

Allergènes M-441

Cette méthode décrit l'analyse de la (des) substance(s) : **Allergènes** par UHPLC-MS/MS dans les **gants**.

Données de validation _____ Validation complète

Numéro de la méthode _____ M-441

Substances

Informations générales

Nom	
Allergènes	
Substance	données de validation
Allergènes	Validation_345

Famille de substances

- ALLERGENES

Principe et informations

Cette méthode permet la recherche d'un allergène ou d'une famille d'allergènes dans un gant. Elle a été validée pour les 43 substances dont la liste se trouve dans les données de validation.

La méthode nécessite la maîtrise d'un logiciel de traitement de données (MassLynx[®] WATERS[™] ou équivalent).

Elle repose sur l'extraction du gant au solvant, la préparation de **11 mélanges étalons stabilisés et leurs injections successives** dans les conditions MS/MS optimisées pour les allergènes qu'ils contiennent, **et enfin l'injection systématique de l'échantillon**, dans chacune des conditions MS/MS optimisées pour les différentes familles d'allergènes.

Principe de prélèvement et d'analyse

Etat physique _____ Solide

Type de prélèvements _____ Produit massif

Technique analytique _____ CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ULTRA HAUTE PERFORMANCE

Injecteur _____ PASSEUR AUTOMATIQUE

Détecteur _____ SPECTROMETRE MS/MS

Liste des réactifs

- ACETONE
- ACETONITRILE
- ACIDE ACETIQUE
- EAU ULTRAPURE
- METHANOL
- SULFATE DE ZINC
- THF

Consignes de sécurité pour les manipulations en laboratoire ¹

¹ <https://www.inrs.fr/media.html?refiNRS=ED%20953>

Méthode d'analyse

Préparation de l'analyse

Commentaires sur les étapes :

- Découpe du gant
- Mise en solution de l'échantillon
- Extraction des allergènes aux ultra-sons
- Filtration de la solution extraite avant analyse

Conditions de conservation testée et validée pour les échantillons préparés :

L'analyse doit être immédiate.

3 étapes de préparation :

Etape de préparation n° 1

Type de préparation _____ ■ Découpe

Commentaires :

Découper le gant en morceaux de 2 à 3 mm, puis en peser une masse $m = 0,5$ g.

Etape de préparation n° 2

Solvant ou solution _____ ■ METHANOL

Type de préparation _____ ■ Mise en solution

Volume _____ 5 mL

Commentaires :

Pour quelques allergènes, le solvant de la solution mère est différent. Voir les données de validation.

Etape de préparation n° 3

Type de préparation _____ ■ Extraction

Commentaires :

L'extraction se fait aux ultra-sons pendant 15 minutes à température ambiante.

Filtrer ensuite une partie aliquote sur un filtre en PTFE de 0,2 μ m. Transférer dans un flacon de 2 mL pour l'injection.

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 LIQUIDE ULTRA HAUTE PERFORMANCE
Injecteur _____	▪ PASSEUR AUTOMATIQUE
Colonne _____	▪ En PEEK ▪ PHASE INVERSE
Détecteur _____	▪ SPECTROMETRE MS/MS
Phase mobile _____	▪ ACETONITRILE ▪ ACIDE ACETIQUE ▪ EAU TAMPONNEE ▪ SULFATE DE ZINC

