

PROTOCOLES D'ANALYSE DES MYCOTOXINES DANS LES ALIMENTS

PLAN

INTRODUCTION

I- METHODES DE DETECTIONS ET DE DOSAGE DES MYCOTOXINES

II- PROTOCOLES D'ANALYSE

A- EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE ET PURIFICATION LIQUIDE-LIQUIDE

- Procédure d'analyse simultanée d'AFB1, CIT et OTA

B-EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE ET PURIFICATION IMMUNO-AFFINITE

1- Protocole d'analyse de l'Aflatoxine M1 dans le lait

2- Protocole d'analyse de l'Aflatoxine B1, B2, G1, G2 dans le figuier les pistaches, le paprika, cacahuètes ou arachides

3-Protocole d'analyse de l'Ochratoxine A dans l'orge et le café

4-Protocole d'analyse de la Patulin, dans le jus et la purée de pomme

I-METHODES DE DETECTIONS ET DE DOSAGE DES MYCOTOXINES

A- LES METHODES BIOLOGIQUES

Utiles pour déterminer la DL_{50}

1- *test sur caneton d'un jour*

Consiste à introduire directement l'extrait dans le gésier. la DL_{50} afla B1 et M1 est 0,36 et 0,32 ng/kg.

Aflatoxines	B1	B2	G1	G2	M1
DL50	0,025	0,125	1,1	2,7	0,2

2- *test d'un embryon de poulet*

Avantages :+ sensible, reproductible, facilité.

3- *Test sur les bactéries*

Teneur de 1 μ g.

I-METHODES DE DETECTIONS ET DE DOSAGE DES MYCOTOXINES

4-Test sur les larves de crustacés

0,5 μ g/mL d'afla B1 détruisent 60% des larves.

1 μ g/mL détruisent 90% des larves.

5- Test sur les insectes

6- Test sur végétaux

I-METHODES DE DETECTIONS ET DE DOSAGE DES MYCOTOXINES

B- TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

- **La méthode de la mini colonne**

Gel de silice

La lecture : UV 365- 366 nm Chromatocuve

fluorescence	Concentration (ppm)
Bleu très foncé	>0,1
Bleu foncé	0,05 à 0,1
Bleu clair	0,02 à 0,05
Bleu pâle	0,01 à 0,02

I-METHODES DE DETECTIONS ET DE DOSAGE DES MYCOTOXINES

C- CCM

⊙ La méthode de Control Branch (CB).

Gel de silice

Solvant de migration : chloroforme acétone

Sensibilité 5 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

D- H P L C

1- Dosage par chromatographie liquide et détection spectrophotométrique UV à 362 nm.

Silice de 5 μm

Afla B1 B2 G1 G2

Temps d'éluion 15mn

Débit 1mL/mn

I-METHODES DE DETECTIONS ET DE DOSAGE DES MYCOTOXINES

2- Dosage par chromatographie liquide et détection spectrofluorimétrique.

- Détection fluorimétrique des aflatoxines en milieu liquide.
Aflatoxines B, G, M 360 – 365 nm max 415 nm.
- Détection fluorimétrique des aflatoxines absorbées sur cellule garnie de silice.

Silice fine granulométrique

separation	detection	sensibilité	Reproductibilité CV %	Observation
CCM	Visuelle ou densitométrique	5 ng (2,5 ppb)	20-80	-
HPLC	Spectrophotométrique UV à 362 nm	5 ng (2,5 ppb)	5- 10	-
HPLC	Spectrophotométrique cellule garnie de silice	0,1 ng (0,05ppb)	5-10	Grande selectivité

I-METHODES DE DETECTIONS ET DE DOSAGE DES MYCOTOXINES

E-METHODES IMMUNOCHIMIQUES DE DOSAGE DES AFLATOXINES

1-Dosage immunoenzymatique : Elisa (enzyme linked)

Résultat global B et G.

Sensibilité : >20ng/g

2-Chromatographie d'immuno-affinité suivie du dosage
HPLC ou CCM

F- METHODES DE COUPLAGE AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE

1- HPLC-SM

ABRAMSON 1987 OTA dans l'orge

Seuil 0,5ng /g.

2- CPG-MS

II-PROTOCOLE D'ANALYSE DES MYCOTOXINES

A- EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE ET PURIFICATION LIQUIDE-LIQUIDE

1- Procédure d'analyse simultanée d'AFB1, CIT et OTA

a-Extraction des toxines de riz

- ⊙ 20g de riz finement broyés sont extraits avec 100 ml du mélange acétonitrile-chlorure de potassium 4%.
- ⊙ Ce mélange ajusté à pH 1,5 avec de l'acide chlorhydrique, est agité sur un agitateur orbital pendant 20 mn.
- ⊙ Le broyat est filtré sous vide sur un filtre de papier Whatman No.4.

