ORDRE DE SERVICE

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE,
DE L'ALIMENTATION, DE LA PECHE ET DES AFFAIRES RURALES

Direction générale de l'alimentation **Sous-direction de la santé et de la protection animales** **Bureau de la pharmacie vétérinaire et de l'alimentation animale** **Sous-direction de la réglementation, de la recherche et de la coordination des contrôles** **Bureau de la recherche et des laboratoires d'analyses** Adresse : 251, rue de Vaugirard 75 732 PARIS CEDEX 15 Dossier suivi par : Lilian Puech Tél. : 01 49 55 47 78 Réf. interne :	**NOTE DE SERVICE** **DGAL/SDSPA/SDRRCC/N2003-8143** **Date : 13 AOÛT 2003** Classement :

Date de mise en application : immédiate
Abroge et remplace :
Date limite de réponse :
Nombre d'annexes : 1
Degré et période de confidentialité :

Objet : Méthode de détection des résidus de nitrofuranes dans les tissus animaux.

MOTS-CLES : résidus – nitrofuranes – tissus – méthode d'analyse

Résumé : La présente note de service référence la méthode d'analyse officielle de détection des nitrofuranes dans les tissus animaux.

Destinataires	
Pour exécution : - Directeurs départementaux des services vétérinaires - Laboratoires vétérinaires départementaux - Laboratoire vétérinaire de Rungis	Pour information : - Préfets - Inspecteurs généraux de la santé publique vétérinaire - Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires - Directeurs des Ecoles nationales vétérinaires - Directeur de l'Ecole nationale des services vétérinaires - Directeur de l'INFOMA - Directeur général de l'AFSSA - LERMVD, AFSSA site de Fougères

J’ai l’honneur de vous faire parvenir les références des méthodes d’analyse officielle de détection des nitrofuranes dans les tissus animaux, référencée LMV/03/02 version 1.

Cette méthode a été développée par le laboratoire national de référence pour le contrôle des médicaments vétérinaires (Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Laboratoire d’études et de recherche sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants –AFSSA LERMVD, site de Fougères).

L’adjoint au Directeur Général
Jean-Jacques RENAULT

ANNEXE : DETERMINATION DE RESIDUS DE NITROFURANES (METABOLITES) DANS LES TISSUS PAR LC/SM/SM

Responsable : Dominique Hurtaud-Pessel
Jérôme Blot
Pierrick Couëdor

Mars 2003

Laboratoire d'études et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants AFSSA
B.P.90203 - 35302 FOUGERES Cedex
La Haute-Marche - JAVENE - 35133 FOUGERES (France)

Tél : 02 99 94 78 78
Fax : 02 99 94 78 80

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS DE SECURITE

Les solvants organiques et les standards doivent être manipulés sous une hotte ventilée.
Les nitrofuranes étant photo-sensibles, il convient de prendre toutes les précautions nécessaires durant la préparation et l' analyse pour protéger les échantillons et les extraits de la lumière du jour.

0 - INTRODUCTION

Les nitrofuranes (furazolidone, nitrofurantoïne, furaltadone et nitrofurazone) ont été classés en Annexe IV du règlement CEE 2377/90. Aucun résidu de ces molécules ne doit être présent dans les denrées d'origine animale. Leur détection sous forme de molécule parente est quasiment impossible car ces molécules se métabolisent très rapidement. In vivo, ils sont alors présents sous la forme de résidus liés aux protéines. Ces résidus liés sont persistants dans l'organisme et peuvent donc être détectés après rupture de la liaison avec les protéines. Les résidus marqueurs alors identifiés sont :

- le 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) pour la furazolidone
- le 1-aminohydantoïne (AHD) pour la nitrofurantoïne
- le semicarbazide (SEM) pour la nitrofurazone
- le 3-amino-5morpholinomethyl-1,3-oxazolidin-2-one (AMOZ) pour la furaltadone.
-

Ces résidus marqueurs sont détectés par CL/SM-SM sous la forme de dérivés nitrophényl.

PS : La méthode décrite ici est issue des travaux d'un programme de recherches européen : Project QLK1-CT-1999-00142 Foodbrand (« Bound Residues and Nitrofuran Detection ». Coordinateur : G. Kennedy).

