

Données de validation

Numéro de fiche	Titre
METROPOL_339	AOZ M-339

Données de validation principales

Généralités

V-248

Données de validation pour l'ochratoxine A et la zéaralénone, dosées à partir de coupelles dopées avec des quantités connues des 3 types de mycotoxines : ochratoxine A, zéaralénone et aflatoxines (données de validation fournies séparément).

Les rendements d'extraction sur IA-AOZ et les taux de récupération de la méthode sont détaillés dans l'onglet "Données de validation 2". L'analyse est détaillée dans la rubrique "Informations complémentaires".

Les données de performances et de validation pour le prélèvement lui-même sont fournies dans les méthodes spécifiques à chacune des mycotoxines : M-46, M-48 ou M-306, par exemple.

Ochratoxine M-48 ¹

¹ http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.htm?refINRS=METROPOL_48

Zéaralénone M-306 ²

² http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.htm?refINRS=METROPOL_306

Débit prélèvement _____ 10 L/min

Conditions analytiques

1 injecteur :

PASSEUR AUTOMATIQUE

Température d'utilisation _____ 10 °C

Volume injecté _____ 80 µL

Programme de température _____ non

1 colonne :

Colonne _____ ■ PHASE INVERSE

Nature phase _____ ■ C18

Granulométrie _____ 5 µm

Longueur _____ 25 cm

Diamètre _____ 4,6 mm

Température d'utilisation _____ 40 °C

Programme de température _____ non

2 détecteurs :

FLUORIMETRIE

Longueur d'onde 1 (ou excitation) en nm _____ 330

Longueur d'onde 2 (ou émission) en nm _____ 460

Commentaires _____ Longueurs d'onde programmées pour la détection de l'ochratoxine A, avec sensibilité du détecteur adaptée (super high, par exemple).

FLUORIMETRIE

Longueur d'onde 1 (ou excitation) en nm _____ 276

Longueur d'onde 2 (ou émission) en nm _____ 460

Commentaires _____ Longueurs d'onde programmées pour la détection de la zéaralénone, avec sensibilité du détecteur adaptée (super high, par exemple)

Phase mobile	Pourcentage	Présence d'un tampon	Nature tampon	Commentaires / Débit
ACETONITRILE	50	non		1 mL/min
EAU	40	oui	0,1 % d'acide acétique	
METHANOL	10	non		

Recommandations particulières :

L'OTA est classée 2B (Cancérogène possible) par le Centre International pour la Recherche sur le Cancer (CIRC), la zéaralénone est classée Cancérogène non génotoxique chez l'animal. En l'absence de données épidémiologiques, aucune évaluation de sa carcinogénicité chez l'homme n'a été proposée.

Une procédure de décontamination de la verrerie et des pailles (en cas de renversement d'un flacon) devra être établie, avec un lavage à l'hypochlorite de sodium suivi d'un lavage à l'acétone, et d'un rinçage à l'eau. Les solutions de décontamination seront éliminées dans un bidon de récupération pour produits chimiques prévu à cet effet. Se reporter à : **Manipulations dans les laboratoires de chimie**³

³ <http://www.inrs.fr/media.htm?refINRS=ED%20953>

Validation Méthode Analytique**Répétabilité :**

10 injections du même point de gamme pour ochratoxine A à 550 pg/mL et pour zéaralénone à 70 ng/mL.

Coefficient de variation pour ochratoxine A égal à 1,55 et pour zéaralénone à 1,52.

Limite de détection (LD) :

Pour ochratoxine A : 30 pg/mL

Pour zéaralénone : 5 ng/mL

Limite de quantification (LQa) :

Pour ochratoxine A : 100 pg/mL

Pour zéaralénone : 15 ng/mL

Réponse analytique - linéarité :

La linéarité du détecteur a été vérifiée jusqu'à 1700 pg/mL pour l'ochratoxine A et 228 ng/mL pour la zéaralénone.

