

## METHODE DE DOSAGE DE L'OTA PAR HPLC

### I - REACTIFS

<b>Réactif</b>	<b>Spécification</b>
Ethanol	Pureté 95-96 %
Hydrogénocarbonate de sodium (bicarbonate de sodium)	Pour analyse
Hypochlorite de sodium	12.5 % chlore actif
Méthanol	Pour HPLC
Sulfate de sodium	Anhydre pour analyse
Toluène	Pour analyse de résidus
Pastilles de sel pour tampon phosphate salin (PBS)	
Solution d'hydrogénocarbonate de sodium	1 % m/v dans le l'eau de qualité HPLC
Solution d'hydrogénocarbonate de sodium	3 % m/v dans de l'eau quailté HPLC
Phase mobile : acétonitrile /eau qualité HPLC/acide acétique	55/43/2 v/v/v. Filtrer à 0,45 µm
Mélange toluène/acide acétique	99/1, v/v.
Mélange méthanol/acide acétique	98/2, v/v.
Tampon PBS	Une pastille de sel pour 100 ml d'eau qualité HPLC. Vérification du pH (7.2<pH<7.4)
Mélange méthanol/acide acétique/tampon PBS	49/1/50, v/v/v.
Mélange méthanol/ hydrogénocarbonate de sodium à 3 %	20/80, v/v.
Mélange méthanol/ hydrogénocarbonate de sodium à 3 %	50/50, v/v.
Mélange méthanol/eau qualité HPLC	7/93, v/v
Solution d'hypochlorite de sodium,	Concentration finale à environ 1.3 %.

## II - CONSOMMABLES

Consommables	Spécification
Colonne analytique	Type: C18 S5 ODS 2.5 µm (25 cm_4.6mm ou équivalent
Colonnes d'immunoaffinité	Type: R-Biopharm OCHRA-PREP
Cônes pour pipette automatique	Type. : Labsystem finpipette research ou PCR cofralab ou Gilson CP 1 000.
Filtres HPLC	45 µm de porosité.
Filtres Papier	Qualité Whatman N° 4.
Membrane filtrante	Type : Millipore membrane durapore en PVDF, hydrophile 0.45 µm 47 mm.
Pot à centrifuger	250 ml, en nalgène.
Précolonne	Type: C18 , 2,5 µm, 10 mm x 4 mm ou equivalent.

## III - MATERIEL

Agitateur magnétique	Agitateur magnétique non chauffant.
Bac à ultra-sons ou pompe à vide pour dégazage des solutions	
Balances	Type: résolution 0,1 mg max 200 g, résolution 0,001 g max 410g, résolution 0,1 mg max 200 g, résolution 0,01 g max 2 kg, résolution 0.002 g, résolution 0.001 g max 400 g.
Broyeurs	Type : Robot coupe broyeur à couteaux Ultra Turax ou Waring Blender
Cuve quartz	Trajet optique de 10 mm et sans absorption significative entre 300 nm et 370 nm
PHmètre	Résolution 0.1 unité de pH.
Pipettes automatiques	
Spectrophotomètre UV/Visible	Largeur de bande ne dépassant pas 5 nm
Système chromatographique en Phase Liquide Haute Pression (HPLC)	Boucle d'injection de 100 µl. Détecteur fluorescence.
Verrerie	Matériel en verre couramment utilisé au laboratoire, avec notamment des pipettes et des fioles de classe A.

#### IV - ETALONS

L'ochratoxine peut être utilisée sous forme sèche (poudre) ou en solution. Dans la mesure du possible, en relation avec la toxicité de la molécule, il est préférable de travailler avec des solutions.