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode permet de déterminer la présence de résidus de AOZ, AMOZ, AHD et SEM dans les matrices biologiques (muscles, abats, boyaux, produits d'aquaculture …) par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL/SM/SM). Au cours de l'extraction, les métabolites sont dérivés en leurs analogues nitrophényl avec le 2-nitrobenzaldéhyde. En effet, les dérivés nitrophényl permettent d'améliorer la détection en SM/SM (fragmentation plus spécifique, augmentation de la sensibilité). Leur détection est réalisée en mode positif par couplage avec l'interface ESI. Le AOZ-D4 et le AMOZ-D5 sont utilisés comme standard interne pour le dosage. La confirmation est possible à un niveau de concentration ≤ 0.5 µg/kg.

2 - PRINCIPE

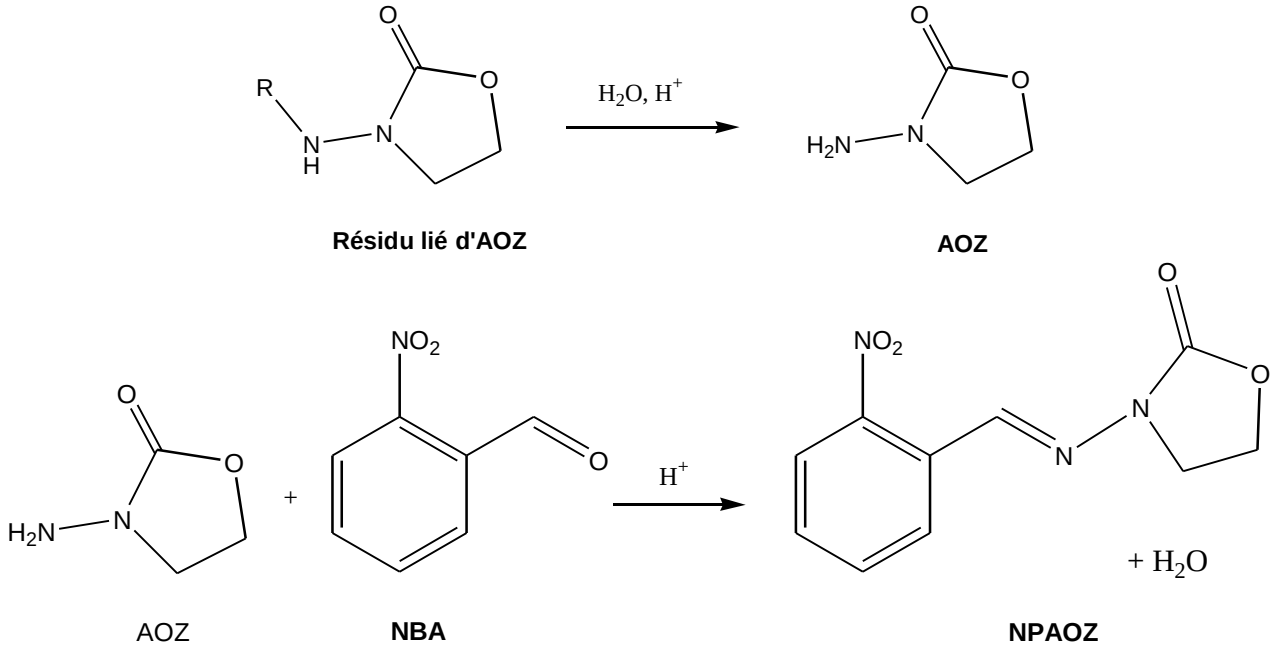
2.1. Extraction des métabolites des tissus et dérivation simultanée en milieu acide avec le 2-nitrobenzaldéhyde.

2.2. Extraction des dérivés produits : NPAOZ, NPAHD, NPAMOZ et NPSEM par l'acétate d'éthyle.

2.3. Evaporation à sec.

2.4. Injection dans le système CL/SM/SM.

Schéma : Réactions d'obtention du dérivé nitrophényl NPAOZ.



3 - REACTIFS ET PRODUITS

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente. Tous les solvants doivent être de pureté analytique. Les références sont données à titre indicatif.

3.1. Réactifs chimiques commercialisés

3.1.1. Méthanol (Fischer A4841822, n° CAS 67-56-1)
3.1.2. Acétonitrile (Fischer A10626/17, n° CAS 75-05-8)
3.1.3. Soude (Prolabo 28226.293, n° CAS 1310-73-2)
3.1.4. 2-nitrobenzaldehyde (Fluka 72780)
3.1.5. Acide chlorhydrique (Merck 1.00317.1000)
3.1.6. Acétate d'ammonium (Merck 1.01116.0500)
3.1.7. di-potassium hydrogen phosphate anhydre (Prolabo 26927.292)
3.1.8. Acide acétique (Merck 1.00062)
3.1.9. Acétate d'éthyle (Fisher E/0900/17)

3.2. Solutions

3.2.1. 50mM 2-nitrobenzaldéhyde dans le méthanol (solution 2-NBA)

Peser 189 ± 1 mg de nitrobenzaldéhyde dans une fiole ambrée et compléter à 25 ml avec du méthanol.

