ILNAS-EN 17521:2021 - Preview only Copy via ILNAS e-Shop

ILNAS

Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

ILNAS-EN 17521:2021

Produits alimentaires - Détermination de la teneur en toxines d'Alternaria dans la tomate, le blé et les graines de tournesol purification par SPE et

Lebensmittel - Bestimmung von Alternariatoxinen in Tomaten, Weizen und Sonnenblumenkernen mit SPE clean-up und HPLC-MS/MS

Foodstuffs - Determination of Alternaria toxins in tomato, wheat and sunflower seeds by SPE clean-up and HPLC-MS/MS

08/2021

Avant-propos national

Cette Norme Européenne EN 17521:2021 a été adoptée comme Norme Luxembourgeoise ILNAS-EN 17521:2021.

Toute personne intéressée, membre d'une organisation basée au Luxembourg, peut participer gratuitement à l'élaboration de normes luxembourgeoises (ILNAS), européennes (CEN, CENELEC) et internationales (ISO, IEC) :

- Influencer et participer à la conception de normes
- Anticiper les développements futurs
- Participer aux réunions des comités techniques

https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html

ILNAS-EN 17521:2021 - Preview only Copy via ILNAS e-Shop

CETTE PUBLICATION EST PROTÉGÉE PAR LE DROIT D'AUTEUR
Aucun contenu de la présente publication ne peut être reproduit ou utilisé sous quelque forme ou par quelque procédé que ce soit - électronique, mécanique, photocopie ou par d'autres moyens sans autorisation préalable !

ILNAS-EN 17521:2021 - Preview only Copy via ILNAS e-Shop

ILNAS-EN 17521:2021

NORME EUROPÉENNE
EUROPÄISCHE NORM
EUROPEAN STANDARD

EN 17521

Août 2021

ICS 67.050

Version Française

Produits alimentaires - Détermination de la teneur en toxines d'Alternaria dans la tomate, le blé et les graines de tournesol purification par SPE et CLHP-SM/SM

Lebensmittel - Bestimmung von Alternariatoxinen in Tomaten, Weizen und Sonnenblumenkernen mit Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie

Foodstuffs - Determination of Alternaria toxins in tomato, wheat and sunflower seeds by SPE clean-up and HPLC-MS/MS

La présente Norme européenne a été adoptée par le CEN le 21 juin 2021.

Les membres du CEN sont tenus de se soumettre au Règlement Intérieur du CEN/CENELEC, qui définit les conditions dans lesquelles doit être attribué, sans modification, le statut de norme nationale à la Norme européenne. Les listes mises à jour et les références bibliographiques relatives à ces normes nationales peuvent être obtenues auprès du Centre de Gestion du CEN-CENELEC ou auprès des membres du CEN.

La présente Norme européenne existe en trois versions officielles (allemand, anglais, français). Une version dans une autre langue faite par traduction sous la responsabilité d'un membre du CEN dans sa langue nationale et notifiée au Centre de Gestion du CEN-CENELEC, a le même statut que les versions officielles.

Les membres du CEN sont les organismes nationaux de normalisation des pays suivants: Allemagne, Autriche, Belgique, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République de Macédoine du Nord, République de Serbie, République Tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Slovaquie, Slovénie, Suède, Suisse et Turquie.

COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION
EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION

CEN-CENELEC Management Centre: Rue de la Science 23, B-1040 Bruxelles

© 2021 CEN Tous droits d'exploitation sous quelque forme et de quelque manière que ce soit réservés dans le monde entier aux membres nationaux du CEN.

Réf. n° EN 17521:2021 F

Sommaire

Page

Avant-propos européen 3
Introduction 4
1 Domaine d'application 5
2 Références normatives 5
3 Termes et définitions 5
4 Principe 5
5 Réactifs 6
6 Appareillage et équipement 10
7 Mode opératoire 11
8 Calcul 15
9 Fidélité 15
10 Rapport d'essai 18
Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes 19
Annexe B (informative) Exemples de conditions pour des systèmes CLHP-SM/SM adaptés 22
Annexe C (informative) Données de fidélité 27
Bibliographie 38

ILNAS-EN 17521:2021 - Preview only Copy via ILNAS e-Shop

Avant-propos européen

Le présent document (EN 17521:2021) a été élaboré par le comité technique CEN/TC 275 « Valorisation, recyclage, traitement et élimination des boues », dont le secrétariat est tenu par DIN.

