



## **SOP DHA/ANA305 v01**

### **Détection et identification d'Aminoglycosides dans les fientes de volailles par LC-MS/MS**

### **DOSSIER DE VALIDATION**

Mise en fonction : 24/06/2016

Pages : 9

Annexes : 1

	Nom, fonction	Date	Signature
Rédaction :	Robert Christelle Responsable méthode		

**Toute reproduction interdite**

Vérification : JL Beudart (RQ)

Mise en fonction : 24.06.2016

## Plan de la validation

<b>Méthode d'analyse</b>	Détection/identification d'aminoglycosides dans les fientes de volaille par LC-MS/MS
<b>Technique</b>	Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS)
<b>Matrice</b>	fientes de volaille
<b>Validation</b>	Validation principale, méthode de confirmation qualitative

## Destinataires : Département Santé / labo LC-MS/MS

### Opérateurs

Pierre-Yves BRASSEUR  
Christelle ROBERT

### Responsable

Christelle ROBERT

## Sommaire

<b>1. Introduction</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Champ d'application</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. Matrice</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. Gamme de concentration</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3. Statut de la méthode</b> .....	<b>4</b>
<b>2.4. Analytes</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Schéma de la validation et performances de la méthode</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1. Limite de décision (CC<math>\alpha</math>), capacité de détection (CC<math>\beta</math>)</b> .....	<b>5</b>
<b>3.2. Selectivité-spécificité</b> .....	<b>5</b>
<b>3.3. Robustesse</b> .....	<b>5</b>
<b>4. Conclusions</b> .....	<b>6</b>
<b>5. Références</b> .....	<b>6</b>
<b>ANNEXE 1. Données Brutes, vérification des performances de la méthode et détermination du CC<math>\alpha</math>7</b>	

## 1. Introduction

La méthode ANA305 a été établie pour la détection et l'identification d'aminoglycosides dans les fientes de volailles.

## 2. Champ d'application

### 2.1. MATRICE

La méthode s'applique aux échantillons de fientes de volailles.

### 2.2. GAMME DE CONCENTRATION

Les composés ont été validés à 50 µg/kg.

### 2.3. STATUT DE LA METHODE

La méthode d'analyse ANA 305 est une méthode de confirmation qualitative (D/I).

### 2.4. ANALYTES

Les composés concernés par ce dossier de validation ANA305 sont repris dans le tableau repris au § 3. Conclusions.

## 3. Schéma de la validation et performances de la méthode

La méthode ANA305 qualitative a été validée de manière principale en 2016, soit sur 1 jour d'analyse avec 20 échantillons blancs et 20 échantillons blancs supplémentés au CCβ.

Ces diverses analyses ont permis de répondre aux exigences de la Décision de la Commission 2002/657/EC.

La méthode était initialement appliquée sur un système HPLC-MS/MS de type XEVO-TQ MS (Waters). Ces diverses analyses ont permis de répondre aux exigences de la Décision de la Commission 2002/657/EC.

Method		CCβ Detection limit	CCα Decision limit	Trueness/ recovery	Precision	Selectivity/ specificity	Applicability/ ruggedness/ stability
Qualitative	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Quantitative	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+
S = Screening    C= Confirmatory    += mandatory							

### 3.1. LIMITE DE DECISION (CC $\alpha$ ), CAPACITE DE DETECTION (CC $\beta$ )

Dans le cas des substances non-autorisées, le CC $\beta$  correspond à la plus basse concentration à laquelle la méthode peut correctement détecter avec une certitude statistique de 1- $\beta$ . Le CC $\alpha$  est calculé sur base de la variabilité observée lors de la validation (où Ss = l'écart-type au CC $\beta$ ).

$$CC\alpha \leq CC\beta - 1,64 \times Ss$$

### 3.2. SELECTIVITE-SPECIFICITE

La **sélectivité** de la méthode LC-MS/MS a été démontrée par la présence d'au moins 2 transitions diagnostiques MRM lors du monitoring en MS/MS, par la détermination du temps de rétention relatif (tolérance de  $\pm 2.5\%$ ), et la détermination des abondances ioniques relatives (dans les tolérances admises).

La **spécificité** a été démontrée par l'absence de pic d'intensité significative dans les échantillons blancs. (réponse inférieure à 50% de la réponse au CC $\beta$ ) au temps de rétention des composés recherchés dans les échantillons de fientes blanches.