1- Procédure d'analyse simultanée d'AFB1, CIT et OTA

b- Purification

- ⊙ Le filtrat est dégraissé grasse à l'hexane. 100 ml sont ajoutés au filtrat et le mélange est agité pendant 10 mn.
- ⊙ La phase supérieure (hexane) est éliminée. Cette opération est répétée une seconde fois en ajoutant 50 ml de hexane.
- ⊙ La phase inférieure (aqueuse) est récupérée. Les toxines sont extraites par 50 ml de chloroforme.
- ⊙ Après agitation, la phase inférieure (chloroforme) est récupérée. La phase aqueuse est ré-extraite 2 fois par du chloroforme (2x 25 ml).
- ⊙ Les phases chloroformiques sont groupées. Le chloroforme est éliminé à 40°C sous vide dans un évaporateur rotatif

1- Procédure d'analyse simultanée d'AFB1, CIT et OTA

b- purification

- ◎ 2 ml de méthanol sont ajoutés au résidu et la solution est soniquée puis filtré sur papier filtre.
- ◎ Finalement, le filtrat est séché sous l'atmosphère de l'azote.
- ◎ Le résidu est dissous dans 500µl de méthanol.
- ◎ Cette solution servira au dosage par HPLC.

1- Procédure d'analyse simultanée d'AFB1, CIT et OTA

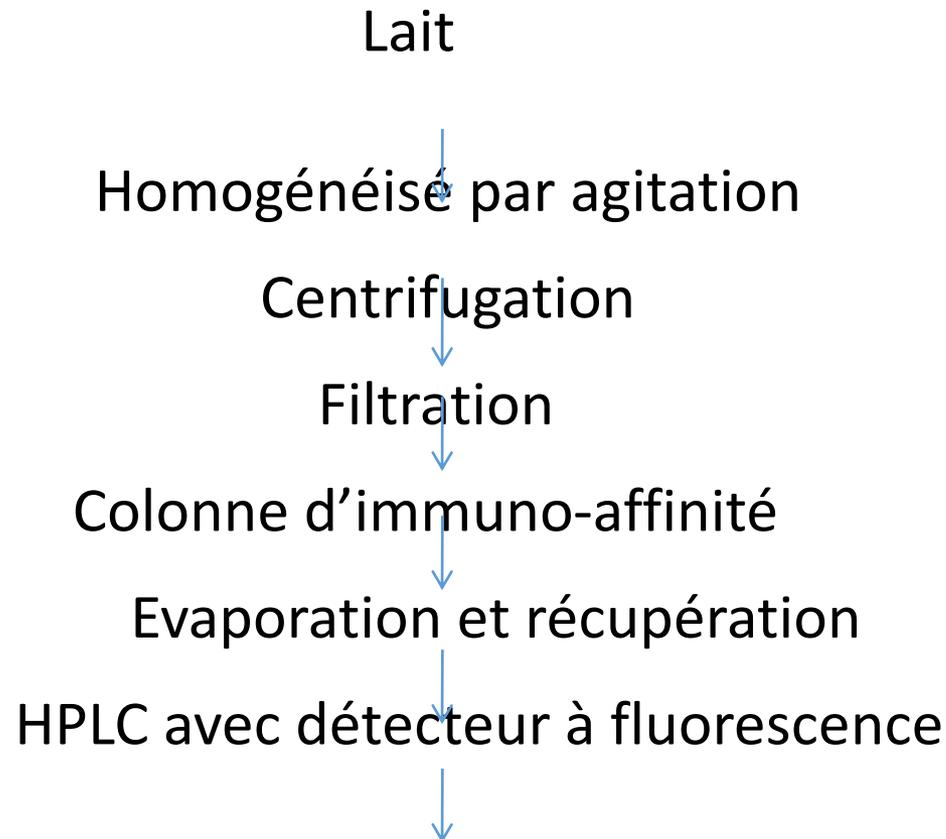
c- Analyse sur HPLC

- Un chromatographe équipé d'une boucle d'injecteur de 20 μ l, d'une colonne (3 μ m C18, 0.46x 25 cm) et d'un détecteur fluorimétrique, est utilisé.
- La phase mobile H₃PO₄/acétonitrile/ propanol-2 est utilisée en mode isocratique avec un débit d'écoulement de 0,5 ml/min ; les temps d'élution sont 14 mn (AFB1), 28 mn (CIT) et 56 min (OTA)

B- EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE ET PURIFICATION IMMUNO-AFFINITE

- La communauté européenne à travers le 4eme appel d'offre appelé mesure program essay a financé un projet de validation d'analyse des mycotoxines suivantes :
- Aflatoxines B1, B2, G1, G2
- Aflatoxine M1
- Ochratoxine A
- Patulin

1-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE M1 DANS LE LAIT



1-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE M1 DANS LE LAIT

a- Extraction

- ⊙ Après avoir fait sortir l'échantillon du congélateur, il faut le laisser lentement se décongeler
- ⊙ Après une agitation douce à la main l'échantillon est placé dans un bain marie (37°C) pendant 10mn
- ⊙ Rendre l'échantillon homogène par agitation magnétique pendant quelques minutes
- ⊙ Transférer le lait dans un tube à centrifuger, puis centrifugation pendant 15mn .Après centrifugation la couche de graisse est éliminée
- ⊙ Filtrer soigneusement l'échantillon et en prélever 50ml (pipette 50 ml)
- ⊙ Déposer cette quantité sur la colonne(en respectant le débit de 2 à 3 ml par mn