Données de validation - données 2**Taux de récupération****Rendement d'extraction sur colonne IA-AOZ**

Pour chaque charge, dosage de 3 solutions extraites sur 3 colonnes IA-AOZ, comparé aux résultats de dosage des solutions étalons analysées directement.

Ochratoxine A	
Quantité en pg	Rendement en %
330	111
618	119
1000	121
1650	115
2438	120
Moyenne	117
Ecart type	4,15
Coefficient de variation	3,5

Zéaralénone	
Quantité en ng	Rendement en %
43	106
81	119
130	108
207	106
318	113
Moyenne	112
Ecart type	7,1
Coefficient de variation	6,3

Taux de récupération analytique

Rapport entre la quantité dosée et la quantité réelle dans un échantillon collecté en atmosphère connue.

Ochratoxine A				
Quantité en pg	301	493	660	1325
Kt 1 (%)	89	114	98	112
Kt 2 (%)	85	97	113	105
Kt 3 (%)	114	94	103	111
Kt 4 (%)	124	107	95	
moyenne	103	103	103	109
écart type	19	9,2	7,9	3,8
coefficient de variation	18	8,9	7,7	3,5

zéaralénone				
Quantité en ng	21	29	37	72
Kt 1 (%)	124	116	133	134,1
Kt 2 (%)	124	128	139	130,4
Kt 3 (%)	133	135	140	136,3
Kt 4 (%)	136	137	137	
moyenne	129	129	137	133,6
écart type	6,2	9,5	3,1	2,4
coefficient de variation	4,5	7,4	2,3	1,8

Conservation après prélèvement

Méthode appliquée / conditions de prélèvement :

Conservation de l'Ochratoxine A et de la zéaralénone dans les coupelles de prélèvement

Ochratoxine A	
Quantité en pg	Rendement en %
421	141
554	112
647	90
1430	102
Moyenne	111
Ecart type	22
Coefficient de variation	20

zéaralénone	
Quantité en ng	Rendement en %
19	89
24	80
42	103
76	96
Moyenne	92
Ecart type	9,8
Coefficient de variation	10,7

Informations complémentaires

Compléments d'information :

Le règlement CE n° 472/2002 du 12/02/2002 fixe des teneurs maximales en ochratoxine A pour les produits commercialisés : < 5 µg/kg pour les céréales et < 3 µg/kg pour les produits à base de céréales.

Traitement des dispositifs de prélèvement :

Extraction à partir des coupelles de prélèvement :

Désorption de la mousse avec le mélange acétonitrile/eau : Transférer la mousse dans un flacon de 20 mL avec 10 mL de solvant d'extraction (acétonitrile/eau 60/40). Extraire aux ultra-sons pendant 15 minutes.

Récupération des poussières déposées sur les parois de la coupelle en effectuant 3 fois de suite l'étape suivante :

Ajouter 1 mL de solvant d'extraction (acétonitrile/eau 60/40) dans la coupelle, la refermer avec son couvercle et la soumettre 5 minutes aux ultra-sons.

Récupérer la solution d'extraction à l'aide d'une pipette pasteur en matière plastique et la transférer dans le flacon qui contient la mousse.

Dilution avec la solution tampon : Transférer la totalité de la solution extraite (≈ 13 mL) dans un flacon de 200 mL avec 100 mL de solution tampon pH 7,4 (rincer plusieurs fois le flacon qui contient la mousse avec une portion de solution tampon, aspirer avec une pipette pasteur en matière plastique, transférer dans le flacon de 200 mL).

L'échantillon est maintenant en solution dans 113 mL d'un mélange acétonitrile /eau tamponnée. Le pourcentage d'acétonitrile doit être inférieur à 5 % pour permettre l'extraction sur colonne d'immunoaffinité. Agiter à l'aide d'un barreau magnétique.

