

## Données de validation

Numéro de fiche	Titre
METROPOL_45	Aflatoxines M-45

### Données de validation principales

#### Généralités

Substance \_\_\_\_\_ Aflatoxine B1  
 Débit prélèvement \_\_\_\_\_ 10 L/min

#### Conditions analytiques

##### 1 injecteur :

PASSEUR A EFFET PELTIER

Température d'utilisation \_\_\_\_\_ 20 °C

Volume injecté \_\_\_\_\_ 80 µL

Programme de température \_\_\_\_\_ non

##### 1 colonne :

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

Longueur \_\_\_\_\_ 25 cm

Diamètre \_\_\_\_\_ 4,6 mm

Epaisseur de film \_\_\_\_\_ 5 µm

Température d'utilisation \_\_\_\_\_ 40 °C

Programme de température \_\_\_\_\_ non

##### 1 détecteur :

FLUORIMETRIE

Longueur d'onde 1 (ou excitation) en nm \_\_\_\_\_ 365

Longueur d'onde 2 (ou émission) en nm \_\_\_\_\_ 435

Phase mobile	Pourcentage	Présence d'un tampon	Nature tampon	Commentaires / Débit
ACETONITRILE	20	non		1 mL/min
METHANOL	20	non		
EAU	60	oui	119 mg de bromure de potassium et 350 µL d'acide nitrique 4M par litre de phase mobile	

**Recommandations particulières :**

PRÉCAUTIONS PARTICULIÈRES :

Se reporter à l'aide-mémoire technique « Manipulations dans les laboratoires de chimie. **Risques et prévention** <sup>1</sup><sup>1</sup> <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%20953>

Les Aflatoxines sont classées cancérogènes du groupe 1 par le Centre International pour la Recherche sur le Cancer (CIRC). Une procédure de décontamination de la verrerie et des paillasse (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 \_\_\_\_\_ &lt; 5%

**Limite de détection (LD) :**

Estimation de la limite de détection analytique basée sur un rapport signal/bruit égal à 3, soit 0,7 à 1,7 pg/mL selon l'aflatoxine

**Limite de quantification (LQa) :**

Limite de quantification 15 pg/mL pour chacune des aflatoxines.

**Taux de récupération**

Taux de récupération moyen compris entre 85 % et 100 % selon l'aflatoxine.

**Conservation après prélèvement****Méthode appliquée / conditions de prélèvement :**

Niveau de charge indiquée en nanogramme pour chacune des aflatoxines.

q1

Niveau de charge 1 (q1) \_\_\_\_\_ 0,028 ng

q2

Niveau de charge 2 (q2) \_\_\_\_\_ 0,125 ng

**Temps de conservation**

Temps 1 \_\_\_\_\_ 30 jour(s)s à 20 °C

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

**Calcul d'incertitude**

Taux de récupération moyen égal à 95 % pour toutes les aflatoxines.

**Informations complémentaires****Compléments d'information :**

Afin de réduire l'exposition de la population par voie orale, la Commission Européenne a fixé par Directive CE n° 2006/1881, une limite de :

- 2 µg/kg d'aflatoxine B1 et 4 µg/kg pour la somme des aflatoxines (B1, B2, G1, G2) dans les arachides, noix, fruits séchés et céréales,

- 8 µg/kg pour B1 et 15 µg/kg pour la somme des aflatoxines dans les amandes et pistaches.

Traitement des dispositifs de prélèvement

**Extraction des aflatoxines 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 60/40).

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 60/40) 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 PE 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 30 mL de solution tampon pH 7,4 (rincer plusieurs fois le flacon qui contient la mousse avec une portion de solution tampon, aspirer avec une pipette Pasteur en PE, transférer dans le flacon de 200 mL).

L'échantillon est maintenant en solution dans 43 mL d'un mélange méthanol/ eau tamponnée 20/80.

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 d'aflatoxines 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**

**Nota :** Pour une plus grande précision de l'analyse, les récupérations en flacons, les transferts et les dilutions, décrits à partir de cette étape, pourront être réalisés par gravimétrie (sur une balance calibrée) :

**Pesée flacon vide avec bouchon,**

**Pesée flacon bouché + solvant**

**Pesée flacon bouché + solvant + aflatoxines.**

## Fixation des Aflatoxines 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 aflatoxines 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 Aflatoxines 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 2 fois 0,5 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 aflatoxines :

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<sup>er</sup> 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 (concentration atmosphérique a priori supérieure au domaine d'application) :

- Déposer à nouveau 1 ml d'eau en haut de la colonne, 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 (selon les estimations préalablement effectuées) 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

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

Volume équivalent de l'extrait IA dilué :

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

- Transférer une aliquote de l'extrait IA ou de l'extrait dilué dans les flacons pour passeur (avec insert).

