

## Données de validation

Numéro de fiche	Titre
METROPOL_460	Mélanges de mycotoxines M-460

### Données de validation principales

#### Généralités

Données de validation pour le prélèvement et l'analyse de 11 mycotoxines dans l'air des lieux de travail, collectées sur mousse en coupelle CIP 10-I, extraction sur colonnes AOF-DZT en tandem, dosage en présence d'autres mycotoxines en LC/MS/MS.

Protocole de validation : Dopage de mousses en coupelle avec des quantités connues de farines certifiées, contaminées par 11 mycotoxines (aflatoxines B1, B2, G1, G2, OTA, FB1, FB2, zéaralénone, DON, HT2 et T2).

Les performances de l'analyse, les rendements d'extraction sur les colonnes AOF-DZT en tandem et les taux de récupération de la méthode, sont fournis pour les 11 mycotoxines.

Le protocole d'analyse est détaillé dans la rubrique "**Informations complémentaires**".

Les données de performances et de validation pour le prélèvement lui-même, et celles concernant la conservation des mycotoxines dans la coupelle CIP 10-I, sont fournies dans les méthodes spécifiques à chacune des mycotoxines : aflatoxines ( **M-45**<sup>1</sup>), fumonisine B1 ( **M-46**<sup>2</sup>), ochratoxine A ( **M-48**<sup>3</sup>), zéaralénone ( **M-306**<sup>4</sup>) ou AOZ ( **M-339**<sup>5</sup>).

<sup>1</sup> [https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_45](https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_45)

<sup>2</sup> [https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_46](https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_46)

<sup>3</sup> [https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_48](https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_48)

<sup>4</sup> [https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_306](https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_306)

<sup>5</sup> [http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_339](http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_339)

Substance \_\_\_\_\_ Mélange de mycotoxines

Dispositif de prélèvement :

CIP 10-I

Débit prélèvement \_\_\_\_\_ 10 L/mn

#### Conditions analytiques

##### 1 injecteur :

PASSEUR AUTOMATIQUE

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

Volume injecté \_\_\_\_\_ 5 µL

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

##### 1 colonne :

Colonne \_\_\_\_\_ ■ Phase inverse inerte

Nature phase \_\_\_\_\_ ■ Biphényl

Granulométrie \_\_\_\_\_ 2,7 µm

Longueur \_\_\_\_\_ 100 mm

Diamètre \_\_\_\_\_ 2,1 mm

Température d'utilisation \_\_\_\_\_ 60 °C

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

2 détecteurs :

MS/MS

Température \_\_\_\_\_ 150 °C

Conditions MS/MS	
Mode ion	ES +
Temp source (°C)	150
Temp. désolvation (°C)	500
Débit désolvation (L/Hr)	800
Tension capillaire (kV)	3
Débit gaz de cône (L/h)	10

Commentaires \_\_\_\_\_

Phase mobile	Présence d'un tampon	Nature tampon	Commentaires / Débit																								
EAU/METHANOL	oui	Acide formique 0,1% vol.	<p><b>Débit</b> : 0,4 mL/min</p> <p><b>Gradient d'éluion :</b>  <b>Eluant A</b> : Eau+Acide formique 0,1% vol.  <b>Eluant B</b> : Méthanol+acide formique 0,1 % vol.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Temps (min)</th> <th>% Eluant A</th> <th>% Eluant B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>16,5</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>18,1</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> </tbody> </table>	Temps (min)	% Eluant A	% Eluant B	0	75	25	3	50	50	16	25	75	16,5	0	100	18	0	100	18,1	75	25	20	75	25
Temps (min)	% Eluant A	% Eluant B																									
0	75	25																									
3	50	50																									
16	25	75																									
16,5	0	100																									
18	0	100																									
18,1	75	25																									
20	75	25																									

**Recommandations particulières :**

La colonne utilisée lors de la validation est une colonne UPLC Raptor Inert Biphenyl.

Les données de transition MS/MS sont données dans le tableau suivant. Pour chaque molécule, la quantification est réalisée sur la première transition (en vert), les autres sont des transitions de confirmation.

