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 animale** **Mission de coordination sanitaire internationale** **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 75732 Paris cedex 15** **Suivi par :** Valérie BADUEL **Tél : 01 49 55 58 70** **Fax : 01 49 55 49 61** **Réf. Interne : NS sulfamides muscles 0304.doc** **Réf. Classement : BRLA/VB/n°42-2004**	**NOTE DE SERVICE** **DGAL/SDSPA/SDRRCC/N2004-8110** **Date : 6 avril 2004**

Date de mise en application Immédiate

Annule et remplace **:** Dispositions correspondantes de la NS DGAL/SDHA/N°92/8028 du 10 février 1992

Date limite de réponse : sans objet

Nombre d'annexes : 1

Le Ministre de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et des affaires rurales

Objet : Méthodes de dosage des sulfamides dans le muscle par chromatographie liquide haute performance.

Bases juridiques : 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

Résumé : La présente note de service référence la nouvelle méthode d'analyse officielle de dosage des sulfamides dans le muscle par chromatographie liquide haute performance dans le muscle

MOTS-CLES : Méthode d'analyse – résidus - sulfamides – muscle

Plan de diffusion	
Pour exécution : - Directeurs départementaux des services vétérinaires - Vétérinaires responsables des postes d'inspection frontaliers - LERMVD - Laboratoires vétérinaires départementaux	Pour information : - Préfets - Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires - Directeur de l'Ecole nationale des services vétérinaires - Directeur de l'INFOMA - DGCCRF - AFSSA - Laboratoire vétérinaire de Rungis - COFRAC

J’ai l’honneur de vous faire parvenir les références et le protocole (en annexe) de la nouvelle méthode d’analyse officielle de dosage des sulfamides dans le muscle par chromatographie liquide haute performance dans le muscle.

Ce protocole constitue une révision de celui de la méthode d’analyse officielle de dosage des sulfamides dans le muscle par chromatographie liquide haute performance dans le muscle diffusé par la note de service DGAL/SDHA/N°92/8028 du 10 février 1992. Les dispositions correspondantes de cette note de service sont donc annulées.

Méthode	Référence	Remplace
sulfamides dans le muscle par chromatographie liquide haute performance dans le muscle	LMV/92/02 – version 2	Protocole diffusé par NS DGAL/SDHA/N°92/8028 du 10 février 1992

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).

Isabelle CHMITELIN
Directrice Générale Adjointe
C.V.O.

LABORATOIRE D'ETUDES ET DE RECHERCHES SUR LES MEDICAMENTS VETERINAIRES ET LES DESINFECTANTS
LABORATOIRE NATIONAL DE REFERENCE
B.P. 90203 - 35302 FOUGERES Cédex
La Haute-Marche - JAVENE - 35133 FOUGERES (France)

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

Réf. : LMV/92/02 version 2
Responsables : B. Roudaut et M. Juhel-Gaugain
Août 2003

METHODE DE DOSAGE DES SULFAMIDES DANS LE MUSCLE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS DE SECURITE

Cette méthode implique la connaissance par l'opérateur des règles usuelles de manipulation des produits chimiques et des solvants. Elle devra être, autant que possible, mise en œuvre sous hotte ventilée.

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode a pour objet l'identification et le dosage de cinq sulfamides (sulfadiazine, sulfadimérazine, sulfaméthoxypyridazine, sulfadoxine et sulfadiméthoxine) dans le muscle de diverses espèces animales (animaux de boucherie, volailles, lapin et poisson) et de la sulfaquinoxaline dans le muscle de volailles et de lapin après un dépistage par chromatographie sur couche mince. La combinaison des deux techniques permet de confirmer la présence des sulfamides selon la Décision 2002/657/CE. Il est également possible d'identifier la molécule détectée par son spectre d'absorption UV. La méthode est applicable à des échantillons conservés à - 20° C jusqu'au moment de l'analyse. Le dosage sera effectué le plus rapidement possible après la mise en évidence d'un sulfamide par chromatographie sur couche mince.

La limite de quantification a été validée à 50 µg/kg. La limite de détection est inférieure à 10 µg/kg. La limite maximale de résidus (LMR) est actuellement fixée à 100 µg/kg pour la somme des sulfamides.

2 - PRINCIPE

La méthode comporte 4 étapes :

- Homogénéisation des échantillons.
- Extraction par le dichlorométhane.

- Purification sur colonne d'extraction en phase solide remplie de silice.
- Dosage par chromatographie liquide (HPLC) sur colonne de silice greffée de type C18 et détection photométrique dans l'ultraviolet à 268 nm. Le dosage peut s'effectuer en mode isocratique avec 2 mélanges éluants différents selon les sulfamides à quantifier, ou en gradient d'élution si le matériel est disponible (pompe binaire). La concentration en sulfamide est calculée par interpolation à partir de la droite d'étalonnage en tenant compte du pourcentage de récupération.

