

## AOZ M-339

Cette méthode décrit le prélèvement Actif sur CIP10-I et l'analyse par HPLC détection fluorimétrique de la (des) substance(s) : **AOZ**

**Données de validation** \_\_\_\_\_ Validation complète

**Numéro de la méthode** \_\_\_\_\_ M-339

### Substances

#### Informations générales

Nom	Numéro CAS	Formule Chimique	Masse molaire	Synonymes
Aflatoxine B1	1162-65-8	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312,27	
Aflatoxine B2	7220-81-7	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314,29	
Aflatoxine G1	1165-39-5	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328,27	
Aflatoxine G2	7241-98-7	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330,29	
Ochratoxine A	303-47-9	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>6</sub>	403,83	OTA
Zéaralénone	17924-92-4	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	318,4	ZEA

Substance	données de validation
Aflatoxine B1	Validation_247
Aflatoxine B2	Validation_247
Aflatoxine G1	Validation_247
Aflatoxine G2	Validation_247
Ochratoxine A	Validation_248
Zéaralénone	Validation_248

#### Famille de substances

- AGENTS BIOLOGIQUES
- BIOAEROSOLS
- MYCOTOXINES

#### Principe et informations

La détermination des concentrations en aflatoxines, ochratoxine A ou zéaralénone dans les atmosphères de travail est réalisée par :

- prélèvement de l'aérosol de poussières contaminées à l'aide d'un échantillonneur CIP 10 muni d'un sélecteur de la fraction inhalable haute efficacité, équipé d'une coupelle rotative contenant une mousse filtrante en polyuréthane ;
- pesée des coupelles avant et après prélèvement pour déterminer la masse d'aérosol prélevé ;
- extraction des mycotoxines du média de collecte à l'aide d'un mélange de solvants ;
- purification et concentration de la solution d'extraction sur une colonne d'immunoaffinité AOZ, qui contient les anticorps de l'ochratoxine A, de la zéaralénone et de 4 aflatoxines ;
- analyse de l'une ou l'autre de ces mycotoxines (en 2 injections successives) par chromatographie en phase liquide avec détection fluorimétrique.

**L'intérêt de cette méthode réside dans l'utilisation d'une colonne d'immuno-affinité "multi-mycotoxines" qui permet de rechercher et doser simultanément l'une ou l'autre des mycotoxines sur un même prélèvement d'air, sans avoir à faire le choix *a priori* de la mycotoxine étudiée.**

## Principe de prélèvement et d'analyse

**Etat physique** \_\_\_\_\_ Particules en suspension (liquides ou/et solides)

**Type de prélèvements** \_\_\_\_\_ Actif

**En savoir plus sur ce type de prélèvement** <sup>1</sup>

<sup>1</sup> <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-principe/metropol-prelevement-principe.pdf>

**Nom du dispositif** \_\_\_\_\_ CIP10-I

**Technique analytique** \_\_\_\_\_ CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

**Injecteur** \_\_\_\_\_ PASSEUR A EFFET PELTIER

**Détecteur** \_\_\_\_\_ FLUORIMETRIE

## Domaine d'application

Substance	Quantité minimum sur le dispositif	Quantité maximum sur le dispositif
Aflatoxine B1	180 pg	900 pg
Aflatoxine B2	1500 pg	6000 pg
Aflatoxine G2	60 pg	400 pg
Ochratoxine A	300 pg	1300 pg
Zéaralénone	20 ng	70 ng
Aflatoxine G1	Voir Données de validation-Données 2	Voir Données de validation-Données 2

## Liste des réactifs

- ACETONITRILE
- ACIDE ACETIQUE
- EAU ULTRAPURE
- METHANOL
- SOLUTION COMMERCIALE PBS pH 7,4

**Consignes de sécurité pour les manipulations en laboratoire** <sup>2</sup>

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

## Méthode de prélèvement

Utilisation du dispositif CIP 10 pour le prélèvement d'aérosols<sup>3</sup>

<sup>3</sup> <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-cip10/metropol-prelevement-cip10.pdf>

