 µg/ml Aflatoxine G2.

**PREPARATION STANDARD**

**Important:** Vérifier les micropipettes utilisées avec de l'eau distillée et la balance pour s'assurer qu'elles soient bien calibrées avant de préparer les standards.

**SOLUTION MERE (100 NG/ML OU PPB)**

La solution mère doit être préparée fraîchement chaque semaine.

Attendre que le standard soit à température ambiante (entre 20 et 25°C)

À l'aide d'une micropipette de 10-100 µL, transvaser 100 µL du standard 1 ppb ( ) dans un flacon HPLC ambré de 2 ml avec bouchon à visser. Placer un bouchon en attente sur le flacon pour éviter toute évaporation.

*✍ Enregistrer le numéro de lot du standard.*

*✍ Enregistrer le numéro de la micropipette utilisée.*

À l'aide d'une micropipette de 100-1000 µL, ajouter 900 µL d'acétonitrile (qualité HPLC) dans le flacon. Visser le bouchon sur le flacon. Passer sur le Vortex quelques secondes pour bien homogénéiser la solution mère.

*✍ Enregistrer le numéro de la micropipette utilisée.*

**Convention :**

*✍ Indique les données à inscrire **impérativement** dans le cahier d'analyse*

*Indique les informations à noter sur l'étiquette des solutions*

*f Indique les formules à utiliser*

Cette solution mère peut se garder 1 semaine au réfrigérateur dans l'obscurité (flacon ambré ou papier aluminium autour du flacon).

### SOLUTION DE CALIBRATION (1, 5, 10 ET 20 PPB)

Les solutions de calibration doivent être préparées fraîchement chaque jour.

À l'aide de micropipettes de 10-100 µL et 100-1000 µL, préparer chaque solution de calibration comme spécifié dans le tableau ci-dessous dans 4 flacons HPLC de 2 ml à sertir en utilisant du méthanol qualité HPLC. Couvrir les flacons entre les ajouts pour éviter toute évaporation.

Niveau	Volume solution mère (en µl)	Volume solution mère (en µl)	Volume final	Concentration aflatoxine B <sub>1</sub> (ppb)
1	10	990	1 ml	1
2	50	950	1 ml	5
3	100	900	1 ml	10
4	200	800	1 ml	20

Notes: La solution mère est suffisante pour préparer 2 séries de solutions de calibration.

*✍* Enregistrer le numéro des micropipettes utilisées.

### PREPARATION, EXTRACTION ET PURIFICATION DES ECHANTILLONS

**IMPORTANT**: Analyser l'échantillon en duplicata (2 extractions en parallèle).

#### Préparation de l'échantillon

Homogénéiser l'échantillon de laboratoire en mélangeant l'échantillon entier à la main à plusieurs reprises.

Broyer finement 100 g ± 10 g d'échantillon.

*✍* Noter la référence de la balance utilisée.

*✍* Noter la masse de l'échantillon prélevé pour le broyage à 1 g près.

#### Extraction d'échantillons

Peser 5.0 g ± 0.1 g de l'échantillon broyé dans un tube à centrifuger de 50 ml.

*✍* Noter la référence de la balance utilisée.

*✍* Enregistrer le poids de l'échantillon prélevé.

À l'aide d'un cylindre gradué de 25 ml, ajouter 25 ml de la solution d'extraction 80% Méthanol / 20% Eau (dans un cylindre de 25 ml, ajouter 20 ml de méthanol AR, puis compléter à 25 ml avec de l'eau distillée).

Agiter avec vortex les tubes pendant 5 minutes.

Centrifuger à 5000 tour par minutes pendant 5 min.

Dans un cylindre de 100 ml, ajouter exactement 14 ml de l'extrait (avec micropipette de 1 – 5 ml, 5 + 5 + 4 ml). Compléter exactement jusqu'à 100 ml avec la solution tampon PBS.