Produits	Spécificités
Substances de référence	Ochratoxine en poudre. Ochratoxine en solution : 50 µg/ml dans le mélange benzène/acide acétique (99/1), pureté 99%.
Solution mère	Solution à 90 mg/l dans le mélange toluène/acide acétique (99/1).
Solution intermédiaire	Solution à 0,9 mg/l dans le tampon phosphate
Solutions d'étalonnage dans le mélange méthanol/acide acétique/tampon phosphate (49/1/50)	9,0 µg/l 4,5 µg/l 1,8 µg/l 0,45 µg/l 0,090 µg/l 0,018 µg/l
Solution de contrôle	Solutions étalon à 1,8 µg/l, 0,090 µg/l et 0,018 µg/l.
Solution étalon de contrôle de purification pour l'immunoaffinité et la double purification	Solution à 9 µg/l

##### 4.1 – Solution mère

Dissoudre l'ochratoxine A dans un mélange toluène/ acide acétique (99/1) afin d'avoir une concentration de l'ordre de 90 mg/l. Déterminer la concentration de cette solution en faisant une dilution de 10 dans le mélange toluène/acide acétique (99/1) et mesurer l'absorbance à 333 nm dans une cuve de quartz de 1 cm, le mélange toluène/acide acétique (99/1) étant dans la cuve de référence.

La concentration  $c$  (exprimée en mg/l) de la solution est déterminée comme suit «.

$$C = \frac{A \times M}{\epsilon \times \delta} \times 100 \times f$$

$M = 403$

masse moléculaire relative de l'ochratoxine, en g/mole

$\epsilon = 544$

coefficient d'absorption molaire dans le mélange toluène/acide acétique/ (99/1) en  $m^2/mole$

$\delta = 1$

trajet optique de la cellule, en cm.

$F$

facteur de dilution de la solution mère pour mesure au spectrophotomètre ( $f = 10$ )

La solution mère est conservée à l'obscurité, au congélateur et calibrée tous les ans. La concentration trouvée ne doit pas varier de plus de 20 % par rapport à la concentration initiale. Dans le cas contraire, une nouvelle matière active est commandée.

#### 4.2 – Solution intermédiaire

1 ml de la solution mère est mis à évaporer, à sec, sous flux d'azote à température ambiante, dans une fiole jaugée de 100 ml. Le mélange méthanol/acide acétique/tampon phosphate (49/1/50) est le solvant de reprise. On obtient une solution à 0,9 mg/l dans le tampon phosphate.

#### 4.3 – Solutions d'étalonnage

Autant que possible, protéger de la lumière les solutions d'ochratoxine. Elles sont conservées dans des flacons en verre ambré en chambre froide positive. Leur durée de vie est de un an. A partir de la solution intermédiaire, préparer une série de solutions étalons dans le mélange méthanol/acide acétique/tampon phosphate (49/1/50) de la façon suivante :

Solutions	N°	Solution préparée à partir de	Dilution	Concentration à Environ
Solution étalon	1	Solution intermédiaire	100	9,0 µg/l
Solution étalon	2	Solution intermédiaire	200	4,5 µg/l
Solution étalon	3	Solution étalon n°1	5	1,8 µg/l
Solution étalon	4	Solution étalon n°1	20	0,45 µg/l
Solution étalon	5	Solution étalon n°1	100	0,090 µg/l
Solution étalon	6	Solution étalon n°1	500	0,018 µg/l

#### 4.4 - Solutions de contrôle

Lorsque la gamme d'étalonnage n'est pas utilisée pour le calcul, trois solutions, étalon n° 3, étalon n° 5 et étalon n° 6 (1,8µg/l, 0,09 µg/l et 0,018 µg/l), préparées de façon indépendante et adaptées aux teneurs supposées des échantillons, sont choisies et injectées en même temps que les extraits obtenus.

#### 4.5 - Solution étalon de contrôle de purification pour l'immunoaffinité et la double purification

Par dilution 100 de la solution intermédiaire, dans du tampon phosphate , faire un standard à environ 9 µg/l.

### V - MODE OPERATOIRE

#### 5.1 – Broyage des échantillons

Lorsque la quantité de produit le permettra, on préparera un échantillon global de 4 kg qui sera broyé avec un broyeur à marteau muni d'une grille de 10 mm pour le cacao et de 1,5 mm pour le café. L'échantillon final de 200 g sera obtenu par séparation successive de l'échantillon global broyé. Les échantillons sont broyés de manière à ce qu'ils traversent un tamis d'ouverture de maille de 1,0 mm de diamètre.