Molécule	Tr (min)	Tps début d'acquisition (min)	Tps fin d'acquisition (min)	Ion parent m/z	Ion fils m/z	Tension de cône (V)	Energie de collision (V)	Ratio d'aire de pic attendu
DON	1,31	0,01	4	297	249	30	15	/
				297	231	30	15	1,54
Afla B1	10,29	10	11,5	313	285	60	25	/
				313	213	60	30	8,25
Afla B2	8,92	7,5	11	315	287	60	25	/
				315	259	60	30	1,08
Afla G1	8,43	7,5	11	329	243	60	30	/
				329	200	60	40	1,05
				329	214	60	30	2,33
				329	311	60	30	7,66
Afla G2	7,21	6,5	7,8	331	245	60	30	/
				331	313	60	20	0,8
				331	189	60	50	1,59
FB1	4,88	4	6,5	722	352	60	40	/
				722	334	60	50	1,42
FB2	7,03	6,5	7,8	706	336	60	40	/
				706	318	60	40	1,7
HT2	5,52	4	6,5	425	263	20	15	/
				425	245	20	15	1,96
T2	7,73	7,5	11	467	305	20	10	/
				467	245	20	10	1,55
				467	387	40	20	0,32
OTA	12,79	11,5	20	404	239	40	23	/
				404	358	40	14	1,98
				404	120	40	16	13,47
Zea	9,43	7,5	11	319	283	20	15	/
				319	187	20	15	1,06
				319	185	20	20	1,34

**Validation Méthode Analytique****Description de la méthode :**

La méthode analytique a été validée selon le **protocole de mise au point**.<sup>6</sup>

<sup>6</sup> <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-gaz-vapeur-actif/metropol-prelevement-gaz-vapeur-actif.pdf>

**Répétabilité :**

La répétabilité a été évaluée par une série de 10 injections d'une même solution de mélange des 11 mycotoxines passée sur une colonne d'immuno-affinité et concentrée (cf protocole dans le § informations complémentaires) :

	Aire										
	DON 297>249	Afla B1 313>285	Afla B2 315>287	Afla G1 329>200	Afla G2 331>243	FB1 722>352	FB2 706>336	HT2 425>263	T2 467>305	OTA 404>239	ZEA 319>283
<b>C° (ng/mL)</b>	<b>10,46</b>	<b>1,02</b>	<b>1,02</b>	<b>1,02</b>	<b>1,02</b>	<b>5,32</b>	<b>5,36</b>	<b>10,6</b>	<b>10,6</b>	<b>1,02</b>	<b>10,5</b>
Inj 1	228	298	249	103	59	434	917	142	147	522	1041
Inj 2	222	287	239	97	49	429	830	150	145	551	1089
Inj 3	233	289	253	95	50	439	926	146	132	547	1015
Inj 4	231	286	233	90	57	436	916	159	153	510	1028
Inj 5	236	277	236	92	47	454	892	149	153	524	1060
Inj 6	217	280	229	93	50	482	956	155	132	554	1026
Inj 7	249	297	235	99	55	469	892	147	155	577	1039
Inj 8	219	290	233	100	50	425	925	130	136	505	1002
Inj 9	215	289	221	95	56	421	1003	145	134	551	991
Inj 10	228	274	244	96	59	439	850	149	143	514	1026
<b>Moyenne</b>	<b>227,8</b>	<b>286,7</b>	<b>237,2</b>	<b>96</b>	<b>53,2</b>	<b>442,8</b>	<b>910,7</b>	<b>147,2</b>	<b>143</b>	<b>535,5</b>	<b>1031,7</b>
<b>Ecart type</b>	<b>10,3</b>	<b>7,86</b>	<b>9,48</b>	<b>3,92</b>	<b>4,47</b>	<b>19,7</b>	<b>49,4</b>	<b>7,77</b>	<b>9,04</b>	<b>23,7</b>	<b>28,1</b>
<b>CV (%)</b>	<b>4,50</b>	<b>2,74</b>	<b>4,00</b>	<b>4,08</b>	<b>8,40</b>	<b>4,44</b>	<b>5,43</b>	<b>5,28</b>	<b>6,32</b>	<b>4,42</b>	<b>2,73</b>

Les coefficients de variation étant tous inférieurs à 10 % la répétabilité de la méthode est validée.

#### Limite de détection (LD) :

La limite de détection instrumentale est déterminée à partir d'un rapport signal/bruit égal à 3.

