

Méthode d'analyse en sécurité sanitaire des aliments

RÉFÉRENCE : ANSES/LMV/16/01 version 1

Juillet 2016

Méthode de détection et dosage de résidus d'aminosides dans le muscle et le lait par CL-SM/SM

Laboratoire de Fougères

**Laboratoire national de référence Résidus de médicaments
vétérinaires et colorants dans les denrées alimentaires
d'origine animale et aliments pour animaux**

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.



Historique de la méthode

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

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
0	-	Février 2016	Version initiale soumise à consultation
1	Mineures	Juillet 2016	Modifications suite à consultation et à l'atelier de formation des 20 et 21/04/2016 à Anses Fougères



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de Fougères

Laboratoire National de Référence Résidus Médicaments Vétérinaires

Adresse : 10B rue Claude Bourgelat – Javené – CS 40608 35306 FOUGERES Cedex

Contacts : lnr-rmv@anses.fr - Marie-Pierre CHOTARD et Murielle GAUGAIN

La présente méthode a été optimisée, caractérisée et validée par l'unité Analyses des résidus et Contaminants du laboratoire de Fougères.



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application	7
2 Documents de référence	8
3 Termes, sigles et définitions	8
4 Principe de la méthode	9
5 Réactifs	9
5.1 Eau	9
5.2 Gaz	9
5.3 Réactifs	10
5.4 Solutions.....	10
5.5 Substances standards et préparation des solutions mères	10
5.6 Solutions de travail.....	13
6 Appareillage et matériels	15
6.1 Matériel de Laboratoire	15
6.2 Matériel de chromatographie.....	15
6.3 Spectrométrie de masse	16
7 Échantillons.....	16
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	16
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	16
8 Mode opératoire	16
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	16
8.2 Préparation des échantillons de matrice supplémentés de contrôle (dépistage)	16
8.3 Préparation des standards d'étalonnage (confirmation).....	17
8.4 Extraction	18
8.5 Analyse et détection par CL-SM/SM	18
9 Résultats	22
9.1 Contrôle de la validité des résultats	22
9.2 Calculs et expression des résultats	23
10 Caractéristiques de performance de la méthode	26
10.1 Performances quantitatives dans le muscle.....	26
10.2 Performances quantitatives dans le lait.....	26
10.3 Limites de détection pour le dépistage	27
Annexe : Mentions de danger.....	28
Bibliographie.....	30



Introduction

La présente méthode a été développée pour le contrôle des échantillons officiels mis en œuvre dans le cadre de la directive (EC) 96/23 du 29 avril 1996 relative aux contrôles de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits. Cette méthode est applicable pour le dépistage de l'ensemble des aminosides inscrits dans le tableau 1 du règlement de la commission (EU) 37/2010 du 22/12/2009 et pour la confirmation d'une partie de ces aminosides.



Avertissements et précautions de sécurité

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

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

Cette méthode implique la connaissance par l'opérateur des règles usuelles de manipulation des produits chimiques et des solvants. Elle devra être, autant que possible, mise en œuvre sous hotte ventilée. Toutes les précautions nécessaires devront être prises lors de la manipulation des standards (pesées sous hotte, port de gants...). Il est important de bien vérifier les risques associés à chaque produit (en annexe) avant de les utiliser.



1 Objet et domaine d'application

La méthode a pour objet la détection et le dosage de certains aminosides dans le muscle d'animaux de boucherie et de volaille et dans le lait entier (bovin, ovin, caprin). Les aminosides sont classés dans le tableau I (substances autorisées) du règlement de la commission (EU) N° 37/2010 du 22/12/2009. La liste des aminosides, leurs conditions d'autorisation et les Limites Maximales en Résidus dans le muscle et le lait sont données dans le tableau ci-dessous :

Substance active / résidu marqueur	LMR muscle (µg/kg)	LMR lait (µg/kg)
Apramycine	1000 (bovins)	Ne pas utiliser chez les animaux produisant du lait destiné à la consommation humaine 200*
Dihydrostreptomycine (DHS)	500 (ruminants, porcins, lapins)	200 (tous ruminants)
Gentamicine / somme Gentamicine C1, C1a, C2, C2a	50 (bovins, porcins)	100 (bovin)
Kanamycine / Kanamycine A	100 (toutes espèces productrices d'aliments excepté le poisson)	150 (toutes espèces)
Néomycine / Néomycine B (Framycétine)	500 (toutes espèces productrices d'aliments)	1500 (toutes espèces)
Paromomycine (Aminosidine)	500 (toutes espèces productrices d'aliments)	Ne pas utiliser chez les animaux produisant du lait destiné à la consommation humaine 200*
Spectinomycine	300 (toutes espèces productrices d'aliments)	200 (toutes espèces)
Streptomycine	500 (ruminants, porcins, lapins)	200 (tous ruminants)

*Concentration de validation

Selon les résultats obtenus lors de la validation au sein du laboratoire :

La méthode est applicable en **dépistage** à l'ensemble des aminosides dans le muscle et le lait sur les deux types d'appareils cités ci-dessous.



Selon nos résultats de validation, la méthode est applicable ou non applicable en confirmation selon le tableau suivant. Néanmoins, il conviendra d'adapter ce tableau en fonction des résultats de validation obtenus.

Analyte	TSQ VANTAGE		API4000	
	muscle	lait	muscle	lait
Apramycine	✓	✗	✓	✓
DHS	✓	✓	✓	✓
Gentamicine	✗	✗	✗	✗
Kanamycine	✓	✓	✓	✓
Néomycine	✓	✓	✓	✓
Paromomycine	✓	✓	✓	✓
Spectinomycine	✗	✓	✗	✗
Streptomycine	✗	✓	✓	✓

✓ Méthode applicable selon les critères de la décision (EC) 2002/657.

