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 :** Alexandre BLANC-GONNET **Tél : 01 49 55 81 49** **Fax : 01 49 55 49 61** **Réf. Interne : NS Nitroimidazoles m oeuf alim ani 0804.doc** **Réf. Classement : BRLA/ABG/192-04**	**NOTE DE SERVICE** **DGAL/SDSPA/MCSI/SDRRCC/N2004-8215** **Date: 17 août 2004**

Date de mise en application	Immédiate
Annule et remplace :	néant
Date limite de réponse :	sans objet
Nombre d'annexes :	2

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

Objet : Méthode de confirmation des nitroimidazoles dans le muscle et les œufs par CL/SM/SM (ESI) et méthode de dépistage et de confirmation des nitroimidazoles dans les aliments pour animaux par CL/SM/SM (ESI)

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 méthode de confirmation des nitroimidazoles dans le muscle et les œufs par CL/SM/SM (ESI), et la méthode de dépistage et de confirmation des nitroimidazoles dans les aliments pour animaux par CL/SM/SM (ESI).

MOTS-CLES : Méthode d'analyse – résidus – nitroimidazoles – muscles – œufs – aliments pour animaux

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 les protocoles (en annexe) des nouvelles méthodes d’analyse officielles de :

- confirmation des nitroimidazoles dans le muscle et les œufs par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL/SM/SM) avec détection réalisée en mode positif par couplage avec l'interface Electrospray (ESI),
- dépistage et de confirmation des nitroimidazoles dans les aliments pour animaux par CL/SM/SM (ESI).

Méthode	Référence	Remplace
Méthode de confirmation des nitroimidazoles dans le muscle et les œufs par CL/SM/SM (ESI)	LMV/04/01 – version 1	-
Méthode de dépistage et de confirmation des nitroimidazoles dans les aliments pour animaux par CL/SM/SM (ESI)	LMV/04/02 – version 1	-

Ces méthode ont été développées 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 Cedex
La Haute-Marche - JAVENE - 35133 FOUGERES (France)

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

Réf. : LMV/04/01 - version 1 Mai 2004

Responsables : Dominique HURTAUD-PESSEL
Estelle CHENEAU
Yvette PIROTAIS

METHODE DE CONFIRMATION DES NITROIMIDAZOLES DANS LE MUSCLE ET LES ŒUFS PAR CL/SM/SM (ESI)

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS DE SECURITE

Les solvants organiques et les standards doivent être manipulés sous une hotte ventilée.

✋ **Précautions** : *Les nitroimidazoles sont extrêmement sensibles à la lumière ; il est donc indispensable de prendre toutes les précautions nécessaires afin que les solutions et extraits soient manipulés dans l'obscurité (salle sombre, papier aluminium ...).*

0 - INTRODUCTION

L'utilisation de dimétridazole, de ronidazole et de métronidazole est interdite en médecine vétérinaire au sein de l'union européenne ; ils sont classés en annexe IV (Règlement EEC n°2377/90). Aucun résidu de ces molécules ne doit être présent dans les animaux.

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode permet de déterminer la présence de résidus de dimétridazole, de ronidazole, de leur métabolite majeur l'hydroxydimétridazole et de métronidazole dans le muscle (de volaille, de lapin …) et dans les œufs par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL/SM/SM). La détection est réalisée en mode positif par couplage avec l'interface Electrospray (ESI). Le ronidazole deutéré (RNZ-d3) est utilisé comme standard interne pour le dosage. La confirmation est possible à un niveau de concentration ≤ 1,5 µg/kg pour chaque nitroimidazole.

2 - PRINCIPE

2.1. Extraction à l'acétate d'éthyle, en milieu basique, par agitation.

2.2. Evaporation de la phase organique sous $N_{2.}$

2.3. Reprise par un mélange Isooctane / Acide formique 0,2 %.

2.4. Injection de la phase aqueuse dans le système CL/SM/SM.

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. Standards

3.1.1. Dimétridazole (SIGMA Réf D-4025)

3.1.2. Ronidazole (SIGMA Réf R-7635)

3.1.3. Métronidazole (SIGMA Réf M-3761)

3.1.4. Hydroxydimetridazole (3Hydroxy methyl-1-methyl 5 nitroimidazole) (WITEGA, Berlin)

3.1.5. Ronidazole deutéré (RIVM, The Netherlands, ref CEC/MAT33 ou WITEGA)

3.2. Préparation des solutions standards

Solutions mères (stockées au congélateur à l'abri de la lumière, pendant 1 an)

3.2.1. Solution mère de dimétridazole à 1 g/l dans MeOH : SM-dmz

3.2.1.1. Peser 50 mg ou plus selon la pureté de dimétridazole dans une fiole de 50 ml

3.2.1.2. Ajuster le volume avec du méthanol

3.2.2. Solution mère de ronidazole à 1 g/l dans MeOH : SM-rnz

3.2.2.1. Peser 50 mg ou plus selon la pureté de ronidazole dans une fiole de 50 ml

3.2.2.2. Ajuster le volume avec du méthanol

3.2.3. Solution mère d'hydroxydimétridazole à 1 g/l dans MeOH : SM-dmzoh

3.2.3.1. Peser 50 mg d'hydroxydimétridazole ou plus selon la pureté dans une fiole de 50 ml

3.2.3.2. Ajuster le volume avec du méthanol

3.2.4. Solution mère de métronidazole à 1 g/l dans MeOH : SM-mnz

3.2.4.1. Peser 50 mg de métronidazole ou plus selon la pureté dans une fiole de 50 ml

3.2.4.2. Ajuster le volume avec du méthanol

Solution intermédiaire (stockée au réfrigérateur à l'abri de la lumière, préparée tous les 15 jours)

