

Mélanges de mycotoxines M-460

Prélèvement : Actif sur CIP10-I

Analyse : UPLC/MS/MS

Données de validation _____ Validation complète

Numéro de la méthode _____ M-460

Substances

Informations générales

Nom
4-Déoxynivalérol
Aflatoxine B1
Aflatoxine B2
Aflatoxine G1
Aflatoxine G2
Fumonisine B1
Fumonisine B2
HT2 toxine
T2 toxine
Ochratoxine A
Zéaralénone
Mélange de mycotoxines

Nom	Numéro CAS	Formule Chimique	Masse molaire	Synonymes
4-Déoxynivalérol	51481-10-8	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296	DON
Aflatoxine B1	1162-65-8	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	Afla B1
Aflatoxine B2	7220-81-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	Afla B2
Aflatoxine G1	1165-39-5	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	Afla G1
Aflatoxine G2	7241-98-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	Afla G2
Fumonisine B1	116355-83-0	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	722	FB1
Fumonisine B2	116355-84-1	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	706	FB2
HT2 toxine	26934-87-2	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424	HT2
T2 toxine	21259-20-1	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	470,5	T2
Ochratoxine A	303-47-9	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	404	OTA
Zéaralénone	17924-92-4	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	318,4	ZEA
Mélange de mycotoxines				

Substance	données de validation
Mélange de mycotoxines	Validation_372

Famille de substances

- AGENTS BIOLOGIQUES
- BIOAEROSOLS
- MYCOTOXINES

Principe et informations

- Classification CIRC et dose journalière tolérable (DJT) des mycotoxines (cf [ED 4411](#)¹) :

Mycotoxines	Classification CIRC	DJT ($\mu\text{g}/\text{kg pc}^*$)
DON	Groupe 3	1
Somme des aflatoxines	Groupe 1	Principe Alara (Aussi bas que raisonnablement possible)
Somme des fumonisines	Groupe 2B	1
Somme des toxines HT2 et T2	Groupe 3	0,02
Ochratoxine A	Groupe 2B	5
Zéaralénone	Groupe 3	0,25

* Par kilogramme de poids corporel

- La mycotoxine déoxynivalénol (DON) ou vomitoxine, appartient aux trichothécènes de la classe B, qui sont produites, en particulier, par des moisissures appartenant au genre *Fusarium*. Des niveaux élevés de ces mycotoxines sont rapportés, en présence de zéaralénone, dans les grains de blé, d'orge, d'avoine, de maïs et de riz au cours des années pluvieuses (pendant la période de floraison des céréales). Le DON survit tout à la fois aux processus de cuisson et de brassage.
- Les mycotoxines HT2 et T2 appartiennent à la famille des trichothécènes de type A, produites par certaines souches de moisissures *Fusarium* qui se développent sur les céréales dans les régions au climat froid ou tempéré et dans des conditions de stockage humides.

Dans l'Union européenne, les valeurs maximales des mycotoxines dans les produits agricoles et alimentaires sont fixées par les directives européennes du 8 et 9 avril 2024 - (EU) 2024/1022 et (EU) 2024/1038 :

Denrées	Valeurs maximales admissibles (µg/kg)					
	DON	Somme des aflatoxines	Somme des fumonisines	Somme des toxines HT2 et T2	Ochratoxine A	Zéaralénone
Arachides, noix, fruits séchés	/	4	/	/	2-10	/
Céréales brutes	1250-1750	4	4000	50-1250 (avoine)	5	100
Céréales destinées à la consommation	750	4	1000	20-100	3	75
Maïs et aliments à base de maïs	1250 (brut)	10	800-1000	50	/	100
Café	/	/	/	/	3-5	/
Aliments pour bébés	150	0,1	200	10	0,5	20