	LD (ng/mL)
DON	0,4
Afla B1	0,1
Afla B2	0,1
Afla G1	0,2
Afla G2	0,2
FB1	0,3
FB2	0,1
HT2	1,2
T2	0,6
OTA	0,1
ZEA	0,7

#### Limite de quantification (LQa) :

Les limites de quantification sont déterminées à partir de 6 mousses dopées avec les 11 mycotoxines aux concentrations données ci-dessous, puis traitées selon le même protocole que les échantillons.

Elles sont données en ng sur le dispositif :

	DON	Afla B1	Afla B2	Afla G1	Afla G2	FB1	FB2	HT2	T2	OTA	ZEA
	Quantité théorique en ng (LQ validée)										
	2,70	0,50	0,50	0,39	0,39	2,04	2,05	2,77	2,74	0,26	2,72
	Quantité dosée en ng										
lq_1	2,87	0,66	0,60	0,43	0,47	2,30	2,40	3,88	2,52	0,28	2,31
lq_2	3,27	0,53	0,56	0,42	0,42	2,48	2,15	2,87	3,38	0,26	2,45
lq_3	3,14	0,48	0,56	0,38	0,38	1,78	2,54	2,67	2,59	0,26	2,00
lq_4	3,00	0,53	0,49	0,41	0,35	2,19	2,23	3,37	2,91	0,24	2,07
lq_5	3,59	0,49	0,54	0,40	0,45	2,80	2,54	3,12	3,70	0,16	2,02
lq_6	2,87	0,44	0,60	0,42	0,36	2,28	2,24	3,44	3,03	0,21	2,05
Moyenne	3,12	0,52	0,56	0,41	0,41	2,31	2,35	3,22	3,02	0,24	2,15
Coeff variation	8,86	14,61	7,27	4,41	12,03	14,52	7,20	13,44	15,08	18,28	8,54
justesse	15,69	4,58	11,38	5,28	4,07	13,08	14,58	16,41	10,28	-8,87	-20,99

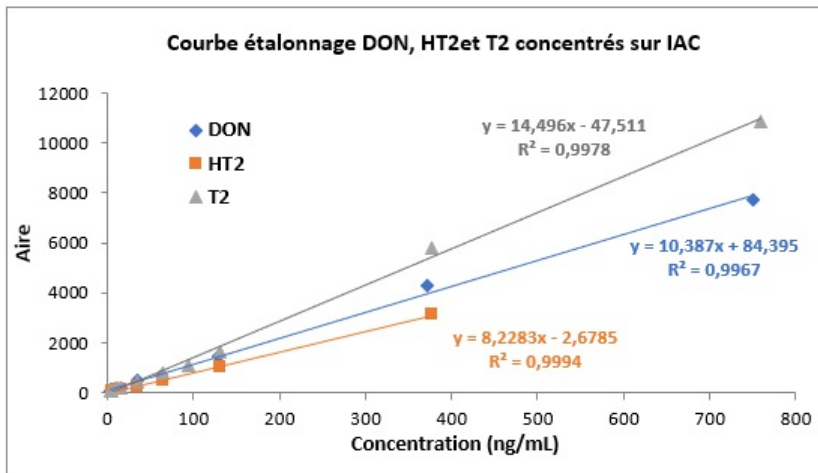
Réponse analytique - linéarité :

Le domaine de linéarité est donné pour chaque mycotoxine dans les tableaux suivants :

	DON (ng/mL)	Aire
E1	3,70	62
E2	5,48	106
E3	10,46	199
E4	15,91	170
E5	35,07	473
E6	63,54	670
E7	128,78	1457
E8	372,60	4319
E9	750,33	7698

	HT2 (ng/mL)	Aire
E1	5,55	59
E2	10,59	118
E3	16,11	136
E4	35,51	280
E5	64,34	510
E6	130,41	1022
E7	377,31	3121

