

# **I. Matériel et méthode**

## **1. Introduction**

La directive 89/437/CEEC concernant les problèmes d'ordre sanitaire<sup>(30)</sup> impose la réalisation des recherches sur les résidus des molécules, les quinolones ont font parties. Ils sont autorisés par la législation européenne à condition que les limites maximales de leurs résidus soient respectées selon le règlement (UE) No 37/2010<sup>(31)</sup>de la commission du 22 décembre 2009.

## **2. Objet et domaine d'application**

Cette méthode a été adaptée pour la confirmation (identification et quantification)des quinolones dans le muscle blanc, muscle rouge et poisson.Les quinolones concernés : marbofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, difloxacin, acide oxolinique, acide nalidixique et flumequine. Le norfloxacin D5 est utilisé comme le standard interne.Cette méthode quantitative devrait permettre, après validation, la détermination de la teneur en quinolones dans une gamme de concentration allant jusqu'à 1,5 fois les limites autorisées LMRou bien les concentrations de travail LWC définie par le laboratoire.

La technique utilisée est la chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandemLC/MS/MS (AB SCIEX 5500 QTRAP / AB SCIEX 4000 QTRAP), avec ionisation par électrospray et détection en mode positif.

## **3. Définition**

- ◆ Standard interne (étalon interne):substance non contenue dans l'échantillon possédantdes propriétés physico-chimiques aussi prochesque possible de celles de l'analyte qui doit être identifié. Il est indispensable pour comparer son intensité avec celle de la molécule à identifier ou à quantifier (mêmes conditions, mêmes erreurs).
- ◆ Analyte: substance devant être détectée, identifiée et/ou quantifiée et dérivés apparaissant au cours de son analyse

## **4. Principe de la méthode**

Les quinolones sont extraites de la matrice à l'aide de l'acide trichloroacétique (TCA). Après homogénéisation et centrifugation, le surnageant contenant les molécules de quinolones est filtré puis transféré dans les vials afin d'être analysé par LC-MS/MS.

La séparation chromatographique se fait sur une colonne de silice greffée C18 en utilisant un mode d'éluion par gradient, la phase mobile est constituée d'acide fluoropropionique (PFPA) 0.1% (phase A) et acétonitril (ACN) (phase B).

Les quinolones sont détectées en combinant l'ionisation par électrospray positif, l'acquisition des données en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring).

## **5. Appareillage :**

### **❖ Appareil de chromatographie**

Pompe HPLC binaire FLEXAR ou équivalent

Injecteur automatique FLEXAR ou équivalent

Colonne chromatographique C18, 5 µm, 150 x 3,9 mm et pré-colonne correspondante.

### **❖ Spectrométrie de masse :**

Spectromètre de masse triple quadripôle : AB SCIEX 5500 QTRAP / AB SCIEX 4000 QTRAP (ou comparable) avec interface turbo ion-spray et logiciel Analyste.

## **6. Echantillonnage :**

Les échantillons traités sont ceux reçus dans le cadre de détection et de dosage des résidus des quinolones dans les matrices biologiques. Les échantillons sont stockés au congélateur à environ -18°C dès leur arrivée au laboratoire et ce, jusqu'à l'analyse.

## **7. Solutions**

### **7.1. Solutions**

- Acétonitrile grade HPLC pour analyse
- Eau ultra-pure
- Acide trichloro-acétique (TCA) pour analyse
- Acide pentafluoropropionique (PFPA) pour analyse

### **7.2. Préparation des solutions**

- Solution d'acide trichloroacétique à 5% : dissoudre 50 grammes de TCA dans 1 litre d'eau ultra pure.
- Acide pentafluoropropionique (PFPA) à 0,1% : verser environ 900 ml d'eau ultra pure dans une fiole de un litre ajouter 1 ml de PFPA et ajuster à un litre avec de l'eau pure.
- NaOH 1N : dissoudre 4g dans 100 ml eau bidistillée.

### 7.3. Substances standards et étalons internes

- Marbofloxacin(sigma ou équivalent)
- Norfloxacin (sigma ou équivalent)
- Ciprofloxacin (sigma ou équivalent)
- Danofloxacin (sigma ou équivalent)
- Enrofloxacin (sigma ou équivalent)
- SarafloxacinHCl 3 H<sub>2</sub>O (sigma ou équivalent)
- DifloxacinHCl(sigma ou équivalent)
- Acide oxolinique(sigma ou équivalent)
- Acide nalidixique sodique (sigma ou équivalent)
- Flumequine(sigma ou équivalent)
- Norfloxacin D-5 étalon interne (EI) (sigma ou équivalent)

## 8. Mode opératoire :

### 8.1. Préparation des solutions standards et des standards internes :

#### 8.1.1 Préparation des solutions mères SM :

Des solutions mères à 0,5 mg/ml en substance active sont préparées indépendamment pour chacune des molécules :

- Peser de la quantité de poudre nécessaire dans une fiole de volume adapté
- Ajouter 2 ml de méthanol avec 0,4 ml de NaOH 1N
- Ajuster au trait de jauge avec le méthanol
- Passer la fiole aux ultrasons.

*Tableau 5 : Durées de vies de chaque molécule de quinolone*

<b>Analytes</b>	<b>Stabilité de la solution mère</b>
Marbofloxacin	1 an à au moins -18°C
Norfloxacin	6 mois à au moins -18°C
Ciprofloxacin	1 an à au moins -18°C
Danofloxacin	3 mois à au moins -18°C
Enrofloxacin	1 an à au moins -18°C
Sarafloxacin	1 an à au moins -18°C
Difloxacin	6 mois à au moins -18°C
Acide Nalidixique	6 mois à au moins -18°C
Acide oxolinique	6 mois à au moins -18°C
Flumequine	6 mois à au moins -18°C

#### 8.1.2 Préparation des solutions de travail

Solution de supplémentation des standards : lorsque la totalité des analytes aura été ajoutée dans la fiole de 100 ml selon les recommandations indiquées dans le tableau ci-dessous, ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultra pure. Les solutions de travail des standards sont stables pendant une demi-

année lorsque stockée dans un réfrigérateur à + 4 ° C. La même préparation concernant la solution de travail du standard interne : Norfloxacin D5.

*Tableau 6 : Le volume à prélever pour la préparation de la solution de travail des standards*

Analytes	concentration de validation	volume (µl) à prélever de la SM et à mettre dans une fiole de 100 ml	concentration de la ST µg/ml
Marbofloxacin	150	300	1,5
Norfloxacin	30	60	0.3
Ciprofloxacin	100	200	1
Danofloxacin	200	400	2
Enrofloxacin	100	200	1
Sarafloxacin	30	60	0,3
Difloxacin	300	600	3
Acide Nalidixique	50	100	0,5
Acide oxolinique	100	200	1
Flumequine	200	400	2

## 8.2. Préparation des échantillons

### 8.2.1 les blancs :

Pour la réalisation du blanc, on pèse  $2 \pm 0.04$  g du muscle non traité dans des tubes à centrifuger, auquel on rajoute 200 µl de la solution de travail d'étalon interne.