- La détermination des concentrations en aflatoxines, ochratoxine A, fumonisines B1 et B2, DON, zéaralénone, T2 et/ou HT2 dans les atmosphères de travail est réalisée par prélèvement de l'aérosol de poussières contaminées à l'aide d'un échantillonneur CIP 10 muni d'un sélecteur de la fraction inhalable haute efficacité, équipé d'une coupelle rotative contenant une mousse filtrante en polyuréthane préalablement lavée (voir dispositif de prélèvement). La masse d'aérosol prélevé peut être déterminée par pesée des coupelles avant et après prélèvement. L'intérêt de cette méthode réside dans l'utilisation de 2 colonnes d'immunoaffinité (IAC) multi-mycotoxines utilisées en tandem (deux colonnes AOF et DZT montées en série), qui permet l'analyse de l'une ou l'autre des 11 mycotoxines sur un même prélèvement d'air, sans avoir à faire le choix *a priori* de la mycotoxine à doser. Le protocole de préparation des échantillons tient compte de toutes les contraintes dues à l'utilisation des ces colonnes d'IA.

Avertissement : Pour les aflatoxines, le niveau de performances validé expérimentalement reste en deçà de celui estimé pour la méthode individuelle M-45². Dans ce cas, la méthode multi-mycotoxines pourra constituer une 1^{ère} étape vers un dosage plus précis réalisé, au besoin, sur un autre prélèvement d'air, analysé à l'aide d'une colonne IA spécifique.

² https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_45

¹ <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%204411>

Principe de prélèvement et d'analyse

Etat physique _____ Particules en suspension (liquides ou/et solides)

Type de prélèvements _____ Actif

En savoir plus sur ce type de prélèvement ³

³ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-cip10/metropol-prelevement-cip10.pdf>

Nom du dispositif _____ CIP10-I

Technique analytique _____ CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ULTRA HAUTE PERFORMANCE

Injecteur _____ PASSEUR AUTOMATIQUE

Détecteur _____ SPECTROMETRE MS/MS

Domaine d'application

Substance	Quantité minimum sur le dispositif	Quantité maximum sur le dispositif
4-Déoxynivalénol	2,70 ng	375 ng
Aflatoxine B1	0,50 ng	45 ng
Aflatoxine B2	0,50 ng	15 ng
Aflatoxine G1	0,39 ng	45 ng
Aflatoxine G2	0,39 ng	36 ng
Fumonisine B1	2,04 ng	375 ng
Fumonisine B2	2,05 ng	375 ng
HT2 toxine	2,77 ng	188 ng
T2 toxine	2,74 ng	380 ng
Ochratoxine A	0,26 ng	72 ng
Zéaralénone	2,72 ng	376 ng
Mélange de mycotoxines	1 mg	60 mg

Liste des réactifs

- ACETONITRILE
- ACIDE FORMIQUE
- EAU
- METHANOL
- SOLUTION COMMERCIALE PBS pH 7,4

Consignes de sécurité pour les manipulations en laboratoire ⁴

⁴<https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%20953>

Méthode de prélèvement

Nombre d'éléments (dispositifs) composant le dispositif en série _____ 1

Dispositif de prélèvement

Type de dispositif _____ ■ CIP10-Inhalable

Support ou substrat de collecte _____ ■ FILTRE EN MOUSSE POLYURETHANE

Préparation du substrat :

Les mousses filtrantes en polyuréthane sont préalablement lavées dans de l'eau savonneuse tiède et pressées plusieurs fois pendant le lavage. Répéter ces étapes avec de l'eau ultra pure puis avec de l'acétonitrile en réalisant 3 rinçages et en pressant les mousses plusieurs fois pendant le lavage. Laisser sécher à température ambiante sous sorbonne.

Conditionner les mousses et les coupelles et réaliser la pesée avant et après prélèvement, suivant la méthode décrite dans la fiche "

Analyse gravimétrique⁵", pour déterminer la masse des poussières collectées.