3.2.2. 0,1 M di-potassium hydrogeno phosphate

Peser 8,71 g de di-potassium hydrogeno phosphate (anhydre) dans une fiole de 500 ml. Ajouter de l'eau et compléter à 500 ml.

3.2.3. 0,5 mM acétate d'ammonium

Peser 3,8 ± 0,1 g d'acétate d'ammonium dans une fiole de 100 ml. Dissoudre avec de l'eau et compléter à 100 ml. Puis prélever 1 ml de cette solution (d'acétate d'ammonium à 0,5 M) dans une fiole de 1 litre et ajuster le volume avec de l'eau.

3.2.4. Acide acétique 0,01 %.

Pipetter 1 ml d'acide acétique dans une fiole de 100 ml et ajuster le volume avec de l'eau. Puis prélever 500 µl de cette solution (d'acide acétique à 1 %) dans une fiole de 50 ml et ajuster le volume avec de l'eau.

3.2.5. Soude 1 M.

Peser 4 g de pastille de soude dans un bécher et dissoudre dans 50 ml d'eau. Transvaser dans une fiole de 100 ml et compléter le volume avec de l'eau.

3.3. Standards

3.3.1. 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) (CSS, Northern Ireland))
3.3.2. D4-3-amino-2-oxazolidinone (D4-AOZ) (CSS, Northern Ireland)
3.3.3. 1-aminohydantoin hydrochloride (AHD.HCl) (Sigma)
3.3.4. 3-amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidin-2-one (AMOZ) (Witega, Germany)
3.3.5. D5-3-amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidin-2-one (D5-AMOZ) (Witega, Germany)
3.3.6. Semicarbazide hydrochloride (SEM.HCl) (Sigma)

3.4. Préparation des solutions standards

Solutions mères (stockées à 4°C indéfiniment)

AOZ 1 mg/ml dans MeOH (SM 1000 ppm)
Peser la quantité appropriée dans une fiole ambrée de 25 ml, dissoudre et ajuster avec du méthanol.
AMOZ 1 mg/ml dans MeOH (SM 1000 ppm)
Peser la quantité appropriée dans une fiole ambrée de 25 ml, dissoudre et ajuster avec du méthanol.
AHD 1 mg/ml dans MeOH (SM 1000 ppm)
Peser la quantité appropriée dans une fiole ambrée de 25 ml, dissoudre et ajuster avec du méthanol.
SEM 1 mg/ml dans MeOH (SM 1000 ppm)
Peser la quantité appropriée dans une fiole ambrée de 25 ml, dissoudre et ajuster avec du méthanol.

Solutions mères deutérées = Standards internes (stockées à 4°C indéfiniment)

D4-AOZ 100 µg/ml (SM 100 ppm)
Peser 10 ± 0,1 mg dans une fiole ambrée de 100 ml, dissoudre et ajuster avec du méthanol.
D5-AMOZ 100 µg/ml (SM 100 ppm)
Peser 10 ± 0,1 mg dans une fiole ambrée de 100 ml, dissoudre et ajuster avec du méthanol.

Solutions filles de standards internes deutérées

	Solutions intermédiaires à 1µg/ml MeOH (SF 1ppm)	**Solution de travail (SI D4/D5 0,1 ppm)**
D4-AOZ	1 ml de SM 100 / fiole de 100 ml	1 ml de SF 1 D4-AOZ + 1 ml de SF 1 D5-AMOZ dans une fiole de 10 ml
D5-AMOZ	1 ml de SM 100 / fiole de 100 ml	
	Préparer tous les 6 mois	Préparer toutes les semaines

Solutions intermédiaires et solutions filles

		SF 0,1 ppm AOZ,AMOZ,AHD,SEM (100 ng/ml dans MeOH)	**SF 0,01 ppm AOZ,AMOZ,AHD,SEM** (Solution de supplémentation : 10 ng/ml dans MeOH)
AOZ AMOZ AHD SEM	1 ml SM1000-AOZ + 1 ml SM1000-AMOZ + 1 ml SM1000-AHD + 1 ml SM1000-SEM dans une fiole de 100 ml	0,5 ml de SF10 dans une fiole de 50 ml	1 ml SF0,1 dans une fiole de 10 ml
	Préparer tous les 6 mois	Préparer tous les 3 mois	Préparer toutes les semaines

3.5. Gaz

3.5.1. Argon (Air liquide).

3.5.2. Azote produit par un générateur d'azote (Whatman).

4. APPAREILLAGE

Les références sont données à titre indicatif. Tout matériel équivalent peut être utilisé.

