

**Méthode d'analyse en sécurité sanitaire des aliments**

**RÉFÉRENCE : ANSES / LSAiments / LSA-INS-0147 - Version 5**

Janvier 2022

# **Détermination des biotoxines marines lipophiles dans les mollusques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)**

**Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort**

Laboratoire national de référence pour les Biotoxines Marines

## Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

*Une modification est qualifiée de majeure* lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

*Une modification est qualifiée de mineure* si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
V0	-	08/10/2010	Version initiale
V1	-	06/04/2011	-
V2	-	04/10/2011	-
V3	-	22/12/2014	-
V4	Majeures	05/02/2018	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Harmonisation au nouveau format de méthode ANSES (s'agissant d'une refonte complète, les modifications apportées ne sont pas apparentes dans le texte)</li> <li>- Mise à jour des données de caractérisation/ validation intra-laboratoire de la méthode.</li> <li>- Modification du domaine d'application de la méthode (Retrait d'une toxine non réglementée : acide seco-pectenotoxine-2 (PTX2sa) ; ajout de deux toxines non réglementées : la pinnatoxine A et la pinnatoxine G.</li> <li>- Précisions apportées à la partie « correction des résultats »</li> </ul>
V5	Mineure	31/01/2022	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mise à jour de la méthode pour tenir compte de la déréglementation des pecténotoxines (Règlement délégué (UE) 2021/1374)</li> </ul>

## Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

**Anses - Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort**

Laboratoire National de Référence pour les Biotoxines Marines

Adresse : 14 rue Pierre et Marie Curie – 94701 Maisons-Alfort Cedex

Contact : [lnr.biotoxines.marines@anses.fr](mailto:lnr.biotoxines.marines@anses.fr)

## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Principe de la méthode</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Réactifs</b> .....	<b>10</b>
<b>5. Appareillage et matériels</b> .....	<b>15</b>
<b>6. Échantillons</b> .....	<b>16</b>
6.1. Conditions d'acceptation des échantillons.....	16
6.2. Conservation des échantillons avant analyse .....	16
6.3. Conservation des échantillons ou reliquats après analyse .....	16
<b>7. Mode opératoire</b> .....	<b>16</b>
7.1. Préparation des échantillons pour analyse.....	16
7.2. Extraction .....	17
7.3. Hydrolyse .....	17
7.4. Etape de purification .....	18
7.5. Injection des extraits .....	18
7.6. Conditions LC-MS/MS .....	19
<b>8. Résultats</b> .....	<b>21</b>
8.1 Contrôle de la validité des résultats.....	21
8.2 Calculs des résultats .....	22
8.3 Correction des résultats.....	23
8.4 Expression des résultats.....	25
<b>9 Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....	<b>26</b>
9.1 Performances de la méthode sans mise en œuvre de l'étape de purification .....	26
9.2 Performances de la méthode avec mise en œuvre de l'étape de purification .....	27
<b>Annexes</b> .....	<b>28</b>
<b>Annexe A : Préparation des échantillons de moules transformées</b> .....	<b>29</b>
<b>Annexe B : Exemple de paramètres de spectromètre de masse</b> .....	<b>30</b>
<b>Annexe C : Exemples de chromatogrammes</b> .....	<b>32</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>33</b>

## Table des tableaux

TABLEAU 1 – BIOTOXINES MARINES LIPOPHILES REGLEMENTEES .....	8
TABLEAU 2 - BIOTOXINES MARINES LIPOPHILES NON REGLEMENTEES .....	9
TABLEAU 3 - EXEMPLE DE PREPARATION DE SOLUTION ETALON DE TRAVAIL N°1 (SOLUTION MULTI-TOXINES) .....	13
TABLEAU 4 - EXEMPLE DE PREPARATION DE SOLUTION ETALON DE TRAVAIL N°2 (SOLUTION MULTI-TOXINES) .....	13
TABLEAU 5 - EXEMPLE DE NIVEAUX DE CONCENTRATION DE LA GAMME .....	14
TABLEAU 6 - EXEMPLE DE PREPARATION DE LA GAMME ETALONNAGE .....	14
TABLEAU 7 - EXEMPLE DE CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES EN CONDITIONS ACIDES .....	20
TABLEAU 8 - CONTROLES QUALITE .....	21
TABLEAU 9 - TEF ADOPTES PAR L'EFSA POUR LES BIOTOXINES MARINES LIPOPHILES REGLEMENTEES .....	25
TABLEAU 10 - EXEMPLE DE PARAMETRES DE LA SOURCE OPTIMISES AVEC UN INSTRUMENT LC-MS/MS .....	30
TABLEAU 11 - EXEMPLE DE CONDITIONS MS/MS OPTIMISES AVEC UN INSTRUMENT LC-MS/MS .....	30

## Introduction

Les biotoxines marines lipophiles sont les phycotoxines les plus fréquemment mises en évidence en Europe. Elles sont produites par certains dinoflagellés marins et peuvent s'accumuler dans les mollusques et notamment les bivalves filtreurs. Les teneurs parfois très élevées, peuvent induire des effets chez l'homme tels que des nausées, des vomissements et des diarrhées. Pour protéger la santé publique, des programmes de surveillance des biotoxines marines lipophiles dans les mollusques ont été mis en place dans de nombreux pays. Quatre groupes chimiques de biotoxines marines lipophiles sont réglementés: le groupe de l'acide okadaïque, le groupe des pecténotoxines, le groupe des azaspiracides et le groupe des yessotoxines.

La structure réglementaire au sein de l'Union européenne (UE) comporte toute une série de règlements relatifs au contrôle des toxines lipophiles. Ainsi, l'annexe III, section VII, chapitre V du Règlement (CE) n°853/2004 [1] et le règlement n°786/2013 [2] fixent les quantités limites de toxines lipophiles dans les mollusques bivalves avant leur mise sur le marché pour la consommation humaine.

Les méthodes d'analyses reconnues pour détecter les biotoxines marines dans les mollusques bivalves sont définies dans le règlement (CE) n°15/2011 [3] de la Commission modifiant le règlement (CE) n°2074/2005 [4]. Pour les toxines lipophiles, la méthode de référence est le protocole harmonisé du LRUE : « EU-Harmonised-SOP-LIPO-LC-MS/MS ». Cette méthode est utilisée d'une part dans le cadre d'analyses de contrôles officiels et d'autre part pour des analyses d'autocontrôles par les opérateurs du secteur alimentaire.

## Avertissements et précautions de sécurité

**Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.**

**Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.**

Cette méthode requiert l'utilisation de substances toxiques, en solution dans un solvant toxique et inflammable, le méthanol. Eviter tout contact avec ces substances et les maintenir éloignées d'une source de chaleur, d'étincelles ou de flammes. Il convient de prendre les précautions de sécurité qui s'imposent lors de la manipulation de ces composés et notamment :

- De porter une blouse, des lunettes de protection avec protections latérales et d'utiliser des gants adaptés à la manipulation de solvants ;
- De manipuler sous une hotte ventilée. Les solvants utilisés sont toxiques et volatils ;
- De bien informer le personnel ayant accès au laboratoire des risques et des précautions à prendre pour la manipulation des toxines ;

## 1. Objet et domaine d'application

La présente méthode décrit un protocole de quantification des différentes familles de biotoxines marines lipophiles réglementées dans des mollusques, qu'ils soient crus ou cuits, telles que les moules, les huîtres, les coquilles Saint-Jacques, les coques, les palourdes, les praires ou encore les couteaux. Il s'agit d'une méthode quantitative par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Cette méthode est basée sur le protocole harmonisé du LRUE BM [5] validé lors d'un essai inter-laboratoires [6]. Elle a également fait l'objet d'une validation intra-laboratoire par le LNR au cours de laquelle les matrices huîtres, moules et coquilles Saint-Jacques ont été étudiées. Le domaine de validité du LNR ainsi que les valeurs obtenues pour chacune des caractéristiques de performances étudiées, sont précisés dans le présent document.

Pour être applicable à d'autres matrices (telles que les tuniciers ou les échinodermes) ou à des produits transformés, la méthode devra faire l'objet d'une validation intra-laboratoire.

