



IAEA

Agence internationale de l'énergie atomique

Manuel des procédures opérationnelles standard pour l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires



Joint FAO/IAEA Programme
Nuclear Techniques in Food and Agriculture

MANUEL DES PROCÉDURES
OPÉRATIONNELLES STANDARD
POUR L'ANALYSE DES RÉSIDUS
DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES

COLLECTION COURS DE FORMATION N° 63

MANUEL DES PROCÉDURES
OPÉRATIONNELLES STANDARD
POUR L'ANALYSE DES RÉSIDUS
DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES

AGENCE INTERNATIONALE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE
VIENNE, 2017

NOTE CONCERNANT LE DROIT D'AUTEUR

Toutes les publications scientifiques et techniques de l'AIEA sont protégées par les dispositions de la Convention universelle sur le droit d'auteur adoptée en 1952 (Berne) et révisée en 1972 (Paris). Depuis, le droit d'auteur a été élargi par l'Organisation mondiale de la propriété intellectuelle (Genève) à la propriété intellectuelle sous forme électronique. La reproduction totale ou partielle des textes contenus dans les publications de l'AIEA sous forme imprimée ou électronique est soumise à autorisation préalable et habituellement au versement de redevances. Les propositions de reproduction et de traduction à des fins non commerciales sont les bienvenues et examinées au cas par cas. Les demandes doivent être adressées à la Section d'édition de l'AIEA :

Unité de la promotion et de la vente
Section d'édition
Agence internationale de l'énergie atomique
Centre international de Vienne
B.P. 100
1400 Vienne
Autriche

Télécopie : +43 1 2600 29302
Téléphone : +43 1 2600 22417
Courriel : sales.publications@iaea.org
<http://www.iaea.org/books>

Pour tout renseignement supplémentaire, s'adresser à :

Section de la protection des aliments et de l'environnement
Agence internationale de l'énergie atomique
Centre international de Vienne
B.P. 100
1400 Vienne (Autriche)
Courriel : Official.Mail@iaea.org

MANUEL DES PROCÉDURES OPÉRATIONNELLES STANDARD
POUR L'ANALYSE DES RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES

AIEA, VIENNE, 2017

IAEA-TCS-63

ISSN 2520-2170

© AIEA, 2017

Imprimé par l'AIEA en Autriche

Janvier 2017

AVANT-PROPOS

Les laboratoires sont essentiels pour les programmes nationaux de surveillance des résidus de médicaments vétérinaires. Cependant, l'un des principaux problèmes auxquels ils sont confrontés est de disposer de méthodes d'analyse pertinentes. Ainsi, outre la formation, la fourniture de conseils techniques et le transfert de technologie, la Division mixte FAO/AIEA des techniques nucléaires dans l'alimentation et l'agriculture a décidé d'élaborer des manuels clairs et pratiques pour appuyer les laboratoires des États Membres.

Le projet de recherche coordonnée (PRC) sur l'élaboration de méthodes d'analyse radiométriques et connexes pour renforcer les programmes de surveillance des résidus de médicaments vétérinaires antibiotiques et anthelminthiques a mis au point un certain nombre de méthodes d'analyse qui sont devenues des procédures opérationnelles standard (POS) et sont compilées ici. La présente publication contient des POS sur les techniques de chromatographie et de spectrométrie, ainsi que sur celle de radio-immunos dosage et les méthodes d'études connexes, en vue de l'analyse de divers résidus de médicaments vétérinaires antimicrobiens et anthelminthiques. Certains protocoles de validation des méthodes analytiques sont également présentés.

La présente publication s'adresse principalement aux laboratoires de sécurité alimentaire et environnementale chargés des essais relatifs aux résidus de médicaments vétérinaires, y compris dans le cadre de programmes nationaux organisés de surveillance de ces résidus. Elle devrait renforcer les capacités et les compétences des laboratoires grâce à l'utilisation d'outils et de techniques radiométriques et complémentaires. La publication est également utile pour la recherche appliquée sur les résidus de médicaments vétérinaires présents dans les échantillons alimentaires et environnementaux.

Dix-sept organisations de recherche collaborative de quinze États Membres de l'AIEA et de la FAO qui ont participé au PRC ont contribué à la rédaction des POS présentées ici. Le fonctionnaire de l'AIEA responsable de la publication était J. J. Sasanya de la Division mixte FAO/AIEA des techniques nucléaires dans l'alimentation et l'agriculture.

NOTE DE L'ÉDITEUR

La présente publication a été élaborée à partir de documents originaux soumis par les personnes ayant contribué à sa rédaction. Elle n'a pas été éditée par l'équipe rédactionnelle de l'AIEA. Les opinions exprimées relèvent de la responsabilité de ces personnes et ne représentent pas nécessairement celles de l'AIEA ni de ses États Membres.

Ni l'AIEA ni ses États Membres n'assument une quelconque responsabilité pour les conséquences éventuelles de l'utilisation de la présente publication. La présente publication ne traite pas des questions de la responsabilité, juridique ou autre, résultant d'actes ou omissions imputables à une quelconque personne.

L'emploi d'appellations particulières pour désigner des pays ou des territoires n'implique de la part de l'éditeur, l'AIEA, aucune prise de position quant au statut juridique de ces pays ou territoires, ou de leurs autorités et institutions, ni quant au tracé de leurs frontières.

La mention de noms de sociétés ou de produits particuliers (qu'ils soient ou non signalés comme marques déposées) n'implique aucune intention d'empiéter sur des droits de propriété et ne doit pas être considérée non plus comme valant approbation ou recommandation de la part de l'AIEA.

L'AIEA n'assume aucune responsabilité quant à la persistance ou à l'exactitude des adresses URL de sites Internet externes ou de tiers mentionnées dans la présente publication et ne peut garantir que le contenu desdits sites est ou demeurera exact ou approprié.

TABLE DES MATIÈRES

1.	INTRODUCTION.....	1
1.1.	CONTEXTE.....	1
1.2.	OBJECTIF.....	1
1.3.	PORTÉE.....	1
1.4.	STRUCTURE.....	1
2.	DÉTERMINATION DES RÉSIDUS DE BENZIMIDAZOLE ET D'AVERMECTINE DANS LE LAIT DE VACHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM.....	2
2.1.	PRINCIPE.....	2
2.2.	PORTÉE.....	2
2.3.	MATIÈRES.....	2
2.3.1.	Solutions étalons et solutions mères.....	2
2.3.2.	Matériel.....	3
2.4.	PROCÉDURE.....	3
2.4.1.	Extraction des échantillons.....	3
2.4.2.	Calibration avec des étalons de même matrice.....	4
2.4.3.	Conditions de chromatographie.....	4
a)	Validité du système.....	4
b)	Conditions déterminantes.....	4
2.4.4.	Spectrométrie de masse (SM).....	5
3.	DÉTERMINATION DES RÉSIDUS DE BENZIMIDAZOLE ET D'AVERMECTINE DANS LE LAIT DE VACHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE AVEC DÉTECTEUR DE FLUORESCENCE.....	6
3.1.	PRINCIPE.....	6
3.2.	PORTÉE.....	6
3.3.	MATIÈRES.....	6
3.3.1.	Étalons et solutions.....	6
a)	Solutions étalons mères (2 000 µg/ml).....	6
b)	Mélange de solution étalon (50 µg/ml).....	6
c)	Mélange de solution étalon (250 µg/ml).....	6
d)	Solution étalon de travail.....	6
e)	Échantillons enrichis.....	7
3.3.2.	Matériel.....	7
3.4.	PROCÉDURE.....	7
3.4.1.	Extraction de l'échantillon.....	7
3.4.2.	Dérivatisation.....	7
3.4.3.	Conditions de chromatographie.....	8
a)	Validité du système et conditions déterminantes.....	8
4.	DÉTERMINATION DU FLORFENICOL DANS LA CHAIR DE POISSON PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE.....	8
4.1.	PRINCIPE.....	8
4.2.	PORTÉE.....	8
4.3.	MATIÈRES.....	8
4.3.1.	Étalons et solutions.....	9

4.3.2.	Matériel.....	9
4.4.	PROCÉDURE.....	9
4.5.	CONTRÔLE ESSENTIEL.....	11
4.6.	CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ.....	11
4.7.	INCERTITUDE DE MESURE.....	11
4.8.	LOQ.....	11
4.9.	CC ALPHA ET CC BETA.....	11
4.10.	RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE DE PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON.....	12
5.	DÉTERMINATION DU FLORFENICOL ET DU FLORFENICOL-AMINE DANS LA CHAIR DE POISSON PAR RADIO-IMUNNODOSAGE ET CONFIRMATION PAR CL-SM/SM.....	13
5.1.	PRINCIPE.....	13
5.2.	PORTÉE.....	13
5.3.	MATIÈRES.....	13
5.3.1.	Étalons.....	13
5.3.2.	Réactifs.....	13
5.3.3.	Solutions étalons.....	13
a)	Solution étalon mère de FFC (SNI) de $100 \cdot 10^3 \mu\text{g/l}$	13
b)	Solution étalon de travail $2 \cdot 10^3 \mu\text{g/l}$	14
c)	Solution tampon PBS 0,1 mol/l ; pH = 7,4.....	14
d)	Solution tampon PBS + gélatine 0,01 mol/l, pH 7,4.....	14
e)	Mélange de scintillation.....	14
f)	Suspension de charbon.....	14
5.3.4.	Matériel.....	14
5.4.	PROCÉDURE.....	15
5.5.	CALCULS.....	16
5.6.	POINTS DE CONTRÔLE ESSENTIELS.....	16
5.7.	INCERTITUDE DES MESURES.....	16
5.8.	LOQ, CC ALPHA ET CC BETA.....	16
5.9.	TEST DE CONFIRMATION.....	16
6.	MÉTHODE DE CONFIRMATION POUR LA DÉTECTION DES AMINOGLYCOSIDES DANS LE MUSCLE, LE FOIE ET LES REINS PAR CL-ESI-SM/SM.....	18
6.1.	PRINCIPE.....	18
6.2.	PORTÉE.....	18
6.3.	MATÉRIEL.....	19
6.3.1.	Échantillon de contrôle négatif.....	19
6.3.2.	Étalons de la matrice dopés avant extraction (PrEMS).....	19
6.3.3.	Étalons de la matrice dopés après extraction (PoEMS).....	19
6.3.4.	Blanc de réactifs (ou « blanc de procédure »).....	19
6.3.5.	Matières de référence.....	19
6.3.6.	Solvants.....	20
a)	Solution aqueuse de TCA à 5 % (p/v).....	20
b)	HFBA 0,2 mol/l.....	20
c)	HFBA 0,02 mol/l.....	20
d)	MeCN:HFBA 0,15 M (4:1, v/v).....	20

e)	Solution aqueuse de NaOH de 100 g/l	20
f)	Solution de HCl 0,2 mol/l.....	20
g)	Solution de NaOH (pH 8,5).....	20
h)	Phases mobiles	20
6.3.7.	Étalon et solutions standard	21
6.3.8.	Matériel.....	24
6.4.	CONTRÔLE DE L'ENVIRONNEMENT.....	25
6.5.	PRÉPARATION ET ANALYSE DES ÉCHANTILLONS.....	25
6.6.	QUALIFICATION DE LA PERFORMANCE.....	27
6.7.	CALCUL DES RESULTATS.....	27
7.	MÉTHODE DE DÉTERMINATION PAR CL-SM/SM DES RÉSIDUS DE BENZIMIDAZOLE DANS LES PRODUITS ANIMAUX.....	31
7.1.	PRINCIPE.....	31
7.2.	PORTÉE.....	31
7.3.	MATÉRIEL.....	31
7.3.1.	Solutions étalons	31
7.4.	PROCÉDURE	31
7.4.1.	Extraction et rinçage des tissus musculaires et hépatiques.....	31
7.4.2.	Extraction et rinçage des échantillons de lait.....	32
7.4.3.	Conditions de CLHP.....	32
7.4.4.	Paramètres de SM.....	33
7.4.5.	Évaluation des résultats	33
a)	Détermination qualitative.....	33
b)	Détermination quantitative.....	33
c)	Calcul	33
7.4.6.	Critères d'acceptabilité	34
8.	DÉTECTION DES RÉSIDUS D'ALBENDAZOLE DANS LA VIANDE.....	35
8.1.	PRINCIPE.....	35
8.2.	PORTÉE.....	35
8.3.	MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS	35
8.3.1.	Matériel.....	35
8.4.	PROCÉDURE	35
8.4.1.	Préparation/extraction et analyse des échantillons.....	35
8.4.2.	Évaluation des résultats	37
9.	MÉTHODE D'ANALYSE DES SULFAMIDES ET DES TÉTRACYCLINES DANS LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX SOLIDES/SEMI- SOLIDES ET AQUEUX PAR CL-SM/SM	38
9.1.	PRINCIPE.....	38
9.2.	PORTÉE.....	38
9.3.	PRODUITS	38
9.3.1.	Étalons/solutions étalons	38
9.3.2.	Matériel.....	39
9.4.	PROCÉDURE	39
9.4.1.	Préparation des échantillons	39
9.4.2.	Extraction et concentration	40
9.4.3.	Résumé de la préparation des échantillons.....	40

9.4.4.	Mesure	41
9.4.5.	Évaluation des résultats	41
9.4.6.	Critères d'acceptabilité	42
10.	DÉTERMINATION DES RÉSIDUS DE CHLORAMPHÉNICOL DANS LA VIANDE, LES BOYAUX ET LES HERBES PAR LA MÉTHODE ELISA.....	43
10.1.	PRINCIPE	43
10.2.	PORTÉE.....	43
10.3.	MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS	43
10.3.1.	Produits chimiques/réactifs.....	43
10.3.2.	Matériel.....	43
10.4.	PROCÉDURE	43
10.4.1.	Spécificité et sensibilité	43
10.4.2.	Traitement de l'échantillon.....	44
a)	Échantillons de tissus (viande/boyaux)	44
b)	Échantillon d'herbes.....	44
10.4.3.	Préparation des réactifs de la trousse ELISA.....	44
10.4.4.	Protocole d'essai	45
11.	DÉTERMINATION DES SULFAMIDES DANS LE MUSCLE DE POULET PAR LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	47
11.1.	PRINCIPE	47
11.2.	PORTÉE.....	47
11.3.	MATÉRIEL.....	47
11.3.1.	Produits chimiques/réactifs.....	47
11.3.2.	Matériel/articles en verre	47
11.3.3.	Solutions	47
11.4.	PROCÉDURE	48
11.4.1.	Préparation de l'échantillon de contrôle	48
11.4.2.	Extraction.....	48
11.5.	MESURE.....	49
11.5.1.	Application des échantillons	49
11.5.2.	Développement	49
11.5.3.	Dérivatisation	49
11.5.4.	Détection.....	49
11.5.5.	Calculs/évaluation	49
11.5.6.	Critères d'acceptation.....	49
12.	VALIDATION DES IMMUNODOSAGES	50
12.1.	INTRODUCTION	50
12.1.1.	Spécificité de la méthode.....	50
12.1.2.	Seuils de détection des tests.....	51
12.1.3.	Répétabilité	51
12.1.4.	Exactitude et récupération	52
12.1.5.	Stabilité de l'analyte.....	52
12.1.6.	Robustesse	53
12.1.7.	Critères d'acceptabilité	53

13.	VALIDATION DES MÉTHODES D'ANALYSE POUR LA DÉTECTION DE RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES	54
13.1.	PORTÉE.....	54
13.2.	PLAN DE VALIDATION	54
13.3.	VALIDATION PAR LA MATRICE ET L'ESPÈCE	54
	13.3.1. Spécificité/sélectivité.....	55
	13.3.2. CC α pour les substances interdites.....	55
	13.3.3. CC α pour les substances avec MRL.....	56
	13.3.4. CC β pour les substances interdites.....	56
	13.3.5. CC β pour les substances avec MRL.....	56
	13.3.6. Stabilité de l'analyte dans la solution.....	56
	13.3.7. Stabilité de l'analyte dans la matrice.....	57
	13.3.8. Stabilité de l'analyte dans l'extrait.....	57
13.4.	COURBE D'ÉTALONNAGE	57
13.5.	REPRODUCTIBILITÉ INTRA-LABORATOIRE.....	57
13.6.	VARIATION ENTRE ESSAIS ET INTRA-ESSAI	58
13.7.	RÉCUPÉRATION	58
13.8.	ROBUSTESSE	58
	RÉFÉRENCES.....	59
	LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES.....	60
	PERSONNES AYANT COLLABORÉ À LA RÉDACTION ET À L'EXAMEN.....	62

1. INTRODUCTION

1.1. CONTEXTE

Le présent manuel est le résultat du projet mixte FAO/AIEA de recherche coordonnée (PRC) intitulé « Élaboration de méthodes et de stratégies d'analyse radiométriques et connexes pour renforcer les programmes de surveillance des résidus de médicaments vétérinaires antibiotiques et antihelminthiques » mis en œuvre entre 2009 et 2014 pour appuyer la surveillance de certains médicaments antibiotiques et antihelminthiques dans des échantillons alimentaires et environnementaux afin de protéger la sécurité alimentaire des produits consommés.

La plupart des méthodes ont été élaborées et validées sur plusieurs résidus au cours de travaux de recherche puis appliquées dans des programmes nationaux d'étude des résidus dans certains pays. Étant donné que seuls 15 pays ont participé à ces travaux, on a pensé que des laboratoires d'autres États Membres pouvaient bénéficier des résultats du projet grâce à la diffusion de techniques transférables sous forme de procédures opérationnelles standard (POS) compilées dans un manuel. Bien qu'un certain nombre de techniques d'étude et de confirmation soient présentées dans la présente publication, celle-ci, compte tenu de l'étendue et de la diversité des besoins en matière de méthodes d'analyse dans le monde, ne couvre qu'un champ limité déterminé par les besoins recensés par les participants au PRC. Toutefois, ces besoins sont communs à de nombreux États Membres et l'on espère que ce manuel sera utile à de nombreux laboratoires d'essai.

1.2. OBJECTIF

Le présent manuel a pour objectif d'aider les laboratoires d'essais alimentaires et environnementaux principalement dans la surveillance et le contrôle réguliers des résidus de certains médicaments vétérinaires dans les produits d'origine animale, mais aussi dans certains échantillons environnementaux. Il peut aussi appuyer des activités de recherche pertinentes.

1.3. PORTÉE

La présente publication contient des méthodes d'analyse, sous forme de POS, destinées à détecter certains résidus de médicaments vétérinaires dans certains produits animaux et dans des échantillons environnementaux. Elle couvre un certain nombre de techniques chromatographiques et spectrométriques basées sur des anticorps, le radio-immunodosage, les radio-isotopes et la technique de compteur à scintillateur liquide. Ces méthodes ont été élaborées sur la base de certains besoins et questions de recherche présentés par 17 établissements qui ont participé au PRC susmentionné et ne couvrent donc pas un éventail très large. Les renseignements contenus dans le manuel sont également présentés dans une certaine mesure sous forme de guide informatif.

1.4. STRUCTURE

La partie préliminaire (et la plus longue) du manuel présente des POS de chromatographie et de spectrométrie pour l'analyse de résidus antihelminthiques tels que les benzimidazoles et les avermectines, de résidus antimicrobiens comme le chloramphénicol et le florfenicol, les tétracyclines, les aminoglycosides, les sulfonamides ainsi que les quinolones. Une POS ayant trait à une technique de radio-immunodosage pour les résidus de florfenicol et de ses amines

est également présentée dans la première partie. Le manuel se termine par deux protocoles de validation.

2. DÉTERMINATION DES RÉSIDUS DE BENZIMIDAZOLE ET D'IVERMECTINE DANS LE LAIT DE VACHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM

2.1. PRINCIPE

Cette technique est basée sur le principe QuEChERS (méthode rapide, facile, abordable, efficace, robuste et sûre) [1]. Elle comprend l'extraction d'une partie représentative de l'échantillon avec de l'acétonitrile (MeCN), suivie d'un relargage et d'une extraction en phase solide dispersive avec un mélange de sulfate de magnésium (MgSO₄) et d'un composé de C18. Après rinçage, une partie aliquote du surnageant est analysée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM).

2.2. PORTÉE

Cette méthode d'analyse permet de déterminer la présence et la concentration des résidus de sept benzimidazoles [albendazole (ABZ), thiabendazole (TBZ), albendazole-sulfoxyde (ABZ-SO), albendazole-sulfone (ABZ-SO₂), triclabendazole (TCB), triclabendazole-sulfoxyde (TCB-SO) et triclabendazole-sulfone (TCB-SO₂)] ainsi que de trois avermectines [abamectine (ABA), émamectine (EMA) et ivermectine (IVE)] dans le lait de vache à des niveaux de concentration de 5 à 500 ng/g.

2.3. MATIÈRES

Les réactifs et les produits chimiques nécessaires sont les suivants :

MeCN ; méthanol (MeOH) de qualité CLHP (chromatographie liquide haute performance) ; sorbant d'octadécylsilane C18 ; chlorure de sodium (NaCl) de pureté analytique ; acétate d'ammonium de pureté analytique ; acide formique de pureté analytique ; sorbant d'amine secondaire primaire (PSA) ; sulfate de magnésium anhydre.

2.3.1. Solutions étalons et solutions mères

Les solutions étalons nécessaires comprennent : ABZ 99,6 % et IVE 91,0 % de la société Pharmacopeia des États-Unis (USP) ; TBZ 98,3 %, ABA 94,4 %, EMA 96,5 % ; cyprodinil 99,5 % tous de Chem Service ; ABZ-SO ; ABZ-SO₂ ; TCB-SO et TCB-SO₂, tous de WITEGA ; TCB 99,0 % (Dr. Ehrenstorfer) ; et phosphate de triphényle 99,9 % (Supelco/Sigma Aldrich).

