

**SOP/MYC/ANA/08**

Vnr : 01

Datum/Date : 22/03/13 Pg 1/10

Titel/Titre : Détermination de l'ochratoxine A dans les rognons, foie et boudin noir par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse (UPLC/MS-MS)

Doel / Objet :

La présente instruction décrit les tâches nécessaires à la détermination de l'ochratoxine A (OTA) dans les rognons, foie et boudin noir par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse (UPLC/MS-MS).

Toepassingsgebied / Domaine d'application :

Cette instruction s'applique aux analyses de routine des triperies (rognons, foies) et boudins noirs destinés à la consommation humaine.

**Bestemmingen / Destinataires : zie distributielijst /
Voir liste de distribution****Aantal copies in omloop / Copies en circulation : 3****Historiek / Historique**

Vnr	Datum vrijgave Date d'application	Reden(en) wijziging / Motif(s) de changement
01	22/03/13	Première version / Eertse editie

	Auteur	Kwaliteitsverantwoordelijke Responsable Qualité	Technisch verantwoordelijke Responsable technique
Naam / Nom	TANGNI Emmanuel K.	Knapen Katia	TANGNI Emmanuel K.



1. Objet

La présente instruction décrit les tâches nécessaires à la détermination de l'ochratoxine A (OTA) dans les rognons, foie et boudin noir par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse (UPLC/MS-MS).

2. Domaine d'application

Cette instruction s'applique aux analyses de routine des triperies (rognons, foies) et boudins noirs destinés à la consommation humaine.

3. Définitions, abréviations, références et normes

3.1 Définitions

Les définitions de la décision 2002/657/CE sont d'application.

- Eau = Eau MilliQ obtenue via un système combiné d'osmose et de polissage produisant de l'eau à 18.2 MΩ et 4 ppb TOC (total organic contaminants).
- Température ambiante = $23 \pm 5^{\circ}\text{C}$

3.2 Abréviations

ACN :	acétonitrile
H ₃ PO ₄ :	acide phosphorique
CHCl ₃ :	Chloroforme
°C :	Degré Celsius
H ₂ O :	eau
ESI :	electro-spray ionisation
g :	gramme
h :	heure
HPLC :	high performance liquid chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
ID :	Identification de l'échantillon
kg :	kilogramme
L :	litre
LC :	chromatographie liquide
LOD :	limit of detection (limite de détection)
LOQ :	limit of quantification (limite de quantification)
MΩ :	méga Ohm
MeOH :	méthanol
m/z :	rapport masse/charge
m :	mètre
μg :	microgramme
ml :	millilitre
min :	minute
MRM :	Monitoring de Réaction Multiple
MS:	Spectrométrie de Masse
ng :	nanogramme
OTA :	ochratoxine A
PFTE :	polytetrafluoroethylene
ppb:	parts par billion
QC :	contrôle de qualité (Control quality)
rpm:	rotation par minute
RT :	responsable technique
STD :	standard
TOC :	total organic contaminants)
UV :	ultra-violet.