La mise en œuvre de ce protocole permet la détermination des toxines lipophiles réglementées des groupes de l'acide okadaïque (AO), des azaspiracides (AZAs) et des yessotoxines (YTXs).

**Tableau 1 – Biotoxines marines lipophiles réglementées**

Groupe de toxines	Toxines réglementées
<b>Groupe de l'Acide okadaïque</b> (Groupe AO)	AO, DTX1, DTX2
<b>Groupe des Azaspiracides</b> (Groupe AZAs)	AZA1, AZA2, AZA3
<b>Groupe des Yessotoxines</b> (Groupe YTXs)	YTX, 45-OH-YTX homo-YTX, 45-OH-homo-YTX

Le dosage quantitatif de l'acide okadaïque (AO), de la yessotoxine (YTX) et de l'azaspiracide 1 (AZA1) est réalisé directement à partir de leur étalon respectif.

La quantification directe est fortement recommandée pour tous les analogues lorsque les étalons sont disponibles. Toutefois, la quantification indirecte reste possible, bien que déconseillée.

Dans ce cas, en faisant l'hypothèse d'un facteur de réponse équivalent, l'acide okadaïque est utilisé pour la quantification indirecte de la dinophysistoxine 1 (DTX1) et de la dinophysistoxine 2 (DTX2), l'azaspiracide 1 est utilisée pour la quantification indirecte de l'azaspiracide 2 (AZA2) et de l'azaspiracide 3 (AZA3) et la yessotoxine est utilisée pour la quantification indirecte de l'homo-yessotoxine (homo-YTX), de la 45-OH-yessotoxine (45-OH-YTX) et de la 45-OH-homo-yessotoxine (45-OH-homo-YTX).

La méthode s'applique également aux toxines non réglementées suivantes : les pecténotoxines 1 et 2 (PTX1 et PTX2), la gymnodimine A (GYM A), la 13-desmethyl-spirolide C (13-desMe-SPX C) et les pinnatoxines A et G (PnTX A et PnTX G).

Tableau 2 - Biotoxines marines lipophiles non réglementées

Groupe de toxines	Toxines non réglementées
<b>Groupe des Pecténotoxines</b> (Groupe PTXs)	PTX1, PTX2
<b>Groupe des Gymnodimines</b> (Groupe GYM s)	GYM A
<b>Groupe des Spirolides</b> (Groupe SPXs)	13-desMe-SPX C (SPX1)
<b>Groupe des Pinnatoxines</b> (Groupe PnTXs)	PnTX A, PnTX G

Le dosage quantitatif de la pecténotoxine 2 (PTX2) est réalisé directement à partir de son étalon. En faisant l'hypothèse d'un facteur de réponse équivalent, la pecténotoxine 2 est utilisée pour la quantification indirecte de la pecténotoxine 1 (PTX1).

## 2. Documents de référence

Sans objet

## 3. Principe de la méthode

Extraction des biotoxines marines lipophiles avec du méthanol à partir d'un tissu homogénéisé.

- Pour déterminer la teneur des échantillons en AO libre, DTX1 libre, DTX2 libre, AZA1, AZA2, AZA3, YTX, homo-YTX, 45-OH-YTX, 45-OH-homo-YTX, PTX1, PTX2, GYM A, 13-desMe-SPX C , PnTX A et PnTX G, les extraits sont analysés directement par chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).
- Pour déterminer la teneur des échantillons en AO total, DTX1 totale et DTX2 totale une hydrolyse alcaline est mise en œuvre avant l'analyse par LC-MS/MS.  
En effet, l'AO, la DTX1 et la DTX2 peuvent faire l'objet d'une acylation au niveau de l'hydroxyle du carbone 7 de la molécule (7-O-AO/DTXs) conduisant à la formation d'un ester. Cette acylation se traduit par la fixation de chaînes d'acides gras saturés ou insaturés, conduisant à la formation d'un groupe de dérivés toxiques : les DTX3. Pour pouvoir détecter et quantifier les DTX3, une hydrolyse alcaline de leur liaison ester est nécessaire. Cette étape permet de libérer selon le cas, l'AO, la DTX1 et/ou DTX2. Les teneurs totales en AO, DTX1 et DTX2 sont alors déterminées par LC-MS/MS (somme de la forme libre et de la forme ester).

## 4. Réactifs

### Avertissement :

Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Utiliser seulement des réactifs de qualité analytique reconnue. Les solvants doivent être à minima de qualité appropriée pour l'analyse CLHP, sauf indication contraire.

#### 4.1. Eau ultra-pure (par exemple, Milli-Q<sup>®</sup>)

#### 4.2. Acétonitrile (ACN)

#### 4.3. Méthanol (MeOH)

#### 4.4. Méthanol 30 %

Exemple : Dans une fiole jaugée de 100 ml : introduire 30 ml MeOH (4.3), compléter au volume avec de l'eau (4.1).

#### 4.5. Acide formique, pureté 98-100 %

#### 4.6. Formiate d'ammonium, pureté $\geq 99$ %

#### 4.7. Acide chlorhydrique 2,5 M (HCl)

Par Exemple : A partir d'une solution titrée d'HCl à 5 M :

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 50 ml d'HCl à 5M, compléter au volume avec de l'eau (4.1).

A partir d'HCl à 37 % :

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 20 ml d'HCl, compléter au volume avec de l'eau (4.1).

Cette solution se conserve à température ambiante et peut être utilisée pendant 3 mois.

#### 4.8. Hydroxyde de sodium 2,5 M (NaOH)

Par Exemple : A partir d'une solution titrée de NaOH à 5 M :

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 50 ml de NaOH à 5M, compléter au volume avec de l'eau (4.1).

A partir du NaOH  $\geq 99$  % :

Dissoudre 10 g de NaOH dans 75 ml d'eau (4.1), transvaser dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter au volume avec de l'eau (4.1).

Cette solution se conserve à température ambiante et peut être utilisée pendant 3 mois.

#### 4.9. Hydroxyde d'ammonium 25 % (NH<sub>4</sub>OH)

#### 4.10. Hydrogénocarbonate d'ammonium, pureté ≥ 98 % (bicarbonate)

#### 4.11. Solution de lavage pour colonne SPE : H<sub>2</sub>O 89%, MeOH 10 %, NH<sub>4</sub>OH1%, (v/v/v)

Par exemple : Dans une fiole jaugée de 200 ml, introduire 20 ml MeOH (4.3) et 2 ml NH<sub>4</sub>OH (4.9) et compléter au volume avec l'eau (4.1).

#### 4.12. Phases mobiles CLHP

**Note** : Le présent protocole donne un exemple de conditions de phases mobiles acides. L'opérateur pourra utiliser les conditions qui lui semblent les plus appropriées. Plusieurs exemples de conditions chromatographiques, y compris des exemples des conditions basiques, sont décrits dans le protocole harmonisé du LRUE [5].

##### 4.12.1. Solution mère de phases mobiles : 40 mM formiate d'ammonium et 1000 mM d'acide formique

Dans un bécher, dissoudre 504,4 mg de formiate d'ammonium (4.6) avec de l'eau (4.1). Introduire cette solution aqueuse dans une fiole jaugée de 200 ml. Ajouter 7,7 ml d'acide formique (4.5). Compléter au volume avec de l'eau (4.1). Cette solution se conserve à température ambiante et peut être utilisée pendant 15 jours.

##### 4.12.2. Eluant A : 100% H<sub>2</sub>O à 2 mM formiate d'ammonium et 50 mM d'acide formique

Dans une fiole jaugée de 1 000 ml, introduire 50 ml de « solution mère à 40 mM de formiate d'ammonium et 1 000 mM d'acide formique » (4.12.1). Compléter au volume avec de l'eau (4.1).

Cette solution se conserve à température ambiante et peut être utilisée pendant 1 semaine.

##### 4.12.3 Eluant B : 95% ACN : 5% H<sub>2</sub>O à 2 mM formiate d'ammonium et 50 mM d'acide formique (v:v)

Dans une fiole de 1 000 ml, introduire 50 ml de « solution mère à 40 mM de formiate d'ammonium et 1 000 mM d'acide formique » (4.12.1). Compléter au volume avec de l'acétonitrile (4.2).

Cette solution se conserve à température ambiante et peut être utilisée pendant 1 semaine.