3 - REACTIFS

Au cours de l'analyse, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique et de l'eau ultra pure. Les références sont données à titre indicatif.

3.1. Dichlorométhane (Merck 6050)

3.2. n-Hexane pour analyses de résidus (Merck 4371)

3.3. Acétate d'éthyle pour la chromatographie (Merck 868) ou acétate d'éthyle pour analyse de résidus (Merck 10972) distillé à l'évaporateur rotatif avant l'emploi.

3.4. Acétonitrile pour HPLC (FISHER A/0626/17)

3.5. Méthanol (Merck 6009)

3.6. Acide acétique pour HPLC (Prolabo 20 108 292) : préparer une solution à 5 %.

3.7. Acide orthophosphorique à 85 % (Prolabo 20 624 295) : préparer une solution à 1 mol/l (6,67 ml dans 100 ml d'eau).

3.8. Soude en solution à 30 % (Prolabo 28 226 293) : préparer une solution à 0,1 mol/l (90 µl dans 10 ml d'eau).

3.9. Acétate d'ammonium (Merck 1116) : préparer une solution à 0,01 mol/l (0,77 g/l) et ajuster à pH 4,6 (± 0,05) ou pH 4,3 (± 0,05) avec une solution d'acide acétique 5% (3.6) si présence d'un coextrait interférent avec la sulfadoxine.

3.10. Phosphate dipotassique anhydre (Merck 5104) : préparer une solution à 0,05 mol/l (8,71 g/l) et ajuster à pH 10 (± 0,5) avec une solution de soude à 0,1 mol/l (3.8).

3.11. Muscle témoin dépourvu de traces de sulfamides.

3.12. Solutions étalons

3.12.1. Etalons :

Sulfadiazine sodique (Sigma S6387)
Sulfadimérazine (synonymes : Sulfaméthazine - Sulfadimidine) (Sigma S 6256)
Sulfaméthoxypyridazine (Sigma S 7257)
Sulfadoxine (Intervet)
Sulfadiméthoxine sodique (Sigma S 7385)
Sulfaquinoxaline sodique (Sigma 7382)

NB : les étalons utilisés peuvent être la forme base ou la forme sodique. Il est nécessaire d'en tenir compte lors des pesées pour préparer les solutions mères.

3.12.2. Solutions mères

Préparer pour chaque sulfamide une solution mère à 1 mg/ml en pesant dans une fiole de 50 ml la quantité d'étalon correspondant à 50 mg de matière active et en complétant à 50 ml avec du méthanol.
Ces solutions sont stables à + 4° C, à l'abri de la lumière pendant au moins 6 mois.

NB : si la sulfadiazine base est utilisée à la place de la sulfadiazine sodique, préparer une solution mère à 1 mg/ml en pesant dans une fiole de 50 ml la quantité d'étalon correspondant à 50 mg de matière active et en complétant à 50 ml avec un mélange méthanol/H_2SO_4 à 1 % (60:40, v/v). Cette solution est stable à + 4° C, à l'abri de la lumière pendant seulement 2 mois.

3.12.3. Solutions étalons

Transférer 1,25 ml de chacune des solutions mères dans une fiole de 50 ml (4.1.3) et compléter à 50 ml avec du méthanol (3.5) pour obtenir une solution intermédiaire contenant 25 µg/ml de chaque sulfamide.
Cette solution est stable à + 4° C, à l'abri de la lumière pendant 4 mois.

Préparer des solutions étalons à 5000 - 2500 - 500 et 250 ng/ml en diluant de façon appropriée la solution à 25 µg/ml avec le mélange acétonitrile - acétate d'ammonium 0,01 mol/l (12:88, v/v).

Les solutions sont stables à + 4° C, à l'abri de la lumière pendant 2 mois.

3.12.4. Solutions pour la supplémentation

Solution à 25 µg/ml.

Préparer des solutions à 12,5 - 2,5 - 1,25 µg/ml en diluant de façon appropriée la solution à 25 µg/ml avec du méthanol.

Les solutions sont stables à + 4° C à l'abri de la lumière pendant 4 mois.

