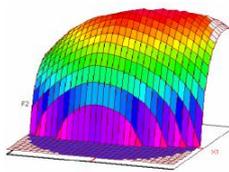


Année Universitaire : 2017-2018



Master Sciences et Techniques CAC Ageq
Chimométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion de la qualité

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Mise au point et la validation d'une méthode de
confirmation des résidus des quinolones dans le muscle
par LC-MS/MS**

Présenté par:

LAHNINE Oumaima

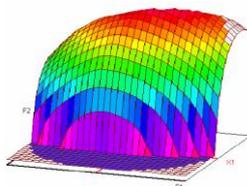
Encadré par:

- Mr. A. TALMI (ONSSA Rabat)
- Pr. E. H. ALILOU (FST Fès)

Soutenu Le 13 Juin 2018 devant le jury composé de:

- Pr. E. H. ALILOU
- Pr. A. BEN TAMA
- Pr. F. OUZZANI

**Stage effectué à : L'Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires à Rabat
(ONSSA)**



Master ST CAC Ageq

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: LAHNINE Oumaima

Année Universitaire : 2017/2018

Titre: La mise au point et la validation d'une méthode de confirmation des résidus de quinolones dans le muscle par LC-MS/MS

Résumé

L'utilisation croissante des antibiotiques en médecine vétérinaire s'avère être un grand problème de santé publique si elle n'est pas contrôlée.

Le Maroc figure sur la liste des pays qui font le contrôle des denrées alimentaires d'origine animale, et dispose également des plans nationaux de contrôle. La DPIV est l'un des organismes contribuant à la mise en place de ces plans. Pour confirmer la présence des résidus des quinolones dans le muscle animal, une mise au point et validation d'une méthode d'analyse est nécessaire pour la détection et la quantification de ces substances dans les matrices étudiées. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem est considérée comme la méthode analytique la plus performante pour la détection de ces molécules.

Le protocole analytique développé au sein du laboratoire porte sur les modalités d'application e la décision 2002/657 en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats. Une fois une méthode est validée, la confirmation des échantillons aura lieu pour déterminer leur innocuité ou leur non-conformité.

Mots clés: Validation – Antibiotiques – Quinolones – résidus des médicaments vétérinaires

Dédicace

Je dédie ce travail à

Ma très chère mère

Tu représente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Mon précieux père

Qui peut être fier et trouve ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire sorte que ce travail porte son fruit. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de ta part.

Mon frère et mes sœurs

Adam, Yasmine, Ikram et en particulier mon idéale Btissam ainsi son mari, avec l'expression de mon attachement et mon affection.

Ma grande famille

Chacun par son nom

Mon oncle Jawad et sa femme, merci infiniment pour votre soutien et encouragement.

En particulier Btissam Loukili et toute sa famille

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ce mémoire.

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier

Mon encadrant et professeur Mr. *ALILOU Elhoussine*, vos qualités toujours appréciées de pédagogie, votre modestie, votre rigueur scientifique, vos qualités humaines, ainsi que le désir profond de transmettre vos connaissances alliées à une grande simplicité font de vous un homme admirable et je vous prie d'accepter par ce travail, l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Mr. Talmi Ali chef de service et de la section chimie à l'ONSSA, je vous adresse ma profonde gratitude pour votre orientation, votre confiance et vos encouragements, vous m'avez accordé beaucoup de votre précieux temps et m'avez guidé avec rigueur et amabilité durant mon stage. J'ai eu le privilège de travailler parmi votre équipe.

Je tiens à exprimer mon sincère remerciement envers *Mme. ID SIDI YAHIA Khadija* et *Mr. DARKAOUI Sami* pour votre accueil.

J'aimerais adresser mes remerciements à tout le personnel du service de contrôle et des expertises, spécialement *Mme. MOUTKANE*, *Mme El KOUCHE*, *Mme LAMINI*, *Mr. ZERABI* pour me permettre de faire partie de leur équipe pendant ce stage, pour leur excellent accueil, leurs conseils avisés et leur bonne humeur.

Je tiens à remercier *Pr. El HADRAMI* responsable de la filière Chimie et Analyse Chimique pour votre encadrement tout au long de ce master.

Les membres de jury *Pr. OUZZANI*, *Pr. BEN TAMA* trouvent ici l'expression de ma plus haute considération d'avoir accepté de participer à l'évaluation de ce modeste travail.

J'ai une pensée particulière à mes collègues et amis de l'équipe à l'ONSSA : Saoudi Meryem, Gouita Hanane, Lamrani Alaoui Fatima Zahra, Maher Hind, Semlal Ihoussine, Zennouhi Abdelhadi et Chellak Imane pour les encouragements et pour l'ambiance chaleureuse qu'ils ont su créer au laboratoire. Le travail à leurs côtés est un réel plaisir !

Enfin, mes vifs remerciements s'adressent à mes amis Aachimi Abir, Nali Mohssine, Malki Hind, Chraïbi Chaimae ...

Merci à toutes personnes qui m'ont aidé de près ou de loin au bon déroulement de ce stage.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les limites maximales de résidus ou la concentration de travail (selon le règlement (UE) No 37/2010)	15
Tableau 2 : valeurs de justesse à respecter selon la décision européenne 2002/657.....	23
Tableau 3 : valeurs de reproductibilité du signal à respecter selon la décision 2002/657	24
Tableau 4 : valeurs de reproductibilité du ratio du signal à respecter selon la décision 2002/657.....	24
Tableau 5 : Durées de vies de chaque molécule de quinolone.....	29
Tableau 6 : Le volume à prélever pour la préparation de la solution de travail des standards	30
Tableau 7 : Les différents niveaux de la gamme.....	30
Tableau 8 : Le gradient d'élution de la phase mobile	31
Tableau 9 : Les conditions de détection en mode négatif	32
Tableau 10: les niveaux de concentration de la gamme de chaque molécule selon la LMR ou LWC	37
Tableau 11 : Résultats de la droite de linéarité pour chaque molécule	40
Tableau 12 : le rendement d'extraction de chaque molécule	41
Tableau 13 : les coefficients de variation du signal, temps de rétention et ratio	41
Tableau 14 : les concentrations estimées et la justesse des molécules.....	42
Tableau 15 : les valeurs de CC α de chaque molécule	43
Tableau 16 : les valeurs de l'incertitude de chaque molécule.....	43

Liste des figures

Figure 1 : Structure des quinolones	10
Figure 2 : structure chimique du Marbofloxacin	11
Figure 3: structure chimique du Norfloxacin	12
Figure 4 : structure chimique du ciprofloxacin	12
Figure 5 : Structure chimique du danofloxacin	12
Figure 6 : structure chimique de l'enrofloxacin.....	13
Figure 7 : structure chimique du sarafloxacin	13
Figure 8 : structure chimique du Difloxacin	13
Figure 9: structure chimique de l'Acide oxolinique	14
Figure 10 : structure chimique du Flumequine	14
Figure 11: structure chimique de l'Acide nalidixique	14
Figure 12 : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (AB SCIEX 5500 QTRAP).....	16
Figure 13 : Appareil de la Chromatographie Liquide à Haute Performance	17
Figure 14 : La spectrométrie de masse en tandem AB SCIEX 5500 QTRAP.....	18
Figure 15: Source d'ionisation	19
Figure 16: Schéma d'une ionisation par Electrospray	19
Figure 17: Schéma résumant les trois quadripôles.....	20
Figure 18: Schéma résumant le principe de la spectrométrie de masse en tandem	20
Figure 19: Chromatogrammes de 20 échantillons blancs et de 20 analytes seuls.....	22
Figure 20: Représentation de la justesse	23
Figure 21 : Représentation de la fidélité	24
Figure 22 : Chromatogramme d'un standard équivalent 1 LMR.....	34
Figure 23 : Chromatogramme d'un blanc	34
Figure 24 : Chromatogramme d'un supplémenté équivalent 1 LMR	35
Figure 25 : Chromatogramme d'un standard équivalent 1 LMR de la molécule acide nalidixique.....	35
Figure 26: Chromatogramme d'un blanc de la molécule acide nalidixique	35
Figure 27 : Chromatogramme d'un standard équivalent 1 LMR de la molécule acide nalidixique.....	36

Liste des abréviations

AMM	Autorisation de mise sur le marché
BPF	Bonnes pratiques de fabrication
CAD	Gaz de collision
CC α	Limite de décision
CE	Energie de collision
CUR	Gaz de Curtain
CXP	Collision cell exit potential
CV	Coefficient de variation
DPIV	La division de la pharmacie et des intrants vétérinaires
DP	Declustering potential
EI	Etalon interne
EP	Entrance potentiel
ESI	Ionisation electro-spray
FAO	Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDA	Food and Drug Administration (Agence américaine des produits alimentaires médicamenteux)
GS1	Heater (nebulizing gaz)
GS2	Nébuliser (drying gaz)
HFBA	Acide heptafluorobutyrique
HPLC	La chromatographie liquide en haute performance
IHAP	Influenza Aviaire Hautement Pathogène
IS	Source d'ionisation
ISO	Organisation internationale de normalisation
LC	Chromatographie liquide
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem
LMR	Limite maximale en résidus

LWC	Laboratory Working Concentration
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Spectrométrie de masse
NaOH	Hydroxyde de sodium
OMS	Organisme mondiale de santé
ONSSA	Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires
PIB	Produit Intérieur Brut
PFPA	Acide fluoropropionique
SEMAC	Service marocain d'accréditation
SIMV	Syndicat de l'Industrie du médicament et réactif vétérinaire
SM	Solution mère
ST	Solution de travail
TCA	Acide trichloroacétique
TR	Temps de rétention

Chapitre I :
Partie
bibliographique

Chapitre II :

Partie expérimentale

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Partie bibliographique	
Présentation de l'Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires (ONSSA).....	2
Présentation de la Division de la pharmacie et des intrants vétérinaires (DPIV)	5
Généralités sur les résidus des médicaments vétérinaires	7
Généralités sur les médicaments vétérinaires :	7
Généralités sur les antibiotiques :	8
Définition des résidus :	8
Temps de retrait ou délai d'attente	9
La limite maximale de résidus.....	9
Les quinolones	10
Généralités	10
1. Présentation des molécules recherchées	11
2. Principaux risques sanitaires des quinolones	14
3. Les limites maximales en résidus et les concentrations de travail.....	15
Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (LC/MS-MS).....	16
1. La chromatographie liquide à haute performance	16
2. La spectrométrie de masse en tandem	18
Mise au point et validation de la méthode :	21
1. Les grandeurs mesurées	21
2. Critères de validation.....	22
2.1. Spécificité.....	22
2.2. Linéarité.....	22
2.3. Justesse	23
2.4. Fidélité	23

2.5. Limite de décision ($CC\alpha$).....	25
2.6. Rendement d'extraction.....	26

Chapitre II : Partie expérimentale

Matériel et méthode 27

1. Introduction.....	27
2. Objet et domaine d'application	27
3. Définition	27
4. Principe de la méthode	27
5. Appareillage :	28
Echantillonnage :.....	28
Réactifs et produits	28
7.1. Réactifs	28
7.2. Solutions.....	28
7.3. Substances standards et étalons internes	29
Mode opératoire :.....	29
8.1. Préparation des solutions standards et des standards internes :	29
8.2. Préparation des échantillons	30
8.3. Procédure d'extraction – purification	31
Les conditions de l'UHPLC et la spectrométrie en tandem	31
9.1. Conditions chromatographiques.....	31
9.2. Conditions de la spectrométrie de masse en tandem	31
9.3. Transitions recherchées et temps de rétention :.....	32
Méthodologie de l'étude	33

Résultats et discussion 34

1. Résultats.....	34
1.1. Chromatogramme :	34
1.2. Résultats :.....	36
1.3. Traitement et interprétation des résultats :.....	36
1.3.1. Spécificité :	36
1.3.2. Linéarité :.....	36
1.3.3. Rendement:	41
1.3.4. Reproductibilité :.....	41

1.3.5. Justesse:	42
1.3.6. La limite de décision $CC\alpha$:	43
1.3.7. Incertitude de la méthode :.....	43
1.4. Conclusion :	44
2. Discussion.....	44
3. Conclusion	45
Conclusion générale.....	46
Annexe	

Références bibliographiques :

1. Profil du secteur laitier et des viandes rouges au Maroc, ELMKINSSI Rim. Service des délégués commerciaux du Canada. Février 2016.
2. <http://www.agriculture.gov.ma/pages/lagriculture-en-chiffre-plaquette-onssa-fr-2014.pdf>
3. <http://www.onssa.gov.ma/fr/laboratoires-sp-2215/service-du-controle-et-des-expertises>
4. Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires – JECFA/ Manuel de procédure du codex : la commission du codex alimentarius <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/vetdrugs/glossary/fr/>
5. Les résidus de médicaments vétérinaires. L'évaluation et la gestion du risque : <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ft-20ans-ResidusMedicsVet.pdf>
6. Les résidus de médicaments vétérinaires. L'évaluation et la gestion du risque : <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ft-20ans-ResidusMedicsVet.pdf>
7. FAO/OMS, 1988 Evaluation of certain veterinary drug residues in food, 736 OMS, Genève.
8. Définitions adoptées par la Commission du Codex Alimentarius- Manuel de procédure du Codex-.
9. Les résidus: aspects juridiques/Gaborone, du 31 octobre au 2 novembre 2011/ A. TEKO-AGBO Ecole Inter- Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires deDakar/ page 29.
10. Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires – JECFA/ Manuel de procédure du codex : la commission du codex alimentarius <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/vetdrugs/glossary/fr/> Consulté le 09-03-2016.
11. <http://www.clubveterinairesetentreprises.fr/wp-content/uploads/2016/11/Industrie-pharmaceutique-v%C3%A9t%C3%A9rinaire-Th%C3%A8se-Bossy-2016.pdf>
12. Quinolones et Fluoroquinolones : des décennies de développement et d'utilisation Le point sur les molécules vétérinaires Partie 2 : le regard du vétérinaire MUYLAERT A., MAINIL J.G Ann. Méd. Vét., 2014, 158, page 73.
13. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions, G. S. TILLOTSON, 1996, page 320.
14. Usage prudent d'une fluoroquinolone de troisième génération dans le cadre de la cascade : le cas de la marbofloxacin chez le cheval documenté par un modèle de

population et des simulations de Monte Carlo, CAZAJEU Lorelei, UNIVERSITÉ DE TOULOUSE 2015 page 22.

15. Influence des facteurs associés à une antibiothérapie de type métaglycémique sur les relations pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) des antibiotiques. Conséquences sur les schémas posologiques et sur l'émergence de résistance, Anne-Sylvie KESTEMAN, UNIVERSITÉ DE TOULOUSE 2009, page 25.
16. An integrated method for degradation products detection and characterization using hybrid ion trap/time-of-flight mass spectrometry and data processing techniques : Application to study of the degradation products of danofloxacin under stressed conditions / Zhao-Ying Liu, Xiao-Ni Zhou, Hua-Hai Zhang, Leren Wan et Zhi-Liang Sun / original paper / 10 January 2011 / page 2476
17. Biotransformation of the antibiotic danofloxacin by *Xylaria longipes* lead to an efficient reduction of its antibacterial activity / Journal of agricultural and food chemistry
18. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sarafloxacin#section=Top>
19. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Difloxacin#section=Top>
20. Devenir dans l'environnement aquacole de l'oxytétracycline, l'acide oxolinique et la fluméquine, antibiotiques utilisés en thérapeutique piscicole, Raphaël DELEPEE Université de Nantes, 2009, page 4
21. RÈGLEMENT (UE) No 37/2010 DE LA COMMISSION du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale/ Journal officiel de l'Union européenne
22. Antibacterial drugs, Mark Farrington, Clinical Pharmacology (Eleventh Edition), 2012
23. Utilisation de la CL/SM/SM en pharmacocinétique : disparition d'un antibiotique dans le muscle de truite.
24. Ionization Technique in Modern LC/MS/MS. Dr Houssain El Aribi, Senior Support and Application Specialist M, page 13.
25. Laboratoire d'étude et de recherche sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants : Confirmation de la présence d'antibiotique dans les denrées d'origine animale par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.
26. LC/MS/MS API 4000/ AB SCIEX.
27. Formation LC/MS/MS System Basic Training. Dr. Houssain El Aribi, Senior Support and Application Specialist MS, page 21.

28. Cours de master Chimométrie et analyse chimique : application à la gestion industrielle de la qualité
29. Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques - Recueil de directives et autres documents - Volume 1
30. Guide de validation de méthodes analytiques destinées à l'analyse de résidus et contaminants chimiques dans les matrices biologiques selon la décision 2002/657/EC
31. Guide for validation of analytical methods/ Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (LABERCA) / Emmanuelle Bichon/ 14 avril 2005
32. DIRECTIVE 96/23/CE DU CONSEIL du 29 avril 1996 relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE/ Journal officiel des Communautés européennes/page 11
33. Mode opératoire N° PR-06-MO-LCMSMS-005/Méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques dans le muscle et le lait par LC-MS/MS/Edition N°6 du 19/08/2011
34. Méthode de détection de résidus d'antibiotiques dans le muscle par CL-SM/SM / ANSES/LMV/16/02 version 2 / septembre 2016 / page 12

Introduction

En 50 ans, l'agriculture marocaine a accompli de grands progrès en termes de modernisation et de diversification. Hier comme aujourd'hui, l'activité agricole représente d'ailleurs l'un des piliers de l'économie marocaine.

L'industrie de l'élevage fait l'objet d'un plan de développement national à l'horizon 2020 dont les objectifs sont définis dans le Plan Maroc Vert lancé en 2008. Ce plan vise notamment à accroître les niveaux de consommation annuelle par habitant de viandes rouges de 14,2 à 20 kilogrammes pour s'aligner avec les normes nutritionnelles de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et de l'Organisation des Nations Unies (FAO) pour l'alimentation et l'agriculture. (1)

Le Maroc a également amélioré son autosuffisance concernant certaines denrées alimentaires, dans un contexte marqué par une intégration grandissante du marché international. Le Royaume assure ainsi 100% de ses besoins en viandes, fruits et légumes ; 82% de ses besoins en lait, 50% de ses besoins en sucre, 60% de ses besoins en céréales et 20% de ses besoins en huile. (2)

Ces vingt dernières années, le recours à l'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation des animaux producteurs de denrées alimentaires a évolué au Maroc, afin de remédier à certaines pathologies et augmenter par conséquent le rendement de la production. Ce qui donne naissance aux principaux dangers pour le consommateur : la présence de résidus d'antibiotiques dans notre alimentation.

Ces dangers font l'objet des plans de surveillance et de contrôle dans un cadre réglementaire par l'Office national de la sécurité sanitaire des produits alimentaires (ONSSA), qui a pour mission le contrôle et la certification sanitaire à l'importation et à l'exportation des animaux vivants ainsi que la mise à niveau sanitaire des élevages.

Ce travail fait partie des activités de la DPIV (service du contrôle et des expertises, section chimie). Ce dernier s'intéresse à la mise au point et la validation d'une nouvelle méthode de confirmation des résidus des quinolones dans le muscle animal. Le travail réalisé comprend deux parties :

- Une partie bibliographique, rapportant les études et la littérature relatives aux résidus des antibiotiques.
- Une partie expérimentale, dans laquelle on présente les critères de validation d'une nouvelle méthode d'analyse des résidus des quinolones dans le muscle animal par LC-MS/MS.

I. Présentation de l'office National de sécurité Sanitaire des produits alimentaires (ONSSA)

L'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires (ONSSA) est un établissement public doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière créée en 2009 par la loi n° 25-08 et placée sous la tutelle de l'Etat. Il exerce, pour le compte de l'Etat, les attributions relatives à la protection de la santé du consommateur et à la préservation de la santé des animaux et des végétaux. Il est appelé à appliquer la politique du gouvernement en matière de sécurité sanitaire des végétaux, des animaux et des produits alimentaires depuis les matières premières jusqu'au consommateur final, y compris les aliments pour animaux.

L'ONSSA a été créé pour appuyer les orientations stratégiques tracées par le Plan Maroc Vert qui ambitionne de faire de l'agriculture un moteur de croissance essentiel dans l'économie marocaine, ainsi de rendre les produits alimentaires plus compétitifs aussi bien sur le marché national qu'international.

Les missions de l'ONSSA

Afin d'accomplir ses attributions relatives à la protection de la santé du consommateur et à la préservation de la santé des animaux et des végétaux, l'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires a été chargé d' :

- ◆ Assurer la surveillance et la protection sanitaire du patrimoine végétal et animal au niveau national et aux frontières ;
- ◆ Assurer la sécurité sanitaire des produits alimentaires depuis les matières premières jusqu'au consommateur final, y compris les produits de la pêche et les aliments pour animaux ;
- ◆ Homologuer et contrôler les intrants agricoles (semences, pesticides, engrais) et les médicaments vétérinaires ;
- ◆ Appliquer les législations et réglementations relatives à la police sanitaire vétérinaire et phytosanitaire.

Approche du contrôle

L'approche adoptée est une approche innovante et moderne en matière de contrôle sanitaire des végétaux, des animaux et des produits alimentaires basée sur :

- Le contrôle harmonisé des processus de fabrication basé sur le principe de l'analyse de risque
- La responsabilisation des professionnels et l'obligation de l'autocontrôle

- L'octroi de l'agrément sanitaire à tous les établissements agro-alimentaires
- L'obligation de la traçabilité et la responsabilisation des professionnels pour le retrait des produits dangereux ou non-conformes.