3.2.5. Solution intermédiaire à 10 µg/ml en DMZ, RNZ , DMZOH et MNZ : SF_{10}

3.2.5.1. Pipetter 500 µl de SM-dmz, 500 µl de SM-rnz, 500 µl de SM-dmzoh et 500 µl de SM-mnz dans une fiole de 50 ml

3.2.5.2. Ajuster le volume avec du méthanol

Solutions filles (stockées au réfrigérateur à l'abri de la lumière, préparées tous les jours)

3.2.6. Solution fille à 0,1 µg/ml en DMZ, RNZ , DMZ-OH et MNZ : $SF_{0.1}$

3.2.6.1. Pipetter 200 µl de SF_{10} dans une fiole de 20 ml

3.2.6.2. Ajuster le volume avec de l'eau

3.2.7. Solution fille à 0,04 µg/ml en DMZ, RNZ , DMZ-OH et MNZ : $SF_{0.04}$

3.2.7.1. Pipetter 100 µl de SF_{10} dans une fiole de 25 ml

3.2.7.2. Ajuster le volume avec de l'eau

3.2.8. Solution fille à 0,01 µg/ml en DMZ, RNZ , DMZ-OH et MNZ : $SF_{0.01}$

3.2.8.1. Pipetter 1 ml de $SF_{0.1}$ dans une fiole de 10 ml

3.2.8.2. Ajuster le volume avec de l'eau

Solutions deutérées (stockées au réfrigérateur à l'abri de la lumière indéfiniment)

3.2.9. Solution mère de ronidazole deutéré à 10 µg/ml dans MeOH : SI

3.2.9.1. Placer l'ampoule à température ambiante pendant 30 min au moins à l'abri de la lumière

3.2.9.2. Ouvrir l'ampoule avec précaution

3.2.9.3. Ajouter 1 ml d'éthanol (haut degré de pureté) dans l'ampoule

3.2.9.4. Fermer l'ampoule avec un parafilm (pour éviter l'évaporation durant les étapes suivantes)

3.2.9.5. Agiter l'ampoule au Vortex durant au moins 1 min

3.2.9.6. Placer l'ampoule dans le bain à ultrasons pendant au moins 5 min

3.2.9.7. Pipetter la solution dans une fiole de 10 ml

3.2.9.8. Ajuster le volume avec du méthanol

3.2.10. Solution fille à 0,2 µg/ml en RNZ-d_3 : $SI_{0.2}$

3.2.10.1. Pipetter 200 µl de SI dans une fiole de 10 ml

3.2.10.2. Ajuster le volume avec du méthanol

3.3. Réactifs chimiques

3.3.1.	Méthanol	(Fisher M/4000)
3.3.2.	Acétonitrile pour CLHP	(Fisher A/0626)
3.3.3.	Isooctane	(Merck 1.04727)
3.3.4.	Acide formique	(Merck 1.00264)
3.3.5.	Di-potassium hydrogeno phosphate	(Merck 1.05099)

3.3.6. Isohexane (Fisher H/0411)

3.3.7. Acétate d'éthyle (Fisher E/0900)

3.3.8. Eau ultrapure (Milli-Q, Millipore)

3.3.9. Ethanol (Fisher E/0500DF)

3.4. Solutions

3.4.1. **Tampon phosphate de potassium (0,5 mol/l, pH 8,8)**

Peser 8,7 g de K_2HPO_4 dans une fiole de 100 ml puis ajouter ~ 90 ml d'eau et mettre quelques min dans une cuve à ultrasons jusqu'à dissolution. Ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau et vérifier que le pH est voisin de 8,8 (± 0,2).

3.4.2. Acide formique à 0,2 % dans l'eau (phase mobile).

Pipetter 1 ml d'acide formique dans une fiole de 500 ml et ajuster le volume avec de l'eau.

3.5. Gaz

3.5.1. Azote I (Air liquide)

3.5.2. Argon (Air liquide)

3.5.3. Générateur d'azote (Whatman)

4 - APPAREILLAGE

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

4.1. Matériel de laboratoire (extraction)

4.1.1. Tubes à centrifuger en polypropylène copolymère (PPCO) de 16 ml (18 x 100 mm) avec obturateur, type Nalgene VWR 2064301