3.3 Références

1. Comité Technique CEN/TC 275 du Comité Européen de Normalisation (CEN). Produits alimentaires – Biotoxines – Critères des méthodes d'analyse des mycotoxines. CR 13505. Bruxelles : CEN, 1999, 8 p.
2. Commission des communautés européennes. Décision de la commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances d'analyse et l'interprétation des résultats. Journal officiel des Communautés européennes, n° 2002/657/CE du 17 août 2002, pp. 8-36.
3. Commission des Communautés Européennes. Règlement (CE) N°401/2006 de la Commission du 23 février 2006 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires. Journal officiel de l'Union européenne L70 du 9.3.2006 pp. 12-34.
4. Commission of the European communities. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels of Ochratoxin A in foodstuffs. Official Journal of the European Communities, n° 2002/26/EC of 13 March 2002, pp. 38-43.
5. Duarte S.C., Lino C.M., Pena, A., 2010. Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: A review of the worldwide status. Food Additives and Contaminants. Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 27, 1440–1450.
6. Duarte S.C., Lino C.M., Pena A. 2013. Novel IAC-LC-ESI-MS2 analytical set-up for ochratoxin A determination in pork. Food Chemistry 138: 1055-1061.
7. Horwitz W., Albert R. 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): A useful Index of method performance with respect to precision. Journal of AOAC International 89(4) : 1095-1109.
8. International Organization for Standardization (ISO), 1999. ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO, Geneva, Switzerland.
9. Nordic Committee on Food Analysis. NMKL Protocol N° 5, 2011 (11 Octobre) Analytical Quality Control – Guidelines for the publication of analytical results of chemical analyses in foodstuffs. pp 1-23.
10. Jorgensen K., Petersen A. Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. Food Additives and Contaminants, 2002.
11. Malagutti L., Zannotti M., Sampini A., et al. Effects of Ochratoxin A on heavy pig production. Animal Research, 2005, n°54, pp. 179-184.
12. Matrella R., Monaci L., Milillo M.A., Palmisano F., Tantillo M.G. 2006. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. Food Control 17: 114-117.
13. Milicevic D.R., Juric V.B, Stefanovic S.M., Veskovic-Moracanin S.M. Jankovic S.I. 2009. Analysis of ochratoxin A in pig tissues using high pressure liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) as confirmative methods. Proceedings for natural sciences 117: 51-61.
14. Van Loco J., Beernaert H., An Alternative Method Validation Strategy for the European Decision 2002/657/EC, Proceedings of Euro Food Chem XII: Strategies for Safe Food 2003, 1, 91 -94
15. Van Trijp J.M.P., Roos A.H. 1991. RIKILT Test Model for calculation of calibration curves. Rikilt report n° 91-02: 1-4.
16. Völkel I., Schröer-Merker E., Czerny C.P. The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European food safety legislation. Food and Nutrition Sciences, 2011, n°2, pp. 852-867.

PRO/5.7/01 Archivages

SOP/MAT/MAIN/04: Sauvegarde des données générées par l'UPLC-MS/MS



4. Principe

4.1. Etape de préparation

Il s'agit de la préparation de l'échantillon par broyage à l'aide d'un hachoir à viande et d'homogénéisation des échantillons. Les broyats peuvent être stockés à -16°C avant l'extraction.

4.2. Etape d'extraction

Avant les mesures, l'ochratoxine A présente dans l'échantillon doit être extraite afin de pouvoir être analysée par la suite. L'extraction est précédée d'un traitement à l'acide phosphorique et consiste à un ajout de solvant organique (chloroforme) et d'une trituration ou agitation. L'extraction n'utilise pas de nettoyage par passage sur une colonne à phase solide ou d'immuno-affinité ayant comme particularité une extrême affinité pour la molécule visée. L'extrait isolé par centrifugation est évaporé et dissout dans du méthanol et filtré pour les mesures UPLC/MS-MS.

4.3. Etape de mesure

L'ochratoxine A dans les extraits est détectée et quantifiée au moyen de la LC-MS/MS. La séparation est assurée par une colonne en phase inverse et la détection est réalisée par la MS avec «electrospray ionisation » ESI (en mode +). Les ions sont filtrés selon un m/z défini et fragmentés en 2 ions adduits (molécules filles) grâce à la collision avec les atomes d'argon. La quantification se fait grâce aux standards internes ^{12}C et à l'isotope ^{13}C ajoutés.

5. Paramètres de validation

Voir dossier de validation

6. Fournitures

6.1. Petit matériel de laboratoire

- Tubes Falcon (de 50 mL ou pot en plastique avec couvercle)
- Hachoir à viande
- Spatules
- Agitateur rotatif ou Mélangeur over-head (Reax II)
- Pot à centrifuger en copolymère de PPP de 250 mL
- Erlenmeyer de 100 ml
- Vial (4 mL, 1,5 mL, 250 μL)
- Pipettes en plastique à usage unique de 25, 10 et 5ml
- Eprouvettes gradués (50, 100 mL)
- Cônes à usage unique pour micropipettes de 200 μL et 1000 μL)
- Gants en latex ou mieux en nitrile
- Tubes à centrifuger de 50 ml (récipients d'extraction) avec couvercle à visser
- Vortex secoueur de tube
- Filtres Acrodisc (PTFE 0,45 μm)
- Evaporateur (REACTI – THERM III)