### 8.2.2 la gamme des échantillons supplémentés :

Préparations de 4 tubes de  $2 \pm 0,04$  g de la matrice (muscle), dont on ajoute :

- Tube 1(¼LMR) : ajout de 50 µl de la solution de travail des standards ;
- Tube 2(½LMR) : ajout de 100 µl de la solution de travail des standards ;
- Tube 3 (1 LMR) : ajout de 200 µl de la solution de travail des standards ;
- Tube 4(1.5 LMR) : ajout de 300 µl de la solution de travail des standards ;

Pour l'ensemble des tubes, on rajoute 200 µl de la solution de travail d'étalon interne, puis on complète à un ml avec de l'eau ultra pure pour chaque tube.

*Tableau 7 : Les différents niveaux de la gamme*

8.2.3 Gamme étalonnage			
Niveau	Ajout ST de standard (µl)	Ajout ST d'étalon interne (µl)	Ajout H <sub>2</sub> O (µl)
0	0	200	800
0.5	50	200	750
1	100	200	700
2	200	200	600
3	300	200	500

#### 8.2.4 Pour les supplémentés à LMR :

On rajoute 200 µl du mélange des standards avec 200 µl du mélange des étalons internes.

#### 8.3. Procédure d'extraction – purification

Après l'addition de 8 ml de TCA 5%, les tubes sont bouchés puis agités 10 min à l'agitateur rotatif à 100 tr/min. Ils sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 14000g à environ 4°C. On récupère le surnageant (extrait) à l'aide des seringues de 1 ml, qui est ensuite filtré par des filtres de 0,45 µm dans des viales pour injection.

### **9. Les conditions de l'UHPLC et la spectrométrie en tandem**

#### 9.1. Conditions chromatographiques

➤ Phase mobile :

- **Phase (A)** : acide fluoropropionique (PFPA) 0,1%
- **Phase (B)** : acétonitrile (ACN)
- En gradients :

*Tableau 8 : Le gradient d'élution de la phase mobile*

Temps (min)	PFPA 0,1% (A)	ACN (B)
0.1	90	10
7	50	50
11	50	50
12	90	10
14	90	10
15	90	10

- Débit : 600 µl/min
- Volume d'injection : 20 µl
- Température de la colonne : 25°C

#### 9.2. Conditions de la spectrométrie de masse en tandem

➤ Spectromètre de masse API 4000 QTRAP

Ionisation : turbo Spray

- **mode positif**

- Type de scan : MRM (Multiple Reaction Monitoring)
- Hauteur d'électrode : 3 mm
- Température de source : 700°C
- CUR = 20 psi ; GS1 = 40 psi ; GS2 = 50 psi ; IS = 5500 V ; CAD = Medium ; EP = 10 V ; CXP = 15 V.

➤ Spectromètre de masse API 5500 QTRAP :

Ionisation : turbo Spray

• **mode positif**

- Type de scan : MRM (Multiple Reaction Monitoring)
- Hauteur d'électrode : 3 mm
- Température de source : 600°C
- CUR = 35 psi ; GS1 = 50 psi ; GS2 = 60 psi ; IS = 5500 V ; CAD = medium ; EP = 10 V ; CXP = 15 V.

9.3. Transitions recherchées et temps de rétention :

Détection : Mode MRM

*Tableau 9 : Les conditions de détection en mode positif*

Analytes	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	DP	CE	CXP	TR 4000	TR 5500	Etalon interne
marbofloxacin	363	345 320	70 70	30 22	15 15	5,9	6,4	Norfloxacin D-5
Norfloxacin	320,2	302 231	60 60	33 50	15 15	6	6,4	Norfloxacin D-5
Ciprofloxacin	332,2	314 231	61 61	30 47	15 15	6,1	6,5	Norfloxacin D-5
Danofloxacin	358,3	340 255	60 60	33 50	15 15	6,2	6,6	Norfloxacin D-5
Enrofloxacin	360,1	342 286	72 72	30 50	15 15	6,4	6,9	Norfloxacin D-5
Sarafloxacin	386,3	368 348	50 50	30 50	15 15	7,1	7,6	Norfloxacin D-5
Difloxacin	400,2	382 356	80 80	30 26	15 15	7,2	7,8	Norfloxacin D-5
Acide nalidixique	233,2	215 187	42 42	22 35	15 15	8,9	8,8	Norfloxacin D-5
Acide oxolinique	262,2	244 216	53 53	25 40	15 15	8,1	8,1	Norfloxacin D-5
Flumequine	262,2	244,2 202,2	44 44	25 45	15 15	9	8,9	Norfloxacin D-5
Norfloxacin D-5	325,2	307	60	33	15	6,89	6,94	-

## **10.Méthodologie de l'étude**

- a.** Injection des standards de la famille des quinolones à une concentration qui correspond à la LMR dans le système LC-MS/MS pour fixer le temps de rétention et pour vérifier la présence des transitions.

Pour toutes les molécules de la famille de quinolone : 20 échantillons blancs de chaque matrice (Muscle rouge, muscle blanc, poisson) de différentes origines et des échantillons supplémentés à des niveaux de concentration sont analysés pour déterminer la spécificité de la méthode, la linéarité et la justesse, ainsi les limites de décision.