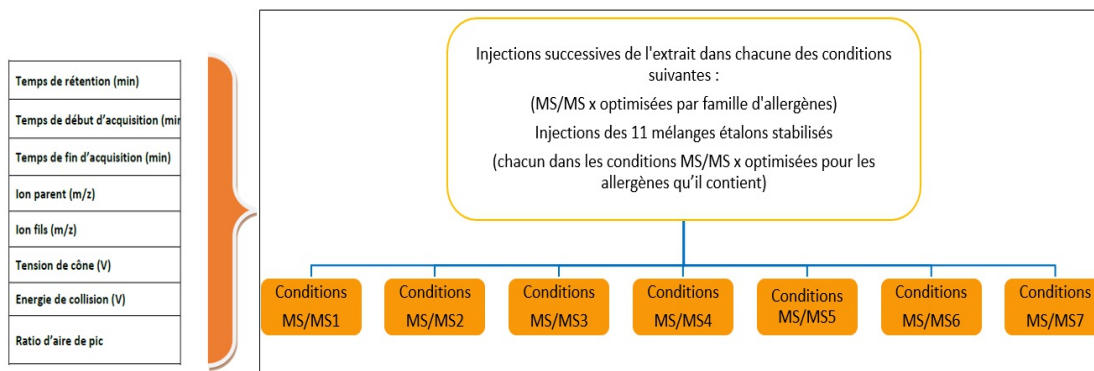
Commentaires, conseils ou conditions particulières :

Le protocole repose sur la comparaison du résultat d'analyse de la solution extraite, aux résultats obtenus pour l'étalon préparé pour chacune des substances recherchées.

Le protocole, schématisé ci-dessous, comprend globalement une extraction à l'aide de méthanol, l'injection dans le système UHPLC-MS/MS de la solution extraite et son analyse dans 7 jeux de conditions optimisées. L'analyse des substances pures (étalons analytiques) est effectuée au cours du même essai, dans les conditions optimisées pour chaque allergène. Ces conditions sont détaillées dans les données de validation.

- Injections des 11 mélanges étalons stabilisés (chacun contenant plusieurs des 43 substances recherchées associées de façon ce qu'elles ne réagissent pas entre elles) successivement dans les conditions MS/MS optimisées pour les allergènes concernés.
- Injections systématiques de l'extrait dans chacune des conditions MS/MS 1 à 7 optimisées (pour les différentes familles d'allergènes).

La composition de ces mélanges et les conditions d'analyse (MS/MS 1 à 7) recommandées pour chaque mélange étalon sont décrites dans les données de validation.



Etalonnage et expression des résultats

La comparaison entre les spectres obtenus pour l'échantillon extrait et la réponse des allergènes étalons, permet la confirmation, ou non, de leur présence, l'identification et le dosage semi-quantitatif des allergènes extraits du gant.

Principe d'étalonnage _____ externe

Commentaires :

Préparation d'une solution mère (environ 2,5 mg/mL) de chaque substance pure dans un solvant adapté * ;

Dilution dans le méthanol (ou un solvant plus adapté*) : solution fille d'un allergène seul.

Mélange des solutions-filles : mélanges étalons stabilisés.

Analyse de l'échantillon et des étalons dans des conditions strictement identiques*.

* Les conditions opératoires optimisées, les solvants recommandés et la composition des mélanges étalons stabilisés, sont indiqués dans les données de validation.

Exemple fourni pour le bis-dibutyldithiocarbamate de zinc (ZDBC)