✗ Méthode non applicable selon les critères de la décision (EC) 2002/657.

La quantification couvre la gamme de concentration suivante : ½ LMR à 1,5 LMR.

Pour l'apramycine et la paromomycine dans le lait (composés non autorisés), la quantification couvre la gamme de concentration suivante : 100 à 300 µg/kg.

2 Documents de référence

- [1] Décision de la Commission Européenne 2002/657/CE du 12 Août 2002. Off J Eur Commun. L221: 8-36.
- [2] Règlement (UE) n°37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009, Journal Officiel de l'Union européenne L15/1 (2010).

3 Termes, sigles et définitions

LMR : Limite Maximale en Résidus

CL-SM/SM : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem



4 Principe de la méthode

La méthode comporte 3 étapes :

- Extraction liquide/liquide après acidification,
- Ultracentrifugation,
- Injection dans le système CL-SM/SM.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec ionisation par électrospray en mode positif est utilisée pour la détection des aminosides. Deux transitions MRM sont suivies pour chaque aminoside. Une colonne analytique C18 de type Kinetex (technologie « core-shell ») ou classique est utilisée pour la séparation par chromatographie liquide haute-performance. L'identification est basée sur la recherche de deux transitions par molécule au temps de rétention correspondant à l'analyte comme défini dans la décision 2002/657/CE de la commission. Deux standards internes différents sont utilisés: la tobramycine et la dihydrostreptomycine méthylée.

5 Réactifs

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

5.1 Eau

Eau ultra pure (MILLI-Q Millipore)

5.2 Gaz

- 5.2.1 Azote à 99,995 % (cuve d'azote).
- 5.2.2 Argon (Air liquide).
- 5.2.3 Air purifié.



5.3 Réactifs

- 5.3.1 Acide heptafluorobutyrique 99,5 % pour analyse, HFBA (Fluka 52411 – N°CAS : [375-22-4])
- 5.3.2 Acide pentafluoro propionique pour analyse, PFPA (Acros Organics 416920500 – N°CAS : [422-64-0])
- 5.3.3 Acétonitrile pour HPLC (Fisher scientific A/0626/17 – N°CAS : [75-05-8])
- 5.3.4 Acétonitrile Optima pour LC/MS (Fischer scientific A/955/212 – N°CAS : [75-05-8])
- 5.3.5 Méthanol (Fisher scientific M/4000/17 – N°CAS : [67-56-1])
- 5.3.6 Acide trichloroacétique (TCA) pour analyse (Merck 1.00807 – N°CAS : [76-03-9])
- 5.3.7 Acide formique qualité Suprapur (Merck 1.11670 – N°CAS : [64-18-6])
- 5.3.8 Acide diaminoéthananetétracétique sel disodique dihydrate, soit Na₂EDTA (Fisher D/0700/50 – N°CAS : [6381-92-6])

5.4 Solutions

- 5.4.1 Solution d'HFBA 1 mmol/l (soit 0,013 %) + PFPA 9,5 mmol/l (soit 0,1 %) dans l'eau (pour la phase mobile) : verser environ 450 ml d'eau ultra pure dans une fiole de 500 ml. Ajouter 65 µl d'HFBA et 500 µl de PFPA puis ajuster à 500 ml avec de l'eau ultra pure.
- 5.4.2 Solution d'HFBA 1mmol/l (soit 0,013 %) + PFPA 9,5 mmol/l (soit 0,1%) dans l'acétonitrile (pour la phase mobile) : verser environ 450 ml d'acétonitrile dans une fiole de 500 ml. Ajouter 65 µl d'HFBA et 500 µl de PFPA puis ajuster à 500 ml avec de l'acétonitrile.
- 5.4.3 Solution de Na₂EDTA 19 mmol/l : peser 0,715 g de Na₂EDTA dans une fiole de 100 ml et ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultra pure.
- 5.4.4 Solution d'acide formique 1 % : verser environ 80 ml d'eau dans une fiole de 100 ml. Ajouter 1 ml d'acide formique puis ajuster à 100 ml avec de l'eau.
- 5.4.5 Solution de TCA 5 % : dissoudre 50 g d'acide trichloroacétique dans 1 l d'eau ultra pure.

5.5 Substances standards et préparation des solutions mères

Les solutions mères sont préparées indépendamment pour chacune des molécules. Peser la quantité de poudre nécessaire pour obtenir des solutions mères à 0,5 mg/ml en substance active (sous la forme base) **dans une fiole en polyméthylpentène (PMP) ou polypropylène (PP)** et diluer avec de l'eau ultrapure ou un mélange eau/méthanol (50:50) en fonction des aminosides (cf tableau ci-dessous). Pour les solutions mères préparées dans le mélange eau/méthanol, la poudre sera dissoute dans l'eau (par agitation aux ultrasons si nécessaire) avant d'ajouter le méthanol. Les solutions sont ensuite transférées dans des flacons en polypropylène et stockées au réfrigérateur pour les solutions aqueuses et au congélateur pour les solutions préparées dans le



mélange eau/méthanol. Si besoin, les concentrations des solutions mères peuvent être adaptées, il faudra alors en tenir compte pour la préparation de SSmuscle et SSLait.