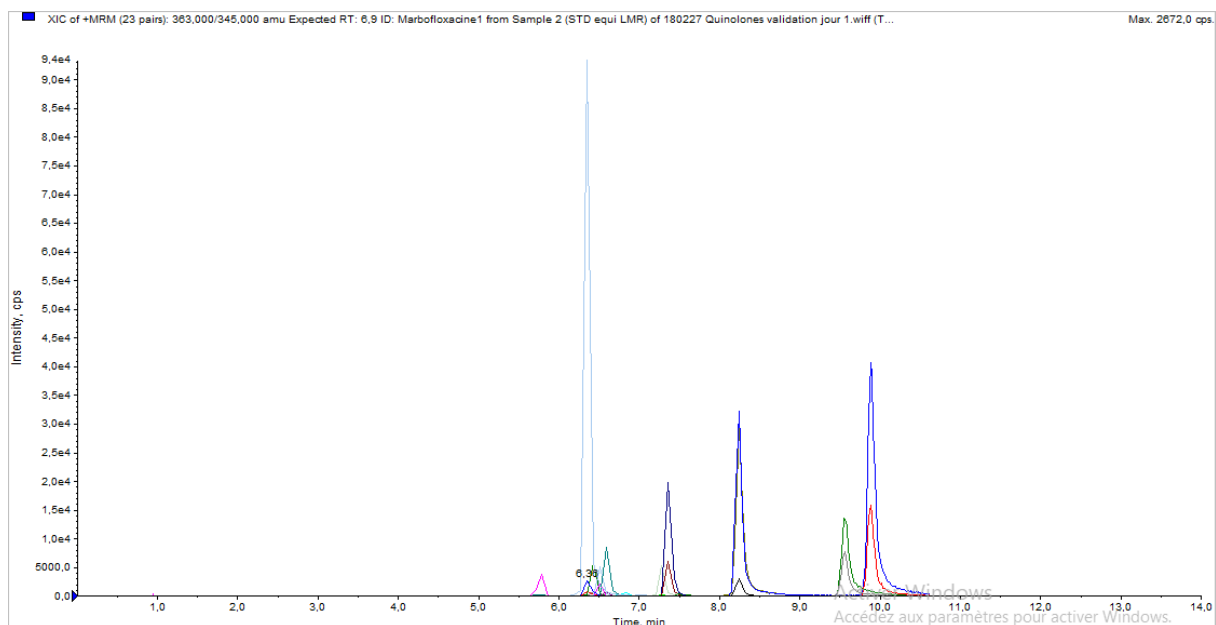
- b.** Injection après extraction des échantillons blancs de chaque matrice (muscle rouge, muscle blanc, poisson) de différentes origines exempte des antibiotiques (n=20) et des échantillons supplémentés (au moins un échantillon à LMR).
- c.** Les 20 échantillons blancs de chaque matrice (muscle rouge, muscle blanc, poisson) de différentes origines sont supplémentés au niveau d'intérêt (LMR) avec les différentes molécules puis analysés : répétés 2 à 3 fois sur 3 jours non consécutifs. Afin de déterminer les limites de décision de chaque molécule, la reproductibilité et la justesse de la méthode.

## II. Résultats et discussion

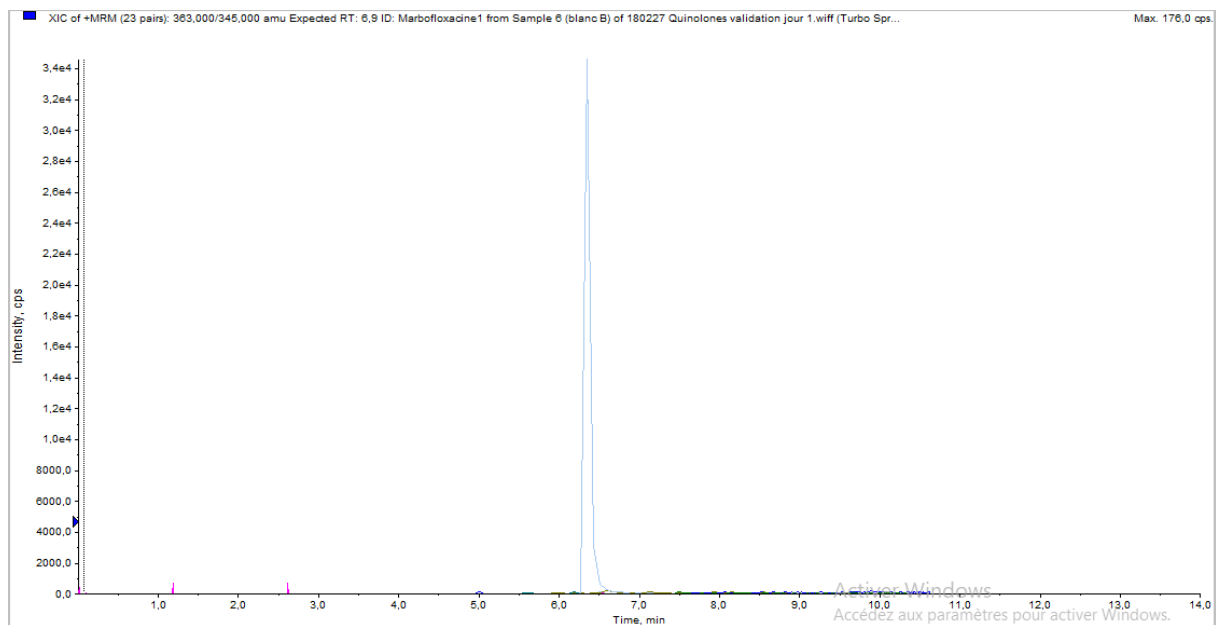
### 1. Résultats

#### 1.1 Chromatogramme :

Exemple d'un MRM chromatogramme des molécules de quinolones : un standard, un essai blanc et un autre supplémenté à 1LMR, d'après le logiciel Analyste.