Nombre d'éléments (dispositifs) composant le dispositif en série \_\_\_\_\_ 1

### Dispositif de prélèvement

Type de dispositif \_\_\_\_\_ ■ CIP10-Inhalable

Support ou substrat de collecte \_\_\_\_\_ ■ FILTRE EN MOUSSE POLYURETHANE

Commentaires, conseils, consignes :

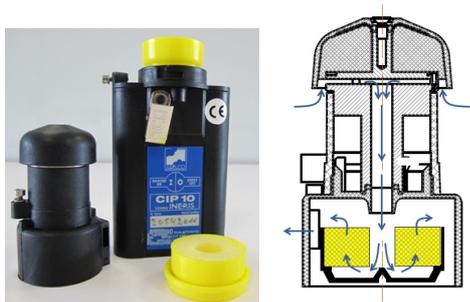


Photo d'un ensemble CIP10-I et représentation **schématique** du sélecteur de la fraction inhalable avec la coupelle rotative en place.

### Conditions de prélèvement

Débit (L/min) \_\_\_\_\_ 10

Temps de prélèvement maximum \_\_\_\_\_ 8

Préparation des dispositifs de prélèvement en vue d'une intervention en entreprise<sup>4</sup>

<sup>4</sup> <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-intervention-preparation/metropol-intervention-preparation.pdf>

## Méthode d'analyse

Principe général de l'analyse en laboratoire<sup>5</sup>

<sup>5</sup> <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-principe/metropol-analyse-principe.pdf>

### Préparation de l'analyse

**Durée de conservation testée et validée pour les prélèvements** \_\_\_\_\_ 30 jour(s)

**Conditions de conservation testée et validée pour les prélèvements :**

A température ambiante

**Nombre d'étapes de préparation** \_\_\_\_\_ 4

**Commentaires sur les étapes :**

Réaliser les **pesées**<sup>6</sup> des coupelles (après prélèvement) avant les étapes de préparation de l'analyse.

<sup>6</sup> <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-gravimetrie/metropol-analyse-gravimetrie.pdf>

Préparation de l'analyse :

La première étape consiste à extraire les poussières contaminées des coupelles, avec un mélange 60/40 acétonitrile/eau (mélange de solvants de l'étape de préparation 1).

La deuxième étape consiste à diluer avec 100 mL de solution PBS.

La troisième étape consiste à fixer et purifier les mycotoxines, sur une colonne d'immunoaffinité (IA -AOZ) contenant des anticorps monoclonaux greffés sur gel de Sépharose. Ces colonnes doivent être **stockées entre 4 °C et 8 °C** mais **non congelées**.

La quatrième étape consiste à extraire les mycotoxines à partir de la colonne IA-AOZ en déposant successivement 1,5 mL de méthanol puis 1,5 mL d'eau à 0.1 % d'acide acétique.

**Durée de conservation testée et validée pour les échantillons préparés** \_\_\_\_\_ 8 jour(s)

**Conditions de conservation testée et validée pour les échantillons préparés :**

Conservation à 4 ± 2 °C

#### 4 étapes de préparation :

Etape de préparation n° 1

**Solvant ou solution** \_\_\_\_\_ ■ MELANGE DE SOLVANTS

**Type de préparation** \_\_\_\_\_ ■ Extraction

**Volume** \_\_\_\_\_ 10 mL

**Ultrasons** \_\_\_\_\_ 15 min

**Autres conditions de préparation :**

Récupération des poussières.

**Commentaires :**

**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 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.

Etape de préparation n° 2

**Solvant ou solution** \_\_\_\_\_ ■ PBS

**Type de préparation** \_\_\_\_\_ ■ Dilution

**Filtration :**

Au besoin

**Commentaires :**

**Dilution avec la solution tampon :** Transférer la totalité de la solution d'extraction dans un flacon de 200 mL avec la solution tampon PBS (rincer plusieurs fois le flacon qui contient la mousse avec une portion de solution tampon, aspirer au travers de la mousse avec une pipette pasteur en matière plastique, transférer dans le flacon de 200 mL).

