

Données de validation

Numéro de fiche	Titre
METROPOL_48	Ochratoxine A M-48

Données de validation principales

Généralités

Substance _____ Ochratoxine A
 Débit prélèvement _____ 10 L/min

Conditions analytiques

1 injecteur :

PASSEUR A EFFET PELTIER

Température d'utilisation _____ 10 °C
 Volume injecté _____ 80 µL
 Programme de température _____ non

1 colonne :

Colonne _____ ■ PHASE INVERSE C18
 Nature phase _____ ■ ALLTIMA
 Granulométrie _____ 5 µm
 Longueur _____ 15 cm
 Diamètre _____ 3 mm
 Température d'utilisation _____ 40 °C
 Programme de température _____ non

1 détecteur :

FLUORIMETRIE

Longueur d'onde 1 (ou excitation) en nm _____ 333
 Longueur d'onde 2 (ou émission) en nm _____ 470

Phase mobile	Pourcentage	Présence d'un tampon	Nature tampon	Commentaires / Débit
ACETONITRILE	49,5	non	--, acide acétique 1%	1 mL/min
EAU	49,5	oui		

Recommandations particulières:

PRÉCAUTIONS :

Se reporter à l'aide-mémoire technique " **Manipulations dans les laboratoires de chimie** ¹".

¹ <http://Risques et prévention>

L'OTA est classée 2B (Cancérogène possible) par le Centre International pour la Recherche sur le Cancer (CIRC). Une procédure de décontamination de la verrerie et des paillasses (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 _____ < 7,5%

Limite de détection (LD) :

Estimation de la limite de détection analytique basée sur un rapport signal/bruit égal à 3, soit 25 pg/mL.

Limite de quantification (LQa) :

75 pg/mL

Taux de récupération

	essai 1
KT Moyen(%)	90

Conservation après prélèvement

q1

Niveau de charge 1 (q1) _____ 0,236 ng

q2

Niveau de charge 2 (q2) _____ 0,6 ng

Temps de conservation

Temps 1 _____ 30 jour(s)(s) à 20 °C

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

Informations complémentaires

Le règlement CE n° 472/2002 du 12/02/2002 fixe des teneurs maximales en ochratoxine A pour les produits commercialisés : < 5 µg/kg pour les céréales et < 3 µg/kg pour les produits à base de céréales.

Traitement des dispositifs de prélèvement

Extraction de l'OTA à partir des coupelles de prélèvement

- **Désorption de la mousse avec le mélange acétonitrile/eau :** Transférer la mousse dans un flacon de 20 mL avec 10 mL de solvant d'extraction (acétonitrile/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 de solvant d'extraction (acétonitrile/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 matière plastique et la transférer dans le flacon qui contient la mousse.

- **Dilution avec la solution tampon :** Transférer la totalité de la solution extraite (≈ 13 mL) dans un flacon de 200 mL avec 150 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 matière plastique, transférer dans le flacon de 200 mL).

L'échantillon est maintenant en solution dans 163 mL d'un mélange acétonitrile /eau tamponnée. Le pourcentage d'acétonitrile doit être inférieur à 5 % pour permettre l'extraction sur colonne d'immunoaffinité.

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

Conditionnement des colonnes d'immunoaffinité (IA)

- Laisser chaque colonne se stabiliser à température ambiante pendant 20 minutes puis éliminer la solution de stockage par simple gravité dans une cuve de récupération prévue à cet effet. Laisser cette cuve en place pour la 1^o phase de l'extraction (élimination de la solution tampon).
- Laver la colonne par passage de 10 mL de solution tampon. Éliminer cette eau de lavage (par simple gravité) dans la cuve de récupération.

(Nota : amorcer si besoin l'élution, en douceur, à l'aide d'une pipette Pasteur en verre).

Nota : Pour une plus grande précision de l'analyse, les récupérations en flacons décrites à partir de cette étape, pourront être réalisées par gravimétrie (sur une balance calibrée) :

Fixation de l'OTA 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 ACN/ H₂O tamponnée par soutirage sous vide (ne pas amener à sec) dans la cuve de récupération → l'OTA est maintenant liée aux anticorps monoclonaux spécifiques de l'ochratoxine A greffés sur le gel de Sepharose contenu dans la colonne.
- Rincer la colonne avec 10 mL de solution tampon préalablement versés dans chacun des flacons vides pour une récupération complète des 163 mL de solution échantillon.
- Éliminer le tampon 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.
- Remplacer la cuve de récupération par le portoir équipé des flacons pour passeur d'échantillons (et s'assurer que les aiguilles plongent jusqu'au fond des flacons).

Extraction de l'OTA par 1 mL de méthanol acidifié

La technique du backflush avec trois passages successifs sur la colonne permet d'améliorer le rendement de récupération de l'OTA :

1°) déposer la solution d'extraction (méthanol/acide acétique 98/2) en haut de la colonne, laisser passer au-travers de la colonne par gravité, recueillir dans un flacon pour passeur d'échantillons (2 mL),

2°) aspirer la solution recueillie dans le flacon à l'aide d'une seringue ajustée sur chaque 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.