1-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE M1 DANS LE LAIT

a- extraction

- ⊙ Après passage du lait la colonne doit être immédiatement lavé car elle ne doit pas être à sec (faire passer 20 ml d'eau à un débit lent et régulier, la colonne est ensuite asséché en soufflant de l'air par une seringue ou sous vide pendant quelques secondes)
- ⊙ On peut maintenant éluer l'aflatoxine M1 dans un tube conique ou pilulier placé à la fin de la colonne (précision : on attache toujours une seringue propre au sommet de la colonne) avec 4 ml d'acétonitrile qui doit rester en contact avec la colonne pendant au moins 1 mn
- ⊙ On procède à l'élution soit à l'aide d'une seringue soit à l'aide d'une pompe

1-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE M1 DANS LE LAIT

a-extraction

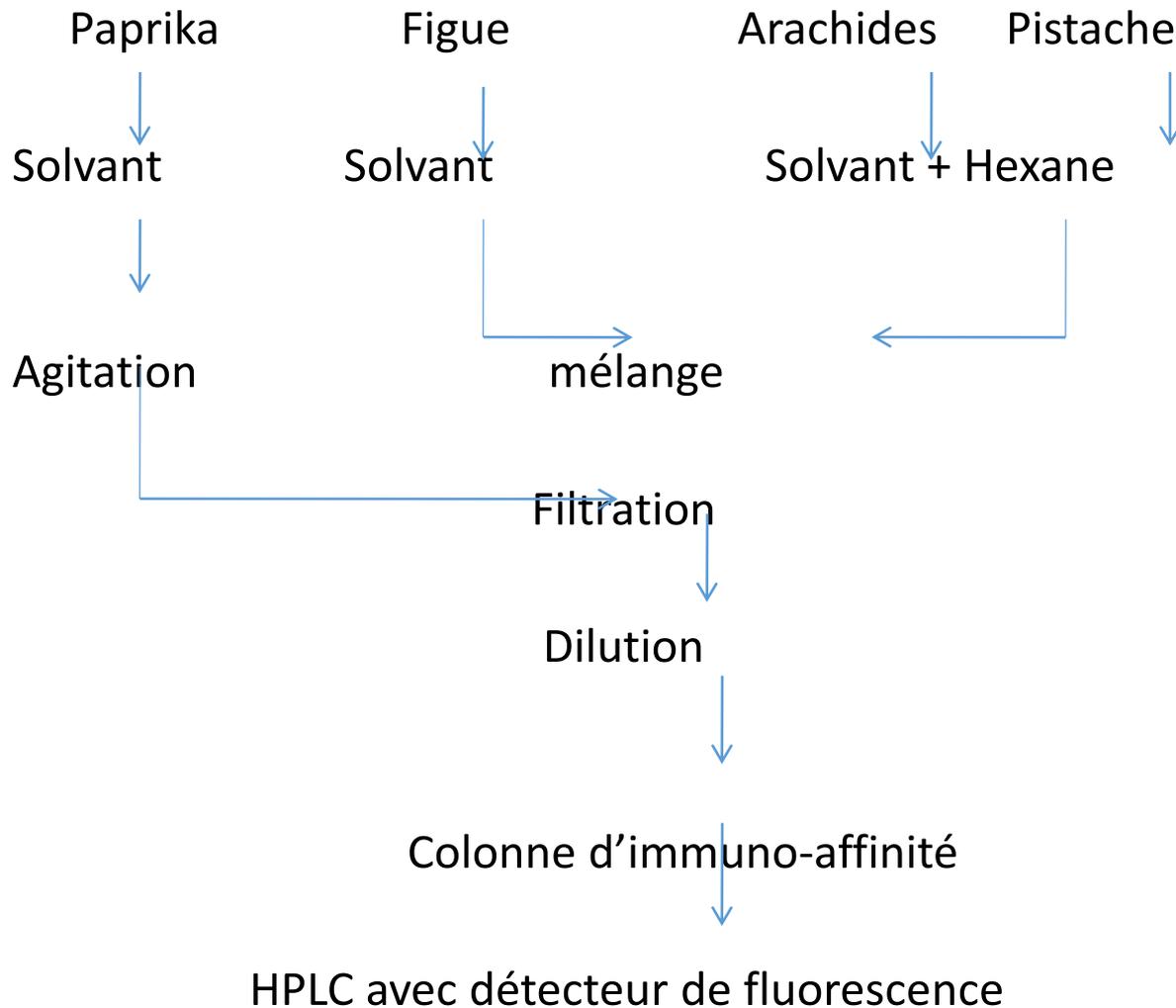
- L'acétonitrile est ensuite évaporé à sec sous un courant modéré d'azote (pour accélérer l'évaporation les tubes peuvent être chauffé à une température n'excédant pas 40°C)
- L'aflatoxine M1 est reprise dans un volume précisément mesuré de phase mobile pour CLHP (ici on reprend pour 200 microlitres de phase mobile)