### 3.3. ROBUSTESSE

La robustesse avait été testée lors de la validation principale en utilisant divers types des fientes de volailles : fraîches/conservées à 4°C, contenant de la litière ou sans litière.

#### **4. Conclusions**

La méthode peut être déclarée validée pour les composés suivants :

<b>Nom</b>	<b>CC<math>\alpha</math> (ppb)</b>	<b>CC<math>\beta</math> (ppb)</b>	<b>Date validation (+) ou de retrait (-)</b>
Spectinomycine	37.6	50	24/06/2016

#### **5. 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. Données Brutes, vérification des performances de la méthode et détermination du CC $\alpha$**

## DOSSIER VALIDATION/ANA305 D, I AMG/fientes de volailles par LC-MS/MS

## Compound 2: Spectinomycine

	Name	Std. Conc	RT	RRT	Area	1° Area	Height	1° Ht	1° Ratio (Actual)	IS Area	Response	Trace	1° Trace	IS#	IS Height
1	ana63-160610-feces-qc01	50	2.73	0.6538	612	1811	5858	11742	0.34	136642	0.004	333.1>140	333.1>189	1	1703107
2	ana63-160610-feces-qc02	300	2.81	0.6719	603	1589	6496	9599	0.38	168216	0.004	333.1>140	333.1>189	1	2097977
3	ana63-160610-feces-qc03	300	2.82	0.6728	667	1727	5593	12155	0.386	122200	0.005	333.1>140	333.1>189	1	1548714
4	ana63-160610-feces-qc04	300	2.8	0.6681	1202	3752	9776	27695	0.32	189777	0.006	333.1>140	333.1>189	1	2394707
5	ana63-160610-feces-qc05	300	2.75	0.6567	672	2102	5588	13402	0.32	101277	0.007	333.1>140	333.1>189	1	1318613
6	ana63-160610-feces-qc06	300	2.82	0.6724	559	2015	6581	12527	0.277	96583	0.006	333.1>140	333.1>189	1	1248555
7	ana63-160610-feces-qc07	300	2.78	0.6628	581	2124	4572	14831	0.273	92154	0.006	333.1>140	333.1>189	1	1155562
8	ana63-160610-feces-qc08	300	2.8	0.6681	1399	3624	10501	20262	0.386	165745	0.008	333.1>140	333.1>189	1	2087641
9	ana63-160610-feces-qc09	300	2.78	0.6615	685	1933	5763	16537	0.354	110041	0.006	333.1>140	333.1>189	1	1385173
10	ana63-160610-feces-qc10	300	2.75	0.6557	315	1141	3089	7350	0.276	149282	0.002	333.1>140	333.1>189	1	1900941
11	ana63-160610-feces-qc11	300	2.76	0.6581	1440	6992	13467	67965	0.206	154587	0.009	333.1>140	333.1>189	1	1901200
12	ana63-160610-feces-qc12	300	2.81	0.671	1072	2901	10380	19433	0.369	144701	0.007	333.1>140	333.1>189	1	1796756
13	ana63-160610-feces-qc13	300	2.79	0.6657	1315	4167	14484	34288	0.316	131044	0.01	333.1>140	333.1>189	1	1626122
14	ana63-160610-feces-qc14	300	2.81	0.6686	1249	5300	12833	55498	0.236	113738	0.011	333.1>140	333.1>189	1	1455105
15	ana63-160610-feces-qc15	300	2.8	0.6672	422	1568	4671	10222	0.269	61278	0.007	333.1>140	333.1>189	1	774334
16	ana63-160610-feces-qc16	300	2.75	0.6548	1195	4678	10772	39019	0.255	103688	0.012	333.1>140	333.1>189	1	1257480