⁵ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-gravimetrie/metropol-analyse-gravimetrie.pdf>

Nota : le prélèvement est validé pour des quantités de poussières dans les coupelles comprises entre 1 mg (en deçà, dosages < limites de quantification des mycotoxines) et 60 mg (au-delà, perte d'efficacité de collecte du CIP10).

Commentaires, conseils, consignes :

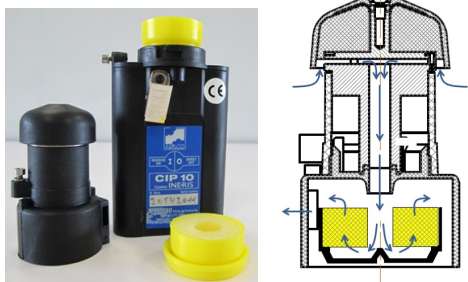


Photo d'un ensemble CIP10-I et représentation **schématique** du sélecteur de la fraction inhalable avec la coupelle rotative en place.

Conditions de prélèvement

Débit (L/min) _____ 10

Temps de prélèvement maximum _____ 8

Préparation des dispositifs de prélèvement en vue d'une intervention en entreprise⁶

⁶ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-intervention-preparation/metropol-intervention-preparation.pdf>

Méthode d'analyse

Principe général de l'analyse en laboratoire⁷

⁷ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-principe/metropol-analyse-principe.pdf>

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 :

Réaliser préalablement **les pesées**⁸ des coupelles après prélèvement. Ensuite :

⁸ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-gravimetrique/metropol-analyse-gravimetrique.pdf>

1 | La première étape consiste à extraire les poussières collectées dans les coupelles, avec un mélange méthanol/eau 70/30 (V/V).

2 | La deuxième étape consiste à diluer avec une solution de tampon phosphate (PBS).

3 | La troisième étape consiste à fixer et purifier les mycotoxines, sur deux colonnes d'immunoaffinité montées en série, AOF (Afla, Ochra, Fumo) et DZT (DON, Zea, Toxi) contenant respectivement les anticorps monoclonaux de 4 aflatoxines, de l'ochratoxine A et de la fumonisine B1 d'une part, du DON, de la zéaralénone, et des toxines T2 et HT2 d'autre part, greffés sur gel de Sépharose. Ces colonnes doivent être stockées non congelées entre 4 °C et 8°C, et utilisées à température ambiante.

4 | La quatrième étape consiste à récupérer les mycotoxines des colonnes AOF/DZT en éluant par 2 mL de méthanol.

5 | La cinquième étape est une concentration à sec de l'éluat précédent sous flux d'azote.

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 °C.

5 étapes de préparation :

Etape de préparation n° 1

Solvant ou solution _____ ■ MELANGE DE SOLVANTS

Type de préparation _____ ■ Extraction

Volume _____ 13 mL

Ultrasons _____ 15 min

Commentaires :

Extraction des poussières collectées dans la coupelle CIP10 (mousse et parois) :

- Transférer la mousse dans un flacon de 20 mL avec 10 mL du solvant de désorption (méthanol/eau 70/30).
- Extraire aux ultra-sons pendant 15 minutes.
- Récupérer les poussières déposées sur les parois de la coupelle par ajout de 3 * 1 mL du solvant de désorption dans la coupelle, la refermer avec son couvercle et la soumettre 15 minutes aux ultra-sons également.
- Transférer la totalité de la solution d'extraction à l'aide d'une pipette pasteur en matière plastique dans un flacon de 200 mL.

Etape de préparation n° 2

Solvant ou solution _____ ■ Tampon phosphate

Type de préparation _____ ■ Dilution

Volume _____ 160 mL

Filtration :

Au besoin

Commentaires :

Dilution par 160 mL de solution tampon phosphate (pH 7,4) (PBS) pour qu'au final la proportion de solvant organique reste < 5% de sur les colonnes IAC (selon les préconisations du fournisseur) :

- Diluer la solution d'extraction par 160 mL de tampon PBS (en plusieurs fois, parmi lesquelles celles qui servent à rincer le flacon de 20 mL qui contenait la mousse et la coupelle vide et en aspirant systématiquement le tampon au travers de la mousse, à l'aide de la pipette pasteur).
- Agiter à l'aide d'un barreau magnétique.
- Si la solution est très chargée en poussières, prévoir une filtration au travers d'un cône en papier filtre.