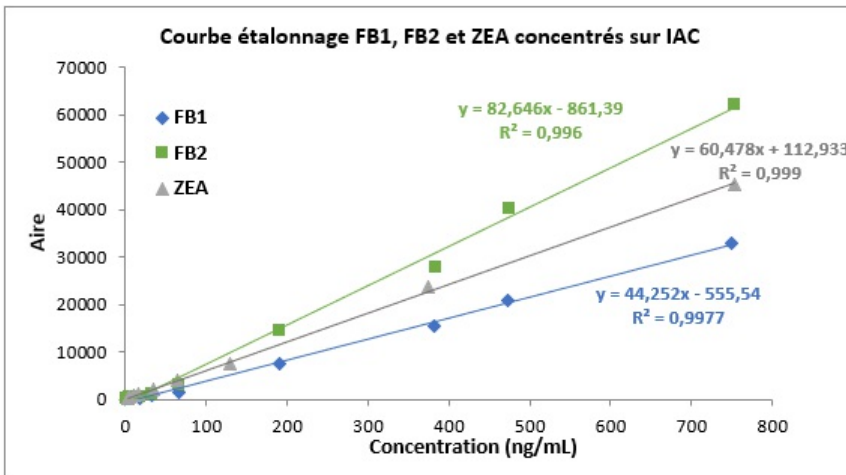
	T2 (ng/mL)	Aire
E1	3,75	62
E2	5,55	100
E3	10,59	191
E4	16,11	226
E5	35,51	449
E6	64,34	793
E7	130,41	1661
E8	94,2	1117
E9	377,3	5788
E10	759,8	10847



	FB1 (ng/mL)	Aire
E1	2,79	86
E2	5,33	198
E3	8,10	176
E4	17,86	332
E5	32,35	706
E6	65,57	1512
E7	189,73	7542
E8	382,07	15390
E9	472,89	20707
E10	749,82	33047

	FB2 (ng/mL)	Aire
E1	1,90	98
E2	2,81	160
E3	5,36	395
E4	8,15	481
E5	17,96	665
E6	32,54	1305
E7	65,94	3012
E8	190,78	14369
E9	384,19	27972
E10	475,52	40259
E11	753,99	62069

	ZEA (ng/mL)	Aire
E1	3,72	325
E2	5,50	476
E3	10,50	886
E4	15,97	1011
E5	35,20	2142
E6	63,78	3879
E7	129,25	7431
E8	373,98	23732
E9	753,11	45259

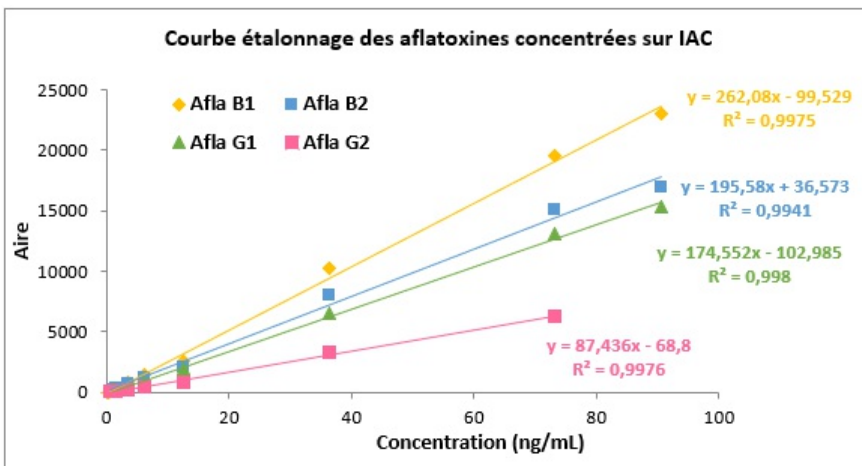


	Afla B1 (ng/mL)	Aire
E1	0,36	/
E2	0,53	86
E3	1,02	223
E4	1,55	332
E5	3,42	803
E6	6,20	1416
E7	12,57	2494
E8	36,36	10228
E9	73,22	19575
E10	90,63	23043

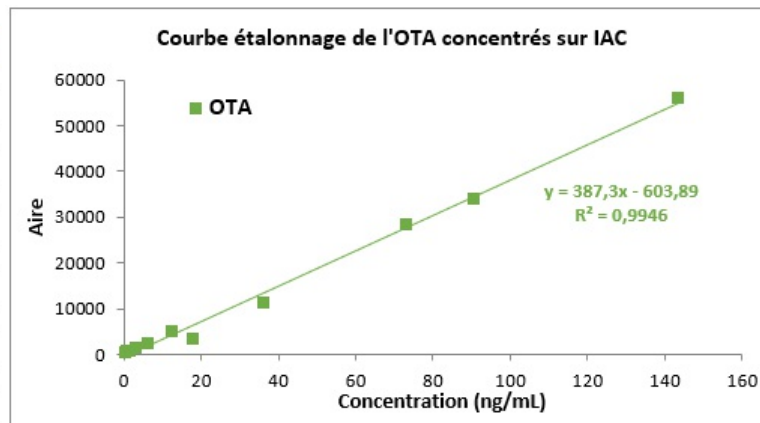
	Afla G1 (ng/mL)	Aire
E1	0,53	74
E2	1,02	203
E3	1,55	220
E4	3,42	341
E5	6,20	755
E6	12,57	1883
E7	36,36	6570
E8	73,22	13092
E9	90,63	15298