■ Procéder à l'analyse de l'**extrait IA** ou de l'**extrait dilué**.

**2<sup>ème</sup> 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°C, pression 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 45 minutes environ
  - 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 d'éluant chromatographique (d=0,915)

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

Pesée ( **m4** ) flacon (+ bouchon), contenant le résidu et l'éluant

Volume exact de l'extrait IA concentré :

$$V_r \text{ (mL)} = \frac{(m_4 - m_3)}{0,915}$$

- Agiter les flacons pendant 10 secondes sur le mélangeur vortex.
- Transférer une aliquote 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.
- Procéder à l'analyse de l'**extrait concentré**.

## Etalonnage

**Préparer une gamme de solutions étalon** à partir de la solution-mère à 250 ng/mL de chaque aflatoxine, 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 ACN/H<sub>2</sub>O (60/40). On obtient l'étalon de travail **AF à 2,5 ng/mL**.
- Effectuer une dilution au 1/20 de l'étalon de travail AF : 1 mL ajouté à 19 mL d'un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (20/80). On obtient l'étalon **AF/20 à 125 pg/mL**.

### 1<sup>er</sup> cas : Extraits IA sans étape de concentration

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

- Préparer les étalons de dosage en effectuant (par exemple) les dilutions suivantes dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (20/80) :
  - une dilution au 1/100 de AF/20 (100 µL + 9,9 mL de mélange) : étalon **AF 1,2** à 1,2 pg/mL,
  - une dilution au 1/30 de AF/20 (300 µL + 9,7 mL de mélange) : étalon **AF 4** à 4 pg/mL,
  - une dilution au 1/10 de AF/20 (1 mL + 9 mL de mélange) : étalon **AF 12** à 12 pg/mL,
  - une dilution au 1/4 de AF/20 (2,5 mL + 7,5 mL de mélange) : étalon **AF 30** à 30 pg/mL,
  - une dilution au 1/2 de AF/20 (5 mL + 5 mL de mélange) : étalon **AF 60** à 60 pg/mL.

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

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

Pesée ( **me1** ) flacon bouché + mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (densité d= 0,958),

Pesée ( **me2** ) flacon bouché + mélange MeOH/H<sub>2</sub>O + solution d'aflatoxines (d= 0,958).

**La concentration exacte en aflatoxines pour chaque étalon AF 1,2-60 est alors égale à :**

$$AF_{1,2-60} \text{ (pg / mL)} = \frac{(me_2 - me_1) \times AF_{/20}}{(me_2 - me_0)}$$

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 AF (1,2-60) sur une colonne IA préalablement conditionnée. Après rinçage de la colonne par la solution tampon, l'extraction est effectuée par 0,5 mL de méthanol 2 fois de suite, puis 1 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 2 mL des étalons extraits (af) à environ **6, 20, 60, 150 et 300 pg/mL** (concentration exactement connue) d'aflatoxines dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O 50/50 :

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

Pesée ( **me4** ) flacon plein avec bouchon.

Pour chaque étalon, quantité exacte d'aflatoxines extraites sur IA :

$$q \text{ (pg)} = AF_{1,2-60} \times \frac{(me_4 - me_3)}{0,958}$$

Concentration exacte en aflatoxines (après IA) :

$$af_{6-300} \text{ (pg / mL)} = q \times \frac{0,895}{(me_4 - me_3)}$$

- Transférer une aliquote de chaque étalon extrait (e) dans les flacons pour passeur munis d'un insert.

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

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

Étalonnage des échantillons qui nécessitent que l'extrait IA soit concentré

- Préparer les étalons de dosage en effectuant (par exemple) les dilutions suivantes dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (20/80) :

- une dilution au 1/200 de AF/20 (50 µL + 9,95 mL de mélange) : étalon **AF 0,6** à 0,6 pg/mL,
- une dilution au 1/100 de AF/20 (100 µL + 9,9 mL de mélange) : étalon **AF 1,2** à 1,2 pg/mL,
- une dilution au 1/50 de AF/20 (200 µL + 9,8 mL de mélange) : étalon **AF 2,4** à 2,4 pg/mL,
- une dilution au 1/30 de AF/20 (300 µL + 9,7 mL de mélange) : étalon **AF 4** à 4 pg/mL,
- une dilution au 1/20 de AF/20 (500 µL + 9,5 mL de mélange) : étalon **AF 6** à 6 pg/mL

*Pesée (me0) flacon vide avec bouchon,*

*Pesée (me1) flacon bouché + mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (densité d=0,958),*

*Pesée (me2) flacon bouché + solvant + solution d'aflatoxines (d=0,958).*

**La concentration exacte en aflatoxines pour chaque étalon AF 0,6-6 est alors égale à :**

$$AF_{0,6-6} \text{ (pg / mL)} = \frac{(me2 - me1) \times AF_{/20}}{(me2 - me0)}$$

- Transférer les 10 mL de chaque étalon de dosage sur une colonne IA préalablement conditionnée. L'extraction est effectuée (2 fois de suite) par 1 mL de méthanol pur.