Les solutions et leur mode de préparation :

a) Solutions étalons mères (2 000 µg/ml)

Mettre 20 mg de chaque solution étalon dans une fiole jaugée de 10 ml et porter au volume avec du MeOH (pour l'EMA, l'IVE et l'ABA), du MeCN (pour le TCB, le TCB-SO et le TCB-SO₂) ou du diméthylformamide (pour l'ABZ, l'ABZ-SO et l'ABZ-SO₂). Conserver toutes les solutions étalons mères à -18 °C.

b) Solutions étalons intermédiaires (100 µg/ml)

Transférer 500 µl de chaque solution étalon mère (2 000 µg/ml) dans une fiole jaugée de 10 ml et porter au volume avec du MeCN.

c) Solutions étalons de travail (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml et 10 µg/ml)

Transférer 10 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl et 1 000 µl du mélange de solution étalon (100 µg/ml) dans cinq fioles jaugées de 10 ml et porter au volume avec du MeCN pour obtenir des mélanges de solutions étalons de travail de 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml et 10 µg/ml, respectivement.

d) Étalon interne (IS) : phosphate de triphényle (TPP) (0,1 µg/ml)

Utiliser le TPP comme IS pour le mode CL-SM/SM à ions positifs. Pour le préparer, mettre 10 mg de TPP dans une fiole jaugée de 10 ml et porter au volume avec du MeCN (1 000 µg/ml). Transférer 10 µl de cette solution dans une fiole jaugée de 10 ml et porter au volume avec du MeCN.

e) IS de cyprodinil (10 µg/ml)

Utiliser le cyprodinil comme étalon de contrôle de qualité (QC) pour surveiller la performance du système de CL-SM/SM. Pour le préparer, mettre 10 mg de cypronidil dans une fiole jaugée de 10 ml et porter au volume avec du MeCN (1 000 µg/ml). Transférer 100 µl de cette solution dans une fiole jaugée de 10 ml et porter au volume avec du MeCN.

2.3.2. Matériel

Le matériel ci-dessous est indiqué :

Centrifugeuse réfrigérée (Sigma, modèle 4K 15C) ; mélangeur vortex, Barnstead Thermolyne (modèle 37600) ; balance, sensibilité de 0,1 mg ; multi-agitateur Reax (Heidolph) ; fioles jaugées de classe A (10, 25 ml en verre transparent) ; tubes de centrifugation en polypropylène (50 ml) ; système de CL-SM/SM (un Waters Alliance 2695 couplé à un Quattro Premier XE de Waters Corporation, États-Unis).

2.4. PROCÉDURE

2.4.1. Extraction des échantillons

Les étapes de l'extraction sont les suivantes :

- a) Mettre 10 g d'échantillon de lait homogénéisé dans des tubes de centrifugation en éthylène propylène fluoré ; utiliser 10 ml d'eau distillée (H₂O) comme blanc de réactifs.
- b) Peser 20 g d'échantillon témoin de lait comme étalons de même matrice.
- c) Peser 10 g pour les solutions dopées de CQ. Ajouter 100 µl de mélange de solution étalon (10 µg/ml des sept benzimidazoles et des trois avermectines) pour obtenir 100 ngg⁻¹ de CQ et laisser au repos pendant 15 minutes (min).

- d) Ajouter 100 µl de solution d'IS de TPP (0,1 µg/ml) par 10 g (cela donne une concentration équivalente de 1 ng/g) à tous les tubes contenant l'échantillon, la solution dopée de QC, la matrice témoin et le blanc de réactifs.
- e) Ajouter 10 ml de MeCN à chaque tube.
- f) Ajouter 5 g de MgSO₄:NaCl [4:1, poids par poids (p/p)], secouer immédiatement les tubes pendant 1 min et centrifuger [pendant 5 min à 3 500 tours par minute (tpm)].
- g) Mettre 2 ml du surnageant dans un tube de 5 ml contenant du MgSO₄ (300 mg) et 100 mg de C18. Mélanger au vortex pendant 1 min et centrifuger à 3 000 tr/min pendant 2 min.
- h) Mettre une partie aliquote du surnageant (1 ml) dans un flacon d'autoéchantillonneur contenant 10 µl de solution de cyprodinil.
- i) Injecter 10 µl de la solution finale dans le système de CL-SM/SM.

2.4.2. Calibration avec des étalons de même matrice

Pour préparer une courbe de calibration avec des étalons de même matrice, mettre 1 ml de l'extrait d'échantillon dans chaque flacon d'autoéchantillonneur. Ajouter à chaque flacon 25 µl des solutions d'étalons de travail de 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml et 10 µg/ml, ce qui correspond à des concentrations de 5 µg/kg, 50 µg/kg, 100 µg/kg, 250 µg/kg et 500 µg/kg, respectivement. Ajouter 10 µl de cypronidil (100 µg/kg) à chacun des cinq flacons.

2.4.3. Conditions de chromatographie

a) Validité du système

Pour évaluer la validité du système, injecter au moins cinq répétitions d'un étalon intermédiaire utilisé pour la courbe d'étalonnage. L'écart-type relatif (RSD) de la réponse maximale et du temps de rétention ne devrait pas dépasser 5 %.

b) Conditions déterminantes

Comme indiqué au tableau 1, effectuer la séparation en phase inverse des analytes à l'aide d'une colonne XTerra MS C18 (150 mm x 2,1 mm ID, particules 5 µm) maintenue à 20 °C.

Les conditions finales de la phase mobile sont : A) acide formique aqueux 0,1 % et B) MeCN comme éluant par gradient (0,3 ml/min) utilisés avec un état initial de 98:2 [A:B volume par volume (v/v)] et la concentration organique est augmentée à 100 % en 5 min ; maintenir pendant 10,5 min avant de retourner à l'état initial.

Équilibrer le système de CL pendant au moins 30 min avec la phase mobile A : phase mobile (2 % : 98 %, v/v) figurant au tableau 2 avant d'analyser les échantillons.

TABLEAU 1. RÉSUMÉ DES CONDITIONS DE CHROMATOGRAPHIE

Colonne chromatographique	Phase inverse, C18, 150 mm x 2,1 mm, 3,5 µm
Phase mobile	Phase mobile A : phase mobile B (2:98, v/v)
Condition de flux	Gradient
Débit	0,2 ml/min
Volume d'injection	10 µl
Température	25 °C

TABLE 2. GRADIENT DE LA PHASE MOBILE

Durée (min)	A	B	Flux (ml/min)	Courbe
0	2	98	0,30	1
5	100	0	0,30	6
10,00	0,0	100,0	0,30	1
15,00	98	2	0,30	1

2.4.4. Spectrométrie de masse (SM)

Ici, les analyses de SM sont effectuées par électronébulisation en mode d'ionisation ESI+ à la pression atmosphérique à un débit de 0,3 ml/min. Utiliser de l'azote gazeux pour la désolvatation à 350 °C et de l'argon pour la collision.

Régler la température de la source et la tension de pulvérisation ionique à 120 °C et 650 V, respectivement. Utiliser un couplage de SM pour la surveillance de réactions multiples (MRM) avec une durée de séjour de 100 à 200 millisecondes (msec) pour détecter les analytes. Régler les gaz du cône et de désolation à 50 et 800 l/h respectivement.

L'acquisition de SM se fait en deux périodes de temps (0 à 7,5 min et 6,5 à 14 min). Les conditions de SM sont optimisées en ajustant les paramètres spécifiques de l'analyte, l'énergie de collision et le potentiel de sortie de la cellule de collision pour chaque analyte. Optimiser en infusant 1 µg/ml de la solution étalon de chaque analyte et surveiller les deux ions-fragments les plus abondants produits à partir de l'ion moléculaire (tableau 3).

TABLEAU 3. IONS SURVEILLÉS ET PARAMÈTRES DE SM OPTIMISÉS POUR CHAQUE ANALYTE

N°	Analyte	Transition SM/SM Pointe de base (1) Deuxième pointe (2)		Tension du cône (V)	Énergie de collision (eV)	Temps de séjour (sec)	Fonction
1	TBZ	202,1>175,1	(1)	50	30	0,20	I
		202,1>131,1	(2)	50	28		
2	ABZ	266,2>234,2	(1)	40	15	0,20	I
		266,2>191,1		40	30		
3	ABZ-SO ₂	298,1>265,9	(2)	40	28	0,20	I
		298,1>159,1		40	15		
4	ABZ-SO	282,1>239,9	(1)	40	28	0,20	I
		282,1>208		40	15		
5	TCB	359>274,1	(2)	50	25	0,20	II
		359>344,1		50	28		
6	TCB-SO ₂	391>242,3	(1)	50	40	0,10	II
7	TCB-SO ₂	375>242,2	(2)	30	45	0,10	II
8	EMA	886,5>158,1	(1)	50	30	0,10	I
		886,5>126		50	15	0,10	
9	ABA	891>305,1	(2)	50	30	0,10	II
		891>567,2		50	12	0,10	
10	IVE	892,5>569,2	(1)	50	30	0,10	II
		892,5>307,1		50	12	0,10	
11	Phosphate de triphényle	327>77	(2)	25	20	0,20	II
12	Cyprodinil	226>108	(1)	40	25	0,20	II

3. DÉTERMINATION DES RÉSIDUS DE BENZIMIDAZOLE ET D'IVERMECTINE DANS LE LAIT DE VACHE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE AVEC DÉTECTEUR DE FLUORESCENCE

3.1. PRINCIPE

Cette méthode met en jeu l'extraction d'échantillons avec des solvants organiques, le rinçage par extraction en phase solide (SPE) et la dérivation avant analyse par CLHP.

3.2. PORTÉE

Le procédé comprend la détermination des résidus de cinq avermectines [émamectine (EMA), ivermectine (IVE), éprinomectine (EPRI), doramectine (DORA)] et abamectine (ABA) dans le lait de vache à des niveaux de 0,5 à 100 ng/g.

3.3. MATIÈRES

Les réactifs et les produits chimiques suivants sont nécessaires : MeCN de qualité CLHP, MeOH et H₂O ; cartouches de C18 (Sep-Pak[®] Vac 6 cc, 500 mg) ; triéthylamine ≥ 99 % ; 1-méthylimidazole ≥ 99% ; anhydride trifluoroacétique - réactif plus ≥ 99 %. ABA 95 % et EMA 96 % (Chem Service) ; IVE 91,0 % et EPRI 91 %, USP ; DORA 96 % (Dr. Ehrenstorfer).

3.3.1. Étalons et solutions

a) Solutions étalons mères (2 000 µg/ml)

- Mettre 20 mg de chaque étalon d'analyse dans une fiole jaugée de 10 ml et remplir au volume avec du MeOH (pour l'EMA, l'IVE, l'EPRI et la DORA) et du MeCN (pour l'ABA).
- Conserver toutes les solutions étalons à -20 °C.

b) Mélange de solution étalon (50 µg/ml)

Mettre 250 µl de chaque solution étalon (2 000 µg/ml) dans une fiole jaugée de 10 ml et remplir au volume avec du MeCN.

c) Mélange de solution étalon (250 ng/ml)

Mettre 50 µl de mélange de solution étalon (50 µg/ml) dans une fiole jaugée de 10 ml et remplir au volume avec du MeCN.

d) Solution étalon de travail

- Mettre 5 µl, 10 µl, 50 µl, 100 µl, 300 µl et 600 µl de mélange de solution étalon (250 ng/ml) dans six fioles jaugées de 10 ml et remplir au volume avec du MeCN pour obtenir des mélanges de solution étalon de travail de 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml et 60 ng/ml, respectivement.
- Le tableau 4 ci-dessous résume le processus de préparation des solutions étalons.

TABLEAU 4. PRÉPARATION DES SOLUTIONS ÉTALONS D'ANALYSE

Niveau	Vol. (µl) du mélange de solution étalon (250 ng/ml)	Volume final	Concentration de la solution étalon (ng/µl)	Milieu de dilution
1	5	2,5	0,5	MeCN
2	10	2,5	1	MeCN
3	50	2,5	5	MeCN
4	100	2,5	10	MeCN
5	300	2,5	30	MeCN
6	600	2,5	60	MeCN

e) Échantillons enrichis

Ajouter 10 µl, 20 µl et 500 µl de mélange de solution étalon à un échantillon de 2,5 g dans un tube à essais, laisser reposer tout en poursuivant la procédure d'extraction de l'échantillon.

3.3.2. Matériel

Le matériel suivant est requis pour le test : centrifugeuse réfrigérée (Sigma, modèle 4K 15 C) ; mélangeur vortex, Barnstead Thermolyne (Modèle 37600) ; balance, sensibilité de 0,1 mg ; multi-agitateur Reax (Heidolph) ; fioles jaugées de classe A : 10, 25 ml en verre clair ; tubes de centrifugation en polypropylène (50 ml). Il faut également un système de CL-DFL : Waters Alliance 2695 couplé à un détecteur de fluorescence (DFL, Waters Corporation, États-Unis).

3.4. PROCÉDURE

3.4.1. Extraction de l'échantillon

- Mettre un échantillon de 2,5 g de lait dans un tube de centrifugation de 50 ml.
- Ajouter 10 ml de MeCN pour la première extraction, mélanger au vortex pendant 30 secondes et centrifuger à 2 500 tr/min pendant 3 min. Transférer le surnageant dans un autre tube de centrifugation de 50 ml.
- Extraire à nouveau avec 5 ml de MeCN. Combiner l'extrait et mélanger avec 20 ml de H₂O et 40 µl de triéthylamine.
- Rincer l'extrait avec une cartouche SPE C18 conditionnée avec 5 ml de MeCN puis 5 ml de MeCN:H₂O (40:60, v/v) contenant 0,1 % de triéthylamine ; passer sous vide pendant 5 min.
- Laver la cartouche avec 3 ml d'hexane et passer sous vide pendant 5 min. Éluer le résidu avec 10 ml de MeCN dans un flacon de couleur ambrée de 12,5 ml. Évaporer l'éluat à sec sous azote à 600 °C.

3.4.2. Dérivatisation

- Dissoudre le résidu dans 1 ml de MeCN, le mettre dans un bain ultra-sonique pendant 20 min puis ajouter 100 µl de N-méthylimidazole et 100 µl d'anhydride trifluoroacétique.

- b) Laisser reposer l'échantillon en le protégeant de la lumière pendant 35 min avant de transférer une partie aliquote dans un flacon d'autoéchantillonneur et d'injecter dans la CLHP-DFL.

3.4.3. Conditions de chromatographie

- a) Validité du système et conditions déterminantes

Pour évaluer la validité du système, injecter au moins cinq répétitions d'un étalon intermédiaire utilisé pour la courbe d'étalonnage. L'écart-type relatif (RSD) de la réponse maximale et du temps de rétention (TR) ne doit pas dépasser 5 %. Exécuter la CLHP dans les conditions résumées dans le tableau 5 ci-dessous.

TABLEAU 5. CONDITIONS DE CHROMATOGRAPHIE

Colonne de chromatographie :	Phase inverse C18, 4,6 x 150 mm, 3,5 µm
Phase mobile :	MeOH:H ₂ O (97:3, v/v),
Type de flux de la phase mobile :	Isocratique
Debit :	1 ml/min
Volume d'injection :	50 µl
Température (échantillon) :	25 °C
Température (colonne) :	30 °C
Temps de lecture :	9 min
Détecteur :	DFL 2475
Longueur d'onde d'excitation :	365 nm
Longueur d'onde d'émission :	465 nm

4. DÉTERMINATION DU FLORFENICOL DANS LA CHAIR DE POISSON PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

4.1. PRINCIPE

Le florfenicol (FFC) est un antimicrobien à large spectre utilisé pour traiter les maladies bactériennes chez le poisson et le seuil maximum de résidus recommandé (MRL) correspondant dans la chair de poisson est de 1000 µg/kg. [2] Les échantillons sont extraits dans de l'acétate d'éthyle, rincés par SPE et analysés par CLHP avec un détecteur ultraviolet (UV).

4.2. PORTÉE

Cette méthode est appropriée pour l'analyse du FFC dans la chair de poisson au seuil de quantification (LOQ) de 500 µg/kg.

4.3. MATIÈRES

Les consommables suivants sont requis :

Étalon d'analyse du FFC ; acétonitrile (MeCN) (*), méthanol (MeOH) (*), hexane (*), eau ultra-pure (H₂O) ; acétate d'éthyle, tous de qualité de CLHP.

(*) Les solvants utilisés dans le processus de rinçage devraient être de qualité analytique ou chromatographique (CLHP) avec un haut degré de pureté. Si un solvant ne répond pas à ces spécifications, il doit être filtré à l'aide de filtres à membrane de 0,45 µm (au moins). Solution étalon primaire (SNI) – solution de FFC, 100.10³ µg/l ; solution étalon secondaire (SNII) – solution de FFC.

4.3.1. Étalons et solutions

- a) Solution étalon mère de FCF (SNI) de $100.10^3 \mu\text{g/l}$
- Mettre très exactement 10,0 mg ($\pm 0,1$ mg) de FFC dans une fiole jaugée de 100 ml et les dissoudre dans environ 80 ml de MeCN de qualité CLHP.
 - Agiter et après dissolution complète, compléter jusqu'à 100 ml avec du MeCN.
 - La stabilité de cette solution est de 3 mois au congélateur.
- b) Solution étalon de travail de $10.10^3 \mu\text{g/l}$
- Mettre, à l'aide d'une pipette, 5 ml de SNI de FFC dans un ballon de 50 ml, remplir jusqu'à la marque avec du MeCN et mélanger soigneusement.
 - La stabilité de cette solution est de sept jours au réfrigérateur.
 - Conserver dans l'obscurité.
- c) MeOH:H₂O (10:90, v/v)

Mélanger 9 ml de H₂O et 1 ml de MeOH dans un tube de 10 ml.

4.3.2. Matériel

Le matériel requis se présente comme suit :

Mélangeur vortex ; pipette Pasteur ; système d'évaporation ; tubes coniques en plastique de 15 ml ; ballon ; bain-marie ; cartouches SPE (C-18 ; liquide de rinçage, 500 mg/3 ml) ; distributeur à vide ; CLHP-UV ; micropipette ; distributeur ; seringues jetables de 3 ml ; flacons avec tubes internes ; balance de précision (0,0001 g) ; béchers ; unité de filtrage de 0,45 μm .

4.4. PROCÉDURE

- a) Mettre 5,0 g ($\pm 0,009$) d'échantillon broyé dans des tubes coniques en plastique de 50 ml.
- b) Mettre six portions de 5,0 g ($\pm 0,009$) d'échantillon témoin de tissus broyé dans des tubes en plastique coniques de 50 ml avant de transférer au laboratoire pour analyse.
- c) Préparer la courbe d'étalonnage de la matrice :
- i) Enrichir ces échantillons avec 10 $\mu\text{g/m}$ de SNII conformément aux concentrations indiquées au tableau 6.
 - ii) Utiliser les échantillons restants comme témoins. À l'aide d'un distributeur, ajouter 10 ml d'acétate d'éthyle aux échantillons pesés mis dans les tubes à essais.
- d) Mélanger au vortex pendant 1 min.
- e) Centrifuger à 2 000 tr/min pendant 5 min.
- f) Transférer le surnageant dans un autre tube en plastique de 15 ml.

- g) Évaporer le surnageant à l'aide d'azote, dans un bain-marie à 50-55 °C jusqu'à ce qu'il reste un résidu huileux.
- h) Ajouter 2 ml d'hexane au tube contenant l'extrait pour éliminer la graisse.
- i) Mélanger au vortex pendant 15 secondes.
- j) Ajouter 5 ml d'eau au tube et secouer 30 secondes.
- k) Centrifuger à 2 000 tr/min pendant 5 min ; enlever la couche supérieure (hexane) et, si nécessaire, répéter cette étape pour éliminer la graisse.
- l) Évaporer tout hexane restant sous azote dans un bain-marie à 50-55 °C pendant 2 min.
- m) Démarrer la SPE comme suit :
 - i) Préparer le distributeur à vide avec le nombre de cartouches de SPE (C18 ; 500 mg/3 ml) nécessaire.
 - ii) Conditionner les cartouches avec 5,0 ml d'acétate d'éthyle, 10 ml de MeOH et 10 ml de H₂O.
 - iii) Charger les échantillons dans les cartouches d'extraction ; transférer les échantillons contenus dans les tubes dans les cartouches, laver les tubes avec 3 ml de H₂O et les transférer dans le réservoir ; élué l'échantillon et laisser les cartouches sécher.
 - iv) Rinçage de l'échantillon : ajouter 10 ml de MeOH:H₂O (1:9, v/v), puis ajouter 10 ml de H₂O.
 - v) Élué des échantillons : mettre les cartouches sur les tubes coniques en plastique de 15 ml pour recueillir l'échantillon élué. Élué les échantillons ; ajouter 5,0 ml d'acétate d'éthyle aux cartouches et les sécher.
- n) Retirer les cartouches de C-18 et évaporer la solution dans le tube (étape m) jusqu'à siccité sous azote dans un bain-marie à 50-55 °C.
- o) Ajouter 1 ml de MeCN:H₂O (40:60, v/v) au résidu et bien mélanger.
- p) Presser le contenu (étape o) à travers un filtre de 0,45 µm dans un flacon de CLHP.
- q) Injecter l'échantillon dans la CLHP pour l'analyse dans les conditions de chromatographie décrites au tableau 7.

