

ARRETES, DECISIONS ET AVIS

MINISTERE DU COMMERCE

Arrêté du 19 Ramadhan 1427 correspondant au 11 octobre 2006 rendant obligatoire la méthode de dosage de l'aflatoxine B₁ et la somme des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés.

— — — —

Le ministre du commerce ;

Vu le décret présidentiel n° 06-176 du 27 Rabie Ethani 1427 correspondant au 25 mai 2006 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-467 du 8 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 10 décembre 2005 fixant les conditions et les modalités de contrôle aux frontières de la conformité des produits importés ;

Vu l'arrêté du 14 Joumada Ethania 1416 correspondant au 7 novembre 1995 relatif aux spécifications techniques et aux règles applicables à l'importation des produits alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire une méthode de dosage de l'aflatoxine B₁ et la somme des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés.

Art. 2. — Pour le dosage de l'aflatoxine B₁ et la somme des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode décrite en annexe.

Cette méthode doit être également utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 19 Ramadhan 1427 correspondant au 11 octobre 2006 .

Lachemi DJAABOUBE.

ANNEXE

METHODE DE DOSAGE DE L'AFLATOXINE B₁ ET DE LA SOMME DES AFLATOXINES B₁, B₂, G₁ et G₂ DANS LES CEREALES, LES FRUITS A COQUE ET LES PRODUITS DERIVES

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode est applicable pour la détermination des teneurs en aflatoxines supérieures à 8 µg/kg.

2. PRINCIPE

L'échantillon pour essai est extrait avec un mélange d'eau et de méthanol. L'extrait d'échantillon est filtré, dilué avec de l'eau et déposé sur une colonne d'immunoaffinité contenant des anticorps spécifiques des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂. Les aflatoxines sont isolées, purifiées et concentrées sur la colonne et libérées des anticorps avec du méthanol. Les aflatoxines sont quantifiées par chromatographie liquide haute performance en phase inversée (CLHP) avec détection par fluorescence et dérivation post-colonne à l'iode.

3. REACTIFS

3.1 Généralités

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

3.2 Chlorure de sodium.

3.3 Iode sous forme de cristaux.

3.4 Aflatoxines, sous forme de cristaux ou de film, en ampoules.

— protéger suffisamment de la lumière du jour le laboratoire où sont effectuées les analyses ;

— protéger de la lumière les solutions d'aflatoxines (les conserver dans l'obscurité, utiliser une feuille d'aluminium ou de la verrerie ambrée).

3.5 Acétonitrile, de qualité CLHP.

3.6 Méthanol, de qualité analytique.

3.7 Méthanol, pour CLHP.

3.8 Toluène

3.9 Solvant d'extraction

Mélanger 7 parties en volume de méthanol (3.6) avec 3 parties en volume d'eau.

3.10 Colonne d'immunoaffinité

La colonne d'immunoaffinité (IA) contient des anticorps dirigés contre les aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂. La capacité minimale de liaison de la colonne d'immunoaffinité ne doit pas être inférieure à 100 ng d'aflatoxine B₁ et la récupération pour les aflatoxines B₁, B₂ et G₁ ne doit pas être inférieure à 80 %, et à 60 % pour l'aflatoxine G₂, lorsqu'on applique sur la colonne d'IA une solution étalon de 5 ng de chaque toxine dans 15 ml d'un mélange de méthanol et d'eau (une partie en volume de méthanol pour 1 + 3,4 parties en volume d'eau). Il convient que la colonne d'IA comprenne un réservoir de solvant approprié, par exemple une seringue avec un adaptateur.

3.11 Phase mobile

Mélanger 3 parties en volume d'eau avec 1 partie en volume d'acétonitrile (3.5) et 1 partie en volume de méthanol (3.7). Dégazer la solution avant de l'utiliser.

3.12 Réactif de dérivation post-colonne

Dissoudre 100 mg d'iode (3.3) dans 2 ml de méthanol (3.6). Ajouter 200 ml d'eau. Agiter pendant 1 heure puis filtrer avec un filtre de 0,45 µm de porosité (4.8). Préparer la solution la semaine même de l'utilisation et la stocker dans l'obscurité ou dans un flacon en verre brun. Agiter pendant 10 min. avant utilisation.

3.13 Mélange de toluène/acétonitrile

Mélanger 98 parties en volume de toluène (3.8) avec 2 parties en volume d'acétonitrile (3.5).