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

Etape de préparation n° 3

Solvant ou solution \_\_\_\_\_ ■ PBS

Type de préparation \_\_\_\_\_ ■ Purification

**Commentaires :**

**Utilisation des colonnes d'immunoaffinité (conditionnement, rinçages, pratique ou non du blackflush) à adapter, le cas échéant, aux indications du fabricant.**

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*

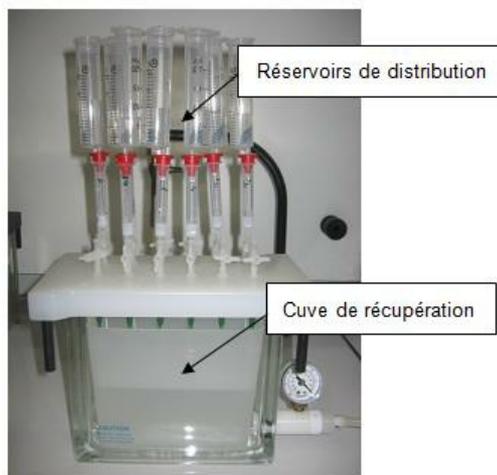
*En cas de difficulté d'écoulement, amorcer celle-ci à l'aide d'un faible vide (ne jamais dépasser 5 bars).*

Éliminer le mélange de solvant 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 2 fois 10 mL (par exemple) d'eau, 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.

Ci-dessous : photo du dispositif.



Étape de préparation n° 4

Solvant ou solution \_\_\_\_\_ ■ METHANOL puis EAU Acidifiée

Type de préparation \_\_\_\_\_ ■ Extraction

**Commentaires :**

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

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

Déposer ensuite 1,5 mL d'eau à 0,1 % d'acide acétique 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 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,

Déposer ensuite 1,5 mL d'eau à 0,1 % d'acide acétique en haut de la colonne, laisser passer au-travers de la colonne par gravité, recueillir dans le flacon. Reproduire cette étape deux fois de suite.

Ci-dessous : photo du dispositif



## Dérivation

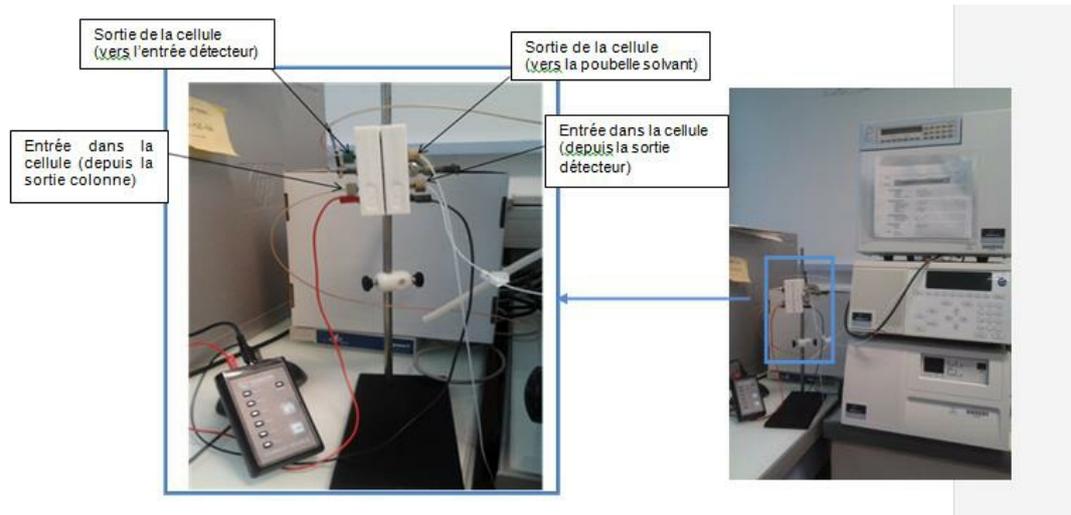
**Moment de la dérivation** \_\_\_\_\_ lors d'un traitement post-colonne

**Réactif** \_\_\_\_\_ ■ BROME

**Nom du/des dérivé(s) formé(s) et numéro(s) CAS correspondants :**

Dérivés bromés des aflatoxines B1 et G1 qui ne fluorescent que très faiblement naturellement (contrairement aux aflatoxines B2 et G2).

