

Méthode d'analyse en sécurité sanitaire des aliments

RÉFÉRENCE : ANSES/LMV/25/02 - Version 1

Octobre 2025

Méthode de détection et de dosage de cinq résidus de métabolites de nitrofuranes dans le miel par CL-SM/SM

Laboratoire de Fougères

**Laboratoire national de référence
Résidus de médicaments vétérinaires et
colorants dans les denrées alimentaires
d'origine animale et aliments pour
animaux**

Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
0	-	Juillet 2025	Version validation.
1	-	Octobre 2025	Intégration des résultats de validation.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de Fougères

Laboratoire National de Référence Résidus de médicaments vétérinaires

Adresse : 10B, rue Claude Bourgelat - JAVENÉ - 35133 FOUGÈRES (France)

Contacts : LNR RMV – lnr-rmv@anses.fr

GUICHARD Pierre – pierre.guichard@anses.fr

HURTAUD-PESSEL Dominique – dominique.pessel@anses.fr

HEDOU Céline – celine.hedou@anses.fr

VERDON Eric – eric.verdon@anses.fr

La présente méthode a été optimisée, caractérisée et validée par l'unité Analyse des Résidus et Contaminants (ARC) du Laboratoire de Fougères.

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	7
Avertissements et précautions de sécurité	8
1. Objet et domaine d'application	9
2. Documents de référence	10
3. Termes, sigles et définitions	11
4. Principe de la méthode	12
5. Réactifs	14
5.1 Eau	14
5.1.1 Eau ultrapure (Milli-Q-IQ-7000, Millipore).....	14
5.2 Gaz.....	14
5.3 Réactifs [n° CAS]	14
5.4 Solutions.....	15
5.5 Standards et préparation des solutions mères	17
5.6 Solutions standards intermédiaires en mélange.....	19
6. Appareillage et matériels	20
6.1 Matériel de laboratoire (supplémentation et extraction).....	20
6.2 Appareillage et matériel de chromatographie	21
6.3 Appareillage de spectrométrie de masse	21
7. Echantillons	22
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons avant analyse	22
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	22
7.3 Préparation des échantillons avant analyse	22
8. Mode opératoire	23
8.1 Echantillons à analyser	23
8.2 Echantillons QC	23
8.3 Gamme d'échantillons supplémentés	24
8.4 Dérivation	24
8.5 Extraction des dérivés nitrophénylés.....	25
8.6 Purification des extraits.....	25
8.7 Reprise des résidus contenant les dérivés nitrophénylés	25

9. Résultats	28
9.1 Contrôle de la validité des résultats	28
9.2 Calculs et expression des résultats	29
9.3 Décision finale – Conformité de l'échantillon	32
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	33
10.1 Performances de justesse de la méthode	33
10.2 Performances de fidélité de la méthode	34
Annexes.....	35
Bibliographie.....	38

Table des figures

FIGURE 1 : SCHEMA REACTIONNEL D'OBTENTION DU DERIVE NITROPHENYLE DU RESIDU LIE D'AOZ.....	12
---	----

Table des tableaux

TABLEAU 1 : COMPOSES STANDARDS UTILISES POUR LA PREPARATION DES SOLUTIONS MERES DE STANDARDS	17
TABLEAU 2 : COMPOSES STANDARDS UTILISES POUR LA PREPARATION DES SOLUTIONS MERES DE STANDARDS INTERNES.....	18
TABLEAU 3 : PREPARATION DES SOLUTIONS STANDARDS INTERMEDIAIRES.....	19
TABLEAU 4 : PREPARATION DE LA SOLUTION EN STANDARDS INTERNES INTERMEDIAIRES	19
TABLEAU 5 : PREPARATION DE LA GAMME D'ECHANTILLONS SUPPLEMENTES	24
TABLEAU 6 : GRADIENT D'ELUTION DE LA PHASE MOBILE.....	26
TABLEAU 7 : PARAMETRES DE DETECTION COMPOSES DEPENDANTS.....	27
TABLEAU 8 : PLAGES DE CONCENTRATIONS LIMITES ($\mu\text{G}/\text{KG}$) POUR LE QC3.....	28
TABLEAU 9 : PARAMETRES D'IDENTIFICATION COMPOSES DEPENDANTS.....	29
TABLEAU 10 : CCB OBTENUS LORS DE LA VALIDATION ($\mu\text{G}/\text{KG}$)	30
TABLEAU 11 : TRANSITIONS D'INTERETS ET STANDARDS INTERNES UTILISES POUR LE DOSAGE	30
TABLEAU 12 : ETALONNAGE ET DOMAINE DE VALIDITE SELON LES MATRICES	31
TABLEAU 13 : CCA OBTENUS LORS DE LA VALIDATION ($\mu\text{G}/\text{KG}$)	32
TABLEAU 14 : DONNEES DE JUSTESSE OBTENUES LORS DE LA VALIDATION.....	33
TABLEAU 15 : DONNEES DE FIDELITE OBTENUES LORS DE LA VALIDATION	34

Introduction

Les nitrofuranes (furazolidone, furaltadone, nitrofurantoïne, nitrofurazone et nifursol) sont inscrits dans le tableau 2 (substances interdites) du règlement de la Commission (UE) 37/2010 du 22/12/2009. En conséquence, aucun résidu de ces molécules ne doit être présent dans les denrées d'origine animale. Dans le miel, la détection de la furazolidone, nitrofurantoïne, furaltadone, nitrofurazone et nifursol est basée sur la présence de leur composé marqueur de la chaîne latérale respectivement : 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 1-amino-2,4-imidazolidinedione (AHD), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), semicarbazide (SEM) et 3,5-dinitrosalisyllic acid hydrazide (DNSH).. Les résidus marqueurs alors identifiés sont :

- Le 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) pour la furazolidone,
- Le 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ) pour la furaltadone,
- Le 1-amino-2,4-imidazolidinedione (AHD) pour la nitrofurantoïne,
- Le semicarbazide (SEM) pour la nitrofurazone,
- Le 3,5-dinitrosalisyllic acid hydrazide (DNSH) pour le nifursol.