### 5.2 - Extraction sur les plantes aromatiques, sèches, le café, le thé, le cacao

Quantité utilisée : environ 15 g d'échantillon pesés à  $\pm 0,01$  g près sont placés dans le bol du Waring Blendor. Ajouter, à l'aide d'une éprouvette graduée, 150 ml du mélange méthanol/hydrogénocarbonate de sodium à 1 % m/v dans l'eau(50/50). Extraire 2 minutes à la vitesse moyenne et ensuite 3 minutes à la vitesse supérieure.

Centrifuger à 4 000 tours/min pendant 5 minutes si cela est nécessaire. Prélever 25 ml du surnageant et les filtrer à travers un papier filtre( 185 mm) Wathman Ref 066082. 775 dans une éprouvette de 25 ml .Diluer 11 ml d'extrait avec 11 ml de PBS ( 10 pastilles pour 11 d'eau HPLC).

### 5.3 - Purification sur colonne d'immunoaffinité (IAC)

Sortir les colonnes d'immunoaffinité de la chambre froide positive au moins 30 minutes avant de commencer le test et les laisser à température ambiante.

Passer l'extrait dilué sur la colonne d'immunoaffinité suivant le protocole ci-après :

Vider les colonnes de leur liquide de conservation dans des flacons de récupération.  
Conditionner la colonne avec 10 ml de PBS, à un débit de 3 ml/min (ne pas sécher la colonne).  
Prélever 20 ml d'échantillon, à la pipette et les déposer sur la colonne à un débit de 2 ml/min.  
Laver la colonne avec 10 ml de PBS, à un débit de 3 ml/min  
Eluer par 1,5 ml du mélange méthanol/acide acétique en trois étapes de 0,5 ml avec une pause de 1 minute entre chaque étape, à un débit de 0.5 ml/min.  
Eluer par 1,5 ml de PBS sur la colonne à un débit de 5 ml/min.

Remarque : le volume final est de 2.8 ml et non 3 ml car il reste toujours quelques gouttelettes sur la colonne.

## VI - DOSAGE

### 6.1 - Exemple de conditions HPLC

Colonne	C18 2,5 $\mu$ m, 250 mm x4.6 mm
Précolonne	Cl 8, 2,5 $\mu$ m
Phase mobile	Acétonitrile /Eau /Acide Acétique (55/43/2, v/v/v)
Débit	1 ml/min en isocratique
Volume injecté	100 $\mu$ l sur détecteur Fluo shimadzu
Détecteur	à fluorescence, $\lambda$ excitation : 330 nm, $\lambda$ émission : 460 nm
Durée analyse	12 min
Solvant de rinçage	acétonitrile

### 6.2 - Etalonnage

Une fois par an, réaliser un étalonnage en 5 points à partir des solutions d'étalonnage préparées au 4.3. Il doit couvrir la gamme des concentrations des extraits obtenus à partir des échantillons à analyser.

Chromatographier les solutions d'étalonnage en injectant un volume correspondant à celui du volume d'extrait injecté. Etablir la courbe d'étalonnage en portant les valeurs du signal obtenu en fonction de la concentration des solutions d'étalonnage. On obtient alors, la droite d'équation

$$Y = ax+b$$

Y est la valeur de l'aire du signal obtenu

x est la concentration de la solution d'étalonnage correspondante (mg/l)

a est la pente de la droite d'étalonnage

b est l'intersection de la droite d'étalonnage avec l'axe des ordonnées

Le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage doit être supérieur à 0,98.

Avant chaque série analytique, réaliser un étalonnage en 3 points avec les solutions n°3, n° 5 et n° 6 préparées au 4.3.

### 6.3 - Vérification de la performance de la colonne d'immunoaffinité : étalon purifié (solution d'OTA dans le vin)

Par exemple à environ 1,8 µg/l. Mettre environ 560 µl de l'étalon à environ 9 µg/l dans le tampon phosphate dans un tube falcon contenant 21 ml de tampon phosphate. Purifier comme indiqué au 5.3. Passer l'extrait en HPLC

La purification sur la colonne d'immunoaffinité doit permettre l'extraction d'au moins 70 % de la quantité d'ochratoxine déposée dessus.