4.1. Matériel de laboratoire (supplémentation et extraction)

4.1.1. Tubes à centrifuger 50 ml (avec bouchon).

4.1.2. Tubes en plastique de 12 ml.

4.1.3. Fioles jaugées 500 ml, 100 ml, 20 ml, 10 ml et 5 ml.

4.1.4. Cuve à ultrasons.

4.1.5. Pipettes automatiques volume 5-100 µl, volume 10-250 µl, volume 100-1000 µl.

4.1.6. Cônes P1000 et P200 (Biohit).

4.1.7. Agitateur (type Vortex).

4.1.8. Agitateur type Rheax II (Heidolph).

4.1.9. Centrifugeuse type MR 18.22 (Jouan).

4.1.10. Centrifugeuse type MR 23i (Jouan).

4.1.11. Tubes Eppendorf à fond conique de 1,5 ml.

4.1.12. Système d'évaporation chauffant sous azote (Toulemonde).

4.1.13. Broyeur (Moulinex).

4.1.14. Seringues en plastique de 1ml (Terumo).

4.1.15. Filtres de 0,45 µm, diamètre 13 mm, PVDF Millex-HV (Millipore).

4.1.16. Microvial de 300 µl en polypropylène.

4.1.17. Pipettes Pasteur.

4.1.18. Bandelette pH.

4.2. Appareillage chromatographique

4.2.1. Pompe HPLC : Hewlett Packard type 1100

4.2.2. Injecteur automatique : Hewlett Packard type 1100

4.2.3. Dégazeur à membrane : Hewlett Packard type 1100

4.2.4. Colonne type Luna Phenomenex C18, 3 µm (150 * 2 mm), Précolonne Symmetry C18, 3,5 µm (2,1 x 10 mm)

4.3. Appareillage de spectrométrie de masse

4.3.1. Spectromètre de masse en tandem de type quadripolaire : Micromass QUATTRO LCZ.

4.3.2. Interface : Electrospray.

4.3.3. Imprimante.

5. ECHANTILLONS

5.1. Les échantillons à analyser doivent être stockés au congélateur (≤ -16°C)

6. MODE OPERATOIRE

6.1. Echantillons à confirmer

6.1.1. Décongeler le tissu à analyser et le broyer.
6.1.2. Peser 1 ± 0,1 g de tissu broyé dans un tube 50 ml.
6.1.3. Ajouter 50 µl de la solution de standard interne SI D4/D5 0,1 ppm.

6.2. Gamme d'échantillons supplémentés et blanc

6.2.1. Décongeler un tissu témoin ne contenant pas de nitrofuranes et le broyer.
6.2.2. Peser 1 ± 0,1 g de tissu broyé dans un tube de 50 ml.
6.2.3. Ajouter les volumes suivants :

Volume de S° à 10 ng/ml dans MeOH (SF0,01 ppmAOZ-AMOZ-SEM-AHD) µl	Volume de standard interne (SI D4/D5 0,1 ppm) µl	Concentration des supplémentés (µg/kg)
0	50	**0**
50	50	**0,5** AOZ-AMOZ-SEM-AHD
100	50	**1** AOZ-AMOZ-SEM-AHD
150	50	**1.5** AOZ-AMOZ-SEM-AHD
200	50	**2** AOZ-AMOZ-SEM-AHD

6.3. Standards dérivés

6.3.1. Dans un tube de 50 ml, rajouter les volumes suivants :

Volume de S° à 10 ng/ml dans MeOH (SF0,01 ppmAOZ-AMOZ-SEM-AHD) µl	Volume de standard interne (SI D4/D5 0,1 ppm) µl	Concentration Standard Equivalent µg/kg
200	100	**1** AOZ-AMOZ-SEM-AHD

6.4. Dérivation (standards et tissus)

6.4.1. Ajouter 4 ml d'eau, 0,5 ml de HCL 1M,et 150 µl de solution 2-NBA.
6.4.2. Boucher et agiter 10 sec au vortex
6.4.3. Protéger de la lumière et placer dans un bain à 37°C.
6.4.4. Laisser incuber environ 16 heures (1 nuit).

