



SOP DHA/ANA305 v01

Détection et confirmation d'Aminoglycosides dans les fientes de volaille par LC-MS/MS

Mise en fonction : 24/06/2016

Pages : 12
Annexes : 3

	Nom, fonction	Date	Signature
Rédaction :	Robert Christelle Responsable méthode		
Vérification :	Jean-Luc Beudart Responsable AQ		
Approbation :	Gillard Nathalie Directeur		

Toute reproduction interdite

Vérification : JL Beudart (RQ)
Mise en fonction : 26.04.2016

Historique de la méthode

N° Version	Date	Evolution de la méthode
SOP DHA/ANA305 v01	24/06/2016	Nouvelle méthode

Destinataires : Département Santé / labo LC-MS/MS

Opérateurs

Pierre-Yves BRASSEUR
Christelle ROBERT

Responsable

Christelle ROBERT

Sommaire

1. Définitions	4
2. Champ d'application et références légales	4
3. Principe général	4
4. Matériel, réactifs et standards	5
4.1. Matériel.....	5
4.2. Réactifs et solvants	5
4.3. Standards.....	6
5. Echantillons	6
5.1. Réception des échantillons et enregistrement.....	6
5.2. Préparation des échantillons	6
6. Mode opératoire.....	6
6.1. Fortification des échantillons.....	6
6.1.1. Fientes de volaille	6
6.2. Extraction.....	7
6.2.1. Extraction.....	7
6.2.2. Purification	7
6.3. Analyse par LC-MS/MS	7
6.4. Traitement des données acquises.....	8
6.5. Acceptation de la séquence d'analyse	8
6.6. Interprétation des résultats et rapport	9
6.6.1. Interprétation des résultats	9
7. Sauvegarde des données	9
8. Cartes de contrôle	9
9. Références.....	9
ANNEXE 1. Préparation des solutions stock et des pools.....	10
A.1.1. Solutions stock.....	10
A.1.2. Validité des solutions stocks.....	10
A.1.3. Préparation des pools	10
A.1.3.1. Pool P305-istd.....	11
A.1.3.2. Pool P305-fientes.....	11
ANNEXE 2. Composés recherchés, données chromatographiques et MRM	12
ANNEXE 3. Composés recherchés.....	12

1. Définitions

- ✦ UPLC-MS/MS : Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
- ✦ QC : Quality Control, Echantillon contenant toutes les molécules cibles recherchées
- ✦ U : Incertitude de mesure élargie

Les codes abrégés des substances à rechercher sont définis dans la procédure QA/REA02

2. Champ d'application et références légales

Afin de diminuer le risque de développement de la résistance aux antimicrobiens, l'arrêté royal belge (C-2007/22784) concernant l'élimination de Salmonella interdit le traitement des volailles avec des antimicrobiens contre Salmonella spp.

Afin de vérifier un éventuel usage abusif d'antimicrobiens, une méthode plus respectueuse des animaux a été développée. La plupart des antimicrobiens utilisés sont éliminés dans les excréta de volaille comme composé parent.

3. Principe général

La méthode de confirmation qualitative (D,I) décrite dans cette SOP s'applique à la détection des aminoglycosides dans les fientes de volaille. La liste des composés est reprise en annexe.

La méthode comprend une étape d'extraction au TCA 5% suivi d'une purification sur SPE avant analyse.

4. Matériel, réactifs et standards

4.1. MATERIEL

- a. Verreries diverses et godets en plastique Nalgene (VWR) et Falcon ou équiv.
- b. Centrifugeuses, équipements M442, M502
- c. Balances, équipements M446, M387
- d. Agitateur magnétique
- e. Fioles "Packard"
- f. Rampe d'évaporation sous azote + azote N28 (Air Liquide), équipem. **M157, M316, M314, M315**
- g. Vortex, équipements **M10 à M13**
- h. Bain à ultrasons, équipements **M576**
- i. Agitateurs horizontaux M8, M246
- j. Micropipettes Gilson P10000, P1000, P200, P20, ou équivalent
- k. Pipettes Pasteur + poire
- l. Vials d'injection en verre de 1.5 ml
- m. Pince à sertir les vials
- n. Bain d'eau thermostaté avec dispenseur d'azote, équipem. **M515, M3, M194, M120, M594, M326**
- o. Chaîne ULPL Acquity TQ MS Xevo (**M655 à M658**)
- p. Colonne Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm, 2,1 x150 mm (ou équivalent)
- q. Agitelec, équipements M261, M184, M505
- r. Colonne HPLC Alltima C18, 5u, 150 x 3mm (Grace ou équivalent)
- s. Papier filtre (Whatman 595 ½, diam 125), ref. 10311644