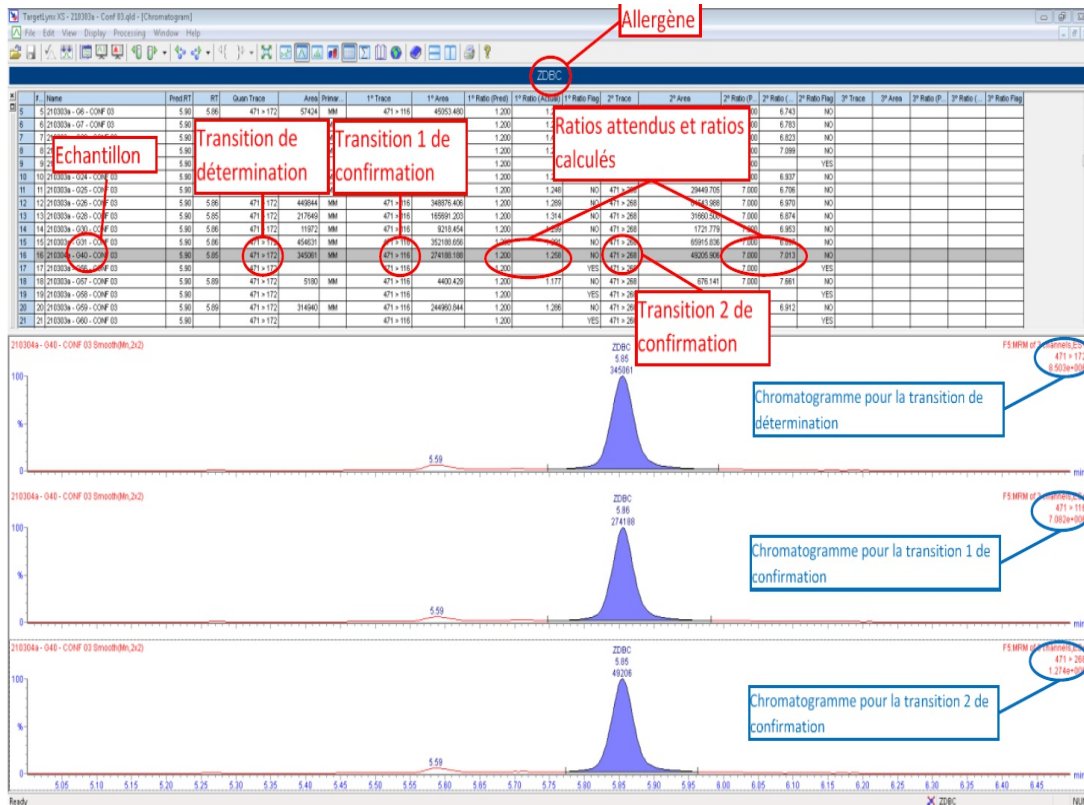
Masse mono-isotopique = 474 g/mol

Mode de détection ES+

Ion parent : m/z=471

Ion fils : m/z = 116, m/z = 172 et m/z = 268.

La fenêtre TargetLynx® de fin d'analyse du ZDBC est la suivante



La transition 471>172 est la transition de détection et de quantification,
 Les transitions 471>116 et 471>268 sont des transitions de confirmation.
 A_{471>172} est l'aire du pic pour la transition 471>172,
 A_{471>116} est l'aire du pic pour la transition 471>116,
 A_{471>268} est l'aire du pic pour la transition 471>268,

La confirmation de l'identité de l'allergène dans l'extrait nécessite la comparaison des ratios de réponse pour chaque transition avec ceux obtenus pour la substance pure analysée dans les mêmes conditions :

- les ratios attendus (obtenus pour ZDBC étalon) sont les suivants :

$$R1 = \frac{A_{471>172}}{A_{471>116}} = 1,200$$

$$R2 = \frac{A_{471>172}}{A_{471>268}} = 7,000$$

- les ratios calculés pour le ZDBC dans l'échantillon confirment l'identité de la molécule extraite :

$$R1 \text{ ech} = \frac{A_{471>172}}{A_{471>116}} = 1,258$$

$$R2 \text{ ech} = \frac{A_{471>172}}{A_{471>268}} = 7,013$$

- Le dosage du ZDBC en $\mu\text{g/g}$ repose classiquement sur le calcul suivant :

$$[(A_{ech}/A_{ref}) * C] * v / m$$

avec :

A ech = aire du pic (pour la transition de quantification) obtenu pour l'échantillon extrait

A ref = aire du pic (pour la transition de quantification) obtenu pour la solution-fille de référence

C = concentration de la solution-fille de référence $\mu\text{g/mL}$

V = volume de la solution d'extraction du gant mL

m = masse (g) de l'échantillon gant soumis à l'extraction.