3.14 Solutions mères d'aflatoxines

Dissoudre de l'aflatoxine B₁, B₂, G₁ et G₂ séparément dans le mélange toluène/acétonitrile (3.13) afin d'obtenir des solutions séparées contenant 10 µg/ml.

Pour déterminer la concentration exacte d'aflatoxine dans chaque solution mère, enregistrer le spectre d'absorption entre une longueur d'onde de 330 nm et 370 nm dans les cuves en quartz de 1 cm (4.8) d'un spectromètre, le mélange toluène/acétonitrile (3.13) étant la cuve de référence.

Calculer la concentration massique de chaque aflatoxine, ρ_i exprimée en microgrammes par millilitre, à l'aide de l'équation (1) ci – après :

$$\rho_i = \frac{A_{\max} \times M_i \times 100}{\varepsilon_i \times d}$$

où :

A_{max} : est l'absorbance déterminée au maximum du spectre d'absorption ;

M_i : est la masse moléculaire relative de chaque aflatoxine, en grammes par mole ;

ε_i : est l'absorptivité molaire de chaque aflatoxine dans le mélange toluène/acétonitrile (3.13), en mètres carrés par mole ;

d : est le trajet optique de la cellule, en centimètres.

M_i et ε_i : sont exprimés dans le tableau (1) ci-après :

Aflatoxine	M _i g/mol	ε _i m ² /mol
B ₁	312	1930
B ₂	314	2040
G ₁	328	1660
G ₂	330	1790

Tableau 1 - Masse moléculaire relative et absorptivité molaire des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ (mélange de toluène et d'acétonitrile).

3.15 Solution mère d'aflatoxines mélangées

Préparer une solution mère contenant 500 ng/l d'aflatoxine B₁, 125 ng/l d'aflatoxine B₂, 250 ng/l d'aflatoxine G₁ et 125 ng/l d'aflatoxine G₂ dans le mélange toluène/acétonitrile (3.13). Lorsque la solution doit être stockée, peser le récipient et enregistrer toute modification quand la solution doit être utilisée. Envelopper soigneusement le récipient avec une feuille d'aluminium et stocker à environ 4 °C.

3.16. Solutions étalons d'aflatoxines mélangées

Transvaser chaque quantité spécifiée dans le tableau (2) de la solution mère d'aflatoxines mélangées (3.15) dans une série de trois fioles jaugées de 2 ml (4 °C).

Laisser les solutions s'évaporer à sec sous un flux d'azote à température ambiante. Ajouter 1 ml de méthanol dans chaque récipient, mélanger, diluer jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger à nouveau. Préparer la solution le jour de l'utilisation.

Solution étalon	Prélevé sur la solution mère (µl) (3.15)	Concentration massique ng/ml			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1	60	15,0	3,75	7,50	3,75
2	40	10,0	2,50	5,00	2,50
3	20	5,00	1,25	2,50	1,25
4	10	2,50	0,625	1,25	0,625

Tableau 2 - Préparation des solutions étalons

Les valeurs indiquées dans ce tableau sont données à titre indicatif. La gamme étalon couvre les concentrations des échantillons.

3.17 Acide sulfurique, c(H₂SO₄) = 2 mol/l

4. APPAREILLAGE

4.1 Appareillage courant de laboratoire

La verrerie de laboratoire entrant en contact avec les solutions aqueuses d'aflatoxines doit être plongée dans de l'acide sulfurique (2 mol/l) pendant plusieurs heures, puis bien rincée à l'eau (3 fois par exemple) afin de retirer toute trace d'acide. Vérifier (3.16) l'absence d'acide avec du papier pH.

- Ce traitement est nécessaire car l'utilisation de verrerie lavée sans acide peut provoquer des pertes d'aflatoxines.

Dans la pratique, ce traitement est nécessaire pour les ballons à fond rond, les fioles jaugées, les éprouvettes graduées, les flacons ou tubes pour solutions d'étalonnage et extraits finaux (notamment les fioles des échantillonneurs automatiques) et les pipettes Pasteur lorsqu'elles sont utilisées pour transvaser des solutions d'étalonnage ou des extraits.

4.2 Broyeur, comprenant un bol de 500 ml et un couvercle.

4.3 Papier-filtre plissé, par exemple de 24 cm de diamètre.

4.4 Papier-filtre à microfibres de verre, par exemple de 11 cm de diamètre.

4.5 Fioles jaugées, par exemple de 2 ml.

4.6 Spectromètre, pouvant balayer des longueurs d'ondes comprises entre 200 nm et 400 nm.

4.7 Cuves en quartz, avec un trajet optique de 1 cm et sans absorption sensible dans les longueurs d'ondes comprises entre 300 nm et 370 nm.

