

Première édition
2008-02-01

Aliments des animaux — Dosage de la zéaralénone par chromatographie à colonne à immunoaffinité et par chromatographie liquide haute performance

Animal feeding stuffs — Determination of zearalenone by immunoaffinity column chromatography and high performance liquid chromatography
iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 17372:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7fe6eb7e-c850-4a3e-826f-2672ced1c7ab/iso-17372-2008>



Numéro de référence
ISO 17372:2008(F)

© ISO 2008

PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 17372:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7fe6eb7e-c850-4a3e-826f-2672ced1c7ab/iso-17372-2008>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2008

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Principe	1
4 Réactifs	2
5 Appareillage	4
6 Échantillonnage	5
7 Préparation de l'échantillon pour essai	5
8 Mode opératoire	5
9 Calcul des résultats	9
10 Fidélité	10
11 Rapport d'essai	11
Annexe A (normative) Confirmation par chromatographie en phase normale	12
Annexe B (informative) Résultats d'un essai interlaboratoires	14
Bibliographie	16

[ISO 17372:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7fe6eb7e-c850-4a3e-826f-2672ced1c7ab/iso-17372-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7fe6eb7e-c850-4a3e-826f-2672ced1c7ab/iso-17372-2008>

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 17372 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 17372:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7fe6eb7e-c850-4a3e-826f-2672ced1c7ab/iso-17372-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7fe6eb7e-c850-4a3e-826f-2672ced1c7ab/iso-17372-2008>

Aliments des animaux — Dosage de la zéaralénone par chromatographie à colonne à immunoaffinité et par chromatographie liquide haute performance

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale s'applique à l'analyse de la zéaralénone dans les aliments pour animaux et leurs ingrédients, comprenant l'orge, le maïs, l'avoine, le seigle, le blé, la farine de soja, la farine de canola (colza), le gluten de maïs, la drêche, les lentilles et la pulpe de betterave à sucre. La limite de quantification est de 0,05 mg/kg (50 µg/kg). Une limite de quantification inférieure à cette valeur peut être atteinte, à condition que le laboratoire utilisateur la valide.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 565, *Tamis de contrôle — Tissus métalliques, tôles métalliques perforées et feuilles électroformées — Dimensions nominales des ouvertures*

ISO 648, *Verrerie de laboratoire — Pipettes à un volume*

ISO 1042, *Verrerie de laboratoire — Fioles jaugées à un trait*

ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

ISO 4788, *Verrerie de laboratoire — Éprouvettes graduées cylindriques*

ISO 6498, *Aliments des animaux — Préparation des échantillons pour essai*

3 Principe

Les échantillons sont extraits avec de l'acétonitrile dilué, puis clarifiés par filtration. Une aliquote du filtrat est ensuite diluée avec de l'eau ou avec un tampon phosphate (PBS), avant d'être purifiée par chromatographie à colonne d'immunoaffinité. Les extraits ainsi purifiés sont analysés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse avec détection par fluorescence. La présence de zéaralénone dans les échantillons potentiellement positifs peut être confirmée en calculant les rapports de la réponse obtenue à plusieurs longueurs d'ondes, en procédant à une analyse par CLHP en phase normale ou en utilisant un détecteur à barrette de diodes.

4 Réactifs

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

AVERTISSEMENT — Utiliser tous les solvants et les solutions sous une hotte aspirante. Porter des lunettes et des vêtements de protection et éviter tout contact avec la peau.

- 4.1 **Eau**, de qualité 1 telle que définie dans l'ISO 3696.
- 4.2 **Acétonitrile** (CH_3CN), de qualité CLHP.
- 4.3 **Méthanol** (CH_3OH), de qualité CLHP.
- 4.4 **Chlorure de sodium** (NaCl), d'une pureté d'au moins 99 % (fraction massique).
- 4.5 **Solvant d'extraction**, de fraction volumique, $\phi(\text{CH}_3\text{CN}) = 90 \%$.

Mélanger 900 ml d'acétonitrile (4.2) avec 100 ml d'eau (4.1). Bien mélanger.