4.1.2. Tubes à centrifuger en polypropylène de 50 ml avec bouchon, type Corning VWR 430290

4.1.3. Fioles jaugées en verre

4.1.4. Balance de précision, type Mettler-Toledo PB302

4.1.5. Cuve à ultrasons, type Branson 2210

4.1.6. Pipettes automatiques volumes 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 500 µl, type Gilson ou Biohit

4.1.7. Cônes P5000, P1000 et P200, type Gilson ou Biohit

4.1.8. Agitateur pour tube à essai, type Vortex

4.1.9. Agitateur rotatif, type Heidolph Rheax II

4.1.10. Centrifugeuse, type Jouan MR 22

4.1.11. Centrifugeuse, type Jouan GR 422

4.1.12. Broyeur, type Moulinette

4.1.13. Bain à sec pour évaporation sous N_2, type Prolabo

4.1.14. Tubes à fond rond de 10 ml en polypropylène, type CML TC10PRO

4.1.15. Tubes à fond conique de 2 ml, type Eppendorf C2EPLOCK

4.1.16. Flacons à injection à vis en polypropylène de 500 µl, type Interchim CH 963290

4.2. Appareillage chromatographique

4.2.1. Pompe CLHP, type Hewlett Packard 1100

4.2.2. Injecteur automatique, type Hewlett Packard 1100

4.2.3. Dégazeur à membrane, type Hewlett Packard 1100

4.2.4. Colonne C18 150 × 3,9 mm (5 µm, 100 A), type Waters Symmetry

4.2.5. Précolonne C18 2,1 × 10 mm, type Waters Symmetry

4.3. Appareillage de spectrométrie de masse

4.3.1. Spectromètre de masse en tandem quadripolaire, type MICROMASS QUATTRO LCZ

4.3.2. Interface Electrospray

4.3.3. Station d'acquisition de données, type MassLynx NT

4.3.4. Imprimante

5 - ECHANTILLONS

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

5.2. Les œufs à analyser sont cassés puis l'œuf entier est battu et la coule d'œuf est stockée au congélateur (≤ -16°C).

6 - MODE OPERATOIRE

*Selon les performances (en terme de sensibilité) du spectromètre de masse utilisé en détection, il est possible de diminuer par un facteur 2 la prise d'essai ainsi que les volumes respectifs pour les supplémentations et l'extraction. Cependant, la reprise au point **6.1.5.9** pour le muscle et au point **6.2.5.9** pour les œufs ne sera pas modifiée.*

6.1. Pour le muscle

6.1.1. Echantillons à confirmer

6.1.1.1. Décongeler le muscle à analyser et le broyer

6.1.1.2. Peser 4 ± 0,1 g de muscle broyé dans un tube en PPCO de 16 ml

6.1.1.3. Ajouter 500 µl d'eau + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml ($SI_{0.2}$)

6.1.1.4. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.1.1.5. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.1.2. Echantillon blanc témoin

6.1.2.1. Décongeler un muscle témoin ne contenant pas de nitroimidazoles et le broyer

6.1.2.2. Peser 4 ± 0,1 g de muscle broyé dans un tube en PPCO de 16 ml

6.1.2.3. Ajouter 500 µl d'eau + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml ($SI_{0.2}$)

6.1.2.4. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.1.2.5. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.1.3. Echantillon blanc supplémenté à 1 µg/kg

6.1.3.1. Décongeler un muscle témoin ne contenant pas de nitroimidazoles et le broyer

6.1.3.2. Peser 4 ± 0,1 g de muscle broyé dans un tube en PPCO de 16 ml

6.1.3.3. Ajouter 400 µl de SF0.01 + 100 µl d'eau + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml ($SI_{0.2}$) → *muscle supplémenté à 1 µg/kg*

6.1.3.4. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.1.3.5. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.1.4. Echantillons blancs supplémentés (gamme 1, 3, 5, 7,5 µg/kg)

La gamme d'échantillons supplémentés nécessaire pour établir la courbe de calibration pour quantifier un échantillon positif doit comprendre au moins 3 points. L'opérateur établit la gamme après évaluation de la concentration.

6.1.4.1. Décongeler un muscle témoin ne contenant pas de nitroimidazoles et le broyer.

6.1.4.2. Peser 4 ± 0,1 g de muscle broyé dans un tube en PPCO de 16 ml.

6.1.4.3. Supplémenter les muscles de la façon suivante :

4 g + 400 µl SF0.01 + 100 µl d'eau + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml ($SI_{0.2}$).→ *muscle supplémenté à 1 µg/kg.*

4 g + 120 µl SF0.1 + 380 µl d'eau + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml ($SI_{0.2}$).→ *muscle supplémenté à 3 µg/kg.*

4 g + 200 µl SF0.1 + 300 µl d'eau + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml ($SI_{0.2}$).→ *muscle supplémenté à 5 µg/kg.*

4 g + 300 µl SF0.1 + 200 µl d'eau + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml ($SI_{0.2}$).→ *muscle supplémenté à 7,5 µg/kg.*

6.1.4.4. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.1.4.5. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.1.5. Extraction sur les muscles

6.1.5.1. Ajouter 1,6 ml de tampon phosphate (0.5 mol/l, pH 8,8)

6.1.5.2. Agiter 20 s au Vortex à vitesse maximum

6.1.5.3. Ajouter 8 ml d'acétate d'éthyle

6.1.5.4. Agiter 15 s au Vortex à vitesse maximum

6.1.5.5. Agiter pendant 10 min à l'agitateur rotatif à 100 t/min

6.1.5.6. Centrifuger pendant 10 min à 8000 g à 5°C

6.1.5.7. Prélever 6,8 ml de la phase organique (supérieure) et transférer dans un tube en polypropylène de 10 ml

6.1.5.8. Evaporer sous flux d'azote à 45°C jusqu'à l'obtention d'un résidu huileux

6.1.5.9. Reprendre avec 0,4 ml d'isooctane et 0,4 ml d'acide formique à 0,2 %

6.1.5.10. Agiter manuellement

6.1.5.11. Transférer dans un tube eppendorf et centrifuger à 17300 g pendant 2 min à 5°C

6.1.5.12. Transférer la phase aqueuse (phase inférieure) dans un flacon à injection

6.2. <u>Pour les oeufs</u>

6.2.1. Echantillons à confirmer

6.2.1.1. Décongeler la coule d'œuf et l'agiter

6.2.1.2. Peser 4 ± 0,1 g dans un tube en polypropylène de 50 ml

6.2.1.3. Ajouter 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml (SI $_{0.2}$)

6.2.1.4. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.2.1.5. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.2.2. Echantillon blanc témoin

6.2.2.1. Décongeler de la coule d'œuf ne contenant pas de nitroimidazoles et l'agiter

6.2.2.2. Peser 4 ± 0,1 g dans un tube en polypropylène de 50 ml

6.2.2.3. Ajouter 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml (SI $_{0.2}$)

6.2.2.4. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.2.3. Echantillon blanc supplémenté à 1 µg/kg

6.2.3.1. Décongeler de la coule d'œuf ne contenant pas de nitroimidazoles et l'agiter

6.2.3.2. Peser 4 ± 0,1 g dans un tube en polypropylène de 50 ml

6.2.3.3. Ajouter 100 µl de SF0.04 + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml (SI $_{0.2}$)→ *oeuf supplémenté à 1 µg/kg*

6.2.3.4. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.2.3.5. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.2.4. Echantillons blancs supplémentés (gamme 1 - 3 - 5 - 7,5 µg/kg)

La gamme d'échantillons supplémentés nécessaire pour établir la courbe de calibration pour quantifier un échantillon positif doit comprendre au moins 3 points.