	Afla B2 (ng/mL)	Aire
E1	0,53	86
E2	1,02	207
E3	1,55	285
E4	3,42	657
E5	6,20	1168
E6	12,57	2029
E7	36,36	8038
E8	73,22	15029
E9	90,63	16936

	Afla G2 (ng/mL)	Aire
E1	0,53	52
E2	1,02	67
E3	1,55	91
E4	3,42	219
E5	6,20	427
E6	12,57	820
E7	36,36	3278
E8	73,22	6289



	OTA (ng/mL)	Aire
E1	0,36	203
E2	0,53	295
E3	1,02	575
E4	1,55	562
E5	3,42	1264
E6	6,20	2429
E7	12,57	4823
E8	18,05	3307
E9	36,36	11232
E10	73,22	28374
E11	90,63	33769
E12	143,70	56045



## Taux de récupération

Les taux de récupération sont déterminés pour chaque mycotoxine, sur 3 niveaux de charges :

q1	rendement en % /sol <sup>0</sup> de dopage										
	DON	Afla B1	Afla B2	FB1	FB2	Afla G1	Afla G2	HT2	T2	OTA	ZEA
Quantité sur dispositif en ng	7	1	1	3,85	3,85	1	1	7	7	1	6
KT_1	123	70	73	85	76	78	86	61	86	63	71
KT_2	103	85	89	102	107	109	88	86	96	83	95
KT_3	100	78	79	105	94	108	72	87	118	108	108
KT_4	109	72	88	84	77	98	88	73	113	103	86
KT_5	118	77	73	94	93	79	64	77	78	75	81
KT_6	69	68	69	65	54	92	83	87	91	87	108
Moyenne	104	75	79	89	83	94	80	78	97	86	92
CV (%)	18,5	8,3	11,0	16,4	22,5	14,0	12,6	13,5	16,2	19,9	16,0

q2	rendement en % /sol <sup>0</sup> de dopage										
	DON	Afla B1	Afla B2	Afla G1	Afla G2	FB1	FB2	HT2	T2	OTA	ZEA
Quantité sur dispositif en ng	28	3,8	3,8	3,8	3,8	16	16	29	28	3,8	25
KT_1	102	73	78	93	91	120	124	89	92	92	73
KT_2	97	74	90	99	114	110	103	96	91	74	77
KT_3	118	85	105	106	111	80	80	107	114	111	94
KT_4	76	95	115	132	138	118	121	110	118	111	92
KT_5	114	63	76	74	90	98	97	111	103	115	93
KT_6	112	73	93	93	103	77	83	131	139	99	109
Moyenne	103	77	93	100	108	101	101	107	110	100	90
CV (%)	14,9	14,4	16,5	19,3	16,5	18,6	18,3	13,5	16,4	15,4	14,5

q3	rendement en % /sol <sup>0</sup> de dopage										
	DON	Afla B1	Afla B2	Afla G1	Afla G2	FB1	FB2	HT2	T2	OTA	ZEA
Quantité sur dispositif en ng	90	30	30	30	30	175	175	47	47	30	140
KT_1	112	64	74	67	77	80	79	71	90	90	70
KT_2	103	68	84	79	92	75	93	76	99	102	82
KT_3	111	69	78	65	86	99	107	75	101	93	76
KT_4	113	58	73	55	80	90	97	76	93	98	68
KT_5	85	59	75	65	72	88	83	72	81	88	77
KT_6	107	64	83	69	80	96	106	78	97	89	83
Moyenne	105	64	78	67	81	88	94	75	94	93	76
CV (%)	10,1	6,9	6,0	11,5	8,5	10,6	12,0	3,6	7,9	6,1	8,0

## Conservation après prélèvement

### Méthode appliquée / conditions de prélèvement :

Les données concernant la conservation des échantillons sont fournies dans les méthodes spécifiques à chacune des mycotoxines : aflatoxines ( M-45<sup>7</sup>), fumonisine B1 ( M-46<sup>8</sup>), ochratoxine A ( M-48<sup>9</sup>), zéaralénone ( M-306<sup>10</sup>) ou AOZ ( M-339<sup>11</sup>).