6.2. Réactifs spécifiques

- ACN pour HPLC, conservé à température ambiante ;
- Acide formique
- Eau Milli Q
- MeOH pour LC-MS, conservé à température ambiante ;
- CHCl_3 Chloroforme BP grade pour analyse, conservé à la température ambiante ;
- H_3PO_4 (solution 0,1 M) pour analyse, conservé à la température ambiante pour préparer une solution finale 1M ;
- Eau de javel à 10% (conservation d'une semaine au maximum)
- Détergent de vaisselle



6.3. Matériaux de référence

- Standard d'ochratoxine A ¹²C
- Standard d'ochratoxine A ¹³C

Le standard certifié ¹²C sera utilisé pour l'élaboration de la courbe de calibration ainsi que pour les enrichissements des matrices. Les dilutions de ce standard certifié seront contrôlées et évaluées par spectrométrie UV afin d'en recalculer la concentration exacte selon la loi de Lambert-Beer.

$E = c \cdot l \cdot \epsilon$ (E = extinction ; c = concentration ; l = longueur de la cuvette ; ϵ = coefficient molaire d'extinction)

Mycotoxin STD OTA (conservation à $5 \pm 3^\circ\text{C}$).

7. Equipements

- Balances de précision et analytiques
- Système UPLC/MS-MS
 - Passeur d'échantillons muni d'un thermostat
 - Pompes
 - Un four pour colonne
 - Colonne pour chromatographie en phase inverse (BEH C18 1.7 μM -2.1x100mm)
 - Gestionnaire du système chromatographique :
 - Gestion des pompes, injecteur, détecteur
 - Acquisition, intégration, print out, calibration, quantification des résultats bruts
 - stockage et archivage des résultats bruts
- Congélateurs (< -16°C)
- Réfrigérateur ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)
- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre (UV-Vis, 200 - 600 nm)
- Micropipettes (20-100 μL ; 100-1000 μL ; 10-100 μL)

8. Instruction

Il est important pour la sécurité et pour éviter toute contamination de l'environnement que la majorité des manipulations soit réalisée sous hotte.

L'OTA étant sensible à la lumière, il ne faut pas omettre de manipuler et stocker les échantillons ou standards à l'abri de la lumière.

8.1 Préparation des échantillons.

- Pesée des échantillons.
- Broyage des échantillons à l'aide d'un hachoir à viande et homogénéisation des échantillons.
- Répartition des broyats (± 35 g) dans des tubes coniques de 50 mL en Polypropylène (BD Falcon).
- Congélation en attente de l'extraction de l'OTA.

8.2 Protocole de l'extraction de l'OTA dans la matrice animale

Ce protocole est à réaliser simultanément pour 4 différents échantillons broyés.

Pour chaque échantillon :

- Prélever $10 \pm 0,01$ g d'échantillon broyé d'un tube (après décongélation) et mettre dans un pot NALGENE.
- Ajouter 3 mL d'acide phosphorique 1 M et bien mélanger à l'aide d'une spatule.
- Prélever 3 fois $3,25 \pm 0,01$ g de ce mélange (soit 3 sous-échantillons : a, b et c).
- Doper un sous échantillon (a) avec 250 μL d'OTA C12 à 50 ng/mL pour obtenir une concentration finale de 5 ng/mL et laisser 2 blancs (b et c = non dopées).
- Laisser évaporer 1h sous hotte (équilibre).
- Ajouter 25 mL de chloroforme dans chaque pot.
- Agiter 1h avec le mélangeur
- Centrifuger 10 min à 4000 rpm ou 2951g.



- Transvaser la phase chloroforme (surnageant) dans un erlenmeyer et boucher pour éviter son évaporation.
- Rajouter 25 mL de chloroforme dans chaque pot.
- Agiter 20 min.
- Centrifuger 10 min à 4000 rpm ou 2951g.
- Rajouter la phase chloroforme (surnageant) dans l'erlenmeyer contenant les 25mL recueillis précédemment.
- Mélanger et prélever 10 mL de chaque erlenmeyer (3 fois 3,33mL environ) à mettre dans des tubes et évaporer à sec avec l'évaporateur.

- Reprendre l'extrait sec dans 2 mL de MeOH/Eau (50/50).
- Bien vortexer pour solubiliser l'ensemble.
- Filtrer à l'aide de seringue et de filtre Acrodisc.