6.2.4.1. Décongeler de la coule d'œuf ne contenant pas de nitroimidazoles et l'agiter

6.2.4.2. Peser 4 ± 0,1 g dans un tube en polypropylène de 50 ml

6.2.4.3. Supplémenter de la façon suivante :

4 g + 100 µl SF0.04 + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml (SI $_{0.2}$)→ *oeuf supplémenté à 1 µg/kg*

4 g + 300 µl SF0.04 + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml (SI $_{0.2}$)→ *oeuf supplémenté à 3 µg/kg*

4 g + 500 µl SF0.04 + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml (SI $_{0.2}$)→ *oeuf supplémenté à 5 µg/kg*

4 g + 750 µl SF0.04 + 100 µl de RNZ-d_3 à 0,2 µg/ml (SI $_{0.2}$)→ *oeuf supplémenté à 7,5 µg/kg*

6.2.4.4. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.2.4.5. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.2.5. Extraction sur les oeufs

6.2.5.1. Ajouter 1,6 ml de tampon phosphate (0,5 mol/l, pH 8,8)

6.2.5.2. Agiter 20 s au Vortex à vitesse maximum

6.2.5.3. Ajouter 24 ml d'acétate d'éthyle + 2 ml d'isohexane

6.2.5.4. Agiter 15 s au Vortex à vitesse maximum

6.2.5.5. Agiter pendant 10 min à l'agitateur rotatif à 100 t/min

6.2.5.6. Centrifuger pendant 10 min à 3000 g à 5°C

6.2.5.7. Prélever 15 ml de la phase organique (supérieure) et transférer une partie de cette phase (pour évaporer en deux fois dans un tube en polypropylène de 10 ml

6.2.5.8. Evaporer sous flux d'azote à 45°C jusqu'à l'obtention d'un résidu huileux

6.2.5.9. Reprendre avec 0,6 ml d'isooctane et 0,6 ml d'acide formique à 0,2 %

6.2.5.10. Agiter manuellement

6.2.5.11. Transférer dans un tube eppendorf et centrifuger à 17300 g pendant 2 min à 5°C

6.2.5.12. Transférer la phase aqueuse (phase inférieure) dans un flacon à injection

6.6. <u>Analyse CL-SM/SM</u>

6.6.1. Conditions chromatographiques :

6.6.1.1. Colonne 150 x 3,9 mm (5 µm, 100 A), type Waters Symmetry C18, Précolonne C18 2,1 × 10 mm, type Waters Symmetry

6.6.1.2. Phase mobile :

Methanol	13 %
Acétonitrile	6 %
0,2 % Acide formique	81 %

6.6.1.3. Débit : 0,6 ml/min (avec un splitt ~1/3 pour Micromass Quattro LCZ)

6.6.1.4. Volume injecté : 100 µl

6.6.2. Conditions de détection (spectrométrie de masse) : les conditions mentionnées ici concernent le spectromètre de masse MICROMASS QUATTRO LCZ

6.6.2.1. Interface : ESI en mode positif

6.6.2.2. Température de nébulisation : 350°C

6.6.2.3. Température du bloc source : 90°C

6.6.2.4. Débit du gaz de nébulisation : 92 l/hr

6.6.2.5. Débit du gaz de désolvatation : 738 l/hr

6.6.2.6. Pression du gaz dans la cellule de collision (Argon) : 2.10^{-3} mbar.

6.6.2.7. Capillaire : 2.90 kVolts

6.6.2.8. Détection en mode MRM :

2 transitions (ion parent → ion fils) sont sélectionnées pour identifier chaque nitroimidazole

	Parent ion > daughter ion	*Dwell(sec)*	*Cone voltage*	*Col.Energy*
Ronidazole	201.0 > 110.0	0.2	19	11
	201.0 > 140.1	0.2	19	11
Hydroxydimétridazole	158.0 > 140.1	0.2	21	13
	158.0 > 112.0	0.2	21	13
Dimétridazole	142.0 > 81.0	0.2	26	16
	142.0 > 96.0	0.2	26	16
Métronidazole	172.0 >128.0	0.2	26	15
	172.0 > 82.0	0.2	26	15
Ronidazole-d_3	204 > 143.1	0.2	19	11

6.6.3. Acquisition des résultats

6.6.3.1. La stratégie analytique est la suivante :

1 - Screening : Extraction des échantillons à doser + extraction d'un supplémenté à 1 µg/kg et d'un blanc témoin. Evaluation de la concentration de l'échantillon positif par rapport à l'échantillon supplémenté à 1 µg/kg.

2 - Confirmation : Si l'échantillon est suspect, extraction des échantillons à doser en double + extraction d'une gamme de supplémentés d'au moins 3 points et d'un blanc témoin. Dosage des échantillons positifs par rapport à la gamme d'étalonnage d'échantillons extraits.

6.6.3.2. L'ordre d'injection est le suivant

- Standard $SF_{0.04}$
- Échantillon blanc témoin
- Échantillon(s) supplémenté(s)
- Injection eau / MeOH
- Échantillon(s) à analyser
- Échantillon blanc témoin
- Échantillon(s) supplémenté(s)

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 nitroimidazoles 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 la matrice (temps de rétention relatif : tolérance de ± 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 nitroimidazole est identifié par son temps de rétention et les transitions spécifiques correspondantes.