Un engagement de qualité

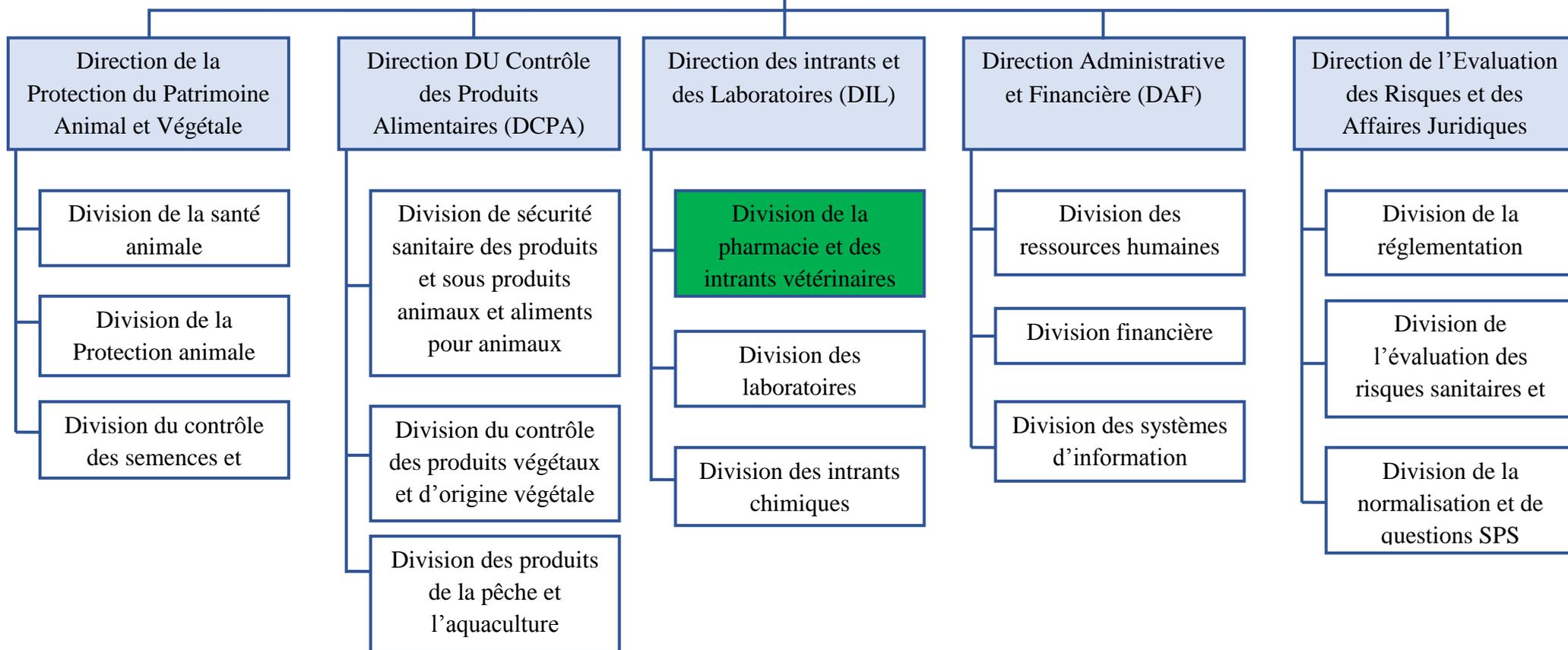
L'ONSSA s'est inscrit dès son démarrage dans un processus d'amélioration continue à travers la mise en place d'une démarche qualité au sein de l'ensemble de ses structures. Pour répondre à cet engagement qualité qui vise à hisser le niveau des prestations de ses structures, un programme d'assurance qualité est lancé pour les doter d'une référentielle qualité et aboutir à leur accréditation selon les normes ISO 9001 et ISO 17025.

Les efforts déployés dans ce sens ont permis d'aboutir en 2012 à des accréditations de ses laboratoires dans différents domaines.

Organigramme

L'ONSSA est organisé en structures centrales, régionales et provinciales. Au niveau central il comprend les structures suivantes :

Direction Générale



II. Présentation de la Division de la pharmacie et des intrants vétérinaires (DPIV)

Le médicament vétérinaire est un facteur très important de la santé du cheptel. Son usage doit être strictement contrôlé car, s'il doit avant tout être efficace, il ne doit en aucun cas constituer un risque ni pour l'animal, ni pour le consommateur des denrées animales ou d'origine animale, ni pour l'environnement. Les médicaments vétérinaires ne peuvent donc être utilisés qu'après avoir reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) de la part de la division de la pharmacie et des intrants vétérinaires (DPIV). Cette autorisation ne peut être délivrée par ce service compétent qu'après une étude approfondie du dossier, accompagnée d'une analyse des produits soumis à autorisation.

La DPIV relevant de l'Office national de sécurité sanitaire des produits alimentaires (ONSSA) vient d'être accréditée en tant qu'organisme d'inspection de type A pour réaliser les inspections dans le domaine de la pharmacie vétérinaire. Ce dernier a reçu le certificat de l'accréditation NM ISO/CEI 17025 par le Service marocain d'accréditation (SEMAC) relevant du ministère de l'industrie, du commerce et des nouvelles technologies.

Ses principales missions et attributions

Le Service du Contrôle et des Expertises est un service public attaché à la Division de la Pharmacie et des Intrants vétérinaires de la Direction des Services Vétérinaires de l'ONSSA. Ses principales missions et attributions sont :

- ◆ Expertise analytique et microbiologique des médicaments vétérinaires, y compris les vaccins, les produits biocides d'élevage et les additifs de l'alimentation animale.
- ◆ Analyse des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées animales et d'origine animale.
- ◆ Contribution aux travaux de recherches dans le domaine de la pharmacie vétérinaire et de la recherche des résidus de médicaments vétérinaires.
- ◆ Diagnostic de certaines maladies animales (rage et IAHP).

Les différentes sections du service :

Le service est organisé en diverses sections pour une meilleure gestion de l'activité :

- ◆ Section Chimie :
 - Contrôle analytique du médicament vétérinaire (antiparasitaire, antibiotique, vitamines, vaccins, ...).

- Recherche des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées animales et d'origine animale.

- ◆ Section Microbiologie.
- ◆ Section Diagnostic.
- ◆ Section Animalerie.
- ◆ Section Maintenance et Métrologie. (3)

III. Généralités sur les résidus des médicaments vétérinaires

1. Généralités sur les médicaments vétérinaires :

Un médicament vétérinaire est «toute substance appliquée ou administrée à tout animal producteur de nourriture, tels que les animaux producteurs de viande ou de lait, la volaille, les poissons ou les abeilles, que ce médicament soit utilisé dans un but thérapeutique, prophylactique ou de diagnostic, ou pour la modification de fonctions physiologiques ou du comportement». (4)

Le médicament contient :

- ◆ Un **principe actif**, substance d'origine chimique ou naturelle caractérisée par un **mécanisme d'action curatif ou préventif** précis dans l'organisme,
- ◆ **Des excipients**, substances d'origine chimique ou naturelle qui facilitent la fabrication et l'utilisation du médicament mais ne présentent pas d'effet curatif ou préventif.

Les médicaments vétérinaires se présentent sous plusieurs formes. C'est ainsi qu'on distingue les formes :

- Solides (les poudres, les comprimés, les granulés, etc.),
- Liquides (les collyres, les solutions injectables, etc.),
- Pâteuses (les pommades, les pâtes dermiques, etc.)
- Gazeuses (les sprays, etc.).

Chaque médicament vétérinaire possède une activité (ou plusieurs) appropriée, et une efficacité contre certaines maladies, on trouve parmi les médicaments les plus utilisés : les antibiotiques prenant l'exemple de l'enrofloxacin, les sulfamides et les quinolones qui font l'objet de ce projet.

Après l'étape de la recherche et développement, puis celle de l'enregistrement, vient la production. Elle fait appel aux principes de l'assurance qualité et notamment aux bonnes pratiques de fabrication (BPF). Le médicament vétérinaire est un produit qui conformément à la réglementation, doit subir de nombreux contrôles de façon à garantir un produit de qualité.

La qualité des médicaments vétérinaires est assurée par les conditions particulières de leur fabrication, conditionnement, détention et commercialisation, conformément aux dossiers agréés par la commission mixte (Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et des Pêches Maritimes - Ministère de la Santé) d'autorisation de mise sur le marché. Elle est due aussi à l'action de l'inspection conjointe (Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et des Pêches Maritimes - Ministère de la Santé) des établissements pharmaceutiques vétérinaires.

2. Généralités sur les antibiotiques :

Les antibiotiques sont des médicaments utilisés pour traiter et prévenir les infections bactériennes. Ils agissent sur les bactéries de diverses manières. Certains empêchent la formation de leurs enveloppes protectrices (membrane et paroi). D'autres substances agissent en bloquant certaines réactions chimiques indispensables à leur métabolisme. Enfin, certains antibiotiques empêchent la traduction de leur information génétique (leurs gènes) en protéines.

L'utilisation d'antibiotiques comme médicaments vétérinaires est un problème de santé publique pour le consommateur. En effet, ils sont susceptibles d'être à l'origine d'effets néfastes tels que :

- ◆ La sélection de bactéries résistantes d'origine animale directement par le traitement antibiotique appliqué, et la transmission de cette résistance via l'alimentation, à des bactéries présentes dans le tube digestif de l'homme ;
- ◆ La modification de la flore intestinale humaine, directement par l'action de résidus d'antibiotiques ;
- ◆ A court terme, les réactions immédiates d'hypersensibilité ou à long terme, les phénomènes de mutagenèse et de cancérogenèse liés à la présence des résidus.
- ◆ L'usage abusif ou excessif des antibiotiques accélère le phénomène de la résistance des bactéries, de même que de mauvaises pratiques de prévention et de lutte contre l'infection. (11)

3. Définition des résidus :

Toutes les substances pharmacologiquement actives, exprimées en mg/kg ou g/kg sur la base du poids frais, qu'il s'agisse de substances actives, d'excipients ou de produits de dégradation. (6)

a. Selon l'OMS

Un résidu de médicament vétérinaire est «toutes les substances médicamenteuses, ainsi que leurs métabolites qui subsistent dans les viandes ou les autres denrées alimentaires d'origine animal auquel le médicament en cause a été administré conformément au mode d'emploi recommandé». (7)

b. Selon le comité du codex alimentarius

Un résidu de médicament vétérinaire est défini par «les composés souches ou leurs métabolites ainsi que les impuretés associées au médicament vétérinaire concerné, présents dans toute partie comestible du produit animal». (8)

Les résidus peuvent parfois être décelés dans les produits d'origine animale. Cela peut entraîner :

- Des effets immédiats très spécifiques comme par exemple un effet pharmacologique, similaire ou différent de celui produit chez l'animal, une allergie ou une sensibilisation.
- Des effets à plus long terme par ingestion régulière de faibles quantités d'une même substance comme par exemple un effet cancérigène.
- Le développement d'antibiorésistance par sélection de bactéries devenues résistantes aux antibiotiques dans la flore intestinale du consommateur.
- Le risque de perte d'efficacité de certains médicaments en raison d'une accoutumance de l'organisme des parasites.

La présence des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale est préoccupante en raison des risques toxicologiques pour le consommateur et du risque de non-conformité aux exigences réglementaires lors d'échanges commerciaux.

4. Temps de retrait ou délai d'attente

Pour chaque médicament vétérinaire on parle du délai d'attente « Il s'agit du délai entre la dernière administration d'un médicament et le prélèvement de tissus ou produits comestibles sur un animal traité, garantissant que la teneur des résidus de médicament dans les aliments est conforme à la limite maximale de résidu pour ce médicament vétérinaire ». Le temps d'attente est déterminé en fonction des limites maximales de résidus et en se basant sur des études de déplétion tissulaire.⁽⁹⁾

5. La limite maximale de résidus

La limite maximale de résidu est la «Concentration maximale de résidu résultant de l'emploi d'un médicament vétérinaire (exprimé en mg/kg ou en µg/kg sur la base du poids frais)».⁽¹⁰⁾

IV. Les quinolones

1. Généralités

La famille des quinolones ou acide pyridine- β -carboxylique représentent l'une des principales classes d'agents au sein de l'arsenal antimicrobien actuel⁽¹²⁾, elles forment une large classe d'antibactériens de synthèse.

Les premières quinolones développées ont eu une application clinique limitée (infections urinaires) due à leur faible absorption lors d'une administration orale, à une activité antibactérienne modérée, à une liaison aux protéines importantes et à une toxicité importante. Dans les années 1980, l'addition d'un atome de fluor en position 6 et la substitution pipérazine en position 7 a augmenté l'activité des ces composés ainsi que leur absorption orale et leur distribution dans les tissus.

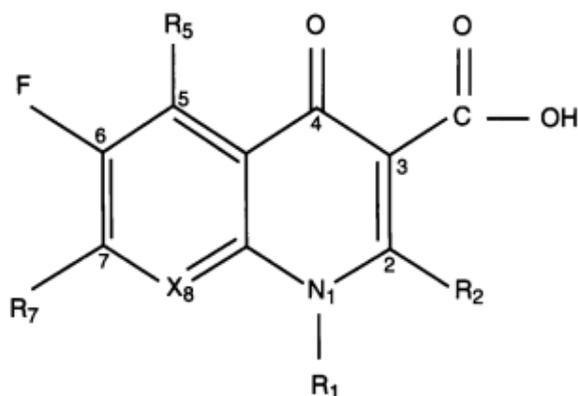


Figure 1 : Structure des quinolones ⁽¹³⁾

Les quinolones sont classées en quatre générations basées sur leur activité et leur spectre d'action. En médecine vétérinaire, seules les 3 premières générations de quinolones sont utilisées, les fluoroquinolones de 4^{ème} génération étant réservées à la médecine humaine ⁽¹⁴⁾:

- Les quinolones de première génération: comme l'acide nalidixique ou l'acide oxolinique, du fait de leurs faibles concentrations sériques, étaient réservées aux infections urinaires.
- Les quinolones de deuxième génération: qui sont des fluoroquinolones, comme la ciprofloxacine, la norfloxacine ou l'ofloxacine en médecine humaine et la flumequine en médecine vétérinaire ont une activité plus importante sur les bactéries à Gram négatif ainsi que contre certains pathogènes atypiques. Ces substances ont une bonne

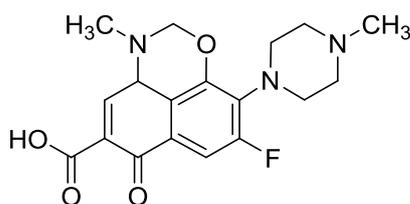
biodisponibilité orale. Leur principal inconvénient est leur efficacité limitée envers les bactéries à Gram positif.

- Les fluoroquinolones de troisième génération: comme la gatifloxacine, la grepafloxacine, la levofloxacine, la moxifloxacine ou la sparfloxacine en médecine humaine et la danofloxacine, l'enrofloxacine, la difloxacine, la sarafloxacine, l'orbifloxacine, l'ibafloxacine ou la marbofloxacine en médecine vétérinaire ont une activité étendue aux bactéries à Gram positif.
- Les fluoroquinolones de quatrième génération: comme la gémifloxacine ou la trovafloxacine ont un spectre d'activité étendu aux bactéries anaérobies.

2. Présentation des molécules recherchées

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à certaines quinolones ayant des structures différentes, utilisées en qualité antibactérienne. Parmi les produits qui faisaient l'objet de ce mémoire, on peut citer :

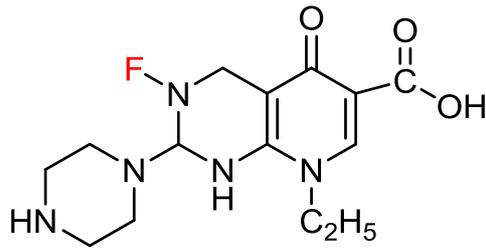
- Marbofloxacine: Elle présente plusieurs groupements d'intérêts. Les deux oxygènes, communs à toutes les quinolones, permettent la liaison à la cible bactérienne. Le fluor permet une activité sur les bactéries à Gram positif car il facilite le passage de la membrane de ces bactéries. La présence du cycle pipéridinique et du groupement méthyl sur celui-ci permettent d'élargir son activité aux Pseudomonas, Streptocoques ainsi qu'aux Mycoplasmes. Le cycle oxadiazine permet quant à lui d'allonger la demi-vie de la molécule et d'augmenter sa biodisponibilité⁽¹⁴⁾.



Marbofloxacine

Figure 2 : structure chimique du Marbofloxacine

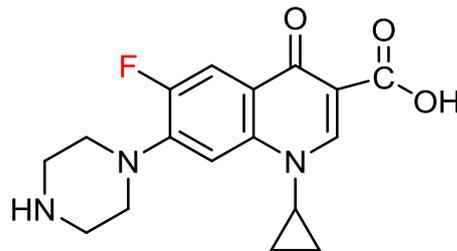
- Norfloxacine: Nouvelle molécule qui présente un spectre élargi à Pseudomonas aeruginosa et à certaines bactéries à Gram positif et une activité plus importante contre les bactéries à Gram négatif. Elle est peu liée aux protéines plasmatiques, offre une meilleure absorption ainsi qu'une excellente distribution tissulaire⁽¹⁵⁾.



norfloxacin

Figure 3: structure chimique du Norfloxacin

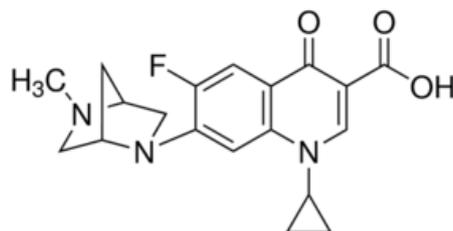
- Ciprofloxacin : Possède une activité plus importante sur les bactéries à Gram négatif ainsi que contre certains pathogènes atypiques. Cette substance a une bonne biodisponibilité orale. Son principal inconvénient est son efficacité limitée envers les bactéries à Gram positif. (14)



ciprofloxacin

Figure 4 : structure chimique du ciprofloxacin (12)

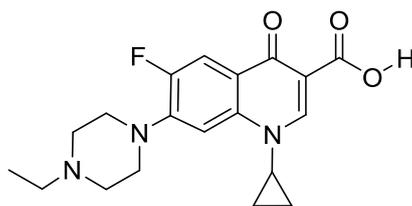
- Danofloxacin : cette molécule a été étudiée pour une utilisation dans les bovins, porcins, poulets et moutons pour le contrôle d'infection bactérienne respiratoire et entérique. C'est très efficace contre de nombreux Gram positif et négatif pathogènes ainsi que des mycoplasmes (16)



Danofloxacin

Figure 5 : Structure chimique du danofloxacin (17)

➤ Enrofloxacin :



Enrofloxacin

Figure 6 : structure chimique de l'enrofloxacin

- Sarafloxacin : il s'agit d'un antibiotique Fluoroquinolone, utilisée pour le traitement et le contrôle des infections bactériennes chez les volailles causées par *Escherichia coli* et *Salmonella* spp.

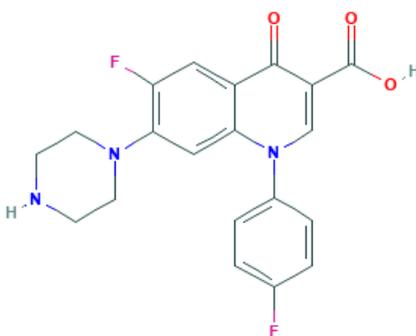


Figure 7 : structure chimique du sarafloxacin⁽¹⁸⁾

- Difloxacin : Utilisée comme un traitement des infections respiratoires chroniques causées par des souches sensibles d'*Escherichia coli* et de *Mycoplasma gallisepticum* (poulets et dindes), traitement des infections causées par *Pasteurella multocida* (dindes)

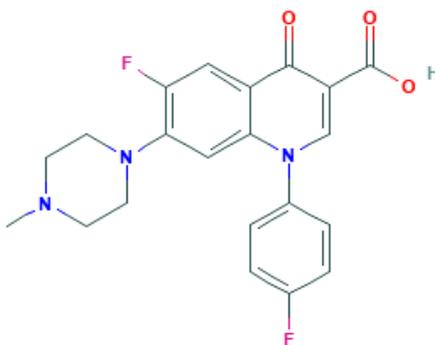
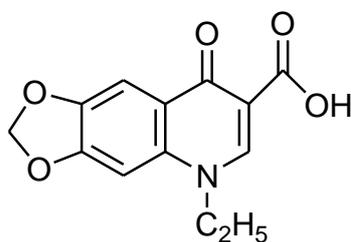


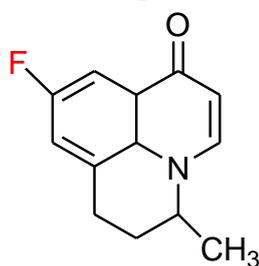
Figure 8 : structure chimique du Difloxacin⁽¹⁹⁾

- Acide oxolinique et Flumequine : sont deux antibiotiques de synthèse appartenant à la famille des quinolones, l'acide oxolinique est classé parmi les quinolones de première génération qui ne possèdent pas d'atome de fluor dans leur formule brute.



acide oxonilique

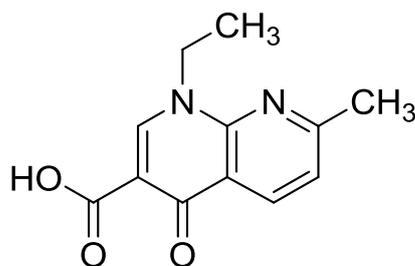
Figure 9: structure chimique de l'Acide oxolinique₍₂₀₎



fluméquine

Figure 10 : structure chimique du Flumequine₍₂₀₎

- Acide nalidixique : La première quinolone, largement utilisée, a été découverte par hasard comme sous-produit de la synthèse de la chloroquine. Il est efficace pour les infections des voies urinaires car il est concentré dans l'urine, il a peu d'activité systémique₍₁₉₎.



Acide nalidixique

Figure 11: structure chimique de l'Acide nalidixique₍₁₅₎

3. Principaux risques sanitaires des quinolones

Les médicaments vétérinaires sont utilisés pour prévenir ou traiter certaines maladies, néanmoins, on ne peut pas parler de médicaments sans parler des risques sanitaires.