Pour le sous-échantillon *c* : dopé l'extrait après filtration des 2mL (**voir section 8.4**).

- Mettre 125 μ L dans les « vials » pour l'injection. Conserver le reste de l'extrait au congélateur.

8.4 Protocole de dopage des extraits blancs.

- Préparation d'une solution d'OTA ¹²C à 6,25 ng/mL :

Prélever 875 μ L de l'extrait *c* et mettre dans une fiole. Ajouter 125 μ L d'OTA ¹²C à 50 ng/mL. Bien vortexer le mélange. Ce qui permet d'obtenir une solution d'OTA ¹²C à 6,25 ng/mL.

- Prélever 125 μ L de ce mélange et mettre dans une fiole destinée à l'analyse par UPLC-MS/MS.

Dopage des extraits blanc

Dopage à 5 ppb des extraits blancs avec OTA ¹²C:

-->50 μ L d'OTA ¹²C à 6,25 ppb + 950 μ L d'extrait

Dopage à 5ppb des extraits blancs avec OTA ¹²C et ¹³C:

Prélever 80 μ L d'extrait dopé avec 50 μ L d'OTA 6,25ppb

Ajouter 20 μ L d'OTA ¹³C à 50 ppb.

8.5 Protocole de préparation de la courbe d'étalonnage.

La courbe d'étalonnage (Tableau ci-dessous) est préparée avec de l'OTA ¹²C 6,25 ng/mL et du méthanol/eau (50/50).

Préparation de la courbe standard

Volume à prélever	Concentration finale					
	0,1	0,2	0,5	1	2	5
μ L d'OTA ¹² C à 6,25 ppb	1,6	3,2	8	16	32	80
μ L d'OTA ¹³ C à 50 ppb	20	20	20	20	20	20
μ L de méthanol 50 %	78,4	76,8	72	64	48	0

8.6 UPLC/MS-MS : Méthode Intlet

Eu égard à la complexité de l'UPLC/MS-MS et de la précision nécessaire avec laquelle les analyses doivent être effectuées, l'analyste doit suivre une formation adéquate avant l'utilisation de la chaîne analytique. Cette formation est donnée par le responsable technique en charge des UPLC/MS-MS.

Avant toute analyse, l'utilisation de la chaîne commence par la vérification des paramètres techniques de l'UPLC/MS-MS (check-list).

La méthode utilise un gradient isocratique de 4 minutes avec les 2 phases mobiles ci-après :

- 55 % H₂O + 0,1% acide formique
- 45 % ACN + 0,1% acide formique



La séquence commencera par l'injection des standards servant à l'établissement de la courbe de calibration et se terminera par l'injection d'une matrice blanche, d'un blanc de procédé et du standard de contrôle.

Attention : veiller à rincer les récipients destinés à recueillir les éluants avec de l'eau « MilliQ », suivi ou non d'un rinçage à l'ACN et enfin d'un séchage durant toute la nuit.

Démarrage du système LC-MS/MS

Le programme Masslynx est démarré en cliquant sur l'icône « Masslynx » sur la page du bureau du PC. Ensuite via l'icône "instrument" on va ouvrir la fenêtre pour la méthode inlet et la méthode MS et on charge la méthode inlet et la méthode MS correctes. Les deux canaux (A & B) de la pompe doivent être amorcés pendant 4 minutes au moins les deux canaux de l'injecteur (SNW & WNW) pendant au moins 4 cycles. La MS doit être en position "operate" avec les gaz allumés et la source à la température correcte.

Pour stabiliser le système et maintenir les temps de rétention constants, il est indispensable que le détecteur MS et le four des colonnes soient conditionnés pendant au moins 30 minutes avant le début des analyses et suivant les conditions déterminées.

La colonne est d'abord rincée pendant 30 minutes à un débit de 1ml/min met MF B (méthanol) et ensuite pendant au moins 20 min à un débit de 1ml/min suivant les conditions de début du gradient d'analyse.

Début des analyses

Au moyen du document «SOP/MYC/ANA/08/DOC02 : checklist des paramètres techniques de la LC » en annexe 2, on peut contrôler si le système fonctionne bien.