4.8 Filtre à membrane pour les solutions aqueuses, en polytétrafluoroéthylène (PTFE), de 4 mm de diamètre et de 0,45 µm de porosité.

4.9 Appareillage CLHP, se composant des éléments suivants :

4.9.1 Pompe de chromatographie liquide, adaptée pour un débit de 1 ml/min.

4.9.2 Système d'injection, vanne d'injection munie d'une boucle de 50 µl ou système équivalent.

4.9.3 Colonne analytique de séparation en phase inversée, par exemple C18, garantissant l'obtention d'une résolution des pics d'aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ à partir de la ligne de base, ces pics étant bien distincts des autres pics.

- longueur de 250 mm ;
- diamètre intérieur de 4,6 mm ;
- particules sphériques de 5 µm.

Il est possible d'utiliser des colonnes plus courtes.

4.9.4 Système de dérivation post-colonne, comprenant une deuxième pompe sans impulsion (non péristaltique) et une pièce en T sans volume mort, avec un tube en polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou en acier inoxydable d'une longueur comprise entre 3000 mm et 5000 mm et d'un diamètre intérieur de 0,5 mm, ainsi qu'un bain de chauffage ou un réacteur de post-colonne pour la réaction à l'iode.

4.10 Détecteur de fluorescence, avec une longueur d'onde d'excitation réglée à 365 nm et une longueur d'onde d'émission à 435 nm (pour les instruments à filtre : longueur d'onde d'émission > 400 nm). Il doit être possible de détecter au minimum 0,05 ng d'aflatoxine B₁ par volume d'injection (en l'occurrence 50 µl).

5. MODE OPERATOIRE

5.1 Extraction

Peser 25 g, à 10 mg près, d'échantillon pour essai homogénéisé dans le bol du broyeur, ajouté 5 g de chlorure de sodium (3.2) et 125 ml de solvant d'extraction (3.9), puis homogénéiser au moyen d'un mélangeur pendant 2 minutes à grande vitesse.

Il convient de vérifier que la vitesse de mélange ne diminue pas l'efficacité de l'extraction.

Filtrer avec un papier-filtre plissé (4.3). Introduire au moyen d'une pipette 15 ml (V₂) du filtrat dans une fiole conique de dimensions appropriées. Ajouter 30 ml d'eau, boucher la fiole et mélanger. Avant de commencer la chromatographie sur colonne d'immunoaffinité, filtrer l'extrait dilué sur un papier-filtre à microfibres de verre (4.4). Il convient que le filtrat (V₃) soit limpide ; dans le cas contraire, filtrer à nouveau. Traiter immédiatement selon (5.2).

5.2 Purification

Préparer la colonne d'immunoaffinité puis procéder à la purification. A l'aide d'une pipette, déposer 15 ml (V₄) du deuxième filtrat (V₃) dans le réservoir de solvant de la colonne (3.10). Recueillir l'éluat de méthanol ou d'acétonitrile (en fonction du produit) dans la fiole jaugée de 2 ml (4.5). Diluer jusqu'au trait avec de l'eau (V₅). Mélanger, puis procéder conformément à (5.3).

Pour leur analyse par CLHP, les solutions échantillons et les solutions étalons doivent contenir le même solvant ou le même mélange de solvants.

- Les méthodes de dépôt sur les colonnes d'immunoaffinité, le lavage de la colonne et l'éluant variant légèrement d'un fabricant de colonne à l'autre, il convient de suivre de façon précise les instructions spécifiques fournies avec les colonnes.

Veiller à ne pas dépasser la capacité maximale de la colonne.

5.3 Conditions d'emploi de la CLHP

Raccorder l'orifice de sortie de la colonne de séparation à l'un des bars en T (4.9.4) à l'aide d'un petit morceau de tube d'un diamètre intérieur de 0,25 mm par exemple. Raccorder au deuxième bras du T l'orifice de sortie de la deuxième pompe sans pulsion devant délivrer le réactif pour la dérivation post-colonne. Raccorder l'une des

extrémités d'un serpentin en PTFE ou en acier inoxydable (4.9.4) au troisième bras du T, et l'autre extrémité au détecteur. A l'aide d'une étuve ou d'un bain-marie, maintenir le serpentin à une température de réaction de 70°C.