- 4.6 **Acétonitrile dilué**, de fraction volumique $\phi(\text{CH}_3\text{CN}) = 50 \%$.

Mélanger 1 volume d'acétonitrile (4.2) avec 1 volume d'eau (4.1). Bien mélanger. Le cas échéant, cette solution est utilisée pour la seringue de l'échantillonneur automatique.

- 4.7 **Méthanol dilué**, de fraction volumique $\phi(\text{CH}_3\text{OH}) = 30 \%$.

Mélanger 75 ml de méthanol (4.3) avec 175 ml d'eau (4.1). Bien mélanger.

- 4.8 **Hydrogénophosphate de disodium** (Na_2HPO_4), d'une pureté d'au moins 99 % (fraction massique).
- 4.9 **Dihydrogénophosphate de potassium** (KH_2PO_4), d'une pureté d'au moins 99 % (fraction massique).
- 4.10 **Chlorure de potassium** (KCl), d'une pureté d'au moins 99 % (fraction massique).
- 4.11 **Hydroxyde de sodium** (NaOH), d'une pureté d'au moins 99 % (fraction massique).
- 4.12 **Solution tampon phosphate** (PBS).

Dissoudre 8 g de chlorure de sodium (4.4), 1,16 g d'hydrogénophosphate de disodium (4.8), 0,2 g de dihydrogénophosphate de potassium (4.9) et 0,2 g de chlorure de potassium (4.10) dans 1 l d'eau (4.1). Ajuster le pH à 7,4 à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium (4.11). Il est également possible de se procurer dans le commerce une solution PBS concentrée prête à l'emploi et de la diluer comme nécessaire.

- 4.13 **Solution d'hydroxyde de sodium**, $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$.

Dissoudre 8 g d'hydroxyde de sodium (4.11) dans 1 l d'eau (4.1).

- 4.14 **Phase mobile CLHP**.

Ajouter 460 ml d'acétonitrile (4.2) dans une fiole de 1 l, ajouter 460 ml d'eau (4.1) et 80 ml de méthanol (4.3). Bien mélanger et filtrer sur un filtre d'une porosité de $0,45 \mu\text{m}$ (5.14).

- 4.15 **Solution étalon mère de zéaralénone**, $\rho(\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5) \approx 50 \mu\text{g/ml}$.

AVERTISSEMENT — La zéaralénone est un œstrogène. À manipuler avec précaution en raison de son activité biologique.

Peser 5,0 mg de zéaralénone à 0,1 mg près. Les transvaser dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (5.1.2). Dissoudre dans de l'acétonitrile (4.2) et compléter au trait avec le même solvant.

Déterminer la concentration de la solution étalon comme suit. Verser à la pipette (5.1.3) 4,0 ml de solution étalon mère dans une fiole jaugée à un trait de 25 ml (5.1.2) et compléter au trait avec de l'acétonitrile (environ 8 µg de zéaralénone par millilitre).

Mesurer l'absorption ultraviolette (UV) à l'aide d'une cuve en quartz de 10 mm.

Déterminer la concentration, $\rho(\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5)$, en milligrammes par millilitre, par l'Équation (1):

$$\rho(\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5) = \frac{M_r \times 1000 \times A \times 25}{\varepsilon \times 4} \quad (1)$$

où

M_r est la masse moléculaire relative, 318,4, de la zéaralénone;

A est l'absorption UV;

ε est l'émissivité, $12\,623 \pm 111$, à 274 nm.

Consigner le résultat à trois chiffres significatifs.

La solution étalon, fermée hermétiquement et conservée au réfrigérateur, est stable pendant au moins un an. Réétalonner à chaque préparation de nouvelles solutions étalons diluées (4.16 et 4.17).