	DMZ	DMZ-OH	RNZ	MNZ	RNZ-d_3
Transitions spécifiques	142 > 81 142 > 96	158 > 140 158 > 112	201 > 110 201 > 140	172 > 128 172 > 82	204 > 143
Temps de rétention de l'ordre de (min)	5,6	5,0	5,9	4,7	5,9

7.3. Détermination de la concentration

Le dosage est réalisé à partir des transitions suivantes :

DMZ	142 > 96
DMZ-OH	158 > 140
MNZ	172 > 128
RNZ	201 > 140
RNZ-d3 (standard interne)	204 > 143

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.

Evaluation de la conformité de l'échantillon par rapport à la limite de décision CCα calculée selon la norme ISO 11843 à partir de la gamme de supplémentés.

7.4. Conclusion

- **Tout échantillon à confirmer est extrait deux fois et quantifié par rapport à une gamme d'échantillons supplémentés. Une moyenne des deux valeurs obtenues est réalisée.**
- **Si les critères de confirmation sont atteints pour les 2 extraits d'un échantillon, la présence de résidu de nitroimidazole est confirmée et la teneur en analyte est estimée comme la moyenne des 2 valeurs. Sinon l'échantillon est déclaré conforme.**

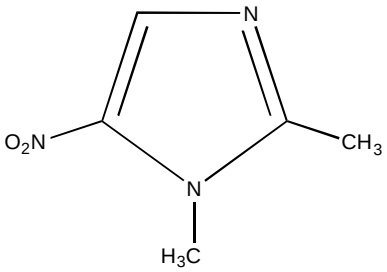
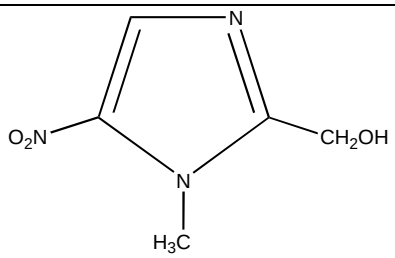
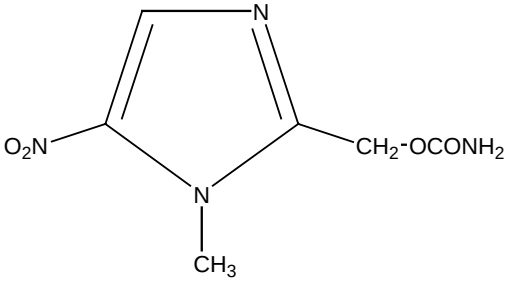
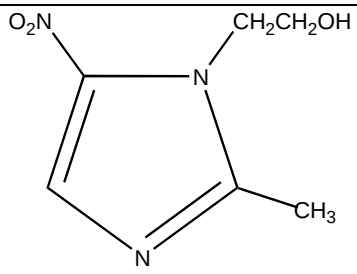
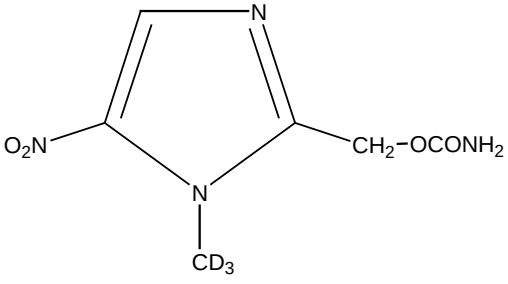
8 - REFERENCES

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).

3. Norme française NF-ISO 11843-2 - Septembre 2000. Capacité de détection – Partie 2 : Méthodologie de l'étalonnage linéaire.

Structures des Nitroimidazoles

Dimétridazole		$C_5H_7N_3O_2$ 141
Hydroxydimetridazole		$C_5H_7N_3O_3$ 157
Ronidazole		$C_6H_8N_4O_4$ 200
Métronidazole		$C_6H_9N_3O_3$ 171
Ronidazole deutéré		$C_6H_5D_3N_4O_4$ 203

LABORATOIRE D'ETUDES ET DE RECHERCHES SUR LES MEDICAMENTS VETERINAIRES ET LES DESINFECTANTS
UNITE CONTAMINANTS MEDICAMENTEUX
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
E-mail : seclmv@fougeres.afssa.fr

Réf. : LMV/04/02 - version 1 Juin 2004

Responsables : Estelle CHENEAU
Yvette PIROTAIS

METHODE DE DEPISTAGE ET DE CONFIRMATION DES NITROIMIDAZOLES DANS LES ALIMENTS POUR ANIMAUX PAR CL/SM/SM (ESI)

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS DE SECURITE

Les solvants organiques et les standards doivent être manipulés sous une hotte ventilée.

✋ **Précautions** : *Les nitroimidazoles sont extrêmement sensibles à la lumière ; il est donc indispensable de prendre toutes les précautions nécessaires afin que les solutions et extraits soient manipulés dans l'obscurité (salle sombre, papier aluminium ...).*

0 - INTRODUCTION

L'utilisation de dimétridazole, de ronidazole et de métronidazole est interdite en médecine vétérinaire au sein de l'union européenne ; ils sont classés en annexe IV (Règlement EEC n°2377/90).

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode permet de déterminer la présence de dimétridazole, de ronidazole, et de métronidazole dans les aliments pour animaux par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL/SM/SM). La détection est réalisée en mode positif par couplage avec l'interface Electrospray (ESI). Le ronidazole deutéré (RNZ-d3) est utilisé comme stantard interne pour le dosage. La méthode permet de confirmer la présence de nitroimidazoles à un niveau de concentration $\geq$ 0.5 mg/kg.