TABLEAU 6. PROCÉDURE D'ENRICHISSEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Concentration de l'étalon µg/kg	Vol. (µl) de concentration de la SNII de 1000 µg/kg	Masse (µg) ajoutée à l'échantillon de 5,0 g
250	125	125.10 ³
500	250	250.10 ³
1 000	500	500.10 ³
1 500	750	750.10 ³
2 000	1 000	1 000.10 ³

TABLEAU 7. CONDITIONS DE CHROMATOGRAPHIE

Paramètres de chromatographie	
Détecteur :	UV
Colonne :	C-18 250 × 4,6 mm, 5 µm
Méthode :	FFC-UV
Température de la colonne :	50 °C
Longueur d'onde (λ) :	230 nm
Phase mobile :	H ₂ O:MeCN (60:40, v/v)
Durée du processus :	6 min
Volume injecté :	20 µl
Débit :	1 ml/min
Temps de retention :	FFC 4,5 min

4.5. CONTRÔLE ESSENTIEL

Il convient de noter ce qui suit :

- a) La colonne analytique est conditionnée pour jusqu'à 1 h 30 min avant l'injection et l'analyse de l'échantillon.
- b) Après chaque dosage, la colonne doit être lavée avec du MeOH à faible débit (environ 0,1-0,2 ml/min) pendant au moins 4 h.

4.6. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les écarts de valeurs du tableau 8 sont recommandés pour l'acceptabilité de la méthode.

TABLEAU 8. NIVEAUX D'ENRICHISSEMENT ET INTERVALLES DE RÉCUPÉRATION ACCEPTABLES

Concentration enrichie (µg/kg)	Intervalle de récupération
Moins de 1	50 à 120 %
1 à 10	70 à 110 %
Plus de 10	80 à 110 %

4.7. INCERTITUDE DE MESURE

L'incertitude élargie estimée de mesure devrait être de 5,4 %.

4.8. LOQ

La LOQ de la méthode pour le FFC en ce qui concerne le poisson est de 500 µg/kg.

4.9. CC ALPHA ET CC BETA

- CC α pour le FFC en ce qui concerne le poisson est de 840 µg/kg.
- CC β est de 879 µg/kg.

4.10. RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE DE PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- a) Mettre 5,0 g d'échantillon dans un tube à essais de 50 ml.
- b) Tracer une courbe ajustée à la matrice en utilisant des concentrations standard de 250 µg/kg, 500 µg/kg, 1000 µg/kg, 1500 µg/kg, 2000 µg/kg.
- c) Ajouter 10 ml d'acétate d'éthyle et mélanger au vortex pendant 1 min.
- d) Centrifuger à 2 000 tr/min pendant 5 min.
- e) Transférer le surnageant dans un tube à essais propre de 15 ml.
- f) Évaporer le surnageant sous azote dans un bain-marie à 50-55 °C.
- g) Ajouter 2 ml d'hexane au tube contenant l'extrait et secouer pendant 15 secondes.
- h) Ajouter 5 ml de H₂O désionisé et agiter pendant 30 secondes.
- i) Centrifuger à 2 000 tr/min pendant 5 min.
- j) Éliminer la couche supérieure (hexane).
- k) Évaporer l'hexane résiduel grâce à un courant d'azote à l'aide d'un bain-marie à 50-55 °C pendant 2 min.
- l) Conditionner la colonne SPE avec 5 ml d'acétate d'éthyle, 10 ml de MeOH et 10 ml de H₂O désionisé.
- m) Transférer le contenu du tube de 15 ml (étape e) dans un réservoir dans la chambre de purification SPE.
- n) Rincer le tube d'échantillon avec 3 ml de H₂O et transférer le contenu dans le réservoir.
- o) Éluer l'échantillon à un débit de 2-3 gouttes par seconde.
- p) Ajouter 10 ml de MeOH:H₂O (1:9, v/v) au réservoir et éluer la colonne SPE.
- q) Laver la colonne avec 10 ml de H₂O.
- r) Sécher la colonne pendant 1 min.
- s) Utiliser des tubes de 15 ml propres pour recueillir l'échantillon élué.
- t) Éluer l'échantillon avec 5 ml d'acétate d'éthyle au débit de 1 à 2 gouttes par seconde.
- u) Retirer la colonne SPE et sécher les échantillons sous azote dans un bain-marie à 50-55 °C.
- v) Reconstituer le résidu avec 1,0 ml de MeCN:H₂O (40:60, v/v) et mélanger au vortex pendant 1 min.
- w) Filtrer le résidu reconstitué avec une membrane de 0,45 µm en polytétrafluoroéthylène (PTFE) dans un flacon avant d'injecter dans la CLHP-UV.

5. DÉTERMINATION DU FLORFENICOL ET DU FLORFENICOL-AMINE DANS LA CHAIR DE POISSON PAR RADIO-IMMUNODOSAGE ET CONFIRMATION PAR CL-SM/SM

5.1. PRINCIPE

Le florfénicol (FFC) est couramment utilisé pour traiter les maladies bactériennes chez le poisson mais ses résidus ne doivent pas dépasser le MRL de 1 000 µg/kg dans la chair de poisson [2]. Les échantillons sont extraits dans de l'acétate d'éthyle, rincés par SPE et analysés par CLHP-UV pour établir une procédure de détermination par radio-immunodosage (RIA) avec confirmation des résultats suspects par CL-SM/SM.

5.2. PORTÉE

La méthode est appropriée pour détecter les résidus de FFC dans la chair de poisson afin de respecter le MRL permis/acceptable de 1 000 µg/kg.

5.3. MATIÈRES

Les consommables suivants sont requis :

5.3.1. Étalons

Solution étalon primaire (SNI) ; FFC et florfénicol-amine (FFA), $100.10^3 \mu\text{g l}^{-1}$; solution étalon secondaire (SNII) - FFC et FFA, $2,103 \mu\text{g l}^{-1}$.

5.3.2. Réactifs

KH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ; NaCl ; gélatine physiologique ; 2,5-diphényloxazole (PPO), 1,4-bis (5-phényl-2-oxazolyl) benzène (POPOP) ; charbon activé ; dextran (T-70) ; toluène ; triton X-100 ; azoture de sodium NaN_3 ; tampon phosphate salin (PBS). Autres réactifs : acétone ^(*) ; dichlorométhane ^(*) ; hexane ^(*) ; H_2O désionisé ; MeOH ^(*) ; toluène ; triton X-100.

- ^(*) Les solvants utilisés pendant le processus de rinçage devraient être de qualité analytique ou CLHP. Tous les solvants utilisés avec l'équipement (CLHP), doivent être des solvants de chromatographie ou de meilleure qualité.
- Si un solvant ne répond pas aux spécifications, il devrait être filtré avec une membrane d'environ 0,45 µm.

5.3.3. Solutions étalons

a) Solution étalon mère de FFC (SNI) de $100.10^3 \mu\text{g/l}$

- Mettre très exactement 10,0 mg ($\pm 0,1$ mg) de FFC dans un ballon de 100 ml en corrigeant la masse réelle en fonction de la pureté de la solution étalon.

- Les dissoudre dans environ 80 ml de MeOH de qualité CLHP, agiter et après dissolution complète, porter la solution à la marque de 100 ml.
 - La période de péremption est d'un an si la solution est conservée au congélateur.
- b) Solution étalon de travail $2.10^3 \mu\text{g/l}$
- Prélever 2 ml de solution de SNI à l'aide d'une pipette, les mettre dans une fiole jaugée de 100 ml et porter à la marque avec du MeOH.
 - Bien mélanger.
 - La période de péremption de la solution est d'un an si elle est conservée au congélateur.
- c) Solution tampon PBS 0,1 mol/l ; pH = 7,4
- Peser 13,609 g de KH_2PO_4 , 14,196 g de Na_2HPO_4 , 5,844 g de NaCl et 6,501 g d'azoture de sodium NaN_3 et dissoudre le tout dans 800 ml de H_2O avant d'ajuster le pH.
 - Transférer le mélange dans une fiole jaugée de 1 000 ml et remplir à la marque avec du H_2O désionisé.
 - La période de péremption de la solution est de 12 mois si elle est conservée au réfrigérateur.
- d) Solution tampon PBS + gélatine 0,01 mol/l, pH 7,4
- Dissoudre 1,0 g de gélatine physiologique dans 800 ml de H_2O .
 - Transférer dans une fiole jaugée de 1 000 ml et ajouter environ 100 ml de PBS 0,1 mol/l ajusté à pH = 7,4.
 - Ajuster le volume avec de H_2O désionisé.
 - La période de péremption de la solution est de 12 mois si elle est conservée au réfrigérateur.
- e) Mélange de scintillation
- Peser 4,9 g de PPO et 0,1 g de POPOP.
 - Les dissoudre dans 666 ml de toluène.
 - Après dissolution complète, ajouter 333 ml de triton et mélanger.
- f) Suspension de charbon
- Dissoudre 0,5 g de charbon actif et 0,05 g de dextran T-70 dans 100 ml de tampon PBS + gélatine 0,01 mol/l à pH = 7,4.
 - Préparer ce mélange chaque jour.

5.3.4. Matériel

Matériel requis : agitateur (vortex) ; micropipette ; pipette Pasteur ; distributeur ; système d'évaporation ; seringues jetables de 3 ml ; tubes coniques en plastique de 15 et 50 ml ;

flacons de scintillation avec tubes ; ballon ; balance de précision (précision de 0,0001 g), bain-marie ; bouchons ; compteur de scintillation liquide ; tubes RIA ; tubes à essais.

5.4. PROCÉDURE

- a) Mettre 5,0 g (\pm 0,001 g) d'échantillon broyé dans des tubes coniques en plastique de 50 ml.
- b) Mettre six portions de 5,0 g (\pm 0,001 g) d'échantillon témoin (échantillons sans l'analyte en question) dans des tubes coniques en plastique de 50 ml. Enrichir les échantillons comme indiqué au tableau 9, ce qui représente $2 \times$ MRL, $1 \times$ MRL et $0,5 \times$ MRL en utilisant des solutions SNI.
- c) Préparer la courbe d'étalonnage en utilisant les plages de concentration indiquées au tableau 10.
- d) Enrichir les échantillons avec des parties aliquotes de la solution étalon de travail à ce stade ; ajouter 2 ml de H₂O désionisé au tube.
- e) Ajouter 8 ml d'acétone et homogénéiser le contenu.
- f) Centrifuger à 1 500 tr/min pendant 10 min. Ajuster le volume final du surnageant combiné, ajouter 20 ml d'acétone et décanter le surnageant dans un tube.
- g) Bien mélanger le surnageant, en transférer 8 ml dans un tube à vis et ajouter 6 ml de dichlorométhane.
- h) Fermer le tube et mélanger le contenu (5 secondes) à l'aide d'un mélangeur vortex.
- i) Centrifuger pendant 5 min à 1 000 tr/min pour séparer les couches.
- j) Aspirer et jeter la couche aqueuse supérieure et évaporer la couche inférieure de dichlorométhane jusqu'à siccité avec de l'azote (température maximale 45 °C). Toute graisse présente devrait être éliminée avec du dichlorométhane.
- k) Dissoudre le résidu dans 1,0 ml d'une solution d'acide acétique à 0,001 % et extraire avec 2 ml d'hexane.
- l) Centrifuger à 1 000 tr/min pendant 5 min pour séparer les couches ; aspirer et jeter la couche supérieure d'hexane.
- m) Mesurer 250 μ l de la solution et porter à 500 μ l avec un tampon physiologique.
- n) Effectuer un test de RIA.
- o) Préparer les points d'étalonnage à une plage de concentration finale de 250 μ g/kg à 2 000 μ g/kg à l'aide d'un tampon physiologique (pH = 7,4).
- p) Ajouter 5 000 à 8 000 coups par minute (cpm) de FFC marqué au tritium.
- q) Ajouter 100 μ l d'antisérum dilué à 1:2500 à chaque tube.
- r) Incuber pendant 15 min à 37 °C, puis toute la nuit à 4 °C.
- s) Ajouter 1 ml de charbon actif (0,5 %) et de dextran (0,05 %)
- t) Laisser reposer le mélange pendant 10 min à 4 °C.
- u) Centrifuger à 10 000 tr/min.
- v) Enlever la couche aqueuse.
- w) Ajouter 5 ml de cocktail de scintillation liquide.
- x) Lire les résultats pendant 4 min à l'aide d'un compteur à scintillateur liquide.

TABLEAU 9. CONCENTRATION ENRICHIE ET VOLUME

Concentration finale ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Vol (μl) de la SNI
500	25
1 000	50
2 000	100

TABLEAU 10. PRÉPARATION DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE

Concentration de l'échantillon ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Vol. (μl) de la SNII	Vol. du tampon phosphate salin
250	1 000	1 000
375	1 000	1 000
500	1 000	1 000
750	1 000	1 000
1 000	1 000	1 000
1 500	1 500	500
2 000	2 000	-

5.5. CALCULS

Étant donné que le volume final de la procédure d'analyse est de 250 μl , représentant 1 g de tissu, aucun autre calcul n'est nécessaire.

5.6. POINTS DE CONTRÔLE ESSENTIELS

Il est important de noter les points essentiels suivants :

- La température d'évaporation devrait être de $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- La température de pré-incubation de l'étape de RIA devrait être de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Le pH du tampon physiologique devrait être de $7,4 \pm 0,1$.
- La température de conservation des étalons ainsi que des solutions devrait être de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $9\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- L'extrait d'échantillon sera stable pendant environ deux jours au congélateur.

5.7. INCERTITUDE DES MESURES

Les niveaux d'incertitude élargis pour le FFC et le FFA sont respectivement de 5,9 % et 10,2 %.

5.8. LOQ, CC ALPHA ET CC BETA

Le seuil de quantification pour le FFC et le FFA en ce qui concerne le poisson est de $250\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$, tandis que les valeurs de $\text{CC}\alpha$ et de $\text{CC}\beta$ pour les deux analytes sont respectivement de $100\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ et $250\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$.

5.9. TEST DE CONFIRMATION

Les résultats du RIA qui semblent positifs peuvent être confirmés à l'aide de la technique de CL-SM/SM après rinçage.

Conditions de CL-SM/SM requises pour l'analyse du FFA :

a. Composante de CL

- HypersilTM C18-BD, 5 μm , 15 cm x 2,0 mm id, colonne en phase inverse.
- La phase mobile consistant en une solution de H₂O désionisé plus une solution d'acide acétique à 0,1 % (solvant A) ; du MeCN plus une solution d'acide acétique à 0,1 % (solvant B).
- Équilibrer le système de CL pendant 30 minutes à une température de la colonne/du four de 40 °C avec 100 % de solvant A au débit de 0,3 ml/min.
- Construire le gradient linéaire comme suit : 2 % de solvant B pendant 2 min ; à 40 % de solvant B en 11 min ; maintenir pendant 2 min ; à 100% de solvant B en 2 min tout en augmentant le débit à 0,4 ml/min ; à 2 % de solvant B en 2 min tout en réduisant le débit à 0,3 ml/min ; équilibrer pendant 11 min.

b. Paramètres de SM :

Source d'ions : ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) en mode positif ; effet couronne = 2 μA ; cône = 25 V ; extracteur = 5 V ; RF lentille = 0,2 V ; température de la source = 130 °C ; sonde de température APCI = 500 °C ; débit du gaz de désolvation 300 l/h ; débit du gaz de cône = 100 l/h. Transitions (de la masse à la charge, m/z) pour le FFA : m/z 248-230 ; m/z 248-197 ; m/z, 248-151 ; m/z, 248-130.

Retard intercanal, 0,3 s ; span (Dalton, Da), 0,1 ; mode ionique FFA ES+, masse de 248,2, durée de séjour de 0,3 ; FFC masse ionique ES-masse 356,1 ; source ES+ 0,3 capillaire, 3,5 kV ; cône, 25,0 V ; extracteur, 1,0 V ; RF lentille, 0,5 V ; température de source, 100 °C ; source ES-: capillaire, 2,5 kV ; cône, 20,0 V ; extracteur, 5,0 V ; Lentille RF, 0,5 V ; Température de la source, 100 °C. Autres conditions de la SM : température de désolvation, 400 °C ; débit de gaz conique, 60 l/h ; débit de désolvation 400 l/h ; durée de centrifugation, 30 min.

Les conditions de CL-SM/SM pour le FFC ci-dessous sont identiques à celles indiquées par ailleurs et notamment [3] :

- a. CLHP : Zorbax 5 mm, C18 (150 x 2,1 mm) ; phase mobile (mode isocratique) composée de MeCN:H₂O:formiate d'ammonium à un débit de 0,2 ml/min de débit ; température du four de 50 °C ; volume d'injection : 10 ml.
- b. SM : ionisation - ESI + ; gaz de dessiccation - Ar (520 l/h, 250 °C) ; tension maximum 3 000 V ; gaz de collision N₂ 25 l/h ; durée de séjour de 0,2 s ; tension du cône (V) de 45 pour m/z 355 > 336,0 (ion de qualification) et 355,8 > 185,0 ions de transition, dont les énergies de collision sont respectivement de 39 et 50 V.

6. MÉTHODE DE CONFIRMATION POUR LA DÉTECTION DES AMINOGLYCOSIDES DANS LE MUSCLE, LE FOIE ET LES REINS PAR CL-ESI-SM/SM

6.1. PRINCIPE

Les résidus des aminoglycosides (AG), souvent des antibiotiques à large spectre, sont extraits des échantillons à l'aide d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique (TCA). Les extraits sont passés à travers des cartouches SPE par la balance-hydrophile-lipophile (HLB) et analysées par CL-ESI-SM/SM.

6.2. PORTÉE

Cette méthode est appropriée pour la confirmation et la quantification des analytes suivants figurant dans le tableau 11.

TABLEAU 11. RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS DÉTECTABLES À L'AIDE DE CETTE MÉTHODE

Médicament	Résidus marqueurs	Matrice	Espèce	CC α (μ g/kg)	CC β (μ g/kg)	MRL/ Niveau indicatif – substances sans MRL (μ g/kg)
Amino-glycosides	Apramycine	Muscle	Porc	63,2	65,8	60
	Kanamycine			44,7	49,0	40
	Gentamicine C1			54,0	59,2	50
	Gentamicine C2			54,9	59,7	50
	Gentamicine C1a			55,2	59,9	50
	Amikacine			105,1	109,9	/100
	Néomycine			555,0	612,3	500
	Spectinomycine			113,6	125,6	100
	Streptomycine			561,7	626,0	500
	Dihydrostreptomycine			564,7	627,7	500
	Tobramycine			51,9	53,9	/50
	Paromomycine			551,4	599,9	500
	Netilmicine			56,4	62,6	/50
	Sisomicine			54,8	60,0	/50
	Micronomicin			55,2	60,3	/50
Hygromycine B	549,5	595,8	/500			
Amino-glycosides	Apramycine	Foie	Porc	65,7	72,5	60
	Kanamycine			45,9	50,9	40
	Gentamicine C1			112,0	125	100
	Gentamicine C2			109,0	121,0	100
	Gentamicine C1a			112	125,0	100
	Amikacine			108,0	117	/100
	Néomycine			555	618,7	500
	Spectinomycine			109,3	118	100
	Streptomycine			550	609,0	500
	Dihydrostreptomycine			553	611	500
	Tobramycine			51,6	54,6	/50
	Paromomycine			1631	1759	1500
	Nétilmicine			57,7	66,2	/50
	Sisomicine			54,8	59,6	/50
	Micronomicin			57,8	66,5	/50
Hygromycine B	542	581,0	/500			

Amino-glycosides		Rein	Porc			
	Apramycine			111,0	124	100
	Kanamycine			45,2	50,3	40
	Gentamicine C1			226	253	200
	Gentamicine C2			218	237	200
	Gentamicine C1a			228	257	200
	Amikacine			109	117	/100
	Néomycine			5359	5797	5,000
	Spectinomycine			570	631	500
	Streptomycine			1104	1206	1,000
	Dihydrostreptomycine			1105	1222	1,000
	Tobramycine			56,9	63,3	/50
	Paromomycine			1641	1789	1500
	Netilmicine			55,5	62,1	/50
	Sisomicine			54,1	59,4	/50
	Micronomicine			57,3	65,1	/50
	Hygromycine B			560	610	/500

6.3. MATÉRIEL

Les réactifs/produits suivants sont requis : H₂O ultra-pur (18,2 méga-ohms) ; acide acétique de qualité CLHP, MeOH, MeCN et n-hexane ; acide heptafluorobutyrique (HFBA) > 99,5% ; TCA, A.R ; NaOH ; HCl, A.R ; unité de filtrage jetable (0,45 µm) ; cartouches Oasis HLB (3 cc/60 mg) ; trousse de test de pH (plage de pH 4 à environ 10).

6.3.1. Échantillon de contrôle négatif

Un échantillon de contrôle négatif est un échantillon témoin dont l'analyse n'a pas permis de détecter des AG. Il devrait provenir d'animaux dont les antécédents médicaux/de traitement sont connus (s'il y en a) ou tiré de plusieurs échantillons témoins de la même matrice et de la même espèce que l'échantillon à étudier.

6.3.2. Étalons de la matrice dopés avant extraction (PrEMS)

Dans cette procédure, les échantillons de contrôle négatif sont dopés avec les analytes à déterminer au début de la procédure d'analyse. Ils sont utiles pour l'étalonnage et la quantification des analytes cibles présents dans les échantillons.

6.3.3. Étalons de la matrice dopés après extraction (PoEMS)

Ce sont des échantillons de contrôle négatif soumis à l'ensemble de la procédure d'extraction puis dopés avec les analytes d'intérêt avant la détection (étalons ajustés à la matrice). Ils peuvent être utilisés pour déterminer la récupération des analytes.

6.3.4. Blanc de réactifs (ou « blanc de procédure »)

Dans ce cas, l'ensemble du protocole d'analyse est suivi, mais sans aucun échantillon ni aucun analyte. Le blanc est utilisé pour vérifier la possible contamination par les réactifs, le matériel ou l'environnement de laboratoire.

6.3.5. Matières de référence

Aucune matière de référence certifiée n'est nécessaire pour cette procédure, mais les contrôles négatifs, les PrEM et les PoEMS sont indispensables pour assurer sa validité.