17	ana63-160610-feces-qc17	300	2.74	0.651	490	1514	4321	9928	0.324	68920	0.007	333.1>140	333.1>189	1	829502
18	ana63-160610-feces-qc18	300	2.8	0.6671	282	749	2173	6261	0.377	66690	0.004	333.1>140	333.1>189	1	956259
19	ana63-160610-feces-qc19	300	2.81	0.6705	1421	4770	13188	37549	0.298	82341	0.017	333.1>140	333.1>189	1	990289
20	ana63-160610-feces-qc20	300	2.76	0.6576	245	947	2591	7293	0.258	53206	0.005	333.1>140	333.1>189	1	658003
21	ana63-160610-feces-net01	300										333.1>140	333.1>189	1	
22	ana63-160610-feces-net02	300								205		333.1>140	333.1>189	1	1032
23	ana63-160610-feces-blanc 01	300	2.85	0.6776	4	25	146	855	0.16	9327	0	333.1>140	333.1>189	1	120572
24	ana63-160610-feces-blanc 02	300	2.87	0.679	3	2	96	77	1.594	4569	0.001	333.1>140	333.1>189	1	60782
25	ana63-160610-feces-blanc 03	300	2.87	0.6858	1	0	24	38	2.841	5864	0	333.1>140	333.1>189	1	64611
26	ana63-160610-feces-blanc 04	300	2.88	0.6881	1	13	62	716	0.078	18645	0	333.1>140	333.1>189	1	220151
27	ana63-160610-feces-blanc 05	300	2.94	0.7014	1	3	22	320	0.215	37987	0	333.1>140	333.1>189	1	451665
28	ana63-160610-feces-blanc 06	300	2.77	0.6591	1	66	50	1360	0.015	35520	0	333.1>140	333.1>189	1	433784
29	ana63-160610-feces-blanc 07	300	2.94	0.7004	3	114	150	2371	0.03	20727	0	333.1>140	333.1>189	1	291122
30	ana63-160610-feces-blanc 08	300	2.94	0.6984	1	185	35	1998	0.004	257256	0	333.1>140	333.1>189	1	3203592
31	ana63-160610-feces-blanc 09	300	2.98	0.7059	3	120	87	1771	0.024	235230	0	333.1>140	333.1>189	1	3035315
32	ana63-160610-feces-blanc 10	300	2.97	0.7065	1	108	55	2813	0.009	191487	0	333.1>140	333.1>189	1	2437823
33	ana63-160610-feces-blanc 11	300	2.83	0.6733	35	71	1177	1631	0.492	248507	0	333.1>140	333.1>189	1	3028776
34	ana63-160610-feces-blanc 12	300	2.83	0.6724	4	1	97	40	6.516	168047	0	333.1>140	333.1>189	1	2099846
35	ana63-160610-feces-blanc 13	300	2.78	0.6595	1	12	34	218	0.06	196625	0	333.1>140	333.1>189	1	2370335
36	ana63-160610-feces-blanc 14	300	2.72	0.6468	14	0	453	32	36.963	191483	0	333.1>140	333.1>189	1	2437823
37	ana63-160610-feces-blanc 15	300	2.79	0.6647	1	33	54	987	0.03	146125	0	333.1>140	333.1>189	1	1816262
38	ana63-160610-feces-blanc 16	300	2.84	0.6743	1	5	27	249	0.093	124056	0	333.1>140	333.1>189	1	1519129
39	ana63-160610-feces-blanc 17	300	2.9	0.6894	1	19	91	322	0.061	5433	0	333.1>140	333.1>189	1	68079
40	ana63-160610-feces-blanc 18	300	2.9	0.6894	3	1	123	52	3.446	68891	0	333.1>140	333.1>189	1	829502
41	ana63-160610-feces-blanc 19	300	2.93	0.6991	0	29	9	992	0.002	3839	0	333.1>140	333.1>189	1	42499
42	ana63-160610-feces-blanc 20	300	2.86	0.6785	0	3	15	105	0.088	119504	0	333.1>140	333.1>189	1	1460183