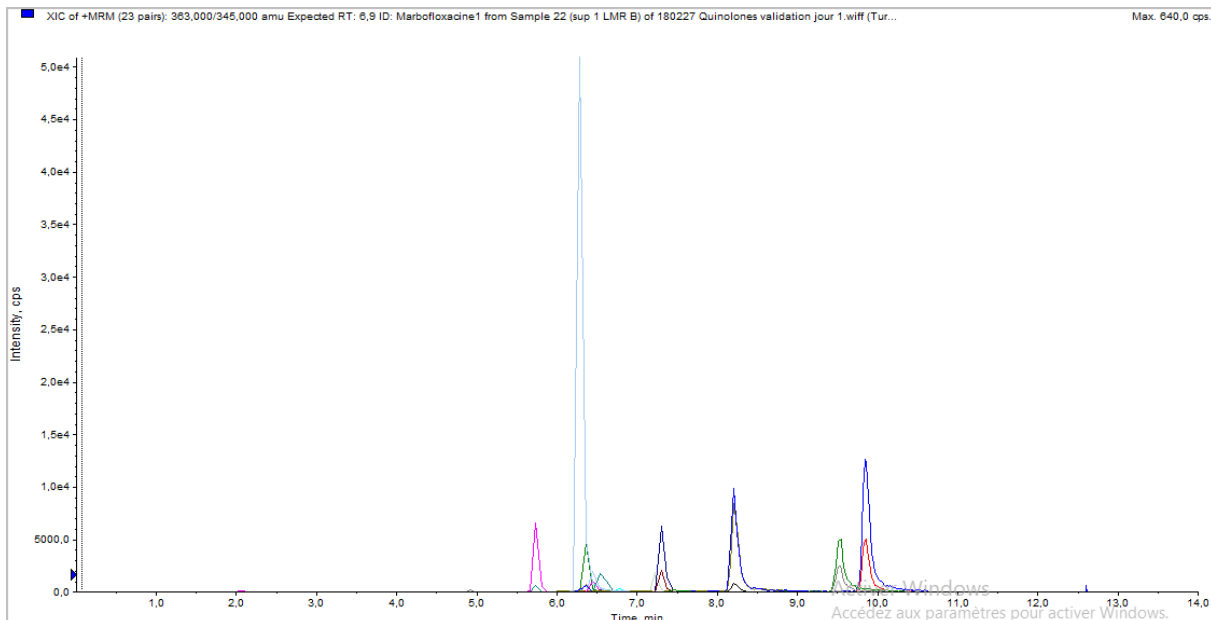


*Figure 22 : Chromatogramme d'un standard équivalent 1 LMR*



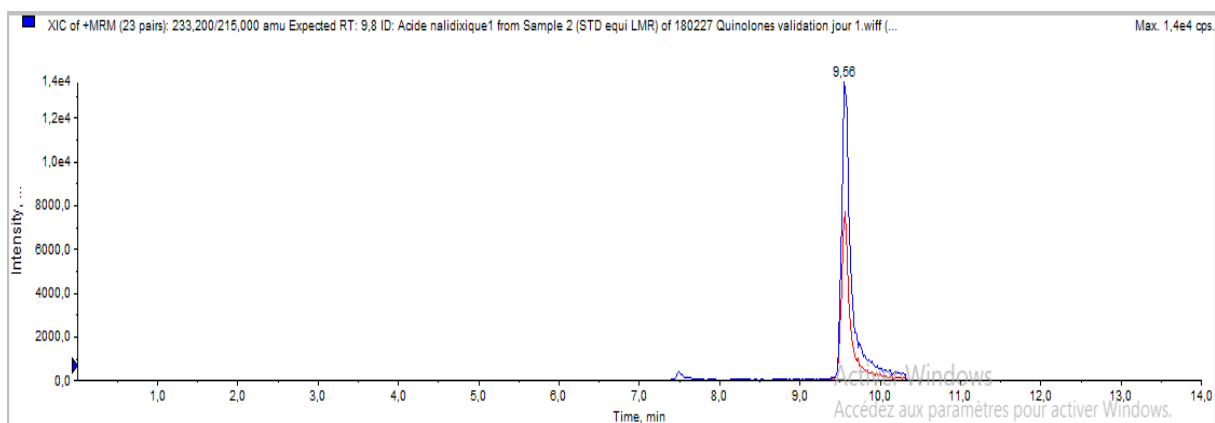
*Figure 23 : Chromatogramme d'un blanc*



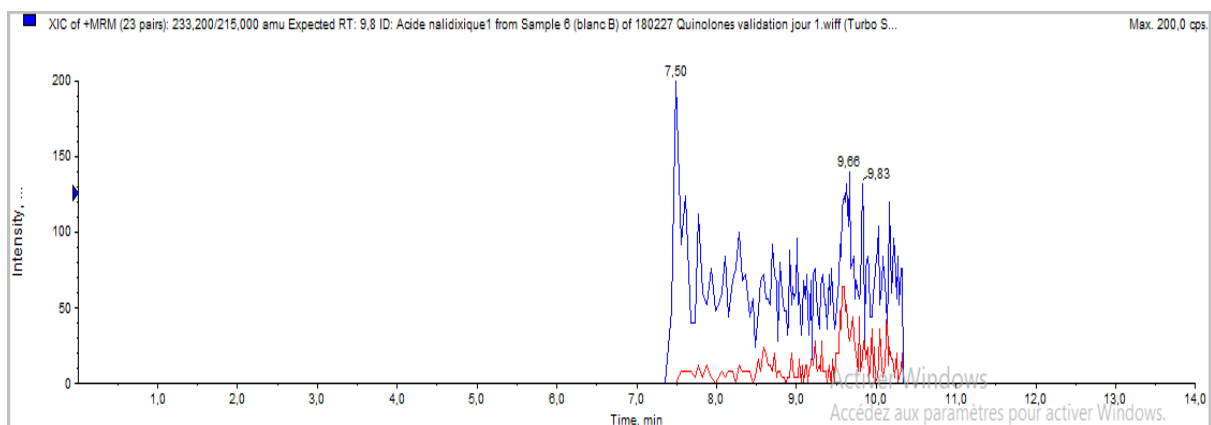


*Figure 24 : Chromatogramme d'un supplément équivalent 1 LMR*

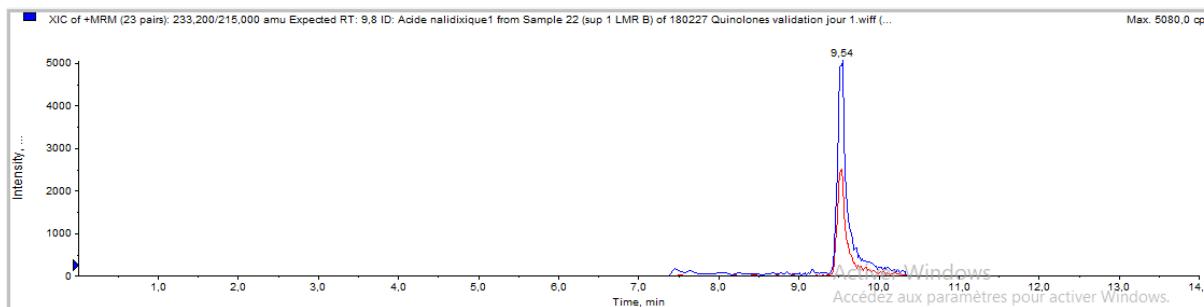
Prenant en exemple les chromatogrammes de la molécule acide nalidixique :



*Figure 25 : Chromatogramme d'un standard équivalent 1 LMR de la molécule acide nalidixique*



*Figure 26: Chromatogramme d'un blanc de la molécule acide nalidixique*



*Figure 27 : Chromatogramme d'un supplémenté équivalent 1 LMR de la molécule acide nalidixique*

## 1.2 Résultats :

La validation de cette méthode s'est déroulée en 3 jours non consécutifs. L'ensemble des résultats des échantillons de chaque molécule sont traités par le logiciel Analyste. (Voir annexe)

## 1.3 Traitement et interprétation des résultats :

### 1.3.1 Spécificité :

Chaque molécule est identifiée spécifiquement par 2 transitions minimum (ion parent -> ion fils) et le temps de rétention. La spécificité de la méthode est évaluée à partir de l'examen de chromatogrammes :

- D'une solution standard afin de déterminer le temps de rétention de chaque analyte, et vérifier la présence des transitions.

Les deux transitions de chaque molécule sont observées à un temps de rétention en fonction des dates d'analyse :

- de matrices blanches : Vérification d'un tracé sans pic parasite dans les blancs au temps de rétention des analytes. L'absence de pic parasite au temps de rétention a été vérifiée pour les deux transitions de chaque analyte. Seule la présence simultanée d'un pic pour chacune des transitions avec un rapport signal/bruit > 3 permet d'identifier la présence de chaque analyte.
- de matrices supplémentées : le temps de rétention de chaque analyte dans les matrices supplémentées est similaire aux temps de rétention du standard de chaque analyte injecté le même jour.

- La méthode est spécifique, puisque aucun pic n'a été détecté au temps de rétention de l'analyte en question dans les échantillons blancs.