#### 4.13. Matériaux de référence

Les matériaux de référence peuvent être obtenus auprès de différents fournisseurs. Une liste mise à jour des matériaux de référence commercialisés est consultable sur le site internet du LRUE : [http://www.aecosan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/public\\_documents/seccion/materiales\\_referencia.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/public_documents/seccion/materiales_referencia.htm).

##### 4.13.1. Matériaux de référence certifiés

4.13.1.1 **Acide okadaïque (AO)** : solution étalon d'acide okadaïque dans du méthanol.

4.13.1.2 **Azaspiracide 1 (AZA1)** : solution étalon d'azaspiracide 1 dans du méthanol.

4.13.1.3 **Azaspiracide 2 (AZA2)** : solution étalon d'azaspiracide 2 dans du méthanol.

- 4.13.1.4 **Azaspiracide 3 (AZA3)** : solution étalon d'azaspiracide 3 dans du méthanol.
- 4.13.1.5 **Yessotoxine (YTX)** : solution étalon de yessotoxine dans du méthanol.
- 4.13.1.6 **Homo-yessotoxine (homo-YTX)** : solution étalon d'homo-yessotoxine dans du méthanol.
- 4.13.1.7 **Dinophysistoxine 1 (DTX1)** : solution étalon de dinophysistoxine 1 dans du méthanol.
- 4.13.1.8 **Dinophysistoxine 2 (DTX2)** : solution étalon de dinophysistoxine 2 dans du méthanol.
- 4.13.1.9 **Pecténotoxine 2 (PTX2)** : solution étalon de pecténotoxine 2 dans du méthanol.
- 4.13.1.10 **Gymnodimine A (GYM A)** : solution étalon de gymnodimine A dans du méthanol.
- 4.13.1.11 **13-desMe-Spirolide C (SPX1)** : solution étalon de spirovide 13DesMe C dans du méthanol.
- 4.13.1.12 **Pinnatoxine G (PnTX G)** : solution étalon de pinnatoxine G dans du méthanol.

#### 4.13.2 Matériaux de référence non certifiés

- 4.13.2.1 **Pinnatoxine A (PnTX A)** : solution étalon de pinnatoxine A dans du méthanol.

#### 4.14. Solutions mères

A partir des matériaux de référence (4.13) disponibles dans le commerce, des solutions mères individuelles à 1 µg/ml peuvent, par exemple, être préparées.

**Note** : Pour les toxines : AZA1, AZA2 et AZA3, cette étape n'est pas nécessaire car la concentration des matériaux de référence certifiés (4.13) est déjà suffisamment faible.

#### 4.15. Solutions étalons de travail

A partir des solutions mères à 1 µg/ml et des matériaux de référence certifiés AZA1, AZA2 et AZA3, deux solutions étalons de travail peuvent être préparées. Ces deux solutions permettent de préparer les différents niveaux de la gamme d'étalonnage. La solution étalon de travail n°1 permet de préparer les niveaux 1 et 2, alors que la solution étalon de travail 2 permet de préparer les niveaux 3,4 et 5 (cf. § 4.16 – Gamme d'étalonnage).

#### 4.15.1 Solution de travail N°1

Tableau 3 - Exemple de préparation de solution étalon de travail N°1 (solution multi-toxines)

Toxine	Concentration solution de travail N°1 (ng/ml)	Volume solution mère ou du MRC (µl)	Volume de MeOH à ajouter (µl)	Volume Total (µl)
YTX	12,5	68,8	4749,2	5500,0
Homo-YTX	12,5	68,8		
AO	25	137,5		
DTX1	25	137,5		
DTX2	25	137,5		
PTX2	5	27,5		
SPX1	5	27,5		
GYM A	3,75	20,6		
PnTX A	5	27,5		
PnTX G	5	27,5		
AZA1	5	21,2 (vol. MRC)		
AZA2	5	22,5 (vol. MRC)		
AZA3	5	26,4 (vol. MRC)		

**Note :** dans cet exemple la concentration du matériau de référence certifié AZA1 est de 1,30 µg/ml, celle de l'AZA2 est de 1,22 µg/ml et celle de l'AZA3 est de 1,04 µg/ml.

#### 4.15.2 Solution de travail N°2

Tableau 4 - Exemple de préparation de solution étalon de travail N°2 (solution multi-toxines)

Toxine	Concentration solution de travail N°2 (ng/ml)	Volume solution mère ou du MRC (µl)	Volume de MeOH à ajouter (µl)	Volume Total (µl)
YTX	100	100,0	45,0	1000,0
hYTX	100	100,0		
AO	100	100,0		
DTX1	100	100,0		
DTX2	100	100,0		
PTX2	100	100,0		
SPX1	25	25,0		
GYM A	25	25,0		
PnTX A	25	25,0		
PnTX G	25	25,0		
AZA1	100	77,0 (vol. MRC)		
AZA2	100	82,0 (vol. MRC)		
AZA3	100	96,0 (vol.MRC)		

#### 4.16. Gamme d'étalonnage

Préparer une gamme d'étalonnage comprenant au moins 5 niveaux de concentration. Il est recommandé que le point le moins concentré de la gamme d'étalonnage soit au niveau de la LQ déterminée par le laboratoire. Cette gamme peut être préparée dans le solvant ou dans la matrice.

**Tableau 5 - Exemple de niveaux de concentration de la gamme**

Niveau	Concentration (ng/ml)					
	AO, DTX1, DTX2,	YTX, Homo- YTX	AZA1, AZA2, AZA3	PTX2	SPX1, PnTX A, PnTX G	GYM A
1	1	0,5	0,2	0,2	0,2	0,15
2	2	1	0,4	0,4	0,4	0,3
3	4	4	4	4	1	1
4	16	16	16	16	4	4
5	24	24	24	24	6	6

Afin de préparer la gamme d'étalonnage, les deux solutions étalons de travail (4.15.1 et 4.15.2) sont diluées avec du méthanol (4.3) au volume adéquat pour préparer la gamme étalon.

**Tableau 6 - Exemple de préparation de la gamme étalonnage**

Niveau	Solution de travail	Volume de la solution étalon de travail N°1 ou N°2 (µl)	Volume de MeOH (µl)	Volume Total (µl)
1	N°1	72	1728	1800
2		144	1656	1800
3	N°2	72	1728	1800
4		288	1512	1800
5		432	1368	1800

Des aliquotes de la gamme d'étalonnage se conservent à une température inférieure à -18°C pendant trois mois. Une durée de conservation plus longue peut être envisagée si le laboratoire a vérifié leurs stabilités.

## 5. Appareillage et matériels

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

- 5.1. **Balance analytique** capable de peser avec une précision de 0,1 mg.
- 5.2. **Balance analytique** capable de peser avec une précision de 0,01 g.
- 5.3. **Broyeur ménager ou homogénéisateur à couteaux** (par exemple, Grindomix).
- 5.4. **Agitateur vibreur** (par exemple, Vortex).
- 5.5. **Homogénéisateur** capable d'atteindre une vitesse de 10 000 tours/min (par exemple, Ultra Turrax® ou Polytron®).
- 5.6. **Centrifugeuse**, atteignant au moins 2 000 g.
- 5.7. **Bain sec chauffant ou bain-marie à 76 ± 4°C.**
- 5.8. **Fioles jaugées.**
- 5.9. **Pipettes de précision.**
- 5.10. **Éprouvettes graduées.**
- 5.11. **Flacon en verre à fond conique de 5 ml.**
- 5.12.  **Tubes à centrifuger en polypropylène, d'une capacité de 15 ml.**
- 5.13.  **Tubes à centrifuger en polypropylène, d'une capacité de 50 ml.**
- 5.14. **Filtre pour seringue ou tube à membrane filtrante, d'une porosité de 0,20 µm ou de 0,45 µm.** (PTFE ou nylon)
- 5.15. **Vials pour passeur automatique d'échantillons CLHP.**
- 5.16. **Seringue pour système de filtration.**
- 5.17. **Colonne SPE phase polymérique 60mg/3ml** (par exemple, colonnes Strata®-X)
- 5.18. **Flacon en verre de 4 ml**

**5.19. Colonne analytique à polarité de phases inversée pour HPLC** (par exemple, Hypersil Gold®, 50 mm (longueur) x 2,1 mm (diamètre), taille des particules 1,9 µm).

