

Liste des substances utilisant cette analyse

Nom	Numéro CAS
Fumonisine B1	116355-83-0

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 _____ 5

Commentaires sur les étapes :

Avant toutes étapes, réaliser les **pesées**¹ des coupelles après prélèvement.

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

La première étape consiste à extraire FB1 des mousses avec un mélange 75/25 méthanol/eau.

La deuxième étape consiste à diluer avec 40 mL de solution PBS.

La troisième étape consiste à fixer et purifier la fumonisine sur une colonne d'immunoaffinité (IA), contenant des anticorps monoclonaux spécifiques, 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 la fumonisine à partir de la colonne IA en déposant 1,5 mL de méthanol.

La cinquième étape consiste à concentrer **si nécessaire** par évaporation à sec et reprise par un mélange 50/50 méthanol/eau.

Durée de conservation testée et validée pour les échantillons préparés _____ 8 jour(s)

Conditions de conservation testée et validée pour les échantillons préparés :

A conserver à 4 °C

5 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).

Etape 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

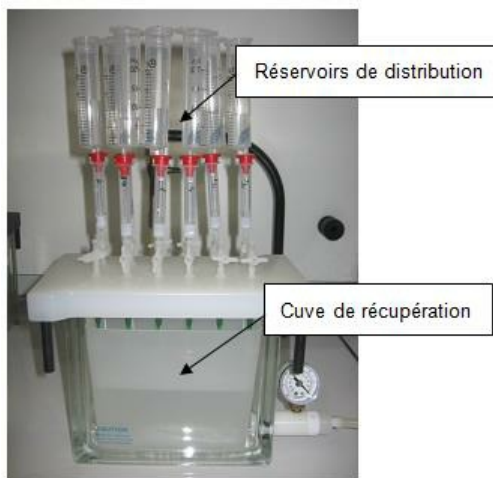
En cas de difficulté d'écoulement, amorcer celle-ci à l'aide d'un faible vide (ne jamais dépasser 5 bars).

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.



Etape de préparation n°

Solvant ou solution _____ ■ MELANGE DE SOLVANTS

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 le solvant 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, 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.

Ci-dessous : photo du dispositif.



Etape de préparation n°

Type de préparation _____ ■ Concentration

Evaporations _____ Température 35 °C Gaz d'évaporation Azote

Commentaires :



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°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 de solvant.

Dérivation

Moment de la dérivation _____ • analyse pré-colonne

Réactif _____ ■ o-PHTALDIALDEHYDE(OPA)

Commentaires :

Préparation du réactif de dérivation (OPA/MCE)

Dissoudre 40 mg d'o-phthalaldéhyde (OPA) dans 1 mL de méthanol, diluer avec 5 mL de tétraborate de disodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 0,1 M, ajouter 50 µL de 2-mercaptoéthanol (MCE), Protéger le réactif OPA/MCE de la lumière, mélanger et homogénéiser par agitation pendant au moins 20 minutes. Le réactif doit être utilisé dans les 24 heures.

- Programmation de la dérivation à l'aide du réactif OPA/MCE : 10 µL de réactif sont prélevés dans le flacon dédié et rajoutés au flacon contenant 125 µL d'un échantillon à analyser. L'injection dans la colonne chromatographique doit se faire en moins de 4 minutes.

Description

Dérivation pré-colonne

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 _____	▪ EAU ▪ METHANOL

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-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 atmosphérique³

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

Compléments :