Les réglages suivants ont été jugés appropriés lors de l'utilisation de la colonne spécifiée en (4.9.3) :

- débit pour la phase mobile (colonne) : 1,0 ml/min ;
- débit du réactif post-colonne : 0,3 ml/min ;
- volume injecté : 50 µl.

Laisser le système fonctionner pendant 10 min afin de le stabiliser. En cas d'utilisation d'un intégrateur, régler la sensibilité du détecteur de fluorescence ou de l'intégrateur afin d'obtenir un rapport signal/bruit de 5/1 pour 0,125 ng d'aflatoxine G₂ dans 50 µl.

En cas d'utilisation d'un enregistreur sur papier, régler la commande du détecteur de fluorescence afin d'obtenir une échelle de déplacement de 30 % à 40 % avec 0,125 ng d'aflatoxine G₂ dans 50 µl. Faire passer le deuxième filtrat (V₃) dans la colonne, laver cette dernière conformément aux instructions du constructeur et éliminer les éluats.

5.4 Identification

Identifier chaque pic d'aflatoxine du chromatogramme provenant de l'analyse de l'échantillon pour essai, en comparant les temps de rétention à ceux des étalons de référence correspondants.

5.5 Courbe d'étalonnage

Préparer la courbe d'étalonnage pour chaque aflatoxine en injectant 50 µl des solutions étalons 1, 2, 3 et 4 (tableau 2).

5.6 Dosage

La détermination quantitative se fait selon la méthode de l'étalonnage externe avec intégration de la surface du pic ou mesure de la hauteur du pic qui est ensuite comparée à la valeur correspondante de la substance étalon.

Injecter par volume de 50 µl le mélange étalon dans la boucle en suivant les instructions du fabricant de l'injecteur. L'élution des aflatoxines se fait dans l'ordre G₂, G₁, B₂, B₁, avec des temps de rétention respectifs d'environ 6 min, 8 min, 9 min et 11 min et il convient que les pics soient bien résolus. Le cas échéant, ajuster les temps de rétention en modifiant la concentration en méthanol du solvant de la phase mobile (3.11).

Injecter 50 µl (V₆) d'extrait d'échantillon purifié (5.2) dans la boucle d'injection.

6. CALCUL DES RESULTATS

Calculer la masse de l'échantillon pour essai m_t, en grammes, présent dans la fraction du deuxième filtrat prélevé pour la colonne d'IAC (V₄) à l'aide de l'équation (2) ci-après :

$$m_t = m_o \frac{V_2 \times V_4}{V_1 \times V_3}$$

où :

m_o : est la masse de la prise d'essai (5.1), en grammes (m_o = 25 g) ;

V₁ : est le volume total du filtrat (5.1), en millilitres (V₁ = 125 ml) ;

V₂ : est le volume de la fraction du premier filtrat (5.1), en millilitres (V₂ = 15 ml) ;

V₃ : est le volume total du deuxième filtrat (5.1), en millilitres (V₃ = 45 ml) ;

V₄ : est le volume de la fraction du deuxième filtrat (5.2), en millilitres (V₄ = 15 ml) ;

Calculer la fraction massique de chaque aflatoxine, w_i, en microgrammes par kilogramme d'échantillon, à l'aide de l'équation (3) ci-après (méthode d'étalonnage externe) :

$$w_i = \frac{V_5 \times m_i}{V_6 \times m_t}$$

où :

V₅ : est le volume de l'éluat (5.2), en microlitres (V₅ = 2000 µl) ;

V₆ : est le volume de l'éluat injecté (5.6), en microlitres (V₆ = 50 µl) ;

m_i : est la masse, en nanogrammes, de chaque aflatoxine ; i présente dans le volume d'injection, correspondant à la surface ou à la hauteur mesurée des pics relevée sur la courbe d'étalonnage ;

m_t : est la masse de l'échantillon pour essai, en grammes, présent dans la fraction du deuxième filtrat prélevé pour la colonne d'IC (V₄) (selon l'équation 2).

Ajouter les fractions massiques des quatre aflatoxines pour obtenir la fraction massique de la somme des aflatoxines.

7. REPETABILITE

La différence absolue entre deux résultats d'essai unique sur un matériau d'essai identique, obtenus par un opérateur utilisant le même appareillage, dans l'intervalle de temps le plus court possible, ne dépassera pas la limite de répétitivité (r) dans plus de 5 % des cas.

8. REPRODUCTIBILITE

La différence absolue entre deux résultats d'essai unique et portant sur un matériau d'essai identique, entre deux laboratoires, ne dépassera pas la limite de reproductibilité (R) dans plus de 5 % des cas obtenus.