Analytes	Fournisseur	Solvant de préparation et température de conservation	Stabilité solution mère	N°CAS
Apramycine sulfate	Sigma-Aldrich	Eau (5±3°C)	6 mois	[65710-07-8]*
Dihydrostreptomycine sesquisulfate	Sigma-Aldrich	Eau/MeOH (à au moins -18°C)	10 mois	[5490-27-7]
Gentamicine sulfate (mélange Gentamicine C1, C1a, C2 et C2a)	Sigma-Aldrich	Eau (5±3°C)	9 mois	[1405-41-0]
Kanamycine sulfate / Kanamycine A	Sigma-Aldrich	Eau/MeOH (à au moins -18°C)	14 mois	[25389-94-0]
Néomycine sulfate / Néomycine B	Sigma-Aldrich	Eau (5±3°C)	14 mois	[1405-10-3]
Paromomycine sulfate	Sigma-Aldrich	Eau (5±3°C)	9 mois	[1263-89-4]
Spectinomycine dichlorhydrate pentahydrate	Sigma-Aldrich	Eau/MeOH (à au moins -18°C)	14 mois	[22189-32-8]
Streptomycine sulfate	Sigma-Aldrich	Eau/MeOH (à au moins -18°C)	14 mois	[3810-74-0]*
Tobramycine sulfate (Standard Interne)	Sigma-Aldrich	Eau/MeOH (à au moins -18°C)	ND	[32986-56-4]-
N-Methyl-Dihydrostreptomycin (DHS-Me)	Cienytech	Eau/MeOH (à au moins -18°C)	ND	-

Important :

* Toxicité sur la reproduction

- Certains aminosides sous forme base sont moins solubles, il est donc important de conserver les formes préconisées ci-dessus ou de vérifier, le cas échéant, la solubilité du principe actif.
- Pour la préparation des solutions, l'usage de fiole en verre est à éviter. Il faut nécessairement utiliser des fioles en PMP ou PP pour éviter une adsorption des aminosides sur le verre.



5.6 Solutions de travail

Les dilutions seront adaptées en fonction de la concentration de la solution mère. Pour l'étape de confirmation, une solution contenant uniquement l'analyte ou les analytes en question peut être préparée.

Les solutions de supplémentation en aminosides peuvent être conservées deux mois à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ou même à température ambiante. La stabilité des solutions de supplémentation en standard interne n'a pas été vérifiée.

5.6.1 Solution de supplémentation pour le muscle (SSmuscle)

	Volume (μl) à prélever de la SM à 0,5mg/ml et à mettre dans une fiole de 100ml qsp eau	Concentration de la SSmuscle en $\mu\text{g/ml}$
Apramycine	2000	10
Dihydrostreptomycine	1000	5
Gentamicine	100	0.5
Kanamycine	200	1
Néomycine	1000	5
Paromomycine	1000	5
Spectinomycine	600	3
Streptomycine	1000	5

5.6.2 Solution de supplémentation de standards internes en tobramycine (10 $\mu\text{g/ml}$) et DHS-méthylée DHS-Me (10 $\mu\text{g/ml}$) pour le muscle (SS-SI-muscle) :

Pipeter 500 μl de solution mère de tobramycine à 0,5 mg/ml + 500 μl de solution mère de DHS-Me à 0,5 mg/ml + 500 μl de solution de Na_2EDTA 0,5 % dans une fiole de 25 ml et ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultrapure.



5.6.3 Solution de supplémentation pour le lait (SSLait)

	Volume (μl) à prélever de la SM à 0,5mg/ml et à mettre dans une fiole de 100ml qsp eau	Concentration de la SSLait en μg/ml
Apramycine	400	2
Dihydrostreptomycine	400	2
Gentamicine	200	1
Kanamycine	300	1,5
Néomycine	3000	15
Paromomycine	400	2
Spectinomycine	400	2
Streptomycine	400	2

5.6.4 Solution de supplémentation de standards internes en Tobramycine (10 μ g/ml) et DHS-méthylée DHS-Me (2 μ g/ml) pour le lait (SS-SI-lait) :

Pipeter 200 μ l de solution mère de Tobramycine à 0,5 mg/ml + 40 μ l de solution mère de DHS-Me à 0,5 mg/ml + 200 μ l de solution de Na₂EDTA 0,5 % dans une fiole de 10 ml et ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultrapure.



6 Appareillage et matériels

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

6.1 Matériel de Laboratoire

- 6.1.1 Tubes à centrifuger de 16 ml en propylène Nalgène (VWR 525-2855) avec obturateurs (VWR 525-2934).
- 6.1.2 Fioles jaugées en PMP (polyméthylpentène) ou polypropylène de différentes capacités et bouchons adaptés.
- 6.1.3 Flacons à injection en polypropylène
- 6.1.4 Pipettes automatiques de laboratoire et cônes correspondants (Gilson-Biohit).
- 6.1.5 Broyeur (Moulinex).
- 6.1.6 Balance de précision (résolution 0,01 mg).
- 6.1.7 Balance de laboratoire (résolution 0,01 g).
- 6.1.8 Agitateur électrique type Vortex (Bioblock).
- 6.1.9 Agitateur rotatif type Rheax 2 (Heidolph).
- 6.1.10 Ultracentrifugeuse réfrigérée type MR 18.22 (Jouan).
- 6.1.11 Filtres 0,45 µm de diamètre 13 mm type Millex HV PVDF (Millipore) et seringues 1 ml pour filtration.

6.2 Matériel de chromatographie

- 6.2.1 Pompe CLHP Ultimate 3000 (Dionex) ou LC-20AD XR (Shimadzu) ou équivalent.
- 6.2.2 Injecteur automatique Ultimate 3000 (Dionex) ou SIL-20ACXR (shimadzu) ou équivalent.
- 6.2.3 Four à colonne ultimate 3000 (Dionex) ou CTO-20AC (shimadzu) ou équivalent.
- 6.2.4 Colonne Kinetex C18, 2,6 µm, 50 x 2,1 mm (Phenomenex, réf : 00B-4462-AN) avec cartouche de garde C18, 4 x 2 mm (Phenomenex, réf : AJO-4286) ou colonne Symmetry C18, 5 µm, 150 x 3,9 mm (Waters, réf : WAT046980) avec cartouche de garde C18, 4 x 3 mm (Phenomenex, réf : AJO-4287).