#### **Convention :**

*✍* Indique les données à inscrire **impérativement** dans le cahier d'analyse

Indique les informations à noter sur l'étiquette des solutions

f Indique les formules à utiliser

**PURIFICATION DE L'EXTRAIT AVEC COLONNE IMMUNOAFFINITE**

- Mesurer précisément 50 ml de l'extrait tamponné dans une fiole de 50 ml ou un cylindre de 50 ml.
- Préparer la cuve d'extraction à vide, la pompe à vide et la trappe intermédiaire. Ouvrir la bague de control du vide de la cuve pour ne pas avoir de vide dans la cuve à ce stade. Placer la colonne immunoaffinité sur le haut de la cuve et ajouter un adaptateur et un réservoir (corps de seringue de 10 ou 20 ml). Vérifier que le haut de la cuve est bien hermétique (le bord en verre doit toucher le joint). ATTENTION : la colonne ne doit pas s'assécher pendant la préparation.
- Remplir le réservoir avec environ 10 à 20 ml d'extrait tamponné. Allumer la pompe et régler la pompe, la bague de control et les ouvertures sur le haut de la cuve afin que l'extrait passe à travers la colonne à 2 ml/min maximum (environ 1 goutte par seconde car 1 ml = 35 gouttes).
- Passer exactement 50 ml d'extrait tamponné. Ajusté la force du vide si nécessaire tout au long de la filtration afin que la filtration ne durent pas plus de 30-45 minutes.
- Dès que les 50 ml de l'extrait tamponné sont filtrés et avant que la colonne ne s'achève, ajouter environ 10 ml d'eau distillée dans le réservoir en 2 fois (environ 5 + 5 ml, 10 ml mesurer à l'aide d'un cylindre gradué de 10 ml). Laisser passer toute l'eau à travers la colonne et laisser la colonne s'assécher quelques minutes. Sécher les parois internes de la colonne délicatement avec un papier absorbant pour enlever toutes traces d'eau.
- Placer la colonne immunoaffinité dans une fiole ambrée de 5 ml.
- À l'aide d'une micropipette de 100 - 1000 µl, ajouter 0.5 ml de méthanol dans la colonne et laisser agir sur le gel pendant quelques secondes ou minutes (varie selon les colonnes). Quand le méthanol émerge du bas de la colonne, ajouter encore 0.5 ml de méthanol. Continuer à éluer la colonne avec le méthanol jusqu'à ce que 2.5 ml ait été ajouté.
- Seulement si nécessaire, utiliser une seringue d'air pour exercer une faible pression sur le haut de la colonne immunoaffinité pour assister l'élution.
- Compléter l'extrait final dans la fiole jaugée de 5 ml avec du méthanol (qualité HPLC).
- L'extrait final peut être conserver au réfrigérateur (4°C) dans l'obscurité pendant quelques jours.

**ANALYSE HPLC**Conditions de la HPLC:

Utiliser la méthode « méthode AFLATOXINES MARKUP ».

- |                            |                                                                                                                     |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - Phase Mobile :           | isocratique 56% Eau / 22% Acétonitrile / 22% Méthanol (tous les solvants de qualité HPLC) dans une seule bouteille. |
| - Débit :                  | 1 ml/min                                                                                                            |
| - Injection:               | 10 µl                                                                                                               |
| - Colonne :                | MYCOTOX ou C18 similaire                                                                                            |
| - Température colonne:     | 40 °C                                                                                                               |
| - Temps d'analyse :        | 16 minutes                                                                                                          |
| - Détecteur Fluorescence : | Excitation 365 nm – Emission 430 nm, sensitivity 1                                                                  |