Des résidus d'antibiotiques sont parfois retrouvés dans le lait ou la viande. Après un traitement antibiotique préventif ou curatif des animaux, l'éleveur ne respecte pas le

délai d'attente prescrit par la législation. Chez certains animaux il est possible de retrouver des résidus antibiotiques même après le temps d'attente officiel mais ce risque est très faible. Les résidus d'antibiotiques présents dans les denrées animales représentent un danger dont les risques associés sont d'ordre allergique, toxicologique, microbiologique et industriel. Ces résidus peuvent notamment perturber la flore intestinale humaine. En effet, même à très faibles doses les antibiotiques ingérés ont un impact sur l'écologie de la flore intestinale. (14) L'antibiorésistance est devenu l'un des problèmes majeurs en santé à la fois humaine et animale, Il est donc du devoir du vétérinaire de lutter contre ces résistances, notamment en adoptant une antibiothérapie raisonnée et prudente. Ainsi, lors de la mise en place d'une thérapeutique antibiotique, le choix de la molécule mais aussi la décision d'une posologie adaptée s'imposent. (15)

4. Les limites maximales en résidus et les concentrations de travail

Les limites maximales en résidus exprimées en µg/kg des molécules recherchées, des matrices muscle blanc, muscle rouge et poisson. Dans le cas où la molécule ne possède pas une LMR, le laboratoire fixe une concentration de travail LWC.

Tableau 1: Les limites maximales de résidus ou la concentration de travail (selon le règlement (UE) No 37/2010). (21)

Famille	Analyte	LMR (µg/kg)				LWC
		Ovin	Bovin	Volaille	Poisson	
<i>Quinolones</i>	Marbofloxacin	150	150	150	150	-
	Norfloxacin	-	-	-	-	30
	Ciprofloxacin	100	100	100	100	-
	Danofloxacin	200	200	200	200	-
	Enrofloxacin	100	100	100	100	-
	Sarafloxacin	-	-	-	-	30
	Difloxacin	400	400	300	400	-
	Acide oxolinique	100	100	100	100	-
	Acide nalidixique	-	-	-	-	50
	Flumequine	200	200	400	600	-

V. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (LC/MS-MS)

La chromatographie liquide en haute performance (HPLC) est largement utilisée dans le domaine de la chimie analytique. Le couplage à la spectrométrie de masse en tandem est un puissant outil pour détecter, identifier et quantifier spécifiquement des molécules de façon très précise.

Les couplages de la LC avec des systèmes à triple quadripôles, dits « en tandem » (LC-MS/MS) représentent aujourd'hui les plus fortes ventes dans l'industrie pharmaceutique (en particulier pour les études de toxicocinétique et de pharmacocinétique), ainsi probablement que dans les laboratoires de toxicologie médicale ou de suivi thérapeutique pharmacologique.



Figure 12 : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (AB SCIEX 5500 QTRAP)

1. La chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide en haute performance permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification, sa grande précision permet la recherche de traces.

Au niveau chromatographique, Le temps de rétention d'analyte varie selon l'interaction entre la phase stationnaire, les molécules étant analysées et le ou les solvants utilisés. À mesure que l'échantillon passe à travers la colonne, il interagit entre les deux phases à des vitesses différentes, principalement à cause des polarités différentes des analytes. Un analyte sera plus ou moins retenu sur la colonne selon que son affinité avec celle-ci est grande ou petite. Un composé apolaire sera par exemple, plus retenu, sur une colonne apolaire qu'un composé

polaire. Et sur une colonne apolaire, un solvant apolaire au un pouvoir éluatif plus grand qu'un solvant polaire. (22)



Figure 13 : Appareil de la Chromatographie Liquide à Haute Performance

◆ **Les composants de la HPLC :**

- **La phase mobile ou éluant** : un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne.
- **La phase stationnaire** : un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés.
- **Réservoir de la phase mobile** : Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon
- **Pompe** : Elle délivre en continu la phase mobile sous pression avec un débit constant et stable
- **Injecteur** : Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μ L...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.
- **Vanne à boucle d'échantillonnage** : Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe, la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique.

◆ **Fonctionnement de l'appareil**

- La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.
- Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

- En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

2. La spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires, d'analyser qualitativement et quantitativement une vaste gamme de composés biologiques et chimiques. Son principe est le suivant : un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par différents procédés (bombardement électronique, ionisation chimique...). Parmi les ions obtenus, l'ion moléculaire permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir rupture des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Les ions formés sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions constitue le spectre de masse dont le lecteur permet l'identifier de la structure moléculaire. (24)



Figure 14 : La spectrométrie de masse en tandem AB SCIEX 5500 QTRAP

Principe générale :

A la sortie de la colonne chromatographique, le composé en solution est introduit par un capillaire dans la source d'ionisation : ESI ou l'électrospray. C'est l'interface dans laquelle les molécules sont ionisées.

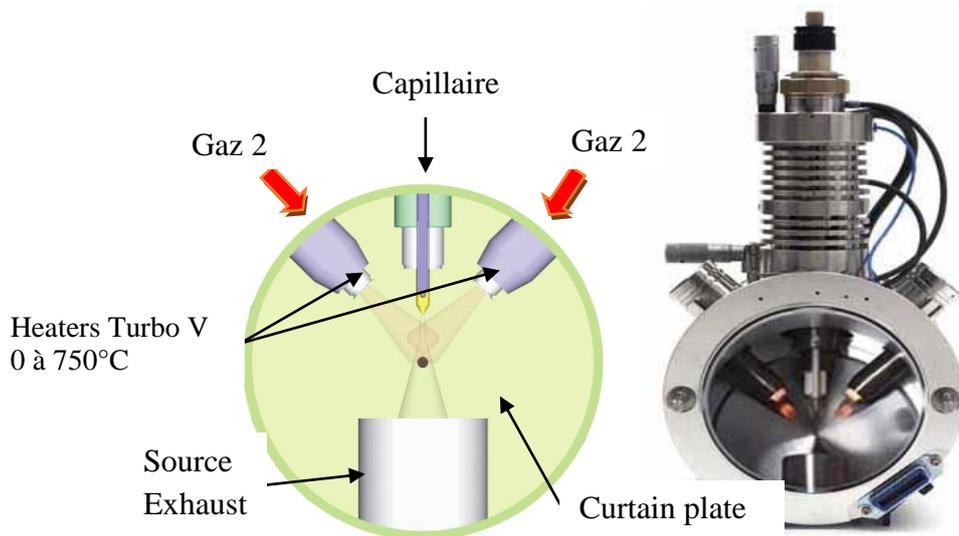


Figure 15: Source d'ionisation (25)

Le principe de l'électrospray peut être décrit en trois étapes qui sont : la production de gouttelettes hautement chargées (**Mode Positif M+H / Mode négatif: M-H**) contenant des molécules de solvant et d'analyte, la réduction du diamètre de ces gouttelettes, et enfin le passage des ions de la solution vers la phase gazeuse. (24)

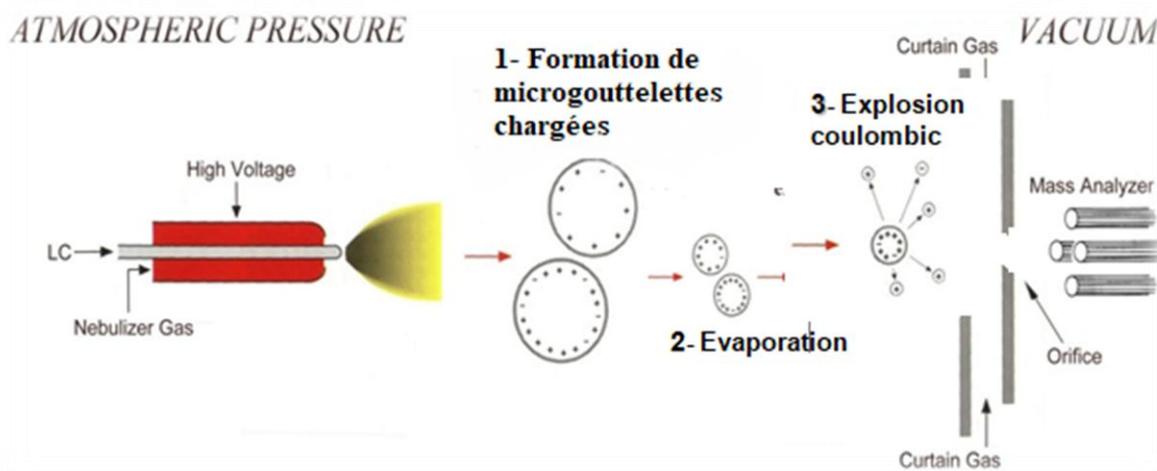


Figure 16: Schéma d'une ionisation par Electrospray(26)

Les ions sont ensuite dirigés dans la direction du premier quadripôle (le quadripôle de transfert ou Q_0) qui a pour rôle la focalisation du faisceau d'ions avant l'entrée dans l'analyseur.

L'analyseur se comporte ici de trois quadripôles : le premier (Q_1) va permettre de sélectionner un ion précurseur (ion parent), L'ion précurseur est amené à la chambre de collision (Q_2) qui est le quadripôle responsable de la fragmentation des ions par une énergie de collision définie préalablement et sous l'effet d'un bombardement par des atomes d'azote.

Les fragments sont sélectionnés encore une fois selon leur rapport m/z dans un deuxième analyseur (Q_3), seuls les ions prédéfinis sont triés, ce sont les ions fils ou les ions produits. Chaque molécule se trouve ainsi identifiée par deux couples (ou plus) ions précurseur/ ion produit, les deux couples présentent deux transitions, la première transition produite est utilisée pour la quantification et sert également à identifier la molécule, la deuxième est complémentaire pour la confirmation de l'identité de la molécule (24, 25).

C'est ce qu'on appelle le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). C'est un mode qui correspond à une détection sélective de transitions. On sélectionne un ion précurseur qu'on casse dans la chambre de collision, puis parmi tous les ions produits, un ion est conservé. C'est le mode principalement utilisé pour la quantification de molécules connues.

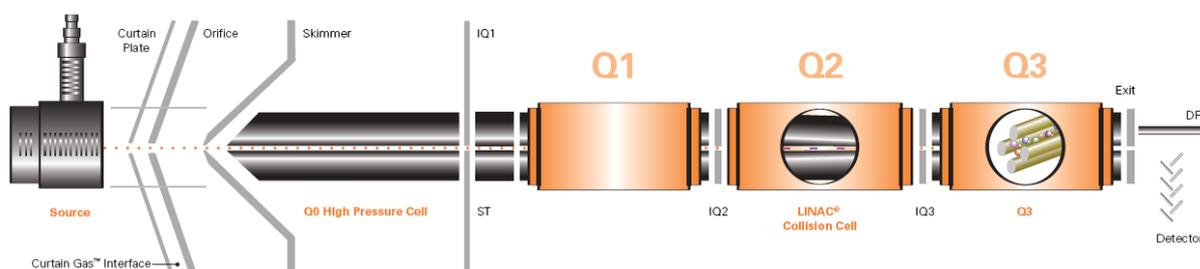


Figure 17: Schéma résumant les trois quadripôles (27)

Le faisceau d'ion, ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Pour ce faire, il existe plusieurs types de détecteur capable de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Les détecteurs multiplicateurs d'ions sont les plus utilisés en spectrométrie de masse.

Un système d'exploitation et de traitement de données (ordinateur muni d'un logiciel approprié), permet l'enregistrement des mesures, de contrôler l'instrument et d'interpréter les résultats illustrés sous forme d'un chromatogramme représentant le signal par rapport au temps de rétention de chaque molécule.

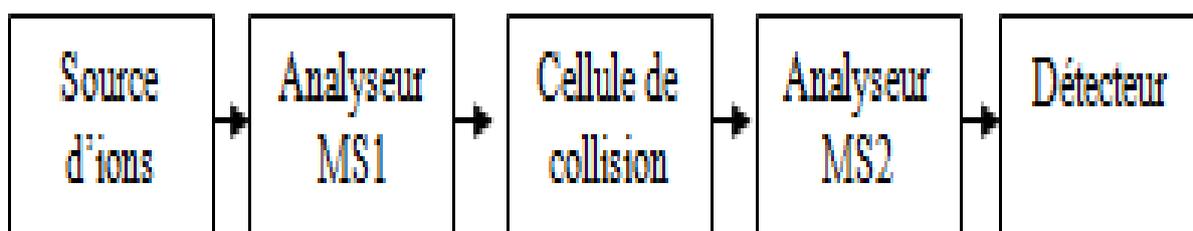


Figure 18: Schéma résumant le principe de la spectrométrie de masse en tandem

VI. Mise au point et validation de la méthode de confirmation

La mise au point d'une méthode consiste à préparer tout d'abord les solutions standards de chaque molécule et leurs standards internes.

Ensuite, chaque solution standard est injectée dans la LC-MS/MS afin d'optimiser les paramètres de détections (Temps de rétention, température du four, la phase mobile, la colonne, température de source, les paramètres d'ionisation...), ainsi que les transitions correspondantes à la molécule (ion précurseur/ion produit).

La validation d'une méthode analytique est l'opération par laquelle on s'assure que ses résultats répondent au problème de manière satisfaisante pour l'utilisateur. Elle s'efforce détecter et contrôler les sources d'erreurs possible liées à la méthode étudiée : définition générale est proposée par FDA : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications définies à l'avance ». (28)

Autrement dit, la validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par les laboratoires. (29)

1. Les grandeurs mesurées

Les grandeurs mesurées pour un analyte lors d'une mesure par couplage chromatographie - spectrométrie de masse en tandem, sont :

- le temps de rétention relatif,
- l'intensité relative des signaux ioniques des molécules cibles (hauteur ou surface du signal) rapporté au signal de l'étalon interne,
- l'intensité relative entre signaux ioniques caractéristiques de l'analyte (rapports d'ion ou de transition).

Les signaux considérés seront intégrés dans une fenêtre de temps de rétention donnée autour du temps de rétention attendu pour les analytes cibles.

2. Critères de la validation

Les critères et exigences de validation selon la décision 2002/657/EC de la Communauté Européenne⁽³⁰⁾, qui détaille les techniques et la méthodologie à suivre pour le contrôle des médicaments vétérinaires, ainsi le laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (LABERCA)⁽³¹⁾.

2.1. Spécificité

La spécificité d'une méthode d'analyse consiste à montrer que le pic mesuré ne provient que du composé à analyser, sans aucune interférence avec sa matrice (excipients, produits de dégradation, impuretés,...).

Observation des chromatogrammes d'ions d'un nombre conséquent d'échantillons blancs différents et vérification de l'absence de coélutions pouvant perturber l'interprétation.

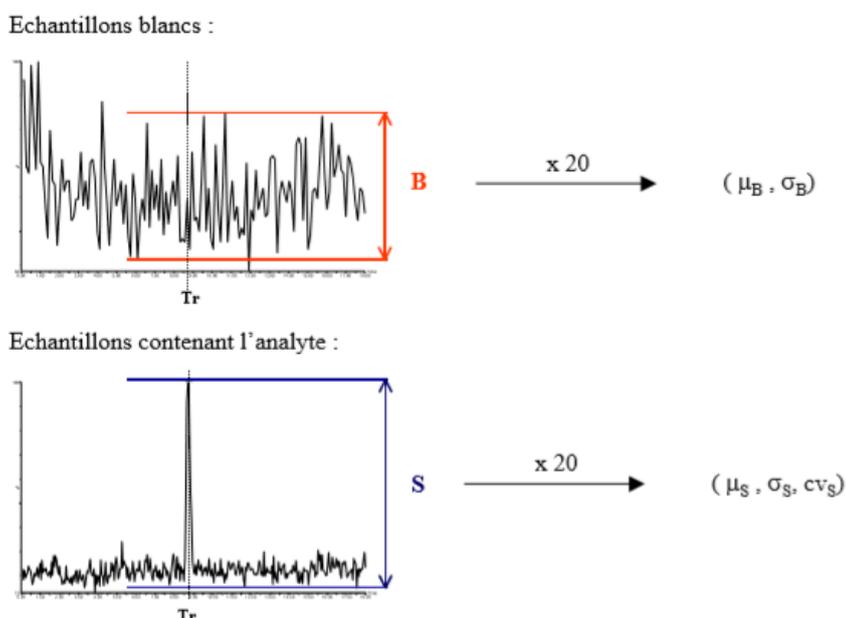


Figure 19: Chromatogrammes de 20 échantillons blancs et de 20 analytes seuls

2.2. Linéarité

Capacité de la méthode à fournir une réponse proportionnelle ($y=ax+b$) à la concentration en analyte sur un domaine de concentration donné.

Méthode d'estimation : calcul du coefficient de détermination R^2 de la droite de régression (intensité rapportée à l'étalon interne en fonction de la concentration), réalisée à partir d'un mélange d'échantillons blancs différents ($n=20$), supplémenté à au moins six niveaux de concentration.

Objectif (fixé en interne) : $R^2 > 0,97$

2.3. Justesse

Différence entre la concentration estimée en analyte dans un échantillon analysé avec la méthode considérée et la concentration réelle en analyte dans cet échantillon (supplémenté).

Méthode d'estimation: Calcul de la différence entre la concentration moyenne obtenue pour une série d'analyse ($n=20$) sur un même échantillon (C_{moy}) et la concentration réelle de cet échantillon ($C_{théo}$), exprimée en pourcentage par rapport à cette concentration réelle (Figure 18).

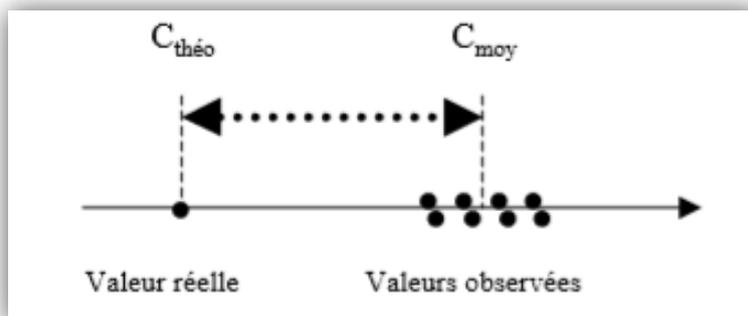


Figure 20: Représentation de la justesse

Objectif (fixé par la directive européenne 2002/657/CE) : justesse minimale d'une méthode quantitative :

Tableau 2 : valeurs de justesse à respecter selon la décision européenne 2002/657

Fraction de masse ($\mu\text{g/kg}$)	Justesse %
≤ 1	-50% à +20%
1 à 10	-30% à +10%
≥ 10	-20% à +10%

2.4. Fidélité

Variabilité de la grandeur mesurée pour des répétitions de la méthode dans des conditions identiques (répétabilité), avec modification d'au moins un paramètre (reproductibilité intra laboratoire) et au sein de différents laboratoires (reproductibilité inter-laboratoire).

Méthode d'estimation : Calcul du coefficient de variation (CV %) du paramètre considéré, sur une série d'analyse ($n=20$) d'un échantillon contenant l'analyte à une concentration C , proche (d'un facteur 0,5 ; 1 ; 1,5 ou 2) de la capacité de détection ou de la LMR (tableau 1).

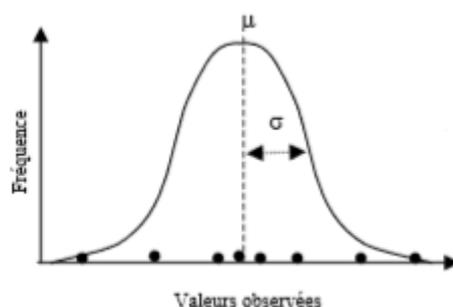


Figure 21 : Représentation de la fidélité

Objectif (fixé par la directive européenne 2002/657/CE) : La loi d’Horwitz est applicable aux concentrations supérieures à 100 ppb, elle l’est beaucoup moins pour des valeurs inférieures (le calcul donne des CV – donc des tolérances – très importants). En pratique les CV doivent être aussi petits que possibles.

$$CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Tableau 3 : valeurs de reproductibilité du signal à respecter selon la décision 2002/657

Fraction de masse (µg / kg)	CV%
≥ 1 à 10	*
≥ 10 à 100	*
≥ 100 à 1000	23
≥ 1000	16

*Il n’y a pas de valeur limite de CV de reproductibilité pour les niveaux de concentration en analyte < 10 µg/kg. Les CV doivent donc être le plus faible possible.

- Pour les temps de rétention relatifs : CV < 2,5 % en LC
- Pour les rapports d’ion :

Tableau 4 : valeurs de reproductibilité du ratio du signal à respecter selon la décision 2002/657

Intensité relative (% du pic de base)	CV% (LC-MS/MS)
> 50%	±20%
> 20% à 50%	±20%
> 10% à 20%	±30%
≤ 10%	±50%

2.5.Limite de décision (CC α)

Une méthode analytique devra être caractérisée par une limite de décision (CC α) qui est la limite à partir de laquelle un échantillon peut être déclaré non conforme avec une certitude statistique de 1 – α . Dont l'erreur alpha (α) est la probabilité que l'échantillon testé soit conforme, même si une mesure non conforme a été obtenue («décision fondée sur un faux résultat non conforme»).Le CC α doit être en pratique utilisé en confirmation pour déclarer la non-conformité (si concentration supérieure au CC α) de l'échantillon.

Pour une méthode de confirmation, ce paramètre est calculé en considérant le signal le moins sensible (signal « critique » permettant de satisfaire tous les critères d'identification).