6.3 Spectrométrie de masse

- 6.3.1 TSQ Vantage (ThermoScientific) avec interface électrospray chauffée (ESI) et station d'acquisition Xcalibur ou API4000 (Applied-BioSystems) avec interface "turboionspray" et station d'acquisition Analyst ou système équivalent.
- 6.3.2 Vanne de dérivation valco ou équivalent.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Les échantillons doivent être conservés à au moins -18°C jusqu'à analyse.

8 Mode opératoire

- Dans le cadre d'une analyse de dépistage : extraction d'un échantillon blanc témoin, d'un échantillon supplémenté de contrôle au niveau de la LMR et des échantillons à analyser.
- Dans le cadre d'une analyse de confirmation : extraction d'une gamme de supplémentés (5 niveaux avec l'échantillon blanc témoin) et des échantillons à confirmer en double. Dosage des échantillons par rapport à la gamme de supplémentés. Le muscle et le lait utilisés pour les supplémentés doivent être de préférence de la même espèce que celle de l'échantillon à analyser.

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les aminosides dans le muscle et le lait sont stables 2 mois à au moins -18°C. Seule la stabilité de la gentamicine dans le muscle n'a pas été déterminée.

- 8.1.1 Broyer le muscle ou homogénéiser le lait et préparer 1 tube pour le dépistage ou 2 tubes pour la confirmation, contenant chacun $2 \pm 0,04$ g de muscle ou de lait.
- 8.1.2 Ajouter 400 µl d'eau ultrapure à chaque échantillon, agiter.

8.2 Préparation des échantillons de matrice supplémentés de contrôle (dépistage)

Ces échantillons sont supplémentés au niveau de la LMR. Ils peuvent être préparés au préalable puis congelés à au moins -18°C. Ils pourront être conservés tant que l'ensemble des transitions des aminosides sont observables avec un S/N > 3 (2 transitions correspondant aux 2 formes de la gentamicine sont suffisantes). En cas de dégradation d'un analyte, si une estimation de la



concentration est effectuée lors du dépistage, cette concentration sera surévaluée, donc le risque de faux conformes sera minimisé.

8.2.1 Décongeler le muscle broyé ou le lait et préparer des tubes contenant chacun $2 \pm 0,04$ g de muscle témoin ou de lait témoin (exempt d'aminosides).

8.2.2 Ajouter 200 μ l de SS muscle ou SS lait, agiter et congeler l'échantillon si nécessaire.

Il est possible de préparer 4 types d'échantillons supplémentés de contrôle pour représenter le lait et l'ensemble des espèces d'animaux de boucherie. Des échantillons supplémentés de contrôle dans le poulet peuvent être utilisés pour la viande blanche (volailles, lapins,...). Des échantillons supplémentés de contrôle dans le bœuf peuvent être utilisés pour la viande rouge (bœuf, mouton, cheval, chèvre,...). Des échantillons supplémentés de contrôle dans le porc sont préparés. Des échantillons supplémentés de contrôle dans le lait de bovin peuvent être utilisés pour tout type de lait (bovin, caprin, ovin, ...).

8.3 Préparation des standards d'étalonnage (confirmation)

8.3.1 Décongeler le muscle broyé ou le lait et préparer 5 tubes contenant chacun $2 \pm 0,04$ g de muscle témoin ou de lait témoin (exempt d'aminosides).

8.3.2 A chacun des tubes, ajouter les solutions suivantes dans les proportions indiquées afin d'obtenir des standards d'étalonnage supplémentés à 0, 0,5, 1, 1,5 et 2 LMR pour chacun des aminosides.

	Ajout SS muscle ou SS lait	Ajout eau ultrapure
Témoin	0	400 μ l
Supp ½ LMR	100 μ l	300 μ l
Supp LMR	200 μ l	200 μ l
Supp 1.5LMR	300 μ l	100 μ l
Supp 2LMR	400 μ l	0

8.3.3 Agiter et laisser en contact 10 min.



8.4 Extraction

- 8.4.1 Ajouter 200 µl d'acide formique 1 %. Agiter et laisser en contact 10 min.
- 8.4.2 Ajouter 200 µl de solution de standard interne (SS-SI-muscle ou SS-SI-lait). Agiter et laisser en contact 10 min.
- 8.4.3 Ajouter 0,5 ml de solution de Na₂EDTA 0,5 % et agiter.
- 8.4.4 Ajouter 8 ml de solution de TCA 5 % et agiter.
- 8.4.5 Boucher les tubes et agiter 10 min à l'agitateur rotatif à environ 100 tours/min.
- 8.4.6 Centrifuger 5 min à 14000 g à environ 4°C.
- 8.4.7 Filtrer environ 500 µl d'extrait à l'aide de filtres 0,45 µm dans un flacon à injection en polypropylène de 500 µl.