6.5. Extraction des dérivés NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD et NPSEM

6.5.1. Ajouter 5 ml de 0,1 M Di-potassium hydrogeno phosphate suivis de 0,12 ml de NaOH 1 M, agiter 15 s environ au vortex et contrôler le pH avec une bandelette.
6.5.2. Ajuster le pH à 7 ± 0,5 par addition supplémentaire de NaOH si nécessaire.
6.5.3. Ajouter 5 ml d'acétate d'éthyle et agiter à l'heidolph pendant 20 min à 100 trs/min.

6.5.4. Centrifuger pendant 5 min à 3000 g à 4°C.

6.5.5. Transférer le surnageant dans un tube en plastique de 10 ml.

6.5.6. Ré-extraire par 3 ml d'acétate d'éthyle et agiter à l'heidolph pendant 20 min à 100 trs/min.

6.5.7. Centrifuger pendant 10 min à 3000 g à 4°C.

6.5.8. Transférer le surnageant dans le même tube en plastique.

6.5.9. Evaporer à sec sous flux azote à 45°C. (résidus huileux)

6.6. Standards dérivés

6.6.1. Reprendre le résidu par 400 µl d'acide acétique 0,01 % et placer dans la cuve à ultra-sons pendant 1 minute environ.

6.6.2. Transférer dans un tube eppendorf et centrifuger à 19200 g pendant 5 minutes à 4°C.

6.7. Tissus

6.7.1. Aux tubes contenant les extraits de tissus dérivés, ajouter 400 µl d'acide acétique 0,01 % et placer dans la cuve à ultra-sons pendant 1 minute environ.

6.7.2. Transférer dans des tubes eppendorf et centrifuger à 19200 g pendant 20 minutes à 4°C.

6.7.3. Prélever le surnageant avec des seringues de 1 ml et filtrer sur des filtres 45 µm, diamètre 13.

6.7.4. Mettre dans des microvials pour l'injecteur (Attention à la présence de bulles au fond des vials).

6.8. Analyse CL/SM-SM.

6.8.1. Conditions chromatographiques :

6.8.1.1. Colonne type Luna Phenomenex C18 (2 x 150 mm) + précolonne Waters Symmetry C18 (2,1 x 10 mm)

6.8.1.2. phase mobile : Acétate d'ammonium 0,5mM / MeOH - gradient.

Temps (min)	Acétate d'ammonium 0,5mM	MeOH
0	76	24
5	40	60
11	40	60
11.50	76	24

6.8.1.3. Débit : 0,2 ml/min

6.8.1.4. Volume injecté : 25 µl.

6.8.1.5. Stop time = 20 min.

6.8.2. Conditions de détection (spectrométrie de masse) :

6.8.2.1. Interface : ESI en mode positive

6.8.2.2. Température de nébulisation : 350°C

6.8.2.3. Température du bloc source : 150°C

6.8.2.4. Débit du gaz de nébulisation : 80 lit/hr

6.8.2.5. Débit du gaz de désolvatation : 770 lit/hr

6.8.2.6. Pression du gaz dans la cellule de collision (Argon) : $2.2.10^{-3}$ mbar.

6.8.2.7. Capillaire : 3,2 kVolts

6.8.2.8. Détection en mode MRM :

2 transitions (ion parent -> ion fils) sont sélectionnées pour identifier chaque composé

	ion parent > ion fils	Dwell(sec)	Cone voltage	Col.Energy
NP-SEM	209,1 > 192	0,25	20	10
	209,1 > 166	0,25	20	10
NP-AOZ	236,1 > 134	0,25	25	15
	236,1 > 104	0,25	25	20
NP-D4AOZ	240,1 > 134	0,25	25	15
NP-AHD	249,1 > 134	0,25	25	15
	249,1 > 178	0,25	25	15
NP-AMOZ	335,1 > 262.1	0,25	20	20
	335,1 > 291.1	0,25	20	15
NP-D5AMOZ	340,1 > 296.1	0,25	20	20

6.8.3. Acquisition des résultats

6.8.3.1. La stratégie analytique est la suivante :

1. Extraction des échantillons à doser + extraction de 2 supplémentés (à 0,5 et à 1 µg/kg) et d'un blanc témoin + extraction de 1 standard dérivé.

2. Si l'échantillon est suspect : Extraction des échantillons à doser en double + extraction d'une gamme de supplémentés de 4 points (0,5 à 2 µg/kg) et d'un blanc témoin + extraction de 1 standard dérivé.