1-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE M1 DANS LE LAIT

b- analyse

- On agite vigoureusement pour assurer une reprise complète du résidu
- L'analyse par HPLC est effectuée (on observe un pic bien individualisé sur le chromatogramme)

2- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE B1, B2, G1, G2 DANS LE FIGUIER LES PISTACHES, LE PAPRIKA, CACAHUETES OU ARACHIDES



2- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE B1, B2, G1, G2 DANS LE FIGUIER LES PISTACHES, LE PAPRIKA, CACAHUETES OU ARACHIDES

L'analyse nécessitera une dérivation post colonne

a- extraction

- ⊙ Les échantillons à analyser son amener température ambiante. Pendant ce temps on pèse 5g de Na Cl.
- ⊙ Avant de prélever le beurre d'arachide ou de pistache il faut agiter doucement les flacons pour redissoudre d'éventuels dépôts de graisse
- ⊙ On pèse 50g d'échantillon qu'on ajoute au Na Cl (le poids exact devra être noté)
- ⊙ L'échantillon de figue est dilué dans 300 ml de méthanol et d'eau

2- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE B1, B2, G1, G2 DANS LE FIGUIER LES PISTACHES, LE PAPRIKA, CACAHUETES OU ARACHIDES

a- extraction

- L'ensemble est broyé à grande vitesse pendant 3mn dans un ULTRA TURAX ou WARIN BLINDER, aucun dépôt de graisse ne doit rester après le broyage
- Les échantillons de beurre d'arachide et patte de pistache sont extraits en présence de 200ml méthanol-eau+100ml hexane
- Les échantillons sont de nouveau mixés jusqu'à obtenir un mélange lisse
- Le paprika est dilué dans 300ml de mélange éthanol-eau puis secoué à la main pendant quelques secondes puis agité à l'aide d'un agitateur mécanique réglé sur une vitesse moyenne pendant 30mn
- En fin d'étape d'extraction tous les échantillons seront filtrés sur papier filtre plissé

2- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE B1, B2, G1, G2 DANS LE FIGUIER LES PISTACHES, LE PAPRIKA, CACAHUETES OU ARACHIDES

b- purification

- ⊙ On prépare la colonne d'immuno-affinité
- ⊙ On prélève 10 ml de filtrat clarifié que l'on transfère dans une éprouvette
- ⊙ On ajoute 60 ml d'un tampon phosphate PBS que l'on mélange
- ⊙ L'échantillon est versé dans le corps d'une seringue attaché au sommet de la colonne, on peut aussi mélanger le filtrat et le tampon directement dans le corps de la seringue en agitant à l'aide d'une spatule préalablement lavé avec un peu de tampon PBS
- ⊙ Le débit de la colonne ne doit dépasser 5 ml/mn, de telle façon que la totalité de l'extrait ne passe en moins de 14mn

2- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE B1, B2, G1, G2 DANS LE FIGUIER LES PISTACHES, LE PAPRIKA, CACAHUETES OU ARACHIDES

b- purification

- ⊙ Après le dépôt de l'extrait la colonne est lavée avec 15 ml d'eau puis asséché en poussant l'air dans la colonne à l'aide de la seringue ou sous vide
- ⊙ Les eaux de lavage sont éliminées, les aflatoxines sont élué de la colonne en 2 étapes :
- ⊙ On fait passer par gravité 0,5 ml de méthanol, l'éluât est alors collecté dans une fiole graduée. 1mn plus tard on fait passer 0,75ml de méthanol à travers la colonne en appliquant une pression et en poussant l'air à travers la colonne.
- ⊙ L'éluat est collecté dans la même fiole graduée. Le contenu de la fiole est ajusté au volume requis avec de l'eau. Si la solution est claire on peut l'analyser telle quelle, si non on filtre la solution sur des petits filtres jetable avant analyse par CHLP.

2- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'AFLATOXINE B1, B2, G1, G2 DANS LE FIGUIER LES PISTACHES, LE PAPRIKA, CACAHUETES OU ARACHIDES