➡ **La méthode est donc spécifique selon les critères de la décision 2002/657.**

### 1.3.2 Linéarité :

Un modèle de régression linéaire a été choisi et tous les critères de validation qui seront calculés ensuite le seront à partir de ce modèle de régression linéaire.

Pour chaque série, l'équation des gammes de calibration a été calculée à partir du blanc et des supplémentées 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 µg/kg. L'équation de la courbe de calibration est établie selon le modèle suivant à partir de la hauteur de la transition la plus intense :

$$Y = ax + b$$

Où Y = ratio des hauteurs (analyte/standard interne)

x = concentration

a = pente

b = l'ordonnée à l'origine

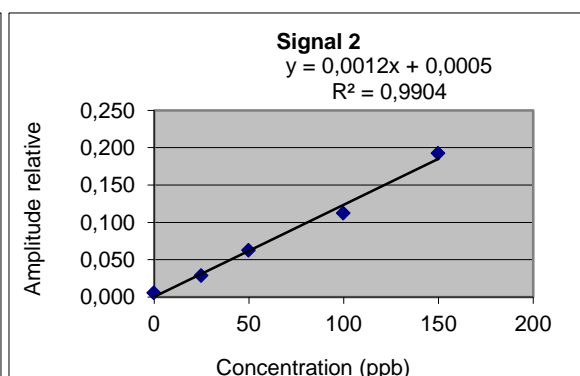
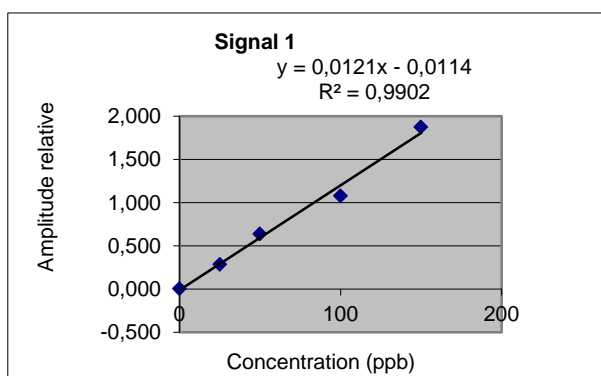
R<sup>2</sup> = coefficient de détermination

*Tableau 10: les niveaux de concentration de la gamme de chaque molécule selon la LMR ou LWC*

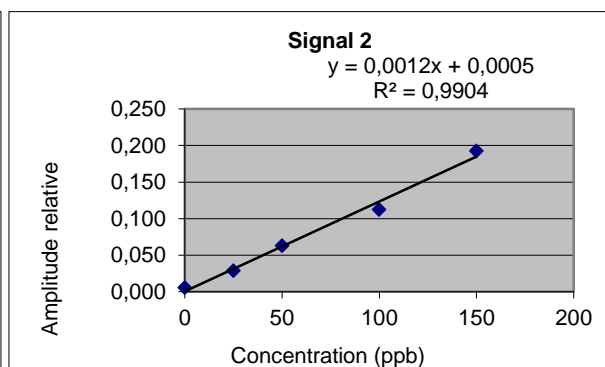
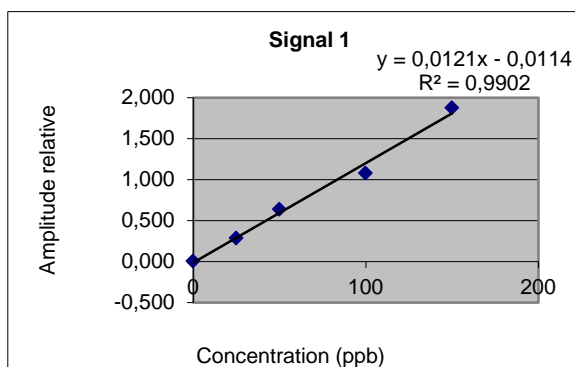
Analyte	Niveaux de la gamme (µg/kg)			
	1	2	3	4
Marbofloxacin	37.5	75	150	225
Norfloxacine	7.5	15	30	45
Ciprofloxacine	25	50	100	150
Danofloxacine	50	100	200	300
Enrofloxacine	25	50	100	150
Sarafloxacine	7.5	15	30	45
Difloxacine	100	200	400	600
Acide oxolinique	25	50	100	150
Acide nalidixique	12.5	25	50	75

Les droites de linéarité obtenues des différentes molécules de la famille des quinolones :

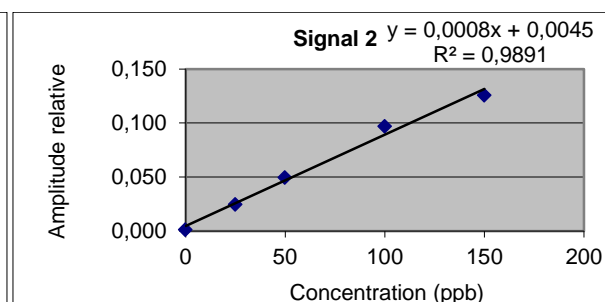
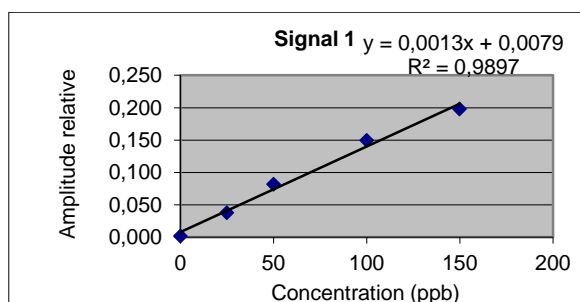
- Acide nalidixique



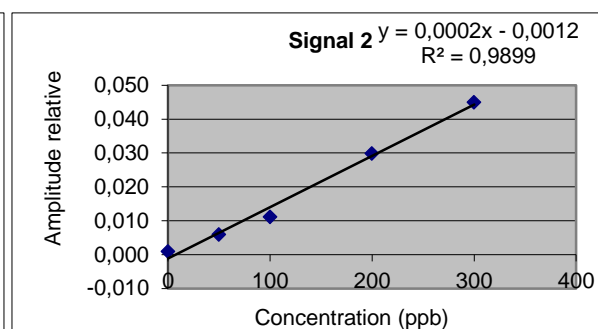
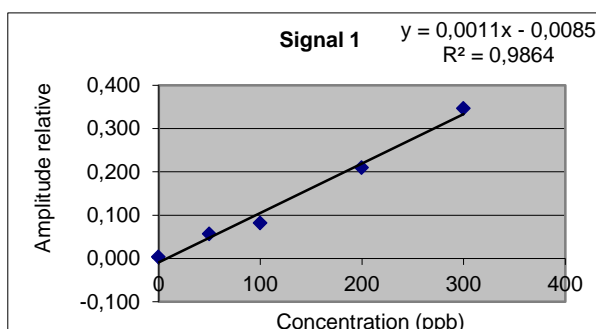
- Acide oxolinique