2 - PRINCIPE

2.1. Extraction à l'acétate d'éthyle, en milieu basique, par agitation

2.2. Evaporation de la phase organique sous N_2

2.3. Reprise par un mélange Isooctane / Acide formique 0.2 %

2.4. Injection de la phase aqueuse dans le système CL/SM/SM

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. Sandards

3.1.1.	Dimétridazole	(SIGMA Réf D-4025)
3.1.2.	Ronidazole	(SIGMA Réf R-7635)
3.1.3.	Métronidazole	(SIGMA Réf M-3761)
3.1.4.	Ronidazole deutéré	(RIVM, The Netherlands, ref CEC/MAT33 ou WITEGA)

3.2. Préparation des solutions standards

Solutions mères (stockées au congélateur à l'abri de la lumière, pendant 1 an)

3.2.1. Solution mère de dimétridazole à 1 g/l dans MeOH : SM-dmz

3.2.1.1. Peser 50 mg ou plus selon la pureté de dimétridazole dans une fiole de 50 ml

3.2.1.2. Ajuster le volume avec du méthanol

3.2.2. Solution mère de ronidazole à 1 g/l dans MeOH : SM-rnz

3.2.2.1. Peser 50 mg ou plus selon la pureté de ronidazole dans une fiole de 50 ml

3.2.2.2. Ajuster le volume avec du méthanol

3.2.3. Solution mère de métronidazole à 1 g/l dans MeOH : SM-mnz

3.2.3.1. Peser 50 mg de métronidazole ou plus selon la pureté dans une fiole de 50 ml

3.2.3.2. Ajuster le volume avec du méthanol

Solutions filles (stockées au réfrigérateur à l'abri de la lumière)

3.2.4. Solution fille à 20 µg/ml en DMZ, RNZ, MNZ : SF_{20} (préparée tous les 15 jours)

3.2.4.1. Pipetter 1 ml de Solution mère dans une fiole de 50 ml

3.2.4.2. Ajuster le volume avec du méthanol

3.2.5. Solution fille à 0,04 µg/ml en DMZ, RNZ, MNZ : $SF_{0.04}$ (préparée tous les jours)

3.2.5.1. Pipetter 50 µl de SF_{20} dans une fiole de 25 ml

3.2.5.2. Ajuster le volume avec de l'eau

Solutions deutérées (stockées au réfrigérateur à l'abri de la lumière indéfiniment)

3.2.6. Solution mère de ronidazole deutéré à 10 µg/ml dans MeOH : SI

3.2.6.1. Placer l'ampoule à température ambiante pendant 30 min au moins à l'abri de la lumière

3.2.6.2. Ouvrir l'ampoule avec précaution

3.2.6.3. Ajouter 1 ml d'éthanol (haut degré de pureté) dans l'ampoule

3.2.6.4. Fermer l'ampoule avec un parafilm (pour éviter l'évaporation durant les étapes suivantes)

3.2.6.5. Agiter l'ampoule au Vortex durant au moins 1 min

3.2.6.6. Placer l'ampoule dans le bain à ultrasons pendant au moins 5 min

3.2.6.7. Pipetter la solution dans une fiole de 10 ml

3.2.6.8. Ajuster le volume avec du méthanol

3.2.7. Solution fille à 0,4 µg/ml en RNZ-d_3 : $SI_{0.4}$

3.2.7.1. Pipetter 400 µl de SI dans une fiole de 10 ml

3.2.7.2. Ajuster le volume avec du méthanol

3.3. Réactifs chimiques

3.3.1.	Méthanol	(Fisher M/4000)
3.3.2.	Acétonitrile pour CLHP	(Fisher A/0626)
3.3.3.	Isooctane	(Merck 1.04727)
3.3.4.	Acide formique	(Merck 1.00264)
3.3.5.	Di-potassium hydrogeno phosphate	(Merck 1.05099)
3.3.6.	Isohexane	(Fisher H/0411)
3.3.7.	Acétate d'éthyle	(Fisher E/0900)
3.3.8.	Eau ultrapure	(Milli-Q, Millipore)
3.3.9.	Ethanol	(Fisher E/0500DF)

3.4. Solutions

3.4.1. Tampon phosphate de potassium (0,5 mol/l, pH 8,8)

Peser 8,7 g de K_2HPO_4 dans une fiole de 100 ml puis ajouter ~ 90 ml d'eau et mettre quelques min dans une cuve à ultrasons jusqu'à dissolution. Ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau et vérifier que le pH est voisin de 8,8 (± 0,2).

3.4.2. Acide formique à 0,2 % dans l'eau (phase mobile)
Pipetter 1 ml d'acide formique dans une fiole de 500 ml et ajuster le volume avec de l'eau.