Dosage des échantillons par rapport à la gamme d'étalonnage d'échantillons extraits

6.8.3.2. L'ordre d'injection est le suivant :

- Standards dérivés
- Échantillon blanc témoin
- Echantillons supplémentés
- Injection eau/MeOH
- Échantillon(s) à analyser.
- Échantillon blanc témoin
- Echantillons supplémentés
- Standards dérivés

7. EXPRESSION DES RESULTATS

7.1. Vérification de la validité de l'analyse

7.1.1. Vérifier que l'échantillon blanc est exempt de toute contamination.
7.1.2. Vérifier que les pics chromatographiques pris en compte ont un rapport signal/bruit ≥ 3.

7.2. Détection - identification

La présence de AOZ, AMOZ, AHD et SEM dans un échantillon à analyser est confirmée si les critères suivants sont satisfaits :

- L'analyte dans l'échantillon doit éluer au temps de rétention correspondant à celui d'un standard supplémenté dans un muscle. (marge ± 2,5 %)
  - Les 2 transitions spécifiques à chaque composé doivent être présentes.
- Les abondances relatives des transitions ion parent - ion fils examinées dans l'échantillon doivent être les mêmes que celles obtenues dans un échantillon supplémenté avec la tolérance suivante :

Intensité relative (% pic de base)	LC-MS-MS
> 50 %	± 20 %
> 20-50%	± 25 %
> 10-20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

Chaque composé est identifié par son temps de rétention et les transitions spécifiques correspondantes. (voir tableau 6.8.2.8).

	ion parent > ion fils	Temps de rétention (min) de l'ordre de	Intensité relative de l'ordre de
NP-SEM	209,1 > 192 209,1 > 166	12,3	104 % 100 %
NP-AOZ	236,1 > 134 236,1 > 104	11,9	100 % 75 %
NP-D4AOZ	240,1 > 134	11,8	-
NP-AHD	249,1 > 134 249,1 > 178	11,7	100 % 35 %
NP-AMOZ	335,1 > 262,1 335,1 > 291,1	13,2	25 % 100 %
NP-D5AMOZ	340,1 > 296,1	13,1	-

7.3. Détermination de la concentration

Le dosage est réalisé à partir de la surface des transitions suivantes :

	transition	Standard interne
NP-SEM	209,1 > 166	NP-D4AOZ
NP-AOZ	236,1 > 134	NP-D4AOZ
NP-D4AOZ	240,1 > 134	-
NP-AHD	249,1 > 134	NP-D4AOZ
NP-AMOZ	335,1 > 291,1	NP-D5AMOZ
NP-D5AMOZ	340,1 > 296,1	-

7.3.1. Courbe d'étalonnage.

A partir de la gamme d'échantillons supplémentés, une courbe d'étalonnage d'équation y = ax + b est établie où y = rapport de la surface de l'analyte / surface du standard interne et x = concentration de l'échantillon supplémenté. Calculer a et b pour la molécule considérée

7.3.2.Calcul des concentrations

La concentration (en µg/kg) dans l'échantillon à doser est obtenue par la formule :

$$[Analyte] = \frac{((SurfaceAnalyte / SurfaceSTDInterne) - b)}{a}$$

Où a est la pente de la courbe d'étalonnage.
b est l'ordonnée à l'origine.

NB : une méthode de dosage automatique peut être créée sur la station de données.

7.4. Conclusion

- Tout échantillon à confirmer est extrait deux fois et quantifié par rapport à une gamme d'échantillons supplémentés (0.5 à 2 µg/kg). Une moyenne des deux valeurs obtenues est réalisée.
- Si les critères de confirmation sont atteints pour les 2 échantillons, la présence de résidu de métabolite est confirmée et la teneur en analyte est estimée comme la moyenne des 2 valeurs. Sinon l'échantillon est déclaré négatif.

8. BIBLIOGRAPHIE

1. Norme internationale ISO 78/2-1982. Plans de normes - Partie 2 : Norme d'analyse chimique.

2. Official Journal of the European Communities L221, 8-36, Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, (2002/657/EC).

ANNEXE 1 Représentation schématique de la procédure de traitement des échantillons

Supplémentation :
Dans un tube de 50 ml :
- **Blanc** : 1 g tissu + 50 µl de std interne SI D4/D 0,1 ppm.
- **Sup 0.5** : 1 g tissu + 50 µl S°0,01 ppm AOZ-SEM-AMOZ-AHD + 50 µl de std interne SI D4/D5 0.1 ppm.
- **Sup 1** : 1 g tissu + 100 µl S°0,01 ppm AOZ-SEM-AMOZ-AHD + 50 µl de std interne SI D4/D5 0.1 ppm.

Standard dérivé :
Dans un tube de 50 ml, ajouter :
STD 1 : 200 µl S°0,01 ppm AOZ-SEM-AMOZ-AHD + 100 µl de std interne SI D4/D 0,1 ppm.