3.12.5. Ajouter à 5 (± 0,1) g de muscle homogénéisé 0,2 ml de l'une des solutions de supplémentation (3.12.4) pour obtenir des échantillons de muscle supplémentés à 1000, 500, 100 et 50 µg/kg. Mélanger à l'agitateur vortex et laisser en contact 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

4 - APPAREILLAGE

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

4.1. - Verrerie

4.1.1. Tubes en verre de 5 et 14 ml.

4.1.2. Pipettes de précision en verre de 1 ml et 20 ml.

4.1.3. Fioles jaugées en verre de 20, 25, 50 et 100 ml.

4.1.4. Ballons à fond rond et à col rodé de 25 ml.

4.1.5. Tubes à centrifuger de 50 ml en verre ou en polypropylène.

4.1.6. Bouchons en silicone, type Rhodorsil adaptables aux tubes à centrifuger en verre.

4.1.7. Erlenmeyers de 100 ml.

4.1.8. Flacons pour injecteur automatique.

4.2. – Matériel

4.2.1. Colonnes d'extraction en phase solide remplie de silice (690 mg), type Waters Sep Pak 20520.

4.2.2. Réservoirs de 75 ml, type Analytichem Bond Elut 607500.

4.2.3. Système d'extraction en phase solide sous vide, type Sep Pak Rack Waters 22030 relié à une source de vide (trompe à eau ou pompe).

4.2.4. pH-mètre type Tacussel.

4.2.5. Hachoir électrique, type Moulinex Moulinette.

4.2.6. Agitateur électrique pour tubes à essai, type Vortex.

4.2.7. Pipette automatique, type Gilson Pipetman P 200.

4.2.8. Distributeur automatique, type Brand Dispensette 0 - 25 ml.

4.2.9. Balance de précision analytique, type Sartorius A 120S.

4.2.10. Balance de précision, type Mettler-Toledo PB 302.

4.2.11. Bac à ultra-sons, type Branson Bransonic B221.

4.2.12. Evaporateur rotatif, type Büchi Rotavapor RE-120 ou système d'évaporation sous azote.

4.2.13. Centrifugeuse réfrigérée, type Jouan GR 4.11.

4.2.14. Pompe CLHP, type Spectra-Physics SP 8700.

4.2.15. Détecteur UV, type Kratos Spectroflow 773.

4.2.16. Interface reliée à une station d'acquisition des données ou intégrateur, type Spectra-Physics SP 4290.

4.2.17. Injecteur automatique ou vanne d'injection, type Rheodyne 7125 avec boucle d'échantillonnage de 50 µl et seringue en verre de 100 µl pour chromatographie, type Hamilton.

4.2.18. Colonne analytique (125 x 4 mm) remplie de silice greffée en C18, type Merck Lichrospher 100 RP-18E, 5 µm, avec précolonne (4 x 4 mm), type Merck remplie de la même phase stationnaire.

5 - MODE OPERATOIRE

NB : les sulfamides sont sensibles à la lumière. Les solutions doivent donc être protégées de la lumière au cours du déroulement de la procédure.

5.1. Extraction

5.1.1. Décongeler l'échantillon à température ambiante.

5.1.2. Homogénéiser environ 20 g de muscle au hachoir électrique (4.2.5).

5.1.3. Peser 5 (± 0,1) g dans un tube à centrifuger (4.1.5).

5.1.4. Ajouter 25 ml de dichlorométhane (3.1) et boucher le tube (4.1.6).

5.1.5. Agiter à l'agitateur (4.2.6) 30 s. à vitesse maximum.

5.1.6. Placer le tube dans le bac à ultra-sons (4.2.11) pendant 10 min puis agiter de nouveau 15 s. à l'agitateur (4.2.6).

5.1.7. Centrifuger 10 min à 2000 *g* à environ + 15°C (4.2.13).

5.1.8. *Prélever la totalité de la phase aqueuse surnageante (représentant généralement un faible volume) et la transférer dans un tube (4.1.1).*

5.1.9. Prélever la phase organique au-dessous de la phase solide et la transférer dans un erlenmeyer (4.1.7).

5.1.10. Procéder à une nouvelle extraction de la viande, après avoir ajouté la phase aqueuse (5.1.8), en opérant comme indiqué ci-dessus à partir du point 5.1.4.

5.1.11. Transférer la phase organique dans le même erlenmeyer que le premier extrait et ajouter 40 ml de n-hexane (3.2).

5.2. Purification

5.2.1. Adapter la colonne d'extraction (4.2.1) sur le système d'extraction (4.2.3) et le réservoir (4.2.2) sur la colonne.

5.2.2. Laver la colonne avec 10 ml de n-hexane (3.2).

5.2.3. Transférer l'extrait de muscle (5.1.11) dans le réservoir et filtrer sous vide avec un débit d'environ 15 ml/min.

5.2.4. Laisser la colonne sous vide 2 min au minimum pour la sécher.

5.2.5. Eluer avec 10 (± 0,5) ml de solution de phosphate dipotassique à 0,05 mol/l en maintenant un débit d'environ 2 ml/min .