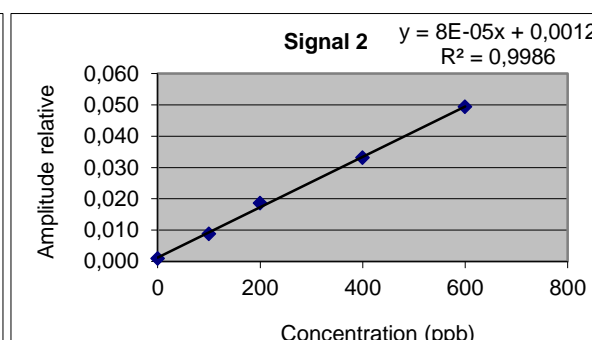
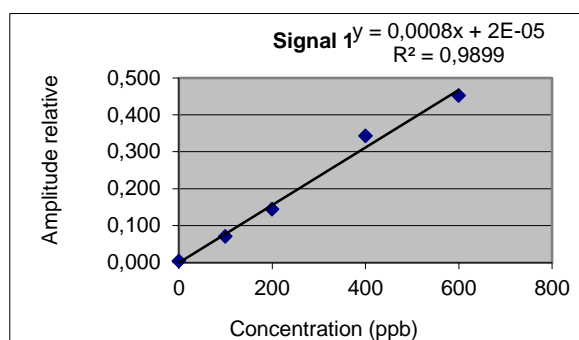
- Ciprofloxacin



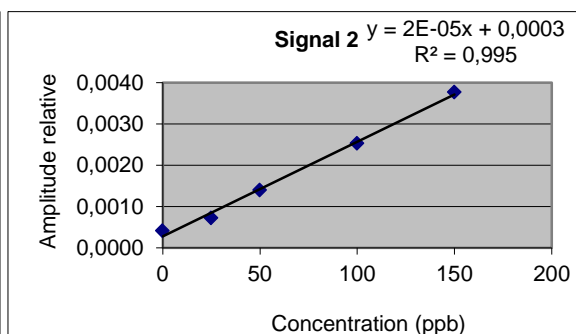
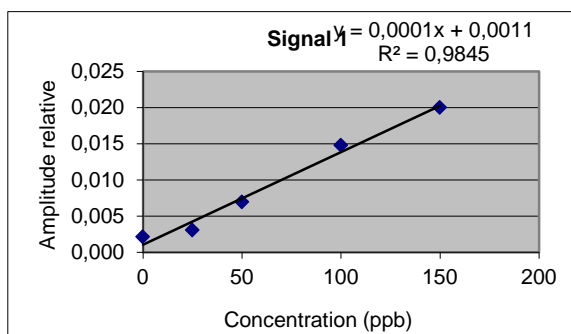
- Danofloxacin



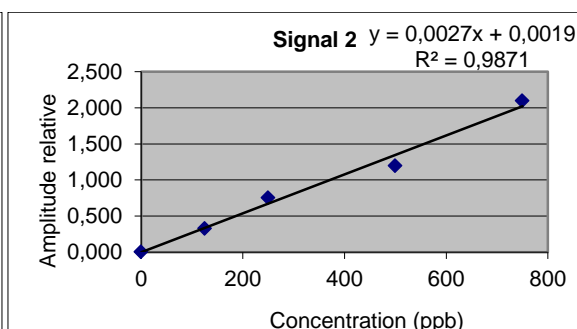
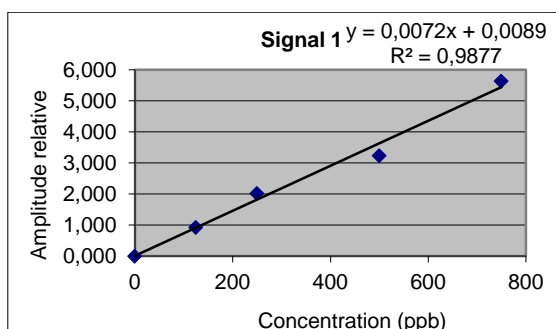
- Difloxacin



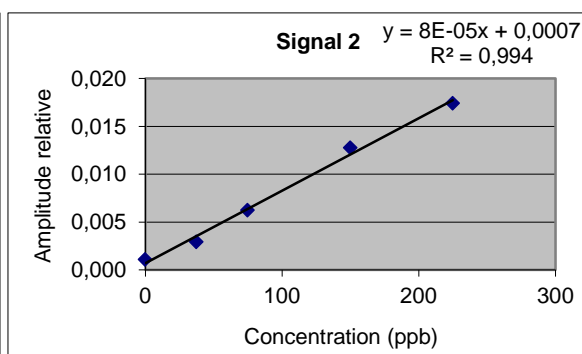
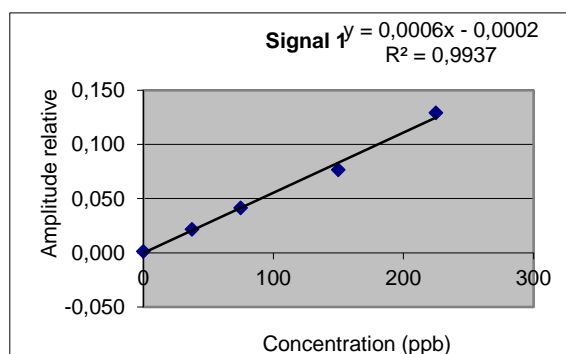
- Enrofloxacin



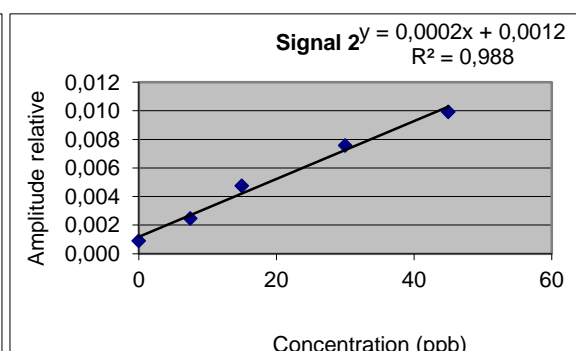
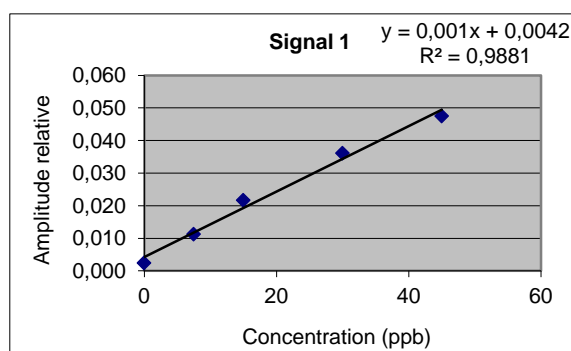
- Flumequine