6.3.6. Solvants

a) Solution aqueuse de TCA à 5 % (p/v)

- Mettre 50,0 g de TCA dans un bécher et les dissoudre dans environ 900 ml de H₂O ultra-pur.
- Transférer le tout dans une fiole jaugée de 1 l et remplir à la marque avec du H₂O ultra-pur.
- Préparer une nouvelle solution pour chaque essai.

b) HFBA 0,2 mol/l

- Diluer 13 ml de HFBA dans du H₂O ultra-pur pour obtenir un volume final de 500 ml.
- Cette solution reste stable jusqu'à six mois à 4 °C.

c) HFBA 0,02 mol/l

- Diluer 1,3 ml de HFBA dans de l'eau ultra-pure pour obtenir un volume final de 500 ml.
- Cette solution reste stable jusqu'à six mois à 4 °C.

d) MeCN:HFBA 0,15 M (4:1, v/v)

- Ajouter 400 ml de MeCN et 75 ml de HFBA 0,2 mol/l à 25 ml de H₂O ultra-pur et bien mélanger.
- Préparer une nouvelle solution pour chaque essai.

e) Solution aqueuse de NaOH de 100 g/l

- Dissoudre 100 g de NaOH dans du H₂O ultra-pur et porter à un volume final de 1 000 ml.
- Préparer une nouvelle solution pour chaque essai.

f) Solution de HCl 0,2 mol/l

- Diluer 5 ml de HCl dans du H₂O ultra-pur et porter à un volume final de 300 ml.
- Préparer une nouvelle solution pour chaque essai.

g) Solution de NaOH (pH 8,5)

- Diluer 100g/l de NaOH à 10g/l puis ajuster le pH à 8,5 par addition de HCl 0,2 mol/l.
- Préparer une nouvelle solution pour chaque essai.

h) Phases mobiles

- MeCN contenant du HFBA 20mM : pour préparer, ajouter 1,3 ml de HFBA à 500 ml de MeCN et mélanger soigneusement.
- MeCN:H₂O (5:95, v/v) contenant du HFBA 20 mM : pour préparer, ajouter 2,6 ml de HFBA à 50 ml de MeCN et 950 ml de H₂O et mélanger soigneusement.

- MeCN:H₂O (50:50, v/v) contenant du HFBA 20 mM ; pour préparer, ajouter 2,6 ml de HFBA à 500 ml de MeCN et 500 ml d'eau et mélanger soigneusement.
- Préparer fraîchement toutes les solutions ci-dessus pour chaque dosage.

6.3.7. Étalon et solutions standard

Il faut des solutions standard de qualité analytique de haute pureté (tableau 12).

TABLEAU 12. LISTE, PURETÉ ET SOURCE POSSIBLE DES MÉDICAMENTS ÉTUDIÉS

Composé	Pureté	Fabricant/source
Apramycine sulphate	98,5 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Allemagne
Kanamycine sulphate	94,5 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Allemagne
Gentamicine-2,5-sulfate hydrate (mélange de gentamicine C1, C2 et C1a, dans les proportions de 29,1 %, 21,3 % et 49,6 %)	96,5 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Allemagne
Amikacine hydrate	99,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Allemagne
Néomycine sulphate	90,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Allemagne
Spectinéomycine sulphate hydrate	96,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Allemagne
Streptomycine sulphate	98,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Allemagne
Dihydrostreptomycine sesquisulfate hydrate	99,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Allemagne
Tobramycine	93,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Allemagne
Paromomycine sulphate	90,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Allemagne
Netilmicine sulphate	93,0 %	European pharmacopoeia, France
Sisomicine	98,0 %	Toronto Research Chemicals Inc., Canada
Micronomicine sulphate	60,7 %	International laboratory, États-Unis
Hygromycine B	60,0 %	Sigma-Aldrich, États-Unis

a) Solution mère

Il convient de noter les points suivants :

- Pour les étalons fournis sous forme de sels et d'hydrates, ajuster la masse pesée de sorte que seule la masse de la base libre soit considérée.
- Pour préparer la solution de dilution, faire un mélange MeCN:H₂O:acide acétique (20:78:2, v/v/v). Préparer une solution mère pour chacun des 16 AG (100 µg/ml sauf pour la gentamicine : 80 µg/ml) dans une solution de dilution de MeCN:H₂O:acide acétique (20:78:2, v/v/v).
- Transférer les solutions étalons mères dans des tubes en plastique et conserver à 2 °C à environ 4 °C pendant jusqu'à six mois.
- Préparer une solution d'ajustement de chaque analyte (10 µg/ml) en diluant chaque solution mère dans un mélange MeCN:H₂O:acide acétique (20:78:2, v/v/v).

b) Solution standard de dopage

- Préparer un mélange standard de dopage (pour doper trois matrices/échantillons) en diluant chaque solution mère des 16 AG dans un mélange de MeCN:H₂O:acide acétique (20:78:2, v/v/v) de concentrations appropriées pour obtenir un volume final de 50 ml.
- Lorsqu'on a besoin d'un mélange d'enrichissement plus faible, préparer une dilution supplémentaire des AG.
- Conserver les solutions dans des tubes en plastique à 2 à environ 4 °C ; elles sont stables pendant 1 mois.

c) Solution standard de dopage des AG cibles pour le muscle porcin

La préparation de la solution étalon de dopage des AG pour le muscle porcin est présentée au tableau 13.

TABLEAU 13. PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'ENRICHISSEMENT POUR LE MUSCLE PORCIN

Composé	MRL/Niveau indicatif – substances sans MRL (µg/kg)	Concentration de chaque solution (mg/l)	Partie aliquote prélevée (ml)	Concentration de chaque composé dans le mélange obtenu (mg/l)
Streptomycine	500	100	6,25	12,5
Dihydrostreptomycine	500	100	6,25	12,5
Néomycine	500	100	6,25	12,5
Paromomycine	500	100	6,25	12,5
Kanamycine	40	100	0,50	1,0
Amikacine	/ (100)	100	1,25	2,5
Tobramycine	/ (50)	100	0,625	1,25
Spectinéomycine	100	100	1,25	2,5
Apramycine	60	100	0,75	1,5
Gentamicine C1	50	80 (total GENT)	2,50	1,16
Gentamicine C2	50			1,98
Gentamicine C1a	50			0,85
Hygromycine B	/ (500)	100	6,25	12,5
Nétilmicine	/ (50)	100	0,625	1,25
Sisomicine	/ (50)	100	0,625	1,25
Micronomicine	/ (50)	100	0,625	1,25

d) Solution standard de dopage des AG cibles pour le foie de porc

Préparer la solution étalon de dopage des AG pour le foie de porc comme indiqué au tableau 14.

TABLEAU 14. PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'ENRICHISSEMENT DES AG POUR LE FOIE DE PORC

Composé	MRL/Niveau indicatif – substances sans MRL (mg/l)	Concentration de chaque solution (mg/l)	Partie aliquote prélevée (ml)	Concentration de chaque composé dans le mélange obtenu (mg/l)
Streptomycine	500	100	5	10
Dihydrostrepto-mycine	500	100	5	10
Neomycine	500	100	5	10
Paromomycine	1500	100	15	30
Kanamycine	40	100	0,4	0,8
Amikacine	/ (100)	100	1	2
Tobramycine	/ (50)	100	0,5	1
Spectinéomycine	100	100	1	2
Apramycine	100	100	0,6	1,2
Gentamicine C1	100	80 (total GENT)	4	1,86
Gentamicine C2	100			3,17
Gentamicine C1a	100			1,36
Hygromycine B	/ (500)	100	5	10
Netilmicine	/ (50)	100	0,5	1
Sisomicine	/ (50)	100	0,5	1
Micronomicine	/ (50)	100	0,5	1

e) Solution standard de dopage des AG cibles pour le rein de porc

Préparer la solution étalon d'enrichissement des AG pour le rein de porc comme indiqué au tableau 15.

TABLEAU 15. PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'ENRICHISSEMENT DES AG POUR LE REIN DE PORC

Composé	MRL/Niveau indicatif – substances sans MRL (mg/l)	Concentration de chaque solution (mg/l)	Partie aliquote prélevée	Concentration de chaque composé dans le mélange obtenu (mg/l)
Streptomycine	1 000	100	2,5	5
Dihydrostreptomycine	1 000	100	2,5	5
Néomycine	5 000	100	12,5	25
Paromomycine	1 500	100	3,75	7,5
Kanamycine	40	100	0,1	0,2
Amikacine	/ (100)	100	0,25	0,5
Tobramycine	/ (50)	100	0,125	0,25
Spectinomycine	500	100	1,25	2,5
Apramycine	100	100	0,25	0,5
Gentamicine C1	200	80 (total GENT)	2	0,93
Gentamicine C2	200			1,59
Gentamicine C1a	200			0,68
Hygromycine B	/ (500)	100	1,25	2,5
Netilmicine	/ (50)	100	0,125	0,25
Sisomicine	/ (50)	100	0,125	0,25
Micronomicine	/ (50)	100	0,125	0,25

6.3.8. Matériel

Tubes en polypropylène à bouchon vissé (15 ml et 50 ml) ; balance de précision (0,1 mg et 0,01 g) ; mélangeur haute vitesse (IKA® T25 ultra-Turrax® numérique) ; élément de dispersion (IKA® Works S25N-25F) ; pipettes microlitres étalonnées (10 µl - 1 000 µl) ; mélangeur vortex ; agitateur à plat (IKA-KS260) ; générateur d'ultrasons ; pH-mètre (sensION + DO6) ; centrifugeuse réfrigérée haute vitesse (Beckman Coulter Allegra™ X-22R) ; évaporateur d'azote (N-EVAP™ 112) ; distributeur à vide de SPE avec contrôle du débit de PTFE ; pompe à vide (GM-0,33A) ; système de production de H₂O ultra-pur (système Milli-Q Plus) ; fioles jaugées (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml et 1 000 ml) ; feuille d'aluminium ; flacons d'auto-échantillonneur de couleur ambrée et couvercles enduits de PTFE ; système de CL-ESI-SM/SM.

Les conditions optimales de CL et de SM de la méthode ainsi que les caractéristiques physico-chimiques pour les analytes sont résumées dans les tableaux 16 et 17.

TABLEAU 16. CONDITIONS OPTIMALES DE CL ET DE SM UTILISÉES

Système	Système Agilent série 1100 series équipé d'un dégazeur automatique, d'une pompe quaternaire et d'un auto-échantillonneur ; CL-SM/SM API 3000		
Colonne	Waters Atlantis® dC18 (2,1×150 mm, 5 µm)		
Volume d'injection	30 µl		
Température de la colonne	30 °C		
Débit	0,4 ml/min		
Mode de SM	ESI ⁺		
Phase mobile	A : MeCN contenant du HFBA 20mM C : MeCN:H ₂ O (5:95, v/v) contenant du HFBA 20mM D : MeCN:H ₂ O (50:50, v/v) contenant du HFBA 20mM		
Durée (min)	C (%)	D (%)	A (%)
0,00	90	10	0
1,00	90	10	0
5,00	50	50	0
8,00	50	50	0
11,00	35	65	0
11,10	0	5	95
13,90	0	5	95
14,00	90	10	0
18,00	90	10	0

TABLEAU 17. MASSES MOLÉCULAIRES (MM), TRANSITIONS D'IONS ET TENSIONS CONNEXES DE SM DES AG

Composé	MM	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)	DP (V)	EP (V)	CXP (V)	CE (V)
Apramycine	539,6	540,4	*378,3	105	4,2	23	25
			217,2			13	40
Amikacine	585,6	586,3	*425,2	90	4,2	27	29
			264,1			17	38
Spectinomycine	332,3	351,3	*333,2	60	10,0	23	26
			98,2			6	44
Néomycine	614,6	615,4	*161,2	155	4,3	10	44
			293,0			17	36
Tobramycine	467,5	468,3	*163,2	65	10,0	10	36
			324,1			19	23
Gentamicine C1a	449,5	450,3	*160,1	85	5,0	9	34
			322,1			20	20
Gentamicine C2	463,6	464,3	*322,1	85	5,0	20	20
			160,1			9	34
Gentamicine C1	477,6	478,3	*157,2	100	4,5	10	30
			322,2			20	21
Kanamycine	484,5	485,3	*163,2	80	4,3	9	39
			324,1			19	25
Hygromycine B	527,5	528,2	*177,2	95	10,0	10	44
			352,2			20	35
Dihydrostreptomycine	583,6	584,2	*263,1	145	9,5	14	46
			246,2			14	56
Paromomycine	615,6	616,3	*163,2	135	9,0	11	52
			293,0			17	35
Streptomycine	581,6	600,3	*582,2	125	4,5	34	26
			263,1			16	52
Netilmicine	475,6	476,4	*299,5	65	7,2	21	31
			191,4			11	36
Sisomicine	447,5	448,5	*322,4	50	7,0	20	20
			271,5			19	27
Micronomicine	463,6	464,6	*322,4	90	7,6	22	21
			160,3			15	33

*Choisi comme ion quantitatif
 Traitement des données Analyste 1.4.1 ou au-dessus

D'autres conditions doivent être remplies comme suit : durée de séjour de 40 msec ; potentiel de focalisation de 350 V ; gaz de nébuliseur 12 psi ; rideau de gaz = 8 psi ; gaz de collision = 6 l/min ; tension de pulvérisation ionique = 3 500 V ; température de la source d'ions = 500 °C.

6.4. CONTRÔLE DE L'ENVIRONNEMENT

- L'extraction et le rinçage devraient être effectués sous éclairage non-UV (lumière jaune).
- Lorsqu'ils sont sortis de la zone de lumière jaune, les extraits devraient être protégés de la lumière UV (par exemple en utilisant du verre de couleur ambrée ou des feuilles d'emballage).

6.5. PRÉPARATION ET ANALYSE DES ÉCHANTILLONS

Utiliser la procédure de préparation et d'analyse des échantillons décrite ci-dessous et les concentrations indiquées au tableau 18.

- a) Homogénéiser les échantillons de tissu porcine (muscle, foie et reins) en pâte à l'aide d'un mélangeur haute vitesse. Conserver les échantillons à $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ dans des récipients en plastique et analyser dans les trois mois. L'échantillon devrait être retourné à la conservation à froid immédiatement après le sous-échantillonnage. Faire les analyses le plus rapidement possible ou conserver à nouveau les échantillons à $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.
- b) Peser deux fois $5\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ de l'échantillon préparé et les transférer dans un tube en polypropylène de 50 ml.
- c) Pour les contrôles négatifs et les PrEMS, peser comme indiqué à l'étape b) et doper avec des volumes appropriés de solution standard de dopage. Utiliser un minimum de quatre niveaux d'étalonnage (plus le blanc), avec deux PrEMS pour chaque niveau. Les niveaux de concentration devraient être espacés de manière équidistante et choisis de telle sorte que la concentration prévue de l'échantillon se situe au milieu de la courbe d'étalonnage.
- d) Pour chaque extrait de PrEMS, préparer et étiqueter un échantillon de contrôle négatif supplémentaire prélevé par la procédure d'extraction (PoEMS) comme PoEMS.
- e) Ajouter 10 ml de TCA à 5 % (p/v) à l'échantillon et bien homogénéiser à 10 000 tpm pendant 1 min, puis centrifuger à 8 000 tpm pendant 5 min. Transférer l'extrait dans un autre tube de 50 ml en polypropylène.
- f) Répéter la procédure d'extraction en utilisant 10 ml de TCA à 5 % et combiner les surnageants de TCA dans le tube de 50 ml en polypropylène.
- g) Ajouter 5 ml chacun de HFBA 0,2 M et de n-hexane aux surnageants de TCA ; couvrir les tubes avec du papier aluminium, les placer sur un agitateur à plat et mélanger pendant 30 min à $\geq 360\text{ tpm}$.
- h) Centrifuger les tubes à 8 000 tpm pendant 5 min à température ambiante, éliminer la couche supérieure de n-hexane et l'utiliser pour le rinçage.
- i) Mettre une cartouche SPE HLB sur le distributeur à vide, la conditionner avec 3 ml de MeOH, 3 ml de H₂O et 3 ml de HFBA 0,2 M et laisser les solvants s'écouler par gravité. Jeter l'éluat.
- j) Charger 5 ml de l'extrait de la couche supérieure (étape h) sur la cartouche conditionnée et laisser pénétrer à 1 ml/min. Recueillir l'extrait dans un tube de 15 ml en polypropylène et ajuster le pH à $8,5 \pm 0,2$ avec du NaOH à 100g/l (environ 9 gouttes) et du HCl 0,2 mol/l.
- k) Mettre une autre cartouche SPE HLB sur le distributeur à vide, la conditionner avec 3 ml de MeOH, 3 ml de H₂O, 3 ml de HFBA 0,2 M et 3 ml de solution de NaOH de pH 8,5 et laisser couler l'éluat par gravité. Jeter l'éluat.
- l) Mettre l'extrait à pH $8,5 \pm 0,2$ de l'étape k) sur la cartouche conditionnée et le laisser s'écouler à la vitesse de 1 ml/min. Jeter l'éluat.
- m) Relier les deux cartouches HLB avec des joints à vide et rincer avec 5 ml de H₂O ultra-pur. Sécher les deux cartouches à moins de 15 mm Hg pendant 10 min.
- n) Éluer les résidus d'AG des deux cartouches avec 6 ml de MeCN:HFBA 0,15 M (8:2, v/v) à 1 ml/min, et recueillir l'éluat dans un nouveau tube en polypropylène de 15 ml.
- o) Réduire l'éluat recueilli à environ 0,3 ml avec un évaporateur d'azote à une température réglée de 40 °C.
- p) Pour préparer les PoEMS, prendre l'échantillon résiduel de 0,3 ml de l'étape d) marqué PoEMS et y ajouter la solution standard de dopage pour faire correspondre les PrEMS préparés à l'étape c) comme indiqué au tableau 18.

- q) Reconstituer le résidu (étape o) à 1 ml par addition de HFBA 20 mM et mélanger au vortex pendant 30 secondes. Transférer l'échantillon dans un flacon d'autoéchantillonneur à bouchon vissé de 2 ml.
- r) Soumettre les échantillons et les contrôles à la CL-ESI-SM/SM comme suit :
 - i) Injecter les PoEMS par ordre croissant de concentration.
 - ii) Injecter également les PrEMS par ordre croissant de concentration.
 - iii) Rincer la colonne en y injectant un blanc.
 - iv) Injecter les échantillons.
 - v) Après le 10^e échantillon, injecter un PrEMS suivi d'un autre rinçage (injection de blanc).
 - vi) Injecter une autre série de PoEMS (par ordre croissant de concentration).
 - vii) Injecter une autre série de PrEMS également par ordre croissant de concentration.
 - viii) Faire un rinçage final.

TABLEAU 18. PRÉPARATION DES ÉTALONS DE CONTRÔLE ET NIVEAUX DE RÉFÉRENCE

Identification du contrôle	Niveau d'enrichissement des PrEMS (µg/kg)
Blanc de réactifs	0
PrEMS 0	0
PrEMS 1	0,5 MRL/Niveau indicatif
PrEMS 2	1,0 MRL/Niveau indicatif
PrEMS 3	1,5 MRL/Niveau indicatif
PrEMS 4	2,0 MRL/Niveau indicatif

6.6. QUALIFICATION DE LA PERFORMANCE

Avant de commencer la séquence de CL-ESI-SM/SM, vérifier que les conditions suivantes sont remplies :

- a) Largeur de référence approximative du PrEMS 1 pour chaque analyte : < 1
- b) Rapport approximatif signal-bruit du PrEMS 1 pour chaque analyte > 5:1
- c) Résolution de la gentamicine C2/micronomicine : > 50 %
- d) Dérive des temps de rétention (PrEMS 1 du début à la fin de la procédure) < 5 %
- e) Dérive de la surface du pic (PrEMS 1 du début à la fin de la procédure) : < 30 %
- f) Coefficient de régression des PrEMS (r^2) pour chaque analyse > 0,97

6.7. CALCUL DES RESULTATS

Il convient de noter ce qui suit :

- a) Préparer les courbes d'étalonnage des PrEMS de l'aire du pic par rapport à la concentration pour chaque analyte/transition et calculer la valeur de r^2 .
- b) Préparer les courbes de réponse des PoEMS de l'aire du pic par rapport à la concentration pour chaque analyte/transition.
- c) Calculer les recouvrements en comparant les pentes des courbes de PrEMS et de PoEMS.

- d) Effectuer les vérifications de la validité du système en utilisant la streptomycine comme marqueur.
- e) Si l'échantillon a un pic au temps de rétention (TR) typique pour l'un des analytes, calculer la concentration des analytes à partir des courbes d'étalonnage du PrEMS par la formule :

$$Y = mx + c \dots \dots \dots (1)$$

Où

Y est l'aire du pic ; m la pente et x la concentration ; c l'ordonnée

Utiliser la formule : $concentration (\mu g/kg - 1) = \frac{aire\ du\ pic\ de\ l'echantillon - c}{m} \dots \dots (2)$

- f) Comparer la différence entre les résultats relatifs aux échantillons doubles et la répétabilité indiquée dans le document de validation
- g) Comparer le rapport des concentrations calculées de chaque diagramme et les tolérances indiquées dans la décision 2002/657/CE [4] de la Commission. Si les rapports se situent dans les tolérances spécifiées pour le nombre requis de points d'identification, l'identité de l'analyte est confirmée.

Des informations détaillées sont présentée au tableau 19 sur la validation de la méthode.