4.16 Solution étalon de dopage $\rho(\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5) = 5,0 \mu\text{g/ml}$

Diluer 10,0 ml de solution étalon mère (4.15) dans 100 ml avec le solvant d'extraction (4.5). Stocker au réfrigérateur. Renouveler la solution tous les 6 mois.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7fe6eb7e-c850-4a3e-826f-2672ced1c7ab/iso-17372-2008>

4.17 Solutions étalons pour CLHP

Préparer cinq solutions étalons de zéaralénone à des concentrations indiquées dans le Tableau 1 en diluant la solution étalon de dopage (4.16) ou la solution étalon pour CLHP (4.17.1) avec la phase mobile CLHP (4.14).

Tableau 1 — Préparation des solutions étalons pour CLHP

Solution étalon pour CLHP	Solution étalon à diluer	Volume à diluer ml	Volume final ml	Concentration de zéaralénone µg/ml
4.17.1	4.16	2,0	50	0,20
4.17.2	4.16	1,5	50	0,15
4.17.3	4.16	1,0	50	0,10
4.17.4	4.16	1,0	100	0,050
4.17.5	4.17.1	5,0	50	0,020

Stocker au réfrigérateur toutes les solutions étalons pour CLHP. Les renouveler tous les 6 mois.

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

5.1 Verrerie de laboratoire usuelle.

5.1.1 **Éprouvettes graduées**, conformes à l'ISO 4788, classe A.

5.1.2 **Fioles jaugées à un trait**, conformes à l'ISO 1042, classe A.

5.1.3 **Pipettes**, conformes à l'ISO 648, classe A.

5.2 Spectrophotomètre UV.

5.3 **Support de filtration sous vide**, compatible avec les colonnes d'immunoaffinité.

5.4 **Erlenmeyer**, de 125 ml et 500 ml de capacités.

5.5 **Papier-filtre**, d'un diamètre de 185 mm, par exemple Whatman no. 41¹⁾.

5.6 **Tube en verre**, à fond rond de 5 ml (13 mm × 100 mm), ou équivalent.

5.7 **Tubes à centrifuger**, d'une capacité de 50 ml, en polypropylène ou équivalent.

5.8 **Entonnoirs en verre**, d'un diamètre intérieur de 60 mm et de 90 mm.

5.9 **Papier-filtre en microfibres de verre**, d'un diamètre de 125 mm, par exemple Whatman 934AH¹⁾.

5.10 **Colonnes d'immunoaffinité**, d'une capacité de chargement ≥ 2 μg de zéaralénone et présentant une récupération ≥ 85 %. ZearalaTest¹⁾ [format standard ou WB («wide bore»; recommandé pour limiter les risques de colmatage)] et EASI-EXTRACT¹⁾

5.11 **Agitateur**, orbital ou manuel, ou équivalent.

5.12 **Seringues en plastique**, d'une capacité de 5 ml.

5.13 **Filtres pour seringue jetables**, en difluorure de polyvinyle (PVDF), de porosité 0,45 μm et de diamètre 13 mm.

5.14 **Système de filtration des solvants**: tout matériel de filtration en verre compatible avec un filtre de 47 mm de diamètre ainsi qu'un filtre en nylon (polyamide) ou en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de 47 mm de diamètre et d'une porosité de 0,45 μm .

5.15 **Système CLHP**, se composant des éléments suivants:

5.15.1 **Pompe**, exempte d'impulsions, d'une capacité de débit allant de 0,5 ml/min à 1,5 ml/min.

5.15.2 **Système d'injection**, manuel ou via un échantillonneur automatique, muni d'une boucle permettant de réaliser des injections de 100 μl .

5.15.3 **Colonne analytique**, C₁₈ 4 μm ou 5 μm , 150 mm × 4 mm; par exemple: Waters Nova-Pak C₁₈¹⁾, Inertsil ODS-3¹⁾, Lichrospher 100-RP-18¹⁾, ACE 3 C₁₈¹⁾, Waters Symmetry Shield RP18¹⁾ et Hypersil ODS/BDS¹⁾.

1) C'est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.15.4 Détecteur fluorimétrique, permettant d'effectuer des mesures avec des longueurs d'onde d'excitation de 236 nm et de 274 nm, et une émission à 440 nm (détecteur à longueur d'onde variable) ou à 418 nm (détecteur équipé d'un filtre d'émission).