5.2.6. Recueillir l'éluat dans un tube en verre de 14 ml et transférer dans un tube à centrifuger (4.1.5).

5.2.7. Ajuster le pH de l'éluat à 7,0 ± 0,1 avec de la soude 0,1 mol/l (3.8) ou de l'acide orthophosphorique 1 mol/l (3.7).

5.2.8. Ajouter à l'éluat 20 ml d'acétate d'éthyle (3.3) et agiter 1 min à l'agitateur (4.2.6) à vitesse maximum.

5.2.9. Centrifuger 5 min à 1100 *g* à environ + 15°C (4.2.13).

5.2.10. Transférer précisément 18 (± 1) ml de la phase organique avec une pipette de 20 ml (4.1.2) dans un ballon (4.1.4).

5.2.11. Evaporer à sec à l'évaporateur rotatif (4.2.12) à environ + 30°C ou sous flux d'azote.

NB : Ne pas plonger le ballon dans le bain d'eau pendant la première minute afin d'éviter l'ébullition de l'acétate d'éthyle.

Passer rapidement à l'étape suivante, dès la fin de l'évaporation.

5.2.12. Dissoudre le résidu sec dans 0,9 ml d'un mélange acétonitrile - acétate d'ammonium 0,01 mol/l (12:88, v/v). Agiter 30 s. à l'agitateur (4.2.6). Déposer le ballon dans le bac à ultra-sons (4.2.11) pendant 1 min et agiter 30 s. à l'agitateur (4.2.6).

5.2.13. Transférer dans les flacons pour injection. Dans le cas des extraits de poisson, centrifuger à 2500 *g* à environ + 4°C avant injection.

5.3. Dosage chromatographique

5.3.1. Débit de la pompe (4.2.14) : 1 ml/min

5.3.2. Longueur d'onde du détecteur (4.2.15) : 268 nm

5.3.3. Phase mobile : A : acétonitrile (3.4)
B : acétate d'ammonium 0,01 mol/l (3.9)

a - Gradient :

Temps	% A	% B
0 min	12	88
16 min	26	74
18 min	26	74

Temps de rééquilibrage de la colonne dans les conditions initiales : 5 min.

Temps de rétention : ils sont donnés à titre indicatif

sulfadiazine	3,8 min
sulfadimérazine	6,8 min
sulfaméthoxypyridazine	7,6 min
sulfadoxine	10,7 min
sulfadiméthoxine	17,0 min
sulfaquinoxaline	17,4 min

Un coextrait interférant avec la sulfadoxine peut être présent dans certaines matrices (ex. : ovins). Il est conseillé dans ce cas d'ajuster le pH de la solution d'acétate d'ammonium à 4,3 (± 0,05).

b - Mode isocratique :

16 % A	84 % B
sulfadiazine	3,1 min
sulfadimérazine	5,5 min
sulfaméthoxypyridazine	6,2 min
sulfadoxine	10,3 min
20 % A	80 % B
sulfadoxine	6,7 min
sulfadiméthoxine	15,5 min
sulfaquinoxaline	16,6 min

NB : ajuster le cas échéant la phase mobile pour bien séparer le sulfamide à analyser de son métabolite.

6 - EXPRESSION DES RESULTATS

6.1. - Mode de calcul

6.1.1. Etablir la droite d'étalonnage obtenue avec les solutions de travail pour chaque sulfamide. Déterminer l'équation de cette droite :

$$y = ax + b$$

avec **y** : aire du pic

x : concentration (ng/ml)

a : pente

b : ordonnée à l'origine

6.1.2. Calculer les pourcentages de récupération des différents sulfamides dans le muscle.

Déterminer la concentration finale de l'extrait (**Cf**) à partir de l'équation de la droite d'étalonnage :

$$\boldsymbol{Cf} = \frac{Yf - b}{a}$$

Cf : concentration finale de l'extrait injecté

Yf : Aire du pic de sulfamide

a : pente de la droite d'étalonnage

b : ordonnée à l'origine

Calculer le pourcentage :

$$\boldsymbol{R} = \frac{Cf \times 100}{F \times Cv}$$

R : pourcentage de récupération

Cf : concentration finale de l'extrait déterminée à partir de la droite d'étalonnage

Cv : concentration vraie ou concentration de supplémentation (100 µg/kg).

F : facteur de concentration (soit 5 dans ce cas).

Lors de la validation, les pourcentages de récupération (moyenne et écart type) pour le muscle de porc et pour la truite supplémentés à 100 µg/kg étaient :

Molécule	Muscle de porc (n = 6)		Poisson (truite) (n = 6)	
	% de récup.	Ecart type	% de récup.	Ecart type
sulfadiazine	68,7	4,3	68,1	2,8
sulfadimérazine	81,0	6,4	77,0	5,1
sulfaméthoxypyridazine	80,9	5,3	78,0	2,8
sulfadoxine	82,7	6,2	72,5	4,7

sulfadiméthoxine	93,2	7,1	82,0	3,3

Le pourcentage moyen (écart type) de récupération de la sulfaquinoxaline était de 51,1 (8,6) % pour le muscle de volaille supplémenté à 100 µg/kg.