- Marbofloxacin



- Norfloxacin



- Sarafloxacin

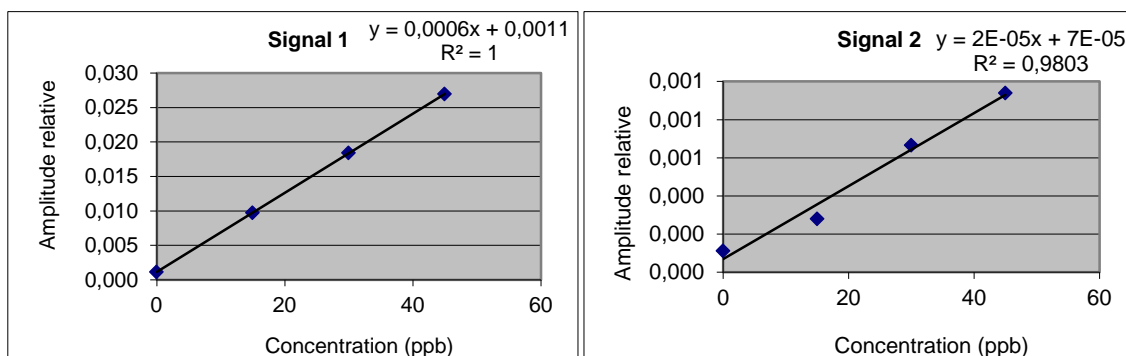


Tableau récapitulatif des résultats des droites de régression des molécules de quinolones :

*Tableau 11 : Résultats de la droite de régression pour chaque molécule*

Analytes	Pente a		Ordonnée à l'origine b		Coefficient de détermination R <sup>2</sup>	
	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
Acide nalidixique	0.0073	0.0034	0.0130	0.0045	0.9905	0.9921
Acide oxolinique	0.0121	0.0012	-0.0114	0.0005	0.9902	0.9904
Ciprofloxacine	0.0013	0.0008	0.0079	0.0045	0.9897	0.9891
Danofloxacine	0.0011	0.0002	-0.0085	-0.0012	0.9864	0.9899
Difloxacine	0.0008	0.0001	0.0000	0.0012	0.9899	0.9986
Enrofloxacine	0.0001	0.000023	0.0011	0.0003	0.9845	0.9950
Flumequine	0.0072	0.0027	0.0089	0.0019	0.9877	0.9871
Marbofloxacine	0.0006	0.0001	-0.0002	0.0007	0.9937	0.9940
Norfloxacine	0.0010	0.0002	0.0042	0.0012	0.9881	0.9880
Sarafloxacine	0.0006	0.000019	0.0011	0.0001	1.0000	0.9803

Les coefficients de détermination de toutes les molécules sont supérieurs à 0.97.

➡ D'après les critères de la loi 2002/657/EC, la linéarité de la droite de régression est vérifiée.

### 1.3.3 Rendement:

*Tableau 12 : le rendement d'extraction de chaque molécule*

Analyte	Conc. Ajouts (LMR) (ppb)	Conc. Estimée (ppb)		Rendement (%)	
		Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
Acide nalidixique	50	48.60	51.16	97.21	102.32
Acide oxolinique	100	94.69	90.87	94.69	90.87
Ciprofloxacine	100	103.65	82.95	103.65	82.95
Danofloxacine	200	194.08	167.24	97.04	83.62
Difloxacine	300	285.88	246.51	95.29	82.17
Enrofloxacine	100	98.13	108.92	98.13	108.92
Flumequine	200	160.12	160.05	80.06	80.02
Marbofloxacine	150	131.14	134.73	87.43	89.82
Norfloxacine	30	30.41	25.60	101.36	85.32
Sarafloxacine	30	26.91	30.99	89.69	103.30

### 1.3.4 Reproductibilité :

Les valeurs des coefficients de variation des 10 molécules :

*Tableau 13 : les coefficients de variation du signal, temps de rétention et ratio*

Analyte	CV			
	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	TR	Ratio
Acide nalidixique	19.1%	21.3%	0.8%	7.9%
Acide oxolinique	22.8%	22.8%	1.0%	5.1%
Ciprofloxacine	14.5%	20.9%	0.3%	14.3%
Danofloxacine	15.8%	19.6%	0.4%	11.2%
Difloxacine	18.6%	22.5%	1.2%	16.7%
Enrofloxacine	15.1%	17.5%	0.8%	14.0%
Flumequine	22.2%	22.7%	1.5%	7.0%
Marbofloxacine	20.2%	19.0%	0.4%	17.3%
Norfloxacine	18.5%	20.0%	0.2%	14.5%
Sarafloxacine	12.7%	22.3%	1.2%	17.4%

➤ Le coefficient de variation du signal 1 relatif des molécules :

- Norfloxacine, sarafloxacine et acide nalidixique (dont le LMR < 100 µg/kg) est inférieur à 19.1% donc plus faible possible.
- Acide oxolinique, ciprofloxacine, danofloxacine, difloxacine, enrofloxacine, flumequinemarbofloxacine (LMR > 100 µg/kg) est inférieur à 23%.

- Le coefficient de variation du signal 2 relatif des molécules :
  - Norfloxacin, sarafloxacin et acide nalidixique (dont le LMR < 100 µg/kg) est inférieur à 22.3%.
  - Acide oxolinique, ciprofloxacine, danofloxacine, difloxacine, enrofloxacine, flumequinemarbofloxacine (LMR > 100 µg/kg) est inférieur à 23%.
- Le coefficient de variation du temps de rétention de chaque molécule est inférieur à 2.5%, ce qui confirme que le temps de rétention relatif de l'analyte détecté est identique à celui des échantillons supplémentés.
- Le coefficient de variation du rapport d'ion de chaque molécule est compris entre ±30%

Les CV obtenus vérifient les valeurs recommandées par la décision 2002/657/EC

➡ **La méthode est reproductible conformément à la décision 2002/657/EC**

### 1.3.5 Justesse:

$$\text{Justesse\%} = \frac{(\text{Concentration estimée} - \text{Concentration théorique}) \times 100}{\text{Concentration théorique}}$$

*Tableau 14 : les concentrations estimées et la justesse des molécules*

Analyte	Concentrations Ajouts (LMR) (ppb)	Concentrations Estimées (ppb)		Justesse (%)	
		Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
Acide nalidixique	50	48.60	51.16	-2.8%	2.3%
Acide oxolinique	100	94.69	90.87	-5.3%	-9.1%
Ciprofloxacine	100	103.65	82.95	3.7%	-17.0%
Danofloxacine	200	194.08	167.24	-3.0%	-16.4%
Difloxacine	300	285.88	246.51	-4.7%	-17.8%
Enrofloxacine	100	98.13	108.92	-1.9%	8.9%
Flumequine	200	160.12	160.05	-19.9%	-20.0%
Marbofloxacine	150	131.14	134.73	-12.6%	-10.2%
Norfloxacine	30	30.41	25.60	1.4%	-14.7%
Sarafloxacine	30	26.91	30.99	-10.3%	3.3%

Selon la décision 2002/657/EC de la Communauté Européenne, les concentrations ajouts de toutes les molécules sont supérieures à 10 µg/kg, ce qui impose que l'écart entre la concentration estimée et la concentration théorique doit être compris entre -20 et +10%.