Méthode d'estimation:

✚ Dans le cas des substances soumises à LMR :

CC α est la concentration correspondant (au risque $\alpha = 5 \%$) à une réponse d'intensité $I_{CC\alpha}$, définie par la relation :

$$I_{CC\alpha} = \mu_{LMR} + 1,64 \cdot \sigma_{LMR}$$

Où μ_{LMR} et σ_{LMR} représentent respectivement la moyenne et l'écart type de l'amplitude du signal de l'analyte à la concentration égale à la LMR, calculés sur des échantillons supplémentés différents (n=20). La relation intensité/concentration est donnée par une courbe d'étalonnage réalisée à partir d'un mélange d'échantillons blancs différents (n=20), supplémenté à au moins six niveaux de concentration incluant : 0 (n=5) ; x.MRL (n=5) ; 0,5 LMR (n=10) ; LMR (n=20) ; 1,5 LMR (n=10) et y.LMR (n=5) ou x et y sont fixés en fonction des besoins. Le signal moyen μ_B obtenu pour les échantillons blancs est utilisé comme origine forcée de la droite d'ajustement. D'après cette droite d'étalonnage, $I_{CC\alpha}$ peut s'écrire :

$$I_{CC\alpha} = \mu_B + a \cdot CC\alpha$$

On obtient donc finalement d'après ces deux relations :

$$CC\alpha = (\mu_{LMR} - \mu_B + 1,64 \cdot \sigma_{LMR}) / a$$

Objectif (fixé en interne) : Pour les méthodes spectrométriques, la valeur calculée pour CC α devra être confrontée a posteriori à un signal réellement observé pour une valeur de concentration la plus proche possible, afin de confirmer sa validité. En particulier, dans le cas des substances non soumises à LMR, le signal observé devrait être par définition mesurable dans 50% des cas avec un signal sur bruit d'environ 3 à 6.

2.6. Rendement d'extraction

Fraction de la quantité d'analyte contenu ou ajouté dans l'échantillon analysé qui est extraite et présente à la mesure finale.

Méthode d'estimation :

$$Rdt = 100 \times \frac{\left(\frac{\text{analyte}}{EE}\right)_{Ajout}}{\left(\frac{\text{analyte}}{EE}\right)_{Standard}}$$

- EE = étalon externe ;
- Ajout = échantillon supplémenté en analyte à la concentration C puis extrait ;
- Standard = échantillon témoin extrait et supplémenté en dernière étape par l'analyte cible à la concentration C.

Dans le cas d'une méthode n'incluant pas d'étalon externe, une estimation du rendement d'extraction basé sur les signaux bruts des analytes pourra alternativement être utilisée.

Objectif (fixé en interne) :

Le rendement d'extraction est estimé pour la connaissance des performances de la méthode, mais il n'est pas un critère d'acceptation de l'analyse ; en effet, nous considérons que la spécificité du signal (absence de composés interférents) pèse en général d'avantage sur le rapport signal sur bruit que le rendement d'extraction proprement dit.

I. Matériel et méthode

1. Introduction

La directive 89/437/CEE concernant les problèmes d'ordre sanitaire⁽³⁰⁾ 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⁽³¹⁾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(e)sigma ou équivalent)
- Norfloxacin(e)sigma ou équivalent)
- Ciprofloxacin(e)sigma ou équivalent)
- Danofloxacin(e)sigma ou équivalent)
- Enrofloxacin(e)sigma ou équivalent)
- Sarafloxacin(e)HCl 3 H₂O (sigma ou équivalent)
- Difloxacin(e)HCl(sigma ou équivalent)
- Acide oxolinique(sigma ou équivalent)
- Acide nalidixique sodique (sigma ou équivalent)
- Flumequine(sigma ou équivalent)
- Norfloxacin(e) 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

Analytes	Stabilité de la solution mère
Marbofloxacin(e)	1 an à au moins -18°C
Norfloxacin(e)	6 mois à au moins -18°C
Ciprofloxacin(e)	1 an à au moins -18°C
Danofloxacin(e)	3 mois à au moins -18°C
Enrofloxacin(e)	1 an à au moins -18°C
Sarafloxacin(e)	1 an à au moins -18°C
Difloxacin(e)	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 ± 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 ₂ 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.

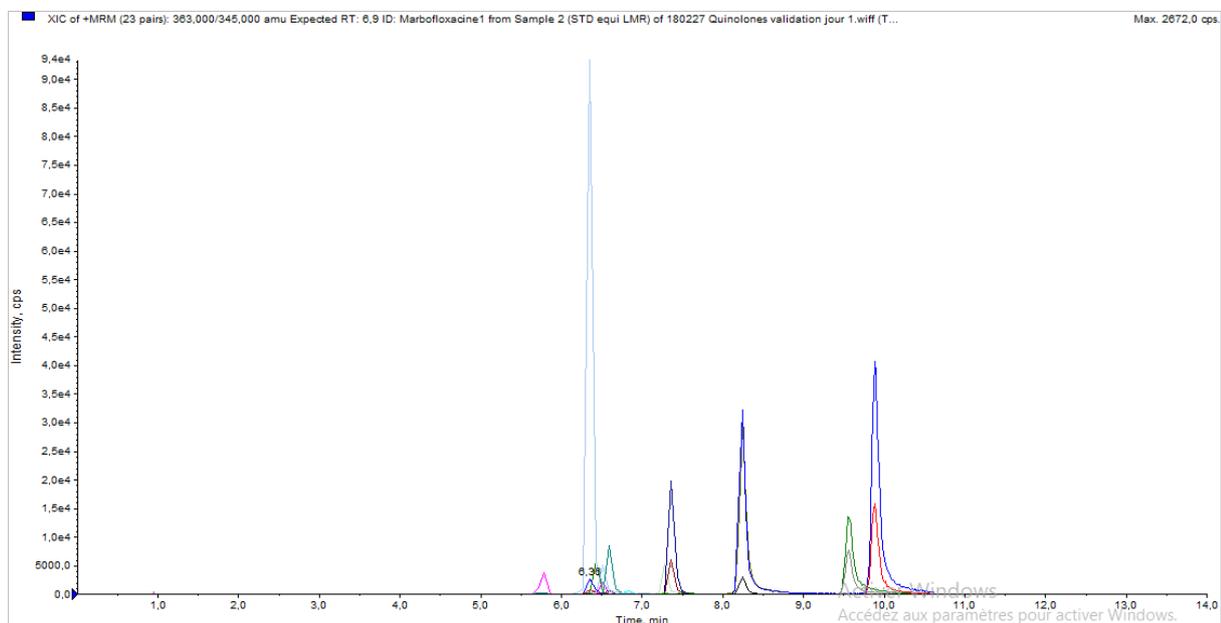


Figure 22 : Chromatogramme d'un standard équivalent 1 LMR

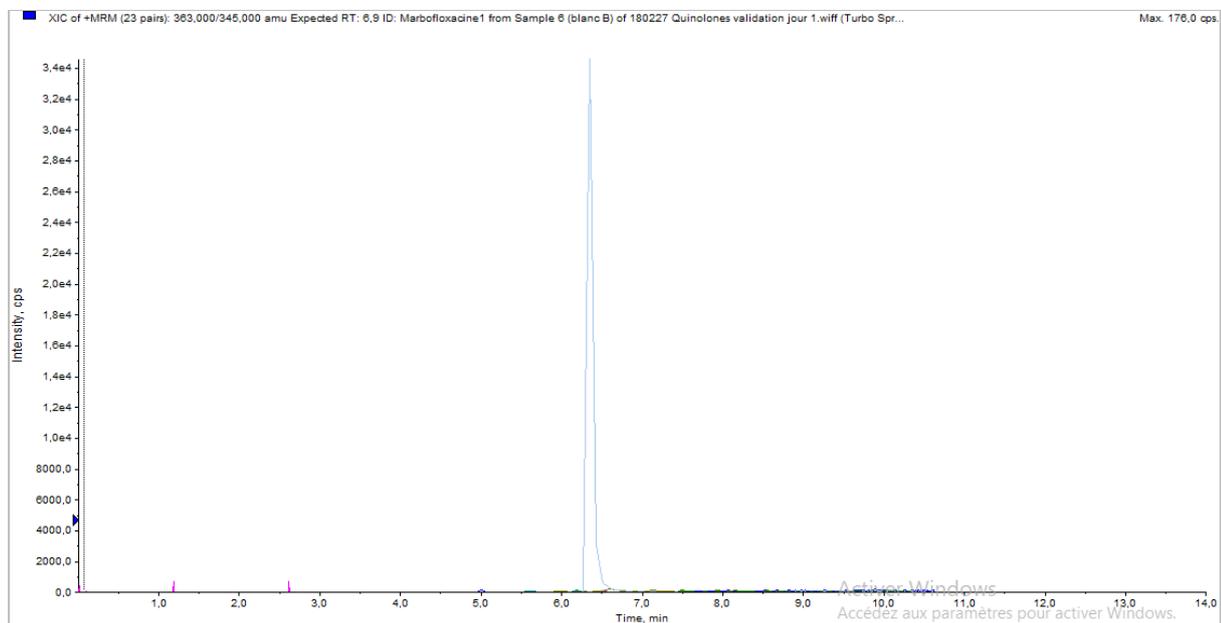


Figure 23 : Chromatogramme d'un blanc

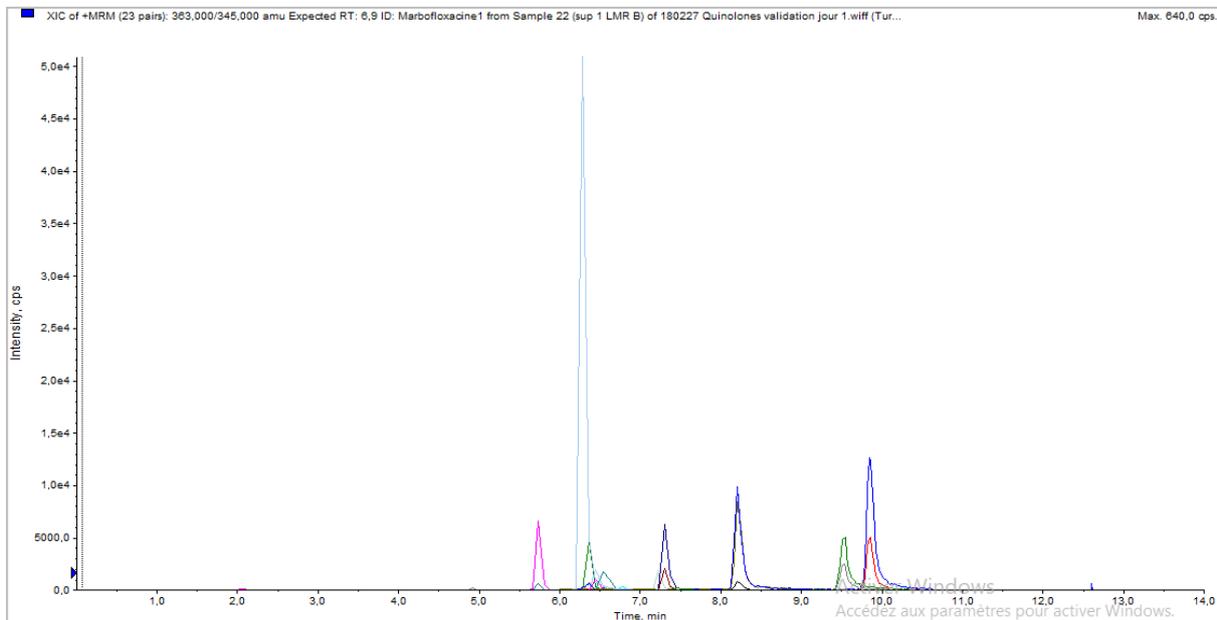


Figure 24 : Chromatogramme d'un supplément équivalent 1 LMR

Prenant en exemple les chromatogrammes de la molécule acide nalidixique :

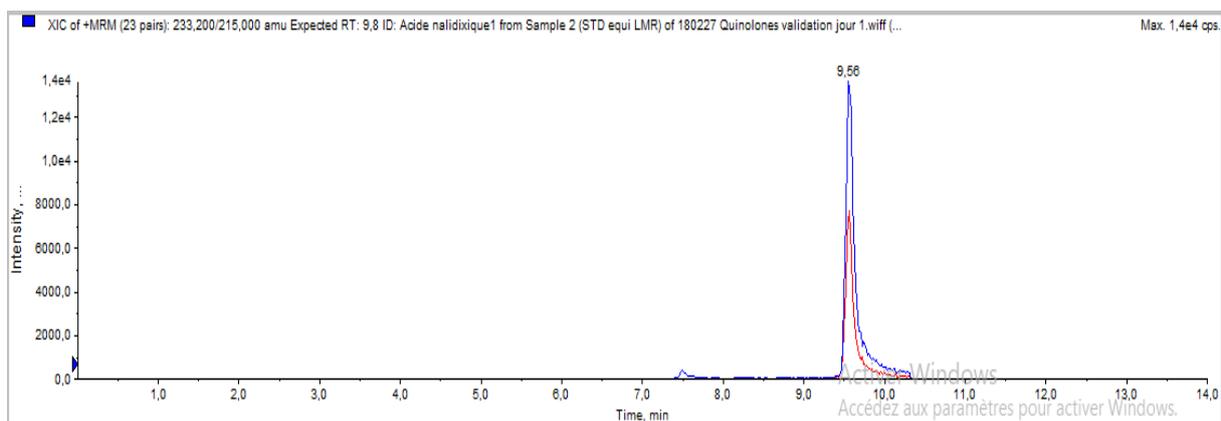


Figure 25 : Chromatogramme d'un standard équivalent 1 LMR de la molécule acide nalidixique

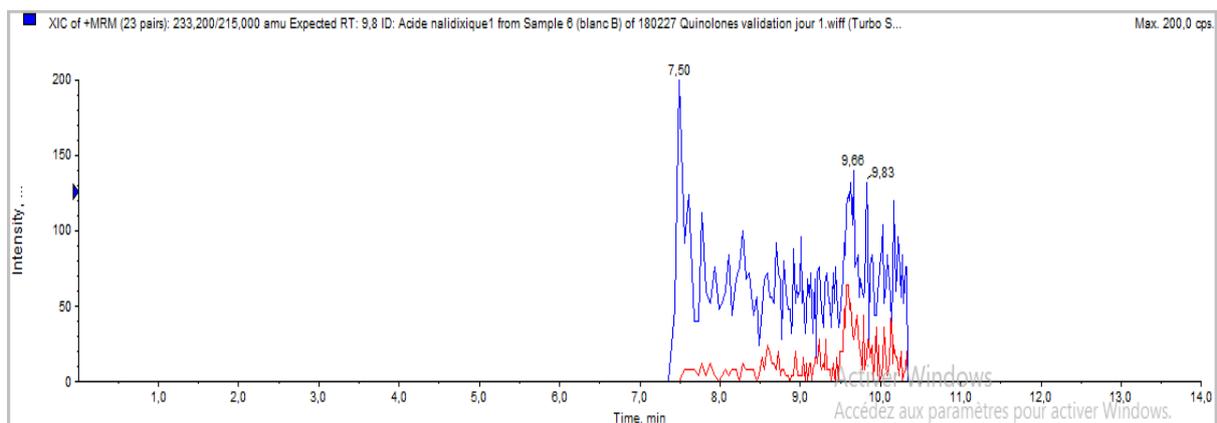


Figure 26: Chromatogramme d'un blanc de la molécule acide nalidixique

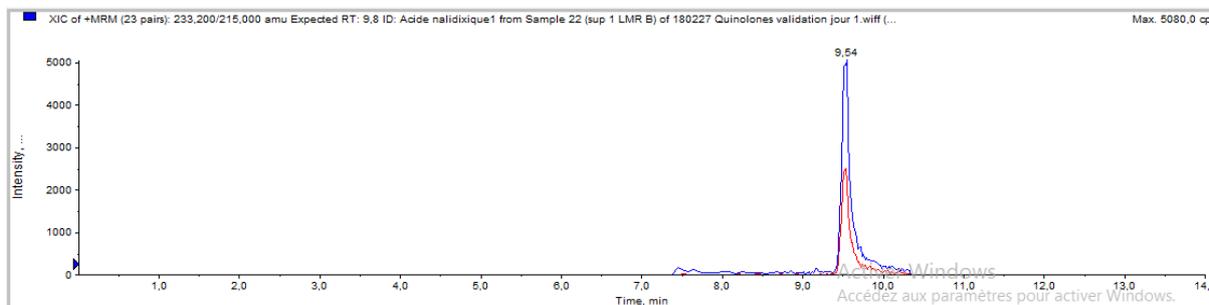


Figure 27 : Chromatogramme d'un supplémenté équivalent 1 LMR de la molécule acide nalidixique

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

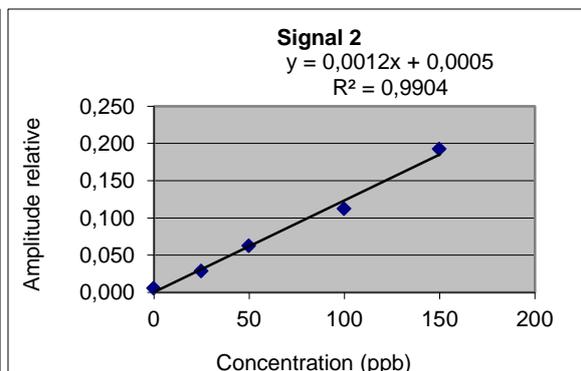
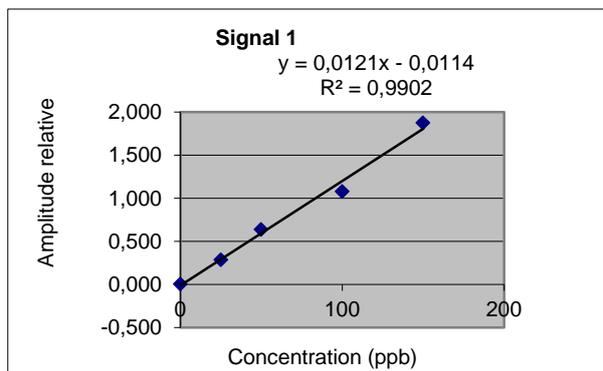
R² = coefficient de détermination

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

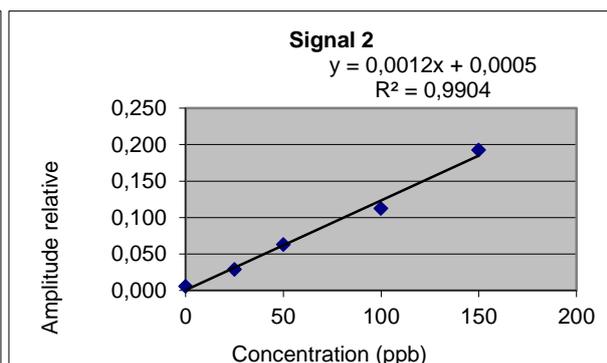
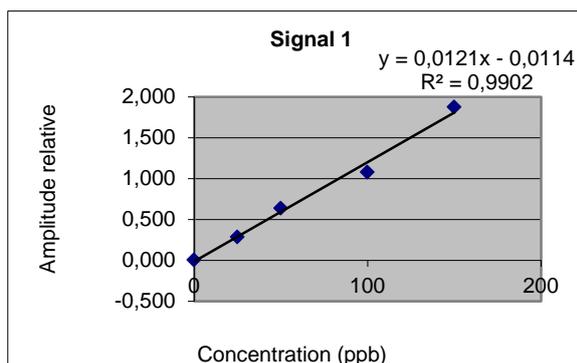
Analyte	Niveaux de la gamme (µg/kg)			
	1	2	3	4
Marbofloxacin	37.5	75	150	225
Norfloxacin	7.5	15	30	45
Ciprofloxacin	25	50	100	150
Danofloxacin	50	100	200	300
Enrofloxacin	25	50	100	150
Sarafloxacin	7.5	15	30	45
Difloxacin	100	200	400	600
Acide oxolinique	25	50	100	150
Acide nalidixique	12.5	25	50	75

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

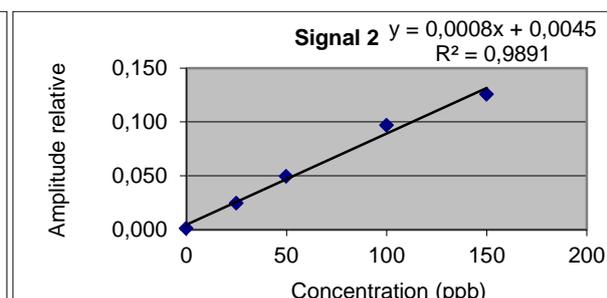
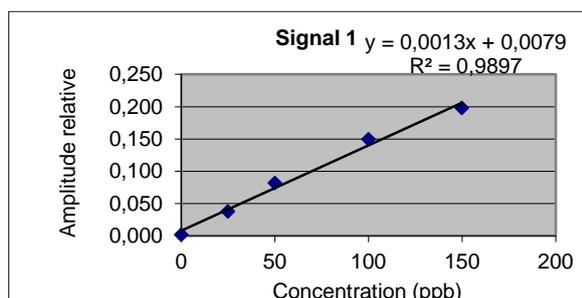
- Acide nalidixique



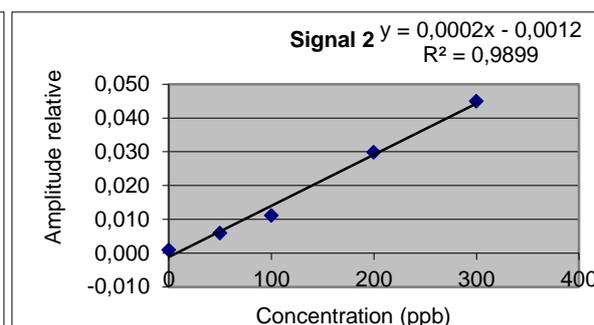
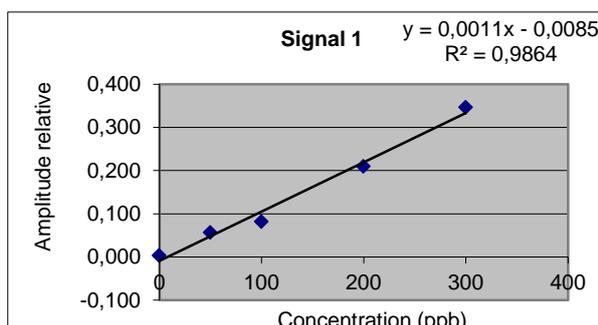
- Acide oxolinique