Cette Norme européenne devra recevoir le statut de norme nationale, soit par publication d'un texte identique, soit par entérinement, au plus tard en février 2022, et toutes les normes nationales en contradiction devront être retirées au plus tard en février 2022.

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

Ce document a été élaboré dans le cadre d'une demande de normalisation donnée au CEN par la Commission européenne et l'Association européenne de libre-échange.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve sur le site Web du CEN.

Selon le Règlement intérieur du CEN/CENELEC, les organismes de normalisation nationaux des pays suivants sont tenus de mettre cette Norme européenne en application : Allemagne, Autriche, Belgique, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République tchèque, République de Macédoine du Nord, Roumanie, Royaume-Uni, Serbie, Slovaquie, Slovénie, Suède, Suisse et Turquie.

ILNAS-EN 17521:2021 - Preview only Copy via ILNAS e-Shop

Introduction

Les espèces appartenant au genre *Alternaria*, la plus prédominante étant l'*A. alternata*, produisent plus de 70 métabolites secondaires, mais seuls quelques-uns ont été identifiés structurellement et signalés en tant que mycotoxines [1]. Les champignons *Alternaria* sont des nuisibles communs des végétaux présents dans les céréales, les graines oléagineuses, les fruits et les légumes, entre autres aliments, et la présence de toxines d'*Alternaria* dans ces denrées a été largement rapportée [1]. Ces toxines contaminent non seulement les récoltes, mais elles peuvent également contaminer les denrées alimentaires à des températures de réfrigération.

Parmi ces toxines d'*Alternaria*, l'altenuène (ALT), l'alternariol (AOH), l'alternariol monométhyl éther (AME), la tentoxine (TEN) et l'acide ténuazonique (TEA) sont celles qui suscitent le plus d'inquiétudes. L'ALT, l'AOH et l'AME sont des dibenzo-α-pyrones, la TEN est un tétrapeptide cyclique et le TEA est un dérivé de l'acide tétramique. L'ALT et le TEA ont démontré une toxicité aiguë *in vitro* et au cours d'expérimentations animales. L'AME et l'AOH ne présentent pas de toxicité aiguë ; toutefois, ces toxines ont été décrites comme induisant des effets génotoxiques et mutagènes [1 à 3].

Ces toxines apparaissent généralement dans les produits à base de tomates, les céréales et les graines oléagineuses (par exemple, les graines de tournesol). Le présent document se concentre par conséquent sur ces produits.

AVERTISSEMENT 1 — Il est nécessaire de prendre des précautions et des mesures de protection appropriées lors de la mise en œuvre des étapes de travail impliquant des produits chimiques dangereux. Il convient de tenir compte de la dernière version du règlement relatif aux substances dangereuses, le règlement (CE) n° 1907/2006 [4], ainsi que des dispositions nationales applicables.

AVERTISSEMENT 2 — L'utilisation du présent document peut impliquer l'utilisation de produits et la mise en œuvre de modes opératoires et d'appareillages à caractère dangereux. Le présent document n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur du présent document de mettre en place, avant de l'utiliser, des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la compatibilité avec les limitations réglementaires.

AVERTISSEMENT 3 — Certaines toxines d'*Alternaria* présentent des effets génotoxiques et mutagènes.

ILNAS-EN 17521:2021 - Preview only Copy via ILNAS e-Shop

ILNAS-EN 17521:2021 - Preview only Copy via ILNAS e-Shop

1 Domaine d'application

Le présent document décrit un mode opératoire pour la détermination de la teneur en cinq toxines d'*Alternaria* dans la purée de tomate, le blé et les graines de tournesol par chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM).

La méthode a été validée avec des échantillons naturellement contaminés et dopés de blé, de purée de tomate et de graines de tournesol.

Les teneurs de validation pour l'altenuène (ALT) étaient comprises entre 2,18 µg/kg et 13,8 µg/kg.

Les teneurs de validation pour l'alternariol (AOH) étaient comprises entre 1,82 µg/kg et 46,7 µg/kg.

Les teneurs de validation pour l'alternariol monométhyl éther (AME) étaient comprises entre 1,29 µg/kg et 47,2 µg/kg.

Les teneurs de validation pour la tentoxine (TEN) étaient comprises entre 5,29 µg/kg et 218 µg/kg.

Les teneurs de validation pour l'acide ténuazonique (TEA) étaient comprises entre 41,8 µg/kg et 1 618 µg/kg.