**Convention :**

*✍* Indique les données à inscrire **impérativement** dans le cahier d'analyse

Indique les informations à noter sur l'étiquette des solutions

f Indique les formules à utiliser

Séquence d'injection

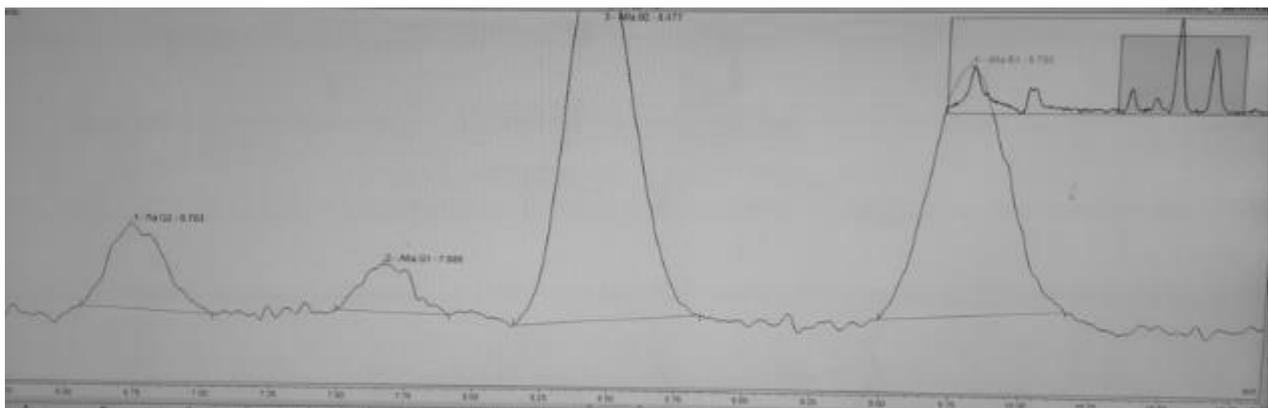
La séquence d'analyse suivante doit être suivie :

Solvant/blanc (Méthanol)
Niveau standard 1 (1 ppb)
Niveau standard 2 (5 ppb)
Niveau standard 3 (10 ppb)
Niveau standard 4 (20 ppb)
Échantillon 1 – duplicata 1
Échantillon 1 – duplicata 2
Échantillon 2 – duplicata 1
Échantillon 2 – duplicata 2
Échantillon 3 – duplicata 1
Échantillon 3 – duplicata 2
Niveau standard 1 (5 ppb)
...
6 injections d'échantillon maximum
...
Niveau standard 2 (1 ppb)
...
6 injections d'échantillon maximum
...
Niveau standard 1 (1 ppb)
Niveau standard 2 (5 ppb)
Niveau standard 3 (10 ppb)
Niveau standard 4 (20 ppb)

Intégration des pics de HPLC

Un exemple de chromatogramme est donné ci-dessous (pour 1 et 20 ppb). L'aire des pics et le temps de rétention peuvent varier, mais l'ordre des composés doit rester le même.

Aflatoxines	Temps de rétention (min)	Aire des pics (1 ppb)
<b>1 – G2</b>	6.7	650
<b>2 – G1</b>	7.6	350
<b>3 – B2</b>	8.4	3450
<b>4 – B1</b>	9.7	2450