5.15.5 Intégrateur ou logiciel PC.

5.15.6 Détecteur à barrette de diodes, facultatif.

5.16 Filtres en microfibres de verre, d'un diamètre de 21 mm, par exemple Whatman GF/D ¹⁾.

5.17 Réservoirs, en polypropylène, pouvant être fixés sur la partie supérieure des colonnes d'immunoaffinité, d'une capacité de 20 ml et de diamètre intérieur 20 mm. Un adaptateur peut s'avérer nécessaire.

5.18 Frittés, pour les réservoirs (5.17), d'un diamètre de 20 mm et d'une porosité de 20 µm.

5.19 Tamis, conforme aux prescriptions de l'ISO 565.

5.20 Évaporateur à azote, avec bain pouvant être maintenu à une température de 50 °C ± 5 °C.

5.21 Mélangeur vortex.

6 Échantillonnage

Il convient que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, qui n'ait été ni endommagé ni modifié lors du transport ou du stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est indiquée dans l'ISO 6497 ^[1].

Il est recommandé de conserver les échantillons à l'état congelé, de manière à éviter que les concentrations en mycotoxines ne varient avec la croissance des champignons producteurs.

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 6498.

Broyer l'intégralité de l'échantillon de laboratoire, de sorte qu'il passe en totalité à travers un tamis (5.19) d'ouverture nominale de mailles égale à 1 mm. Bien mélanger.

Des études avec d'autres mycotoxines ont montré que broyer un échantillon à l'aide d'une grille de 0,5 mm plutôt qu'une grille de 1,0 mm réduit la variabilité de la répétabilité des analyses et augmente l'efficacité d'extraction. Il est recommandé d'utiliser un équipement de broyage produisant une granulométrie inférieure à 1 mm; veiller néanmoins à ce que la grille présente des ouvertures de mailles suffisantes pour ne pas provoquer de surchauffe de l'échantillon. Il est suggéré d'utiliser une grille de 0,75 mm; la majeure partie de la matière broyée passe à travers un tamis de 0,5 mm d'ouverture nominale de maille.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon de contrôle

Il est recommandé d'utiliser un échantillon de contrôle; les résultats d'analyse doivent être conformes à la spécification relative à la récupération (à savoir une récupération ≥ 85 %). Analyser un échantillon de contrôle dopé (0,10 mg/kg) par série d'échantillons. Préparer en pipettant 1,0 ml de la solution étalon de dopage (4.16) et en les versant dans une prise d'essai de 50 g de blé ou de maïs exempt de zéaralénone et mélanger. Analyser également l'échantillon exempt de zéaralénone (appelé «blanc»).

8.2 Extraction

Pour chaque prise d'essai, suivre le mode opératoire suivant.

Peser, à 0,01 g près, 50,00 g dans un erlenmeyer de 500 ml (5.4).

Peser et ajouter 5 g de chlorure de sodium (4.4).

Ajouter 150 ml de solvant d'extraction (4.5). Agiter pendant 1 h. Poursuivre avec le protocole de purification par colonne d'immunoaffinité (8.3).

Certaines matrices, comme l'ensilage séché, par exemple, peuvent absorber plus de 150 ml de solvant d'extraction. Dans ce cas, porter le volume de solvant d'extraction à 200 ml ou 250 ml.

Si besoin, il est possible de démarrer l'étape d'agitation à la fin de la journée, en utilisant un agitateur (5.11) muni d'un chronomètre d'arrêt; dans ce cas, agiter brièvement le lendemain matin avant de passer à l'étape décrite en 8.3.

8.3 Purification par colonne d'immunoaffinité

Se conformer aux instructions fournies avec les colonnes d'immunoaffinité, mais utiliser un réservoir (5.17) équipé d'un verre fritté (5.18) et d'un ou plusieurs filtres GF/D (5.16), pour les colonnes ZearalaTest¹⁾ (8.3.1) et les colonnes EASI-EXTRACT¹⁾ (8.3.2), et éluer avec 2,0 ml d'éluant. Pour les autres modèles, se conformer soit à 8.3.1, soit à 8.3.2, selon le plus approprié.