TABLEAU 19. EXPÉRIENCE ET DONNÉES DE VALIDATION DE LA MÉTHODE

	SPEC CTIN OMY CINE	HYGR OMYC INE	STREP TOMY CINE	DIH YDR O STR EPT OMY CINE	AMIK ACINE	KA NA MY CIN E	APRA MYCI NE	PARO MOMY CINE	TOBR AMYC INE	SISO MICI NE	GENT AMYC INE C1a	GENT AMYC INE C2	MICR ONOM YCINE	NETI LMI CINE	GEN TAM YCIN E C1	NE OM YCI NE
Muscle																
RSD du jour (%) n=21	3,9- 9,5	4,1-8,7	4,8-10,6	5,2- 8,0	3,5-9,6	4,1- 9,4	4,3- 12,2	3,0-11,2	3,5-8,6	4,1- 11,1	3,7-10,1	3,3-9,7	4,4-12,1	4,7- 12,6	4,2- 11,7	5,2- 10,3
RSD entre jours (%) n=63	5,0- 10,4	7,4-10,1	8,2-11,1	5,3- 8,2	5,5-8,4	6,4- 7,8	5,7- 10,5	5,6-8,9	6,4-8,2	5,9- 9,5	5,4-8,8	7,0-10,3	4,8-9,3	9,1- 12,2	5,6- 9,6	5,5- 9,2
Récupération (%)	60-85	51-78	64-98	74- 107	60-90	66- 88	66-101	78-107	76-108	76- 107	76-106	76-111	76-110	74- 112	76- 111	75- 102
MRL/niveau (µg/kg)	100	/500	500	500	/100	40	60	500	/50	/50	50	50	/50	/50	50	500
CCα (µg/kg)	113,6	549,5	561,7	564,7	105,1	44,7	63,2	551,4	51,9	54,8	55,2	54,9	55,2	56,4	54,0	555,0
CCβ (µg/kg)	125,6	595,8	626,0	627,7	109,9	49,0	65,8	599,9	53,9	60,0	59,9	59,7	60,3	62,6	59,2	612,3
LOD (µg/kg)	6,0	15	9,0	8,0	6,0	3,0	3,0	9,0	4,0	4,5	3,0	3,0	4,5	3,0	3,0	9,0
LOQ (µg/kg)	20	50	30	25	20	10	10	30	13	15	10	10	15	10	10	30
Foie																
RSD du jour (%) n=21	3,3- 9,1	4,0-7,2	5,4-9,8	4,6- 8,5	4,1-7,8	3,2- 10,0	4,2-9,8	4,5-9,5	3,4-7,1	3,4- 13,3	3,4-10,2	4,6-10,7	3,6-11,3	2,8- 11,0	4,2- 9,5	4,9- 10,3
RSD entre jours (%) n=63	5,4- 9,4	6,2-6,8	8,4-9,7	8,8- 10,6	8,8-10,0	7,1- 8,6	4,9- 10,4	5,5-8,6	5,6-10,7	6,6- 10,6	5,5-8,8	7,2-10,4	7,5-11,5	6,7- 10,5	7,4- 8,9	7,1- 10,7
Récupération (%)	59-85	56-72	61-92	69- 102	60-87	59- 84	66-95	75-100	63-101	69- 100	73-110	69-106	70-105	73- 109	77- 109	71- 100
MRL/niveau indicatif (µg/kg)	100	/500	500	500	/100	40	60	1500	/50	/50	100	100	/50	/50	100	500
CCα (µg/kg)	109,3	541,5	549,8	552,5	108,0	45,9	65,7	1630,8	51,6	54,8	111,6	109,4	57,8	57,7	112,0	555,2
CCβ (µg/kg)	117,6	581,0	609,0	610,9	116,6	50,9	72,5	1758,9	54,6	59,6	125,4	121,3	66,5	66,2	124,9	618,7
Seuil de détection (LOD ₂ , µg/kg)	8,0	18	9,0	9,0	6,0	3,0	3,0	12	3,0	4,5	2,5	4,0	5,5	6,0	3,0	6,0
Limite de quantification (LOQ, µg/kg)	25	60	30	30	20	10	10	40	10	15	8,0	12	18	20	10	20
Rein																

	SPE CCT INO MYC INE	HYG ROM YCIN E	STRE PTO MYCI NE	DIHY DRO STRE PTOM YCIN E	AMIK ACIN E	KA NA MY CIN E	APR AMY CINE	PARO MOM YCIN E	TOBR AMY CINE	SISO MIC INE	GEN AMY CINE C1a	GEN AMY CINE C2	MICR ONO MYCI NE	NET ILMI CIN E	GEN TAM YCI NE CI	NEO MYCI NE
RSD du jour (%) n=21	4,7- 8,4	4,2-6,9	3,3-9,6	3,5-8,0	2,9-8,3	3,8- 8,8	4,4- 10,1	3,8-8,9	5,0-9,5	3,5- 9,5	4,2- 10,2	3,5-8,1	3,8- 13,8	2,8- 9,3	4,2- 8,2	4,7- 10,2
RSD entre jours (%) n=63	5,6- 10,4	7,0-7,9	8,3-8,6	8,3- 10,8	6,1-7,6	9,0- 9,7	5,5- 8,1	5,6-8,0	6,0-8,7	9,6- 10,1	6,6- 10,3	5,8-7,3	5,0-9,8	6,6- 9,6	7,0- 8,6	10,1- 11,4
Récupération (%)	60-91	54-77	68-100	70-106	74-100	61- 88	76- 101	76-103	74-103	68- 101	68-103	76-102	69-105	69-98	75- 107	67-99
MRL/niveau indicatif (µg/kg)	500	/500	1000	1000	/100	40	100	1500	/50	/50	200	200	/50	/50	200	5000
CCα (µg/kg)	570,3	559,9	1104,2	1104,9	108,9	45,2	111,0	1640,5	56,9	54,1	227,8	217,5	57,3	55,5	226,3	5357,5
CCβ (µg/kg)	630,7	609,6	1206,2	1221,9	117,3	50,3	123,7	1788,8	63,3	59,4	257,3	237,3	65,1	62,1	252,7	5795,3
LOD (µg/kg)	6,0	15	7,5	6,0	8,0	2,5	3,0	9,0	4,5	3,0	3,0	4,0	4,5	4,5	3,6	8,0
LOQ (µg/kg)	20	50	25	20	25	8,0	10	30	15	10	10	12	15	15	12	25

Note : Les niveaux d'enrichissement sont de 0,5 puis 1,0 et 1,5 × MRL/niveaux indicatifs

7. MÉTHODE DE DÉTERMINATION PAR CL-SM/SM DES RÉSIDUS DE BENZIMIDAZOLE DANS LES PRODUITS ANIMAUX

7.1. PRINCIPE

Les échantillons sont extraits avec du carbonate de potassium et de l'acétate d'éthyle et dégraissés avec de l'hexane. Les mesures qualitatives et quantitatives des résidus sont faites par CL-ESI-SM/SM avec ou sans IS ($^{13}\text{C}_6$ -thiabendazole).

7.2. PORTÉE

Cette méthode de CL-ESI-SM/SM est adaptée à la détermination des benzimidazoles (BZ), des pro-benzimidazoles et de leurs métabolites dans les produits animaux, y compris la viande de porc, de mouton, le foie, le lait et le poisson. Les BZ cibles, les pro-benzimidazoles et leurs métabolites comprennent le 5-hydroxy-thiabendazole (TBZ-5-OH), le thiabendazole (TBZ), l'albendazole-2-aminosulfone (ABZ-NH₂-SO₂), l'albendazole sulfoxide (ABZ-SO), l'oxibendazole (OXI), l'oxfendazole (OXF), l'albendazole sulfone (ABZ-SO₂), l'albendazole (ABZ), le fébantel, le thiophénate-éthyl, le fenbendazole sulfone (FBZ-SO₂) et le fenbendazole (FBZ). La LOD et le LOQ sont respectivement de 0,75 µg/kg et 2,5 µg/kg.

7.3. MATÉRIEL

Les produits suivants sont requis : H₂O de qualité analytique ; MeCN, n-hexane, acétate d'éthyle, MeOH et acétone de qualité CLHP ; acide formique, acide acétique, GR ; MgSO₄ anhydre, acétate de sodium anhydre, AR ; adsorbant SPE (PSA) ; des étalons d'analyse, y compris ABZ 99,0 %, ABZ-SO 98,5 %, ABZ-SO₂ 99,0 %, ABZ-NH₂-SO₂ > 99 %, TBZ 98,5 %, TBZ-5-OH 99,5 %, OXI 98,5 %, OXF 99,0 %, FBZ 99,0 %, FBZ-SO₂ > 99 %, fébantel 99,0 % et thiophénate-éthyle 99,0 %. Autres équipements nécessaires: membrane filtrante 0,22 µm ; système de CLHP-ESI-SM/SM ; homogénéiseur ; mélangeur vortex ; super-centrifugeuse ; ultra-sonicateur ; évaporateur rotatif/azote ; et balance de précision.

7.3.1. Solutions étalons

- Préparer 100 mg/l de mélange de solution mère dans du MeOH et diluer à des solutions étalons de travail (environ 10 mg/l) immédiatement avant utilisation.
- Conserver la solution mère au réfrigérateur à 4 °C.
- Préparer également des étalons de travail de même matrice avec un échantillon témoin du foie.

7.4. PROCÉDURE

7.4.1. Extraction et rinçage des tissus musculaires et hépatiques

- a) Ajouter 50 µg/l d'IS, 3 g de sulfate de sodium, 3 ml de carbonate de potassium 2 M et 15 ml d'acétate d'éthyle à 5 g de tissus musculaires ou hépatiques homogénéisés, dans un tube de centrifugeuse de 50 ml.
- b) Agiter sur un mélangeur vortex pendant 2 min et centrifuger pendant 5 min à 5 000 tpm.
- c) Décanter le surnageant dans un ballon de distillation de 100 ml.
- d) Répéter la procédure d'extraction une fois avec 15 ml d'acétate d'éthyle.

- e) Évaporer les phases organiques collectées jusqu'à siccité sous azote (45 °C).
- f) Ajouter 3 ml de MeCN et 5 ml de n-hexane au résidu séché et agiter pendant 2 min à l'aide d'un ultra-sonicateur avant de transférer le contenu dans un tube de centrifugeuse de 10 ml.
- g) Centrifuger pendant 5 min à 5 000 tpm et jeter la couche supérieure.
- h) Ajouter 5 ml de n-hexane à la couche restante pour dégraisser l'extrait.
- i) Évaporer la couche de MeCN jusqu'à siccité sous azote (45 °C) et dissoudre à nouveau le résidu dans 1 ml de MeCN.
- j) À l'aide d'une pipette, mettre 100 µl de la solution (étape i) dans 900 µl de MeCN:H₂O (30:70, v/v) et presser la matière à travers un filtre de 0,22 µm.
- k) Injecter dans un système de CL-SM/SM pour analyse.

7.4.2. Extraction et rinçage des échantillons de lait

- a) Mettre 5 ml d'échantillon de lait dans des tubes de centrifugeuse en polypropylène de 50 ml.
- b) Ajouter 50 g/l d'IS, 20 ml de MeCN contenant de l'acétique-acide à 0,5 %.
- c) Agiter sur un mélangeur vortex pendant 2 min.
- d) Ajouter de l'acétate de sodium anhydre (1,5 g) et du sulfate de sodium anhydre (6,0 g) à chaque tube et agiter vigoureusement pendant 2 min.
- e) Centrifuger à 5 000 tpm pendant 5 min.
- f) Aspirer 4 ml du surnageant et évaporer jusqu'à siccité sous azote (45 °C).
- g) Dissoudre le résidu dans 2 ml de MeOH et ajouter 50 mg de PSA.
- h) Mélanger au vortex pendant 2 min.
- i) Centrifuger à nouveau à 5 000 tpm pendant 5 min.
- j) Évaporer une partie aliquote de 1 ml de surnageant jusqu'à siccité sous azote (45 °C) et reconstituer les résidus dans 1 ml de MeCN:H₂O (30:70, v/v).
- k) Presser la matière à travers un filtre de 0,22 µm.
- l) Injecter le contenu dans un système de CL-SM/SM pour l'analyse.

7.4.3. Conditions de CLHP

Les conditions de CLHP sont notamment les suivantes : colonne chromatographique – colonne analytique Eclipse x DB-C18 (50 mm x 4,6 mm 1,8 µm) ; débit de 0,3 ml/min de flux ; volume d'injection de 10 µl ; température de la colonne : 26 °C ; phase mobile : MeCN et solution d'acide formique 0,005 M en mode gradient (tableau 20).

TABLEAU 20. FLUX DU GRADIENT DE LA PHASE MOBILE DE LA CLHP

Temps (min)	A : MeCN (%)	B : acide formique 0,005 M (%)
0	85	15
5	20	80
8,5	20	80
8,6	85	15
14	85	15

7.4.4. Paramètres de SM

- Utiliser le mode d'ionisation ESI avec scanner MRM et de l'azote comme gaz nébuliseur, de collision, rideau de gaz et gaz de chauffage.
- Les conditions optimisées d'ESI+ - les conditions de SM/SM comprennent : potentiel de focalisation : 400 V ; potentiel de sortie : 10 V ; potentiel de sortie de la cellule de collision : 4 V ; température : 450 °C ; tension de pulvérisation ionique : 4500 V ; gaz 1 : 50 psi ; gaz 2 : 60 psi ; rideau de gaz : 30 psi ; gaz de collision : 10 psi ; durée de séjour : 50 ms.
- Les paramètres de tolérance et de SM/SM pour les benzimidazoles sont présentés dans les tableaux 21 et 22 respectivement.

7.4.5. Évaluation des résultats

a) Détermination qualitative

- Pour chaque composé, sélectionner un ion parent et deux ions fils.
- Maintenir le temps de rétention (TR) à $\pm 2,5$ % des ions standards respectifs et les erreurs maximales tolérées des abondances relatives des ions, comme indiqué au tableau 21

TABLEAU 21. ABONDANCE RELATIVE DES IONS (%) ET ERREURS MAXIMALES TOLÉRÉES

Abondances relatives des ions %	>50	20–50	10–20	≤ 10
Erreurs maximales tolérées %	± 20	± 25	± 30	± 50

b) Détermination quantitative

- Préparer des courbes d'étalonnage pour chaque analyte en analysant les échantillons négatifs dopés en double avec des solutions étalons de chacun des 12 analytes à 7 niveaux de concentrations différents.
- Quantifier chaque composé en faisant référence à la réponse de l'aire du pic de l'IS.

c) Calcul

Exprimer les concentrations en analyte X (mg/kg), calculées par la formule :

$$X = \left[\frac{ml \times 1000}{m \times 1000} \right] \times n \dots \dots \dots (4)$$

Où

ml est le poids de l'analyte dans la courbe d'étalonnage (μg) ; m le poids de l'échantillon (g) ; et n le facteur de dilution.

7.4.6. Critères d'acceptabilité

- Il est recommandé d'utiliser des échantillons témoins et de référence dans les analyses courantes.
- Seuls les résultats avec des taux de récupération de 70 % à 110 % sont acceptés ; en dehors de cette fourchette, il faudrait arrêter l'analyse et déterminer la source des problèmes identifiés.

TABLEAU 22. DÉTERMINATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES IONS* ET PARAMÈTRES D'ANALYSE PERTINENTS

Composé	Transition (m/z)	Potentiel de désolvatation/v	Énergie de collision /v	TR /min
ABZ	226/234,1*	45	31	8,24
	222/191,1		48	
ABZ-SO	282,3/208,1*	33	37	6,26
	282,3/191,1		45	
ABZ-SO ₂	298,3/159,1*	44	53	7,19
	298,3/224,1		40	
TBZ	202,2/175,1*	50	37	3,61
	202,2/131,2		48	
TBZ-5-OH	218,1/191,1*	48	37	1,93
	218,1/147,2		50	
OXI	250,2/218,0*	41	30	7,07
	250,2/176,2		43	
OXF	316,3/159,1*	48	51	7,07
	316,3/191,2		32	
FBZ	300,3/268,1*	44	35	8,89
	300,3/159,1		52	
FBZ-SO ₂	332,2/159,1*	50	58	7,82
	332,2/300,2		36	
ABZ-NH ₂ -SO ₂	240,1/133,2*	45	44	2,72
	240,1/198,2		30	
Febantel	447,2/280,1*	37	48	10,2
	447,2/227,1		48	
Thiophenate-ethyl	371,3/151,0*	34	34	9,11
	371,3/104,0		48	

8. DÉTECTION DES RÉSIDUS D'ALBENDAZOLE DANS LA VIANDE

8.1. PRINCIPE

L'albendazole (ABZ) extraite d'échantillons de viande et purifié entre en concurrence avec l'ABZ conjuguée à du raifort (HRP) sur une plaque de dosage immuno-enzymatique (ELISA). Après rinçage, les résidus de HRP catalysent le substrat, ce qui entraîne un changement de couleur. L'intensité de celle-ci est inversement proportionnelle à la concentration d'ABZ dans les échantillons.

8.2. PORTÉE

Cette méthode est adaptée à la détermination de l'ABZ et de ses métabolites dans les produits animaux, y compris la viande de porc, de mouton, le foie, le lait et le poisson. Les résidus cibles sont le sulfoxyde d'albendazole (ABZ-SO), le sulfone albendazole (ABZ-SO₂) et l'ABZ.

8.3. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS

La trousse d'analyse contient notamment :

Microplaque à 96 puits enduite d'immunoglobuline g (IgG) de lapin contre l'ABZ ; solutions étalons ABZ ; peroxydase conjuguée ; tampon de rinçage concentré 10 x ; tampon de citrate ; substrat ; solution de diluant 20 × concentrée ; solution d'obturation ; enveloppe en plastique ; kit d'instructions. Autres réactifs nécessaires à l'immunodosage : HCl 0,01 M ; NaOH 5 M ; HCl 5 M ; H₂O distillé ; diméthylsulfoxyde (DMSO) ; tampon phosphate salin (PBS).

8.3.1. Matériel

Le matériel suivant est requis : homogénéiseur ; super-centrifugeuse ; micropipettes de précision de 50 µl, 100 µl et 200 µl ; micropipette multi-canaux de 50 µl à 200 µl ; lecteur de plaque microtitre avec filtre de 450 nm.

8.4. PROCÉDURE

8.4.1 . Préparation/extraction et analyse des échantillons

8.4.1.1. Foie

- a) Mettre 1 g de foie dans un tube de centrifugation de 50 ml.
- b) Ajouter 10 ml de PBS contenant 10 % de DMSO.
- c) Homogénéiser pendant 30 min avec un Ultra-Turrax ou un équipement similaire.
- d) Centrifuger l'homogénat à 4 500 tpm pendant 5 min.
- e) Transférer le surnageant dans un nouveau tube à essais.
- f) Répéter les étapes b) à e).
- g) Combiner les surnageants et bien mélanger.
- h) Centrifuger 1 ml de surnageant à 10 000 tpm pendant 5 min.
- i) Le surnageant propre est prêt pour la détection.

8.4.1.2. *Viande et poisson*

- a) Mettre un échantillon de viande de 2 g dans un tube de centrifugation de 50 ml.
- b) Ajouter 10 ml de PBS contenant 10 % de DMSO.
- c) Homogénéiser pendant 30 min avec un Ultra-Turrax ou un équipement similaire.
- d) Centrifuger l'homogénat à 4 500 tpm pendant 5 min.
- e) Transférer le surnageant dans un autre tube à essais.
- f) Répéter les étapes a) à e).
- g) Combiner les surnageants et centrifuger (1 ml) à 10 000 tpm pendant 5 min.
- h) Le surnageant propre est prêt pour la détection.

8.4.1.3. *Lait*

- a) Mettre un échantillon de lait de 1 ml dans un tube de 50 ml.
- b) Ajouter 10 ml de PBS contenant 10 % de DMSO.
- c) Homogénéiser pendant 30 min avec un Ultra-Turrax ou un équipement similaire.
- d) Centrifuger l'homogénat à 4 500 tpm pendant 5 min.
- e) Transférer le surnageant dans un autre tube à essais.
- f) Centrifuger 1 ml de surnageant à 10 000 tpm pendant 5 min.
- g) Le surnageant propre est prêt pour l'analyse/détection.

Pour l'analyse

- h) Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante. Une fois qu'on commence, il faut terminer toutes les étapes sans interruption.
- i) Ajouter 200 µl de H₂O distillé dans les puits des échantillons témoins.
- j) Ajouter 50 µl de H₂O distillé dans les puits de liaison maximale.
- k) Ajouter 50 µl de chaque étalon dans les puits des étalons.
- l) Ajouter 50 µl de chaque échantillon dans les puits des échantillons.
- m) Ajouter 50 µl d'enzyme conjuguée à chaque puits, sauf aux puits des échantillons témoins.
- n) Agiter doucement la plaque.
- o) Laisser incuber la plaque pendant 30 min à température ambiante (20 à 25°C).
- p) Vider tous les puits après incubation.

8.4.1.4. *Séquence de rinçage*

- a) Remplir complètement tous les puits avec la solution de rinçage ; les vider en retournant la plaque et en serrant la cadre central en matière plastique pour éviter que les bandes ne tombent du cadre.
- b) Répéter quatre fois la procédure de rinçage.
- c) Enlever les gouttelettes résiduelles en tapant vigoureusement contre une serviette en papier.

8.4.1.5. *Développement*

- a) Préparer la solution de développement en diluant une partie de chromogène dans neuf parties de tampon citrate.
- b) À l'aide d'une micropipette multicanaux, ajouter 200 µl de solution de développement à chaque puits, y compris ceux des échantillons témoins.
- c) Laisser incuber pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité.

- d) Ajouter 50 μ l de solution d'obturation à chaque puits. La couleur devrait virer du bleu au jaune. Bien mélanger.

8.4.1.6. *Lecture*

- Après avoir bien mélangé, mesurer l'absorbance avec un lecteur de microplaques à 450 nm.
- Prendre la mesure immédiatement après l'arrêt du processus de développement.