4.2. REACTIFS ET SOLVANTS

Note : tous les solvants et réactifs sont de qualité « pour analyse » (PA)

- a. Eau bidistillée et distillée
- b. Acétonitrile pour HPLC (Biosolve, ou équivalent)
- c. Acide trichloroacétique (TCA, Acros Organics, ou équivalent)
- d. Eau pour UPLC (Biosolve, ou équivalent)
- e. Méthanol pour UPLC (Biosolve, ou équivalent)
- f. KH₂PO₄ (Analar normapur, Prolabo, ou équivalent)
- g. Eau pour HPLC (Acros Organics, ou équivalent)
- h. Solutions stocks de standards, dans l'eau (voir aussi SOP QA/REA02 et annexe 1)
- i. NaOH (Analar normapur, Prolabo, ou équivalent)
- j. HCl (Acros Organics, ou équivalent)
- k. SPE de type échangeuse de cation (Baker, CBX, widebore 500mg, 6ml)
- l. Acide acétique (Acros Organics, ou équivalent)
- m. Solution d'acide Heptafluorobutyrique à 1% (HFBA, Aldrich) : 1ml HFBA/100 ml d'eau HPLC
- n. Solution d'extraction KH₂PO₄ 10 mM (1,36 g/l) + 5% TCA (50 g/l) dans l'eau distillée
- o. NaOH 2M (8 g/ 100 ml) dans l'eau distillée
- p. HCl 1M (environ 8,6 ml /100 ml) dans l'eau distillée

4.3. STANDARDS

- a. Pool de standards dont la description en fonction des matrices et des composés à rechercher est donnée en Annexe 1. (P305-faeces)
- b. Solution de standards internes (P305-ISTD)

5. Echantillons

5.1. RECEPTION DES ECHANTILLONS ET ENREGISTREMENT

La réception des échantillons, leur enregistrement et encodage sont réalisés selon la procédure SOP QA/GEN07A. Les feuilles de route sont imprimées sur base de cette même procédure.

L'analyse débute dès la réception des échantillons. Dans le cas contraire, les échantillons doivent être entreposés au congélateur et remis à température ambiante avant le début de l'analyse. Les dates de début et de fin d'analyse sont enregistrées sur la feuille de route.

Les échantillons de substances destinées à l'alimentation humaine (excepté les produits animaux) seront conservés conformément à une note de service de l'AFSCA (Procédure QA/GEN07A)

5.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Il est essentiel que l'entièreté des échantillons reçus au laboratoire soit broyé et mélangé avant prélèvement de sous-échantillons d'analyse. Afin d'augmenter l'homogénéité des échantillons solides, ceux-ci sont broyés très finement à l'aide des moulin Waring.

6. Mode opératoire

6.1. FORTIFICATION DES ECHANTILLONS

6.1.1. Fientes de volaille

6.1.1.1. Echantillons de contrôle

Lors de chaque série d'analyse, des échantillons de contrôle supplémentaires doivent également être préparés et extraits comme les autres échantillons:

- **Un Blanc** (5 gr) est préparé à l'aide d'un échantillon de matrice blanche (fientes) supplémenté avant extraction avec le pool de standard interne (P305-ISTD).
- **Un QC** (5 gr) est préparé à l'aide d'un échantillon de matrice blanche (fientes) supplémenté avant extraction avec 50µl de pool P305-fientes et 50 µl de pool P305-ISTD. (voir annexes).

Laisser reposer 15 min et extraire suivant le mode opératoire décrit en 6.2.1.

6.1.1.2. Echantillons de routine

Les échantillons (5 gr) sont fortifiés avec 50 µl du pool de standards internes (P305-ISTD).

Laisser reposer 15 min et extraire suivant le mode opératoire décrit en 6.2.2.

6.2. EXTRACTION

6.2.1. Extraction

1. Peser $5 \pm 0,1$ g d'échantillon préalablement broyé et homogénéisé
2. Ajoute 10 ml avec un mélange KH_2PO_4 10mM et TCA 5%
3. Agiter énergiquement 15 min à l'agitelec
4. Centrifuger pendant 5 minutes à environ 4650 x g, à environ 4°C
5. Prélever le surnageant dans un autre tube Falcon
6. Réextraire le culot avec nouveau 10 ml avec un mélange KH_2PO_4 10mM et TCA 5%
7. Agiter énergiquement 15 min à l'agitelec
8. Centrifuger pendant 5 minutes à environ 4650 x g, à environ 4°C
9. Combiner les surnageants
10. Ajuster le pH à 7.5 – 8.5 avec du NaOH 5M et HCl 1M. (± 1 ml NaOH) avant la purification