Il est possible d'analyser des matrices hautement pigmentées et des matrices pour lesquelles des signaux parasites apparaissent dans le chromatogramme. Du méthanol, de fraction volumique 30 % (4.7), est utilisé pour éluer les substances parasites sans dénaturer les anticorps; ne pas dépasser une fraction volumique de 35 %. Avec tous les types de colonnes d'immunoaffinité, pour atteindre la limite de quantification de 0,05 mg/kg, pour limiter la variabilité et pour améliorer la chromatographie CLHP, les éluats de la colonne sont évaporés puis dissous dans un volume minimal (2,0 ml) de phase mobile (4.14).

NOTE 1 Plus de 10 ml de filtrat dilué peut être ajouté aux colonnes dans les étapes 8.3.1.4 et 8.3.2.5, à condition de ne pas dépasser la capacité de chargement. Les gros volumes peuvent engendrer des problèmes de colmatage du verre fritté et de la colonne; l'orge est connu pour poser ce type de problèmes; l'utilisation de deux filtres sur le verre fritté permet de limiter les risques de colmatage. Les colonnes «wide bore» sont moins sujettes aux risques de colmatage.

NOTE 2 La clarté du filtrat appliqué à la colonne d'immunoaffinité a une incidence sur les performances de cette dernière. Outre les risques d'obstruction de la colonne, les particules peuvent empêcher la zéaralénone de se fixer aux anticorps, ce qui provoque une altération et une plus grande variabilité des performances de récupération.

8.3.1 Colonne d'immunoaffinité ZearalaTest¹⁾ [format standard et «wide bore» (WB)].

8.3.1.1 Filtrer au moins 10 ml d'extrait sur du papier-filtre plissé (5.5) dans un erlenmeyer de 125 ml (5.4).

8.3.1.2 Prélever à la pipette (5.1.3) 10 ml d'extrait filtré et les introduire dans une fiole jaugée à un trait de 50 ml (5.1.2), compléter au trait avec de l'eau. Bien mélanger. Filtrer l'extrait dilué (environ 25 ml) sur du papier-filtre en microfibrilles de verre (5.9) dans un tube à centrifuger de 50 ml (5.7).

8.3.1.3 Raccorder la colonne d'immunoaffinité au port du système de filtration sous vide (5.3). Fixer un réservoir (5.17) muni d'un fritté (5.18) à la partie supérieure de la colonne. Un adaptateur est requis pour les colonnes WB. Insérer un filtre en microfibrilles de verre (5.16).

Pour les colonnes de format standard, deux filtres en microfibrilles de verre sont nécessaires pour certaines matrices telles que l'orge. Si la solution filtrée (8.3.1.2) est claire, aucun fritté ni filtre n'est nécessaire.

8.3.1.4 Prélever à la pipette (5.1.3) 10 ml du filtrat (8.3.1.2) et les introduire dans le réservoir. Faire passer l'extrait à travers la colonne à un débit constant, jusqu'à ce que de l'air pénètre dans la colonne; le débit doit être suffisant pour que des gouttelettes se forment (de 1 goutte par seconde à 2 gouttes par seconde).

8.3.1.5 Pour les produits pigmentés et les échantillons présentant des pics parasites, laver la colonne avec 15 ml de méthanol, fraction volumique 30 % (4.7) avec un débit de 1 goutte par seconde à 2 gouttes par seconde jusqu'à ce que de l'air pénètre dans la colonne. Pour tous les autres types d'échantillons, laver la colonne avec 10 ml d'eau (4.1) avec un débit de 1 goutte par seconde à 2 gouttes par seconde, jusqu'à ce que de l'air pénètre dans la colonne.

8.3.1.6 Retirer le réservoir, fixer un réservoir sans fritté (pour les colonnes WB, aucun réservoir n'est requis) et éluer la zéaralénone en faisant passer 2,0 ml de méthanol (4.3) à travers la colonne à une vitesse d'environ 1 goutte par seconde, en collectant l'éluant dans un tube de 5 ml (5.6).