Etape de préparation n° 3

Solvant ou solution _____ ■ PBS

Type de préparation _____ ■ Purification

Commentaires :

- Laisser chaque colonne (AOF ou DZT) 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.
- Conditionner chaque colonne IA selon les préconisations du fournisseur.
- Associer les colonnes d'immunoaffinité en tandem, la colonne AOF au-dessus de la colonne DZT, avec un embout adapté à l'entrée de chacune des 2 colonnes. Remplir chaque colonne de PBS.
- Prévoir un corps de seringue de 20 ou 50 mL comme réservoir de distribution, à remplir en plusieurs fois, et transférer tout le volume de solution échantillon sur la colonne (voir photo 1).
- Amorcer si besoin l'élution, en douceur, à l'aide d'une pipette Pasteur en verre ou à l'aide d'un faible vide, **sans dépasser 5 bars**.
- Éliminer le mélange de solvant par soutirage sous vide dans la cuve de récupération, **sans amener à sec**.
- Les mycotoxines sont maintenant liées aux anticorps monoclonaux spécifiques, présents sur l'une ou l'autre des 2 colonnes.
- Rincer les colonnes IA avec 2 fois 10 mL d'eau, préalablement versés dans le flacon de 200 mL ayant contenu la solution échantillon (pour une récupération complète de celle-ci).
- Éliminer le liquide par soutirage à sec, en douceur et en s'assurant qu'il soit complet.

Photo 1



Étape de préparation n° 4

Solvant ou solution _____ ■ METHANOL

Type de préparation _____ ■ Extraction

Commentaires :

Nota : Pour une plus grande précision de l'analyse, les récupérations en flacons, les transferts et les dilutions décrits à partir de cette 4^e étape, pourront être réalisés par gravimétrie (sur une balance calibrée) :

Pesée flacon avec bouchon,

Puis, pour les dilutions

Pesée flacon bouché + solvant

Pesée flacon bouché + solvant + solution mycotoxine

Ou, pour les reprises après évaporation à sec

Pesée flacon bouché + solution de reprise,

Etc.

- Tarer au besoin les flacons de 4 mL, prévus pour la récupération de l'extrait, en identifiant chaque flacon et le bouchon associé.
- 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 2 mL de méthanol à l'entrée de la colonne AOF, laisser passer au-travers des deux colonnes par gravité, recueillir dans le flacon.
- 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.

La pesée du volume récupéré permet de vérifier que tout le méthanol a bien été élué des colonnes IA.

Étape de préparation n° 5

Solvant ou solution _____ ■ MELANGE MeOH/EAU 50/50

Type de préparation _____ ■ Concentration

Évaporations _____ 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) (Voir **photo 2**).
- 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 et effectuer la pesée du flacon contenant le résidu sec ;
- Reprendre le résidu par **500 µL de méthanol/eau 50/50** et effectuer la pesée du flacon "plein" ;

La solution obtenue est ainsi concentrée 4 fois par rapport à l'éluat IAC.

- Mélanger à l'aide d'un agitateur Vortex et transférer dans un flacon pour passeur muni d'un insert.

Photo 2



1 condition analytique :

Condition analytique n° 1

Les conditions analytiques utilisées lors du développement de la méthode sont fournies avec les données de validation.