6.2.2. Purification

1. Conditionner la SPE avec 5 ml de méthanol puis 5 ml d'eau
2. Placer un réservoir de 20 ml au dessus de la SPE
3. Placer un entonnoir contenant un filtre plissé (Whatman 595 ½, diam 125)
4. Charger l'échantillon sur la SPE et mettre le vide de manière à avoir un débit de ± 1 ml/min
5. Laver avec 3 ml d'eau et laisser sécher la colonne sous vide
6. Eluer avec 3 ml d'un mélange méthanol/acide acétique 10% dans un tube falcon de 15 ml (tube plastique, adsorption des AMG sur le verre)
7. Evaporer à sec sous flux d'azote à environ 40°C (env. 1h30).
8. Reprendre l'extrait avec 1 ml d'eau HPLC et vortexer
9. Placer l'échantillon dans un vial

6.3. ANALYSE PAR LC-MS/MS

6.3.1. Conditions HPLC-Acquity

Le programme LC utilisé présente les caractéristiques suivantes :

- Débit d'éluion : 0,5 ml/min.
- Injecter 50 μl de l'extrait purifié
- Colonne Alltech 1,8 μm , 2,1 x150 mm (ou équivalent)
- Température du four à 40 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Température de la chambre à échantillons : 15 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Le gradient suivant est appliqué :

Temps (min.)	HFBA 0,2 %	Méthanol (80%) HFBA 1% (20%)
0	93.7	6.3
0,5	93.7	6.3
1	30	70
2	30	70
4.5	0	100
5.6	0	100
5.65	93.7	6.3
6.6	93.7	6.3

6.3.2. Conditions MS-MS Xevo

L'acquisition des données se fait en mode MS/MS en « multiple reaction monitoring » (MRM). Les programmes MRM de screening des médicaments vétérinaires comprennent les données reprises dans le tableau en annexe (Annexe 2). La détection des composés par spectrométrie de masse est basée sur une ionisation par électrospray en mode positif ou négatif. Le programme présente les caractéristiques suivantes :

- Source ESI en mode positif avec une température de désolvation d'environ 500 °C
- Le voltage du capillaire est d'environ de 2,5 kV
- La pression dans la cellule de collision est située d'environ 2.10^{-3} mbar.
- La température de source est d'environ 150 °C.

6.3.3. Contenu d'une séquence d'analyse.

La succession des échantillons injectés au cours d'une séquence d'analyse s'établit comme suit :

- QC au cc β
- 1 Lavage
- Les échantillons
- QC au cc β (réinjection du premier QC pour vérifier stabilité du détecteur)

6.4. TRAITEMENT DES DONNEES ACQUISES

Le programme Targetlynx est utilisé pour le traitement des données acquises et l'intégration des pics chromatographiques de chaque composé et du standard interne. Une fois les données traitées, il est possible de visualiser pour chaque composé le chromatogramme de ses transitions et de déterminer la réponse relative par rapport au standard interne (surface du pic).

6.5. ACCEPTATION DE LA SEQUENCE D'ANALYSE

Les critères suivants doivent être rencontrés pour permettre l'acceptation de la séquence d'analyse :

- Les standards internes avec un S/N supérieur à 10 doivent être présents dans chaque échantillon d'analyse ainsi que dans tous les échantillons de contrôle (QC) et dans tous les blancs de contrôle associés à la série ;
- L'absence d'un standard interne dans un échantillon conduira obligatoirement à sa réanalyse.
- Dans tous les échantillons de contrôle associés à la série d'analyse, chaque composé devra présenter un rapport signal/bruit supérieur à 3 pour la transition de screening.
- Le temps de rétention relatif de chaque composé ne pourra différer de plus de 2,5 % par rapport à celui mesuré dans le QC au cc β .
- Dans le(s) blanc(s) de contrôle associé(s) à la série d'analyse il ne pourra être détecté au temps de rétention de chaque composé un pic chromatographique dont la réponse est supérieure à 1/2 de la réponse du QC au cc β .

Lorsque le technicien devra vérifier si le rapport signal sur bruit est égal ou supérieur à 10, il le fera visuellement. En cas d'hésitation, il le vérifiera manuellement.