Le résultat de la recherche peut être fourni

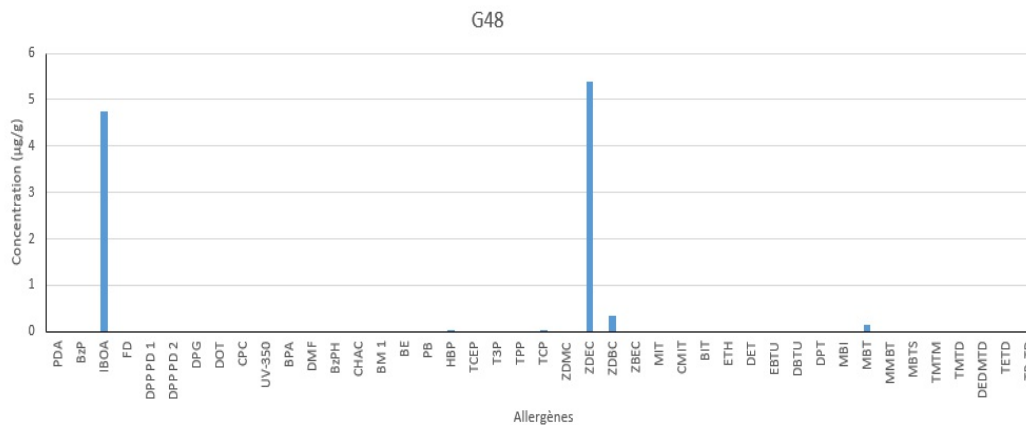
- sous la forme d'un tableau détaillé présentant pour un gant donné, les allergènes identifiés en laboratoire et leur teneur respective ramenée au gant échantillon :

Echantillon	4-(Benzyloxy)phénol ou BzPH ($\mu\text{g/g}$)	Phosphate de triphényle ou TPP ($\mu\text{g/g}$)
G33	1,33	0,90

- sous la forme de données synthétisées :

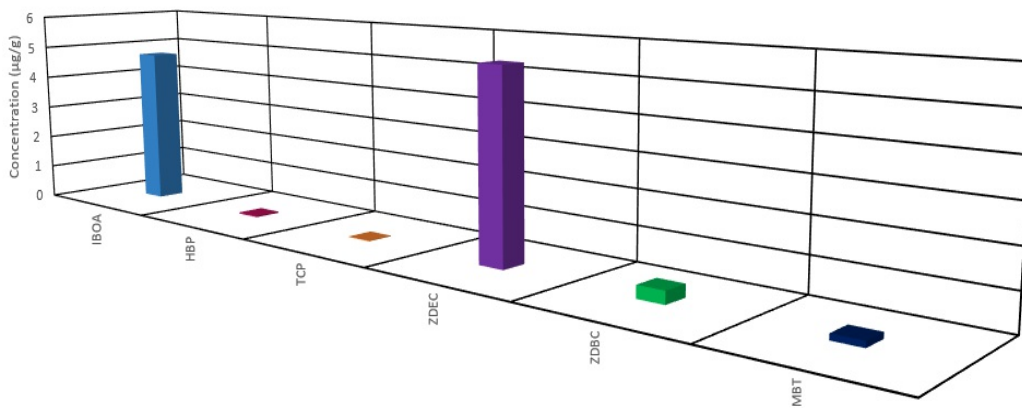
Gant échantillon	Nb d'allergènes trouvés	Concentration mini ($\mu\text{g/g}$) parmi les non nulles	Concentration maxi ($\mu\text{g/g}$)
G05	5	0,23	161,88

- sous la forme d'un histogramme où les allergènes en faible concentration n'apparaissent pas, compte tenu des écarts entre les concentrations respectives :



- sous la forme d'un histogramme groupé, plus visuel, avec des données de type logarithmique, qui permet de faire apparaître l'ensemble des molécules détectées :

G48



Contacts

metropol@inrs.fr

Bibliographie

Historique

Version	Date	Modification(s) faisant l'objet de la nouvelle version
M-441 V01	Décembre 2021	Création de la méthode