<sup>7</sup> [https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_45](https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_45)

<sup>8</sup> [https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_46](https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_46)

<sup>9</sup> [https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_48](https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_48)

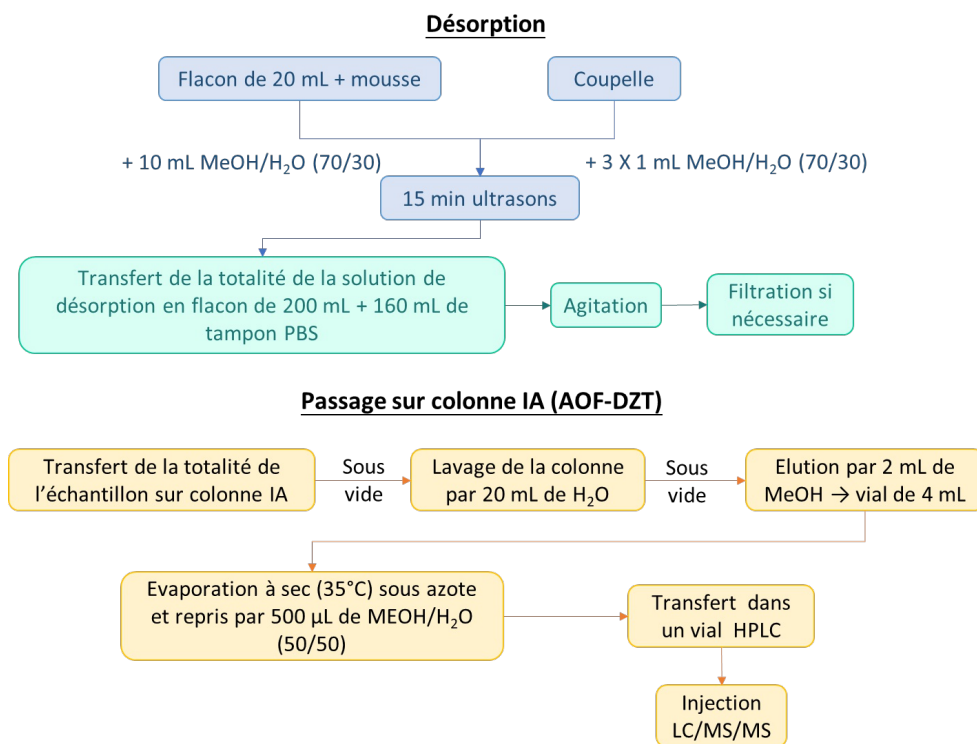
<sup>10</sup> [https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_306](https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_306)

<sup>11</sup> [http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_339](http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_339)

Les conditions de conservation validées sont de 30 jours à 20°C.

## Informations complémentaires

### Protocole pour le dosage des mycotoxines DON, AFLA, FB1, FB2, HT2, T2, OTA, ZEA dans les mousses CIP 10



## Etalonnage

L'étalonnage est réalisé à l'aide d'étalons multimycotoxines, préparés par mélange de 8 solutions mères des produits de référence (Aflatoxines, Ochrotoxine A, Fumonisine B1 et B2, DON, Zéaralénone, T2 et HT2).

La solution de travail contenant les 11 mycotoxines est diluée pour obtenir des concentrations croissantes. Les solutions obtenues sont purifiées sur colonnes en tandem et concentrées sous azote, dans les mêmes conditions que celles adoptées pour les échantillons prélevés dans l'air.