Si la solution est opaque car très chargée en poussières, prévoir une filtration au travers d'un cône en papier filtre (aucune perte lors de la filtration sur papier filtre n'a été mise en évidence).

Conditionnement des colonnes d'immunoaffinité (IA -AOZ)

Laisser chaque colonne se stabiliser à température ambiante pendant 20 minutes puis éliminer la solution de stockage par simple gravité dans une cuve de récupération prévue à cet effet. Laisser cette cuve en place pour la 1° phase de l'extraction (élimination de la solution tampon).

Conditionnement à effectuer selon les indications du fabricant

(Nota : amorcer si besoin l'élution, en douceur, à l'aide d'une pipette Pasteur en verre).

Pour une plus grande précision de l'analyse, les récupérations en flacons décrites à partir de cette étape, pourront être réalisées par gravimétrie (sur une balance calibrée) :

Pesée flacon vide avec bouchon,

Pesée flacon bouché + solvant

Pesée flacon bouché + solvant +mycotoxines .

Fixation des mycotoxines sur colonne (IA-AOZ) et purification

Transférer la totalité de la solution échantillon sur une colonne d'immunoaffinité (IA-AOZ).

Prévoir un corps de seringue de 20 à 50 mL comme réservoir de distribution, à remplir en plusieurs fois, pour transférer tout le volume de solution sur la colonne .

En cas de difficulté d'écoulement, amorcer celle-ci à l'aide d'un faible vide (ne jamais dépasser 5 bars).

Éliminer le mélange acétonitrile/ eau tamponnée par soutirage sous vide (ne pas amener à sec) dans la cuve de récupération. Les mycotoxines sont maintenant liées aux anticorps monoclonaux spécifiques.

Rincer la colonne IA avec 10 mL (par exemple) de PBS préalablement versés dans le flacon de 200 mL ayant contenu la solution échantillon (pour une récupération complète de celle-ci) et 10 mL d'eau.

Éliminer l'eau par soutirage à sec, en douceur et en s'assurant qu'il soit complet.

Remplacer la cuve de récupération par le portoir équipé des flacons de récupération et s'assurer que les aiguilles plongent jusqu'au fond des flacons.

Extraction des mycotoxines à partir de la colonne (IA-AOZ)

Protocole d'extraction à adapter, le cas échéant, aux indications du fabricant (en particulier pour la pratique ou non du backflush).

Déposer 1,5 mL de méthanol en haut de la colonne, laisser passer au-travers de la colonne par gravité, recueillir dans le flacon.

Si la colonne le permet, la technique du backflush avec trois passages successifs permet d'améliorer le rendement de récupération des mycotoxines :

Aspirer la solution recueillie dans le flacon à l'aide d'une seringue ajustée sur la colonne d'immunoaffinité. Le liquide passe dans la colonne en sens inverse, il est recueilli au-dessus de la phase solide. Laisser repasser la solution au-travers de la colonne par gravité, recueillir dans le flacon.

Déposer ensuite 1,5 mL d'eau acidifiée à 0,1 % en acide acétique, en haut de la colonne.

Récupérer la totalité de l'éluat par soutirage à sec, en douceur et en s'assurant qu'il soit complet, mais sans excès sous peine d'éclaboussures et de perte de produit.

Traitement des extraits (IA-AOZ)

À partir de cette étape, un traitement approprié (déterminé à partir des résultats de chacun des prélèvements d'estimation) peut alors être appliqué à cet extrait : soit l'analyse directe d'une aliquote, soit une dilution.

Pesée (m1) flacon vide + bouchon

Pesée (m2) flacon plein bouché + extrait IA (densité d =0,895)

Volume exact de l'extrait IA :

$$V_e \text{ (mL)} = (m2 - m1) / 0,895$$

Effectuer si besoin une dilution adaptée (selon les estimations préalablement effectuées) à l'aide d'un mélange méthanol/eau acidifiée (50/50).