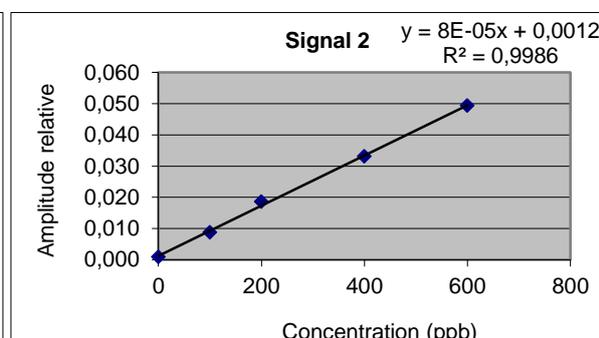
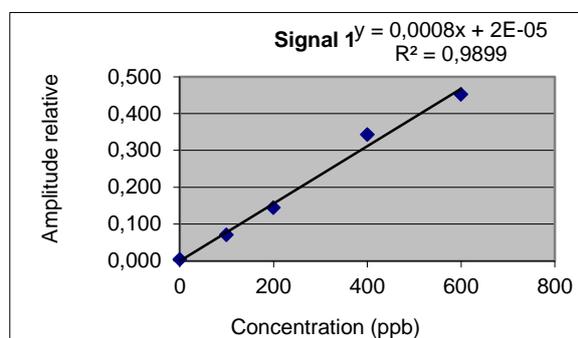
- Ciprofloxacin



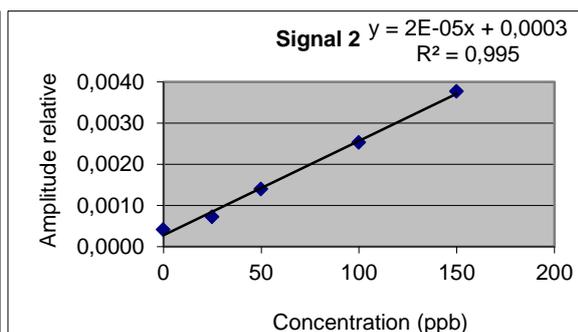
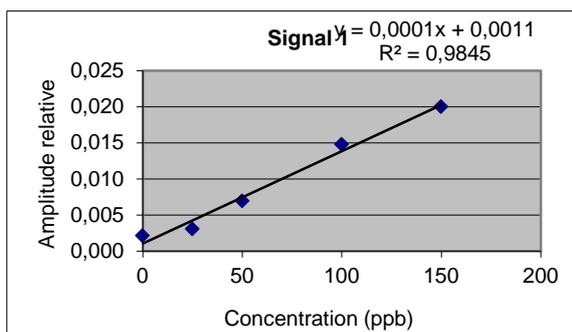
- Danofloxacin



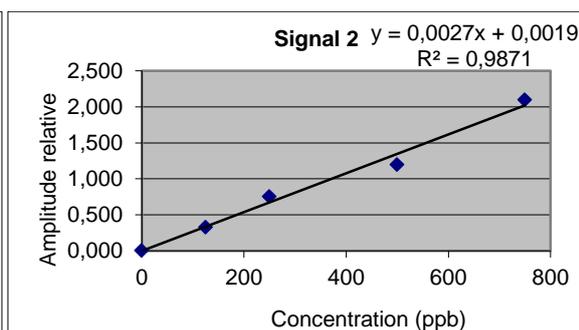
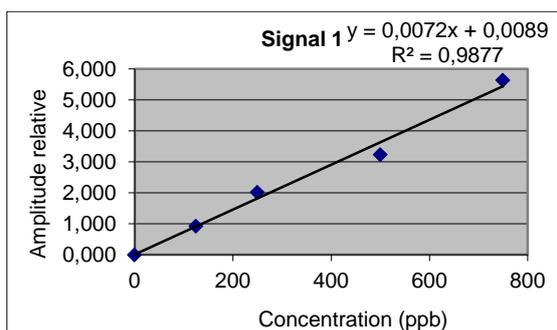
- Difloxacin



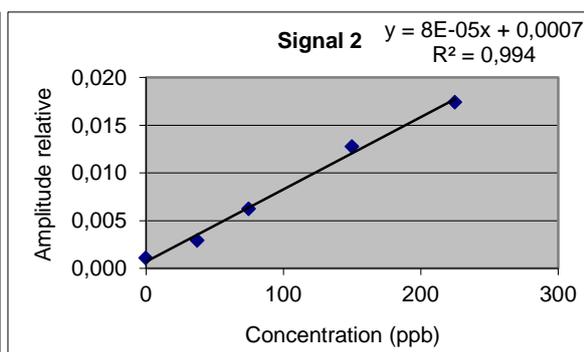
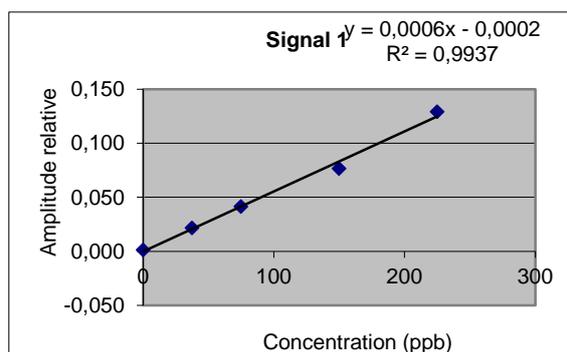
- Enrofloxacin



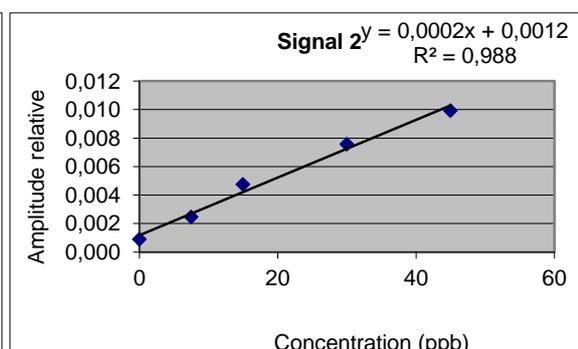
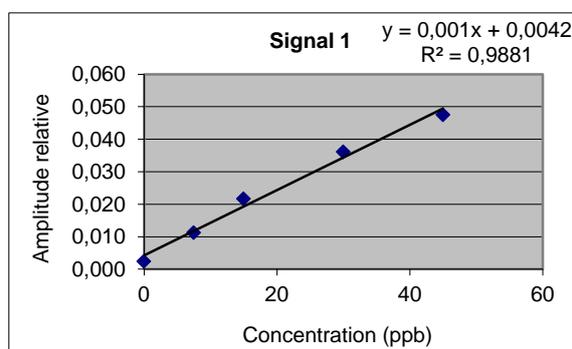
- Flumequine



- Marbofloxacin



- Norfloxacin



- Sarafloxacin

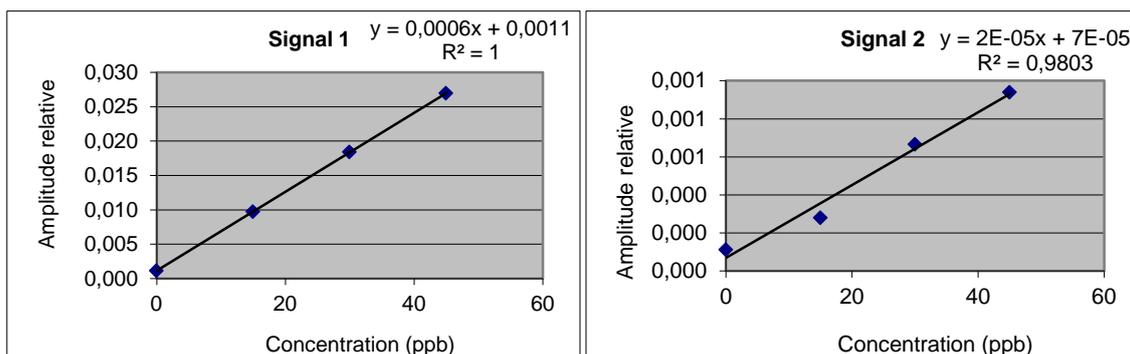


Tableau récapitulatif des résultats des droites de régression des molécules de quinolones :

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

Analytes	Pente a		Ordonnée à l'origine b		Coefficient de détermination R ²	
	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
Ciprofloxacin	0.0013	0.0008	0.0079	0.0045	0.9897	0.9891
Danofloxacin	0.0011	0.0002	-0.0085	-0.0012	0.9864	0.9899
Difloxacin	0.0008	0.0001	0.0000	0.0012	0.9899	0.9986
Enrofloxacin	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
Marbofloxacin	0.0006	0.0001	-0.0002	0.0007	0.9937	0.9940
Norfloxacin	0.0010	0.0002	0.0042	0.0012	0.9881	0.9880
Sarafloxacin	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) »⁽³³⁾.

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⁽³⁴⁾ 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⁽³⁰⁾, 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 μ g/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.

Conclusion générale

Au cours de ce stage, l'objectif était de mettre au point et valider une méthode de confirmation des quinolones dans le muscle pour la confirmation des échantillons suspects. Ce qui permettra d'analyser les échantillons destinés à la consommation humaine pour protéger la santé du citoyen et assurer l'innocuité de la viande rouge et blanche ainsi du poisson. Ce sujet s'inscrit dans le cadre de la mission de la division de la pharmacie et des intrants vétérinaires au service contrôle et expertises section chimie.

Il est nécessaire que le laboratoire de la section chimie développe des méthodes appropriées pour réaliser les analyses requises des plans de surveillance et de contrôle nationaux des médicaments vétérinaires et résidus de médicaments dans les denrées destinées à l'alimentation. Mais le sujet est également important du point de vue validation des méthodes en respectant les exigences de la décision 2002/657.

Les résultats obtenus durant ce travail de recherche m'a permis de valider la méthode de confirmation des quinolones dans le muscle par LC-MS/MS avec succès et dont la spécificité, la reproductibilité et la justesse sont satisfaisantes, ainsi que la linéarité de la droite de régression avec des coefficients de régression qui dépassent 0,97 pour des niveaux de concentrations entre $\frac{1}{4}$ et 1,5 LMR. Le rendement moyen témoignant d'un taux de récupération satisfaisant.

L'évaluation de la méthode effectuée, avec l'analyse de plusieurs muscles destinés à la consommation, a permis de calculer les limites de décision pour les deux transitions de chaque molécule. Les résultats obtenus démontrent qu'aux niveaux d'intérêt déterminés, le risque d'obtenir un faux résultat négatif en routine, comme lors de plans de contrôle, doit être inférieur à 5%.

Le couplage LC-MS/MS apparaît comme la méthode de choix pour confirmer la présence de résidus médicamenteux dans les denrées du muscle. Sa spécificité et sa sélectivité lui donne un avantage sur d'autres méthodes semi-quantitatives.

Il est nécessaire d'inciter les vétérinaires traitant, les éleveurs, les législateurs et les hygiénistes à accentuer leurs efforts afin d'offrir au consommateur un produit indemne de tout danger.

Annexe

Feuilles de calculs des résultats de la validation de la méthode de confirmation des quinolones qui sont traités par le logiciel Analyste.

- Acide nalidixique

Echantillons Blancs

Essai	Etalon Interne		Analyte (bruit de fond)			
	TR (min)	Amplitude Signal	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
1	6.88	3.11E+03	3.98E+01	1.27E+01	0.013	0.004
2	6.83	1.71E+03	3.73E+01	1.01E+01	0.022	0.006
3	6.82	4.41E+03	6.21E+01	1.42E+01	0.014	0.003
4	6.88	4.04E+03	3.00E+01	6.78E+00	0.007	0.002
5	6.82	2.34E+03	5.22E+01	1.03E+01	0.022	0.004
6	6.81	2.80E+03	5.41E+01	3.68E+01	0.019	0.013
7	6.8	2.13E+03	6.00E+01	1.69E+01	0.028	0.008
8	6.84	2.44E+03	6.55E+01	1.21E+01	0.027	0.005
9	6.8	2.46E+03	2.41E+02	1.74E+01	0.098	0.007
10	6.8	2.77E+03	4.27E+01	7.73E+00	0.015	0.003
11	6.8	3.99E+03	5.39E+01	1.91E+01	0.014	0.005
12	6.82	3.33E+03	6.17E+01	2.55E+01	0.019	0.008
13	6.82	3.82E+03	5.98E+01	1.53E+01	0.016	0.004
14	6.8	2.53E+03	5.52E+01	1.28E+01	0.022	0.005
15	6.82	3.58E+03	9.61E+01	1.49E+01	0.027	0.004
16	6.8	2.81E+03	4.47E+01	3.48E+01	0.016	0.012
17	6.8	4.54E+03	6.13E+01	1.87E+01	0.014	0.004
18	6.78	1.48E+03	6.00E+01	2.52E+01	0.041	0.017
19	6.77	1.58E+03	6.31E+01	1.03E+01	0.040	0.007
20	6.74	2.04E+03	7.21E+01	1.70E+01	0.035	0.008
Moyenne	6.81	2895.50	65.63	16.93	0.03	0.01
Ecart-Type	0.03	928.86	43.61	8.14	0.02	0.00
CV %	0.5%	32.1%	66.5%	48.1%	76.2%	59.4%

Courbes d'Etalonnage

Concentration	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
0	6.81	2895.50	-	6.56E+01	1.69E+01	-	0.025	0.006	-
12.5	6.47	9.07E+03	9.77	1.04E+03	4.35E+02	1.510	0.115	0.048	0.418
25	6.47	1.19E+04	9.77	1.88E+03	9.30E+02	1.510	0.158	0.078	0.495
50	6.47	9.30E+03	9.74	3.64E+03	1.74E+03	1.505	0.391	0.187	0.478
75	6.47	9.56E+03	9.76	5.39E+03	2.42E+03	1.509	0.564	0.253	0.449
moyenne						1.508			0.464
a							0.0073	0.0034	
b							0.0130	0.0045	
R ²							0.9905	0.9921	

Essai	Analyte				
	Tr relatif	conformité du TR Relatif	ratio	conformité du ratio	Identification
1	1.504	conforme	0.401	conforme	identifié
2	1.515	conforme	0.435	conforme	identifié
3	1.505	conforme	0.478	conforme	identifié
4	1.512	conforme	0.448	conforme	identifié
5	1.504	conforme	0.538	conforme	identifié
6	1.504	conforme	0.405	conforme	identifié
7	1.504	conforme	0.470	conforme	identifié
8	1.512	conforme	0.428	conforme	identifié
9	1.512	conforme	0.504	conforme	identifié
10	1.518	conforme	0.442	conforme	identifié
11	1.546	conforme	0.448	conforme	identifié
12	1.545	conforme	0.459	conforme	identifié
13	1.510	conforme	0.500	conforme	identifié
14	1.506	conforme	0.484	conforme	identifié
15	1.506	conforme	0.496	conforme	identifié
16	1.505	conforme	0.485	conforme	identifié
17	1.510	conforme	0.488	conforme	identifié
18	1.512	conforme	0.519	conforme	identifié
19	1.500	conforme	0.514	conforme	identifié
20	1.509	conforme	0.491	conforme	identifié
moyenne	1.511		0.469		
écart-type	0.011		0.037		
CV %	0.75%		7.94%		

*Conformité du temps de rétention relatif et de ration des 20 supplémentés équivalent LMR.

Echantillons Supplémentés

Essai	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
1	6.49	1.22E+04	9.76	3.74E+03	1.50E+03	1.504	0.307	0.123	0.401
2	6.41	1.27E+04	9.71	4.74E+03	2.06E+03	1.515	0.373	0.162	0.435
3	6.47	9.30E+03	9.74	3.64E+03	1.74E+03	1.505	0.391	0.187	0.478
4	6.44	6.66E+03	9.74	3.10E+03	1.39E+03	1.512	0.465	0.209	0.448
5	6.47	1.14E+04	9.73	4.65E+03	2.50E+03	1.504	0.408	0.219	0.538
6	6.47	8.14E+03	9.73	3.36E+03	1.36E+03	1.504	0.413	0.167	0.405
7	6.47	1.12E+04	9.73	3.81E+03	1.79E+03	1.504	0.340	0.160	0.470
8	6.43	5.06E+03	9.72	1.96E+03	8.39E+02	1.512	0.387	0.166	0.428
9	6.42	5.87E+03	9.71	2.80E+03	1.41E+03	1.512	0.477	0.240	0.504
10	6.39	8.44E+03	9.7	3.28E+03	1.45E+03	1.518	0.389	0.172	0.442
11	5.95	1.22E+05	9.2	3.62E+04	1.62E+04	1.546	0.297	0.133	0.448
12	5.95	6.05E+04	9.19	2.83E+04	1.30E+04	1.545	0.468	0.215	0.459
13	6.31	1.28E+04	9.53	3.62E+03	1.81E+03	1.510	0.283	0.141	0.500
14	6.33	2.09E+04	9.53	4.92E+03	2.38E+03	1.506	0.235	0.114	0.484
15	6.32	7.53E+03	9.52	3.63E+03	1.80E+03	1.506	0.482	0.239	0.496
16	6.32	7.25E+03	9.51	3.55E+03	1.72E+03	1.505	0.490	0.237	0.485
17	6.31	1.09E+04	9.53	4.12E+03	2.01E+03	1.510	0.378	0.184	0.488
18	6.31	9.50E+03	9.54	3.64E+03	1.89E+03	1.512	0.383	0.199	0.519
19	6.3	1.15E+04	9.45	3.95E+03	2.03E+03	1.500	0.343	0.177	0.514
20	6.31	1.25E+04	9.52	3.83E+03	1.88E+03	1.509	0.306	0.150	0.491
Moyenne	6.34	18317.50	9.59	6542.00	3037.95	1.51	0.38	0.18	0.47
Ecart-Type	0.15	27081.78	0.17	8909.32	4005.36	0.0123	0.0726	0.0382	0.0375
CV %	2.4%	147.8%	1.8%	136.2%	131.8%	0.8%	19.1%	21.3%	7.9%

Synthèse

		Signal 1 (+ intense)	Signal 2 (- intense)	
Spécificité	Variabilité du bruit de fond (CV %)	66.5%	48.1%	
	Absence d'interférences			
Linéarité	Coefficient de détermination (R^2)	0.9905	0.9921	
	Pente (a)	0.0073	0.0034	
	Ordonnée Origine (b)	0.0254	0.0065	
Répétabilité	Signal (CV %)	19.1%	21.3%	
	TR (CV %)	0.8%		
	Ratio (CV %)	7.9%		
Justesse	Conc. Ajouts (LMR)	ppb	50.00	
	Conc. Estimée	ppb	48.60	51.16
	Ecart (%)		-2.8%	2.3%
Limites	CC α	ppb	64.88	69.68

- Acide oxolinique

Echantillons Blancs

Essai	Etalon Interne		Analyte (bruit de fond)			
	TR (min)	Amplitude Signal	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
1	6.88	3.11E+03	1.43E+01	4.64E+00	0.005	0.001
2	6.83	1.71E+03	1.24E+00	9.00E+00	0.001	0.005
3	6.82	4.41E+03	5.72E+00	2.67E+00	0.001	0.001
4	6.88	4.04E+03	2.87E+00	1.33E+00	0.001	0.000
5	6.82	2.34E+03	9.33E+00	5.33E+00	0.004	0.002
6	6.81	2.80E+03	9.33E+00	4.79E+00	0.003	0.002
7	6.8	2.13E+03	1.03E+01	1.33E+00	0.005	0.001
8	6.84	2.44E+03	1.20E+01	4.98E+00	0.005	0.002
9	6.8	2.46E+03	1.20E+01	1.50E+00	0.005	0.001
10	6.8	2.77E+03	9.33E+00	2.80E+01	0.003	0.010
11	6.8	3.99E+03	1.33E+01	3.25E+01	0.003	0.008
12	6.82	3.33E+03	1.55E+01	3.18E+00	0.005	0.001
13	6.82	3.82E+03	1.69E+01	5.00E+00	0.004	0.001
14	6.8	2.53E+03	2.22E+01	9.02E+01	0.009	0.036
15	6.82	3.58E+03	1.84E+01	6.07E+00	0.005	0.002
16	6.8	2.81E+03	1.40E+01	1.94E+00	0.005	0.001
17	6.8	4.54E+03	2.28E+01	1.96E+01	0.005	0.004
18	6.78	1.48E+03	8.74E+00	5.33E+00	0.006	0.004
19	6.77	1.58E+03	1.49E+01	4.60E+01	0.009	0.029
20	6.74	2.04E+03	2.00E+01	6.72E+00	0.010	0.003
Moyenne	6.81	2895.50	12.66	14.01	0.00	0.01
Ecart-Type	0.03	928.86	5.83	21.64	0.00	0.01
CV %	0.5%	32.1%	46.1%	154.5%	52.6%	167.7%

Courbes d'Etalonnage

Concentration	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
0	6.81	2.90E+03	-	1.27E+01	1.40E+01	-	0.005	0.006	-
25	5.9	5.74E+04	7.81	1.64E+04	1.65E+03	1.324	0.286	0.029	0.101
50	5.88	5.20E+04	7.81	3.32E+04	3.27E+03	1.328	0.638	0.063	0.098
100	5.88	6.68E+04	7.79	7.22E+04	7.51E+03	1.325	1.081	0.112	0.104
150	5.89	4.54E+04	7.80	8.51E+04	8.74E+03	1.324	1.874	0.193	0.103
moyenne						1.326			0.103
a							0.0121	0.0012	
b							-0.0114	0.0005	
R ²							0.9902	0.9904	

Essai	Analyte				
	Tr relatif	conformité du TR Relatif	ratio	conformité du ratio	Identification
1	1.297	conforme	0.091	conforme	identifié
2	1.295	conforme	0.106	conforme	identifié
3	1.296	conforme	0.104	conforme	identifié
4	1.319	conforme	0.105	conforme	identifié
5	1.314	conforme	0.098	conforme	identifié
6	1.314	conforme	0.102	conforme	identifié
7	1.326	conforme	0.099	conforme	identifié
8	1.313	conforme	0.101	conforme	identifié
9	1.325	conforme	0.104	conforme	identifié
10	1.314	conforme	0.100	conforme	identifié
11	1.323	conforme	0.102	conforme	identifié
12	1.298	conforme	0.100	conforme	identifié
13	1.295	conforme	0.112	conforme	identifié
14	1.287	conforme	0.105	conforme	identifié
15	1.324	conforme	0.107	conforme	identifié
16	1.322	conforme	0.101	conforme	identifié
17	1.319	conforme	0.106	conforme	identifié
18	1.324	conforme	0.090	conforme	identifié
19	1.324	conforme	0.104	conforme	identifié
20	1.314	conforme	0.107	conforme	identifié
moyenne	1.312		0.103		
écart-type	0.013		0.005		
CV %	0.96%		4.96%		

*Conformité du temps de rétention relatif et de ration des 20 supplémentés équivalent LMR.