**Note :** Plusieurs autres exemples de colonnes chromatographiques adéquates sont mentionnés dans le protocole harmonisé du LRUE [5].

**5.20. Chromatographe en phase liquide**, système capable d'analyse en mode gradient.

**5.21. Spectromètre de masse**, équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI) et capable d'analyser en mode tandem MS/MS

## 6. Échantillons

### 6.1. Conditions d'acceptation des échantillons

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode décrite dans ce protocole. Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

### 6.2. Conservation des échantillons avant analyse

Si le début d'analyse est prévu dans les 48h, les échantillons frais ou congelés doivent être conservés à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ . Dans le cas contraire, les échantillons doivent être conservés à une température  $\leq -18^\circ\text{C}$ .

### 6.3. Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les échantillons après analyse sont conservés à une température  $\leq -18^\circ\text{C}$ .

## 7. Mode opératoire

### 7.1. Préparation des échantillons pour analyse

#### 7.1.1 Coquillages entiers

Les coquillages doivent être soigneusement nettoyés en rinçant la coquille à l'eau fraîche. Les muscles adducteurs sont ensuite sectionnés. L'intérieur des coquillages est rincé à l'eau fraîche pour éliminer le sable et/ou tout corps étranger. La chair est alors séparée de la coquille. Les tissus sont déposés au fur et à mesure dans une passoire afin de les laisser s'égoutter et ainsi éliminer l'eau salée. Pour un échantillonnage représentatif, au moins 100 g de tissus doivent être recueillis. Les tissus sont ensuite homogénéisés dans un broyeur ménager ou homogénéisateur à couteaux (5.3).

### 7.1.2 Coquillages décoquillés

Les coquillages décoquillés doivent être rincés à l'eau fraîche pour éliminer le sable et/ou tout corps étranger. Les tissus sont déposés au fur et à mesure dans une passoire afin de les laisser s'égoutter et ainsi éliminer l'eau salée. Pour un échantillonnage représentatif, au moins 100 g de tissus doivent être recueillis. Les tissus sont ensuite homogénéisés dans un broyeur ménager ou homogénéisateur à couteaux (5.3).

### 7.1.3 Moules transformées

L'annexe A décrit la procédure de préparation des échantillons de moules transformées.

## 7.2. Extraction

Peser 2,00 g  $\pm$  0,05 g d'homogénat tissulaire dans un tube à centrifuger (5.13). Ajouter 9 ml de méthanol (4.3) et homogénéiser l'échantillon à l'aide d'un homogénéisateur (5.5) pendant 2 min à environ 10 000 tours/min. Centrifuger à 2000 g ou plus pendant 10 min à environ 20°C (5.6), prélever le surnageant avec une pipette (5.9), transvaser le surnageant dans une fiole jaugée de 20 ml. Procéder à une deuxième extraction du culot avec 9 ml de méthanol (4.3) et homogénéiser pendant 1 min à l'aide d'un homogénéisateur (5.5). Après centrifugation à 2000 g ou plus pendant 10 min à environ 20 °C, prélever le surnageant avec une pipette (5.9), transvaser de nouveau le surnageant dans la fiole de 20 ml ayant recueilli le premier extrait et ajuster le volume avec le méthanol (4.3). Filtrer une aliquote de l'extrait méthanolique sur un filtre seringue (5.14) dans un tube (5.13).

**Note :** Si la sensibilité de la LC-MS/MS le permet, une étape systématique de dilution de l'extrait final peut être mise en œuvre afin de réduire les effets matrice. La méthode devra alors être caractérisée/validée dans ces conditions.

## 7.3. Hydrolyse

Pour hydrolyser la liaison ester des DTX3, transférer une aliquote de l'extrait obtenu à l'issue de l'extraction (7.2) dans un flacon en verre à fond conique (5.11) par exemple, et ajouter du NaOH 2,5 M (4.8). Agiter le tube sur un agitateur-vibreux (5.4) et le faire chauffer pendant 40 minutes dans un bain sec chauffant ou un bain-marie à 76°C  $\pm$  4°C (5.7).

Retirer le tube et le laisser revenir à température ambiante. Neutraliser l'extrait avec de l'HCl 2,5 M (4.7) et agiter le tube sur un agitateur-vibreux (5.4). Filtrer cet extrait sur un filtre pour seringue (5.14).

Le rapport volumétrique : extrait / NaOH 2,5M / HCl 2,5M doit être de 1 / 0,125 / 0,125. Les protocoles suivants sont donnés à titre indicatif :

**Exemple 1 :** Dans un flacon en verre à fond conique (5.11) : Ajouter 500  $\mu$ l de NaOH 2,5 M (4.8) à 4ml d'extrait (7.2) puis neutraliser avec 500  $\mu$ l de HCl 2,5 M (4.7)

**Exemple 2 :** Dans un vial HPLC : Ajouter 125  $\mu$ l de NaOH 2,5 M (4.8) à 1ml d'extrait (7.2) puis neutraliser avec 125  $\mu$ l de HCl 2,5 M (4.7)

**Note 1 :** Les flacons ou vials doivent être hermétiquement bouchés pendant toute la durée de l'hydrolyse, (le point d'ébullition du méthanol est de 65°C). En pesant les flacons ou vials avant et après chauffage, il est possible de vérifier s'il y a eu évaporation du méthanol au cours de l'opération. Si l'on constate une évaporation du méthanol, il est absolument nécessaire de compléter le volume avec du méthanol jusqu'au poids adéquat avant de passer aux étapes suivantes.

**Note 2 :** Si la sensibilité de la LC-MS/MS le permet, une étape systématique de dilution de l'extrait final peut être mise en œuvre afin de réduire les effets matrice. La méthode devra alors être caractérisée/validée dans ces conditions.

## 7.4. Etape de purification

La purification peut permettre de réduire les effets de matrice. Cette étape est optionnelle. Elle peut se faire par extraction en phase solide (SPE) ou par partition liquide-liquide. Des contrôles qualité adéquats doivent alors être mis en œuvre afin d'évaluer le taux de récupération de cette étape. Un exemple de protocole de purification SPE est donné ci-après.

### 7.4.1 Conditionnement

Préparer deux colonnes de SPE (5.17) par échantillon. Conditionner chaque colonne avec 3,0 ml de MeOH (4.3) suivi de 3,0 ml de MeOH à 30% (4.4). Il ne faut pas laisser s'assécher la phase stationnaire de la colonne.

### 7.4.2 Dépôt

Pour chaque échantillon, transférer :

- 3,0 ml d'extrait non hydrolysé (7.2) dans 1 tube de 15 ml (5.12) et ajouter 7,0 ml H<sub>2</sub>O (4.1)
- 3,0 ml d'extrait hydrolysé (7.3) dans 1 tube de 15 ml (5.12) et ajouter 7,0 ml H<sub>2</sub>O (4.1).

Prélever le contenu de chaque tube et le déposer sur une colonne conditionnée en 7.4.1. Laisser éluer le solvant par gravité.

### 7.4.3 Lavage

Laver chaque colonne avec 3,0 ml de solution de lavage (4.11). Sécher ensuite les colonnes pendant 3 minutes sous un vide d'environ 10 kPa.

### 7.4.4 Elution

Placer sous chaque colonne un flacon en verre de 4,0 ml (5.18) pour récupérer le solvant d'élution contenant les toxines. Éluer avec 3,0 ml de MeOH (4.3) par gravité. Sécher chaque cartouche 3 min sous un vide d'environ 10 kPa. Boucher et agiter le flacon à l'aide de l'agitateur (5.4).

## 7.5. Injection des extraits

### 7.5.1 Généralités

En fonction de la mise en œuvre ou non de l'étape de purification, injecter les extraits non purifiés ou purifiés.

- Les extraits non hydrolysés sont injectés afin de déterminer la teneur des toxines sous forme libre du groupe AO et les toxines des groupes AZAs, YTXs, PTXs, GYM A, SPX et PnTXs.
- Les extraits hydrolysés sont injectés afin de déterminer la teneur en toxines totales pour les toxines du groupe AO.