3.5. Gaz

3.5.1. Purificateur d'air (Claind)

3.5.2. Générateur d'azote (Claind)

3.5.3. Azote (Air liquide)

4. APPAREILLAGE

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

4.1. Matériel de laboratoire (extraction)

4.1.1. Tubes à centrifuger en polypropylène de 50 ml avec bouchon, type Corning VWR 430290

4.1.2. Fioles jaugées en verre

4.1.3. Balance de précision, type Mettler-Toledo PB302

4.1.4. Cuve à ultrasons, type Branson 2210

4.1.5. Pipettes automatiques volumes 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 500 µl, type Gilson ou Biohit

4.1.6. Cônes P5000, P1000 et P200, type Gilson ou Biohit

4.1.7. Agitateur pour tube à essai, type Vortex

4.1.8. Agitateur rotatif, type Heidolph Rheax II

4.1.9. Centrifugeuse, type Jouan MR 22

4.1.10. Centrifugeuse, type Jouan GR 422

4.1.11. Broyeur, type Blender Waring

4.1.12. Bain à sec pour évaporation sous N_2, type Prolabo

4.1.13. Tubes à fond rond de 5 ml en polypropylène, type CML TH5PRO

4.1.14. Tubes à fond conique de 2 ml, type Eppendorf C2EPLOCK

4.1.15. Flacons à injection à vis en polypropylène de 500 µl, type Interchim CH 963290

4.2. Appareillage chromatographique

4.2.1. Pompe CLHP : type Agilent 1100

4.2.2. Injecteur automatique : type Agilent 1100

4.2.3. Colonne C18 150 × 3,9 mm (5 µm, 100 A), type Waters Symmetry

4.2.4. Précolonne C18 2,1× 10 mm, type Waters Symmetry

4.3. Appareillage de spectrométrie de masse

4.3.1. Spectromètre de masse en tandem quadripolaire : type APPLIED BIOSYSTEMS API 4000

4.3.2. Interface Electrospray

4.3.3. Station d'acquisition de données, type Analyst 1.4

4.3.4. Imprimante

5 - ECHANTILLONS

5.1. Les échantillons d'aliments doivent être stockés à température ambiante à l'abri de la lumière

6 - MODE OPERATOIRE

*Selon les performances (en terme de sensibilité) du spectromètre de masse utilisé en détection, il est possible de prélever 20µl de phase aqueuse au lieu de 10µl (point **6.2.12**).*

6.1. Préparation des échantillons

Pour les granulés, les hydrater (7 ml d'eau pour 2 g) au moins 16h avant de faire la prise d'essai.
Pour les concassés, les broyer avant de faire la prise d'essai.
Pour les aliments moulus, passer directement au stade de la prise d'essai.

6.1.1. Echantillons à confirmer

6.1.1.1. Peser 2 ± 0,1 g d'aliment dans un tube en polypropylène de 50 ml

6.1.1.2. Ajouter 500 µl de RNZ-d_3 à 0,4 µg/ml ($SI_{0.4}$)

6.1.1.3. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.1.1.4. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.1.2. Echantillon blanc témoin

6.1.2.1. Peser 2 ± 0,1 g d'aliment témoin ne contenant pas de nitroimidazoles dans un tube en polypropylène de 50 ml

6.1.2.2. Ajouter 500 µl de RNZ-d_3 à 0,4 µg/ml ($SI_{0.4}$)

6.1.2.3. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.1.2.4. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.1.3. Echantillon blanc supplémenté à 1 mg/kg

6.1.3.1. Peser 2 ± 0,1 g d'aliment ne contenant pas de nitroimidazoles dans un tube en polypropylène de 50 ml

6.1.3.2. Ajouter 100 µl de SF_{20} + 500 µl de RNZ-d_3 à 0,4 µg/ml ($SI_{0.4}$) → *aliment supplémenté à 1 mg/kg*

6.1.3.3. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.1.3.4. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.1.4. Echantillons blancs supplémentés (gamme 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 mg/kg)

La gamme d'échantillons supplémentés nécessaire pour établir la courbe de calibration pour quantifier un échantillon positif doit comprendre au moins 3 points.

6.1.4.1. Peser 2 ± 0,1 g d'aliment ne contenant pas de nitroimidazoles dans un tube en polypropylène de 50 ml.

6.1.4.2. Supplémenter les aliments de la façon suivante*:*

2 g + 50 µl SF_{20} + 500 µl de RNZ-d_3 à 0.4 µg/ml ($SI_{0.4}$)→ *aliment supplémenté à 0,5 mg/kg.*

2 g + 100 µl SF_{20} + 500 µl de RNZ-d_3 à 0.4 µg/ml ($SI_{0.4}$)→ *aliment supplémenté à 1 mg/kg.*

2 g + 150 µl SF_{20} + 500 µl de RNZ-d_3 à 0.4 µg/ml ($SI_{0.4}$)→ *aliment supplémenté à 1,5 mg/kg.*

2 g + 200 µl SF_{20} + 500 µl de RNZ-d_3 à 0,4 µg/ml ($SI_{0.4}$)→ *aliment supplémenté à 2 mg/kg.*

6.1.4.3. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.1.4.4. Laisser en contact pendant 10 min à l'obscurité

6.2. <u>Extraction</u>

6.2.1. Ajouter 1,6 ml de tampon phosphate (0.5 mol/l, pH 8,8)

6.2.2. Agiter 20 s au Vortex à vitesse maximum

6.2.3. Ajouter 10 ml d'acétate d'éthyle

6.2.4. Agiter 15 s au Vortex à vitesse maximum

6.2.5. Agiter pendant 10 min à l'agitateur rotatif à 100 t/min

6.2.6. Centrifuger pendant 10 min à 4000 g à 5°C

6.2.7. Prélever 1 ml de la phase organique (supérieure) et transférer dans un tube de 5ml en polypropylène

6.2.8. Evaporer sous flux d'azote à 45°C jusqu'à l'obtention d'un résidu huileux

6.2.9. Reprendre avec 1 ml d'isooctane et 1 ml d'acide formique à 0,2 %

6.2.10. Agiter manuellement

6.2.11. Transférer dans un tube à fond conique et centrifuger à 17300 g pendant 2 min à 5°C

6.2.12. Prélever 10 µl de la phase aqueuse (phase inférieure) dans un flacon à injection et compléter à 1 ml avec l'acide formique à 0,2 %

6.2.13. Agiter pendant 10 s au Vortex à vitesse maximum

6.3. <u>Analyse CL-SM/SM</u>

6.3.1. Conditions chromatographiques :

6.3.1.1. Colonne 150 x 3,9 mm (5µm, 100 A), type Waters Symmetry C18, Précolonne C18 2,1 × 10 mm, type Waters Symmetry

6.3.1.2. Phase mobile :

Temps (min)	Acide formique 0.2% (%)	Méthanol (%)
0	90	10
2	60	40
5,5	60	40
6	90	10

