

Données de validation

Numéro de fiche	Titre
METROPOL_46	Fumonisine B1 M-46

Données de validation principales

Généralités

Substance _____ Fumonisine B1
 Débit prélèvement _____ 10 L/min

Conditions analytiques

1 injecteur :

PASSEUR A EFFET PELTIER

Température d'utilisation _____ 10 °C
 Volume injecté _____ 80 µL
 Programme de température _____ non

1 colonne :

Colonne _____ ■ PHASE INVERSE C18
 Nature phase _____ ■ ALLTIMA
 Granulométrie _____ 5 µm
 Longueur _____ 15 cm
 Diamètre _____ 3 mm
 Température d'utilisation _____ 40 °C
 Programme de température _____ non

1 détecteur :

FLUORIMETRIE

Longueur d'onde 1 (ou excitation) en nm _____ 335
 Longueur d'onde 2 (ou émission) en nm _____ 440

Phase mobile	Pourcentage	Présence d'un tampon	Nature tampon	Commentaires / Débit
METHANOL	75	non	--, NaH ₂ PO ₄ 0,1 M ajusté à pH 3,35 avec H ₃ PO ₄ (85 %)	0,5 mL/min
EAU	25	oui		

Recommandations particulières :

PRÉCAUTIONS :

Se reporter à l'aide-mémoire technique , **Manipulations dans les laboratoires de chimie**^{1, 2}

¹ <http://Risques et prévention>

² <http://www.inrs.fr/media.html?ref=INRS=ED%20953>

La fumonisine FB1 est classée 2B (Cancérogène possible) par le Centre International pour la Recherche sur le Cancer (CIRC). Une procédure de décontamination de la verrerie et des paillasses (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 puis de la vaisselle habituelle.

Les solutions de décontamination seront éliminées dans un bidon de récupération pour produits chimiques prévu à cet effet.

Validation Méthode Analytique

Répétabilité :

Injections d'une même solution 10 fois de suite. Déterminations périodiques réalisées sur plusieurs mois.

Répétabilité _____ < 5,5%

Limite de détection (LD) :

Estimation de la limite de détection analytique basée sur un rapport signal/bruit égal à 3, soit 10 ng/mL.

Limite de quantification (LQa) :

30 ng/mL

Réponse analytique - linéarité :

La linéarité a été vérifiée dans la gamme allant de 13,3 à 625 ng/mL de fumonisine B1.

Taux de récupération

	essai 1
KT Moyen(%)	100

Conservation après prélèvement

q1

Niveau de charge 1 (q1) _____ 5 ng

q2

Niveau de charge 2 (q2) _____ 240 ng

Temps de conservation

Temps 1 _____ 30 jour(s)(s) à 20 °C

Taux de récupération T1	q1	q2
Kc Moyen(%)	95	95

Informations complémentaires

Compléments d'information

Afin de réduire l'exposition de la population par voie orale, la Commission Européenne a fixé une limite de 4000 µg de fumonisine/kg dans les céréales brutes, de 200 à 1000 µg de fumonisine/kg dans les denrées alimentaires à base de céréales (selon qu'elles soient destinées aux enfants en bas âge ou aux adultes) et une limite de 1000 µg/kg dans le maïs et les aliments à base de maïs pour l'ensemble fumonisine B1+ fumonisine B2 (Directive CE n° 2007/1126).

Traitement des dispositifs de prélèvement

Préparation de la solution de désorption des coupelles

Préparer un mélange méthanol/eau (MeOH/H₂O) 75/25 en volume.

Préparation de la solution de reprise des échantillons après évaporation à sec

Préparer un mélange méthanol/eau (MeOH/H₂O) 50/50 en volume.

Extraction des fumonisines à partir des coupelles de prélèvement

Désorption de la mousse avec le mélange méthanol/eau : Transférer la mousse dans un flacon de 20 mL avec 10 mL du solvant de désorption (méthanol/eau 75/25). 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 du solvant de désorption (méthanol/eau 75/25) 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 d'extraction (≈ 13 mL) dans un flacon de 200 mL avec 40 mL de solution tampon PBS (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 53 mL d'un mélange méthanol/ eau tamponnée.

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 de fumonisine lors de la filtration sur papier filtre n'a été mise en évidence).

Conditionnement des colonnes d'immunoaffinité (IA)

A effectuer selon les indications du fabricant

Fixation des fumonisines sur colonne IA et purification

Transférer la totalité de la solution échantillon sur une colonne d'immunoaffinité.

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

Rincer la colonne IA avec 2 fois 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).

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 fumonisines à partir de la colonne IA

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 ensuite d'améliorer le rendement de récupération des fumonisines.

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. Reproduire cette étape 2 fois de suite.

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

A 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, soit une concentration.