Lorsque l'on complète la base de données des injections, on doit tenir compte du fait qu'il s'agisse d'un blanc, d'un standard ou d'un contrôle de qualité, d'un échantillon pour le recouvrement ou d'un échantillon. La nature de l'échantillon peut être remplie dans la colonne « SAMPLE TYPE » en la choisissant dans une liste déroulante : «standard, ...»

On peut toujours utiliser un «Sample Set» précédent pour remplir la liste des données. On peut de cette manière utiliser les mêmes paramètres d'injections pour nom d'échantillon déterminé.

La liste d'injection "Sample Set" reçoit un nom et est stockée sur le disque dur.

Fin de l'analyse chromatographique

Fin de l'analyse

Lorsqu'une séquence d'analyses est finie, on peut terminer l'analyse de deux manières différentes:

- Manuellement par un lavage de la colonne avec la phase mobile B avec un débit de 1ml/min et après 30 minutes avec un débit de 0.03ml/min.
- En mettant une ligne "stop" dans la séquence et dès lors le système se mettra automatiquement en arrêt.

8.7 Validation des résultats (exploitables)

Contrôle des chromatogrammes.

Les résultats d'analyses peuvent être visualisés grâce à "Targetlynx" via "process samples" et quantifiés via la méthode d'intégration appropriée.

Les résultats sont stockés dans un fichier Targetlynx avec le même nom que la séquence. Les résultats peuvent être imprimés à partir d'ici.

Le chromatogramme de vérification avec le standard doit être exempt de toutes formes d'interférence dans la fenêtre d'observation du pic de l'ochratoxine A avec un temps de rétention relatif ne peut varier de plus de 2,5%.

En cas de présence d'interférences, il convient d'appliquer, successivement, les modifications suivantes avant de recommencer, à chaque étape, le conditionnement de la colonne ainsi que l'injection de vérification après :

- remplacement de l'éluant par un neuf.
- remplacement de la colonne analytique
- rinçage de tout le système.



Contrôle de la courbe d'étalonnage. Le RIKILT Test (Van Trijp & Roos, 1991) sera utilisé pour vérifier la linéarité des réponses aux injections de standards d'OTA (ng/mL).

Les concentrations d'OTA seront déterminées au moyen de cette courbe d'étalonnage conformément aux exigences spécifiques de l'uniformité des temps de rétentions (valeur absolue des temps de rétention) et des rapports d'ions (ion ratio). En effet, l'OTA apparaît toujours aux temps de rétention variant entre 2,593 – 2,634 minutes, sans qu'aucune interférence de pics ne soit observée pour les extraits de rognon, foie et boudins noirs.

Tolérances maximales admissibles pour les intensités ioniques relatives. La fragmentation de l'OTA (m/z 404,178) donne deux produits ioniques (m/z 358,022 et 238,9) dont les rapports d'intensités sont comparés aux tolérances maximales du tableau ci-après :

Intensité relative	CL-MS (Variation relative des intensités)
>50 %	± 20 %
>20 % - 50 %	± 25 %
>10 % à 20 %	± 30 %
<= 10 %	± 50 %

2002/657/CE* : Valeur moyenne (coefficient de variation)

Contrôle du pourcentage de récupération.

A chaque série d'échantillons, il est associé :

- un échantillon servant au calcul de la récupération (dopé ^{12}C). Cet échantillon est composé d'une matrice blanche dopée à un des niveaux d'OTA représentatifs des limites envisagées (voir Tableau ci-après). Les taux de récupération peuvent ainsi être calculés (valeurs minimale et maximale) pour contrôler la bonne marche des essais considérés.

Limites maximales autorisées pour les déterminations des pourcentages de récupération dans les triperies et boudins

	Limites maximales autorisées ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Justesse (%) [*]	
		Minimum	Maximum
Rognons	5-15	70%	110%
Foie	5-15	70%	110%
Boudins noirs	2-5	70%	110%

* : 2002/657/CE

- un échantillon servant à contrôler l'effet matrice (utilisation des standards ^{13}C) (voir ci-dessus : préparation de la courbe standard).