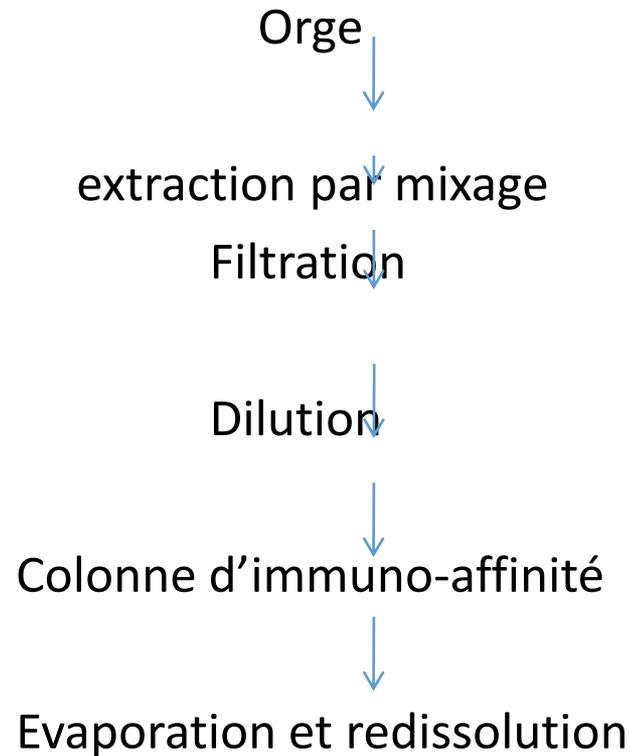
c- analyse par CLHP

- ⊙ La méthode de dosage comprend une méthode de dérivation post colonne brome pour faciliter la détection des aflatoxines en renforçant leur fluorescence. La dérivation au brome peut se réaliser soit en utilisant un réactif PBPB soit en générant du brome par électrochimie
- ⊙ Appariation de 4 pics sans interférence avec une très bonne résolution

3-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

Il ya 2 protocoles d'analyses, pour l'orge et l'autre pour le café

Orge



HPLC à détection à fluorescence

3-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

a- extraction

- ⊙ Après avoir sorti du congélateur l'échantillon d'orge, on le laisse revenir à température ambiante. Le sachet est ensuite ouvert et le contenu est homogénéisé par agitation pendant au moins une minute.
- ⊙ On pèse environ 25g d'orge (le poids exact doit être noté) ou 100ml d'un mélange acétonitrile-eau sont ajoutés
- ⊙ Le couvercle est scellé avec du ruban adhésif afin d'éviter toute fuite durant le broyage
- ⊙ L'ensemble est broyé à grande vitesse pendant 3mn
- ⊙ Le broyat est filtré sur un papier filtre plissé et recueilli dans un tube conique

3-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

b- purification

- ⊙ à l'aide d'une pipette on transfère 4 ml du filtrat dans une éprouvette, puis on ajuste le volume à 48 ml par addition d'une solution tampon de PBS
- ⊙ l'échantillon est déposé dans le réservoir et passe lentement à travers la colonne (le débit ne doit pas dépasser 5 ml/min, donc ne doit pas durer moins de 10 mn)
- ⊙ la colonne est lavée avec 10 ml d'eau
- ⊙ on place un pilulier en verre cilanisé à la sortie de la colonne. L'Ochratoxine A est ensuite recueillie en éluant à l'aide de 1ml de méthanol. cette étape est répétée 4 fois.
- ⊙ On évapore le méthanol à sec sous un flux modéré d'azote
- ⊙ Le résidu est enfin repris dans la phase mobile qui a été préalablement filtré sous un filtre de 0,2micron

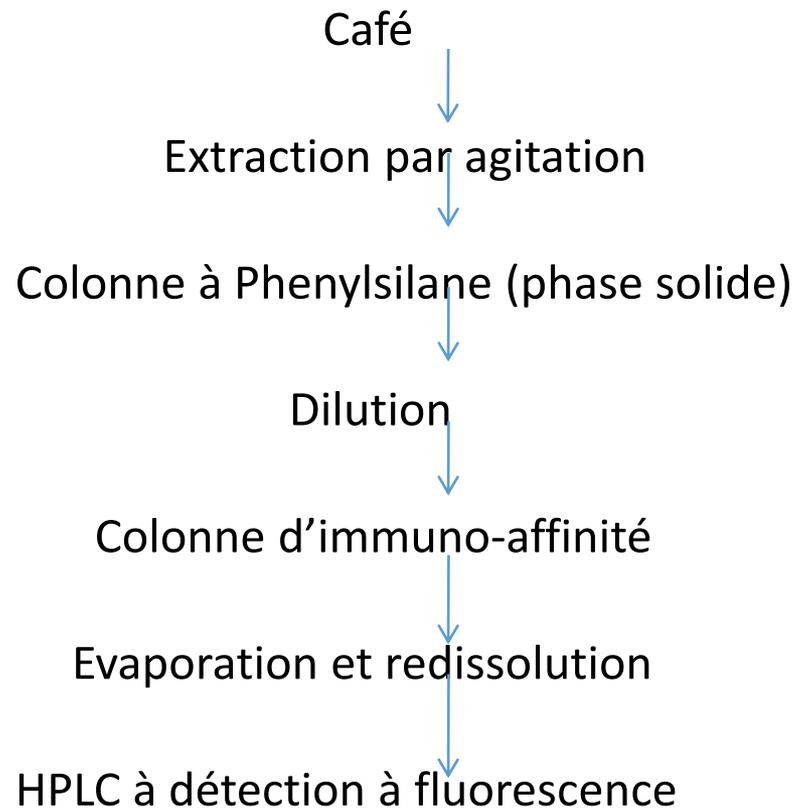
3-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

c- Analyse par CHLP

- Analyse par CHLP selon le protocole
- Chromatogramme montre un pic bien séparé sans interférence