- Recueillir dans des flacons identifiés et mélanger.

On obtient 1 mL des étalons extraits (af) à environ 6, 12, 24, 40 et 60 pg/mL d'aflatoxines dans le méthanol :

*Pesée (me3) flacon vide avec bouchon,*

*Pesée (me4) flacon plein avec bouchon.*

*Pour chaque étalon, quantité exacte d'aflatoxines extraites sur IA :*

$$q \text{ (pg)} = AF_{0,6-6} \times \frac{(me2 - me1)}{d2}$$

Concentration exacte en aflatoxines des extraits IA :

$$af_{6-60} \text{ (pg / mL)} = q \times \frac{0,79}{(me4 - me3)}$$

- Les étalons extraits af (6-60) contenus dans les flacons de récupération sont ensuite évaporés à sec sous flux d'azote et repris par 200 µL d'éluant chromatographique (d=0,915) suivant le même protocole que les échantillons.

On obtient 200 µL des étalons concentrés (afc) à environ **30, 60, 120, 200 et 325 pg/mL** d'aflatoxine(s) dans l'éluant chromatographique.

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

*Pesée (me6) flacon (+ bouchon), contenant le résidu et l'éluant.*

*Concentration exacte en aflatoxines (étalon extrait IA et concentré) :*

$$afc_{30-325} \text{ (pg / mL)} = q \times \frac{0,915}{(me6 - me5)}$$

- Transférer une aliquote de chaque étalon concentré (afc) dans les flacons pour passeur munis d'un insert.

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

## EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 1- Déterminer la concentration (Ca) en aflatoxine(s) des solutions analysées :

Tracer une droite d'étalonnage en prenant en compte la **concentration exacte (af) ou (afc) des étalons injectés**.

La concentration en aflatoxine(s) C<sub>a</sub> (pg/mL) dans la solution analysée est déterminée à partir de la droite d'étalonnage.

### 2- Calculer la quantité d' aflatoxine(s) (Mp) extraite sur IAC :

M<sub>p</sub> (pg) = Ca x Ve, pour un extrait IA analysé directement ;

ou M<sub>p</sub> (pg) = Ca x Vd, pour un extrait IA dilué ;

ou M<sub>p</sub> (pg) = Ca x 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 (pg/mL) : concentration en aflatoxine(s) de la solution analysée.

La quantité (M<sub>p</sub>) est **égale à la quantité d'aflatoxine(s) prélevée dans la coupelle du CIP10**.

## Calcul de la concentration (C) d'aflatoxine dans l'air

$$C (\text{pg}/\text{m}^3) = (M_p - M_b) \times 1/V \times 1000$$

avec :  $M_p$  ( **pg** ) : masse d'aflatoxine(s) dans la coupelle de prélèvement

$M_b$  ( **pg** ) : masse moyenne d'aflatoxine(s) 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 :

$$Q_x = \Delta M_x - \frac{1}{n} \sum_{y=1}^n \Delta T_y$$

avec, pour n témoins pesés :

Mix : la masse initiale de la x<sup>e</sup> coupelle utilisée

Mfx : la masse finale de la x<sup>e</sup> coupelle utilisée

$\Delta M_x$  : Mfx - Mix, pour la x<sup>e</sup> coupelle utilisée

Tiy : la masse initiale de la y<sup>e</sup> coupelle témoin

Tfy : la masse finale de la y<sup>e</sup> coupelle témoin

$\Delta T_y$  : Tfy - Tiy pour le y<sup>e</sup> témoin.

Soit, pour 3 témoins :

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

### 2- Teneur moyenne en aflatoxine(s) dans les poussières $Q_{afla}$ (en $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) :

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

$$Q_{afla} (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{M_{p_x}}{Q_x}$$

avec  $M_{p_x}$  (pg) : masse d'aflatoxine(s) dosée dans la coupelle x

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

- [Annexes DONNÉES DE VALIDATION-Aflatoxines.pdf](#)
- [Exemple Chromato Afla Méthode AOZ M 45 .pdf](#)
- [Fiche technique Aflas matrices.pdf](#)