8.8 Calcul du facteur de correction total

Formulation du calcul du facteur de correction (top-down) :

- Prise de 3,25 g de mélange viande et acide phosphorique à partir d'un mélange de 10 g de matrice et 3 ml d'acide phosphorique (soit $3,25 \cdot 10/13 = 2,5$ g de matrice par prise de mélange)
- 2,5 g de matrice dans 50 mL de CHCl_3 donnent un facteur de dilution de 20
- 10 ml de CHCl_3 sont prélevés des 50 mL ; ce qui correspond à un facteur de 1/5
- Les 10 ml de CHCl_3 prélevés sont évaporés et reconstitués avec 2 mL de MeOH/eau ; ce qui engendre un facteur de concentration de 5
- Le facteur de correction total est de $2 \text{ mL} \cdot 50 \text{ mL}/10 \text{ mL} \cdot 1/2,5 \text{ g} = 4,0$. Ce qui signifie que la concentration (ng/mL) dans l'extrait injecté (analyse chromatogramme) est multiplié par 4,0 pour obtenir la concentration (ng/g) en ochratoxine A dans l'échantillon analysé.



8.9 Décision liée aux interprétations des résultats

Le broyage des échantillons est obligatoire et doit permettre l'homogénéisation des échantillons.

L'analyse des échantillons se fera néanmoins en 2 répétitions en considérant les critères suivants :

- Un résultat inférieur à LOQ sera rendu en tant que « < LOQ »
- Pour des échantillons dont les résultats des 2 répétitions (> LOQ) sont inférieurs à CC_{α} , la moyenne des 2 répétitions sera établie et l'échantillon est déclaré **conforme**
- Si le résultat de l'une des répétitions est égal ou supérieur au CC_{α} alors cette analyse sera reprise
- Pour des échantillons dont les résultats des 2 répétitions (> LOQ) sont supérieurs à CC_{α} , la moyenne des 2 répétitions sera établie et l'échantillon est déclaré **non conforme**

9. Mesures spécifiques de sécurité

Il est recommandé de porter des gants lors de la préparation des solutions standards ainsi que lors de la manipulation des échantillons durant l'extraction. Toutes les précautions seront prises lors de la manipulation des échantillons et des solutions étalons afin d'éviter toute contamination. Toute l'extraction devra être effectuée sous une hotte bien ventilée. L'élimination des solvants organiques et des solutions se fera dans les bidons prévus à cet effet. En ce qui concerne les déchets organiques, ils seront stockés dans les poubelles appropriées en attendant d'être éliminés.

On n'omettra pas d'utiliser les moyens préventifs adéquats lors de la manipulation de solvants eux aussi toxiques (voir tableau ci-dessous).

Solvants	Risk code	Security code
MeOH	11/23/24/25/39	7/16/36/37/45
ACN	11/23/24/25	16/27/45
CHCl ₃	22-38-40- 48/20/22	(2-)36/37
H ₃ PO ₄	34	26-45

Toute la verrerie ainsi que le matériel réutilisable sera décontaminé pendant au moins une demi-heure par trempage dans de l'eau de Javel diluée à 10%. Ce matériel réutilisable sera ensuite rincé à l'eau, nettoyé avec un détergent pour vaisselle, rincé abondamment à l'eau déminéralisée et séché à l'air.

10. Contrôle interne

Les contrôles par injection d'une matrice blanche¹, d'un blanc de procédé² et d'un standard de contrôle, seront suivis sur MultiQC afin d'en contrôler les dérives éventuelles. Nous avons aussi initié l'analyse de routine (20 rognons, 20 foies et 20 boudins noirs) afin d'identifier des matrices blanches et éventuellement d'échantillons contaminés pouvant servir à l'établissement de carte QC.

De plus, les contrôles internes de 1^{ère} ligne et de 2^{ème} ligne sont exécutés selon la procédure PRO/5.5/01 en vigueur.

¹ : Matrice blanche : Echantillon de très faible concentration en toxine (<LOD) déjà analysé et en quantité suffisante pour être répété un certain nombre de fois à défaut de matériau de référence non disponibles sur le marché.

² : Les «blancs de procédé» sont censés représenter l'ensemble des étapes de la préparation de l'échantillon. Ils comprennent donc toutes les manipulations, la vaisselle et les réactifs utilisés dans le procédé en l'absence de l'échantillon. Etant donné qu'ils pourraient être soustraits des valeurs obtenues pour les inconnues, une procédure « blanc » est réalisée à chaque série d'analyse et injectée à intervalles réguliers dans la série d'échantillons afin de circonscrire toute contamination éventuelle.