6.1.3. Calculer la concentration (µg/kg) en sulfamide présent dans les échantillons analysés (Ca) en utilisant la droite d'étalonnage et en tenant compte du pourcentage de récupération.

$$\boldsymbol{Ca} = \frac{C_f}{F} \times \frac{1}{R}$$

Ca : concentration en sulfamide dans l'échantillon à analyser

$\mathbf{C_f}$: concentration finale de l'extrait injecté déterminée à partir de la droite d'étalonnage

R : pourcentage de récupération

F : facteur de concentration (soit 5 dans ce cas)

La limite de détection est inférieure à 10 µg/kg.

6.2. **<u>Contrôle qualité</u>**

A chaque série d'échantillons, ajouter au minimum un muscle témoin dépourvu de traces de sulfamides (3.11) et un muscle supplémenté à 100 µg/kg.

LABORATOIRE D'ETUDES ET DE RECHERCHES SUR LES MEDICAMENTS VETERINAIRES ET LES DESINFECTANTS
LABORATOIRE NATIONAL DE REFERENCE
B.P. 90203 - 35302 FOUGERES Cédex
La Haute-Marche - JAVENE - 35133 FOUGERES (France)

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

Réf. : LMV/92/02 version 2
Responsables : B. Roudaut et M. Juhel-Gaugain Août 2003

METHODE DE DOSAGE DES SULFAMIDES DANS LE MUSCLE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS DE SECURITE

Cette méthode implique la connaissance par l'opérateur des règles usuelles de manipulation des produits chimiques et des solvants. Elle devra être, autant que possible, mise en œuvre sous hotte ventilée.

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode a pour objet l'identification et le dosage de cinq sulfamides (sulfadiazine, sulfadimérazine, sulfaméthoxypyridazine, sulfadoxine et sulfadiméthoxine) dans le muscle de diverses espèces animales (animaux de boucherie, volailles, lapin et poisson) et de la sulfaquinoxaline dans le muscle de volailles et de lapin après un dépistage par chromatographie sur couche mince. La combinaison des deux techniques permet de confirmer la présence des sulfamides selon la Décision 2002/657/CE. Il est également possible d'identifier la molécule détectée par son spectre d'absorption UV. La méthode est applicable à des échantillons conservés à - 20° C jusqu'au moment de l'analyse. Le dosage sera effectué le plus rapidement possible après la mise en évidence d'un sulfamide par chromatographie sur couche mince.

La limite de quantification a été validée à 50 µg/kg. La limite de détection est inférieure à 10 µg/kg. La limite maximale de résidus (LMR) est actuellement fixée à 100 µg/kg pour la somme des sulfamides.

2 - PRINCIPE

La méthode comporte 4 étapes :

- Homogénéisation des échantillons.
- Extraction par le dichlorométhane.
- Purification sur colonne d'extraction en phase solide remplie de silice.
- Dosage par chromatographie liquide (HPLC) sur colonne de silice greffée de type C18 et détection photométrique dans l'ultraviolet à 268 nm. Le dosage peut s'effectuer en mode isocratique avec 2 mélanges éluants différents selon les sulfamides à quantifier, ou en gradient d'élution si le matériel est disponible (pompe binaire). La concentration en sulfamide est calculée par interpolation à partir de la droite d'étalonnage en tenant compte du pourcentage de récupération.

3 - REACTIFS

Au cours de l'analyse, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique et de l'eau ultra pure. Les références sont données à titre indicatif.

3.1. Dichlorométhane (Merck 6050)

3.2. n-Hexane pour analyses de résidus (Merck 4371)

3.3. Acétate d'éthyle pour la chromatographie (Merck 868) ou acétate d'éthyle pour analyse de résidus (Merck 10972) distillé à l'évaporateur rotatif avant l'emploi.

3.4. Acétonitrile pour HPLC (FISHER A/0626/17)

3.5. Méthanol (Merck 6009)

3.6. Acide acétique pour HPLC (Prolabo 20 108 292) : préparer une solution à 5 %.

3.7. Acide orthophosphorique à 85 % (Prolabo 20 624 295) : préparer une solution à 1 mol/l (6,67 ml dans 100 ml d'eau).

3.8. Soude en solution à 30 % (Prolabo 28 226 293) : préparer une solution à 0,1 mol/l (90 µl dans 10 ml d'eau).

3.9. Acétate d'ammonium (Merck 1116) : préparer une solution à 0,01 mol/l (0,77 g/l) et ajuster à pH 4,6 (± 0,05) ou pH 4,3 (± 0,05) avec une solution d'acide acétique 5% (3.6) si présence d'un coextrait interférent avec la sulfadoxine.