Pour couvrir tout le domaine d'application validé pour chaque type de mycotoxines les gammes d'étalonnage à envisager sont les suivantes :

C° au moment de l'injection (ng/mL)	
DON	5 à 750
Aflatoxines	0,5 à 90
FB1	2,8 à 750
FB2	2,8 à 750
HT2	5,5 à 375
T2	5,5 à 760
OTA	0,5 à 145
ZEA	5,5 à 750

Procéder, par exemple selon le protocole décrit ci après :

- Diluer les 8 solutions de référence conservées au congélateur, ramenées à température ambiante et homogénéisées à l'aide d'un mélange Vortex, dans une même solution A :

Mycotoxine	C° de la sol° ref. (µg/mL)	Vol Sol° ref (mL)	Vol (mL) de MeOH/H <sub>2</sub> O (70/30)	Vol. total (mL)	C° sol° A (ng/mL)
DON	100	0,1	4,2	5	2000
Chacune des 4 aflatoxines	10	0,1	4,2	5	200
FB1	50	0,1	4,2	5	1000
FB2	50	0,1	4,2	5	1000
HT2	100	0,1	4,2	5	2000
T2	100	0,1	4,2	5	2000
OTA	10	0,1	4,2	5	200
ZEA	100	0,1	4,2	5	2000

- Préparer une solution de mélange B par dilution de la solution A dans la solution de tampon PBS :

Mycotoxine	Vol sol° A (mL)	Vol. PBS (mL)	Vol. total (mL)	C° sol° B (ng/mL)
DON	2,0	8	10	400
Chacune des 4 aflatoxines	2,0	8	10	40
FB1	2,0	8	10	200
FB2	2,0	8	10	200
HT2	2,0	8	10	400
T2	2,0	8	10	400
OTA	2,0	8	10	40
ZEA	2,0	8	10	400

- Préparer une solution de mélange C par dilution de la solution B dans la solution de tampon PBS :

Mycotoxine	Vol sol° B (mL)	Vol. PBS (mL)	Vol. total (mL)	C° sol° C (ng/mL)
DON	1,0	3	4	10
Chacune des 4 aflatoxines	1,0	3	4	10
FB1	1,0	3	4	100
FB2	1,0	3	4	100
HT2	1,0	3	4	100
T2	1,0	3	4	100
OTA	1,0	3	4	50
ZEA	1,0	3	4	50

- Préparer les étalons de dosage multi-mycotoxines en effectuant (par exemple) les dilutions suivantes des solutions B et C préparées précédemment :

Sol° étalon	Vol. PBS (mL)	Volume mélange (mL)	Vol. total (mL)	Masse DON (ng)	Masse Afla (ng)	Masse FB1 (ng)	Masse FB2 (ng)	Masse HT2 (ng)	Masse T2 (ng)	Masse OTA (ng)	Masse ZEA (ng)
E1	9,97	0,03 (sol° C)	10	3	0,3	1,5	1,5	3	3	0,3	3
E2	9,95	0,05 (sol° C)	10	5	0,5	2,5	2,5	5	5	0,5	5
E3	9,9	0,10 (sol° C)	10	10	1	5	5	10	10	1	10
E4	9,95	0,05 (sol° B)	10	20	2	10	10	20	20	2	20
E5	9,9	0,10 (sol° B)	10	40	4	20	20	40	40	4	40
E6	9,85	0,15 (sol° B)	10	60	6	30	30	60	60	6	60

L'étape de fixation/purification/extraction sur colonnes IA est réalisée dans les mêmes conditions que celles de échantillons.

- Transférer les 10 mL de chaque étalon sur le tandem de colonnes IA. Après rinçage de la colonne à l'eau, l'extraction est effectuée par 2 mL de méthanol.
- Laisser s'écouler par gravité et appliquer un léger vide pour récupérer les dernières gouttes, recueillir dans des flacons de récupération (5 mL) tarés et identifiés et mélanger.
- Les étalons extraits (Ee) sont ensuite évaporés à sec sous flux d'azote, repris par 500 µL de méthanol/eau (50/50 vol.) puis transférés dans des flacons pour passeur munis d'un insert et injectés en LC/MS/MS.

Récapitulatif du protocole de préparation des étalons de dosage (Ee) :

Sol° étalon	Elution	Reprise après évaporation	C° (ng/mL) au moment de l'injection							
	Vol. MeOH (mL)	Vol. MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50) (mL)	DON	Afla	FB1	FB2	HT2	T2	OTA	ZEA
Ee 1	2	0,5	6	0,6	3	3	6	6	0,6	6
Ee 2	2	0,5	10	1	5	5	10	10	1	10
Ee 3	2	0,5	20	2	10	10	20	20	2	20
Ee 4	2	0,5	40	4	20	20	40	40	4	40
Ee 5	2	0,5	80	8	40	40	80	80	8	80
Ee 6	2	0,5	120	12	60	60	120	120	12	120