3-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

- **Café**



3-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

a- extraction

- 15g de Café sont pesé dans un flacon(le poids exact doit être enregistré), on y ajoute 150 ml de solution aqueuse de méthanol et d'une solution à 3% de bicarbonate de potassium
- Le flacon à col rodé est bouché afin d'éviter tout risque de fuite pendant l'étape d'extraction, on fixe le flacon dans un agitateur secoueur et on laisse agiter à vitesse moyenne pendant au moins 30mn, le contenu du flacon est ensuite filtré sur papier filtre plissé. On recueille le filtrat
- transférer environ 50 ml du filtrat dans un tube à centrifuger et centrifuger pendant 15 mn
- L'extrait est déposé sur une colonne de phenylsilane, cette colonne est conditionnée par passage de 15 ml de méthanol suivi par 5ml de la solution de bicarbonate de sodium à 3%

3-PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

a- extraction

- ⊙ Les eaux de lavages sont éliminées
- ⊙ 10 ml de l'extrait sont pipeté et transféré dans un bécher, on lui ajoute 10 ml de la solution de bicarbonate de sodium à 3%, puis on les mélange
- ⊙ La solution est alors déposée sur la colonne de phenylsylane
- ⊙ On procède à l'étape de lavage de la colonne successivement avec 10 ml de méthanol contenant 3% de bicarbonate de sodium puis avec 5 ml de solution de bicarbonate de sodium à 1%
- ⊙ L'Ochratoxine A est alors élué de la colonne par 10 ml de solvant (7 volume de méthanol pour 93 volumes d'eau), le débit ne doit pas dépasser 5ml par mn

3- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

b- purification

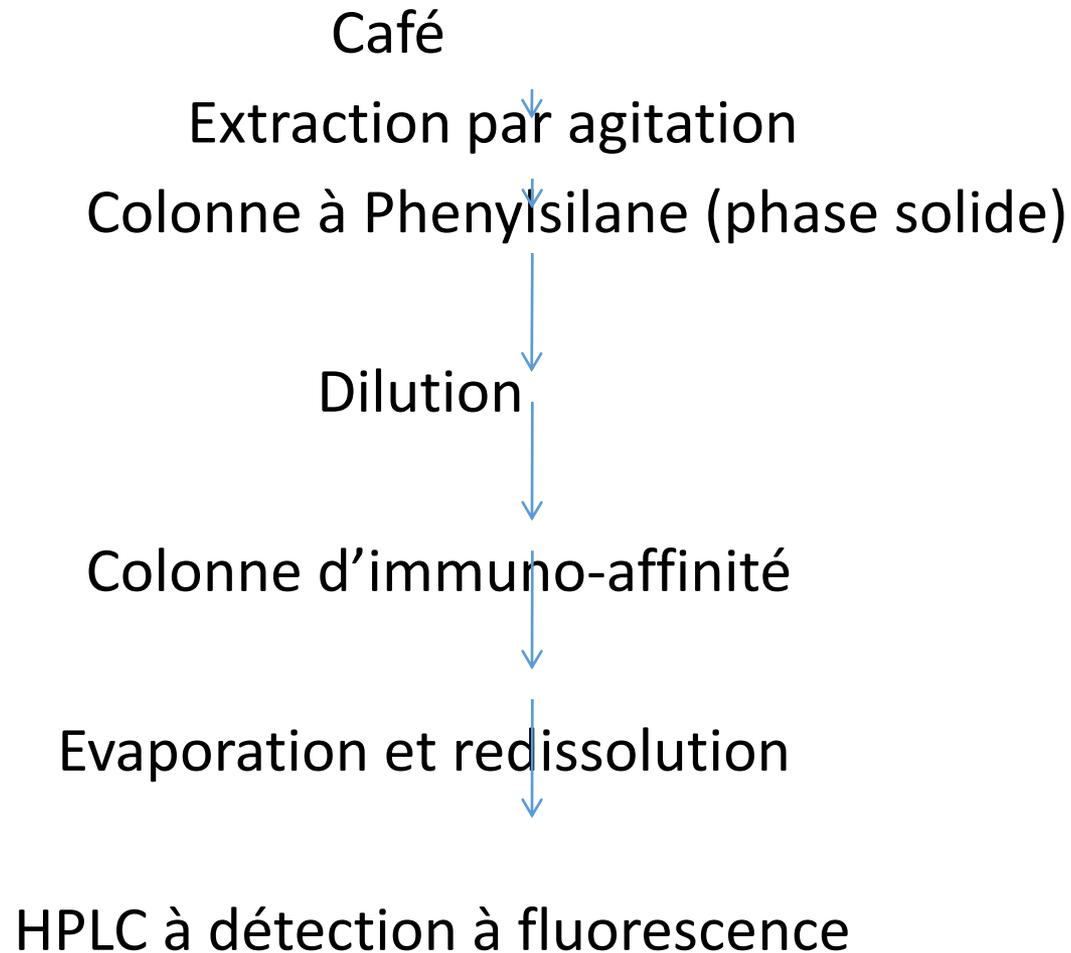
- L'éluat recueilli est dilué sur 30 ml de tampon PBS puis passé à la colonne d'immuno-affinité
- L'éluat recueilli en méthanol est évaporé à sec avant analyse par CLHP

c- analyse

- Analyse par CHLP selon le protocole
- Chromatogramme montre un pic bien séparé sans interférence

3- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

Café



3- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

a - extraction

- ⊙ 15g de Café sont pesé dans un flacon (le poids exact doit être enregistré), on y ajoute 150 ml de solution aqueuse de méthanol et d'une solution à 3% de bicarbonate de potassium
- ⊙ Le flacon à col rodé est bouché afin d'éviter tout risque de fuite pendant l'étape d'extraction, on fixe le flacon dans un agitateur secoueur et on laisse agiter à vitesse moyenne pendant au moins 30mn, le contenu du flacon est ensuite filtré sur papier filtre plissé. On recueille le filtrat
- ⊙ transférer environ 50 ml du filtrat dans un tube à centrifuger et centrifuger pendant 15 mn
- ⊙ L'extrait est déposé sur une colonne de phenylsilane, cette colonne est conditionnée par passage de 15 ml de méthanol suivi par 5ml de la solution de bicarbonate de sodium à 3%

3- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

a- extraction

- ⊙ Les eaux de lavages sont éliminées
- ⊙ 10 ml de l'extrait sont pipeté et transféré dans un bécher, on lui ajoute 10 ml de la solution de bicarbonate de sodium à 3%, puis on les mélange
- ⊙ La solution est alors déposée sur la colonne de phenylsylane
- ⊙ On procède à l'étape de lavage de la colonne successivement avec 10 ml de méthanol contenant 3% de bicarbonate de sodium puis avec 5 ml de solution de bicarbonate de sodium à 1%
- ⊙ L'Ochratoxine A est alors élué de la colonne par 10 ml de solvant (7 volume de méthanol pour 93 volumes d'eau), le débit ne doit pas dépasser 5ml par mn

3- PROTOCOLE D'ANALYSE DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGE ET LE CAFE