3.10. Phosphate dipotassique anhydre (Merck 5104) : préparer une solution à 0,05 mol/l (8,71 g/l) et ajuster à pH 10 (± 0,5) avec une solution de soude à 0,1 mol/l (3.8).

3.11. Muscle témoin dépourvu de traces de sulfamides.

3.12. Solutions étalons

3.12.1. Etalons :

Sulfadiazine sodique (Sigma S6387)

Sulfadimérazine (synonymes : Sulfaméthazine - Sulfadimidine) (Sigma S 6256)

Sulfaméthoxypyridazine (Sigma S 7257)

Sulfadoxine (Intervet)

Sulfadiméthoxine sodique (Sigma S 7385)

Sulfaquinoxaline sodique (Sigma 7382)

NB : les étalons utilisés peuvent être la forme base ou la forme sodique. Il est nécessaire d'en tenir compte lors des pesées pour préparer les solutions mères.

3.12.2. Solutions mères

Préparer pour chaque sulfamide une solution mère à 1 mg/ml en pesant dans une fiole de 50 ml la quantité d'étalon correspondant à 50 mg de matière active et en complétant à 50 ml avec du méthanol.

Ces solutions sont stables à + 4° C, à l'abri de la lumière pendant au moins 6 mois.

NB : si la sulfadiazine base est utilisée à la place de la sulfadiazine sodique, préparer une solution mère à 1 mg/ml en pesant dans une fiole de 50 ml la quantité d'étalon correspondant à 50 mg de matière active et en complétant à 50 ml avec un mélange méthanol/H_2SO_4 à 1 % (60:40, v/v). Cette solution est stable à + 4° C, à l'abri de la lumière pendant seulement 2 mois.

3.12.3. Solutions étalons

Transférer 1,25 ml de chacune des solutions mères dans une fiole de 50 ml (4.1.3) et compléter à 50 ml avec du méthanol (3.5) pour obtenir une solution intermédiaire contenant 25 µg/ml de chaque sulfamide.

Cette solution est stable à + 4° C, à l'abri de la lumière pendant 4 mois.

Préparer des solutions étalons à 5000 - 2500 - 500 et 250 ng/ml en diluant de façon appropriée la solution à 25 µg/ml avec le mélange acétonitrile - acétate d'ammonium 0,01 mol/l (12:88, v/v).

Les solutions sont stables à + 4° C, à l'abri de la lumière pendant 2 mois.

3.12.4. Solutions pour la supplémentation

Solution à 25 µg/ml.

Préparer des solutions à 12,5 - 2,5 - 1,25 µg/ml en diluant de façon appropriée la solution à 25 µg/ml avec du méthanol.

Les solutions sont stables à + 4° C à l'abri de la lumière pendant 4 mois.

3.12.5. Ajouter à 5 (± 0,1) g de muscle homogénéisé 0,2 ml de l'une des solutions de supplémentation (3.12.4) pour obtenir des échantillons de muscle supplémentés à 1000, 500, 100 et 50 µg/kg. Mélanger à l'agitateur vortex et laisser en contact 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

4 - APPAREILLAGE

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

4.1. - Verrerie

4.1.1. Tubes en verre de 5 et 14 ml.

4.1.2. Pipettes de précision en verre de 1 ml et 20 ml.

4.1.3. Fioles jaugées en verre de 20, 25, 50 et 100 ml.

4.1.4. Ballons à fond rond et à col rodé de 25 ml.

4.1.5. Tubes à centrifuger de 50 ml en verre ou en polypropylène.

4.1.6. Bouchons en silicone, type Rhodorsil adaptables aux tubes à centrifuger en verre.

4.1.7. Erlenmeyers de 100 ml.

4.1.8. Flacons pour injecteur automatique.

4.2. – Matériel

4.2.1. Colonnes d'extraction en phase solide remplie de silice (690 mg), type Waters Sep Pak 20520.

4.2.2. Réservoirs de 75 ml, type Analytichem Bond Elut 607500.

4.2.3. Système d'extraction en phase solide sous vide, type Sep Pak Rack Waters 22030 relié à une source de vide (trompe à eau ou pompe).

4.2.4. pH-mètre type Tacussel.