6.3.1.3. Débit : 0,6 ml/min

6.3.1.4. Volume injecté : 100 µl

6.3.2. Conditions de détection (spectrométrie de masse) : Les conditions mentionnées ici concernent le spectromètre de masse APPLIED BIOSYSTEMS API 4000

6.3.2.1. Source : ESI en mode positif

6.3.2.2. Mode d'ionisation : Turbo IonSpray

6.3.2.3. Température de nébulisation (TEM): 700°C

6.3.2.4. Pression du gaz de nébulisation : 40 psi

6.3.2.5. Pression du gaz de désolvatation : 40 psi

6.3.2.6. Pression du gaz (Azote) dans la cellule de collision (CAD) : 2 (sans unité)

6.3.2.7. Pression du gaz rideau (CUR): 20 psi

6.3.2.8. Tension de capillaire : 5500 V

6.3.2.9. Détection en mode MRM :

2 transitions (ion parent → ion fils) sont sélectionnées pour identifier chaque nitroimidazole

	Parent ion > daughter ion	***Dwell (msec)***	***Col.Energy***
Ronidazole	201.0 > 110.0	70	25
	201.0 > 140.1	70	15
Dimetridazole	142.0 > 81.1	70	35
	142.0 > 96.0	70	20
Métronidazole	172.0 >128.0	70	20
	172.0 > 82.0	70	35
Ronidazole-d_3	204.1 > 143.0	70	15

6.3.3. Acquisition des résultats

6.3.3.1. La stratégie analytique est la suivante :

1 - Screening : Extraction des échantillons à doser + extraction d'un supplémenté à 1 mg/kg et d'un blanc témoin. Evaluation de la concentration de l'échantillon positif par rapport à l'échantillon supplémenté à 1 mg/kg.

2 - Confirmation : Si l'échantillon est suspect, extraction des échantillons à doser en double + extraction d'une gamme de supplémentés d'au moins 3 points et d'un blanc témoin. Dosage des échantillons positifs par rapport à la gamme d'étalonnage d'échantillons extraits.

6.3.3.2. **L'ordre d'injection est le suivant**

- Standard $SF_{0.04}$
- Échantillon blanc témoin
- Échantillon(s) supplémenté(s)
- Injection eau
- Échantillon(s) à analyser
- Échantillon blanc témoin
- Échantillon(s) supplémenté(s)

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 nitroimidazoles 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 la matrice (temps de rétention relatif : tolérance de ± 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 nitroimidazole est identifié par son temps de rétention et les transitions spécifiques correspondantes.

	DMZ	RNZ	MNZ	RNZ-d_3
Transitions spécifiques	142 > 81 142 > 96	201 > 110 201 > 140	172 > 128 172 > 82	204 > 143
temps de rétention de l'ordre de (min)	5,9	5,8	5,5	5,8

7.3. **Détermination de la concentration**

Le dosage est réalisé à partir des transitions suivantes :

DMZ	142 > 96
MNZ	172 > 128
RNZ	201 > 140
RNZ-d3 (standard interne)	204 > 143

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 mg/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.

Evaluation de la conformité de l'échantillon par rapport à la limite de décision CCα calculée selon la norme ISO 11843 à partir de la gamme de supplémentés.

7.4. **Conclusion**

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

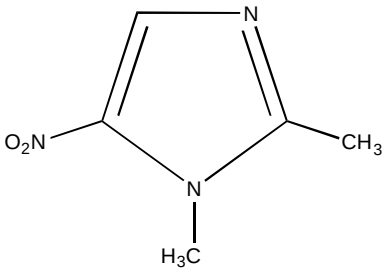
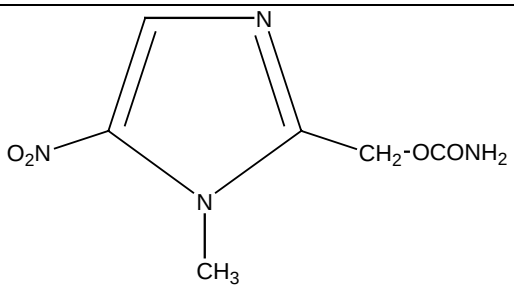
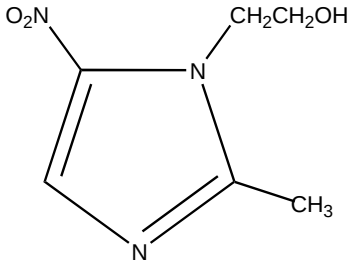
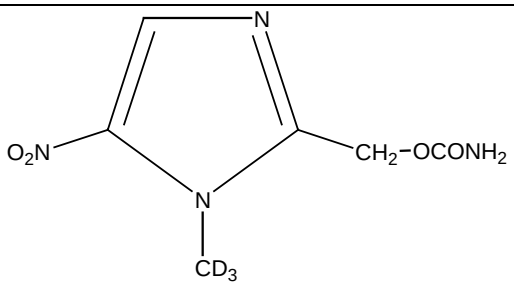
8. BIBLIOGRAPHIE

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).

3. Norme française NF ISO 11843-2, Septembre 2000 capacité de détection. Partie 2 : Méthodologie de l'étalonnage linéaire.

Structures des Nitroimidazoles

Dimétridazole		$C_5H_7N_3O_2$ 141
Ronidazole		$C_6H_8N_4O_4$ 200
Métronidazole		$C_6H_9N_3O_3$ 171
Ronidazole deutéré		$C_6H_5D_3N_4O_4$ 203