8.5 Analyse et détection par CL-SM/SM

- 8.5.1 Conditions chromatographiques pour le système TSQ VANTAGE
 - 8.5.1.1 Colonne Kinetex C18, 2,6 µm, 50 x 2,1 mm avec cartouche de garde C18, 4 x 2 mm.
 - 8.5.1.2 Température du four de la colonne : 30°C.
 - 8.5.1.3 Température passeur : 10°C.
 - 8.5.1.4 Phase mobile : HFBA 1 mmol/l + PFPA 9,5 mmol/l dans l'eau / HFBA 1mmol/l + PFPA 9,5 mmol/l dans l'acétonitrile en gradient :

Temps (minutes)	HFBA 1 mmol/l + PFPA 9,5 mmol/l eau	HFBA 1 mmol/l + PFPA 9,5 mmol/l acétonitrile
0	98	2
3	50	50
3,1	98	2
5	98	2

- 8.5.1.5 Débit = 400 µl/min
- 8.5.1.6 Volume d'injection = 10 µl
- 8.5.1.7 Temps de rétention : voir tableau ci-dessous.

8.5.2 Conditions de détection spectrométriques pour le système TSQ VANTAGE

8.5.2.1 Vanne de dérivation (Valco) :

La vanne est réglée pour laisser passer la phase mobile dans la source entre 1 et 3 minutes.

8.5.2.2 Conditions de source (spectromètre de masse TSQ Vantage) :

- Method Type : EZ Method (t-SRM)
- Source : HESI en mode positif



- Temps d'acquisition : 5 min
- Position de la source : profondeur C (Z), 0.5 (Y) et 0 (X).
- Température du capillaire de transfert : 330°C
- Vaporizer temperature : 300°C
- Pression du gaz de nébulisation (Sheath gaz) : 50 psi
- Pression du gaz de désolvatation (Aux gaz) : 20 psi
- Pression du gaz rideau (Ion Sweep Gaz) : 5 psi
- Pression du gaz (Argon) dans cellule de collision : 1 mTorr
- Tension du capillaire (Spray voltage) : 3000 V
- Résolution Q1 et Q3 : 0,7
- Chrom Filter peak Width : 5 s
- Cycle time : 0,5 s

8.5.3 Tableau des transitions SRM et temps de rétention pour le système TSQ VANTAGE:

Les valeurs sont données à titre indicatif, les analytes sont à optimiser pour chaque instrument.

	Transition	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	CE	S-Lens	Temps de rétention (min)
Spectinomycine*	1	351,000	98,100	31	120	1,6
	2	351,001	207,100	22	120	
Streptomycine*	1	582,201	263,100	31	205	1,7
	2	582,200	246,000	37	205	
DHS*	1	584,201	263,100	31	177	1,8
	2	584,200	246,100	36	177	
Kanamycine**	1	485,181	163,000	25	100	2,1
	2	485,182	324,200	15	100	
Gentamicine C1a**	1	450,190	322,200	20	73	2,3
	2	450,191	159,960	31	73	
Gentamicine C1**	1	478,090	322,100	19	85	2,4
	2	478,091	156,960	30	85	
Gentamicine C2**	1	464,150	322,180	13	85	2,4
	2	464,151	160,110	23	85	
Apramycine**	1	540,000	217,010	27	131	2,3
	2	540,001	378,150	16	131	
Néomycine**	1	615,100	160,970	36	119	2,4
	2	615,101	162,970	42	119	
Paromomycine**	1	616,200	163,000	32	150	2,3
	2	616,202	293,090	24	150	
DHS-Me (SI)	1	598,300	263,100	32	217	1,8
Tobramycine (SI)	1	468,360	163,000	24	83	2,3

* aminosides dosés avec la DHS-Me comme standard interne

** aminosides dosés avec la Tobramycine comme standard interne



8.5.4 Conditions chromatographiques pour le système API4000

8.5.4.1 Colonne Symmetry C18, 5 µm, 150 x 3,9 mm avec cartouche de garde C18, 4 x 3 mm

8.5.4.2 Température du four de la colonne : 25°C.

8.5.4.3 Température passeur : ambiante.

8.5.4.4 Phase mobile : HFBA 1 mmol/l + PFPA 9,5 mmol/l dans l'eau / HFBA 1mmol/l + PFPA 9,5 mmol/l dans l'acétonitrile en gradient :

Temps (minutes)	HFBA 1 mmol/l + PFPA 9,5 mmol/l eau	HFBA 1 mmol/l + PFPA 9,5 mmol/l acétonitrile
0	90	10
7	50	50
11	50	50
12	90	10
14	90	10

8.5.4.5 Débit = 600 µl/min

8.5.4.6 Volume d'injection = 20 µl

8.5.4.7 Temps de rétention : voir tableau ci-dessous.

8.5.5 Conditions de détection spectrométriques pour le système API4000

8.5.5.1 Vanne de dérivation (Valco) :

La vanne est réglée pour laisser passer la phase mobile dans la source entre 3 et 9 minutes.

8.5.5.2 Conditions de source (spectromètre de masse API4000) :

- Type de scan : MRM (Multiple Reaction Monitoring)
- Ionisation : turbo Spray en mode positif
- Hauteur de l'électrode : 3 mm
- Température de source : 700°C
- Curtain gas : 20 psi
- GS1 : 40 psi
- GS2 : 50 psi
- IS : 5500 V
- EP : 10
- CXP : 15
- CAD : 3
- Method Type : MRM scheduled
- MRM detection window : 60 sec
- Target scan time : 0,8 sec



8.5.6 Tableau des transitions SRM et temps de rétention pour le système API4000:

Les valeurs sont données à titre indicatif, les analytes sont à optimiser pour chaque instrument.