## 7.5.2 Séquence d'injections

Une nouvelle aliquote de la gamme d'étalonnage doit être utilisée à chaque série d'analyse (4.17). La séquence d'injection peut être construite de la manière suivante :

- MeOH
- Extrait de composition toxinique connue (8.1, variation du temps de rétention)
- Gamme d'étalonnage (4.16)
- CQ négatif (8.1)
- CQ positif (8.1) et les extraits d'échantillons (non hydrolysés et hydrolysés)
- CQ négatif (8.1)
- Gamme d'étalonnage (4.16)
- CQ négatif (8.1)
- Extraits d'échantillons (non hydrolysés et hydrolysés)
- CQ négatif (8.1)
- Gamme d'étalonnage (4.16)
- ...

## 7.6. Conditions LC-MS/MS

### 7.6.1 Généralités

Les conditions LC-MS/MS peuvent être adaptées par les laboratoires. Les analytes qui ne peuvent pas être séparés par spectrométrie de masse doivent l'être par chromatographie (par exemple, AO et DTX2).

### 7.6.2 Conditions chromatographiques

La méthode peut être mise en œuvre avec des conditions de phases mobiles acides ou basiques. Plusieurs exemples de conditions chromatographiques sont décrits dans le protocole harmonisé du LRUE [5]. Dans la partie qui suit, un exemple de conditions de phases mobiles acides est présenté.

**Tableau 7 - Exemple de conditions chromatographiques en conditions acides**

Colonne HPLC		Hypersil Gold, 50 mm (longueur) x 2,1 mm (diamètre), 1,9 µm (taille des particules)		
Débit		0,4 ml/min		
Volume d'injection		5 µl		
Température de la colonne		40 °C		
Gradient	Mode ionisation négative	Temps (min)	Phase mobile A (%)	Phase mobile B (%)
		0,0	65	35
		0,5	65	35
		4,0	45	55
		5,5	30	70
		6,0	10	90
		7,0	10	90
		7,5	65	35
	10,0	65	35	
	Mode ionisation positive	0,0	90	10
		0,5	90	10
		5,5	10	90
		6,5	10	90
		7,0	90	10
10,0		90	10	

### 7.6.3 Conditions de la spectrométrie de masse

Au sein d'un même groupe de toxines, les mécanismes de fragmentation sont considérés comme identiques. Lorsque les paramètres MS/MS d'une toxine ne peuvent pas être optimisés (par exemple, en l'absence d'étalon), les valeurs obtenues à partir de la toxine représentative de ce groupe sont alors reprises pour la détection et la quantification de cette toxine. Par exemple, les valeurs des paramètres MS/MS optimisées pour la YTX sont utilisées pour la détection et la quantification de la 45-OH-YTX.

La détection MS/MS doit se faire avec un minimum de deux transitions :

- La transition de quantification. Il s'agit généralement de celle dont le rapport du S/N (signal/bruit) est le plus élevé
- La transition qualitative, utilisée à des fins de confirmation.

Il est recommandé que chaque pic chromatographique soit composé de 12 à 20 points.

Les paramètres instrumentaux sont à optimiser et sont instruments-dépendant. Un exemple des conditions donnant des résultats satisfaisants est présenté dans l'annexe B. Plusieurs autres exemples de conditions chromatographiques adéquates sont décrits dans le protocole harmonisé du LRUE [5].

## 8. Résultats

### 8.1 Contrôle de la validité des résultats

Le tableau 8 regroupe l'ensemble des contrôles qualité permettant de garantir la validité des résultats.

Tableau 8 - Contrôles qualité

Critère de contrôle de la validité des résultats		Description et critères d'acceptation
Courbe d'étalonnage	Coefficient de détermination	Le coefficient de détermination, $R^2$ , de chacune des 2 droites d'étalonnage (bracketing) et de la droite d'étalonnage moyenne doit être supérieur ou égal à 0,98.
	Variation de la réponse	<p>La dérive de la réponse au sein d'une même séquence, définie ici comme l'écart des pentes des courbes d'étalonnage, résultant de l'injection de 2 gammes successives.</p> <p>L'écart entre 2 pentes est calculé de la manière suivante :</p> $\text{Écart des pentes} = \frac{ pente (n + 1) - pente n }{\left(\frac{pente (n + 1) + pente n}{2}\right)}$ <p>La dérive doit être inférieure ou égale à 25 %.</p>
Identification et confirmation de la présence de toxines	Variation du temps de rétention	<p>Un analyte est détecté si l'écart entre son temps de rétention et celui de l'étalon correspondant ne dépasse pas 3 %.</p> <p>Pour les biotoxines marines ne disposant pas de standard, le calcul de cet écart est impossible. Il convient alors, dans la mesure du possible, d'injecter en début de séquence un ou plusieurs extraits de composition toxinique connue. Les temps de rétention des biotoxines marines contenues dans ce ou ces extraits serviront de référence pour calculer les écarts de temps de rétention.</p>
	Sensibilité	Un analyte est détecté si le rapport signal sur bruit (S/N) de la transition la moins intense est $\geq 3$ .
	Résolution chromatographique	<p>Pour une identification correcte, il faut s'assurer d'une bonne séparation entre AO et son isomère DTX2, avec retour à la ligne de base entre leurs pics respectifs. La résolution des pics entre AO/DTX2 peut être calculée à l'aide de l'expression suivante :</p> $Rs = 2 \times \frac{(Tr2 - Tr1)}{(\omega1 + \omega2)} \quad \text{ou} \quad Rs = 1,18 \times \frac{(Tr2 - Tr1)}{(\delta1 + \delta2)}$ <p>Où : <math>Tr_1</math> et <math>Tr_2</math> = temps de rétention des 2 pics (avec <math>Tr_2 &gt; Tr_1</math>).  <math>\omega_1</math> et <math>\omega_2</math> = largeur à la ligne de base du pic de l'AO et de la DTX2.  <math>\delta_1</math> et <math>\delta_2</math> = largeur à mi-hauteur du pic de l'AO et de la DTX2.</p> <p>Une résolution acceptable entre deux pics correspond à <math>Rs &gt; 1,0</math>, et une résolution complète jusqu'à la ligne de base correspond à <math>Rs &gt; 1,5</math>. Si <math>Rs &lt; 1,0</math>, il convient de réajuster les conditions chromatographiques.</p>

Critère de contrôle de la validité des résultats		Description et critères d'acceptation
Contrôle qualité (CQ)	Contrôle qualité négatif (CQ négatif)	<p>Le CQ négatif, inclus dans chaque série, est soit un blanc solvant (2 ml d'eau) ayant suivi l'ensemble des étapes analytiques, soit un échantillon non contaminé, soit un matériau de référence interne négatif (MRI), soit un matériau de référence externe négatif (MRE) soit un matériau de référence certifié négatif (MRC).</p> <p>Aucune toxine ne doit être détectée (Teneur inférieure à la limite de détection).</p>
	Contrôle qualité positif (CQ positif)	<p>Le CQ positif, inclus dans chaque série, est un échantillon supplémenté, un matériau de référence interne (MRI), un matériau de référence externe (MRE) ou un matériau de référence certifié (MRC) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pour les échantillons supplémentés et les matériaux de référence interne, les critères d'acceptation doivent être spécifiés dans un document interne du laboratoire.</li> <li>- Pour les MRE les critères d'acceptation sont spécifiés par le fabricant.</li> <li>- Pour les MRC, les critères d'acceptation sont spécifiés par le fabricant. A défaut (ex. NRCC), il est recommandé de conduire les calculs tels que défini dans la note d'application de l'IRMM (Application Note1, ERM).</li> </ul>

## 8.2 Calculs des résultats

Après injection des extraits non hydrolysés et hydrolysés et intégration des pics chromatographiques, chaque toxine est quantifiée par la méthode de l'étalonnage externe. La quantification est soit directe (fortement recommandée lorsque les étalons existent), soit indirecte (en faisant l'hypothèse d'une réponse équivalente).

En cas de quantification indirecte :

- La courbe d'étalonnage de l'AO est aussi utilisée pour quantifier la DTX1 et la DTX2.
- La courbe d'étalonnage de l'AZA1 est aussi utilisée pour quantifier l'AZA2 et l'AZA3.
- La courbe d'étalonnage de la YTX est aussi utilisée pour quantifier l'Homo-YTX, la 45-OH-YTX et la 45-OH-Homo-YTX.
- La courbe d'étalonnage de la PTX2 est aussi utilisée pour quantifier la PTX1.