1^{er} cas : Dosage HPLC des extraits IA sans étape de concentration :

Pour les échantillons d'estimation, les échantillons analysables sans traitement particulier ou les échantillons qui nécessitent que l'extrait IA soit dilué :

- Déposer 1,5 mL d'eau en haut de la colonne, les laisser s'écouler par gravité, recueillir dans le flacon et appliquer un léger vide pour récupérer les dernières gouttes. Mélanger ;

Pesée (m1) flacon vide + bouchon

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

Volume exact de l'extrait IA :

$$V_e \text{ (mL)} = \frac{(m_2 - m_1)}{0,895}$$

- Effectuer si besoin une dilution adaptée à l'aide d'un mélange méthanol/eau 50/50 ;

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

Volume équivalent de l'extrait IA dilué :

$$V_d \text{ (mL)} = \frac{(m_2 - m_1)}{0,895} \times f$$

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

- Transférer 125 µL (exactement connus) de l'extrait IA ou de l'extrait dilué dans les flacons pour passeur (avec insert) et procéder à l'analyse.

Pesée (m3) flacon pour passeur (+ insert) vide, avec bouchon

Pesée (**m4**) flacon pour passeur (+ insert) bouché + aliquote ($d = 0,895$)

Volume exact de l'aliquote transférée :

$$V_t (\mu\text{L}) = \frac{(m_4 - m_3)}{0,895} \times 1000$$

2° cas : Extraits IA à concentrer sous flux d'azote

Pour les échantillons qui nécessitent que l'extrait IA soit concentré :

Procéder à la concentration à sec sous flux d'azote .

Traiter les blancs de terrain et les blancs de laboratoire de la même façon.

L'extrait contenu dans les flacons de récupération est évaporé à sec sous flux d'azote de la façon suivante :

- Déposer les flacons, sans leur bouchon, dans les blocs de l'évaporateur prévu à cet effet ($T=35^\circ\text{C}$, débit d'azote 0,4 PSI) ;
- Faire descendre les aiguilles au dessus des flacons sans qu'elles ne trempent dans l'extrait ;
- Effectuer cette étape de concentration pendant 1 heure à 1 heure 30 ;
- Descendre les aiguilles au fur et à mesure de l'évaporation ;

- Lorsque l'extrait est complètement évaporé : retirer les flacons, remettre leur bouchon pour effectuer la pesée du flacon contenant le résidu sec,

- Reprendre le résidu par 200 μL du mélange méthanol/eau 50/50.

Pesée (**m3**) flacon (+bouchon), contenant le résidu sec,

Pesée (**m4**) flacon (+bouchon), contenant le résidu et le solvant

Volume exact de l'extrait IA concentré :

$$V_r (\text{mL}) = \frac{(m_4 - m_3)}{0,895}$$

- Agiter les flacons pendant 10 secondes sur le mélangeur vortex.

- Transférer 125 μL (exactement connus) de la solution obtenue dans les flacons pour passeur munis d'un insert. Effectuer le transfert à l'aide d'une pipette pasteur en verre. Vérifier qu'aucune bulle d'air ne se forme au fond de l'insert sinon tapoter le flacon délicatement.

Pesée (**m5**) flacon pour passeur (+ insert) vide, avec bouchon

Pesée (**m6**) flacon pour passeur (+ insert) plein avec bouchon.

Volume exact de l'aliquote transférée :

$$V_t (\mu\text{L}) = \frac{(m_6 - m_5)}{0,895} \times 1000$$

Procéder à l'analyse de l'**extrait concentré**.

Étalonnage

Préparer une gamme de solutions étalon à partir de la solution-mère à 50 $\mu\text{g/mL}$ de fumonisine, conservée au congélateur, ramenée à température ambiante et homogénéisée à l'aide des ultra-sons :

- Effectuer une dilution au 1/100 de la solution-mère : 100 μL dans 10 mL d'un mélange MeOH/ H_2O (50/50). On obtient l'étalon de travail **FB à 500 ng/mL**.

- Effectuer une dilution au 1/2 de l'étalon de travail FB : 5 mL ajoutés à 5 mL d'un mélange MeOH/ H_2O (50/50) aux 5 mL de FB. On obtient l'étalon **FB/2 à 250 ng/mL**.

1^{er} cas : Extraits IA sans étape de concentration

Pour l'étalonnage des prélèvements d'estimation, des échantillons dilués après IA ou des échantillons analysables sans traitement particulier :

- Préparer les étalons de dosage en effectuant (par exemple) :

une dilution au 1/125 de FB (80 μL + 9,92 mL de tampon PBS) : étalon **FB 4** à 4 ng/mL,

une dilution au 1/100 de FB (100 μL + 9,9 mL de tampon PBS) : étalon **FB 5** à 5 ng/mL,

une dilution au 1/50 de FB (400 μL + 9,6 mL de tampon PBS) : étalon **FB 10** à 10 ng/mL,

une dilution au 1/20 de FB (500 μL + 9,5 mL de tampon PBS) : étalon **FB 25** à 25 ng/mL,

une dilution au 1/10 de FB (1 mL + 9 mL de tampon PBS) : étalon **FB 50** à 50 ng/mL,

une dilution au 1/5 de FB (2 mL + 8 mL de tampon PBS) : étalon **FB 100** à 100 ng/mL.

