

Liste des substances utilisant cette analyse

Nom	Numéro CAS
Aflatoxine B1;Aflatoxine B2;Aflatoxine G1;Aflatoxine G2;Ochratoxine A;Zéaralénone	1162-65-8;7220-81-7;1165-39-5;7241-98-7;303-47-9;17924-92-4

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**¹ des coupelles (après prélèvement) avant les étapes de préparation de l'analyse.

¹<https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-gravimetrique/metropol-analyse-gravimetrique.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°

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°

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).

Étape de préparation n°

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

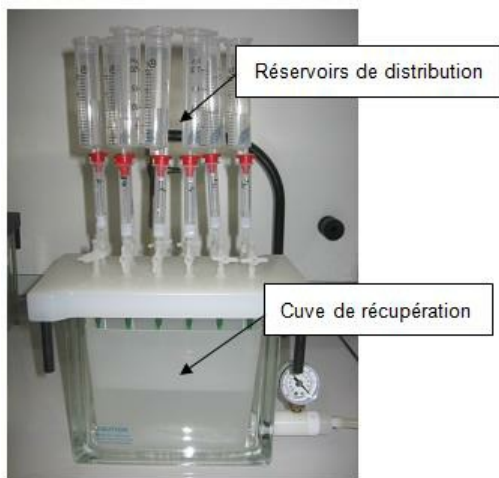
En cas de difficulté d'écoulement, amorcer celle-ci à l'aide d'un faible vide (ne jamais dépasser 5 bars).

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°

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 du 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.

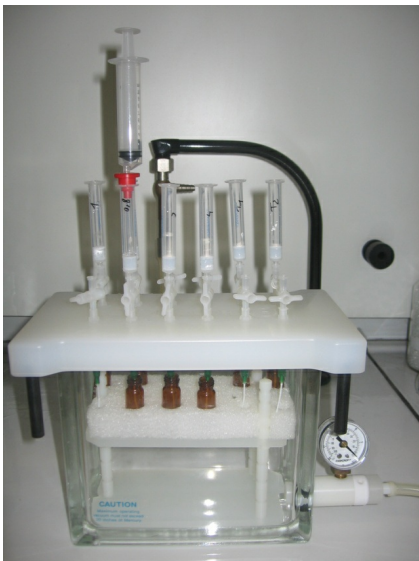
Déposer 1,5 mL de méthanol en haut de la colonne, laisser passer au-travers de la colonne par gravité, recueillir dans le flacon.

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

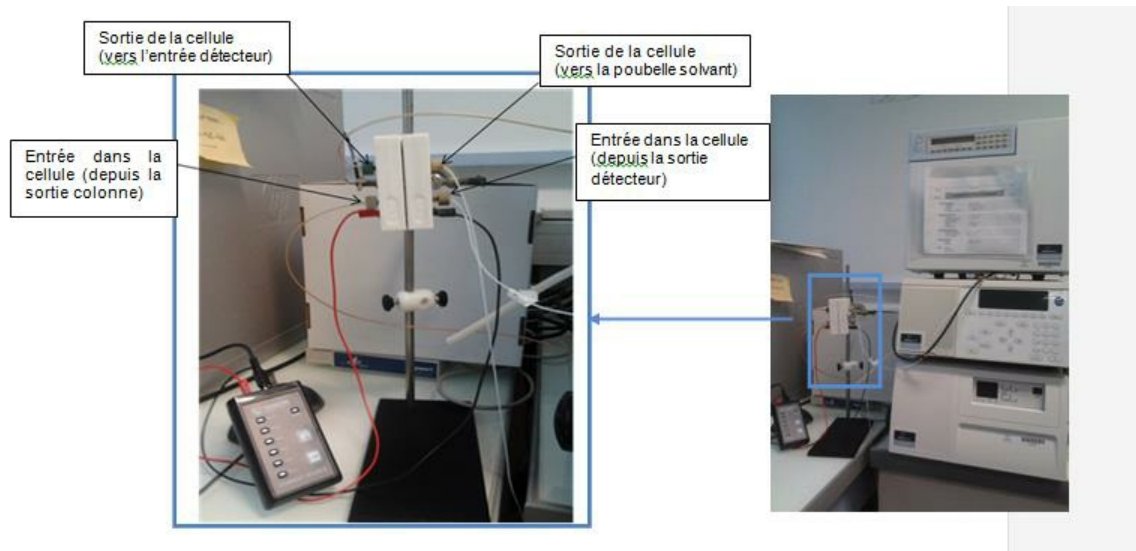
Moment de la dérivation _____ lors d'un traitement post-colonne

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.

Condition analytique n°

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^{ème} 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 polluants²

²<https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-etalonnage/metropol-analyse-etalonnage.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 atmosphérique³

³<https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-resultat-calcul-concentration/metropol-resultat-calcul-concentration.pdf>

Compléments :