Il est possible d'atteindre des limites de quantification de 1 µg/kg pour l'ALT (sauf dans le cas du blé et des graines de tournesol, 1,4 µg/kg et 1,2 µg/kg, respectivement), l'AOH et l'AME, de 5 µg/kg pour la TEN et de 10 µg/kg pour le TEA, ou des valeurs inférieures à l'aide de la présente méthode.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

EN ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai* (ISO 3696).

3 Termes et définitions

Aucun terme n'est défini dans le présent document.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes :

— IEC Electropedia : disponible à l'adresse suivante https://www.electropedia.org/ ;

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

4 Principe

Une prise d'essai de l'échantillon dopé avec les étalons internes marqués aux isotopes est extraite avec un mélange de méthanol, d'eau et d'acide acétique. Ce mélange échantillon/solvant d'extraction est centrifugé, puis une aliquote du surnageant est prélevée. L'extrait est dilué dans un volume équivalent de solution aqueuse d'acide acétique à 1 % (φ), puis concentré à l'aide d'un adsorbant d'extraction en phase solide (SPE). L'extrait est élué de la colonne SPE à l'aide d'une solution de méthanol et d'acétate d'éthyle. L'éluat est ensuite évaporé, reconstitué, filtré à travers un filtre à seringue contenant du polytétrafluoroéthylène (PTFE), puis analysé par CLHP-SM/SM.

5 Réactifs

Sauf spécification contraire, utiliser exclusivement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau de qualité 1 comme défini dans l'EN ISO 3696. Sauf spécification contraire, les solutions doivent être de qualité CL-SM. Les solutions disponibles dans le commerce possédant des propriétés équivalentes à celles énumérées ici peuvent être utilisées.

5.1 Azote comprimé, de pureté équivalente à φ = 99,99 % ou plus.

5.2 Eau (H_2O), de qualité CLHP.

5.3 Eau (H_2O), de qualité CL-SM.

5.4 Méthanol (CH_3OH) de qualité analytique.

5.5 Méthanol (CH_3OH) de qualité CL-SM.

5.6 Acétate d'éthyle ($CH_3COOC_2H_5$) de qualité analytique ou supérieure.

5.7 Hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) de qualité CL-SM, fraction massique $w(NH_4OH)$ = 25 %.

5.8 Hydroxyde d'ammonium (NH_4OH), $w(NH_4OH)$ = 2,3 %.

Ajouter 1 ml d'hydroxyde d'ammonium à 25 % (5.7) dans une fiole jaugée de 10 ml contenant environ 5 ml d'eau (5.3) et compléter au volume avec de l'eau (5.3).

5.9 Acide acétique (CH_3COOH), $w \geq 99{,}7$ %.

5.10 Acétate d'ammonium (CH_3COONH_4), de qualité CL-SM.

5.11 Solution d'acétate d'ammonium (CH_3COONH_4), de concentration molaire c = 1 mol/l.

Dissoudre 77,08 g d'acétate d'ammonium (5.10) dans 1 l d'eau (5.3).

5.12 Mélange d'extraction, méthanol + eau + acide acétique (85 + 14 + 1, $V + V + V$).

Mélanger 850 ml de méthanol (5.4) avec 140 ml d'eau (5.2) et 10 ml d'acide acétique (5.9).

5.13 Solution aqueuse d'acide acétique, acide acétique + eau (1 + 99, $V + V$), φ = 1 %.

Mélanger 10 ml d'acide acétique (5.9) avec 990 ml d'eau (5.2) et bien homogénéiser le mélange.

5.14 Solution d'élution, méthanol + acétate d'éthyle (75 + 25, $V + V$).

Mélanger 750 ml de méthanol (5.4) avec 250 ml d'acétate d'éthyle (5.6) et bien homogénéiser.

5.15 Phase mobile A pour CLHP, 5 mmol/l d'acétate d'ammonium tamponné à un pH d'environ 8,0.

Mélanger 5 ml de solution d'acétate d'ammonium (5.11) et environ 200 µl d'hydroxyde d'ammonium à 2,3 % (5.8) avec 900 ml d'eau (5.3). Ajuster le volume à 1 l avec de l'eau (5.3), puis bien homogénéiser.

Vérifier le pH de la phase mobile A. La valeur du pH doit être comprise entre 7,95 et 8,05. Ajuster avec de l'hydroxyde d'ammonium à 2,3 % (5.8) de sorte à se situer dans cet intervalle.

5.16 Phase mobile B pour CLHP, méthanol (5.5)

ILNAS-EN 17521:2021 - Preview only Copy via ILNAS e-Shop