	Transition	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	DP	CE	Temps de rétention (min)
Spectinomycine*	1	351,4	333,0	71	27	4,2
	2	351,4	207,0	71	31	
Streptomycine*	1	582,2	263,0	157	45	4,7
	2	582,2	246,0	157	51	
DHS*	1	584,2	263,0	120	42	4,8
	2	584,2	246,0	120	54	
Kanamycine**	1	485,3	163,0	70	35	5,4
	2	485,3	205,0	70	35	
Gentamicine C1a**	1	450,3	322,0	60	20	5,9
	2	450,3	160,0	56	29	
Gentamicine C1**	1	478,3	322,0	60	20	5,9
	2	478,3	157,0	91	29	
Gentamicine C2**	1	464,3	322,0	60	20	5,9
	2	464,3	160,0	86	29	
Apramycine**	1	540,5	217,0	82	35	5,7
	2	540,5	378,0	82	25	
Néomycine**	1	615,3	161,1	92	45	5,9
	2	615,3	163,1	92	45	
Paromomycine**	1	616,3	163,0	84	45	5,7
	2	616,3	293,0	84	33	
DHS-Me (SI)	1	598,3	263,0	141	45	4,8
Tobramycine (SI)	1	468,2	163,0	66	31	5,8

* aminosides dosés avec la DHS-Me comme standard interne

** aminosides dosés avec la Tobramycine comme standard interne



8.5.7 Séquence d'acquisition

8.5.7.1 Analyse de dépistage

Lors d'analyses de routine de dépistage, les échantillons sont analysés de préférence de la façon suivante:

- Echantillon Témoin
- Echantillon supplémenté de contrôle au niveau de la LMR
- TCA 5 %
- Echantillons à analyser en intercalant éventuellement des injections de TCA 5 %
- Echantillon Témoin
- Echantillon supplémenté de contrôle au niveau de la LMR

8.5.7.2 Analyse de confirmation

Lors d'analyses de routine de confirmation, les échantillons sont analysés de préférence de la façon suivante:

- Echantillon Témoin
- Standards d'étalonnage 0,5 LMR, LMR, 1,5 LMR et 2 LMR
- TCA 5 %
- Echantillons à analyser en double en intercalant éventuellement des injections de TCA 5 %
- TCA 5 %
- Echantillon Témoin
- Standards d'étalonnage 0,5 LMR, LMR, 1,5 LMR et 2 LMR

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

9.1.1 Analyse de dépistage

- La présence des standards internes (SI) dans chaque échantillon doit être vérifiée (standards d'étalonnage et échantillons à analyser).
- Présence des pics chromatographiques d'intérêt (un pour chacune des transitions de l'analyte en question) avec un rapport signal/bruit ≥ 3 dans les échantillons supplémentés à la LMR. Pour la Gentamicine, présence au minimum de deux transitions correspondant à deux formes de la gentamicine avec un rapport signal/bruit ≥ 3 dans les échantillons supplémentés à la LMR.

9.1.2 Analyse de confirmation

- La présence des standards internes (SI) dans chaque échantillon doit être vérifiée (standards d'étalonnage et échantillons à analyser).



- Présence des pics chromatographiques d'intérêt (un pour chacune des transitions de l'analyte en question) avec un rapport signal/bruit ≥ 3 dans les échantillons supplémentés à la $\frac{1}{2}$ LMR.
- Les $CC\alpha$ calculés à chaque série ne doivent pas dépasser les $CC\alpha$ max suivants pour le muscle :

	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$CC\alpha$ max ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Apramycine	1000	1320
DHS	500	678
Kanamycine	100	144
Néomycine	500	678
Paromomycine	500	678
Streptomycine	500	678

- Les $CC\alpha$ calculés à chaque série ne doivent pas dépasser les $CC\alpha$ max suivants pour le lait :

	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$CC\alpha$ max ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Apramycine	200*	100
DHS	200	282
Kanamycine	150	214
Néomycine	1500	1951
Paromomycine	200*	100
Spectinomycine	200	282
Streptomycine	200	282

* Limite arbitraire fixée pour la validation

- Le coefficient de détermination des droites de calibration des transitions 1 doit être supérieur à 0,96. Pour la spectinomycine dans le lait, le coefficient de détermination est toléré jusqu'à 0,93. Ce critère est un critère interne au laboratoire de l'Anses-Fougères lié aux résultats de la validation.

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Critères d'identification du dépistage

La présence d'aminosides dans l'échantillon à analyser est confirmée lorsque les critères définis dans la décision de la commission 2002/657/CE sont réunis, c'est-à-dire :

- Le temps de rétention relatif de l'analyte dans l'échantillon à analyser doit correspondre au temps de rétention relatif des standards d'étalonnage avec une tolérance de $\pm 2,5$ %.



- Présence des pics chromatographiques d'intérêt (un pour chacune des transitions de l'analyte en question) avec un rapport signal/bruit ≥ 3 . Pour la Gentamicine, présence de deux transitions correspondant à deux formes de la gentamicine avec un rapport signal/bruit ≥ 3 .



Attention : La néomycine donne un pic sur les 2 transitions de la paromomycine mais les temps de rétention sont différents.

9.2.2 Estimation de la concentration lors du dépistage

Dans le cadre d'une analyse de dépistage, pour les analytes validés en confirmation seulement (cf **tableau d'applicabilité de la méthode du paragraphe 1 « Objet et domaine d'application »**), la concentration peut être estimée par rapport à un échantillon témoin et à un échantillon supplémenté. Le standard interne adapté à chaque analyte sera utilisé dans ce cas.

9.2.3 Décision suite à l'étape de dépistage

Dans le cas des analytes valides en confirmation et pour lesquels une estimation de la concentration aura été effectuée, l'échantillon suspect sera alors soumis à une analyse de confirmation par le laboratoire agréé si la concentration estimée est supérieure à la $\frac{1}{2}$ LMR.

Dans le cas des analytes non valides en confirmation, l'échantillon suspect sera alors envoyé au LNR pour une analyse de confirmation si le rapport signal/bruit est ≥ 3 .