Echantillon :
- Dans un tube de 50 ml, peser 1 ± 0,1 g de tissu broyé et ajouter 50 µl de std interne SI D4/D5 0,1 ppm.

↓

Dérivation :
- Ajouter 4 ml d'eau, 0,5 ml d'HCL 1M et 150 µl de 2-NBA
- Agiter 10 s au vortex
- Placer au bain marie à 37 °C pendant 16 h.

↓

Neutralisation :
- Ajouter 5 ml de tampon di-potassium hydrogen orthophosphate 0,1 M
- Ajouter environ 120 µl de NaOH 1M.
- Agiter et contrôler le pH avec une bandelette.
- Ajuster le pH à 7 ± 0,5 par addition supplémentaire de NaOH si nécessaire

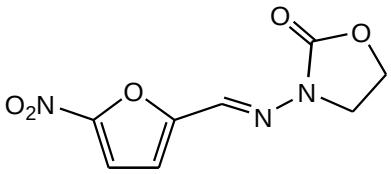
↓

Extraction à l'acétate d'éthyle :
- Ajouter 5 ml d'acétate d'éthyle
- Agiter à l'heidolph pendant 20 min à 100 tr/min
- Centrifuger 5 min à 3000g
- Transférer le surnageant dans un tube en plastique.
- Ajouter 3 ml d'acétate d'éthyle
- Agiter à l'heidolph pendant 20 min à 100 tr/min
- Centrifuger 10 min à 3000 g
- Transférer le surnageant dans le même tube en plastique.
- Evaporer à sec sous N_2.

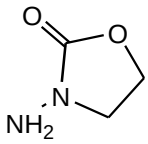
↓

Préparation des échantillons :
- Reprendre le résidu par 400 µl d'acide acétique 0,01 %
- Placer les tubes 1 min aux ultra-sons.
- Transvaser dans des tubes eppendorf.
- Centrifuger pendant 20 min à 20000 g
- Filtrer le surnageant sur des filtres 45 µm.
- Mettre dans des microvials. (attention à la présence de bulle au fond du vial).

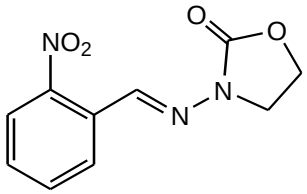
ANNEXE 2 : Structures des nitrofuranes, de leurs métabolites marqueurs et des dérivés nitrophénylés correspondants :