8.4.2. **Évaluation des résultats**

Se servir d'une courbe d'étalonnage pour déterminer les concentrations inconnues de benzimidazole.

- a) Calculer la valeur d'absorbance moyenne pour l'échantillon témoin et la soustraire de la valeur d'absorbance de chaque puits.
- b) Calculer la valeur d'absorbance moyenne pour la liaison maximale (B_o), les étalons et les échantillons.
- c) Diviser la valeur d'absorbance moyenne des étalons et des échantillons (B) par celle de la liaison maximale (B_o) et multiplier par 100.
- d) La liaison maximale est donc égale à 100 % ; donner les valeurs d'absorbance en pourcentage.
- e) Entrer les rapports B/B_o (%) calculés pour chaque étalon dans un système semi-logarithmique de coordonnées par la concentration en benzimidazole de l'étalon ; tracer la courbe d'étalonnage.
- f) Prendre le rapport B/B_o (%) pour chaque échantillon et interpoler la concentration correspondante à partir de la courbe d'étalonnage.

9. MÉTHODE D'ANALYSE DES SULFAMIDES ET DES TÉTRACYCLINES DANS LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX SOLIDES/SEMI-SOLIDES ET AQUEUX PAR CL-SM/SM

9.1. PRINCIPE

Les échantillons sont préparés par extraction solide-liquide, y compris le rinçage par SPE à l'aide de la cartouche HLB puis concentrés sous un courant d'azote avant l'analyse par CL-SM/SM mettant en jeu 1 MRM ou le suivi de réactions sélectionnées (SRM), le balayage des ions produits, le balayage des ions précurseurs, et les balayages d'une perte de neutre.

9.2. PORTÉE

Cette POS sert à la détermination des résidus de sulfamides et de tétracyclines des médicaments dans plusieurs échantillons environnementaux par CL-SM/SM.

Les matrices d'essai sont divisées en matrices solides/semi-solides et aqueuses. Les matrices solides/semi-solides sont principalement le sol, le fumier animal et le compost de fumier ainsi que les sédiments, alors que les matrices aqueuses sont l'eau douce souterraine et de source, ainsi que l'eau de mer.

Les analytes cibles sont des antimicrobiens (tels que les tétracyclines et les sulfamides) utilisés en élevage et en aquaculture. La concentration cible est aussi faible que raisonnablement possible.

9.3. PRODUITS

Les produits chimiques, les réactifs et les consommables suivants sont requis :

échantillons aqueux/(semi-)solides – bouteille d'échantillon, PTFE ou équivalent en plastique résistant aux solvants organiques avec bouchon à vis ; bouchons de bouteilles (enduits de fluoropolymère) ; réactifs de qualité analytique.

9.3.1. Étalons/solutions étalons

a) Solutions étalons

- Utiliser des matières de pureté et de composition connues, ou les acheter sous forme de solutions/mélanges avec certification de leur pureté, de leur concentration et de leur authenticité.
- Pour les étalons de pureté $\geq 98\%$, il n'est pas nécessaire de corriger le poids lors du calcul de la concentration.

b) Solution mère

- Dissoudre une quantité appropriée de matière de référence testée/d'étalon pur dans un solvant approprié (10 mg dans une fiole jaugée de 10 ml avec bouchon émeri et remplir à la marque avec du MeOH).
- Conserver les solutions étalons dans l'obscurité à -10 °C dans des flacons à bouchons à vis enduits de fluoropolymère ou sous un gaz non réactif (comme l'azote).

- Mettre une marque sur le ballon au niveau de la solution pour permettre de détecter les pertes de solvant par évaporation.
- Compléter la solution si du solvant s'évapore.

c) Solution de dopage

- Préparer à une limite de quantification ou un seuil de déclaration pratique.
- Dans ce protocole, cela est déterminé par la formule.

$$\frac{\text{quantité (ng)} \times \text{vol. dilution (ml)}}{\text{vol. injection } (\mu\text{l}) \times \frac{1}{\text{échantillon}} \text{ taille (g)}} \dots \dots \dots (5)$$

d) Solutions étalons marquées avec des isotopes

- Préparer les étalons internes correspondants de la même manière que l'étalon analytique à l'étude.

9.3.2. Matériel

Le matériel suivant est requis : homogénéiseur de tissus, mélangeur vortex ; mélangeur ultra-sonique ; four ; dessiccateur ; balance de précision (capable de peser 0,1 mg à 10 mg) ; pH-mètre ; papier pH (large gamme) ; ultra-sonicateur ; cartouche SPE de HLB/mode mixte ; mode mixte d'échange de cations (MCX) 60 mg, Waters Oasis, 20 cc/1 g LP, 60 µm, ou équivalent ; appareil de filtration de solvants ; appareil de filtration sous vide avec distributeur à vide ; filtre en microfibre de verre Whatmann de qualité C (GF/C) de pores 0,45 µm ; centrifugeuse ; pipettes/micropipettes ; évaporateur rotatif ; évaporateur d'azote.

9.4. PROCÉDURE

9.4.1. Préparation des échantillons

- Les échantillons, en particulier de sol avec des particules de tailles inférieures à 2 mm, sont utilisés pour l'analyse (si nécessaire les homogénéiser/mélanger pour réduire la taille).
- Pour le fumier/compost de fumier solide, obtenir du fumier solide et du compost de fumier sans antimicrobien auprès de fermes d'élevage biologiques.
- Le lisier peut être préparé à partir de fumier solide avec de H₂O distillé. Mélanger le fumier solide et le H₂O distillé à 1:1 (p/p) et agiter pendant 5 h ; recueillir le filtrat.
- Les échantillons de sol doivent être libres d'antimicrobiens (c'est-à-dire provenir d'endroits où des médicaments vétérinaires et du fumier n'ont pas été appliqués).
- Les échantillons de sol, de sédiments et de fumier/compost de fumier utilisés pour l'analyse ne doivent pas contenir de débris. Ils doivent être déshydratés autant que possible par centrifugation ou filtration sous vide et séchés pendant au moins 12 h à 110°C.
- Filtrer les échantillons aqueux pour l'analyse avec un GF/C de pores 0,45 µm sous vide.

9.4.2. Extraction et concentration

- a) Extraire les analytes cibles par SPE à partir d'échantillons aqueux.
- b) Utiliser l'extraction à ultrasons avec du MeOH:EDTA-tampon Mcilvaine pH = 6 (90:10, v/v) pour extraire les échantillons solides.
- c) Pour éliminer les extraits indésirables/interférences des extraits solides, utiliser la même procédure SPE que pour les échantillons aqueux.
- d) Utiliser de l'EDTA-tampon Mcilvaine (pH 6) comme solvant d'extraction pour éviter la chélation, notamment des tétracyclines.
- e) Filtrer les échantillons de sol avec de la célite 545 (moins de 1 g).
- f) Utiliser des articles en plastique lors de la préparation et de la manipulation des échantillons pour éviter l'adsorption qui pourrait réduire les taux de récupération.
- g) Utiliser un composé au C18 pour le rinçage des échantillons.

9.4.3 . Résumé de la préparation des échantillons

- a) Peser 3 à 5 mg d'échantillon solide (fumier solide).
- b) Ajouter du MeOH:EDTA-tampon Mcilvaine (90:10, v/v) (pH = 6) ; 3 x 30 ml, et passer à l'ultra-sonicateur pendant 20 min.
- c) Filtrer avec GF/C et un composé de célite 545.
- d) Charger 1 g de C18 de SPE sur une rampe (activer et prétraiter avec 5 ml de MeOH, 5 ml de tampon d'EDTA de Mcilvaine (pH = 4).
- e) Filtrer l'échantillon.
- f) Éluer l'échantillon avec 10 ml de H₂O ; jeter et ajouter 20 ml d'acide oxalique 0,01 M dans du MeOH.
- g) Sécher l'échantillon sous N₂ et ajouter du MeCN:H₂O (10:90, v/v).
- h) Injecter l'échantillon solide dans le système de CL-SM/SM.
- i) Mesurer ≤ 100 ml d'échantillon aqueux (H₂O/lisier).
- j) Filtrer sous vide avec un GF/C et un composé de célite 545.
- k) Charger 1 g de C18 de SPE sur une rampe (activer et prétraiter avec 5 ml de MeOH, 5 ml d'EDTA-Mcilvaine tampon pH = 4.
- l) Filtrer l'échantillon.

- m) Éluer l'échantillon avec 10 ml de H₂O ; jeter et ajouter 20 ml d'acide oxalique 0,01 M dans du MeOH.
- n) Sécher l'échantillon sous N₂ et ajouter MeCN:H₂O (10:90, v/v).
- o) Injecter échantillon aqueux dans le système de CL-SM/SM.

9.4.4. Mesure

- Système Acquity de chromatographie liquide ultra performance (UPLC), C18, colonne hybride pontée à éthylène (100 mm x 2,1 mm, diamètre des particules 1,7 µm) ; phase mobile programmable, NH₄HCO₂ 20mM, 20 % de MeOH et NH₄ HCO₂ 20mM, 95 % de MeOH.
- Transitions MRM (m/z) : chlorotétracycline (CTC) 479>444, 479>462, oxytétracycline (OTC) 461>426, 461>443, sulfaméthazine (SMT) 279>124, 279>186, sulfaméthoxazole (SMTZ) 254>108, 254>156 (99), sulfathiazole (STZ) 256>108 255>156 (92), et comme IS, SMTZ-¹³C₆ 260>162 et SMT -¹³C₆ 285>124 (tableau 23).
- Préparer des courbes d'étalonnage en utilisant des étalons dans le solvant/tampon, l'extrait de contrôle de la matrice et la matrice traitée par la procédure d'extraction.

TABLEAU 23. PARAMÈTRES DE SM/SM POUR LES ANALYTES ET LES ÉTALONS INTERNES

Nom générique	Classe	Transition MRM (m/z) Ion précurseur → Ion produit	Tension du cone (V)	CE (eV)
CTC	Tétracyclines	479>444, 479>462	36	18, 18
4-épichlorotétracycline (ECTC)	Tétracyclines	479>444, 479>462	36	18, 18
4-épi-anydrochlorotétracycline (EACTC)	Tétracyclines	461>154, 461>444	36	18, 18
OTC	Tétracyclines	461>426, 461>443	34	18, 14
4-épioxytétracycline (EOTC)	Tétracyclines	461>426, 461>444	34	18, 14
SMT	Sulfamides	279>124, 279>186	40	26, 16
SMT- ¹³ C ₆	Sulfamides	285>124	36	26
SMTZ	Sulfamides	254>108, 254>156 (99)	36	24, 16
SMTZ- ¹³ C ₆	Sulfamides	260>162	30	16
STZ	Sulfamides	256>108, 255>156 (92)	34	20, 14

9.4.5. Évaluation des résultats

- Le taux de récupération (%) des tétracyclines et des sulfamides dans les échantillons aqueux (eau et lisier) devrait être supérieur à 70 % (79,4 à 116 et 76,46 à 110 pour les échantillons solides/semi-solides) comme indiqué dans le tableau 24.
- Les seuils de déclaration des tétracyclines et des sulfamides devraient être inférieurs à 0,05 ngg⁻¹ dans le sol, à 0,1 ngg⁻¹ dans le compost solide (sauf le SMTZ) et à 0,0025 ngg⁻¹ dans le lisier/l'eau (tableau 25).

TABLEAU 24. TAUX MOYEN DE RÉCUPÉRATION DES RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES DANS LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX SOLIDES/SEMI-SOLIDES ET AQUEUX

Nom générique	Sol/compost		Eau/échantillons liquides	
	Moyenne (%)	Coefficient de variation (CV %)	Moyenne (%)	CV (%)
CTC	110,0	7,5	108,0	4,3
ECTC	71,3	8,2	78,2	5,4
EACTC	72,3	9,3	76,6	5,7
OTC	92,5	7,3	79,4	7,2
EOTC	80,3	6,4	82,4	6,7
SMT	101,0	8,4	101,0	7,3
SMTZ	88,7	8,2	89,5	6,3
STZ	77,5	9,4	81,2	7,8

TABLEAU 25. VALEURS DE CC ALPHA ET DE CC BETA ET SEUILS DE DÉCLARATION POUR LES RÉSIDUS DE TÉTRACYCLINES ET DE SULFAMIDES

Nom générique	CC _α (µg/kg)	CC _β (µg/kg)	Seuil de déclaration (µg/kg)	Observation (m/z)
CTC	14,9	25,3	<0,05 (sol) <0,1 (compost solide)	479>444
OTC	19,2	32,7	<0,05 (sol) <0,1 (compost solide)	461>426
SMT	0,4	0,7	<0,05 (sol) <0,1 (compost solide)	279>124
SMTC	0,5	0,9	<0,05 (sol) N/A (compost solide)	254>108
STZ	0,5	0,9	<0,05 (sol) <0,1 (compost solide)	256>108

- Donner les résultats en ng/l pour les échantillons aqueux et en µg/kg pour les solides (échantillons aqueux contenant des particules visibles, solides, sols, sédiments, tourteaux de filtrage, compost) sur la base du poids sec de l'échantillon.

9.4.6. Critères d'acceptabilité

Les critères d'acceptabilité devraient être fondés sur une décision de la Commission européenne [4] concernant les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats.

10. DÉTERMINATION DES RÉSIDUS DE CHLORAMPHÉNICOL DANS LA VIANDE, LES BOYAUX ET LES HERBES PAR LA MÉTHODE ELISA

10.1. PRINCIPE

Cette technique est une version modifiée d'une méthode standard [5] dans laquelle les résidus sont extraits de la viande, des boyaux et des herbes avec du H₂O. Après centrifugation, une partie aliquote du surnageant est rincée par des colonnes Extrelut[®] NT3. Après incubation, le chloramphénicol (CAP) est extrait avec du dichlorométhane et l'éluat final est dilué dans du PBST.

Le principe de détection est le dosage immuno-enzymatique basé sur une réaction antigène-anticorps. Les anticorps polyclonaux (PCA) du lapin sont préparés contre le CAP couplé à l'albumine bovine (BSA). Les puits de la microplaque sont enduits d'anticorps du lapin contre les caprins.

10.2. PORTÉE

Cette méthode peut permettre de détecter le PAC dans la viande et les boyaux (à 0,3 µg/kg) ainsi que dans les herbes à 0,5 µg/kg. Le procédé est également indiqué pour la détection des glucuronides du CAP.

10.3. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS

10.3.1. Produits chimiques/réactifs

Les produits chimiques requis comprennent : l'acétate d'éthyle ; l'iso-octane ; le trichlorométhane ; le n-hexane ; le H₂O désionisé.

10.3.2. Matériel

Le matériel suivant est également requis : bouteilles et couvercles en plastique polyvalents (25 ml et 50 ml) ; produits d'isolation des réactifs (50 ml) ; tubes en verre (12 ml) ; bécher en verre ; embouts de pipettes (10 à 200 µl ; 100 à 1 000 µl et 500 à 5 000 µl) ; balance de précision ; vortex à vitesse variable ; centrifugeuse réfrigérée ; homogénéiseur ; concentrateur d'échantillons ; bain-marie ; lecteur ELISA ; agitateur de microplaque ; pipette à simple canal (10 à 100 µl ; 100 à 1 000 µl et 500 à 5 000 µl) ; pipette multicanaux (25 µl à 300 µl).

10.4. PROCÉDURE

10.4.1. Spécificité et sensibilité

- Cette technique ELISA utilise un anticorps spécifique cultivé chez le lapin contre la protéine du CAP conjugué et il est important de noter la réactivité croisée.
- Préparer une courbe d'étalonnage linéaire dans la plage 0,025 ng/ml à 2 ng/ml.
- Il n'est pas nécessaire d'hydrolyser l'échantillon en raison de la réactivité croisée entre le CAP et son glucuronide.

10.4.2. Traitement de l'échantillon

a) Échantillons de tissus (viande/boyaux)

- Homogénéiser environ 10 g de tissus.
- Mettre 3 g d'échantillon homogénéisé dans un tube en verre.
- Ajouter 6 ml d'acétate d'éthyle et mélanger pendant 10 min.
- Après centrifugation (10 min, 2 000 g), mettre 4 ml d'acétate d'éthyle au moyen d'une pipette dans un tube en verre et évaporer l'acétate d'éthyle à 50 °C sous un courant d'azote doux.
- Dissoudre le résidu gras dans 1 ml d'iso-octane/trichlorométhane (2:3, v/v) et ajouter 1,0 ml de tampon de dilution de l'échantillon. Agiter le mélange pendant 1 min et centrifuger (10 min, 2 000 g).
- S'il y a une émulsion dans la couche supérieure, mettre le tube à essais dans un bain-marie (80 °C) pendant 5 min et centrifuger à nouveau. Mettre au moyen d'une pipette 50 µl du liquide de la couche supérieure dans un tube à essais.
- On peut utiliser du mélange iso-octane/trichlorométhane ou du n-hexane dans la préparation des échantillons. Prélever 50 µl de la couche supérieure lorsqu'on utilise le mélange iso-octane/trichlorométhane ou 50 µl de la couche inférieure lorsqu'on utilise du n-hexane. La récupération peut être meilleure avec le mélange iso-octane/trichlorométhane qu'avec le n-hexane.

b) Échantillon d'herbes

- Broyer 10 à 100 g d'herbes.
- Homogénéiser 5 g du broyat dans 20 ml de H₂O distillé.
- Mettre avec une pipette 5 ml de ce mélange dans un tube en verre.
- Ajouter 10 ml d'acétate d'éthyle et mélanger pendant 30 min.
- Centrifuger à 2 000 g pendant 10 min.
- Mettre avec une pipette 5 ml d'acétate d'éthyle (couche supérieure) dans un tube en verre et évaporer à 50 °C sous un courant d'azote doux.
- Dissoudre le résidu gras dans 0,5 ml d'iso-octane/trichlorométhane (2:3, v/v) et ajouter 0,5 ml de tampon de dilution de l'échantillon.
- Mélanger au vortex pendant 1 min et centrifuger (10 min, 2 000 g).
- Prélever une partie aliquote de 50 µl de la couche supérieure pour le test ELISA.

10.4.3. Préparation des réactifs de la trousse ELISA

Il convient de noter les points suivants :

- a) Les réactifs inclus dans la trousse de test sont suffisants pour au moins 96 analyses (y compris les analyses d'étalons). L'étalon et l'échantillon doivent être analysés en double.
- b) Des étalons prêts à l'emploi sont préparés dans un tampon de dilution. Lorsqu'on utilise une matrice d'échantillon de substitution, les étalons ou les solutions de dopage devraient être préparés dans la matrice de l'échantillon en utilisant la solution étalon de 100 ng/ml fournie.
- c) Avant de commencer l'analyse, amener tous les réactifs à la température ambiante.

- d) Tout réactif non utilisé devrait être immédiatement conservé à une température de +2 à +8 °C. Garder les solutions étalons dans l'obscurité et les conserver à une température de +2 à +8 °C.
- e) Tampon de rinçage : le tampon de rinçage est livré à 20 fois la concentration appropriée. Par conséquent, en préparer des solutions diluées peu avant utilisation. Préparer 40 ml de tampon de rinçage dilué (2 ml de tampon de rinçage concentré + 38 ml de H₂O distillé).
- f) Solution de substrat : la solution de substrat prête à utiliser précipite à 40 °C. S'assurer que le flacon contenant cette solution est à la température ambiante (dans l'obscurité) ; mélanger le contenu avant de le mettre dans les puits à l'aide d'une pipette.
- g) Solution conjuguée : reconstituer la solution conjuguée lyophilisée de CAP avec 4 ml de tampon de reconstitution/d'étalon zéro ; bien mélanger et garder dans l'obscurité jusqu'à utilisation.
- h) Solution d'anticorps : reconstituer les anticorps lyophilisés fournis dans un flacon avec 4 ml de tampon de reconstitution/d'étalon zéro ; mélanger soigneusement et garder dans l'obscurité jusqu'à utilisation.
- i) Tampon de dilution de l'échantillon (4 x la concentration appropriée) : avant dilution (20 ml de solution tampon + 60 ml de H₂O distillé), amener le tampon concentré à la température ambiante et bien mélanger. Bien mélanger avant dilution avec du H₂O distillé. Le tampon dilué peut être conservé au réfrigérateur (+2 à +8 °C) jusqu'à péremption.
- j) Solution étalon (100 ngml⁻¹) : pour préparer des étalons dans la matrice appropriée ou pour préparer les solutions de dopage, utiliser la solution étalon contenant 100 ng de CAP par ml. La diluer dans la matrice appropriée pour constituer une gamme de dilutions de 2 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,2 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,05 ng/ml et 0,025 ng/ml. La concentration de 0,0125 ng/ml peut être incluse en option. L'étalon de référence devrait être préparé à partir de la matrice à l'étude.

10.4.4. Protocole d'essai

- a) Préparer l'échantillon et s'assurer que la microplaque (tableau 26) est prête à l'emploi.
- b) Prélever à la pipette 100 µl de tampon reconstitué/d'étalon zéro en double (puits A1, A2). Prélever à la pipette 50 µl de tampon reconstitué/d'étalon zéro en double (puits B1, B2).
- c) Prélever à la pipette 50 µl de chaque solution diluée en double (puits C1, 2 à H1, 2 soit 0,025 ng/ml, 0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,2 ng/ml, 0,5 ng/ml et 2 ng/ml).
- d) Mettre 50 µl de chaque solution de l'échantillon en double dans les puits restants de la microplaque.
- e) Ajouter 25 µl de CAP conjugué dans tous les puits, excepté les puits A1 et A2.
- f) Ajouter 25 µl de solution d'anticorps dans tous les puits, excepté les puits A1 et A2.
- g) Sceller la microplaque et l'agiter pendant 1 min.
- h) Incuber la plaque pendant 1 h dans l'obscurité à 40 °C (plage acceptable : 20 à 80 °C).
- i) Jeter la solution de la microplaque et laver 3 fois avec un tampon de rinçage.
- j) Vider chaque puits en faisant tourner la plaque à l'envers et en lui imprimant un mouvement vertical bref et sec.
- k) Remplir tous les puits jusqu'au rebord avec la solution de rinçage (300 µl).
- l) Répéter le rinçage 3 fois.