Procéder à l'analyse de l'**extrait IA**.

Traiter les témoins de la même façon.

Étalonnage

Préparer une gamme de solutions étalon à partir de la solution-mère à 10 µg/mL d'OTA, conservée au congélateur, **ramenée à température ambiante et homogénéisée aux ultra-sons** :

-Effectuer une dilution au 1/100 de la solution-mère : 20 µL dans 2 mL d'un mélange ACN/H₂O 60/40. On obtient l'étalon de travail **E à 100 ng/mL**.

- Effectuer une dilution au 1/500 de l'étalon de travail E : 40 µL dans 20 mL de **tampon pH 7,4**. On obtient l'étalon **E/20 à 200 pg/mL**.

- Préparer les étalons de dosage en effectuant (par exemple) :

- une dilution de 400 µL de E/20 + 9.6 mL de tampon pH 7,4 : étalon **E8 à 8 pg/mL**,
- une dilution de 1 mL de E/20 + 9 mL de tampon pH 7,4 : étalon **E20 à 20 pg/mL**,
- une dilution de 2 mL de E/20 + 8 mL de tampon pH 7,4 : étalon **E40 à 40 pg/mL**,
- une dilution de 3 mL de E/20 + 7 mL de tampon pH 7,4 : étalon **E60 à 60 pg/mL**,
- une dilution de 4 mL de E/20 + 6 mL de tampon pH 7,4 : étalon **E80 à 80 pg/mL**,
- une dilution de 5 mL de E/20 + 5 mL de tampon pH 7,4 : étalon **E100 à 100 pg/mL**,
- Pour une plus grande précision de l'analyse, toutes les dilutions décrites ci-après pourront être réalisées par gravimétrie (sur une balance calibrée, masses lues en g) :**

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

Pesée (**me1**) flacon bouché + solvant (densité d1 g/mL),

Pesée (**me2**) flacon bouché + solvant + solution d'OTA (densité d2 g/mL, concentration C2 pg/mL).

$$E_{8-100} \text{ (pg/mL)} = \left[(me2 - me1) \times E_{/20} \right] + (me2 - me0)$$

Transférer les 10 mL de chaque étalon de dosage sur une colonne IA préalablement conditionnée. L'extraction est effectuée (3 fois de suite) par 1.5 mL de méthanol acidifié, récupéré en flacon pour passeur. Mélanger.

On obtient 1.5 mL des étalons extraits (e) à environ 50, 130, 265, 400, 530 et 650 pg/mL (concentration exactement connue) d'OTA dans un mélange méthanol/acide acétique 98/2.

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

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

Pour chaque étalon de travail, quantité exacte d'ochratoxine extraitesur IA :

$$q \text{ (pg)} = E_{8-100} \times (me2 - me0)$$

Concentration exacte en ochratoxine (après IA) :

$$e_{50-650} \text{ (pg/mL)} = q \times \frac{0,79}{(me4 - me3)}$$

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

EXPRESSION DES RÉSULTATS

1°) **Déterminer la concentration en ochratoxine A des solutions analysées :**

La concentration en OTA (**Ca**, exprimée en **pg/mL**) dans les solutions analysées est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

2°) Calculer **la quantité d'ochratoxine A (Mp) extraite sur IAC** :

$$M_p (\text{pg}) = C_a \times V_e$$

Avec V_e (mL) : volume de l'extrait IA ;

C_a (pg/mL) : concentration en ochratoxine de la solution analysée.

La quantité (M_p) est égale à la quantité de polluant (ochratoxine A) prélevée dans la coupelle du CIP10.

Calcul de la concentration (C) d'ochratoxine A dans l'air

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

avec : M_p (pg) : masse d'ochratoxine A dans la coupelle de prélèvement

M_b (pg) : masse moyenne d'ochratoxine A dans les coupelles témoins

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 :

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

avec, pour n témoins pesés : M_{ix} : la masse initiale de la x^e coupelle utilisée

M_{fx} : la masse finale de la x^e coupelle utilisée

ΔM_x : $M_{fx} - M_{ix}$, pour la x^e coupelle utilisée

T_{iy} : la masse initiale de la y^e coupelle témoin

T_{fy} : la masse finale de la y^e coupelle témoin

ΔT_y : $T_{fy} - T_{iy}$ pour le y^e 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 ochratoxine A dans les poussières Q_{ota} (en µg/kg) :

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

$$Q_{OTA} (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{M_p \times}{Q_x}$$

avec M_p (pg) : masse d'ochratoxine A dosée dans la coupelle x

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

- [Annexes DONNÉES DE VALIDATION OTA.pdf](#)
- [Exemple de chromatogrammes OTA.pdf](#)
- [Fiche technique OTA matrices A B C.pdf](#)