Le volume de l'extrait IA dilué sera alors à corriger du facteur de dilution.

Volume équivalent de l'extrait IA dilué :

$$V_d \text{ (mL)} = [(m2 - m1) / 0,895] \times f$$

avec f facteur de dilution (10 pour une dilution au 1/10).

Transférer une aliquote de l'extrait IA ou de l'extrait dilué dans les flacons pour passeur (avec insert).

Procéder à l'analyse de l'extrait IA (AOZ) ou de l'extrait dilué .

Étalonnage

Préparer une gamme de solutions étalons à partir des solutions mères de mycotoxines conservées au congélateur, ramenées à température ambiante et homogénéisées à l'aide des ultra-sons.

Préparation des solutions de travail ST :

	solution-mère	Dilution de la solution-mère	Solvant de dilution	Concentration de la solution de travail
Aflatoxines ST1	250 ng/mL	1/10	Eau/MeOH (50/50)	25 ng/mL
Ochratoxine ST2	10 µg/mL	1/100	Eau/MeOH (50/50)	100 ng/mL
Zéaralénone ST3	100 µg/mL	1/100	Eau/MeOH (50/50)	1 µg/mL

Solution de mélange AOZ (pour 10 mL de mélange) :

Volume ST1	Volume ST2	Volume ST3	Volume PBS	Concentration(s) Aflatoxine(s)	Concentration Ochratoxine	Concentration Zéaralénone
1 mL	200 µL	2,5 mL	6,3 mL	2,5 ng/mL	2 ng/mL	250 ng/mL

Gamme de solutions étalons AOZ :

Préparer les étalons de dosage en effectuant (par exemple) les dilutions suivantes dans le tampon PBS :

Étalons	Volume de mélange AOZ	Volume de PBS	Concentration Aflatoxines	Concentration Ochratoxine	Concentration Zéaralénone
E1	200 µL	9,8 mL	50 pg/mL	40 pg/mL	5 ng/mL
E2	400 µL	9,6 mL	100 pg/mL	80 pg/mL	10 ng/mL
E3	800 µL	9,2 mL	200 pg/mL	160 pg/mL	20 ng/mL
E4	1,5 mL	8,5 mL	375 pg/mL	320 pg/mL	37,5 ng/mL
E5	2 mL	8 mL	500 pg/mL	400 pg/mL	50 ng/mL

Pour une plus grande précision de l'analyse, toutes les dilutions pourront être réalisées par gravimétrie (sur une balance calibrée, masses lues en g) :

Pesée (me0) flacon vide avec bouchon,

Pesée (me1) flacon bouché + tampon PBS (densité d= 1),

Pesée (me2) flacon bouché + tampon PBS (densité d= 1) + solution de mélange AOZ (d= 1).

La concentration exacte en mycotoxines pour chaque étalon AOZ est alors égale à :

$$C_{E-AOZ} \text{ (pg/mL ou ng/mL)} = [(me2-me1) \times C_{sol AOZ}] / (me2 - me0)$$

L'étape de fixation/purification/extraction sur colonne IA-AOZ est réalisée dans les mêmes conditions que celle des échantillons.

- Transférer les 10 mL de chaque étalon E sur une colonne IA-AOZ préalablement conditionnée. Après rinçage de la colonne par la solution tampon, l'extraction est effectuée par 1,5 mL de méthanol puis 1,5 mL d'eau acidifiée.

- Laisser s'écouler par gravité et appliquer un léger vide pour récupérer les dernières gouttes, recueillir dans des flacons identifiés et mélanger.

On obtient 3 mL des étalons extraits AOZ, compris entre 150 et 1500 pg/mL (gamme aflatoxines), 120 et 1200 pg/mL (gamme ochratoxine), 15 et 150 ng/mL (gamme zéaralénone) dans un mélange MeOH/H2O (50/50).

Pesée (me3) flacon vide avec bouchon,

Pesée (me4) flacon plein avec bouchon.