NOTE Le fritté peut être retiré des réservoirs usagés en faisant passer un câble ou une tige de petit diamètre par le fond du réservoir; les réservoirs peuvent ensuite être nettoyés et réutilisés.

8.3.1.7 Évaporer à sec à l'aide d'un évaporateur à azote, sous une température de bain de $50\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ (5.20). Ajouter 2,0 ml de phase mobile CLHP (4.14). Agiter au mélangeur vortex (5.21). Poursuivre conformément à 8.4.

8.3.1.8 La solution d'essai peut aussi être filtrée sur un filtre en PVDF (5.13) en utilisant une seringue en plastique (étape facultative). Vérifier que le lot de filtres ne présente pas de pic(s) parasite(s). Si les réservoirs (5.17) sont équipés de filtres et de frittés (5.18), il convient que les solutions d'essai soient claires et n'aient pas besoin d'être filtrées.

8.3.2 Colonne d'immunoaffinité EASI-EXTRACT®.

8.3.2.1 Filtrer plus de 10 ml d'extrait sur du papier-filtre cannelé (5.5) dans un erlenmeyer de 125 ml (5.4).

8.3.2.2 Prélever à la pipette (5.1.3) 10 ml d'extrait filtré et les introduire dans une fiole jaugée à un trait de 50 ml (5.1.2), compléter au trait avec de la solution tampon phosphate (4.12). Bien mélanger.

8.3.2.3 Filtrer l'extrait dilué (environ 25 ml) sur du papier-filtre en microfibres de verre (5.9) dans un tube à centrifuger de 50 ml (5.7).

8.3.2.4 Raccorder la colonne d'immunoaffinité au port du système de filtration sous vide sous vide (5.3). Fixer un réservoir (5.17) muni d'un fritté (5.18) à la partie supérieure de la colonne à l'aide d'un adaptateur. Insérer un filtre en microfibres de verre (5.16). Laver la colonne avec 10 ml à 20 ml de solution tampon phosphate (4.12).

Si la solution filtrée (8.3.2.3) est claire, aucun fritté ni filtre n'est nécessaire.

8.3.2.5 Prélever à la pipette (5.1.3) 10 ml de filtrat (8.3.2.3) et les introduire dans le réservoir. Faire passer l'extrait dans la colonne à un débit constant, jusqu'à ce que de l'air pénètre dans la colonne; le débit doit être suffisant pour que des gouttelettes se forment (à une vitesse de 1 goutte par seconde à 2 gouttes par seconde).

8.3.2.6 Pour les produits pigmentés et les échantillons présentant des pics parasites, laver la colonne avec 15 ml de méthanol, fraction volumique 30 % (4.7) à une vitesse de 1 goutte par seconde à 2 gouttes par seconde, jusqu'à ce que de l'air pénètre dans la colonne. Pour tous les autres échantillons, laver la colonne avec 20 ml d'eau (4.1) à une vitesse de 1 goutte par seconde à 2 gouttes par seconde, jusqu'à ce que de l'air pénètre dans la colonne.

8.3.2.7 Retirer le réservoir, éluer la zéaralénone en passant 2,0 ml d'acétonitrile (4.2) à travers la colonne à une vitesse d'environ 1 goutte par seconde, en collectant l'éluant dans un tube de 5 ml (5.6).

8.3.2.8 Évaporer à sec à l'aide d'un évaporateur à azote, sous une température de bain de $50\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ (5.20). Ajouter 2,0 ml de phase mobile CLHP (4.14). Agiter au mélangeur vortex (5.21).

8.3.2.9 La solution d'essai peut aussi être filtrée sur un filtre en PVDF (5.13) en utilisant une seringue en plastique (étape facultative). Vérifier que le lot de filtres ne présente pas de pic(s) parasite(s). Si les réservoirs sont équipés de filtres et de frittés, il convient que les solutions d'essai soient claires et n'aient pas besoin d'être filtrées.