Echantillons Supplémentés

Essai	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
1	6.43	8.16E+03	8.34	9.38E+03	8.53E+02	1.297	1.150	0.105	0.091
2	6.44	6.66E+03	8.34	6.64E+03	7.01E+02	1.295	0.997	0.105	0.106
3	6.42	5.87E+03	8.32	5.39E+03	5.61E+02	1.296	0.918	0.096	0.104
4	5.93	1.22E+05	7.82	1.11E+05	1.17E+04	1.319	0.910	0.096	0.105
5	5.95	6.80E+04	7.82	7.31E+04	7.15E+03	1.314	1.075	0.105	0.098
6	5.95	6.05E+04	7.82	5.72E+04	5.81E+03	1.314	0.945	0.096	0.102
7	5.89	6.90E+04	7.81	6.42E+04	6.35E+03	1.326	0.930	0.092	0.099
8	5.95	1.20E+05	7.81	1.09E+05	1.10E+04	1.313	0.908	0.092	0.101
9	5.88	6.68E+04	7.79	7.22E+04	7.51E+03	1.325	1.081	0.112	0.104
10	5.95	9.40E+04	7.82	1.05E+05	1.05E+04	1.314	1.117	0.112	0.100
11	5.91	9.26E+04	7.82	1.17E+05	1.19E+04	1.323	1.263	0.129	0.102
12	6.42	6.21E+03	8.33	7.49E+03	7.50E+02	1.298	1.206	0.121	0.100
13	6.43	5.06E+03	8.33	4.08E+03	4.58E+02	1.295	0.806	0.091	0.112
14	6.47	8.14E+03	8.33	6.48E+03	6.78E+02	1.287	0.796	0.083	0.105
15	5.89	4.23E+04	7.8	6.59E+04	7.02E+03	1.324	1.558	0.166	0.107
16	5.9	4.31E+04	7.8	5.95E+04	5.98E+03	1.322	1.381	0.139	0.101
17	5.93	4.89E+04	7.82	6.60E+04	6.97E+03	1.319	1.350	0.143	0.106
18	5.89	4.23E+04	7.8	6.59E+04	5.91E+03	1.324	1.558	0.140	0.090
19	5.9	3.60E+04	7.81	5.59E+04	5.82E+03	1.324	1.553	0.162	0.104
20	5.95	6.87E+04	7.82	1.07E+05	1.15E+04	1.314	1.557	0.167	0.107
Moyenne	6.07	50715.00	7.97	58418.00	5956.05	1.31	1.15	0.12	0.10
Ecart-Type	0.24	37613.65	0.24	39765.24	4099.41	0.013	0.262	0.027	0.005
CV %	4.0%	74.2%	3.1%	68.1%	68.8%	1.0%	22.8%	22.8%	5.1%

Synthèse

		Signal 1 (+ intense)	Signal 2 (- intense)
Spécificité	Variabilité du bruit de fond (CV %)	46.1%	154.5%
	Absence d' interférences		
Linéarité	Coefficient de détermination (R ²)	0.9902	0.9904
	Pente (a)	0.0121	0.0012
	Ordonnée Origine (b)	0.0047	0.0057
Répétabilité	Signal (CV %)	22.8%	22.8%
	TR (CV %)		1.0%
	Ratio (CV %)		5.1%
Justesse	Conc. Ajouts (LMR) ppb	100.00	
	Conc. Estimée ppb	94.69	90.87
	Ecart (%)	-5.3%	-9.1%
Limites	CC _α ppb	130.17	126.60

- Difloxacin

Echantillons Blancs

Essai	Etalon Interne		Analyte (bruit de fond)			
	TR (min)	Amplitude Signal	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
1	6.88	3.11E+03	1.33E+00	9.33E+00	0.00043	0.00300
2	6.83	1.71E+03	3.33E+00	1.33E+00	0.00195	0.00078
3	6.82	4.41E+03	2.67E+00	3.00E+00	0.00061	0.00068
4	6.88	4.04E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.00066	0.00033
5	6.82	2.34E+03	4.17E+00	1.33E+00	0.00178	0.00057
6	6.81	2.80E+03	1.37E+02	1.33E+00	0.04893	0.00048
7	6.8	2.13E+03	4.00E+00	2.67E+00	0.00188	0.00125
8	6.84	2.44E+03	1.04E+00	1.33E+00	0.00043	0.00055
9	6.8	2.46E+03	1.33E+00	4.00E+00	0.00054	0.00163
10	6.8	2.77E+03	1.33E+00	1.33E+00	0.00048	0.00048
11	6.8	3.99E+03	1.33E+00	1.33E+00	0.00033	0.00033
12	6.82	3.33E+03	4.51E+00	1.33E+00	0.00135	0.00040
13	6.82	3.82E+03	6.41E+00	1.33E+00	0.00168	0.00035
14	6.8	2.53E+03	7.40E+00	2.76E+00	0.00292	0.00109
15	6.82	3.58E+03	1.52E+00	1.33E+00	0.00042	0.00037
16	6.8	2.81E+03	2.72E+00	4.00E+00	0.00097	0.00142
17	6.8	4.54E+03	1.33E+00	8.17E+00	0.00029	0.00180
18	6.78	1.48E+03	1.33E+00	2.00E+00	0.00090	0.00135
19	6.77	1.58E+03	2.83E+00	1.33E+00	0.00179	0.00084
20	6.74	2.04E+03	2.48E+00	1.33E+00	0.00122	0.00065
Moyenne	6.81	2895.50	9.54	2.59	0.0035	0.0009
Ecart-Type	0.03	928.86	30.05	2.30	0.0107	0.0007
CV %	0.5%	32.1%	315.1%	88.5%	308.3%	73.3%

Courbes d'Etalonnage

Concentration	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
0	6.81	2.90E+03	-	9.54E+00	2.59E+00	-	0.003	0.001	-
100	5.91	3.27E+04	6.95	2.31E+03	2.85E+02	1.176	0.071	0.009	0.123
200	5.88	6.41E+04	6.94	9.23E+03	1.19E+03	1.180	0.144	0.019	0.129
400	5.89	4.23E+04	6.92	1.45E+04	1.40E+03	1.175	0.343	0.033	0.097
600	5.89	4.54E+04	6.92	2.05E+04	2.24E+03	1.175	0.452	0.049	0.109
moyenne						1.177			0.103
a							0.0008	0.0001	
b							0.0000	0.0012	
R ²							0.9899	0.9986	

Essai	Analyte				
	Tr relatif	conformité du TR Relatif	ratio	conformité du ratio	Identification
1	1.145	conforme	0.084	conforme	identifié
2	1.156	conforme	0.079	conforme	identifié
3	1.154	conforme	0.133	conforme	identifié
4	1.183	conforme	0.095	conforme	identifié
5	1.179	conforme	0.072	conforme	identifié
6	1.173	conforme	0.079	conforme	identifié
7	1.175	conforme	0.103	conforme	identifié
8	1.177	conforme	0.078	conforme	identifié
9	1.175	conforme	0.081	conforme	identifié
10	1.176	conforme	0.080	conforme	identifié
11	1.172	conforme	0.095	conforme	identifié
12	1.180	conforme	0.088	conforme	identifié
13	1.156	conforme	0.089	conforme	identifié
14	1.145	conforme	0.103	conforme	identifié
15	1.175	conforme	0.075	conforme	identifié
16	1.178	conforme	0.103	conforme	identifié
17	1.179	conforme	0.109	conforme	identifié
18	1.154	conforme	0.088	conforme	identifié
19	1.145	conforme	0.116	conforme	identifié
20	1.145	conforme	0.096	conforme	identifié
moyenne	1.165		0.093		
écart-type	0.015		0.013		
CV %	1.30%		14.08%		

*Conformité du temps de rétention relatif et de rations des 20 supplémentés équivalent LMR.

Echantillons Supplémentés

Essai	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
1	6.47	1.12E+04	7.41	1.88E+03	1.57E+02	1.145	0.168	0.014	0.084
2	6.42	5.87E+03	7.42	1.40E+03	1.11E+02	1.156	0.239	0.019	0.079
3	6.42	6.21E+03	7.41	1.57E+03	2.09E+02	1.154	0.253	0.034	0.133
4	5.91	9.26E+04	6.99	2.58E+04	2.46E+03	1.183	0.279	0.027	0.095
5	5.93	4.89E+04	6.99	1.20E+04	8.68E+02	1.179	0.245	0.018	0.072
6	5.95	6.80E+04	6.98	1.50E+04	1.18E+03	1.173	0.221	0.017	0.079
7	5.95	9.40E+04	6.99	2.28E+04	2.35E+03	1.175	0.243	0.025	0.103
8	5.88	4.97E+04	6.92	1.48E+04	1.15E+03	1.177	0.298	0.023	0.078
9	5.9	4.55E+04	6.93	1.28E+04	1.04E+03	1.175	0.281	0.023	0.081
10	5.92	6.03E+04	6.96	1.62E+04	1.29E+03	1.176	0.269	0.021	0.080
11	5.93	2.96E+04	6.95	7.47E+03	7.13E+02	1.172	0.252	0.024	0.095
12	5.9	6.09E+04	6.96	1.69E+04	1.48E+03	1.180	0.278	0.024	0.088
13	6.43	8.16E+03	7.43	1.58E+03	1.41E+02	1.156	0.194	0.017	0.089
14	6.47	1.14E+04	7.41	2.19E+03	2.25E+02	1.145	0.192	0.020	0.103
15	5.95	6.05E+04	6.99	1.17E+04	8.83E+02	1.175	0.193	0.015	0.075
16	5.89	6.90E+04	6.94	1.38E+04	1.42E+03	1.178	0.200	0.021	0.103
17	5.93	1.22E+05	6.99	2.31E+04	2.52E+03	1.179	0.189	0.021	0.109
18	6.44	6.66E+03	7.43	1.21E+03	1.07E+02	1.154	0.182	0.016	0.088
19	6.47	8.14E+03	7.41	1.45E+03	1.68E+02	1.145	0.178	0.021	0.116
20	6.47	9.30E+03	7.41	1.58E+03	1.52E+02	1.145	0.170	0.016	0.096
Moyenne	6.13	43397.00	7.15	10261.50	931.20	1.1660	0.2261	0.0207	0.09
Ecart-Type	0.27	35107.91	0.23	8327.18	811.26	0.0139	0.0422	0.0047	0.02
CV %	4.4%	80.9%	3.2%	81.1%	87.1%	1.2%	18.6%	22.5%	16.7%

Synthèse

		Signal 1 (+ intense)	Signal 2 (- intense)
Spécificité	Variabilité du bruit de fond (CV %)	315.1%	88.5%
	Absence d'interférences		
Linéarité	Coefficient de détermination (R^2)	0.9899	0.9986
	Pente (a)	0.0008	0.0001
	Ordonnée Origine (b)	0.0035	0.0009
Répétabilité	Signal (CV %)	18.6%	22.5%
	TR (CV %)	1.2%	
	Ratio (CV %)	16.7%	
Justesse	Conc. Ajouts (LMR) ppb	300.00	
	Conc. Estimée ppb	285.88	246.51
	Ecart (%)	-4.7%	-17.8%
Limites	CC α ppb	374.67	341.72

- ciprofloxacin

Echantillons Blancs

Essai	Etalon Interne		Analyte (bruit de fond)			
	TR (min)	Amplitude Signal	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
1	6.88	3.11E+03	6.67E+00	1.33E+00	0.002	0.000
2	6.83	1.71E+03	6.67E+00	1.97E+00	0.004	0.001
3	6.82	4.41E+03	1.33E+00	1.20E+01	0.000	0.003
4	6.88	4.04E+03	2.67E+00	2.67E+00	0.001	0.001
5	6.82	2.34E+03	1.33E+00	4.00E+00	0.001	0.002
6	6.81	2.80E+03	9.33E+00	2.67E+00	0.003	0.001
7	6.8	2.13E+03	8.00E+00	4.00E+00	0.004	0.002
8	6.84	2.44E+03	9.33E+00	4.00E+00	0.004	0.002
9	6.8	2.46E+03	4.00E+00	1.33E+00	0.002	0.001
10	6.8	2.77E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.001	0.000
11	6.8	3.99E+03	1.85E+00	2.67E+00	0.000	0.001
12	6.82	3.33E+03	3.30E+00	4.00E+00	0.001	0.001
13	6.82	3.82E+03	3.20E+01	9.33E+00	0.008	0.002
14	6.8	2.53E+03	2.67E+00	2.67E+00	0.001	0.001
15	6.82	3.58E+03	1.33E+00	1.93E+00	0.000	0.001
16	6.8	2.81E+03	1.33E+00	1.34E+00	0.000	0.000
17	6.8	4.54E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.001	0.000
18	6.78	1.48E+03	4.00E+00	1.33E+00	0.003	0.001
19	6.77	1.58E+03	2.01E+00	1.50E+00	0.001	0.001
20	6.74	2.04E+03	8.00E+00	4.00E+00	0.004	0.002
Moyenne	6.81	2895.50	5.56	3.27	0.00	0.00
Ecart-Type	0.03	928.86	6.82	2.77	0.00	0.00
CV %	0.5%	32.1%	122.7%	84.8%	97.1%	62.1%

Courbes d'Etalonnage

Concentration	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
0	6.81	2.90E+03	-	5.56E+00	3.27E+00	-	0.002	0.001	-
25	5.93	2.77E+04	6.11	1.05E+03	6.79E+02	1.030	0.038	0.025	0.647
50	5.89	6.31E+04	6.11	5.17E+03	3.12E+03	1.037	0.082	0.049	0.603
100	5.9	3.60E+04	6.11	5.38E+03	3.49E+03	1.036	0.149	0.097	0.649
150	5.92	2.85E+04	6.11	5.64E+03	3.58E+03	1.032	0.198	0.126	0.635
moyenne						1.035			0.642
a							0.0013	0.0008	
b							0.0079	0.0045	
R ²							0.9897	0.9891	

Essai	Analyte				
	Tr relatif	conformité du TR Relatif	ratio	conformité du ratio	Identification
1	1.032	conforme	0.585	conforme	identifié
2	1.036	conforme	0.338	non conforme	non identifié
3	1.034	conforme	0.448	conforme	identifié
4	1.026	conforme	0.459	conforme	identifié
5	1.026	conforme	0.440	conforme	identifié
6	1.031	conforme	0.546	conforme	identifié
7	1.031	conforme	0.478	conforme	identifié
8	1.033	conforme	0.404	conforme	identifié
9	1.030	conforme	0.546	conforme	identifié
10	1.032	conforme	0.548	conforme	identifié
11	1.034	conforme	0.554	conforme	identifié
12	1.030	conforme	0.549	conforme	identifié
13	1.027	conforme	0.575	conforme	identifié
14	1.036	conforme	0.580	conforme	identifié
15	1.027	conforme	0.573	conforme	identifié
16	1.032	conforme	0.548	conforme	identifié
17	1.037	conforme	0.565	conforme	identifié
18	1.036	conforme	0.518	conforme	identifié
19	1.037	conforme	0.595	conforme	identifié
20	1.036	conforme	0.406	conforme	identifié
moyenne	1.033		0.505		
écart-type	0.004		0.083		
CV %	0.37%		16.44%		

*Conformité du temps de rétention relatif et de ration des 19 supplémentés sur 20 équivalent LMR.

Echantillons Supplémentés

Essai	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
1	5.92	6.03E+04	6.11	1.04E+04	6.08E+03	1.032	0.172	0.101	0.585
2	6.43	8.16E+03	6.66	1.36E+03	4.59E+02	1.036	0.167	0.056	0.338
3	6.44	5.49E+03	6.66	7.92E+02	3.55E+02	1.034	0.144	0.065	0.448
4	6.47	7.29E+03	6.64	9.94E+02	4.56E+02	1.026	0.136	0.063	0.459
5	6.47	6.86E+03	6.64	9.86E+02	4.34E+02	1.026	0.144	0.063	0.440
6	6.43	4.21E+03	6.63	5.51E+02	3.01E+02	1.031	0.131	0.071	0.546
7	6.42	4.22E+03	6.62	4.79E+02	2.29E+02	1.031	0.114	0.054	0.478
8	6.42	5.22E+03	6.63	8.16E+02	3.30E+02	1.033	0.156	0.063	0.404
9	5.93	4.93E+04	6.11	8.32E+03	4.54E+03	1.030	0.169	0.092	0.546
10	5.93	2.96E+04	6.12	3.65E+03	2.00E+03	1.032	0.123	0.068	0.548
11	5.91	9.26E+04	6.11	1.36E+04	7.54E+03	1.034	0.147	0.081	0.554
12	5.93	3.78E+04	6.11	4.46E+03	2.45E+03	1.030	0.118	0.065	0.549
13	5.95	5.90E+04	6.11	7.29E+03	4.19E+03	1.027	0.124	0.071	0.575
14	5.9	3.60E+04	6.11	5.38E+03	3.12E+03	1.036	0.149	0.087	0.580
15	5.95	6.87E+04	6.11	8.31E+03	4.76E+03	1.027	0.121	0.069	0.573
16	5.92	3.52E+04	6.11	4.40E+03	2.41E+03	1.032	0.125	0.068	0.548
17	5.89	6.90E+04	6.11	9.54E+03	5.39E+03	1.037	0.138	0.078	0.565
18	5.9	3.29E+04	6.11	4.63E+03	2.40E+03	1.036	0.141	0.073	0.518
19	5.89	4.23E+04	6.11	6.97E+03	4.15E+03	1.037	0.165	0.098	0.595
20	5.9	4.06E+04	6.11	4.00E+03	5.10E+03	1.036	0.099	0.040	0.406
Moyenne	6.10	34737.50	6.30	4846.40	2834.70	1.03	0.14	0.07	0.51
Ecart-Type	0.26	26246.77	0.26	3831.82	2276.97	0.0036	0.0202	0.0149	0.0732
CV %	4.2%	75.6%	4.1%	79.1%	80.3%	0.3%	14.5%	20.9%	14.3%

Synthèse

		Signal 1 (+ intense)	Signal 2 (- intense)
Spécificité	Variabilité du bruit de fond (CV %)	122.7%	84.8%
	Absence d'interférences		
Linéarité	Coefficient de détermination (R ²)	0.9897	0.9891
	Pente (a)	0.0013	0.0008
	Ordonnée Origine (b)	0.0021	0.0011
Répétabilité	Signal (CV %)	14.5%	20.9%
	TR (CV %)	0.3%	
	Ratio (CV %)	14.3%	
Justesse	Conc. Ajouts (LMR) ppb	100.00	
	Conc. Estimée ppb	103.65	82.95
	Ecart (%)	3.7%	-17.0%
Limites	CC _α ppb	128.74	111.84

- Danofloxacin

Echantillons Blancs

Essai	Etalon Interne		Analyte (bruit de fond)			
	TR (min)	Amplitude Signal	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
1	6.88	3.11E+03	2.67E+00	6.67E+00	0.001	0.002
2	6.83	1.71E+03	4.00E+00	1.33E+00	0.002	0.001
3	6.82	4.41E+03	5.33E+00	1.33E+00	0.001	0.000
4	6.88	4.04E+03	9.33E+00	1.33E+00	0.002	0.000
5	6.82	2.34E+03	1.44E+00	2.67E+00	0.001	0.001
6	6.81	2.80E+03	9.33E+00	1.33E+00	0.003	0.000
7	6.8	2.13E+03	6.67E+00	1.33E+00	0.003	0.001
8	6.84	2.44E+03	4.00E+00	2.67E+00	0.002	0.001
9	6.8	2.46E+03	9.33E+00	1.33E+00	0.004	0.001
10	6.8	2.77E+03	1.73E+01	1.33E+00	0.006	0.000
11	6.8	3.99E+03	2.67E+00	6.67E+00	0.001	0.002
12	6.82	3.33E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.001	0.000
13	6.82	3.82E+03	8.00E+00	4.00E+00	0.002	0.001
14	6.8	2.53E+03	1.20E+01	1.33E+00	0.005	0.001
15	6.82	3.58E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.001	0.000
16	6.8	2.81E+03	1.33E+01	1.99E+00	0.005	0.001
17	6.8	4.54E+03	5.33E+00	4.00E+00	0.001	0.001
18	6.78	1.48E+03	9.67E-01	1.33E+00	0.001	0.001
19	6.77	1.58E+03	6.67E+00	1.33E+00	0.004	0.001
20	6.74	2.04E+03	6.67E+00	5.33E+00	0.003	0.003
Moyenne	6.81	2895.50	6.52	2.50	0.00	0.00
Ecart-Type	0.03	928.86	4.29	1.84	0.00	0.00
CV %	0.5%	32.1%	65.8%	73.5%	69.2%	68.7%

Courbes d'Etalonnage

Concentration	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
0	6.81	2.90E+03	-	2.00E+00	2.50E+00	-	0.002	0.001	-
7.5	5.91	3.27E+04	5.97	3.69E+02	8.08E+01	1.010	0.011	0.002	0.219
15	5.88	6.41E+04	5.95	1.39E+03	3.05E+02	1.012	0.022	0.005	0.219
30	5.89	4.23E+04	5.96	1.53E+03	3.20E+02	1.012	0.036	0.008	0.209
45	5.89	4.54E+04	5.96	2.16E+03	4.51E+02	1.012	0.048	0.010	0.209
moyenne						1.012			0.209
a							0.0010	0.0002	
b							0.0042	0.0012	
R ²							0.9881	0.9880	

Essai	Analyte				
	Tr relatif	conformité du TR Relatif	ratio	conformité du ratio	Identification
1	1.048	conforme	0.102	conforme	identifié
2	1.047	conforme	0.109	conforme	identifié
3	1.050	conforme	0.094	conforme	identifié
4	1.047	conforme	0.127	conforme	identifié
5	1.052	conforme	0.119	conforme	identifié
6	1.052	conforme	0.125	conforme	identifié
7	1.052	conforme	0.125	conforme	identifié
8	1.054	conforme	0.122	conforme	identifié
9	1.050	conforme	0.125	conforme	identifié
10	1.054	conforme	0.119	conforme	identifié
11	1.052	conforme	0.119	conforme	identifié
12	1.056	conforme	0.118	conforme	identifié
13	1.054	conforme	0.142	conforme	identifié
14	1.054	conforme	0.107	conforme	identifié
15	1.056	conforme	0.125	conforme	identifié
16	1.054	conforme	0.124	conforme	identifié
17	1.054	conforme	0.126	conforme	identifié
18	1.040	conforme	0.097	conforme	identifié
19	1.054	conforme	0.118	conforme	identifié
20	1.052	conforme	0.089	conforme	identifié
moyenne	1.052		0.118		
écart-type	0.003		0.013		
CV %	0.26%		10.81%		

*Conformité du temps de rétention relatif et de ration des 20 supplémentés équivalent LMR.