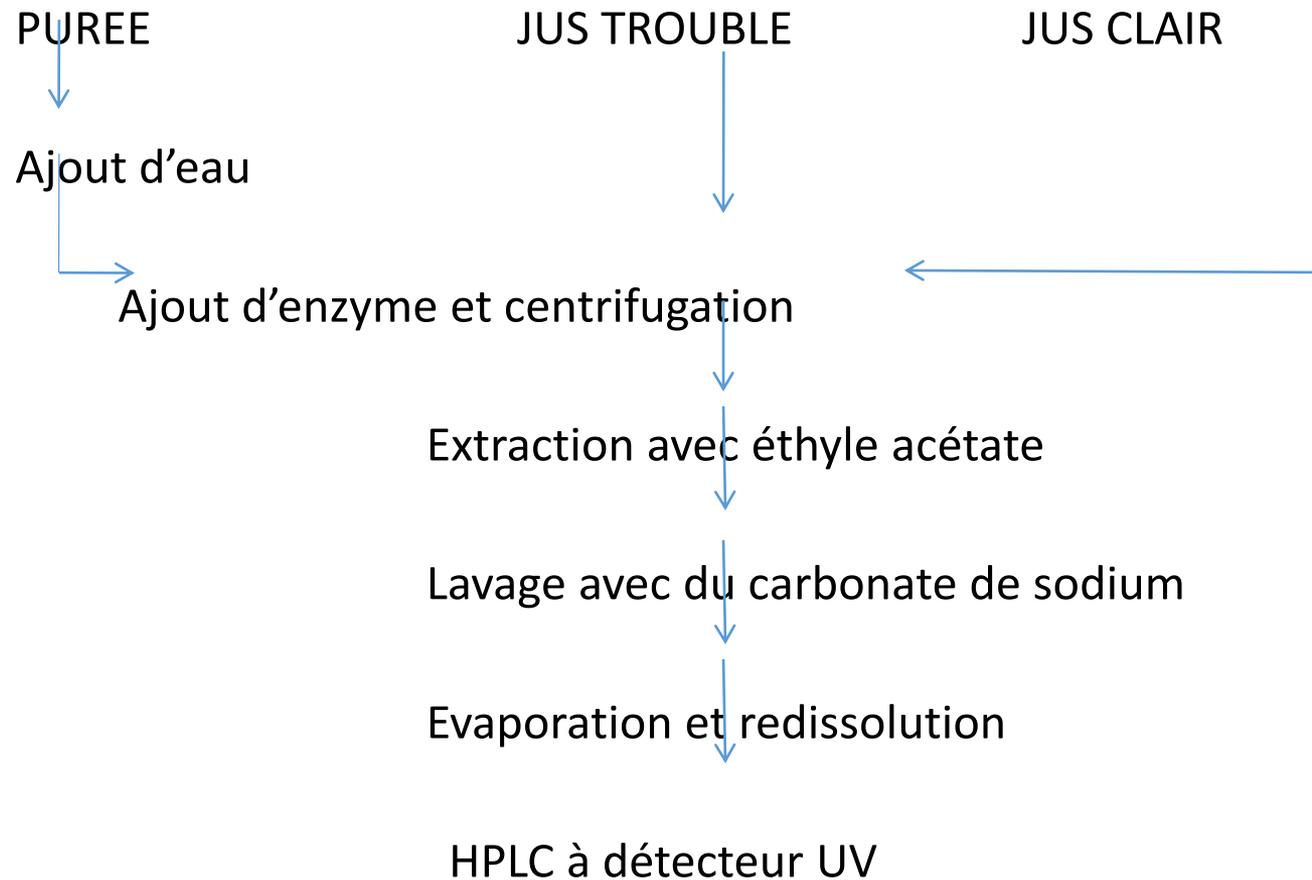
b - purification

- L'éluat recueilli est dilué sur 30 ml de tampon PBS puis passé à la colonne d'immuno-affinité
- L'éluat recueilli en méthanol est évaporé à sec avant analyse par CLHP

c - analyse

- Analyse par CHLP selon le protocole
- Chromatogramme montre un pic bien séparé sans interférence

4- PROTOCOLE D'ANALYSE DE LA PATULIN DANS LE JUS ET LA PUREE DE POMME



4- PROTOCOLE D'ANALYSE DE LA PATULIN DANS LE JUS ET LA PUREE DE POMME

a - extraction

- ⊙ La purée est soigneusement pesée, on la dilue dans 10 ml d'eau
- ⊙ Les échantillons de purée ou de jus trouble doivent être clarifiés avant de leur ajouter les 10 gouttes d'enzymes
- ⊙ de plus les échantillons de purée de pomme doivent centrifuger de sorte obtenir un surnageant clair, les jus de pomme clarifié ne nécessite pas de prétraitement
- ⊙ A partir de maintenant les 3 types d'échantillon subiront le même protocole

4- PROTOCOLE D'ANALYSE DE LA PATULIN DANS LE JUS ET LA PUREE DE POMME

a- extraction

- ⊙ Le jus de purée ou le jus de pomme clarifié est pipeté et transféré dans une ampoule à décanter
- ⊙ On ajoute de l'acétate d'éthyle, on extrait en secoue en ampoule à décanter
- ⊙ On laisse séparer les phases, et on décante la phase inférieure, la phase supérieure est recueillie dans un autre flacon. Cette étape d'extraction doit être renouvelée 2 fois
- ⊙ Les 3 phases éthyliques vont être rassemblé dans une ampoule à décanter, le flacon est rincé avec de l'acétate d'éthyle, les rinçages sont mis dans l'ampoule à décanter

4- PROTOCOLE D'ANALYSE DE LA PATULIN DANS LE JUS ET LA PUREE DE POMME

b - lavage

- ⊙ L'étape de lavage en solution de carbonate de sodium doit se faire rapidement car la Patulin se dégrade en condition alcaline (2 à 3 mn)
- ⊙ L'ampoule est agité, on laisse la phase inferieure se décanter puis celle-ci est recueillie, on tourne doucement l'ampoule pour éliminer toute trace de carbonate de sodium
- ⊙ Pour filtrer on prépare un entonnoir contenant une couche de sulfate de sodium, on verse sur ce filtre la phase éthylique précédemment recueillie
- ⊙ On utilise à nouveau l'acétate d'éthyle pour extraire la solution de lavage de carbonate de sodium

4- PROTOCOLE D'ANALYSE DE LA PATULIN DANS LE JUS ET LA PUREE DE POMME

b – lavage

- ⊙ On lave également l'entonnoir avec l'acétate d'éthyle, les effluents de lavages sont rassemblés, a ce moment il est important de bien lavé le sulfate de sodium avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer l'ensemble de la solution mis à filtrer
- ⊙ L'extrait éthylique est évaporé à sec dans un évaporeur rotatif, le ballon peut être partiellement plongé dans le bain marie, mais surveiller attentivement afin d'éviter les pertes en cas d'ébullition, le ballon est retiré a la fin de l'évaporation
- ⊙ Le résidu est ensuite repris dans un volume connu d'eau à PH 4, il est important de s'assurer que l'intérieur du ballon soit bien rincé, enfin l'extrait est transféré dans un petit flacon pour CLHP

4- PROTOCOLE D'ANALYSE DE LA PATULIN DANS LE JUS ET LA PUREE DE POMME

c - analyse

- Analyse au CHLP à détecteur UV (pour éviter toute recirculation de substance interférente dans le système CLHP il est recommandé de passer entre 2 injections s d'échantillon de l'acétonitrile pur à 100% avant de rééquilibrer la colonne dans la phase mobile)
- La Patulin est identifié sous un pic distingué du composé méthyle hydroxyle furfural qui est fréquemment une source d'interférence.

BIBLIOGRAPHIE