**Convention :**

*℘* Indique les données à inscrire **impérativement** dans le cahier d'analyse

Indique les informations à noter sur l'étiquette des solutions

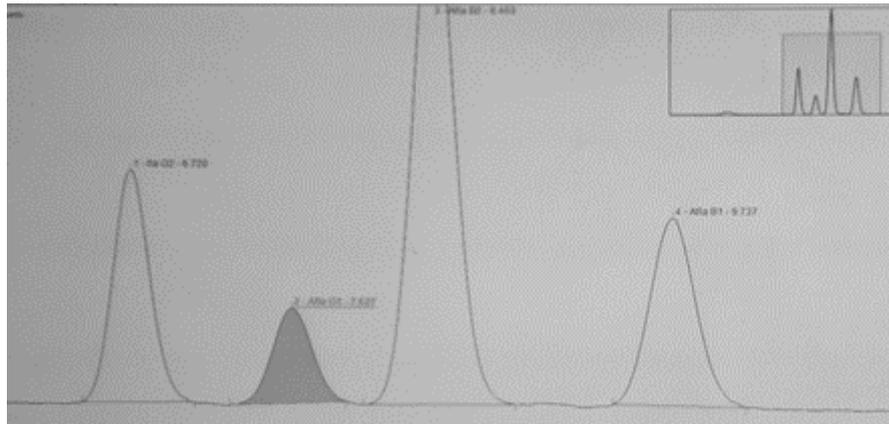
f Indique les formules à utiliser

**Convention :**

*✍* Indique les données à inscrire **impérativement** dans le cahier d'analyse

Indique les informations à noter sur l'étiquette des solutions

f Indique les formules à utiliser



Comme certains pics sont petits et pas toujours bien intégré automatiquement, il peut être nécessaire pour cette analyse d'annuler tous les pics détectés automatiquement et de réintégrer tous les pics d'aflatoxines manuellement de manière comparable (voir par exemple chromatogrammes ci-dessus).

Toute l'intégration des pics doit être vérifiée par un(e) analyste qualifié(e) avant d'être utilisée pour le calcul du résultat final.

La condition de performance du système suivante doit être remplie pour que le résultat soit valide:

- Courbe d'étalonnage :  $R^2 > 0,98$
- Points d'étalonnage : < écart de 20 % par rapport à la courbe d'étalonnage

## CALCUL DES RESULTATS

Une régression linéaire peut être obtenue en traçant la concentration d'aflatoxines dans les standards par rapport à l'aire des pics. Le calcul de la concentration finale peut être fait directement via le logiciel Chromeleon du système HPLC. Pour cela il faut insérer dans les colonnes du tableau de la séquence (voir aussi photo) les données suivantes :

*Weight* : poids exact de l'échantillon initial (environ 20 g), mettre 20 pour tous les standards (ou 5 g si méthode par agitation manuelle et centrifugation).

*Dilution* : 3.5714 (pour 5 ml d'élution final)

Le facteur de dilution est calculé de la façon suivante (tout en ml et g) :

$$1/ \frac{\text{Masse de l'échantillon} \times \text{Volume extrait} \times \text{Volume filtré dans la colonne immunoaffinité}}{\text{Volume solution d'extraction} \times \text{Volume final tampon} \times \text{Volume final de méthanol}}$$

### Convention :

*✍* Indique les données à inscrire **impérativement** dans le cahier d'analyse

Indique les informations à noter sur l'étiquette des solutions

f Indique les formules à utiliser

Soit pour volume final de 1 ml :

$$1/ \frac{20 \times 14 \times 50}{100 \times 100 \times 1} = 0.7143$$

Soit les facteurs de dilution suivants pour les volumes finaux usuels:

Volume final	Facteur de dilution
1 ml	0.7143
2 ml	1.4286
5 ml	3.5714

Weight	Dilution	Final
20.0000	1.0000	1.0000
20.0000	1.0000	1.0000
20.0000	1.0000	1.0000
20.0000	1.0000	1.0000
20.0000	1.0000	1.0000
20.0000	1.0000	1.0000
20.0000	1.0000	1.0000
20.0000	1.0000	1.0000
20.0202	3.5714	1.0000
20.0469	3.5714	1.0000
20.0530	3.5714	1.0000

## CONTROLE QUALITE

Chaque échantillon doit être analysé en duplica. La différence de résultat en duplica ne doit pas dépasser 40 % (100% = le résultat le plus élevé). Si ce critère n'est pas respecté, l'analyse doit être refaite (échantillons en duplica).

*✍ Enregistré la différence de résultat pour chaque analyse.*

Incorporer un échantillon de contrôle pour chaque analyse.