- m) Retourner la plaque et vider les puits par un mouvement vertical bref et vif.
- n) Placer la plaque retournée sur des serviettes en papier absorbant, puis taper sèchement contre la plaque pour éliminer la solution de lavage résiduelle des puits.
- o) Veiller à ce qu'aucun des puits ne sèche avant la distribution du réactif suivant.
- p) Jeter la solution de la microplaque et laver 3 fois avec le tampon de rinçage.
- q) Lorsqu'on utilise un dispositif automatique de rinçage des plaques, vérifier que le contenu de tous les puits peut être complètement aspiré et que la solution de rinçage est correctement dispensée jusqu'au rebord de chaque puits pendant chaque cycle de rinçage. Le dispositif doit être programmé pour effectuer trois cycles de rinçage.
- r) Introduire à la pipette 100 µl de solution de substrat dans chaque puits. Incuber la plaque pendant 30 min à température ambiante (+20 à +25 °C).
- s) Ajouter 100 µl de solution d'obturation dans chaque puits.
- t) Lire immédiatement les valeurs d'absorbance à 450 nm.

Il convient de noter les points ci-dessous lors de l'interprétation des résultats :

- a) Il faut analyser ensemble tous les échantillons de contrôle, les échantillons témoins et les échantillons dopés.
- b) Le témoin ne devrait entraîner aucune réponse en ce qui concerne le CAP.
- c) Pour un échantillon susceptible d'être contaminé (échantillon contenant du CAP), la confirmation par CL-SM/SM est nécessaire.
- d) Pour les échantillons de viande et de plantes : lorsqu'on extrait dans l'acétate d'éthyle et qu'on rince, il faut diviser par deux les équivalents CAP calculés à partir de la courbe d'étalonnage pour obtenir la concentration (ng/g) dans les tissus.
- e) En ce qui concerne les échantillons d'herbes, les équivalents CAP devraient être lus directement à partir de la courbe d'étalonnage. Répartir les échantillons sur l'ELISA comme indiqué dans le tableau 26.

TABLEAU 26. SCHÉMA DE DISTRIBUTION DES 96 PUIITS SUR LA PLAQUE DE MICOTITRAGE ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Témoin	Témoin	Échantillon 1	Échantillon 1								
B	Étalon 1	Étalons 1	Échantillons 2	Échantillons 2								
C	Étalon 2	Étalon 2	Échantillon 3	Échantillon 3								
D	Étalon 3	Étalon 3	Échantillon 4	Échantillon 4								
1E	Étalon 4	Étalon 4	Échantillon 5	Échantillon 5								
F	Étalon 5	Étalon 5	Échantillon 6	Échantillon 6								
G	Étalon 6	Étalon 6	Échantillons 7	Échantillon 7								
H	Étalon 7	Étalon 7	Échantillon 8	Échantillon 8								

11. DÉTERMINATION DES SULFAMIDES DANS LE MUSCLE DE POULET PAR LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

11.1. PRINCIPE

Les tissus du muscle de volaille homogénéisés sont extraits avec de l'acétate d'éthyle. L'extrait est évaporé jusqu'à siccité et le résidu est dissout dans du MeOH:H₂O. Les échantillons sont dégraissés avec de l'essence de pétrole et 25 µl d'extrait de chaque échantillon pulvérisé sur une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) Whatman AL SIL G et développés avec un mélange chloroforme : n-butanol (9:1, v/v). La plaque est séchée et observée à 366 nm après traitement à la fluorescamine à l'aide d'un appareil CAMAG, suivi du balayage des taches d'analytes au moyen d'un scanner CMAC (le cas échéant).

11.2. PORTÉE

Cette méthode est appropriée pour l'analyse des sulfamides dans le muscle de poulet au MLR de 100 µg/kg pour les résidus combinés de toutes les substances du groupe. La POS peut être utilisée pour filtrer les résidus de sulfadiazine (SDZ), de sulfathiazole (STZ), de sulfadoxine (SD), de sulfaméthazine (SMZ) et de sulfaquinoxaline (SQ) dans la viande de volaille à leur MRL.

11.3. MATÉRIEL

11.3.1. Produits chimiques/réactifs

Acide acétique glacial, acétate d'éthyle, essence de pétrole, HCl 0,1 M, MeOH de qualité CLHP (Sigma, qualité CLHP), chloroforme et n-butanol, acétone, fluorescamine, NaOH.

Autres produits requis : azote gazeux, H₂O Milli-Q ; plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) (Whatman AL SIL G/UV) ; étalons de sulfamide : SDZ (Sigma), STZ (Sigma), SMZ (Sigma), SD (Sigma), SQ (Sigma).

11.3.2. Matériel/articles en verre

Le matériel suivant est requis : Ultra-Turrax ; centrifugeuse ; balance de précision (0,01 g) ; densitomètre CAMAG de CCM à balayage avec système d'analyse de données et imprimante ; chambre d'observation de CCM ; articles en verre courants de laboratoire ; tubes de centrifugeuse (15 ml) ; bouteilles en verre de couleur ambrée (100 ml) ; pipettes Pasteur ; réservoir de chromatographie de TCL ; tubes capillaires (25 µl).

11.3.3. Solutions

- a) Solution fluorescente (0,1 M). Dissoudre 10 mg dans 100 ml d'acétone. Préparer fraîchement les solutions.
- b) Système de solvant pour CCM : chloroforme/n-butanol (90:10, v/v). Mettre 9 ml de chloroforme, 1 ml de n-butanol et 10 ml de H₂O désionisé dans une ampoule à décanter. Harmoniser en agitant pendant 30 secondes et laisser les phases se séparer. Recueillir le mélange de solvant du fond. Préparer fraîchement les solvants.

- c) Étalons mères (1 mg/ml). Dissoudre $10 \pm 0,1$ mg d'étalon de sulfamide excepté le SDZ et le SQ dans du MeOH et compléter à la marque de 10 ml dans une fiole jaugée de 10 ml. Dissoudre le SDZ et le SQ dans du NaOH 0,1 M. Conserver à -20 °C dans des flacons de couleur ambrée. Préparer tous les 12 mois.
- d) Mélange d'étalon intermédiaire (100 µg/ml) : mettre des parties aliquotes (1 ml) de la solution mère de sulfamide dans une fiole jaugée de 10 ml et remplir jusqu'à la marque avec du MeOH. Conserver à 4 °C dans un flacon de couleur ambrée. Préparer tous les trois mois.
- e) Étalons de travail (500 ng/ml, 1 000 ng/ml, 2 000 ng/ml, 3 000 ng/ml). Mettre 100 µg/ml du mélange d'étalon (tableau 27) dans une fiole jaugée de 5 ml et remplir à la marque avec du MeOH. Préparer chaque semaine. Conserver dans des flacons de couleur ambrée à 4 °C au réfrigérateur.

TABLEAU 27. PRÉPARATION DES SOLUTIONS POUR LA COURBE D'ETALLONAGE

Concentration de l'étalon (ng/ml)	de	Volume de l'étalon de 100 µg/ml (à 5 ml de volume final)	Concentration de l'étalon (ng/tache)	Équivalent étalon (µg/kg)
0		0	0	0
500		25 µl	12,5	25
1 000		50 µl	25	50
2 000		100 µl	50	100
3 000		150 µl	75	150

11.4. PROCÉDURE

Conserver les échantillons d'étude à -20 °C jusqu'au dosage. Les laisser reposer jusqu'à la température ambiante, et en mettre (environ 5 g de tissus) dans des flacons d'homogénéisation.

11.4.1. Préparation de l'échantillon de contrôle

- a) Mettre deux portions ($3,00 \pm 0,01$ g) de tissus témoins émincés (sans sulfamides) dans des tubes de centrifugeuse de 15 ml.
- b) Ajouter 30 µl de mélange d'étalon intermédiaire (10 µg/ml) à l'échantillon. Cela équivaut à 100 µg/kg de tissus.
- c) Effectuer la procédure de préparation sur l'échantillon non dopé comme blanc de réactifs.
- d) Laisser les échantillons de tissus dopés au repos 15 min avant extraction.

11.4.2. Extraction

- a) Ajouter 0,5 ml de HCl (0,1 M) à l'échantillon et mélanger au vortex pendant environ 20 secondes.
- b) Ajouter 3 ml de H₂O Milli-Q et mélanger au vortex à faible vitesse pendant 10 secondes.
- c) Homogénéiser les échantillons à l'Ultra-Turrax pendant 2 min.
- d) Ajouter 4,5 ml d'acétate d'éthyle et mélanger pendant 10 min à l'aide d'un agitateur rotateur.
- e) Centrifuger pendant 10 min à 3 000 tpm.
- f) Transférer le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur dans un tube à essais.
- g) Répéter les étapes d, e et f.

- h) Évaporer le surnageant jusqu'à siccité sous un courant d'azote à 55 °C.
- i) Dissoudre le résidu sec dans 1 ml de MeOH:H₂O (72:25, v/v) et mélanger au vortex vigoureusement.
- j) Ajouter 1 ml d'essence de pétrole et mélanger doucement.
- k) Jeter la couche de pétrole.
- l) Répéter les étapes j et k.
- m) Transférer la phase aqueuse restante dans des microtubes.

11.5. MESURE

11.5.1. Application des échantillons

- a) Couper la plaque de CCM en fonction des besoins (10 cm × 10 cm).
- b) Appliquer 25 µl d'étalon et d'échantillon ou d'échantillon de contrôle sur la plaque de CCM dans un courant de N₂.
- c) Sécher la plaque à l'aide d'un dessiccateur.

11.5.2 Développement

- a) Mettre le système de solvant dans la chambre de CCM.
- b) Garder la chambre de CCM à la température ambiante pendant 30 min.
- c) Développer la plaque de CCM en mode unidimensionnel linéaire ascendant.
- d) Garder la plaque jusqu'à ce que le front de solvant atteigne sa marge de 9 cm.
- e) Retirer la plaque et la sécher à l'aide d'un dessiccateur.

11.5.3. Dérivatisation

- a) Vaporiser une solution de fluorescamine à 0,1 mg/ml sur la plaque de CCM.
- b) Sécher la plaque à l'aide d'un dessiccateur.

11.5.4. Détection

- a) Observer les plaques développées sous la chambre d'observation.
- b) Balayer les plaques à l'aide d'un scanner CCM.
- c) Observer/balayer les plaques à 366 nm.

11.5.5. Calculs/évaluation

- a) Identifier chaque sulfonamide avec la valeur du facteur de rétention (FR) en comparant la position des différents étalons de sulfonamide respectifs sur la plaque.
- b) Balayer les taches et comparer l'aire du pic de sulfamide concerné à celle de l'étalon de contrôle réglé au seuil maximal de résidus (MRL).

11.5.6. Critères d'acceptation

Les résultats doivent remplir les conditions suivantes :

- a) Les taches des étalons (équivalant au niveau du MRL) doivent être clairement visibles. La valeur de balayage doit être comprise entre la moyenne et $\pm 2 \times$ l'écart-type (SD) des valeurs de référence.

- b) Il ne doit pas y avoir de réponse dans les échantillons témoins négatifs excédant 10% de la réponse équivalente de MRL.
- c) La réponse de l'échantillon de contrôle positif (équivalent MRL) devrait dépasser 50 % de la réponse de l'étalon correspondant (équivalent MRL).
- d) Les valeurs ayant trait au contrôle positif doivent être enregistrées sur le diagramme de la carte de la qualité.

Les échantillons dont la réponse est supérieure au MRL plus $2 \times$ l'écart type relatif (de la répétabilité de l'expérience de validation) sont considérés comme positifs.

12. VALIDATION DES IMMUNODOSAGES

Résumé

Des orientations pratiques sont fournies pour estimer les caractéristiques de performance de la méthode, y compris la spécificité, la réactivité croisée dans la matrice, le seuil de détection (LOD), la capacité de détection (CC β), la répétabilité, l'exactitude et la récupération, la stabilité de l'analyte, la robustesse et les critères d'acceptabilité des techniques d'immunodosage pour les résidus de médicaments vétérinaires. Le protocole peut être adapté à des conditions de laboratoire particulières et utilisé comme procédure opérationnelle standard (POS).

12.1. INTRODUCTION

La validation est le moyen permettant de faire la preuve qu'une méthode d'analyse est appropriée à l'objectif pour lequel elle doit être utilisée. La procédure de validation utilisée pour un immunodosage montrera que celui-ci est un test de détection et si oui ou non ce test est utilisé pour obtenir des résultats quantitatifs. Les tests de détection sont conçus pour donner une faible incidence de faux résultats conformes (faux négatifs) à la concentration suscitant l'intérêt. En revanche, une proportion de faux résultats non conformes (faux positifs) peut être tolérée. La procédure de validation adoptée pour un immunodosage devrait refléter cette distinction importante dans les critères de performance. Un certain nombre d'autorités différentes ont élaboré des lignes directrices pour la validation des tests utilisés dans l'analyse des résidus, telles que la décision 2002/657/CE de la Commission européenne [4].

12.1.1. Spécificité de la méthode

La spécificité s'entend ici de la capacité de la méthode de faire la distinction entre l'analyte mesuré et d'autres substances interférentes potentielles. En immunodosage, la spécificité de la procédure est une caractéristique de l'anticorps utilisé. Des composés de structure chimique similaire à celle de l'analyte ou des analytes étudié(s) doivent être testés pour déterminer leur réactivité croisée (CR) par rapport à l'anticorps.

12.1.1.1. *Évaluation de la réactivité croisée dans la matrice*

La présence de matrice dans un essai influe énormément sur l'interaction qui se produit entre un anticorps et un analyte et peut avoir des effets marqués sur la réactivité croisée de l'anticorps.

Il faut évaluer chaque réactivité croisée pour chaque matrice à laquelle le test sera appliqué.

12.1.2. Seuils de détection des tests

- Le seuil de détection de cette méthode est une valeur à laquelle ou au-dessus de laquelle on peut conclure que l'analyte est présent dans un échantillon. Il peut être déterminé par l'analyse d'au moins 20 échantillons témoins selon la procédure en cours de validation. La concentration moyenne apparente de ces échantillons plus 3 fois le SD de la moyenne est considérée comme le LOD. Cela peut être utilisé pour des tests qualitatifs ou quantitatifs.
- Pour illustrer cela, 20 échantillons de viande de volaille sont analysés pour déterminer la présence de CAP par une méthode ELISA et la concentration moyenne détectée est de 0,05 avec un écart-type de 0,04 µg/kg. Le LOD serait alors de 0,17 µg/kg.

12.1.2.1. $CC\beta$

- $CC\beta$ est la plus petite teneur d'une substance qui peut être détectée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur de β . Un taux de faux résultats conformes (probabilité d'erreur) de 5 % ou moins est toléré dans les tests de détection, selon les directives de l'Union européenne [4].
- A titre d'illustration, enrichir 20 échantillons témoins à des concentrations différentes de CAP (0,15 µg/kg, 0,20 µg/kg et 0,25 µg/kg). Si le LOD est de 0,17 µg/kg et que l'analyse de 19 des 20 échantillons (95 %) donne des résultats non conformes, alors on peut attribuer la valeur approximative de 0,20 µg/kg à la $CC\beta$.
- La valeur de la $CC\beta$ doit être déterminée individuellement pour chaque matrice et pour les grandes différences.

12.1.2.2. $CC\beta$, MRL et seuils minimums de performance requis (MRPL)

- Avant d'essayer de valider la méthode, déterminer quelle devrait être la $CC\beta$ pour les substances avec MRL et MRPL.
- Pour les composés avec MRL, la $CC\beta$ devrait être d'environ 50 % du MRL.
- Pour les substances avec MRPL, la $CC\beta$ devrait être aussi faible que possible et certainement inférieure au MRPL.

12.1.3. Répétabilité

Les données de répétabilité ne sont nécessaires que pour les tests quantitatifs et semi-quantitatifs.

- En règle générale, la mesurer en dopant un certain nombre (≥ 10) d'échantillons ayant la même concentration de l'analyte.
- Exécuter la procédure d'extraction des échantillons et mesurer la concentration du médicament détecté dans une procédure d'immunodosage unique (détermination de la variation intra-essai).
- Répéter cela sur au moins deux autres jours pour calculer la variation entre essais.
- Exprimer les résultats en % des coefficients de variation (CV), le rapport en pour cent de la moyenne par rapport au SD.
- Pour les substances avec MRL, doper chaque combinaison de type/matrice à 0,5, 1,0 et 1,5 fois le MRL ($n > 5$).
- Enregistrer les résultats après l'analyse comme moyenne et CV pour chaque combinaison de type/matrice.
- Pour les substances avec MRPL, doper chaque combinaison de type/combo à 1,0, 1,5 et 2 fois la CC β ($n > 5$).
- Enregistrer les résultats après analyse comme moyenne et CV pour chaque combinaison de type/matrice.

12.1.4. Exactitude et récupération

On peut préparer une courbe d'étalonnage en dopant les échantillons témoins avec les calibrants et en effectuant l'extraction de ces échantillons par la même procédure que pour des échantillons inconnus.

- Pour une vraie récupération, préparer deux courbes d'étalonnage. Dans une série, ajouter les calibrants avant l'extraction, et dans la seconde ajouter les calibrants après l'extraction (c'est-à-dire que la valeur est de 100 %).
- La récupération peut être calculée pour le premier lot de calibrants par rapport à une courbe d'étalonnage construite à partir du deuxième lot.

12.1.5. Stabilité de l'analyte

Concevoir un protocole pour déterminer la stabilité des étalons préparés dans les conditions à la fois de lumière et d'obscurité et à une plage de températures aussi large que possible (comme -17 à 23 °C et +4 à +8 °C).

Au cours des expériences :

- Lorsque cela est possible, utiliser la CL-SM/SM comme méthode de référence.
- Lorsqu'on essaie d'utiliser un immunodosage pour déterminer la stabilité d'un analyte, une série de courbes d'étalonnage peut être utilisée pour comparer les résultats, par exemple avec la même série d'étalons et des réactifs conservés dans l'obscurité pendant une, deux, et quatre semaines à +4 °C.
- Effectuer un test de stabilité de l'analyte dans la matrice en utilisant de préférence une matière connue comme étant contaminée.

- En l'absence d'une telle matière, les mesures peuvent être faites avec des échantillons dopés.
- Doper les échantillons à une concentration « importante » (par exemple au MRL ou au MRPL).
- Conserver les échantillons dopés au congélateur et effectuer les essais à intervalles réguliers sur une certaine période de temps.
- S'il s'écoule beaucoup de temps entre la préparation et l'analyse des extraits d'échantillons, des données devraient être produites pour montrer qu'il n'y a pas de perte notable d'analyte au cours de cette période.
- Doper et extraire une gamme d'échantillons avec l'analyte (pour déterminer la perte). Il faudrait tester la moitié des extraits immédiatement et conserver l'autre moitié à +4 °C et la tester après 24 heures.

12.1.6. Robustesse

- Mesurer la sensibilité du test à d'autres variables telles que l'opérateur, l'équipement, l'environnement de laboratoire et les réactifs.
- Répéter les tests au moins trois fois en utilisant, autant que possible, différents opérateurs, différents équipements et différents lots de réactifs.

12.1.7. Critères d'acceptabilité

Inclure les critères d'acceptabilité dans les POS pour le test ELISA (une fois le test pleinement validé et jugé suffisamment sensible et spécifique pour l'utilisation courante).

Les critères possibles qui pourraient être inclus comprennent :

- Une absorbance de l'étalon zéro supérieure à 0,5 et inférieure à 1,6 unité de densité optique.
- Une densité optique cible de 1,0 avec un temps de développement de 8 à 16 min (cible : 12 min).
- L'absorbance du calibrant au point médian par rapport à l'étalon zéro, calculée comme suit: $\text{pourcentage au point médian} = 100 \times \frac{\text{l'absorbance du calibrant au point médian}}{\text{l'absorbance de l'étalon zéro}}$.
- Une réduction de la densité optique supérieure à 60 % (une forte indication que la sensibilité de la méthode est suffisante pour l'analyse).
- Examiner la répétition de l'analyse de chaque échantillon en utilisant le CV en pour cent. Ce pourcentage devrait être inférieur ou égal à 20. S'il est supérieur à 20 et que toutes les répétitions sont soit au-dessus soit au-dessous du niveau d'action, alors la moyenne devrait être acceptée. Si le pourcentage du CV est supérieur à 20 et que les concentrations chevauchent le niveau d'action, l'analyse devrait être répétée.
- Les échantillons de contrôle devraient donner l'interprétation correcte (un contrôle négatif donne un résultat négatif).

13. VALIDATION DES MÉTHODES D'ANALYSE POUR LA DÉTECTION DE RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES

13.1. PORTÉE

La gamme de méthodes d'analyse utilisées pour les résidus de médicaments vétérinaires est actuellement variée et comprend, entre autres, des techniques comme l'immunodosage, l'inhibition microbiologique, les bio-essais, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et la chromatographie sur couche mince (CCM). Les méthodes d'analyse peuvent être des procédures qualitatives, semi-quantitatives ou quantitatives. Les informations ci-dessous servent de guide pour le niveau minimum de validation requis afin de démontrer qu'une méthode d'analyse est adaptée à son objet. Les éléments choisis pour la validation des méthodes qualitatives et semi-quantitatives varient en fonction de la méthode concernée. La Commission de l'UE a établi des critères de performance pour les méthodes d'analyse en vue de la détection des résidus de certaines substances [4].