**Commentaires :**



Recommandations :

Pour assurer un temps d'analyse optimal du dérivé formé, la longueur de la tubulure entre la cellule de dérivation et l'entrée du détecteur doit être déterminée en fonction de son diamètre interne et du débit. Elle sera par exemple, de 34 cm si le diamètre interne est de 0,5 mm avec un débit 1 mL/min.

Ne jamais laisser la cellule de dérivation au brome sous un flux d'acétonitrile pur.

Stocker la cellule de dérivation au brome sous 100 % d'eau après l'avoir conditionnée à faible débit sous acétonitrile/eau v/v (50/50).

## Description

Montage d'un système de dérivation post-colonne (Kobra cell) ou équivalent.

### 1 condition analytique :

Condition analytique n° 1

Les conditions analytiques utilisées lors du développement de la méthode sont fournies avec les données de validation.

**Technique analytique** \_\_\_\_\_ ■ CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

**Injecteur** \_\_\_\_\_ ■ PASSEUR A EFFET PELTIER

**Colonne** \_\_\_\_\_ ■ PHASE INVERSE C18

**Détecteur** \_\_\_\_\_ ■ FLUORIMETRIE

**Phase mobile** \_\_\_\_\_ ■ ACETONITRILE  
 ■ EAU  
 ■ METHANOL

**Commentaires, conseils ou conditions particulières :**

L'analyse se fait en deux temps :

- La première injection correspond à l'analyse de l'ochratoxine et/ou de la zéaralénone sans dérivation, avec la même phase mobile mais des longueurs d'onde d'excitation et d'émission programmées, adaptées au mélange des deux substances. Les longueurs d'onde choisies peuvent donc ne plus correspondre à celles pour laquelle la réponse de chaque substance est optimale.

- Une 2<sup>ème</sup> injection du même extrait, sur la même colonne mais avec une autre phase mobile et des conditions de détection fluorimétrique différentes (dérivation post-colonne et longueurs d'onde d'excitation et d'émission adaptées), permet l'analyse des aflatoxines.

## Étalonnage et expression des résultats

La technique d'étalonnage utilisée lors du développement de la méthode revêt un caractère obligatoire pour atteindre le niveau de performances indiqué (sensibilité, rendements, précision).

### Méthodes d'étalonnage pour la quantification des polluants<sup>7</sup>

<sup>7</sup><https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-etalonage/metropol-analyse-etalonage.pdf>

Principe d'étalonnage \_\_\_\_\_ externe

Solvant de l'étalon \_\_\_\_\_ ■ Même solvant que celui des échantillons

### Commentaires:

Les solutions étalons sont préparées à partir du produit de référence et purifiées et concentrées (comme les échantillons) sur colonne d'immunoaffinité.

Les informations détaillées sur l'étalonnage sont fournies avec les données de validation (Validation-Compléments pour l'ochratoxine et la zéaralénone ou Validation-Compléments pour les aflatoxines).

### Calcul de la concentration atmosphérique<sup>8</sup>

<sup>8</sup><https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-resultat-calcul-concentration/metropol-resultat-calcul-concentration.pdf>

## Contacts

metropol@inrs.fr

## Bibliographie

## Historique

Version	Date	Modification(s) faisant l'objet de la nouvelle version
M-339/V01	mars 2016	Création
M-339/V02	mars 2018	Complément d'informations dans la méthode d'analyse