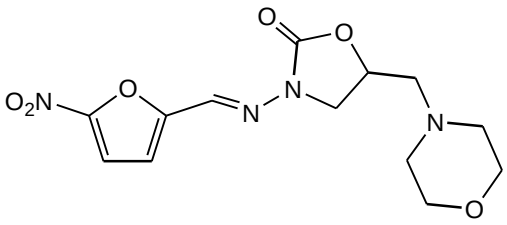
Furazolidone



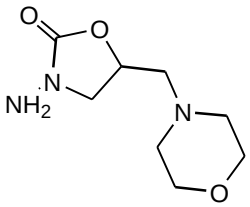
AOZ



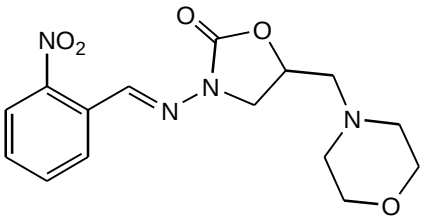
NPAOZ



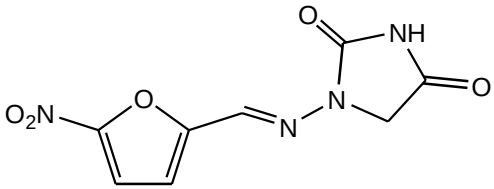
Furaltadone



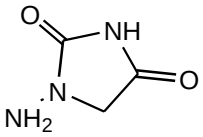
AMOZ



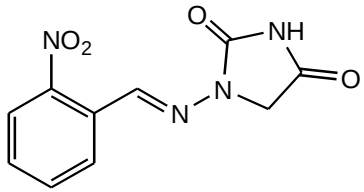
NPAMOZ



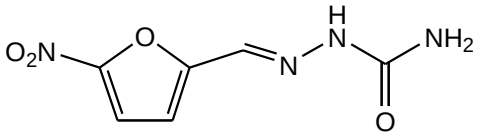
Nitrofurantoïne



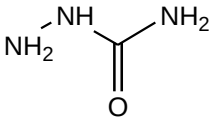
AHD



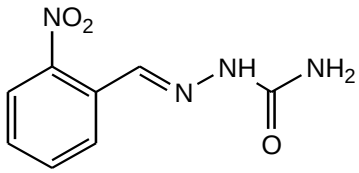
NPAHD



Nitrofurazone



SEM

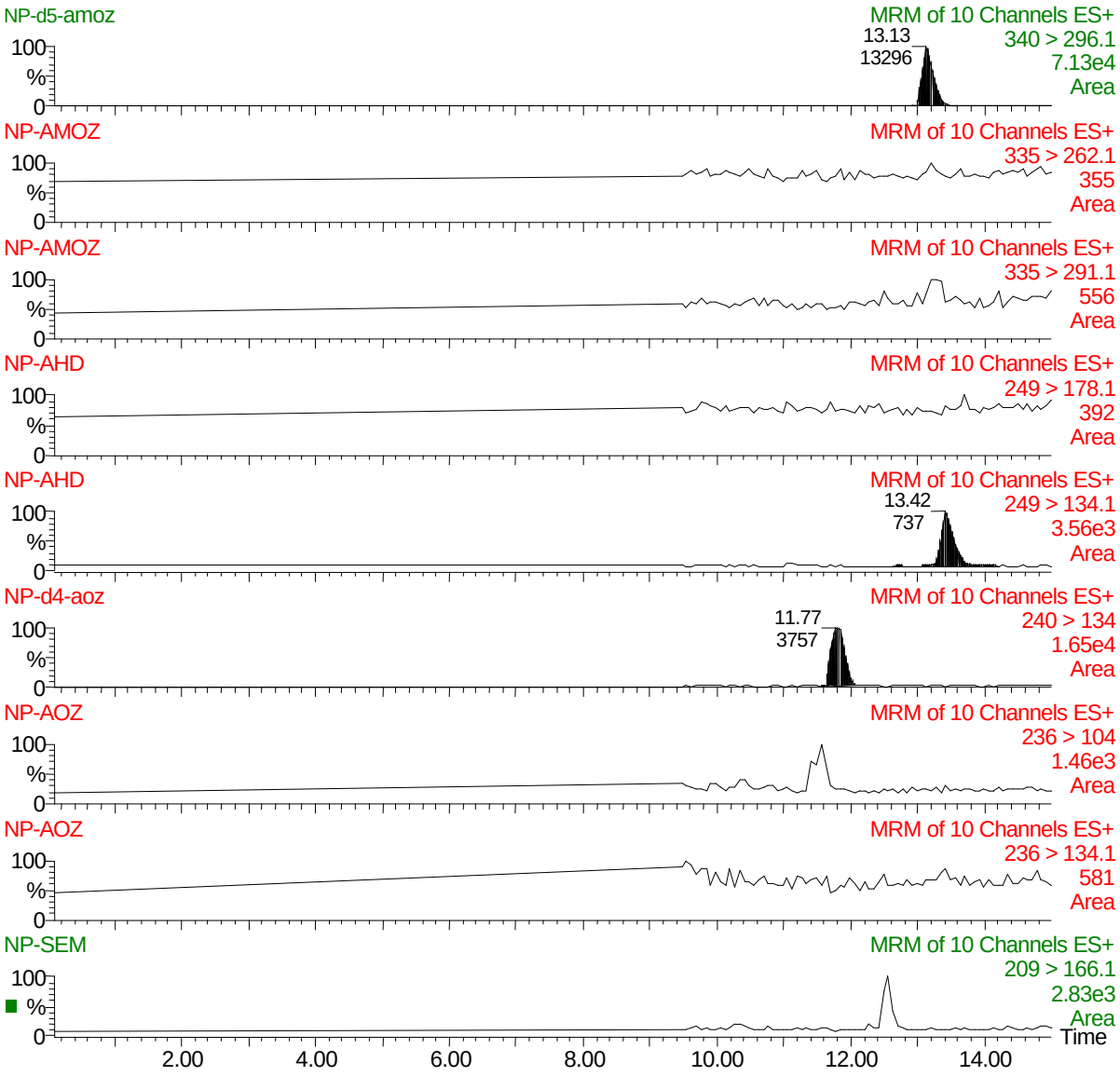


NPSEM

NITROFURANES	METABOLITE MARQUEUR	DERIVE NITROPHENYL

ANNEXE 3 : Echantillon crevette blanc

BLANC



ANNEXE 4 : Echantillon crevette supplémenté à 0.5 µg/Kg

SUP 0.5