DOSSIER VALIDATION/ANA305 D, I AMG/fientes de volailles par LC-MS/MS

Compound 2: Spectinomycine

Réponse 1er Trace (surface)						Réponse 2nd Trace (surface)						RRT				Ecart/Moy (%)			
Répon. Moy.	SD	CV intra-jour (%)	CV norme (%)	Répon. Moy.	SD	CV intra-jour (%)	CV norme (%)	RRT	Ecart/Moy (%)	IR	Ecart/Moy (%)	IR	Ecart/Moy (%)						
0.007	0.003	46.8	15.10	0.025	0.014	56.1	15.10	0.654	1.50	OK	0.338	8.67	OK						
0.0045	0.0034			0.0133	0.0069			0.672	1.22	OK	0.379	22.04	OK						
0.0036	0.0031			0.0094	0.0046			0.673	1.36	OK	0.386	24.20	OK						
0.0055	0.0036			0.0141	0.0078			0.668	0.65	OK	0.320	3.02	OK						
0.0063	0.0041			0.0198	0.0116			0.657	1.07	OK	0.320	2.81	OK						
0.0066	0.0042			0.0208	0.0102			0.672	1.30	OK	0.277	10.79	OK						
0.0058	0.0053			0.0209	0.0100			0.663	0.15	OK	0.274	12.03	OK						
0.0063	0.0040			0.0230	0.0128			0.668	0.65	OK	0.386	24.14	OK						
0.0084	0.0050			0.0219	0.0097			0.662	0.34	OK	0.354	13.96	OK						
0.0062	0.0042			0.0176	0.0119			0.656	1.22	OK	0.276	11.22	OK						
0.0021	0.0016			0.0076	0.0039			0.658	0.85	OK	0.206	33.77	KO						
0.0093	0.0071			0.0452	0.0357			0.671	1.09	OK	0.370	18.83	OK						
0.0074	0.0058			0.0200	0.0108			0.666	0.29	OK	0.316	1.48	OK						
0.0100	0.0089			0.0318	0.0211			0.669	0.73	OK	0.236	24.22	OK						
0.0110	0.0088			0.0466	0.0381			0.667	0.52	OK	0.269	13.45	OK						
0.0069	0.0060			0.0256	0.0132			0.655	1.35	OK	0.255	17.85	OK						
0.0115	0.0086			0.0451	0.0310			0.651	1.92	OK	0.324	4.08	OK						
0.0071	0.0052			0.0220	0.0120			0.667	0.50	OK	0.377	21.08	OK						
0.0042	0.0023			0.0112	0.0065			0.671	1.01	OK	0.298	4.20	OK						
0.0173	0.0133			0.0579	0.0379			0.658	0.93	OK	0.259	16.80	OK						
0.0046	0.0039			0.0178	0.0111			0.678	2.08	OK	0.160	48.55	KO						
0.0004	0.0012			0.0027	0.0071			0.679	2.29	OK	1.500	382.38	KO						
0.0007	0.0016			0.0004	0.0013			0.686	3.32	KO	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!						
0.0002	0.0004			0.0000	0.0006			0.688	3.67	KO	0.077	75.26	KO						
0.0001	0.0003			0.0007	0.0033			0.701	5.67	KO	0.333	7.19	OK						
0.0000	0.0000			0.0001	0.0007			0.659	0.70	OK	0.015	95.13	KO						
0.0000	0.0001			0.0019	0.0031			0.700	5.52	KO	0.026	91.54	KO						
0.0001	0.0005			0.0055	0.0081			0.698	5.22	KO	0.005	98.26	KO						
0.0000	0.0000			0.0007	0.0006			0.706	6.35	KO	0.025	91.96	KO						
0.0000	0.0000			0.0005	0.0006			0.707	6.44	KO	0.009	97.02	KO						
0.0000	0.0000			0.0006	0.0012			0.673	1.44	OK	0.493	58.53	KO						
0.0000	0.0000			0.0003	0.0005			0.672	1.30	OK	4.000	1186.34	KO						
0.0000	0.0000			0.0000	0.0000			0.660	0.64	OK	0.083	73.20	KO						
0.0000	0.0000			0.0001	0.0001			0.647	2.56	KO	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!						
0.0001	0.0002			0.0000	0.0000			0.665	0.14	OK	0.030	90.26	KO						
0.0000	0.0000			0.0002	0.0005			0.674	1.59	OK	0.200	35.68	KO						
0.0000	0.0000			0.0000	0.0002			0.689	3.86	KO	0.053	83.07	KO						
0.0002	0.0013			0.0035	0.0047			0.689	3.86	KO	3.000	884.75	KO						
0.0000	0.0001			0.0000	0.0001			0.699	5.32	KO	0.000	100.00	KO						
0.0000	0.0002			0.0076	0.0233			0.679	2.22	OK	0.000	100.00	KO						
0.0000	0.0000			0.0000	0.0001														

  

Trace 1	OK
Trace 2	OK
RRT	OK
IR	OK
Spectinomycine	
Validé D,I	

  

1ère Trace	
ccβ (ppb)	50.00
cca (réponse)	0.01
cca (ppb)	37.618

  

2ème Trace	
ccβ (ppb)	50.00
cca (réponse)	0.02
cca (ppb)	

  

0.664	RRT	Moyenne	IR	0.311
2.5	RRT	Tolérance %	IR	25.0