Echantillons Supplémentés

Essai	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
1	6.43	8.16E+03	6.74	2.33E+03	2.38E+02	1.048	0.286	0.029	0.102
2	6.44	6.66E+03	6.74	1.36E+03	1.48E+02	1.047	0.204	0.022	0.109
3	6.42	5.87E+03	6.74	1.41E+03	1.32E+02	1.050	0.240	0.022	0.094
4	6.42	6.21E+03	6.72	1.73E+03	2.19E+02	1.047	0.279	0.035	0.127
5	5.93	4.93E+04	6.24	1.26E+04	1.50E+03	1.052	0.256	0.030	0.119
6	5.91	9.26E+04	6.22	1.89E+04	2.36E+03	1.052	0.204	0.025	0.125
7	5.93	4.89E+04	6.24	1.02E+04	1.28E+03	1.052	0.209	0.026	0.125
8	5.9	3.60E+04	6.22	8.53E+03	1.04E+03	1.054	0.237	0.029	0.122
9	5.95	6.87E+04	6.25	1.46E+04	1.82E+03	1.050	0.213	0.026	0.125
10	5.95	9.40E+04	6.27	1.99E+04	2.37E+03	1.054	0.212	0.025	0.119
11	5.95	6.05E+04	6.26	1.24E+04	1.48E+03	1.052	0.205	0.024	0.119
12	5.92	4.23E+04	6.25	1.15E+04	1.36E+03	1.056	0.272	0.032	0.118
13	5.89	4.23E+04	6.21	8.87E+03	1.26E+03	1.054	0.210	0.030	0.142
14	5.95	1.20E+05	6.27	2.64E+04	2.82E+03	1.054	0.220	0.024	0.107
15	5.9	4.55E+04	6.23	1.15E+04	1.44E+03	1.056	0.253	0.032	0.125
16	5.92	6.03E+04	6.24	1.67E+04	2.07E+03	1.054	0.277	0.034	0.124
17	5.95	6.80E+04	6.27	1.21E+04	1.53E+03	1.054	0.178	0.023	0.126
18	6.47	8.14E+03	6.73	1.53E+03	1.49E+02	1.040	0.188	0.018	0.097
19	5.95	1.22E+05	6.27	2.02E+04	2.39E+03	1.054	0.166	0.020	0.118
20	6.39	8.44E+03	6.72	1.61E+03	1.44E+02	1.052	0.191	0.017	0.089
Moyenne	6.08	49694.00	6.39	10718.50	1287.50	1.0516	0.2248	0.0263	0.12
Ecart-Type	0.24	37015.57	0.23	7429.12	873.41	0.0038	0.0355	0.0052	0.01
CV %	3.9%	74.5%	3.6%	69.3%	67.8%	0.4%	15.8%	19.6%	11.2%

Synthèse

		Signal 1 (+ intense)	Signal 2 (- intense)
Spécificité	Variabilité du bruit de fond (CV %)	315.1%	88.5%
	Absence d' interférences		
Linéarité	Coefficient de détermination (R ²)	0.9864	0.9899
	Pente (a)	0.0011	0.0002
	Ordonnée Origine (b)	0.0035	0.0009
Répétabilité	Signal (CV %)	15.8%	19.6%
	TR (CV %)	0.4%	
	Ratio (CV %)	11.2%	
Justesse	Conc. Ajouts (LMR) ppb	200.00	
	Conc. Estimée ppb	194.08	167.24
	Ecart (%)	-3.0%	-16.4%
Limites	CC _α ppb	245.12	223.02

- Enrofloxacin

Echantillons Blancs

Essai	Etalon Interne		Analyte (bruit de fond)			
	TR (min)	Amplitude Signal	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
1	6.88	3.11E+03	1.33E+00	0.00E+00	0.0004	0.0000
2	6.83	1.71E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.0016	0.0008
3	6.82	4.41E+03	6.67E+00	0.00E+00	0.0015	0.0000
4	6.88	4.04E+03	0.00E+00	0.00E+00	0.0000	0.0000
5	6.82	2.34E+03	1.33E+00	0.00E+00	0.0006	0.0000
6	6.81	2.80E+03	5.33E+00	1.33E+00	0.0019	0.0005
7	6.8	2.13E+03	1.33E+00	0.00E+00	0.0006	0.0000
8	6.84	2.44E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.0011	0.0005
9	6.8	2.46E+03	4.00E+00	0.00E+00	0.0016	0.0000
10	6.8	2.77E+03	4.00E+00	1.33E+00	0.0014	0.0005
11	6.8	3.99E+03	2.67E+00	5.33E+00	0.0007	0.0013
12	6.82	3.33E+03	6.67E+00	4.00E+00	0.0020	0.0012
13	6.82	3.82E+03	5.33E+00	2.67E+00	0.0014	0.0007
14	6.8	2.53E+03	2.67E+00	0.00E+00	0.0011	0.0000
15	6.82	3.58E+03	1.33E+00	1.33E+00	0.0004	0.0004
16	6.8	2.81E+03	4.67E+01	0.00E+00	0.0166	0.0000
17	6.8	4.54E+03	8.00E+00	0.00E+00	0.0018	0.0000
18	6.78	1.48E+03	6.67E+00	2.67E+00	0.0045	0.0018
19	6.77	1.58E+03	2.67E+00	0.00E+00	0.0017	0.0000
20	6.74	2.04E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.0013	0.0007
Moyenne	6.81	2895.50	5.74	1.13	0.0021	0.0004
Ecart-Type	0.03	928.86	9.89	1.52	0.004	0.0005
CV %	0.5%	32.1%	172.5%	133.8%	168.0%	128.0%

Courbes d'Etalonnage

Concentration	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
0	6.81	2.90E+03	-	5.74E+00	1.13E+00	-	0.002	0.0004	-
25	5.95	4.98E+04	6.50	1.52E+02	3.64E+01	1.092	0.003	0.001	0.239
50	5.92	7.28E+04	6.44	5.05E+02	1.02E+02	1.088	0.007	0.001	0.202
100	5.9	3.60E+04	6.43	5.32E+02	9.12E+01	1.090	0.015	0.003	0.171
150	5.89	4.54E+04	6.44	9.09E+02	1.71E+02	1.093	0.020	0.004	0.188
moyenne						1.090			0.180
a							0.0001	0.000023	
b							0.0011	0.0003	
R ²							0.9845	0.9950	

Essai	Analyte				
	Tr relatif	conformité du TR Relatif	ratio	conformité du ratio	Identification
1	1.076	conforme	0.162	conforme	identifié
2	1.078	conforme	0.197	conforme	identifié
3	1.090	conforme	0.171	conforme	identifié
4	1.081	conforme	0.185	conforme	identifié
5	1.076	conforme	0.164	conforme	identifié
6	1.078	conforme	0.202	conforme	identifié
7	1.078	conforme	0.206	conforme	identifié
8	1.095	conforme	0.174	conforme	identifié
9	1.074	conforme	0.234	conforme	identifié
10	1.092	conforme	0.239	conforme	identifié
11	1.092	conforme	0.164	conforme	identifié
12	1.095	conforme	0.214	conforme	identifié
13	1.074	conforme	0.166	conforme	identifié
14	1.074	conforme	0.185	conforme	identifié
15	1.073	conforme	0.240	conforme	identifié
16	1.079	conforme	0.227	conforme	identifié
17	1.066	conforme	0.186	conforme	identifié
18	1.078	conforme	0.232	conforme	identifié
19	1.090	conforme	0.209	conforme	identifié
20	1.088	conforme	0.231	conforme	identifié
moyenne	1.081		0.193		
écart-type	0.008		0.027		
CV %	0.78%		13.79%		

*Conformité du temps de rétention relatif et de rations des 20 supplémentés équivalent LMR.

Echantillons Supplémentés

Essai	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
1	6.47	9.30E+03	6.96	1.30E+02	2.10E+01	1.076	0.014	0.002	0.162
2	6.43	8.16E+03	6.93	1.32E+02	2.60E+01	1.078	0.016	0.003	0.197
3	5.9	3.60E+04	6.43	5.32E+02	9.12E+01	1.090	0.015	0.003	0.171
4	6.43	5.06E+03	6.95	9.26E+01	1.71E+01	1.081	0.018	0.003	0.185
5	6.42	5.87E+03	6.91	9.55E+01	1.57E+01	1.076	0.016	0.003	0.164
6	6.42	6.21E+03	6.92	1.24E+02	2.50E+01	1.078	0.020	0.004	0.202
7	6.39	8.44E+03	6.89	1.26E+02	2.60E+01	1.078	0.015	0.003	0.206
8	5.88	4.96E+04	6.44	6.91E+02	1.20E+02	1.095	0.014	0.002	0.174
9	6.47	7.92E+03	6.95	1.07E+02	2.50E+01	1.074	0.014	0.003	0.234
10	5.9	4.55E+04	6.44	7.15E+02	1.71E+02	1.092	0.016	0.004	0.239
11	5.9	6.09E+04	6.44	9.15E+02	1.50E+02	1.092	0.015	0.002	0.164
12	5.88	6.68E+04	6.44	8.88E+02	1.90E+02	1.095	0.013	0.003	0.214
13	6.47	1.12E+04	6.95	1.70E+02	2.82E+01	1.074	0.015	0.003	0.166
14	6.47	8.14E+03	6.95	1.30E+02	2.40E+01	1.074	0.016	0.003	0.185
15	6.47	1.14E+04	6.94	1.43E+02	3.43E+01	1.073	0.013	0.003	0.240
16	6.44	6.66E+03	6.95	1.00E+02	2.27E+01	1.079	0.015	0.003	0.227
17	6.49	1.22E+04	6.92	1.62E+02	3.02E+01	1.066	0.013	0.002	0.186
18	6.41	1.27E+04	6.91	1.42E+02	3.30E+01	1.078	0.011	0.003	0.232
19	5.9	3.60E+04	6.43	3.62E+02	7.57E+01	1.090	0.010	0.002	0.209
20	5.92	6.03E+04	6.44	8.60E+02	1.99E+02	1.088	0.014	0.003	0.231
Moyenne	6.25	23418.00	6.76	330.86	66.26	1.08	0.0147	0.0029	0.1994
Ecart-Type	0.27	21792.44	0.24	307.47	63.55	0.01	0.0022	0.0005	0.0278
CV %	4.3%	93.1%	3.6%	92.9%	95.9%	0.8%	15.1%	17.5%	14.0%

Synthèse

		Signal 1 (+ intense)	Signal 2 (- intense)
Spécificité	Variabilité du bruit de fond (CV %)	172.5%	133.8%
	Absence d' interférences		
Linéarité	Coefficient de détermination (R ²)	0.9845	0.9950
	Pente (a)	0.0001	0.0000
	Ordonnée Origine (b)	0.0021	0.0004
Répétabilité	Signal (CV %)	15.1%	17.5%
	TR (CV %)	0.8%	
	Ratio (CV %)	14.0%	
Justesse	Conc. Ajouts (LMR)	ppb	100.00
	Conc. Estimée	ppb	98.13
	Ecart (%)		-1.9%
Limites	CC _α	ppb	126.60
			145.44

- Norfloxacine

Echantillons Blancs

Essai	Etalon Interne		Analyte (bruit de fond)			
	TR (min)	Amplitude Signal	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
1	6.88	3.11E+03	2.67E+00	6.67E+00	0.001	0.002
2	6.83	1.71E+03	4.00E+00	1.33E+00	0.002	0.001
3	6.82	4.41E+03	5.33E+00	1.33E+00	0.001	0.000
4	6.88	4.04E+03	9.33E+00	1.33E+00	0.002	0.000
5	6.82	2.34E+03	1.44E+00	2.67E+00	0.001	0.001
6	6.81	2.80E+03	9.33E+00	1.33E+00	0.003	0.000
7	6.8	2.13E+03	6.67E+00	1.33E+00	0.003	0.001
8	6.84	2.44E+03	4.00E+00	2.67E+00	0.002	0.001
9	6.8	2.46E+03	9.33E+00	1.33E+00	0.004	0.001
10	6.8	2.77E+03	1.73E+01	1.33E+00	0.006	0.000
11	6.8	3.99E+03	2.67E+00	6.67E+00	0.001	0.002
12	6.82	3.33E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.001	0.000
13	6.82	3.82E+03	8.00E+00	4.00E+00	0.002	0.001
14	6.8	2.53E+03	1.20E+01	1.33E+00	0.005	0.001
15	6.82	3.58E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.001	0.000
16	6.8	2.81E+03	1.33E+01	1.99E+00	0.005	0.001
17	6.8	4.54E+03	5.33E+00	4.00E+00	0.001	0.001
18	6.78	1.48E+03	9.67E-01	1.33E+00	0.001	0.001
19	6.77	1.58E+03	6.67E+00	1.33E+00	0.004	0.001
20	6.74	2.04E+03	6.67E+00	5.33E+00	0.003	0.003
Moyenne	6.81	2895.50	6.52	2.50	0.00	0.00
Ecart-Type	0.03	928.86	4.29	1.84	0.00	0.00
CV %	0.5%	32.1%	65.8%	73.5%	69.2%	68.7%

Courbes d'Etalonnage

Concentration	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
0	6.81	2.90E+03	-	2.00E+00	2.50E+00	-	0.002	0.001	-
7.5	5.91	3.27E+04	5.97	3.69E+02	8.08E+01	1.010	0.011	0.002	0.219
15	5.88	6.41E+04	5.95	1.39E+03	3.05E+02	1.012	0.022	0.005	0.219
30	5.89	4.23E+04	5.96	1.53E+03	3.20E+02	1.012	0.036	0.008	0.209
45	5.89	4.54E+04	5.96	2.16E+03	4.51E+02	1.012	0.048	0.010	0.209
moyenne						1.012			0.209
a							0.0010	0.0002	
b							0.0042	0.0012	
R ²							0.9881	0.9880	

Essai	Analyte				
	Tr relatif	conformité du TR Relatif	ratio	conformité du ratio	Identification
1	1.012	conforme	0.167	conforme	identifié
2	1.012	conforme	0.178	conforme	identifié
3	1.012	conforme	0.211	conforme	identifié
4	1.008	conforme	0.161	conforme	identifié
5	1.007	conforme	0.220	conforme	identifié
6	1.008	conforme	0.202	conforme	identifié
7	1.008	conforme	0.140	conforme	identifié
8	1.012	conforme	0.164	conforme	identifié
9	1.009	conforme	0.151	conforme	identifié
10	1.009	conforme	0.158	conforme	identifié
11	1.011	conforme	0.162	conforme	identifié
12	1.011	conforme	0.197	conforme	identifié
13	1.012	conforme	0.144	conforme	identifié
14	1.007	conforme	0.194	conforme	identifié
15	1.007	conforme	0.197	conforme	identifié
16	1.008	conforme	0.200	conforme	identifié
17	1.008	conforme	0.210	conforme	identifié
18	1.007	conforme	0.226	conforme	identifié
19	1.008	conforme	0.214	conforme	identifié
20	1.008	conforme	0.203	conforme	identifié
moyenne	1.010		0.180		
écart-type	0.002		0.027		
CV %	0.21%		14.83%		

Echantillons Supplémentés

Essai	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
1	6.49	1.22E+04	6.57	3.59E+02	6.01E+01	1.012	0.029	0.005	0.167
2	6.47	1.02E+04	6.55	3.79E+02	6.76E+01	1.012	0.037	0.007	0.178
3	5.95	9.40E+04	6.02	2.79E+03	5.90E+02	1.012	0.030	0.006	0.211
4	5.93	4.89E+04	5.98	2.39E+03	3.85E+02	1.008	0.049	0.008	0.161
5	5.95	6.80E+04	5.99	1.76E+03	3.88E+02	1.007	0.026	0.006	0.220
6	5.95	6.05E+04	6	1.77E+03	3.57E+02	1.008	0.029	0.006	0.202
7	6.47	8.14E+03	6.52	2.35E+02	3.30E+01	1.008	0.029	0.004	0.140
8	6.47	7.92E+03	6.55	2.36E+02	3.87E+01	1.012	0.030	0.005	0.164
9	6.47	1.12E+04	6.53	3.07E+02	4.63E+01	1.009	0.027	0.004	0.151
10	6.43	5.06E+03	6.49	1.52E+02	2.40E+01	1.009	0.030	0.005	0.158
11	6.42	5.87E+03	6.49	2.54E+02	4.11E+01	1.011	0.043	0.007	0.162
12	6.42	6.21E+03	6.49	2.38E+02	4.68E+01	1.011	0.038	0.008	0.197
13	6.41	1.27E+04	6.49	4.15E+02	5.98E+01	1.012	0.033	0.005	0.144
14	5.93	2.96E+04	5.97	1.25E+03	2.42E+02	1.007	0.042	0.008	0.194
15	5.93	4.93E+04	5.97	1.79E+03	3.53E+02	1.007	0.036	0.007	0.197
16	5.95	6.87E+04	6	2.15E+03	4.30E+02	1.008	0.031	0.006	0.200
17	5.95	1.20E+05	6	3.59E+03	7.53E+02	1.008	0.030	0.006	0.210
18	5.93	1.22E+05	5.97	3.64E+03	8.23E+02	1.007	0.030	0.007	0.226
19	5.91	9.26E+04	5.96	3.01E+03	6.44E+02	1.008	0.033	0.007	0.214
20	5.95	1.22E+05	6	3.36E+03	6.82E+02	1.008	0.028	0.006	0.203
Moyenne	6.17	47755.00	6.23	1503.75	303.22	1.01	0.03	0.01	0.18
Ecart-Type	0.26	43186.85	0.27	1280.87	276.13	0.0021	0.00610	0.0012	0.03
CV %	4.2%	90.4%	4.4%	85.2%	91.1%	0.2%	18.5%	20.0%	14.5%

Synthèse

		Signal 1 (+ intense)	Signal 2 (- intense)
Spécificité	Variabilité du bruit de fond (CV %)	65.8%	73.5%
	Absence d' interférences		
Linéarité	Coefficient de détermination (R ²)	0.9881	0.9880
	Pente (a)	0.0010	0.0002
	Ordonnée Origine (b)	0.0024	0.0009
Répétabilité	Signal (CV %)	18.5%	20.0%
	TR (CV %)		0.2%
	Ratio (CV %)		14.5%
Justesse	Conc. Ajouts (LMR) ppb	30.00	
	Conc. Estimée ppb	30.41	25.60
	Ecart (%)	1.4%	-14.7%
Limites	CC _α ppb	40.36	35.44

- Marbofloxacin

Echantillons Blancs

Essai	Etalon Interne		Analyte (bruit de fond)			
	TR (min)	Amplitude Signal	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
1	6.88	3.11E+03	1.33E+00	1.33E+00	0.000	0.000
2	6.83	1.71E+03	2.67E+00	1.33E+00	0.002	0.001
3	6.82	4.41E+03	1.33E+00	1.33E+00	0.000	0.000
4	6.88	4.04E+03	4.50E+00	1.33E+00	0.001	0.000
5	6.82	2.34E+03	1.97E+00	1.33E+00	0.001	0.001
6	6.81	2.80E+03	5.33E+00	4.00E+00	0.002	0.001
7	6.8	2.13E+03	2.50E+00	1.33E+00	0.001	0.001
8	6.84	2.44E+03	5.33E+00	2.67E+00	0.002	0.001
9	6.8	2.46E+03	2.67E+00	4.00E+00	0.001	0.002
10	6.8	2.77E+03	4.00E+00	1.33E+00	0.001	0.000
11	6.8	3.99E+03	4.58E+00	4.00E+00	0.001	0.001
12	6.82	3.33E+03	2.67E+00	2.67E+00	0.001	0.001
13	6.82	3.82E+03	2.18E+00	4.00E+00	0.001	0.001
14	6.8	2.53E+03	1.33E+00	1.33E+00	0.001	0.001
15	6.82	3.58E+03	4.00E+00	1.33E+00	0.001	0.000
16	6.8	2.81E+03	3.50E+00	5.33E+00	0.001	0.002
17	6.8	4.54E+03	4.00E+00	2.67E+00	0.001	0.001
18	6.78	1.48E+03	1.33E+00	1.33E+00	0.001	0.001
19	6.77	1.58E+03	4.00E+00	2.67E+00	0.003	0.002
20	6.74	2.04E+03	4.00E+00	1.07E+01	0.002	0.005
Moyenne	6.81	2895.50	3.16	2.80	0.00	0.00
Ecart-Type	0.03	928.86	1.33	2.25	0.00	0.00
CV %	0.5%	32.1%	42.2%	80.4%	50.3%	100.2%

Courbes d'Etalonnage

Concentration	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
0	6.81	2.90E+03	-	3.1E+00	2.80E+00	-	0.001	0.001	-
37.5	5.93	2.77E+04	5.95	6.03E+02	8.14E+01	1.003	0.022	0.003	0.135
75	5.89	6.31E+04	5.93	2.61E+03	3.94E+02	1.007	0.041	0.006	0.151
150	5.9	3.60E+04	5.93	2.76E+03	4.59E+02	1.005	0.077	0.013	0.166
225	5.92	2.85E+04	5.95	3.68E+03	4.96E+02	1.005	0.129	0.017	0.135
moyenne						1.006			0.151
a							0.0006	0.0001	
b							-0.0002	0.0007	
R ²							0.9937	0.9940	

Essai	Analyte				
	Tr relatif	conformité du TR Relatif	ratio	conformité du ratio	Identification
1	1.007	conforme	0.161	conforme	identifié
2	1.000	conforme	0.113	conforme	identifié
3	1.000	conforme	0.104	non conforme	non identifié
4	1.000	conforme	0.122	conforme	identifié
5	1.007	conforme	0.146	conforme	identifié
6	1.007	conforme	0.157	conforme	identifié
7	1.003	conforme	0.150	conforme	identifié
8	1.000	conforme	0.111	conforme	identifié
9	1.005	conforme	0.150	conforme	identifié
10	1.000	conforme	0.140	conforme	identifié
11	1.005	conforme	0.176	conforme	identifié
12	1.000	conforme	0.188	conforme	identifié
13	1.000	conforme	0.190	conforme	identifié
14	1.009	conforme	0.166	conforme	identifié
15	1.013	conforme	0.176	conforme	identifié
16	1.005	conforme	0.166	conforme	identifié
17	1.000	conforme	0.153	conforme	identifié
18	1.009	conforme	0.190	conforme	identifié
19	1.006	conforme	0.188	conforme	identifié
20	1.007	conforme	0.152	conforme	identifié
moyenne	1.004		0.153		
écart-type	0.003		0.025		
CV %	0.34%		16.39%		

*Conformité du temps de rétention relatif et de rations des 19 supplémentés sur 20 équivalent LMR.