Lorsque le signal d'une toxine dans l'échantillon analysé est supérieur au signal de l'étalon de concentration la plus élevée, l'extrait doit être dilué avec du méthanol pour obtenir un signal qui rentre dans la courbe d'étalonnage et le facteur de dilution (D) doit être pris en compte dans les calculs.

La teneur des échantillons en biotoxines marines lipophiles est ensuite calculée de la manière suivante :

$$\text{Teneur}_{\text{ non hydrolysée}} (\mu\text{g/kg}) = \left( \frac{y-b}{a} \right) \times \frac{V_T}{p} \times D$$

$$\text{Teneur}_{\text{ hydrolysée}} (\mu\text{g/kg}) = \left( \frac{y-b}{a} \right) \times \frac{V_E \times V_T}{V_H} \times D$$

Où : **y** = aire du pic chromatographique  
**b** = ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage  
**a** = pente de la courbe d'étalonnage  
**V<sub>T</sub>** = volume total de l'extrait brut (20 ml)  
**V<sub>H</sub>** = volume de l'extrait utilisé pour effectuer l'hydrolyse (ml)  
**V<sub>F</sub>** = volume final de l'extrait après hydrolyse (et purification / concentration) (ml)  
**p** = prise d'essai l'échantillon tissulaire (g)  
**D** = facteur de dilution (si l'extrait a été dilué)

### 8.3 Correction des résultats

Pour certains couples analytes/matrices un biais de justesse significatif peut être observé lors des essais préliminaires de caractérisation / validation de la méthode. Dans la plupart des cas, cela s'explique par la présence d'effets matrice. En effet, en spectrométrie de masse, les interférences dues à la matrice peuvent engendrer une extinction ou une augmentation significative de la réponse instrumentale pour l'analyte ciblé. Si ce biais de justesse est important, les résultats d'analyses doivent alors être corrigés par un facteur de correction. Ces facteurs de correction sont laboratoires-dépendants. Ils peuvent être déterminés :

- A partir d'une droite de justesse établie lors de la caractérisation / validation de la méthode. Le facteur de correction obtenu sera ensuite appliqué à l'ensemble des résultats d'analyse.
- A partir d'un échantillon supplémenté ou d'un matériau de référence externe ou certifié intégré dans chacune des séries d'analyse.
- A partir d'un extrait supplémenté (correction des effets matrices) intégré dans chacune des séries d'analyse (si et seulement si le biais de justesse est uniquement dû à un effet matrice).

Ces 3 cas de figure sont détaillés en 8.3.1, 8.3.2 et 8.3.3.

**Note 1 :** Lorsqu'une correction est nécessaire, la caractérisation / validation de la méthode doit être effectuée en mettant en œuvre l'approche retenue.

**Note 2 :** Les facteurs de correction déterminés ne sont pas automatiquement applicables à des extraits dilués dans du solvant. Il convient d'étudier l'effet de la dilution pour décider si une correction est toujours nécessaire.

#### 8.3.1 Facteur de correction déterminé à partir de droites de justesse établies lors de la caractérisation / validation de méthode

Cette approche est décrite dans l'annexe G de la norme française V03-110 (Mai 2010). A partir des résultats des échantillons supplémentés analysés dans le cadre de la caractérisation / validation de la méthode, des droites de justesse sont tracées représentant graphiquement la relation entre les concentrations retrouvées et les valeurs de référence. L'inverse de la pente de ces droites permet de corriger un taux de récupération non satisfaisant. L'ordonnée à l'origine permet de corriger un biais systématique (ex.pic chromatographique mal résolu).

$$\text{Teneur corrigée } (\mu\text{g/kg}) = \left( \text{Teneur} \times \frac{1}{a} \right) - b$$

Où : - **a** est la pente de la droite de justesse.  
 - **b** est l'ordonnée à l'origine de la droite de justesse.

**Note :** En fonction de l'équation de la droite de justesse, les résultats peuvent être corrigés par la pente, par l'ordonnée à l'origine ou par les deux.

### 8.3.2 Facteur de correction déterminé à partir d'un échantillon supplémenté ou d'un matériau de référence externe ou certifié

Un échantillon supplémenté, un matériau de référence externe ou un matériau de référence certifié est analysé en même temps que les échantillons. Le taux de récupération est calculé de la manière suivante :

$$\text{Taux de récupération} = \frac{\text{Teneur calculée}_{\text{suppl./MR}}}{\text{Teneur cible}}$$

Où : - **Teneur calculée**<sub>suppl./MR</sub> est la teneur de l'échantillon supplémenté ou du matériau de référence externe ou certifié (en µg/kg), calculée conformément au point 8.2.

- **Teneur cible** correspond à la teneur de l'échantillon supplémenté ou à la valeur assignée du matériau de référence externe ou certifié (en µg/kg).

La teneur corrigée des échantillons est calculée de la manière suivante :

$$\text{Teneur corrigée} = \frac{\text{Teneur}}{\text{Taux de récupération}}$$

Où : - **Teneur corrigée** est la teneur après correction des résultats quantifiés de la série d'analyses (µg/kg).

- **Teneur** est la teneur de l'échantillon calculée conformément au point 8.2 (µg/kg).

**Note 1 :** Les matériaux de référence internes ne doivent pas être utilisés car ils ne permettent pas de corriger un biais de justesse.

**Note 2 :** Pour corriger les résultats, Il est recommandé d'utiliser un échantillon supplémenté ou un matériau de référence externe ou certifié différent de celui utilisé comme contrôle qualité positif. Par exemple, dans une même séquence d'analyse, un MRI peut être utilisé comme contrôle qualité positif et un échantillon supplémenté peut être utilisé pour corriger les résultats.

### 8.3.3 Facteur de correction déterminé à partir d'un extrait supplémenté

A partir d'un extrait supplémenté. Dans ce cas les calculs sont conduits de la même manière que pour un échantillon supplémenté. Le taux de récupération est calculé de la manière suivante :

$$\text{Taux de récupération} = \frac{\text{Concentration}_{\text{suppl.}}}{\text{Valeur cible}}$$

Où : - **Concentration**<sub>suppl.</sub> est la concentration en toxine de l'extrait supplémenté (en ng/mL) déterminée par étalonnage externe.

- **Valeur cible** correspond à la valeur de l'ajout (en ng/mL).

La teneur corrigée de l'échantillon et des contrôles internes est alors calculée de la même manière que pour un échantillon supplémenté ou un matériau de référence externe ou certifié.

## 8.4 Expression des résultats

Pour répondre aux exigences réglementaires, les résultats doivent être exprimés par groupe de toxines. Des facteurs d'équivalence toxique (TEF) (cf. Tableau 9) doivent être appliqués aux résultats afin de tenir compte des différences de toxicité entre les biotoxines marines lipophiles. Ces TEF ont été fixés par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA). Après avoir calculé la teneur de chaque toxine, chacun des résultats est multiplié par son TEF respectif. Les toxines appartenant au même groupe réglementé, sont alors additionnées. Les résultats sont alors exprimés dans les mêmes unités que les seuils réglementaires, c'est-à-dire en : « µg équivalent AO/kg », en « µg équivalent AZA1/kg » ou en « mg équivalent YTX par kg ».