4.2.5. Hachoir électrique, type Moulinex Moulinette.

4.2.6. Agitateur électrique pour tubes à essai, type Vortex.

4.2.7. Pipette automatique, type Gilson Pipetman P 200.

4.2.8. Distributeur automatique, type Brand Dispensette 0 - 25 ml.

4.2.9. Balance de précision analytique, type Sartorius A 120S.

4.2.10. Balance de précision, type Mettler-Toledo PB 302.

4.2.11. Bac à ultra-sons, type Branson Bransonic B221.

4.2.12. Evaporateur rotatif, type Büchi Rotavapor RE-120 ou système d'évaporation sous azote.

4.2.13. Centrifugeuse réfrigérée, type Jouan GR 4.11.

4.2.14. Pompe CLHP, type Spectra-Physics SP 8700.

4.2.15. Détecteur UV, type Kratos Spectroflow 773.

4.2.16. Interface reliée à une station d'acquisition des données ou intégrateur, type Spectra-Physics SP 4290.

4.2.17. Injecteur automatique ou vanne d'injection, type Rheodyne 7125 avec boucle d'échantillonnage de 50 µl et seringue en verre de 100 µl pour chromatographie, type Hamilton.

4.2.18. Colonne analytique (125 x 4 mm) remplie de silice greffée en C18, type Merck Lichrospher 100 RP-18E, 5 µm, avec précolonne (4 x 4 mm), type Merck remplie de la même phase stationnaire.

5 - MODE OPERATOIRE

NB : les sulfamides sont sensibles à la lumière. Les solutions doivent donc être protégées de la lumière au cours du déroulement de la procédure.

5.1. Extraction

5.1.1. Décongeler l'échantillon à température ambiante.

5.1.2. Homogénéiser environ 20 g de muscle au hachoir électrique (4.2.5).

5.1.3. Peser 5 (± 0,1) g dans un tube à centrifuger (4.1.5).

5.1.4. Ajouter 25 ml de dichlorométhane (3.1) et boucher le tube (4.1.6).

5.1.5. Agiter à l'agitateur (4.2.6) 30 s. à vitesse maximum.

5.1.6. Placer le tube dans le bac à ultra-sons (4.2.11) pendant 10 min puis agiter de nouveau 15 s. à l'agitateur (4.2.6).

5.1.7. Centrifuger 10 min à 2000 *g* à environ + 15°C (4.2.13).

5.1.8. Prélever la totalité de la phase aqueuse surnageante (représentant généralement un faible volume) et la transférer dans un tube (4.1.1).

5.1.9. Prélever la phase organique au-dessous de la phase solide et la transférer dans un erlenmeyer (4.1.7).

5.1.10. Procéder à une nouvelle extraction de la viande, après avoir ajouté la phase aqueuse (5.1.8), en opérant comme indiqué ci-dessus à partir du point 5.1.4.

5.1.11. Transférer la phase organique dans le même erlenmeyer que le premier extrait et ajouter 40 ml de n-hexane (3.2).

5.2. Purification

5.2.1. Adapter la colonne d'extraction (4.2.1) sur le système d'extraction (4.2.3) et le réservoir (4.2.2) sur la colonne.

5.2.2. Laver la colonne avec 10 ml de n-hexane (3.2).

5.2.3. Transférer l'extrait de muscle (5.1.11) dans le réservoir et filtrer sous vide avec un débit d'environ 15 ml/min.

5.2.4. Laisser la colonne sous vide 2 min au minimum pour la sécher.

5.2.5. Eluer avec 10 (± 0,5) ml de solution de phosphate dipotassique à 0,05 mol/l en maintenant un débit d'environ 2 ml/min .

5.2.6. Recueillir l'éluat dans un tube en verre de 14 ml et transférer dans un tube à centrifuger (4.1.5).

5.2.7. Ajuster le pH de l'éluat à 7,0 ± 0,1 avec de la soude 0,1 mol/l (3.8) ou de l'acide orthophosphorique 1 mol/l (3.7).

5.2.8. Ajouter à l'éluat 20 ml d'acétate d'éthyle (3.3) et agiter 1 min à l'agitateur (4.2.6) à vitesse maximum.

5.2.9. Centrifuger 5 min à 1100 *g* à environ + 15°C (4.2.13).

5.2.10. Transférer précisément 18 (± 1) ml de la phase organique avec une pipette de 20 ml (4.1.2) dans un ballon (4.1.4).

5.2.11. Evaporer à sec à l'évaporateur rotatif (4.2.12) à environ + 30°C ou sous flux d'azote.

NB : Ne pas plonger le ballon dans le bain d'eau pendant la première minute afin d'éviter l'ébullition de l'acétate d'éthyle.

Passer rapidement à l'étape suivante, dès la fin de l'évaporation.