9.2.4 Critères d'identification de la confirmation

La présence d'aminosides dans l'échantillon à analyser est confirmée lorsque les critères définis dans la décision de la commission 2002/657/CE sont réunis, c'est-à-dire :

- Le temps de rétention relatif de l'analyte dans l'échantillon à analyser doit correspondre au temps de rétention relatif des standards d'étalonnage avec une tolérance de $\pm 2,5$ %.
- Présence des pics chromatographiques d'intérêt (un pour chacune des transitions de l'analyte en question) avec un rapport signal/bruit ≥ 3 .
- Les intensités ioniques relatives des deux pics chromatographiques d'intérêt dans les échantillons analysés doivent être comparées aux intensités relatives des deux pics d'intérêt dans les standards d'étalonnage et respecter les tolérances décrites dans la décision 2002/657/CE.

Intensité ionique relative (% du pic de base)	Limites de tolérance en CL-SM/SM
> 50 %	± 20 %
> 20 à 50 %	± 25 %
> 10 à 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %



9.2.5 Détermination de la concentration

Le dosage est fait à partir de la transition 1 et prend en compte le standard interne (voir tableau des transitions SRM). La droite d'étalonnage est établie à partir des standards d'étalonnage en incluant l'échantillon témoin :

$$Y = ax + b$$

y = aire du pic de l'analyte/aire du pic du standard interne

x = concentration en analyte

a = pente de la droite de régression

b = ordonnée à l'origine

Après identification, la teneur en aminoside ($\mu\text{g}/\text{kg}$) est calculée à partir de l'équation de la droite de régression établie ci-dessus. En pratique, le logiciel de traitement de données est utilisé pour créer une méthode de quantification automatique.

9.2.6 Décision finale – Conformité de l'échantillon

L'échantillon est déclaré non conforme si tous les critères d'identification sont respectés et si la concentration estimée est supérieure à la limite de décision ($CC\alpha$) calculée à partir de la norme ISO 11843. Le $CC\alpha$ calculé à partir de la transition 1 (utilisée pour le dosage) correspond à la limite de décision.



10 Caractéristiques de performance de la méthode

10.1 Performances quantitatives dans le muscle

	Gamme de validation (µg/kg)	TSQ VANTAGE			API 4000	
		Justesse %	CV répétabilité (%)	CV reproductibilité (%)	Justesse %	CV répétabilité (%)
Apramycine	500 - 1500	-2,9 à 0,9	6,3 à 10,1	7,5 à 10,9	-0,1 à 5,9	3,0 à 3,5
Dihydrostreptomycine	250 - 750	0 à 3,5	5,8 à 9,7	7,1 à 10,5	-4,2 à -0,1	3,8 à 6,0
Kanamycine	50 - 150	-6,4 à -4,2	9,4 à 16,7	11,6 à 16,5	3,5 à 7,6	5,3 à 11,3
Néomycine	250 750	-9,1 à -6,9	5,6 à 12,4	5,7 à 11,7	-2,5 à -0,1	4,8 à 8,4
Paromomycine	250 - 750	2,7 à 4,9	8,1 à 11,2	9,5 à 12,0	-5,4 à 1,6	4,7 à 12,3
Streptomycine	250 - 750	/	/	/	2,3 à 5,5	4,9 à 7,6

10.2 Performances quantitatives dans le lait

	Gamme de validation (µg/kg)	TSQ VANTAGE			API 4000		
		Justesse %	CV répétabilité (%)	CV reproductibilité (%)	Justesse %	CV répétabilité (%)	CV reproductibilité (%)
Apramycine	100 - 300	/	/	/	-7,9 à 2,6	7,4 à 10,6	7,4 à 13,8
Dihydrostreptomycine	100 - 300	-4,1 à -0,4	3,5 à 8,6	6,1 à 7,9	-0,5 à 1,8	3,5 à 6,1	3,4 à 7,2
Kanamycine	75 - 225	-1,3 à 3,0	4,7 à 10,1	11,8 à 13,3	-8,8 à 7,4	6,4 à 15,1	6,9 à 19,9
Néomycine	750 - 2250	-3,7 à 2,9	2,2 à 4,2	4,4 à 5,6	-6,6 à -4,4	4,2 à 9,8	5,5 à 13,8
Paromomycine	100 - 300	-0,5 à 2,9	4,3 à 14,1	9,0 à 17,3	-13,4 à -4,9	7,0 à 10,9	9,8 à 15,0
Spectinomycine	100 - 300	-6,2 à -2,3	7,5 à 9,7	7,4 à 12,5	/	/	/
Streptomycine	100 - 300	5,7 à 8,3	3,9 à 8,5	17,9 à 22,2	-1,3 à 1,4	6,6 à 9,5	6,1 à 11,3



10.3 Limites de détection pour le dépistage

Substance	TSQ VANTAGE						API 4000	
	Limite de détection dans le muscle (µg/kg) *			Limite de détection dans le lait (µg/kg) *			Limite de détection dans le muscle (µg/kg) *	Limite de détection dans le lait (µg/kg) *
	Porc	Boeuf	Poulet	Caprin	Bovin	Ovin	Porc	Bovin
Apramycine	118.4	240.4	129.7	88.0	103.0	63.9	313,0	72,3
Dihydrostreptomycine	73.4	228.3	97.6	33.4	51.4	74.9	114,7	54,6
Kanamycine	31.5	28.2	38.9	42.0	57.1	70.0	21,8	76,1
Gentamicine C1a	19.9	15.4	12.9	22.4	16.1	21.4	6,9	19,2
Gentamicine C1	4.4	5.7	16.4	10.5	9.8	12.1	3,4	15,2
Gentamicine C2	9.3	ND	10.9	28.6	38.9	33.2	7,5	23,7
Néomycine	92.3	103.1	77.9	295.6	263.2	260.9	147,2	728,9
Paromomycine	68.9	132.2	61.9	72.3	74.7	115.9	176,2	100,7
Spectinomycine	59.4	152.6	59.3	105.2	123.1	154.2	59,8	149,3
Streptomycine	84.7	235.4	64.1	61.5	61.8	71.4	143,6	89,0

* Calculée à partir du CCβ substances interdites (ou CCβ de détection) : le CCβ le plus élevé des deux transitions a été retenu.