11. Rapport interne

Les différentes étapes de la préparation, de l'extraction sont enregistrées sur le document «SOP/MYC/ANA/08/DOC01 : rapport interne» (voir annexe 1) de manière à suivre le dosage de l'OTA dans les échantillons. Il y aura autant de « rapport interne » que nécessaire pour y reprendre l'ensemble des échantillons de la série à analyser.

Classeur	Contenu du dossier
Rapports Internes	- le document SOP/MYC/ANA/08/DOC01 reprenant toutes les opérations effectuées lors de la préparation et de l'extraction d'échantillons ; - Un reprint de la séquence d'injections ;
Résultats chromatographiques	- Le document SOP/MYC/ANA/08/DOC02 : check-list des paramètres techniques de la LC reprenant toutes les opérations effectuées lors de l'analyse chromatographique d'échantillons - Un rapport de TargetLynx

Les données brutes sont conservées selon la SOP/MAT/MAIN/04.

L'archivage se fait en suivant la procédure d'archivage (PRO/5.7/01) en cours.

12. Annexes

Annexe 1: SOP/MYC/ANA/08/DOC01/V01: Rapport interne

Annexe 2 : SOP/MYC/ANA/08/DOC02/V01: Check-list des paramètres techniques de la LC

Annexe 1 :

SOP/MYC/ANA/08/DOC01/V01 Rapport interne						
Date début:.././.....		Date fin:.././.....			Fiche N°.....	
Echantillon ID						
	A.....	B.....	C.....	A.....	B.....	C.....
Homogénéisation						
Homogénéiser						
H ₃ PO ₄ 1M (3mL/10g)						
Mélanger à la spatule						
	Prise d'échantillons					
Quantité d'échantillon prélevé 3,25 g du mélange dans un pot						
Dopage / Spiking						
Concentration voulue en ppb						
Volume d'OTA 50ppb en µL						
Pause de 1H (Equilibrage)						
Extraction						
Ajout de 25 mL chloroforme						
Agiter 1h						
Centrifuger 10 min 4000rpm						
Transvaser dans erleymeyer rodé						
Ajouter 25 mL chloroforme						
Agiter 20 min						
Centrifuger 10 min/4000 rpm						
Transvaser dans erleymeyer rodé						
Prélever 10 mL						
Evaporer à sec						
Remettre dans 2 mL de MeOH						
Vortexer						
Filtrer						
Dopage des extraits blancs						
Courbe Calibration (N° de Prépa. + Paraphe)						
Place + date de stockage/...../.....					
Remarques						

Annexe 2 :

SOP/MYC/ANA/08/DOC02/V01			
Check list des paramètres techniques de la LC			
System		Units	Visa
Column	BEH C18 1.7 μ m 2.1x 100 mm		
Prefilter	UPLC Column In-Line Filter, Waters		

Eluents	55 % H ₂ O + 0,1% acide formique	position A	
	45 % ACN + 0,1% acide formique	position B	
Prime pump			
Strong needle wash	DMK/MeOH/IPA/H ₂ O/PA (25/25/25/23/2, v/v/v/v/v)		
Weak needle wash	(H ₂ O + 0.1% FA)		
Prime SNW			
Prime WNW			
Seal wash	H ₂ O/MeOH (9/1, v/v)		

Pump	Flux/Debit	1	ml/min	
Injector	Syringue pump flow	20	μ l	
	PLPA injection			
Column manager	Température/ Temperatuur	40	°C	
Detector	API	1000	l/h	
	Cone gas	50	l/h	
	Desolvation temperature	450	°C	
	Desolvation Gas Flow	1000	L/Hr	
	ESI	POS (+)		
	Source temperature	140	°C	
	Capillary voltage	3.5	kV	
	Cone	15	V	

Pressure max gradient (<7000)		PSI
-------------------------------	--	-----

waste	
Nom de la séquence/ Sample set naam	
Nom du fichier/ File naam	
Nommer controle	
Remarques/Opmerkingen	
Date/Datum	
Analyste/Analist(e)	