Echantillons Supplémentés

Essai	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
1	5.89	6.90E+04	5.93	5.24E+03	8.44E+02	1.007	0.076	0.012	0.161
2	5.95	6.05E+04	5.95	4.50E+03	5.07E+02	1.000	0.074	0.008	0.113
3	5.95	1.22E+05	5.95	1.07E+04	1.11E+03	1.000	0.088	0.009	0.104
4	5.95	9.40E+04	5.95	7.49E+03	9.17E+02	1.000	0.080	0.010	0.122
5	5.9	4.31E+04	5.94	3.47E+03	5.06E+02	1.007	0.081	0.012	0.146
6	5.9	4.55E+04	5.94	5.33E+03	8.35E+02	1.007	0.117	0.018	0.157
7	5.93	4.93E+04	5.95	4.25E+03	6.38E+02	1.003	0.086	0.013	0.150
8	5.95	1.20E+05	5.95	1.03E+04	1.14E+03	1.000	0.086	0.010	0.111
9	5.88	6.68E+04	5.91	5.28E+03	7.93E+02	1.005	0.079	0.012	0.150
10	5.95	6.87E+04	5.95	5.52E+03	7.75E+02	1.000	0.080	0.011	0.140
11	5.89	4.23E+04	5.92	3.12E+03	5.50E+02	1.005	0.074	0.013	0.176
12	6.47	9.30E+03	6.47	4.78E+02	9.01E+01	1.000	0.051	0.010	0.188
13	6.47	8.14E+03	6.47	4.49E+02	8.53E+01	1.000	0.055	0.010	0.190
14	6.42	6.21E+03	6.48	3.55E+02	5.89E+01	1.009	0.057	0.009	0.166
15	6.39	8.44E+03	6.47	4.88E+02	8.59E+01	1.013	0.058	0.010	0.176
16	5.9	3.60E+04	5.93	2.76E+03	4.59E+02	1.005	0.077	0.013	0.166
17	5.95	6.80E+04	5.95	4.86E+03	7.44E+02	1.000	0.071	0.011	0.153
18	6.43	8.16E+03	6.49	4.99E+02	9.46E+01	1.009	0.061	0.012	0.190
19	6.43	5.06E+03	6.47	3.19E+02	6.00E+01	1.006	0.063	0.012	0.188
20	5.91	9.26E+04	5.95	6.23E+03	9.48E+02	1.007	0.067	0.010	0.152
Moyenne	6.08	51155.50	6.10	4081.90	562.04	1.00	0.07	0.01	0.15
Ecart-Type	0.24	37263.37	0.25	3153.45	371.21	0.00	0.0149	0.002	0.03
CV %	4.0%	72.8%	4.1%	77.3%	66.0%	0.4%	20.2%	19.0%	17.3%

Synthèse

		Signal 1 (+ intense)	Signal 2 (- intense)
Spécificité	Variabilité du bruit de fond (CV %)	42.2%	80.4%
	Absence d'interférences		
Linéarité	Coefficient de détermination (R ²)	0.9937	0.9940
	Pente (a)	0.0006	0.0001
	Ordonnée Origine (b)	0.0012	0.0011
Répétabilité	Signal (CV %)	20.2%	19.0%
	TR (CV %)		0.4%
	Ratio (CV %)		17.3%
Justesse	Conc. Ajouts (LMR)	ppb	150.00
	Conc. Estimée	ppb	131.14
	Ecart (%)		-12.6%
Limites	CC _α	ppb	175.20
			181.23

- Flumequine

Echantillons Blancs

Essai	Etalon Interne		Analyte (bruit de fond)			
	TR (min)	Amplitude Signal	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
1	6.88	3.11E+03	1.33E+00	1.45E+01	0.000	0.005
2	6.83	1.71E+03	2.67E+00	6.94E+00	0.002	0.004
3	6.82	4.41E+03	6.67E+00	1.16E+01	0.002	0.003
4	6.88	4.04E+03	0.00E+00	9.67E+00	0.000	0.002
5	6.82	2.34E+03	1.33E+00	1.42E+01	0.001	0.006
6	6.81	2.80E+03	5.33E+00	6.54E+01	0.002	0.023
7	6.8	2.13E+03	1.33E+00	8.33E+00	0.001	0.004
8	6.84	2.44E+03	2.67E+00	8.11E+00	0.001	0.003
9	6.8	2.46E+03	4.00E+00	1.51E+02	0.002	0.061
10	6.8	2.77E+03	4.00E+00	1.16E+01	0.001	0.004
11	6.8	3.99E+03	2.67E+00	7.17E+00	0.001	0.002
12	6.82	3.33E+03	6.67E+00	1.30E+01	0.002	0.004
13	6.82	3.82E+03	5.33E+00	9.77E+00	0.001	0.003
14	6.8	2.53E+03	2.67E+00	1.13E+01	0.001	0.004
15	6.82	3.58E+03	1.33E+00	8.17E+00	0.000	0.002
16	6.8	2.81E+03	4.67E+01	1.36E+01	0.017	0.005
17	6.8	4.54E+03	8.00E+00	9.33E+00	0.002	0.002
18	6.78	1.48E+03	6.67E+00	1.35E+01	0.005	0.009
19	6.77	1.58E+03	2.67E+00	5.50E+00	0.002	0.003
20	6.74	2.04E+03	2.67E+00	8.17E+00	0.001	0.004
Moyenne	6.81	2895.50	5.74	20.04	0.002	0.01
Ecart-Type	0.03	928.86	9.89	33.30	0.004	0.01
CV %	0.5%	32.1%	172.5%	166.1%	168.0%	174.2%

Courbes d'Etalonnage

Concentration	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
0	6.81	2.90E+03	-	5.74E+00	2.00E+01	-	0.002	0.008	-
125	5.9	5.74E+04	9.51	5.30E+04	1.89E+04	1.612	0.923	0.329	0.357
250	5.88	5.20E+04	9.52	1.05E+05	3.92E+04	1.619	2.019	0.754	0.373
500	5.95	1.20E+05	9.52	3.88E+05	1.44E+05	1.600	3.233	1.200	0.371
750	5.93	7.48E+04	9.53	4.22E+05	1.57E+05	1.607	5.642	2.099	0.372
moyenne						1.609			0.372
a							0.0072	0.0027	
b							0.0089	0.0019	
R ²							0.9877	0.9871	

Essai	Analyte				
	Tr relatif	conformité du TR Relatif	ratio	conformité du ratio	Identification
1	1.561	conforme	0.380	conforme	identifié
2	1.568	conforme	0.355	conforme	identifié
3	1.561	conforme	0.384	conforme	identifié
4	1.561	conforme	0.373	conforme	identifié
5	1.561	conforme	0.375	conforme	identifié
6	1.555	conforme	0.397	conforme	identifié
7	1.558	conforme	0.378	conforme	identifié
8	1.607	conforme	0.356	conforme	identifié
9	1.600	conforme	0.362	conforme	identifié
10	1.614	conforme	0.440	conforme	identifié
11	1.598	conforme	0.366	conforme	identifié
12	1.616	conforme	0.428	conforme	identifié
13	1.600	conforme	0.379	conforme	identifié
14	1.605	conforme	0.343	conforme	identifié
15	1.613	conforme	0.347	conforme	identifié
16	1.558	conforme	0.422	conforme	identifié
17	1.571	conforme	0.374	conforme	identifié
18	1.617	conforme	0.365	conforme	identifié
19	1.608	conforme	0.351	conforme	identifié
20	1.606	conforme	0.391	conforme	identifié
moyenne	1.584		0.377		
écart-type	0.023		0.026		
CV %	1.44%		6.97%		

*Conformité du temps de rétention relatif et de ration des 20 supplémentés équivalent LMR.

Echantillons Supplémentés

Essai	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
1	6.47	8.27E+03	10.1	8.01E+03	3.04E+03	1.561	0.969	0.368	0.380
2	6.44	6.08E+03	10.1	5.95E+03	2.11E+03	1.568	0.979	0.347	0.355
3	6.47	1.03E+04	10.1	1.06E+04	4.07E+03	1.561	1.029	0.395	0.384
4	6.47	7.19E+03	10.1	7.47E+03	2.79E+03	1.561	1.039	0.388	0.373
5	6.47	7.91E+03	10.1	8.08E+03	3.03E+03	1.561	1.021	0.383	0.375
6	6.43	3.97E+03	10	3.78E+03	1.50E+03	1.555	0.952	0.378	0.397
7	6.42	5.33E+03	10	5.45E+03	2.06E+03	1.558	1.023	0.386	0.378
8	5.93	1.22E+05	9.53	1.24E+05	4.42E+04	1.607	1.016	0.362	0.356
9	5.95	9.59E+04	9.52	8.82E+04	3.19E+04	1.600	0.920	0.333	0.362
10	5.9	4.31E+04	9.52	6.23E+04	2.74E+04	1.614	1.445	0.636	0.440
11	5.95	6.05E+04	9.51	6.34E+04	2.32E+04	1.598	1.048	0.383	0.366
12	5.89	6.90E+04	9.52	7.39E+04	3.16E+04	1.616	1.071	0.458	0.428
13	5.95	9.40E+04	9.52	1.03E+05	3.90E+04	1.600	1.096	0.415	0.379
14	5.93	4.89E+04	9.52	6.06E+04	2.08E+04	1.605	1.239	0.425	0.343
15	5.91	9.26E+04	9.53	1.23E+05	4.27E+04	1.613	1.328	0.461	0.347
16	6.42	6.21E+03	10	6.00E+03	2.53E+03	1.558	0.966	0.407	0.422
17	6.43	8.16E+03	10.1	8.76E+03	3.28E+03	1.571	1.074	0.402	0.374
18	5.88	4.96E+04	9.51	8.06E+04	2.94E+04	1.617	1.625	0.593	0.365
19	5.92	4.23E+04	9.52	7.43E+04	2.61E+04	1.608	1.757	0.617	0.351
20	5.92	6.03E+04	9.51	9.96E+04	3.89E+04	1.606	1.652	0.645	0.391
Moyenne	6.16	42081.00	9.77	50850.00	18980.50	1.59	1.16	0.44	0.38
Ecart-Type	0.27	37770.78	0.28	43913.77	16157.46	0.024	0.258	0.100	0.026
CV %	4.4%	89.8%	2.9%	86.4%	85.1%	1.5%	22.2%	22.7%	7.0%

Synthèse

		Signal 1 (+ intense)	Signal 2 (- intense)
Spécificité	Variabilité du bruit de fond (CV %)	172.5%	166.1%
	Absence d' interférences		
Linéarité	Coefficient de détermination (R ²)	0.9877	0.9871
	Pente (a)	0.0072	0.0027
	Ordonnée Origine (b)	0.0021	0.0077
Répétabilité	Signal (CV %)	22.2%	22.7%
	TR (CV %)		1.5%
	Ratio (CV %)		7.0%
Justesse	Conc. Ajouts (LMR) ppb	200.00	
	Conc. Estimée ppb	160.12	160.05
	Ecart (%)	-19.9%	-20.0%
Limites	CC _α ppb	218.42	220.65

- Sarafloxacine

Echantillons Blancs

Essai	Etalon Interne		Analyte (bruit de fond)			
	TR (min)	Amplitude Signal	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif
1	6.88	3.11E+03	4.01E+00	1.33E+00	0.00129	0.00043
2	6.83	1.71E+03	7.89E+00	0.00E+00	0.00461	0.00000
3	6.82	4.41E+03	5.33E+00	1.33E+00	0.00121	0.00030
4	6.88	4.04E+03	0.00E+00	0.00E+00	0.00000	0.00000
5	6.82	2.34E+03	9.33E+00	0.00E+00	0.00399	0.00000
6	6.81	2.80E+03	1.33E+00	0.00E+00	0.00048	0.00000
7	6.8	2.13E+03	1.33E+00	0.00E+00	0.00062	0.00000
8	6.84	2.44E+03	0.00E+00	0.00E+00	0.00000	0.00000
9	6.8	2.46E+03	6.67E+00	0.00E+00	0.00271	0.00000
10	6.8	2.77E+03	4.00E+00	0.00E+00	0.00144	0.00000
11	6.8	3.99E+03	1.33E+00	0.00E+00	0.00033	0.00000
12	6.82	3.33E+03	1.33E+00	1.33E+00	0.00040	0.00040
13	6.82	3.82E+03	1.33E+00	0.00E+00	0.00035	0.00000
14	6.8	2.53E+03	1.33E+00	0.00E+00	0.00053	0.00000
15	6.82	3.58E+03	1.33E+00	0.00E+00	0.00037	0.00000
16	6.8	2.81E+03	1.33E+00	1.33E+00	0.00047	0.00047
17	6.8	4.54E+03	4.00E+00	0.00E+00	0.00088	0.00000
18	6.78	1.48E+03	1.33E+00	0.00E+00	0.00090	0.00000
19	6.77	1.58E+03	4.00E+00	0.00E+00	0.00253	0.00000
20	6.74	2.04E+03	0.00E+00	1.33E+00	0.00000	0.00065
Moyenne	6.81	2895.50	2.86	0.33	0.0012	0.0001
Ecart-Type	0.03	928.86	2.70	0.59	0.0013	0.0002
CV %	0.5%	32.1%	94.4%	177.7%	113.4%	185.3%

Courbes d'Etalonnage

Concentration	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
0	6.81	2.90E+03	-	2.86E+00	3.33E-01	-	0.001	0.000	-
15	6.47	1.01E+04	7.32	9.83E+01	2.83E+00	1.131	0.010	0.000	0.029
30	6.47	9.18E+03	7.32	1.69E+02	6.11E+00	1.131	0.018	0.001	0.036
45	6.39	7.45E+03	7.31	2.01E+02	7.00E+00	1.144	0.027	0.001	0.035
moyenne						1.138			0.035
a							0.0006	0.000019	
b							0.0011	0.0001	
R ²							1.0000	0.9803	

Essai	Analyte				
	Tr relatif	conformité du TR Relatif	ratio	conformité du ratio	Identification
1	1.140	conforme	0.047	conforme	identifié
2	1.131	conforme	0.036	conforme	identifié
3	1.137	conforme	0.044	conforme	identifié
4	1.163	conforme	0.039	conforme	identifié
5	1.161	conforme	0.044	conforme	identifié
6	1.167	conforme	0.039	conforme	identifié
7	1.129	conforme	0.054	conforme	identifié
8	1.130	conforme	0.051	conforme	identifié
9	1.138	conforme	0.053	conforme	identifié
10	1.146	conforme	0.030	conforme	identifié
11	1.144	conforme	0.031	conforme	identifié
12	1.160	conforme	0.034	conforme	identifié
13	1.165	conforme	0.040	conforme	identifié
14	1.164	conforme	0.034	conforme	identifié
15	1.161	conforme	0.038	conforme	identifié
16	1.163	conforme	0.049	conforme	identifié
17	1.161	conforme	0.050	conforme	identifié
18	1.161	conforme	0.039	conforme	identifié
19	1.159	conforme	0.047	conforme	identifié
20	1.155	conforme	0.049	conforme	identifié
moyenne	1.151		0.043		
écart-type	0.014		0.008		
CV %	1.19%		18.36%		

*Conformité du temps de rétention relatif et de ration des 20 supplémentés équivalent LMR.

Echantillons Supplémentés

Essai	Etalon Interne		Analyte						
	TR (min)	Amplitude Signal	TR (min)	Amplitude Signal 1 (+ intense)	Amplitude Signal 2 (- intense)	TR Relatif	Amplitude Signal 1 Relatif	Amplitude Signal 2 Relatif	Ratio
1	6.44	6.66E+03	7.34	1.31E+02	6.10E+00	1.140	0.020	0.0009	0.047
2	6.47	9.18E+03	7.32	1.69E+02	6.11E+00	1.131	0.018	0.0007	0.036
3	6.43	5.06E+03	7.31	9.58E+01	4.23E+00	1.137	0.019	0.0008	0.044
4	5.88	4.97E+04	6.84	9.62E+02	3.75E+01	1.163	0.019	0.0008	0.039
5	5.9	4.55E+04	6.85	8.51E+02	3.71E+01	1.161	0.019	0.0008	0.044
6	5.92	4.23E+04	6.91	8.10E+02	3.14E+01	1.167	0.019	0.0007	0.039
7	6.49	1.22E+04	7.33	2.02E+02	1.10E+01	1.129	0.017	0.0009	0.054
8	6.47	9.30E+03	7.31	1.60E+02	8.09E+00	1.130	0.017	0.0009	0.051
9	6.43	8.16E+03	7.32	1.53E+02	8.08E+00	1.138	0.019	0.0010	0.053
10	6.39	8.44E+03	7.32	1.48E+02	4.50E+00	1.146	0.018	0.0005	0.030
11	6.41	1.27E+04	7.33	1.96E+02	6.00E+00	1.144	0.015	0.0005	0.031
12	5.93	4.93E+04	6.88	6.86E+02	2.33E+01	1.160	0.014	0.0005	0.034
13	5.93	1.22E+05	6.91	1.72E+03	6.94E+01	1.165	0.014	0.0006	0.040
14	5.91	9.26E+04	6.88	1.31E+03	4.41E+01	1.164	0.014	0.0005	0.034
15	5.9	3.60E+04	6.85	5.78E+02	2.22E+01	1.161	0.016	0.0006	0.038
16	5.89	6.90E+04	6.85	9.91E+02	4.88E+01	1.163	0.014	0.0007	0.049
17	5.9	4.31E+04	6.85	6.06E+02	3.02E+01	1.161	0.014	0.0007	0.050
18	5.95	1.20E+05	6.91	1.76E+03	6.80E+01	1.161	0.015	0.0006	0.039
19	5.92	6.03E+04	6.86	1.02E+03	4.79E+01	1.159	0.017	0.0008	0.047
20	5.93	2.96E+04	6.85	4.22E+02	2.06E+01	1.155	0.014	0.0007	0.049
Moyenne	6.12	41555.00	7.05	648.54	26.73	1.1518	0.0166	0.0007	0.04
Ecart-Type	0.27	36417.21	0.23	525.32	20.92	0.0133	0.0021	0.0002	0.01
CV %	4.4%	87.6%	3.2%	81.0%	78.2%	1.2%	12.7%	22.3%	17.4 %

Synthèse

		Signal 1 (+ intense)	Signal 2 (- intense)
Spécificité	Variabilité du bruit de fond (CV %)	94.4%	177.7%
	Absence d' interférences		
Linéarité	Coefficient de détermination (R ²)	1.0000	0.9803
	Pente (a)	0.0006	0.0000
	Ordonnée Origine (b)	0.0012	0.0001
Répétabilité	Signal (CV %)	12.7%	22.3%
	TR (CV %)		1.2%
	Ratio (CV %)		17.4%
Justesse	Conc. Ajouts (LMR) ppb	30.00	
	Conc. Estimée ppb	26.91	30.99
	Ecart (%)	-10.3%	3.3%
Limites	CC _α ppb	32.93	44.49