13.2. PLAN DE VALIDATION

- Le plan de validation est applicable à toutes les méthodes, qu'elles existent déjà ou soient en cours d'élaboration.
- La méthode devrait être à un stade avancé d'élaboration et la procédure devrait être démontrée dans le cadre d'une procédure opérationnelle standard (POS).
- Identifier la portée de la méthode et déterminer son mode de validation dans le plan de validation. La portée comprendra la gamme de concentrations dans laquelle le procédé doit être utilisé ainsi que le type et l'espèce de tissu à analyser.
- On peut ajouter d'autres paramètres avec le temps et modifier le plan de validation en cas de besoin.
- Pour les méthodes déjà utilisées, les données existantes peuvent appuyer la validation (à condition que les conditions spécifiées dans la POS et le plan de validation soient remplies).
- Le cas échéant, une fois la validation terminée, le plan de validation et les données seront soumises à une personne désignée pour vérification.
- Réviser la POS (et les paramètres de qualité connexes en conséquence) après la vérification.
- Si des modifications sont apportées, leur effet doit être documenté et si nécessaire, une nouvelle validation doit être effectuée.

13.3. VALIDATION PAR LA MATRICE ET L'ESPÈCE

- La méthode devrait être validée dans la matrice ou les matrices pour lesquelles le test est prévu.
- Si elle est utilisée pour l'analyse d'une ou plusieurs espèces, et de multiples matrices, les éléments clés de la validation tels que la courbe d'étalonnage, la récupération et la variation intra-essai doivent être comparés pour chaque espèce.
- S'il n'y a pas de différences significatives, appliquer la méthode pour ces espèces et effectuer la validation pour l'espèce/la matrice principale.
- Effectuer une validation complète pour chaque espèce/matrice s'il y a des différences notables.

13.3.1. Spécificité/sélectivité

13.3.1.1. Immunodosages

Pour les immunodosages :

- La validation aide à évaluer la capacité de l'antisérum de provoquer une réaction croisée avec tout composé pouvant influencer sur l'analyse. Conduire un test de réactivité croisée de l'antisérum dans la matrice ou les matrices de l'échantillon pour lesquelles le procédé est prévu.
- La validation permettra également d'évaluer la capacité de la méthode de détecter un certain nombre de médicaments au sein d'une famille.
- Sélectionner les médicaments à étudier en notant les facteurs pertinents (par exemple la prévalence probable du composé dans la matrice, leur disponibilité pour utilisation en production animale et les analogues possibles).

13.3.1.2. CCM et CLHP

- Évaluer la spécificité des méthodes chimiques telles que la CLHP et la CCM en déterminant des facteurs tels que les temps de rétention (TR), le facteur de rétention (FR), les valeurs de rétention et les spectres.
- Les déterminations initiales peuvent être effectuées dans un tampon, un solvant ou la phase mobile, le cas échéant.
- Puis procéder à de nouvelles déterminations dans la matrice pour laquelle la méthode doit être utilisée (comparer les résultats avec le profil standard pour le test).
- Introduire une gamme de médicaments dans les tissus/la matrice appropriés et analyser normalement.
- Choisir les médicaments en tenant compte de la prévalence probable du composé dans la matrice, de sa disponibilité pour utilisation en production animale et des analogues possibles.

13.3.1.3. Essais et bio-essais par inhibition microbienne

- Déterminer la spécificité/sélectivité par rapport aux facteurs comme l'environnement, les désinfectants et les enzymes naturelles.
- Évaluer l'effet en testant une gamme d'échantillons sans médicament connus pour chacune des matrices à tester.
- Pour déterminer la spécificité des méthodes d'inhibition quantitatives (par exemple les antimicrobiens dans les aliments d'origine animale en élevage), calculer de préférence le parallélisme de la gamme d'étalons et des gammes d'étalons contenant d'autres médicaments susceptibles d'entraîner des perturbations.

13.3.2. CC α pour les substances interdites

- Pour les substances interdites, considérer CC α comme le niveau de concentration le plus bas auquel une méthode peut déterminer la présence de l'analyte identifié avec une certitude statistique de 1- α .

- Analyser 20 échantillons négatifs pour chaque matrice et calculer le LOD par la formule moyenne + trois écarts-types (SD).
- Vérifier que les échantillons négatifs viennent de différents animaux et, si possible, confirmer ces résultats par une autre méthode.

13.3.3. CC α pour les substances avec MRL

- Pour les substances avec un MRL établi, analyser au moins 20 échantillons négatifs pour chaque matrice enrichie avec l'analyte au MRL.
- La concentration moyenne au MRL plus 1,64 fois le SD correspondant est égale au CC α ($\alpha = 5\%$).

13.3.4. CC β pour les substances interdites

- Tester 20 échantillons témoins représentatifs enrichis au niveau d'intérêt en fonction du CC α de la méthode.
- Si tous les échantillons enrichis sont déclarés positifs, c'est-à-dire que les résultats sont supérieurs au CC α , alors CC β est inférieure au niveau d'enrichissement.
- Si 19 des échantillons enrichis sont déclarés positifs, CC β est égale au niveau d'enrichissement.
- Si 18 ou moins des échantillons enrichis sont déclarés positifs, alors CC β est supérieure au niveau d'enrichissement.

13.3.5. CC β pour les substances avec MRL

- Tester 20 échantillons témoins représentatifs enrichis au MRL ou en-deçà (par exemple, la moitié du MRL si possible).
- Si tous les échantillons enrichis sont déclarés positifs (résultats supérieurs au CC α), alors CC β est inférieure au niveau d'enrichissement.
- Si 19 des échantillons sont déclarés positifs, alors CC β est égale au niveau d'enrichissement.
- Si 18 ou moins des échantillons enrichis sont déclarés positifs, alors CC β est supérieure au niveau d'enrichissement.

13.3.6. Stabilité de l'analyte dans la solution

- Préparer fraîchement des solutions d'analyte(s) et les diluer pour obtenir les concentrations de l'étalon et du contrôle comme spécifié dans la méthode de la POS.
- Analyser les étalons après préparation, puis ajouter les volumes appropriés dans des récipients indiqués, étiqueter et conserver comme suit : dix parties aliquotes dans l'obscurité et la lumière à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Tester les parties aliquotes par rapport à une série d'étalons et de contrôles frais une, deux, trois et quatre semaines après la préparation.
- S'assurer que l'échelle de temps de l'étude reflète les conditions normales de conservation des étalons et la durée de la conservation.

13.3.7. Stabilité de l'analyte dans la matrice

- Utiliser de préférence des matières connues comme étant contaminées, mais s'il n'y en a pas, on peut utiliser des matières dopées.
- Choisir une concentration ou une plage appropriée, par exemple $CC\beta$ ou MRL.
- Répartir les échantillons en cinq parties aliquotes pour chaque concentration et enrichir au niveau choisi.
- Analyser un lot immédiatement, puis après une, deux, quatre et vingt semaines de conservation à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

13.3.8. Stabilité de l'analyte dans l'extrait

- Évaluer la stabilité dans des procédés où l'analyte est extrait dans une solution finale.
- Déterminer la stabilité dans la solution d'analyse et à tout autre stade auquel l'échantillon est laissé.
- Extraire trois lots de contrôles (six répétitions de chaque) par test. Un lot devrait être terminé en une journée.
- Conserver les autres lots et terminer à d'autres dates reflétant l'utilisation probable de la méthode dans les conditions normales d'essai.
- Comparer les résultats entre les différentes périodes de temps et déterminer toute différence significative.

13.4. COURBE D'ÉTALONNAGE

- Utiliser la variation entre essais et intra-essai de la courbe d'étalonnage (pour établir des valeurs d'acceptabilité pour chaque point de la courbe).
- Tracer trois courbes pour le même essai pour déterminer la variation intra-essai.
- Établir la variation entre essais à mesure que la validation progresse.
- Décrire la formule mathématique de la courbe et décrire le degré de correspondance dans les données de validation.

13.5. REPRODUCTIBILITÉ INTRA-LABORATOIRE

- Préparer un lot d'échantillons et les doper avec l'analyte/les analytes pour obtenir une série de concentrations appropriée (soit 1, 1,5 et 2 fois $CC\beta$ ou 0,5, 1 et 1,5 fois MRL).
- Analyser six répétitions à chaque niveau.
- Répéter ces étapes au moins deux fois en utilisant différents opérateurs et différentes conditions environnementales (par exemple les lots de réactifs, les étalons, instruments, etc.).
- Calculer la moyenne et les CV en % pour les échantillons enrichis.

13.6. VARIATION ENTRE ESSAIS ET INTRA-ESSAI

- Préparer un lot d'échantillons et les doper avec l'analyte/les analytes pour obtenir des concentrations équivalant à 1, 1,5 et 2 fois CC β ou 0,5, 1 et 1,5 fois MRL .
- Analyser au moins six répétitions à chaque niveau.
- Répéter ces étapes à nouveau au moins deux autres fois.
- Calculer la moyenne et les CV en % pour les échantillons dopés.
- La concentration de l'analyte pourrait être estimée à partir d'autres paramètres disponibles, tels que la superficie de la zone, la densité optique ou l'absorbance en %.
- Préciser les analytes et leur concentration pour l'étude et inclure ces informations dans le plan de validation.

13.7. RÉCUPÉRATION

Pour la récupération :

- Utiliser la matière de référence certifiée (s'il y en a) ou doper les échantillons témoins.
- Choisir 18 parties aliquotes d'une matrice témoin et doper six parties aliquotes à 1, 1,5 et 2 fois CC β ou 0,5, 1 et 1,5 fois MRL.
- Ajouter de l'analyte à la matrice négative avant tout solvant et attendre qu'il y ait des interactions avec l'échantillon pendant une période déterminée dans la POS avant l'essai.
- Analyser les échantillons et calculer la concentration de chacun d'entre eux.
- Calculer le taux moyen de récupération (rapport en % entre la concentration mesurée et la concentration dopée) et le CV de six résultats à chaque niveau.

13.8. ROBUSTESSE

- Estimer l'effet de variations mineures raisonnables sur la méthode.
- Choisir des facteurs tels que les changements d'opérateur, de la source et de l'âge des réactifs, des solvants, des étalons et des extraits d'échantillons, ainsi que de la vitesse de chauffage, de la température, de la valeur du pH, de l'équipement utilisé ou de tout autre facteur qui pourrait influencer la méthode d'une manière ou d'une autre.
- Déterminer les facteurs qui pourraient influencer sur les résultats.
- Modifier chaque facteur légèrement.
- On peut se référer aux données de validation.
- Effectuer d'autres expériences si un facteur influe sensiblement sur le résultat de la mesure.

RÉFÉRENCES

- [1] ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F.J., Fast and Easy Multi-residue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J AOAC Int.*, **86** 2 (2003) 412–431.
- [2] COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. A summary report on Florfenicol in Fish. The European Agency for The Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicine Evaluation Unit. EMEA/MRL/251/97-Final, July 1997
- [3] GRANJA, R.H., de LIMA, A.C., PATEL, R.K., SALERNOA, A.G., WANSCHER, A.C., Monitoring of Florfenicol residue in fish muscle by HPL-UV with confirmation of suspect results by LC-MS/MS. *Drug Test Anal.*, **4** Suppl 1 (2012) 125–129.
- [4] DÉCISION DE LA COMMISSION 2002/657/CE du 12 août 2002 portant modalités d’application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d’analyse et l’interprétation des résultats. *Journal officiel des Communautés européennes*, L 221/8, 17.8.2002
- [5] EURO-PROXIMA B.V., A microtiter plate based competitive enzyme immuno assay for screening and quantitative analysis of Chloramphenicol in various matrices Chloramphenicol Fast Elisa 5091 CAPF. Arnhem, The Netherlands.

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

%	Pour cent
°C	Degré Celsius
µA	Microampère
µg/kg	Microgramme par kilogramme
µm	Micromètre (microns)
AG	Aminoglycoside
AIEA	Agence internationale de l'énergie atomique
MeCN	Acétonitrile
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
Ar	Argon
B ₀	Liaison maximale
C18	Carbone 18
CC _α	Seuil de décision
CC _β	Capacité de détection
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CL-SM/SM	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
CPM	Coups par minute
CQ	Contrôle de qualité
CV	Coefficient de variation
Da	Dalton
DFL	Détecteur de fluorescence
DMSO	Diméthyl sulfoxide
EDTA	Acide éthyl-diamine-tétra-acétique
ELISA	Dosage immuno-enzymatique
ESI	Électronebulisation en mode d'ionisation ESI+
eV	Électron-volt
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FFA	Florfénicol-amine
FFC	Florfénicol
g	Gramme
g/l	Grammes par litre
h	Heure
H ₂ O	Eau
HCl	Acide chlorydrique
HFBA	Acide hepta-fluoro-butyrique
HLB	Balance-hydrophile-lipophile
IgG	Immunoglobuline G
IS	Étalon interne
kg	Kilogramme
kV	Kilovolts
l/h	Litres par heure
m/z	Rapport masse sur charge
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
MgSO ₄	Sulphate de magnésium
min	Minute
ml	Millilitre
ml/min	Millilitres par minute

mm	Millimètre
mM	Millimolaire
mmHg	Millimètres de mercure
mol/l	Mole par litre
MRL	Seuil maximum de résidus recommandé
MRM	Surveillance de réactions multiples
msec	Millisecondes
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxide de sodium
ng/µl	Nanogrammes par microlitre
ng/g	Nanogrammes par gramme
nm	Nanomètre
PBS	Tampon phosphate salin
PoEMS	Étalon de la matrice dopé après extraction
POPOP	1, 4 – bis (5 phényl–2–oxazolyl benzène)
POS	Procédure opérationnelle standard
PPO	2, 5, diphényl oxazole
PRC	Projet de recherche coordonnée
PrEMS	Étalon de la matrice dopés avant extraction
PSA	Amine secondaire primaire
psi	Livres par pied carré
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
QuEChERS	Rapide, facile, abordable, efficace, robuste et sûre
r ²	Coefficient de régression
RIA	Radio-immunodosage
rpm	Révolutions par minute
RSD	Écart-type relatif
Sec	Seconde
SPE	Extraction en phase solide
SSNI	Solution étalon secondaire I
SSNII	Solution étalon secondaire II
TCA	Acide trichloro-acétique
TPP	Triphénylphosphate
TR	Temps de rétention
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultra-violet
V	Volt
v/v	Volume par volume
v/v/v	Volume par volume par volume
Vol	Volume
w/w	Poids par poids
µg/ml	Microgrammes par millilitre
µl	Microlitre

PERSONNES AYANT COLLABORÉ À LA RÉDACTION ET À L'EXAMEN

- A. Cannavan (AIEA)
- E. G. Nacif (AIEA)
- Les participants au PRC des organismes ci-dessous :
 - Centre national des sciences et technologies nucléaires (Tunisie)
 - Chemical Analysis and Physical Testing Center, Shenzhen Center for Disease Control (Chine)
 - Institute for Global Food Security School of Biological Sciences, Queen's University, Belfast (Royaume-Uni)
 - Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-Products (IQSTAP), Chinese Academy of Agricultural Sciences (Chine)
 - Kenya Agricultural Research Institute, Trypanosomiasis Research Centre (Kenya Agricultural and Livestock Research Organization)
 - Laboratório Microbóticos (Brésil)
 - Ministère de l'agriculture, Service national de la santé agraire (Pérou)
 - Ministère de l'agriculture et des coopératives, Département du développement des productions animales (Thaïlande)
 - Ministry of Agriculture and Light Industry, State Central Veterinary Laboratory of Mongolia (Mongolie)
 - Ministry of Food and Drug Safety, Busan Regional Food and Drug Administration, Center for Food and Drug Analysis and Animal and Plant Quarantine Agency (République de Corée)
 - Agence autrichienne de la santé et de la sécurité sanitaire des aliments (Autriche)
 - RIKILT – Wageningen University and Research Centre (Pays-Bas)
 - Université technique de Munich (Allemagne)
 - Université Estadual Paulista, Faculté de médecine vétérinaire (Brésil)
 - Université de Gand, Faculté de médecine vétérinaire (Belgique)
 - Université de Peradeniya, Faculté de médecine vétérinaire et des sciences animales, Département de la santé et de la pharmacologie vétérinaires, Peradeniya (Sri Lanka)



IAEA

Agence internationale de l'énergie atomique

N° 24

OÙ COMMANDER ?

Dans les pays suivants, vous pouvez vous procurer les publications de l'AIEA disponibles à la vente chez nos dépositaires ci-dessous ou dans les grandes librairies.

Les publications non destinées à la vente doivent être commandées directement à l'AIEA. Les coordonnées figurent à la fin de la liste ci-dessous.

ALLEMAGNE

Goethe Buchhandlung Teubig GmbH

Schweitzer Fachinformationen

Willstätterstrasse 15, 40549 Düsseldorf, ALLEMAGNE

Téléphone : +49 (0) 211 49 874 015 • Fax : +49 (0) 211 49 874 28

Courriel : kundenbetreuung.goethe@schweitzer-online.de • Site web : <http://www.goethebuch.de>

BELGIQUE

Jean de Lannoy

Avenue du Roi 202, 1190 Bruxelles, BELGIQUE

Téléphone : +32 2 5384 308 • Fax : +32 2 5380 841

Courriel : jean.de.lannoy@euronet.be • Site web : <http://www.jean-de-lannoy.be>

CANADA

Renouf Publishing Co. Ltd.

22-1010 Polytek Street, Ottawa, ON K1J 9J1, CANADA

Téléphone : +1 613 745 2665 • Fax : +1 643 745 7660

Courriel : order@renoufbooks.com • Site web : <http://www.jean-de-lannoy.be>

Bernan Associates

4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Téléphone : +1 800 865 3457 • Fax : +1 800 865 3450

Courriel : orders@bernan.com • Site web : <http://www.bernan.com>

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Bernan Associates

4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Téléphone : +1 800 865 3457 • Fax : +1 800 865 3450

Courriel : orders@bernan.com • Site web : <http://www.bernan.com>

Renouf Publishing Co. Ltd.

812 Proctor Avenue, Ogdensburg, NY 13669-2205, ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Téléphone : +1 888 551 7470 • Fax : +1 888 551 7471

Courriel : orders@renoufbooks.com • Site web : <http://www.renoufbooks.com>

FÉDÉRATION DE RUSSIE

Scientific and Engineering Centre for Nuclear and Radiation Safety

107140, Moscou, Malaya Krasnoselskaya st. 2/8, bld. 5, FÉDÉRATION DE RUSSIE

Téléphone : +7 499 264 00 03 • Fax : +7 499 264 28 59

Courriel : secnrs@secnrs.ru • Site web : <http://www.secnrs.ru>

FRANCE

Form-Edit

5 rue Janssen, B.P. 25, 75921 Paris CEDEX, FRANCE

Téléphone : +33 1 42 01 49 49 • Fax : +33 1 42 01 90 90

Courriel : fabien.boucard@formedit.fr • Site web : <http://www.formedit.fr>

Lavoisier SAS

14 rue de Provigny, 94236 Cachan CEDEX, FRANCE
Téléphone : +33 1 47 40 67 00 • Fax : +33 1 47 40 67 02
Courriel : livres@lavoisier.fr • Site web : <http://www.lavoisier.fr>

L'Appel du livre

99 rue de Charonne, 75011 Paris, FRANCE
Téléphone : +33 1 43 07 43 43 • Fax : +33 1 43 07 50 80
Courriel : livres@appeldulivre.fr • Site web : <http://www.appeldulivre.fr>

HONGRIE

Librotrade Ltd., Book Import

Pesti ut 237. 1173 Budapest, HONGRIE
Téléphone : +36 1 254-0-269 • Fax : +36 1 254-0-274
Courriel : books@librotrade.hu • Site web : <http://www.librotrade.hu>

INDE

Allied Publishers

1st Floor, Dubash House, 15, J.N. Heredi Marg, Ballard Estate, Mumbai 400001, INDE
Téléphone : +91 22 4212 6930/31/69 • Fax : +91 22 2261 7928
Courriel : alliedpl@vsnl.com • Site web : <http://www.alliedpublishers.com>

Bookwell

3/79 Nirankari, Delhi 110009, INDE
Téléphone : +91 11 2760 1283/4536
Courriel : bkwell@nde.vsnl.net.in • Site web : <http://www.bookwellindia.com>

ITALIE

Libreria Scientifica "AEIOU"

Via Vincenzo Maria Coronelli 6, 20146 Milan, ITALIE
Téléphone : +39 02 48 95 45 52 • Fax : +39 02 48 95 45 48
Courriel : info@libreriaaeiou.eu • Site web : <http://www.libreriaaeiou.eu>

JAPON

Maruzen-Yushodo Co., Ltd.

10-10, Yotsuyasakamachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0002, JAPON
Téléphone : +81 3 4335 9312 • Fax : +81 3 4335 9364
Courriel : bookimport@maruzen.co.jp • Site web : <http://maruzen.co.jp>

RÉPUBLIQUE TCHÈQUE

Suweco CZ, s.r.o.

SESTUPNÁ 153/11, 162 00 Prague 6, RÉPUBLIQUE TCHÈQUE
Téléphone : +420 242 459 205, • fax : +420 284 821 646
Courriel : nakup@suweco.cz • Site web : <http://www.suweco.cz>

Les commandes de publications destinées ou non à la vente peuvent être adressées directement à :

Section d'édition de l'AIEA, Unité de la promotion et de la vente
Agence internationale de l'énergie atomique
Centre international de Vienne, B.P. 100, 1400 Vienne (Autriche)
Téléphone : +43 1 2600 22529 ou 22530 • Fax : +43 1 2600 29302
Courriel : sales.publications@iaea.org • Site web : <http://www.iaea.org/books>