### 6.4 - Ajout dosé

Par exemple à environ 0.9 µg/kg

Ajouter 1,5 ml du standard ochratoxine à 9 µg/l dans le tampon phosphate (4.6) à 15 g d'échantillon

Mélanger par agitation manuellement

Extraire cet ajout dosé comme indiqué au 5.2.

Purifier comme indiqué au 5.3

### 6.5 - Essai à blanc

Des essais à blanc sont réalisés régulièrement en prenant les mêmes quantités de tous les réactifs utilisés pour les échantillons. Ils ne doivent pas présenter de composés interférents avec le composé recherché. Dans le cas contraire, il convient de trouver des conditions chromatographiques permettant de s'en affranchir.

### 6.6 - Echantillons surchargés

Des échantillons dits « surchargés » (originellement non contaminés et dans lesquels a été ajoutée avant extraction une quantité connue d'ochratoxine) sont traités et analysés comme les échantillons.

La concentration en acétonitrile ou en méthanol du filtrat passé sur colonne ne doit pas dépasser 5% sinon il y a risque de dénaturation des anticorps. Pour les ajouts, il faut donc faire des dilutions de la solution étalon dans le tampon PBS.

## 6.8. - Séquence analytique

Une fois par semaine, la séquence analytique peut être la suivante :

Solutions de contrôle n° 3, n° 5, n° 6 (1,8µg/1, 0,09µg/1, 0,018 µg/1)

Etalon purifié

Ajout dosé

Blanc solvant

Solutions de contrôle n° 3 (1,8 µg/1)

L'analyse est validée si

- la concentration de la première injection de la solution de contrôle n° 3 calculée à l'aide de l'ancienne courbe d'étalonnage ne diffère pas de ± 15 % de la valeur attendue
- concentration de la solution de contrôle n° 3 calculée à l'aide de la courbe d'étalonnage ne diffère pas de ± 15 % de la valeur attendue
- l'ajout dosé effectué sur la matrice doit être supérieur à 70 % de la quantité ajoutée dans l'échantillon.
- la performance de la colonne d'immunoaffinité est testée, elle doit être supérieure à 70 % pour la quantité purifiée sur la colonne ou l'ajout dosé doit être supérieur à 70 %.

Dans le cas contraire, la séquence est reprise et les causes sont recherchées.

## VII - RESULTATS

### 7.1 - Identification

On identifie le composé d'après son temps de rétention.

### 7.2 - Quantification quand purification par immunoaffinité

La concentration est déterminée de la façon suivante :

$$C = \frac{S \text{ éch} \times Z \text{ std}}{S \text{ std}} \times \frac{V}{m \text{ (ou } v)} \times \frac{V \text{ ext}}{V_a} \times \frac{V_1}{V_2}$$

C : concentration en matière active recherchée, en µg/kg ou µg/1, dans l'échantillon

S éch : surface du pic de matière active recherchée dans l'échantillon

S std : surface du pic de matière active recherchée dans la solution étalon

Z std : concentration de matière active recherchée, en µg/1, dans la solution étalon

V : volume, en ml, de solvant utilisé pour la reprise de l'extrait (2,8 ml)

m : poids, en g, d'échantillon analysé (15 g)

v : volume, en ml, d'échantillon Analysé (10 ml)

V ext : volume, en ml, de solvant à l'extraction (200 ml si solide, 150 ml si liquide)

V<sub>a</sub> : volume, en ml, d'aliquote prélevé après extraction (11 ml)

V<sub>1</sub> : volume, en ml, d'échantillon dilué pour la purification (22 ml)

V<sub>2</sub> : volume, en ml, d'échantillon dilué réellement purifié sur la cartouche (20 ml)

Remarque:

Dans les deux cas,

$$\frac{S_{\text{éch}} \times Z_{\text{std}}}{S_{\text{std}}}$$

Peut être calculé par la courbe d'étalonnage ou à partir des solutions de contrôle.