5.2.12. Dissoudre le résidu sec dans 0,9 ml d'un mélange acétonitrile - acétate d'ammonium 0,01 mol/l (12:88, v/v). Agiter 30 s. à l'agitateur (4.2.6). Déposer le ballon dans le bac à ultra-sons (4.2.11) pendant 1 min et agiter 30 s. à l'agitateur (4.2.6).

5.2.13. Transférer dans les flacons pour injection. Dans le cas des extraits de poisson, centrifuger à 2500 *g* à environ + 4°C avant injection.

5.3. Dosage chromatographique

5.3.1. Débit de la pompe (4.2.14) : 1 ml/min

5.3.2. Longueur d'onde du détecteur (4.2.15) : 268 nm

5.3.3. Phase mobile : A : acétonitrile (3.4)
B : acétate d'ammonium 0,01 mol/l (3.9)

a - Gradient :

Temps	% A	% B
0 min	12	88
16 min	26	74
18 min	26	74

Temps de rééquilibrage de la colonne dans les conditions initiales : 5 min.

Temps de rétention : ils sont donnés à titre indicatif

sulfadiazine	3,8 min
sulfadimérazine	6,8 min
sulfaméthoxypyridazine	7,6 min
sulfadoxine	10,7 min
sulfadiméthoxine	17,0 min
sulfaquinoxaline	17,4 min

Un coextrait interférant avec la sulfadoxine peut être présent dans certaines matrices (ex. : ovins). Il est conseillé dans ce cas d'ajuster le pH de la solution d'acétate d'ammonium à 4,3 (± 0,05).

b - Mode isocratique :

16 % A	84 % B
sulfadiazine	3,1 min
sulfadimérazine	5,5 min
sulfaméthoxypyridazine	6,2 min
sulfadoxine	10,3 min
20 % A	80 % B
sulfadoxine	6,7 min
sulfadiméthoxine	15,5 min

sulfaquinoxaline 16,6 min

NB : ajuster le cas échéant la phase mobile pour bien séparer le sulfamide à analyser de son métabolite.

6 - EXPRESSION DES RESULTATS

6.1. - Mode de calcul

6.1.1. Etablir la droite d'étalonnage obtenue avec les solutions de travail pour chaque sulfamide. Déterminer l'équation de cette droite :

$$y = ax + b$$

avec **y** : aire du pic
x : concentration (ng/ml)
a : pente
b : ordonnée à l'origine

6.1.2. Calculer les pourcentages de récupération des différents sulfamides dans le muscle.

Déterminer la concentration finale de l'extrait (**Cf**) à partir de l'équation de la droite d'étalonnage :

$$\boldsymbol{Cf =} \frac{Yf - b}{a}$$

Cf : concentration finale de l'extrait injecté
Yf : Aire du pic de sulfamide
a : pente de la droite d'étalonnage
b : ordonnée à l'origine

Calculer le pourcentage :

$$\boldsymbol{R =} \frac{Cf \times 100}{F \times Cv}$$

R : pourcentage de récupération
Cf : concentration finale de l'extrait déterminée à partir de la droite d'étalonnage
Cv : concentration vraie ou concentration de supplémentation (100 µg/kg).
F : facteur de concentration (soit 5 dans ce cas).

Lors de la validation, les pourcentages de récupération (moyenne et écart type) pour le muscle de porc et pour la truite supplémentés à 100 µg/kg étaient :

Molécule	Muscle de porc (n = 6)		Poisson (truite) (n = 6)	
	% de récup.	Ecart type	% de récup.	Ecart type
sulfadiazine	68,7	4,3	68,1	2,8
sulfadimérazine	81,0	6,4	77,0	5,1
sulfaméthoxypyridazine	80,9	5,3	78,0	2,8
sulfadoxine	82,7	6,2	72,5	4,7
sulfadiméthoxine	93,2	7,1	82,0	3,3

Le pourcentage moyen (écart type) de récupération de la sulfaquinoxaline était de 51,1 (8,6) % pour le muscle de volaille supplémenté à 100 µg/kg.

6.1.3. Calculer la concentration (µg/kg) en sulfamide présent dans les échantillons analysés (Ca) en utilisant la droite d'étalonnage et en tenant compte du pourcentage de récupération.

$$\boldsymbol{Ca} = \frac{C_f}{F} \times \frac{1}{R}$$

Ca : concentration en sulfamide dans l'échantillon à analyser

C_f : concentration finale de l'extrait injecté déterminée à partir de la droite d'étalonnage

R : pourcentage de récupération

F : facteur de concentration (soit 5 dans ce cas)

La limite de détection est inférieure à 10 µg/kg.

6.2. **<u>Contrôle qualité</u>**

A chaque série d'échantillons, ajouter au minimum un muscle témoin dépourvu de traces de sulfamides (3.11) et un muscle supplémenté à 100 µg/kg.