D'après le tableau, les pourcentages de justesse de toutes les molécules varient de -20% à 10%.



➔ La méthode est juste conformément à la décision 2002/657/CE.

### 1.3.6 La limite de décision CC $\alpha$ :

*Tableau 15 : les valeurs de CC $\alpha$  de chaque molécule*

Analyte	Niveaux de supplémentation	Moyenne (ppb)		Ecart-Type		CC $\alpha$ (ppb)	
		Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
Acide nalidixique	50	0.38	0.18	0.0726	0.0382	64.88	69.68
Acide oxolinique	100	1.15	0.12	0.262	0.027	130.17	126.60
Ciprofloxacine	100	0.14	0.07	0.0202	0.0149	128.74	111.84
Danofloxacine	200	0.2248	0.0263	0.0355	0.0052	245.12	223.02
Difloxacine	300	0.2261	0.0207	0.0422	0.0047	374.67	341.72
Enrofloxacine	100	0.0147	0.0029	0.0022	0.0005	126.60	145.44
Flumequine	200	1.16	0.44	0.258	0.100	218.42	220.65
Marbofloxacine	150	0.07	0.01	0.0149	0.002	175.20	181.23
Norfloxacine	30	0.03	0.01	0.00610	0.0012	40.36	35.44
Sarafloxacine	30	0.0166	0.0007	0.0021	0.0002	32.93	44.49

La valeur de la limite de décision (CC $\alpha$ ) de confirmation calculée pour les différents analytes est supérieure à la LMR ou à la concentration de travail. Elle a pu être identifiée d'après les 20 différents supplémentés à 1 LMR représentant les limites maximales des résidus LMR.

### 1.3.7 Incertitude des résultats de la méthode :

L'incertitude d'une méthode est : 2 x l'écart-type de la reproductible.

*Tableau 16 : les valeurs de l'incertitude de chaque molécule*

Analyte	Incertitude
Acide nalidixique	0.1451
Acide oxolinique	0.5248
Ciprofloxacine	0.0404
Danofloxacine	0.0710
Difloxacine	0.0843
Enrofloxacine	0.0044
Flumequine	0.5151
Marbofloxacine	0.0299
Norfloxacine	0.0122
Sarafloxacine	0.0042

## **2. Discussion**

Le travail a été porté sur la mise au point et la validation d'une méthode de confirmation des quinolones dans le muscle animal. Cette méthode a été adaptée au mode opératoire « méthode de screening des résidus d'antibiotiques (PR-06-MO-LCMS /MS) »<sup>(33)</sup>.

La première étape consistait à l'optimisation des conditions chromatographiques et spectrométriques de la méthode LC-MS/MS pour fixer les paramètres conduisant à obtenir une méthode fiable. On injecte une solution de travail de standards contenant les molécules recherchées de la famille des quinolones de manière à fixer les temps de rétention de chaque molécule, ainsi à choisir les transitions les plus sensibles. Bien qu'il existe des molécules qui possèdent le même temps de rétention, elles diffèrent par les transitions et vice versa, si les molécules ayant les mêmes transitions, elles diffèrent par le temps de rétention, à raison que la méthode LC-MS/MS est spécifique. On passe ensuite à l'injection d'un supplémenté à une concentration correspondante à LMR, pour vérifier l'extraction des différentes molécules avec un rendement suffisant et de vérifier aussi qu'il n'existe aucun effet de matrice.

Selon le mode opératoire de dépistage des antibiotiques, les meilleures conditions chromatographiques sont : une phase mobile à gradient composée d'acétonitrile (phase B) et de l'eau acidifiés par 0,1% d'acide fluoropropionique (phase A), la présence de ce dernier améliore et facilite l'ionisation des molécules dans l'électrospray, ainsi une phase stationnaire C18 avec un diamètre de 5µm. Une autre méthode d'extraction<sup>(34)</sup> des quinolones dans le muscle utilise une phase mobile à gradient, constituée de l'eau (phase A) et l'acétonitrile (phase B) dont les deux solvants sont acidifiés par PFPA (0.1%) avec l'HFBA (0.0.13%). Dans notre travail, le choix des phases mobile et stationnaire est expliqué par la nécessité de trouver un compromis pour la détection de toutes les molécules quinolones.

Pour la configuration des conditions de détection, la méthode sur laquelle on s'est basé opte pour une ionisation par électrospray (ESI) en mode MRM positif, la hauteur de l'électrode est réglée à 3mm. La température de la source ainsi que les autres paramètres dépendent du type d'instrument utilisé.

La deuxième étape consiste à la validation de la méthode selon la décision de la commission européenne 2002/657/CE<sup>(30)</sup>, concernant la performance de méthodes analytiques et l'interprétation des résultats qui est appliquée sur toutes les méthodes analytiques depuis 2002 jusqu'à présent.

D'abord 20 échantillons blancs, prélevés de différentes régions du Maroc, ont été analysés pour chercher qu'il n'y a pas de pics interférents ayant les mêmes temps de rétention des molécules

étudiées, aucune interférence n'a été marquée. En pratique, nous avons utilisé 20 échantillons supplémentés à 1LMR (correspond aux limites maximales des résidus quinolones) pour estimer la limite de décision  $CC\alpha$ , reproductibilité, justesse, rendement et spécificité. La linéarité a été assurée par une gamme de 5 concentrations différentes allant de 0,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1 jusqu'à 1.5 LMR (en respectant les LMR propres à chaque molécule).

Cette méthode apparaît simple dans sa description, cependant sa réalisation a nécessité beaucoup de temps et plusieurs tentatives afin de l'adapter à nos conditions expérimentales.

### **3. Conclusion :**

La méthode de confirmation pour la détermination des quinolones dans le muscle rouge (ovin, bovin), muscle blanc (poulet, dinde) et poisson par LC-MS/MS est validée et usable puisque les résultats sont satisfaisants et respectent les exigences de la directive 2002/657/EC : modèle linéaire entre 0 et 1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  avec une justesse, une fidélité satisfaisantes, les limites de décision de chaque molécule de la méthode sont supérieures à la LMR ou à la concentration de travail, et avec une incertitude de 0.145 pour l'acide nalidixique, 0.525 pour l'acide oxolinique, 0.040 pour la ciprofloxacine, 0.071 pour ladanofloxacine, 0.084 pour ladifloxacine, 0.004 pour l'enrofloxacine, 0.515 pour la flumequine, 0.029 pour lamarbofloxacine, 0.012 pour lanorfloxacine et 0.004 pour lasarafloxacine.

MCours.com