*✍ Enregistré le résultat de l'échantillon de control.*

### Convention :

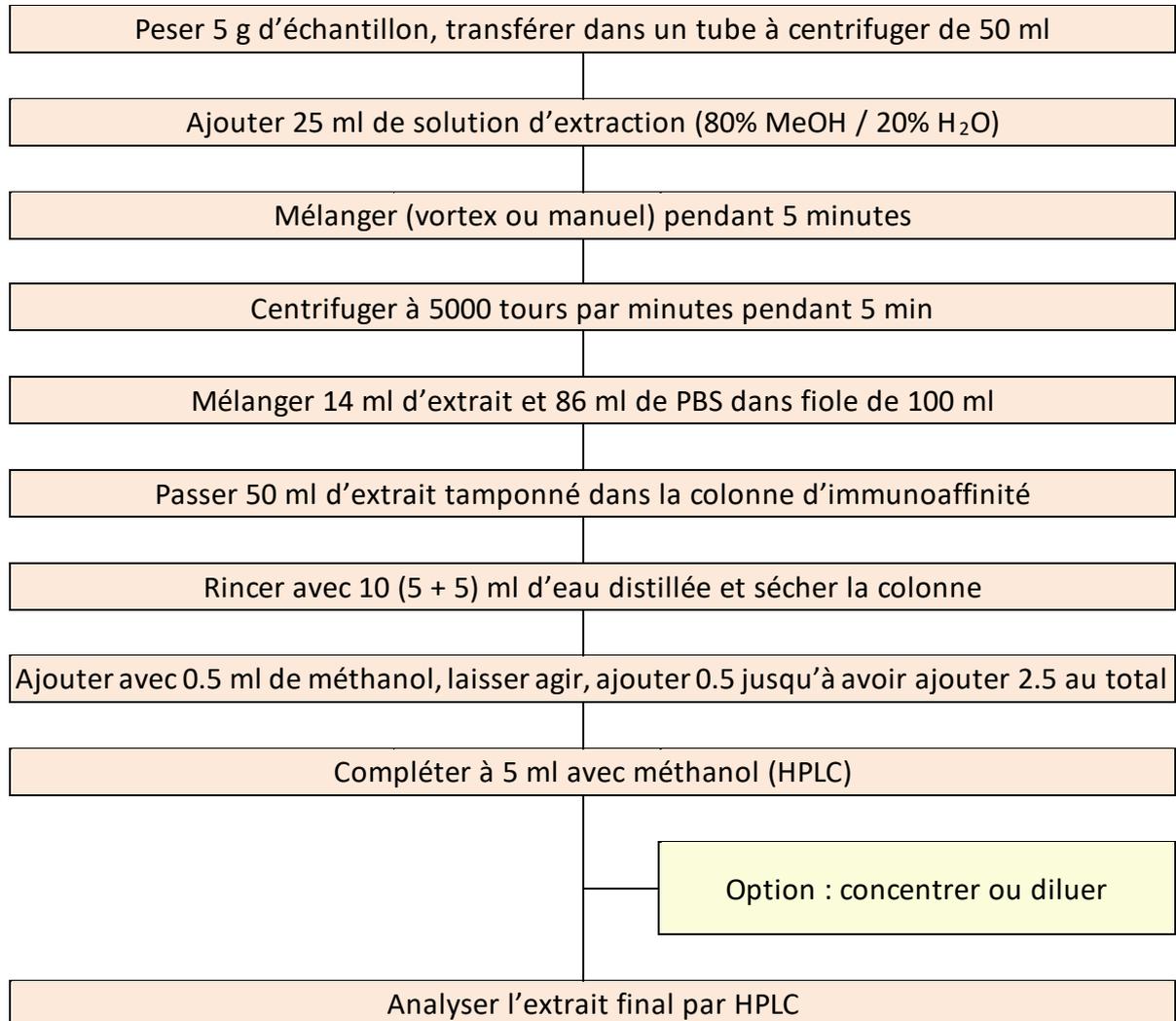
*✍ Indique les données à inscrire **impérativement** dans le cahier d'analyse*

*Indique les informations à noter sur l'étiquette des solutions*

*f Indique les formules à utiliser*

## ORGANIGRAMME DE LA PROCEDURE

Note : analyses en dupliqua

**Convention :**

*✍* Indique les données à inscrire **impérativement** dans le cahier d'analyse

Indique les informations à noter sur l'étiquette des solutions

f Indique les formules à utiliser