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

Pesée (**me0**) flacon vide avec bouchon,

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

Pesée (**me2**) flacon bouché + tampon + solution de fumonisine ($d = 0,895$).

La concentration exacte en fumonisine de la solution diluée est alors égale à :

$$\text{FB}_{4-100} (\text{ng/mL}) = \left[\frac{(m_2 - m_1)}{0,895} \times \text{FB} \right] + \left[\frac{(m_2 - m_1)}{0,895} + \frac{(m_1 - m_0)}{1} \right]$$

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

- Transférer les 10 mL de chaque étalon FB (4-100) sur une colonne IA 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.

- 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 (fb) à environ 13,3, 16,7, 33,3, 83,3, 167 et 333 ng/mL (concentration exactement connue) de fumonisine dans un mélange MeOH/ H_2O 50/50.

Pesée (**me3**) du flacon vide avec bouchon,

Pesée (**me4**) du flacon bouché + extrait IA ($d=0,895$).

Pour chaque étalon, quantité exacte de fumonisine extraite sur IA :

$$q(\text{ng}) = \text{FB}_{4-100} \times \left[\frac{(\text{me}2 - \text{me}1)}{0,895} + \frac{(\text{me}1 - \text{me}0)}{1} \right]$$

Concentration exacte en fumonisine (après IA) = :

$$\text{fb}_{13-333}(\text{ng/mL}) = q \times \frac{0,895}{(\text{me}4 - \text{me}3)}$$

- Transférer 125 μL (exactement connus) de chaque étalon extrait (fb) dans les flacons pour passeur munis d'un insert.

Pesée (**me5**) flacon pour passeur (+ insert) vide, avec bouchon

Pesée (**me6**) flacon pour passeur (+ insert) plein avec bouchon.

Volume exact de l'aliquote transférée :

$$V_t(\mu\text{L}) = \frac{(\text{me}6 - \text{me}5)}{0,895} \times 1000$$

- Procéder à l'analyse des **étalons fb 13-333**.

Tenir compte de la dilution effectuée au moment de la dérivation (ajout de 10 μL de réactif aux 125 μL d'étalon) :

Concentration exacte en fumonisine (au moment de l'injection) :

$$\text{fb}_{\text{injectée}}(\text{ng/mL}) = \text{fb}_{13-333} \times \frac{v_t}{v_t + 10}$$

2° cas : Extraits IA à concentrer sous flux d'azote

Pour l'étalonnage des échantillons qui nécessitent que l'extrait IA soit concentré :

- Préparer les étalons de dosage en effectuant (par exemple) :

une dilution au 1/500 de FB/2 (20 μL + 9,98 mL de tampon PBS) : étalon **FB 0,5** à 0,5 ng/mL,

une dilution au 1/250 de FB/2 (40 μL + 9,96 mL de tampon PBS) : étalon **FB 1** à 1 ng/mL,

une dilution au 1/100 de FB/2 (100 μL + 9,9 mL de tampon PBS) : étalon **FB 2,5** à 2,5 ng/mL,

une dilution au 1/50 de FB/2 (200 μL + 9,8 mL de tampon PBS) : étalon **FB 5** à 5 ng/mL,

une dilution au 1/20 de FB/2 (500 μL + 9,5 mL de tampon PBS) : étalon **FB 12,5** à 12,5 ng/mL.

Pesée (**me0**) flacon vide avec bouchon,

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

Pesée (**me2**) flacon bouché + tampon + solution de fumonisine ($d = 0,895$).

La concentration exacte en fumonisine pour chaque étalon FB(0,5-12,5) est alors égale à :

$$\text{FB}_{0,5-12,5}(\text{ng/mL}) = \left[\frac{(\text{me}2 - \text{me}1)}{0,895} \times \text{FB} / 2 \right] + \left[\frac{(\text{me}2 - \text{me}1)}{0,895} + \frac{(\text{me}1 - \text{me}0)}{1} \right]$$

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

- Transférer les 10 mL de chaque étalon FB(0,5-12,5) sur une colonne IA préalablement conditionnée. Après rinçage de la colonne par la solution tampon, l'extraction est effectuée par 1,5 mL de méthanol.

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

On obtient 1,5 mL des étalons extraits (fb) de 3 à 75 ng/mL de fumonisine dans le méthanol :

Pesée (**me3**) flacon vide avec bouchon,

Pesée (**me4**) flacon bouché + extrait IA ($d = 0,79$).