Annexe : Mentions de danger

Analytes	Pictogrammes de danger	Code	Mentions de danger
Apramycine sulfate		H315	Provoque une irritation cutanée.
		H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
		H360	Peut nuire à la fertilité ou au fœtus
Dihydrostreptomycine sesquisulfate		H302	Nocif en cas d'ingestion
Gentamicine sulfate (mélange Gentamicine C1, C1a, C2 et C2a)		H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
		H334	Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Kanamycine sulfate/Kanamycine A		H360	Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.
Néomycine sulfate/Néomycine B		H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
		H334	Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
Streptomycine Sulfate		H302	Nocif en cas d'ingestion.
		H361	Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus.
Tobramycine sulfate		H312	Nocif par contact cutané
		H332	Nocif par inhalation
		H360	Peut nuire à la fertilité ou au fœtus
N-méthyl-dihydrostreptomycine		H302	Nocif en cas d'ingestion



Réactifs	Pictogrammes de danger	Code	Mentions de danger
Acétonitrile		H225 H302 H312 H319 H332	Liquide et vapeurs très inflammables Nocif en cas d'ingestion Nocif par contact cutané Provoque une sévère irritation des yeux Nocif par inhalation
Méthanol		H225 H331 H311 H301 H370	Liquide et vapeurs très inflammables Toxique par inhalation Toxique par contact cutané Toxique en cas d'ingestion Risque avéré d'effets graves pour les organes (ou indiquer tous les organes affectés, s'ils sont connus) (indiquer la voie d'exposition s'il est formellement prouvé qu'aucune autre voie d'exposition ne conduit au même danger)
Acide trichloroacétique		H314 H335 H410	Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires Peut irriter les voies respiratoires Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme
Acide formique		H226 H314	Liquide et vapeurs inflammables Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires
Acide heptafluorobutyrique		H314	Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires
Acide Pentafluoropropionique		H314 H318	Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires Provoque des lésions oculaires graves

Les analytes et les réactifs présents dans la méthode et non notés dans ces tableaux ne représentent aucun danger.



Bibliographie

1. Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K., Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices. *Analytica Chimica Acta* 711, 46-53.
2. LOFFLER, D. T., T.A., Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography electrospray-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1903, 1000, 583-588.
3. ISOHERRANEN, N. S., S., Chromatographic Methods for Analysis of Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of Association Official Analytical Chemistry* 1999, 82, 1017-1045.
4. Oertel, R.; Neumeister, V.; Kirch, W., Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *Journal of Chromatography A* 2004, 1058, 197-201.
5. Kaufmann, A.; Maden, K., Determination of 11 Aminoglycosides in Meat and Liver by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *JAOAC* 2005, 88, 1118-1125.
6. BABIN, A High-Throughput Analytical Method for Determination of Aminoglycosides in Veal Tissues by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry with Automated Cleanup. *JAOAC* 2007, 90, 1418-1426.
7. Ishii, R.; Horie, M.; Chan, W.; MacNeil, J., Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2008, 25, 1509-1519.
8. HUBICKA, U.; KRZEK, J.; WOLTYNSKA, H.; STACHACZ, B., Simultaneous Identification and Quantitative Determination of Selected Aminoglycoside Antibiotics by Thin-Layer Chromatography and Densitometry. *JAOAC* 2009, 92, 1068-1075.
9. van Holthoon, F. L.; Essers, M. L.; Mulder, P. J.; Stead, S. L.; Caldow, M.; Ashwin, H. M.; Sharman, M., A generic method for the quantitative analysis of aminoglycosides (and spectinomycin) in animal tissue using methylated internal standards and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*
10. MARTOS, P. A.; JAYASUNDARA, F.; DOLBEER, J.; JIN, W.; SPILSBURY, L.; MITCHELL, M.; VARILLA, C.; SHURMER, B., Multiclass, multiresidue drug analysis, including aminoglycosides, in Animal Tissue using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010.
11. Almeida, M. P.; Rezende, C. P.; Souza, L. F.; Brito, R. B., Validation of a quantitative and confirmatory method for residue analysis of aminoglycoside antibiotics in poultry, bovine, equine and swine kidney through liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2011, 29, 517-525.
12. PLOZZA, T.; TRENERRY, V. C.; ZEGLINSKI, P.; NGUYEN, H.; JOHNSTONE, P., The confirmation and quantification of selected aminoglycoside residues in animal tissue and bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *International Food Research Journal* 2011, 18, 1077-1084.
13. Zhang, L.; Peng, J.; Tang, J.; Yuan, B.; He, R.; Xiao, Y., Description and validation of coupling high performance liquid chromatography with resonance Rayleigh scattering in aminoglycosides determination. *Analytica Chimica Acta* 2011, 706, 199-204.
14. DRIVER, L. D.; THIEX, N.; RAYNIE, D., Single-Laboratory Validation for the Quantification of Neomycin B and Neomycin C in Animal Feeds by Liquid Chromatography Fluorescence Detection with Post-Column Derivatization. *JAOAC* 2009, 92, 34-41.