Technique analytique _____ ■ CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ULTRA HAUTE PERFORMANCE

Injecteur _____ ■ PASSEUR AUTOMATIQUE

Colonne _____ ■ PHASE INVERSE INERTE

Détecteur _____ ■ SPECTROMETRE MS/MS

Phase mobile _____ ■ EAU+0.1%ACIDE FORMIQUE
 ■ METHANOL+0.1%ACIDE FORMIQUE

Étalonnage et expression des résultats

La méthode d'étalonnage utilisée lors du développement de la méthode revêt un caractère obligatoire pour atteindre le niveau de performances validé (sensibilité, rendements, précision)

Méthodes d'étalonnage pour la quantification des polluants⁹

⁹<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 par mélange des 8 solutions-mères des produits de référence (aflatoxines, ochratoxine A, fumonisines B1 et B2, DON, zéaralénone, T2, HT2), dilutions du mélange, purification sur colonne d'immunoaffinité AOF-DZT et concentration, dans les mêmes conditions que celles adoptées pour les échantillons prélevés dans l'air.

Les informations détaillées sur l'étalonnage sont fournies avec les données de validation.

Calcul de la quantité de substance sur le dispositif :

1- Déterminer la concentration (Ca) en mycotoxine(s) de chaque aliquote analysée :

Etablir une droite d'étalonnage pour chacune des mycotoxines (Afla G1, Afla G2, Afla B1, Afla B2, OTA, FB1, FB2, Zéa, Don, HT2 et T2) en prenant en compte les concentrations exactes (Ee) des étalons injectés.

Les concentrations en l'une ou l'autre des mycotoxines, C_a (ng/mL), dans les aliquotes-échantillons analysées, sont déterminées à partir de chacune des droites d'étalonnage.

2 - Calculer la quantité (M_p) extraite sur tandem AOF-DZT :

■ M_p (ng, selon la mycotoxine) = $C_a \times V_r$

avec V_r (mL) : volume de reprise après évaporation à sec ;

C_a (ng/mL) : concentration en mycotoxine de la solution échantillon analysée

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

Calcul de la concentration (C) dans l'air

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

avec : M_p (ng) : masse de mycotoxine dans la coupelle de prélèvement

M_b (ng) : masse moyenne de la mycotoxine dans les blancs de laboratoire

V (L) : volume d'air prélevé.

Il est également possible de calculer la concentration pondérale des poussières contaminées dans l'air

1- Masse des poussières Q (en mg) prélevées dans la coupelle x.

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

avec, pour n témoins pesés :

Mix : la masse initiale de la x^e coupelle utilisée

Mfx : la masse finale de la x^e coupelle utilisée

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

Tiy : la masse initiale de la y^e coupelle témoin

Tfy : la masse finale de la y^e coupelle témoin

ΔT : $T_{fy} - T_{iy}$ pour le y^e témoin.

$$\text{Soit, pour 3 témoins : } Q_x = \Delta M_x - \frac{1}{3} (\Delta T_1 + \Delta T_2 + \Delta T_3)$$

2- Teneur moyenne en chacune des mycotoxines dans les poussières Q (en µg/kg) :

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

$$Q \text{ (}\mu\text{g/kg)} = \frac{M_{px} \times 1000}{Q_x}$$

avec M_{px} (ng) : masse de la mycotoxine dosée dans la coupelle x

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

Compléments :

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.

Parmi les différentes méthodes chimiques utilisées en vue de décontaminer les aliments, les plus efficaces vis-à-vis de la zéaralénone semblent être l'emploi de formaldéhyde, puis d'hydroxyde d'ammonium.

Les solutions de décontamination seront éliminées dans un bidon de récupération pour produits chimiques prévu à cet effet.

Se reporter à : **Manipulations dans les laboratoires de chimie** ¹⁰

¹⁰ <https://www.inrs.fr/media.htm?refINRS=ED%206253>

Contacts

metropol@inrs.fr

Bibliographie**Historique**

Version	Date	Modification(s) faisant l'objet de la nouvelle version
M-460/V-01	Mai 2025	Création