6.6. INTERPRETATION DES RESULTATS ET RAPPORT

6.6.1. Interprétation des résultats

- Un échantillon sera déclaré **Positif** pour un composé si la réponse obtenue (réponse relative entre surface du composé et surface du standard interne) est supérieure au cca avec un temps de rétention relatif conforme.
- Le temps de rétention relatif du composé dans l'échantillon ne pourra différer de plus de 2,5 % par rapport à celui mesuré dans le QC.
- Le rapport des intensités (aires) des deux transitions est en accord avec le rapport correspondant du QC, suivant le tableau ci-dessous :

Tableau 1. Tolérance admise pour les rapports ioniques (cf. Décision 2002/657/CE)

Rapport des 2 transitions	Tolérance relative permise
> 50 %	± 20 %
> 20 % - 50 %	± 25 %
> 10 % - 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

7. Sauvegarde des données

Tous les spectres MS sont enregistrés sur le support informatique en réseau. Les feuilles de route et les chromatogrammes d'échantillons confirmés non-conformes sont conservés dans les classeurs correspondants.

8. Cartes de contrôle

La méthode décrite dans cette procédure étant une méthode de screening qualitative, aucun enregistrement dans des cartes de contrôle n'est réalisé.

9. Références

- Décision 2002/657/CE de la Commission européenne portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil concernant les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats.
- Arrêté royal modifiant l'arrêté royal du 27 avril 2007 relatif à la lutte contre les salmonelles chez les volailles
- Confirmation of Aminoglycosides by HPLC-MS/MS United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science.

ANNEXE 1. Préparation des solutions stock et des pools

A.1.1. Solutions stock

Les standards sont achetés sous forme de poudre ou de solution. Les solutions stocks sont préparées en solubilisant une quantité connue du standard pure dans un solvant approprié (eau). Les solutions ainsi obtenues sont conservées au 4°C. La concentration exacte est déterminée d'après la valeur de la pesée et en corrigeant cette dernière par la pureté.

A.1.2. Validité des solutions stocks

Chaque solution doit présenter une date limite de conservation après laquelle elle devrait normalement être éliminée. En pratique, une validité d'un an est attribuée à une solution à partir du moment de sa préparation. Pour les solutions certifiées, la date limite de conservation est celle déterminée par le fournisseur.

A.1.3. Préparation des pools

Les tableaux ci dessous indiquent la teneur (en µg/kg) de chaque composé dans un échantillon constitué de 5 g de matrice auquel ont été ajoutés un volume déterminé du pool correspondant à cette matrice.

A.1.3.1. Pool P305-istd

Nom:	P305-fientes-istd
Composition et concentration:	Voir SOP DHA/ANA305

<u>Date de préparation</u> :	<u>Date d'expiration</u> :	<u>Signature opérateur</u> :
------------------------------	-------	----------------------------	-------	------------------------------	-------

<u>Date de contrôle</u> :	<u>Signature opérateur</u> :
---------------------------	-------	------------------------------	-------

<u>Volume final du Pool (ml):</u>	10.0
<u>Volume dopage du QC (µl):</u>	50.0
<u>Prise d'essai (g):</u>	5.0
<u>Solution de dilution :</u>	Eau

Si pool concentré (à diluer avant dopage) ou pool intermédiaire
Facteur de dilution pool:

Code	Nom du standard	N° Lot	Concentration de la solution stock (µg/ml)	Concentration dans la matrice (ppb)	Volume de solution stock à pipeter (µl)
F137	Tobramycine		1000	100	100.0

A.1.3.2. Pool P305-fientes

Nom:	P305-feed
Composition et concentration:	Voir SOP DHA/ANA305

<u>Date de préparation</u> :	<u>Date d'expiration</u> :	<u>Signature opérateur</u> :
------------------------------	-------	----------------------------	-------	------------------------------	-------

<u>Date de contrôle</u> :	<u>Signature opérateur</u> :
---------------------------	-------	------------------------------	-------

<u>Volume final du Pool (ml):</u>	10.0
<u>Volume dopage du QC (µl):</u>	50.0
<u>Prise d'essai (g):</u>	5.0
<u>Solution de dilution :</u>	Eau

Si pool concentré (à diluer avant dopage) ou pool intermédiaire
Facteur de dilution pool:

Code	Nom du standard	N° Lot	Concentration de la solution stock (µg/ml)	Concentration dans la matrice (ppb)	Volume de solution stock à pipeter (µl)
F16	Spectinomycine		1000	50	500

ANNEXE 2. Composés recherchés, données chromatographiques et MRM

Nom	Voltage Cone (v)	Ion Parent (m/z)	Ions Filles (m/z)	Energie Collision (eV)	RT (min)
Tobramycine (ISTD)	30	468.2		25	4.18
Spectinomycine	45	333.1	98 140	20 25	2.87

ANNEXE 3. Composés recherchés

Compounds	Family	cc β $\mu\text{g}/\text{kg}$	cc α $\mu\text{g}/\text{kg}$
Spectinomycine	AMG	50	37.62