Pour chaque étalon, la quantité exacte de mycotoxines extraite sur IA-AOZ, est égale à :

$$q = C_{E-AOZ} \times (me2 - me0)$$

Concentration exacte en mycotoxines des extraits e-AOZ (après IA-AOZ) :

$$C_{e-AOZ} \text{ (pg/mL ou ng/mL)} = q \times 0,895 / (me4 - me3)$$

Transférer une aliquote de chaque étalon extrait (e) dans les flacons pour passeur.

Procéder à l'analyse des étalons de dosage.

EXPRESSION DES RÉSULTATS

1 - Déterminer la concentration en mycotoxines(s) des solutions analysées :

Tracer une droite d'étalonnage en prenant en compte la concentration exacte des étalons injectés.

La concentration en mycotoxines (C_{e-AOZ}) dans la solution analysée est déterminée à partir de la droite d'étalonnage.

2 - Calculer la quantité de mycotoxines (s) (Mp) extraite sur IAC :

$$M \text{ (pg ou ng)} = C_{e-AOZ} \times V_e, \text{ pour un extrait IA-AOZ analysé directement ;}$$

ou

$$M \text{ (pg ou ng)} = C_{e-AOZ} \times V_d, \text{ pour un extrait IA-AOZ dilué ;}$$

avec

V_e (mL) : volume de l'extrait IA ;

V_d (mL) : volume de l'extrait IA corrigé du facteur de dilution pour un extrait IA dilué ;

C_{e-AOZ} (pg/mL ou ng/mL) : concentration en mycotoxines(s) de la solution analysée.

La quantité (M) est égale à la quantité de mycotoxines(s) prélevée dans la coupelle du CIP10.

3 - Calcul de la concentration (C) des mycotoxines dans l'air

$$C \text{ (pg/m}^3\text{)} = (M_p - M_b) \times 1/V \times 1000$$

avec :

M (pg ou ng) : masse des mycotoxine(s) dans la coupelle de prélèvement

M (pg ou ng) : masse moyenne des mycotoxines(s) dans les blancs de laboratoire

V (L) : volume d'air prélevé.

Il est également possible de calculer la concentration pondérale des poussières contaminées dans l'air

1- Masse des poussières Q (en mg) prélevées dans la coupelle x.

Cette quantité est calculée selon :

$$Q_x = \Delta M_x - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \Delta T_y$$

avec, pour n témoins pesés :

Mix : la masse initiale de la xe coupelle utilisée

Mfx : la masse finale de la xe coupelle utilisée

ΔM : Mfx - Mix, pour la x coupelle utilisée

Tiy : la masse initiale de la ye coupelle témoin

Tfy : la masse finale de la ye coupelle témoin

ΔT : Tfy - Tiy pour le y témoin.

Soit, pour 3 témoins :

$$Q_x = \Delta M_x - \frac{1}{3} (\Delta T_1 + \Delta T_2 + \Delta T_3)$$

2- Teneur moyenne en mycotoxine(s) dans les poussières Q (en $\mu\text{g}/\text{kg}$) :

La contamination des poussières dans l'aérosol peut alors être estimée :

$$Q \text{ AOZ } (\mu\text{g}/\text{kg}) = M_p \text{ x} / Q \text{ x}$$

avec

$M_p \text{ x}$ (pg) : masse de mycotoxine(s) dosée dans la coupelle x

Q_x (mg) : quantité de poussières prélevée dans la coupelle x.

- [Chromato OTA_ZEA Méthode AOZ M 339 .pdf](#)
- [Fiche technique dosage etalon IA -AOZ .pdf](#)
- [Fiche technique dosage matrice solide sur IA \(AOZ\) .pdf](#)
- [Fiche technique etalon IA-AOZ.pdf](#)
- [Fiche technique dosage mousses sur IA \(AOZ\) .pdf](#)