Tableau 9 - TEF adoptés par l'EFSA pour les biotoxines marines lipophiles réglementées

Groupe de toxines	Analogue	TEF	Expression des résultats
Groupe AO	AO	1	µg équivalents AO/kg
	DTX1	1	
	DTX2	0,6	
Groupe AZAs	AZA1	1	µg équivalents AZA1/kg
	AZA2	1,8	
	AZA3	1,4	
Groupe YTXs	YTX	1	mg équivalents YTX/kg
	Homo-YTX	1	
	45-OH-YTX	1	
	45-OH-Homo-YTX	0,5	

## 9 Caractéristiques de performance de la méthode

La méthode d'analyse des biotoxines marines lipophiles a fait l'objet d'une caractérisation/validation intra-laboratoire par le LNR. Lors de l'étude, les matrices : huîtres, moules, et coquilles Saint-Jacques ont été étudiées ; avec et sans mise en œuvre de l'étape de purification. La quasi-totalité des standards disponibles ont été inclus à l'exception de l'AZA2 et de l'AZA3 (en raison de leur coût). Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

### 9.1 Performances de la méthode sans mise en œuvre de l'étape de purification

Toxine	Domaine de validation (µg/kg)	Correction (O/N) – Facteur de correction	Limites analytique		Exactitude (Justesse + Fidélité)			
			LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Domaine (µg/kg)	Taux de récupération (%)	Répétabilité CV <sub>r</sub> (%)	Fidélité intermédiaire CV <sub>Fi</sub> (%)
AO Libre	10 - 240	O – 1,17	3,9	10	10 - 20	90	7,9	17,8
					80 - 240		3,8	
AO Total	10 - 240	N	3,9	10	10 - 20	101	10,6	24,7
					80 - 240			15,2
DTX1 Libre	10 - 240	O – 1,63	1,8	10	10	78	11,2	19,0
					20 - 240	94	7,3	
DTX1 Totale	10 - 240	O – 1,44	1,8	10	10 - 80	81	10,9	12,8
					160 - 240	100	4,4	10,3
DTX2 Libre	10 - 240	O – 1,25	2,4	10	10	102	10,0	13,1
					20 - 80			
					160 - 240			
DTX2 Totale	10 - 240	N	2,4	10	10 - 240	109	9,5	10,6
YTX	5 - 240	N	1,9	5,0	5	87	10,2	13,9
					10			
					80 - 240	73		
Homo-YTX	5 - 240	N	1,8	5,0	5	94	8,6	13,5
					10			
					80 - 240	72		
AZA1 AZA2 AZA3	2,0 - 240	O – 0,76	0,9 (AZA1)	2,0	2,0	82	10,3	17,6
			0,8 (AZA2)		4,0			
			1,4 (AZA3)		80 - 240	102		
PTX2	2,0 - 240	O – 1,56	1,0	2,0	2	80	10,5	16,9
					4			
					80 - 240	99		
GYM A	1,5 - 60	N	0,5	1,5	1,5	93	8,0	11,4
					3,0 - 60	3,0		
SPX1	4,0 - 60	N	0,7	4,0	2,0	112	8,0	11,4
					4,0 - 60	96	3,0	8,3
PnTX A	2,0 – 60	N	1,1	2,0	2,0	75,7	15,6	28,5
					4,0			15,6
					20 - 60			6,3
PnTX G	2,0 - 60	N	0,7	2,0	2,0	86	3,7	14,3
					4,0 - 60			

## 9.2 Performances de la méthode avec mise en œuvre de l'étape de purification

Toxine	Domaine de validation (µg/kg)	Correction (O/N) – Facteur de correction	Limites analytique		Exactitude (Justesse + Fidélité)			
			LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Domaine (µg/kg)	Taux de récupération (%)	Répétabilité CV <sub>r</sub> (%)	Fidélité intermédiaire CV <sub>FI</sub> (%)
AO Libre	10 - 240	N	3,9	10	10 - 240	94	14,6	15,8
AO Total	10 - 240	N	3,9	10	10	97	24,2	24,2
					20 - 80		7,2	16,4
					160 - 240			
DTX1 Libre	10 - 240	O – 1,32	1,8	10	10 - 240	91	7,8	15,0
DTX1 Totale	10 - 240	O – 1,28	1,8	10	10	92	23,4	23,4
					20 - 240		7,7	13,0
DTX2 Libre	10 - 240	N	2,4	10	10	105	10,4	13,8
					20 - 240			
DTX2 Totale	10 - 240	N	2,4	10	10	96	21,5	23,3
					20		9,2	20,1
					80 - 240			
YTX	5 - 240	N	1,9	5,0	5	84	8,9	13,5
					10	69		
					80 - 240			
Homo-YTX	5 - 240	N	1,8	5,0	5	82	9,5	18,7
					10	69	6,1	12,1
					80 - 240			
AZA1 AZA2 AZA3	2,0 - 240	O – 0,82	0,9 (AZA1)	2,0	2,0	69	14,3	20,2
			0,8 (AZA2)		4,0 - 80	99		
			1,4 (AZA3)		160 - 240			
PTX2	2,0 - 240	O – 1,61	1,0	2,0	2	100	16,1	27,3
					4 - 240		13,3	20,8
GYM A	1,5 - 60	N	0,5	1,5	1,5	91	12,9	14,2
					3,0 - 60	67		
SPX1	4,0 - 60	N	0,7	4,0	2,0 – 4,0	92	13,6	19,6
					20 - 60	67		
PnTX A	2,0 – 60	N	1,1	2,0	2,0 – 4,0	94	18,1	18,1
					20 - 60	82		
PnTX G	2,0 - 60	N	0,7	2,0	2,0	79	12,0	13,1
					4,0 - 60			

**Note :** dans certains cas, un biais significatif a été observé lors de la validation de la méthode. Des facteurs de correction ont donc été appliqués.

## Annexes

Titre	Référence
Préparation des échantillons pour analyse de moules transformées	Annexe A
Exemple de paramètres de spectromètre de masse	Annexe B
Exemple de chromatogrammes	Annexe C

## Annexe A : Préparation des échantillons de moules transformées

Lors d'un étuvage ou d'un autoclavage, une perte d'eau est observée. En moyenne, l'étuvage se traduit par une perte d'eau de 30% et l'autoclavage de 50%. Afin de corriger cette perte d'eau et de favoriser l'homogénéisation et l'extraction, cette eau doit être ajoutée à la matrice avant analyse. Ceci est nécessaire si la teneur en toxines qui sera déterminée est à comparer au seuil réglementaire établi pour les mollusques bivalves vivants.

### 1. Moules en conserve

#### 1.1. Conserves à base d'huile, de sauce, de bouillon et d'eau

Suivre la méthode officielle AOAC 937.07 [7]. Si le ratio solide/liquide est élevé (i.e. > 50/50) et/ou si un broyat hétérogène est obtenu, ajouter de l'eau. Ce facteur de dilution doit être pris en compte lors du calcul de la teneur totale en toxines du produit. Après extraction, une étape de purification doit être mise en œuvre (cf. § 7.4).

#### 1.2. Conserves à base de saumure (et autres sauces non-comestibles)

Séparer la chair des moules du liquide. Après avoir rincé les moules à l'eau, les déposer dans une passoire afin d'éliminer cette eau. Peser ensuite les moules égouttées. Puis, ajouter de l'eau (4.1) afin d'obtenir un ratio chair/eau de 50/50. Homogénéiser ensemble la chair et l'eau.

### 2. Moules étuvées

Peser la chair de moules. Ajouter ensuite de l'eau (4.1) afin d'obtenir un ratio chair/eau de 70/30. Homogénéiser ensemble la chair et l'eau.

### 3. Moules transformées (conditionnement en sachets sous vide)

Lorsqu'il est indiqué qu'il n'y a pas d'ajout d'eau ou de sauce, la totalité du liquide présent dans le sachet doit être inclus dans l'échantillon. Lorsque les moules sont avec leur coquille, le liquide doit être conservé. Les moules sont décoquillées et le liquide est ensuite ajouté avant homogénéisation.