Pour chaque étalon, quantité exacte de fumonisine extraite sur IA :

$$q(\text{ng}) = \text{FB}_{0,5-12,5} \times \left[\frac{(\text{me}2 - \text{me}1)}{0,895} + \frac{(\text{me}1 - \text{me}0)}{1} \right]$$

Concentration exacte en fumonisine des extraits IA :

$$\text{fb}_{3-75}(\text{ng/mL}) = q \times \frac{0,79}{(\text{me}4 - \text{me}3)}$$

- Les étalons extraits (fb) contenus dans les flacons de récupération sont ensuite évaporés à sec sous flux d'azote et repris par 200 μL d'un mélange méthanol/eau 50/50 suivant le même protocole que les échantillons.

On obtient 200 μL des étalons concentrés (fbc) à environ 25, 50, 125, 250 et 625 ng/mL de fumonisine dans le mélange méthanol/eau 50/50 :

Pesée (**me5**) flacon (+ bouchon) contenant le résidu sec,

Pesée (**me6**) flacon (+ bouchon) contenant le résidu et le solvant ($d = 0,895$).

Concentration exacte en fumonisine (étalon extrait IA et concentré) :

$$\text{fbc}_{25-625}(\text{ng/mL}) = q \times \frac{0,895}{(\text{me}6 - \text{me}5)}$$

- Transférer 125 μL (exactement connus) de chaque étalon concentré (fbc) dans les flacons pour passeur munis d'un insert.

Pesée (**me7**) du flacon pour passeur (+ insert) vide, avec bouchon

Pesée (**me8**) du flacon pour passeur (+ insert) plein avec bouchon.

Volume exact de l'aliquote transférée :

$$vt (\mu\text{L}) = \frac{(me8 - me7)}{0,895} \times 1000$$

- Procéder à l'analyse des **étalons de dosage concentrés**.

Tenir compte de la dilution effectuée au moment de la dérivation (ajout de 10 μL de réactif aux 125 μL d'étalon) :

Concentration exacte en fumonisine (au moment de l'injection) :

$$fbc_{\text{injectée}} (\text{ng} / \text{mL}) = fbc_{25-625} \times \frac{vt}{vt+10}$$

EXPRESSION DES RÉSULTATS

1- Déterminer la concentration (Ca) en fumonisine des solutions analysées :

Tracer une droite d'étalonnage en prenant en compte la **concentration réelle (fb injectée) ou (fbc injectée)** corrigée de la dilution de l'aliquote au moment de la dérivation. La concentration en fumonisine dans l'aliquote analysée pour les échantillons est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (C lue) et corrigée de la dilution au moment de la dérivation :

$$Ca (\text{ng} / \text{mL}) = Clue \times \frac{vt+10}{vt}$$

avec C lue en ng/mL,

vt (μL) : volume de l'aliquote ($\approx 125 \mu\text{L}$) extrait IA, extrait IA dilué ou extrait IA concentré.

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

$M_p (\text{ng}) = Ca \times Ve$, pour un extrait IA analysé directement ;

ou $M_p (\text{ng}) = Ca \times Vd$, pour un extrait IA dilué ;

ou $M_p (\text{ng}) = Ca \times Vr$, pour un extrait IA concentré ;

avec Ve (mL) : volume de l'extrait IA ;

Vr (mL) : volume de la solution de reprise après évaporation à sec (s'il y a lieu) ;

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

Ca (ng/mL) : concentration en fumonisine de la solution analysée.

La quantité (M_p) est égale à la quantité de fumonisine prélevée dans la coupelle du CIP10.

Calcul de la concentration (C) de fumonisine dans l'air

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

avec : M_p (ng) : masse de fumonisine dans la coupelle de prélèvement

M_b (ng) : masse moyenne de fumonisine dans les blancs de laboratoire

V (L) : volume d'air prélevé.

Calcul de la concentration pondérale des poussières contaminées dans l'air

1- Masse des poussières Q_x (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_x : Mfx - Mix, pour la xe coupelle utilisée

Tiy : la masse initiale de la ye coupelle témoin

Tfy : la masse finale de la ye coupelle témoin

ΔT_y : Tfy - Tiy pour le ye témoin.

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

2- Teneur moyenne en fumonisine dans les poussières Q_{fumo} (en $\mu\text{g}/\text{kg}$) :

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

$$Q_{\text{fumo}} (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{M_{p,x} \times 1000}{Q_x}$$

avec $M_{p,x}$ (ng) : masse de fumonisine dosée dans la coupelle x

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

- [Annexes DONNÉES DE VALIDATION-FB1.pdf](#)
- [Identification des mycotoxines à doser FB1.pdf](#)
- [Chromato Etalon FB1 direct_M-46.pdf](#)