## Annexe B : Exemple de paramètres de spectromètre de masse

Tableau 10 - Exemple de paramètres de la source optimisés avec un instrument LC-MS/MS API 4000 (ABSciex)

	Mode Négatif	Mode positif
<b>Gaz rideau (CUR)</b>	15 psi	10 psi
<b>Gaz de collision (CAD)</b>	8 psi	4 psi
<b>Tension (IS)</b>	- 4 500 V	5 500 V
<b>Température (TEM)</b>	600°C	600°C
<b>Gaz 1 (GS1)</b>	40 psi	40psi
<b>Gaz 2 (GS2)</b>	60 psi	60 psi

Tableau 11 - Exemple de conditions MS/MS optimisés avec un instrument LC-MS/MS API 4000 (ABSciex)

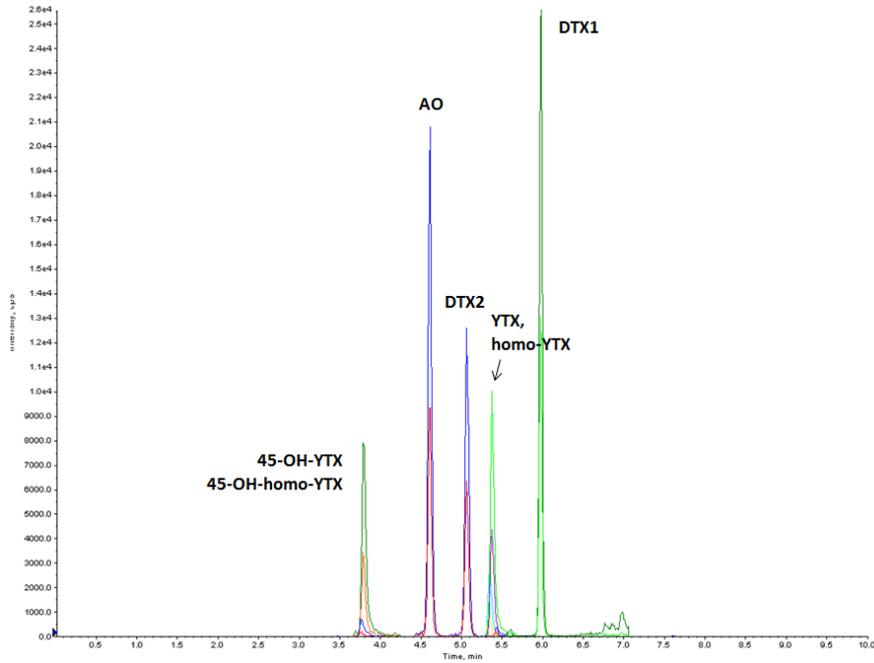
Toxine	Mode d'ionisation	Transition (uma) *	DP	EP	CE	CXP
45-OH-Homo-YTX	Négatif	1171,6 – 1091,7	-130	-10	-47	-30
		1171,6 – 869,4	-130	-10	-100	-20
45-OH-YTX		1157,5 – 1077,7	-110	-10	-54	-30
		1157,5 – 855,4	-110	-10	-97	-20
Homo-YTX		1155,6 – 1075,7	-130	-10	-47	-30
		1155,6 – 869,4	-130	-10	-100	-20
YTX		1141,5 – 1061,6	-110	-10	-54	-30
		1141,5 - 855,4	-110	-10	-97	-20
AO + ester		803,5 – 255,0	-190	-10	-66	-5
		803,5 – 112,9	-190	-10	-90	-8
DTX2 + ester		803,5 – 255,0	-190	-10	-66	-5
		803,5 – 113,0	-190	-10	-90	-8
DTX1 + ester	817,5 – 255,0	-190	-10	-66	-5	
	817,5 – 112,9	-190	-10	-90	-8	

Toxine	Mode d'ionisation	Transition (uma) *	DP	EP	CE	CXP
GYM A	Positif	508,4 – 490,3	100	10	35	14
		508,4 – 392,3	100	10	48	10
SPX 13desMeC		692,5 – 164,2	120	10	69	14
		692,5 – 444,3	120	10	55	12
PTX2		876,6 – 823,5	95	10	33	25
		876,6 – 805,5	95	10	35	25
PTX1		892,6 – 839,5	95	10	33	25
		892,6 – 821,5	95	10	35	25
AZA3		828,5 – 658,4	120	11	66	21
		828,5 – 640,4	120	11	69	21
AZA1		842,5 – 672,4	120	11	66	21
		842,5 – 654,4	120	11	69	21
AZA2		856,5 – 672,4	120	11	66	21
		856,5 – 654,4	120	11	69	21
PnTX A		712,6 – 458,3	100	10	52	12
		712,6 – 164,2	100	10	52	12
PnTX G		694,5 – 458,3	100	10	52	12
		694,5 – 164,2	100	10	52	12

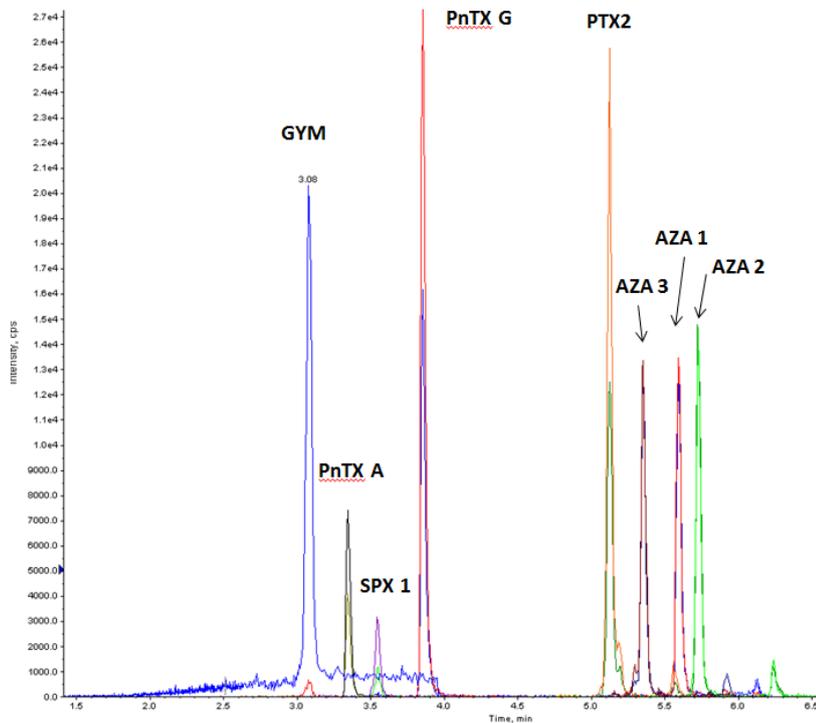
\* : Gris : transition de quantification – Blanc : transition qualitative

## Annexe C : Exemples de chromatogrammes

- Exemple de chromatogramme obtenu en mode d'ionisation négatif



- Exemple de chromatogramme obtenu en mode d'ionisation positif



## Bibliographie

- [1] Règlement (CE) N°853/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale Journal officiel de l'Union européenne L139/55.
- [2] Règlement (CE) N°786/2013 de la Commission du 16 août 2013 modifiant l'annexe III du règlement (CE) n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les limites autorisées de yessotoxines dans les mollusques bivalves vivants.
- [3] Règlement (UE) N°15/2011 du 10 janvier 2011 modifiant le règlement du règlement (CE) 2074/2005 en ce qui concerne les méthodes d'analyse reconnues des biotoxines marines chez les mollusques bivalves vivants.
- [4] Règlement (CE) 2074/2005 du 5 décembre 2005 : établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil et (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE)n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) n° 853/2004 et (CE) n° 854/2004 (JOUE du 22/12/2005).
- [5] EU-Harmonised standard operating procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, Version 5, January 2015.  
[http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/laboratorios/LNRBM/ARCHIVO2EU-Harmonised-SOP-LIPO-LCMSMS\\_Version5.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/laboratorios/LNRBM/ARCHIVO2EU-Harmonised-SOP-LIPO-LCMSMS_Version5.pdf)
- [6] Interlaboratory validation study of the « EU-harmonized standard operating procedure for determination of lipophilic marine biotoxines in molluscs by LC-MS/MS. Report.  
[http://www.aecosan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/public\\_documents/seccion/soporte\\_cientif.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/public_documents/seccion/soporte_cientif.htm)
- [7] AOAC Official Method 937.07 Fish and Marine Products Treatment and Preparation of Sample. 1996. Villar-Gonzalez, A., M. L. Rodriguez-Velasco, et al. (2011). "Determination of lipophilic toxins by LC/MS/MS: single-laboratory validation." J AOAC Int 94(3): 909-22.
- [8] Gerssen, A., Mulder, P. P. J., McElhinney, M. A., de Boer, J. 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. Journal of Chromatography A, 1216, 1421-1430.
- [9] McNabb, P., Selwood, A. I., Holland, P. T. 2005. Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: single-laboratory validation and interlaboratory study. Journal of AOAC International, 88, 761-772.
- [10] EFSA. 2009. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. The EFSA Journal, 1306, 1-23.