Ces résidus marqueurs sont détectés par CL-SM/SM après dérivation sous forme de dérivés nitrophénylés.

La Réglementation (UE) 2019/1871 du 7 Novembre 2019 fixe la RPA (Reference Point for Action – Valeur de Référence) à 0,5 µg/kg, applicable depuis le 28 novembre 2022.

Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

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. Toutes les précautions nécessaires devront être prises lors de la manipulation des standards (pesées sous hotte, port de gants...). Il est important de bien vérifier les risques associés à chaque produit avant de les utiliser, en particulier pour les substances standards (mentions de danger en Annexe 2).

Les nitrofuranes étant photosensibles, il convient de prendre les précautions nécessaires durant la préparation et l'analyse pour protéger les échantillons et les extraits de la lumière du jour.

1. Objet et domaine d'application

La présente méthode est utilisable pour le dépistage et le dosage d'AOZ, d'AMAZ, d'AHD, de SEM et de DNSH dans le miel par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM).

La confirmation de la présence de ces cinq analytes est réalisable à des niveaux de concentrations $<0,5 \mu\text{g/kg}$, permettant ainsi de répondre favorablement à l'abaissement de la RPA récemment adoptée par la Commission Européenne [6], et conformément au Règlement d'exécution (EU) 2021/808 en vigueur [2].

La capacité de détection de la méthode ($CC\beta$) est définie dans le Tableau 10. Les limites de décision aux fins de confirmation ($CC\alpha$) sont définies dans le Tableau 13. Le domaine d'étalonnage est indiqué dans le Tableau 12.

2. Documents de référence

- [1] Règlement (UE) 2017/625 du Parlement Européen et du Conseil du 15 mars 2017. Journal Officiel de l'Union Européenne. L95 : 1-142.
- [2] Règlement d'exécution (UE) 2021/808 de la Commission du 22 mars 2021. Journal Officiel de l'Union Européenne. L180 : 84-109.
- [3] EURL Guidance Document on Confirmation Method Validation, Version 1.1 du 25 novembre 2021
- [4] F/RD//GU/006 version 01 du 18/11/2022 : Guide de validation des méthodes analytiques de dépistage et confirmation de résidus de substances pharmacologiquement actives par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse tandem et haute résolution. Document interne au Laboratoire de Fougères
- [5] Règlement (UE) N° 37/2010 de la commission du 22 décembre 2009, Journal Officiel de l'Union Européenne. L 15 : 1-72.
- [6] Commission Européenne. « Règlement (UE) 2019/1871 de la Commission du 7 Novembre 2019 relatif aux valeurs de référence pour les substances pharmacologiquement actives non autorisées présentes dans les denrées alimentaires d'origine animale et abrogeant la décision 2005/34-CE ». Journal Officiel de l'Union Européenne. L289 : 41-46.
- [7] Guide français d'application du Règlement d'exécution (UE) 2021/808, Version 02, 15/04/2025, Anses, Laberca.
- [8] Règlement d'exécution (UE) 2024/2052 de la Commission du 30 juillet 2024 modifiant le règlement d'exécution (UE) 2021/808 en ce qui concerne son champ d'application et certains critères de performance des méthodes d'analyse des résidus de substances pharmacologiquement actives utilisées chez les animaux producteurs d'aliments. Journal Officiel de l'Union Européenne. L : 1-9.
- [9] Commission Européenne. « Règlement délégué (UE) 2022/1644 de la Commission du 7 juillet 2022 complétant le règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil par des exigences spécifiques pour la réalisation des contrôles officiels de l'utilisation des substances pharmacologiquement actives autorisées en tant que médicaments vétérinaires ou en tant qu'additifs destinés à l'alimentation des animaux et des substances pharmacologiquement actives interdites ou non autorisées et de leurs résidus ». Journal Officiel de l'Union Européenne. L248 : 3-17.
- [10] Commission Européenne. « Règlement d'exécution (UE) 2022/1646 de la Commission du 23 septembre 2022 relatif aux modalités uniformes de réalisation des contrôles officiels en ce qui concerne l'utilisation des substances pharmacologiquement actives autorisées en tant que médicaments vétérinaires ou en tant qu'additifs destinés à l'alimentation des animaux et des substances pharmacologiquement actives interdites ou non autorisées et de leurs résidus, ainsi qu'au contenu spécifique des plans de contrôle nationaux pluriannuels et aux modalités spécifiques de leur élaboration » Journal Officiel de l'Union Européenne. L248 : 32-45.

3. Termes, sigles et définitions

CC α : Limite de décision. Limite à partir de laquelle il est permis de conclure avec une probabilité d'erreur α qu'un échantillon est non conforme, la valeur $1 - \alpha$ désignant la certitude statistique en pourcentage que la limite autorisée a été dépassée. Dans le cas des substances interdites, le seuil alpha est fixé à 1% et calculé selon la méthode 3 décrite au paragraphe 2.6.1.c du Règlement (EU) 2021/808.

CC β : Capacité de détection. Plus petite concentration pouvant être détectée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur β . Dans le cas des substances interdites, le seuil beta est fixé à 5% et calculé selon la méthode 2 décrite au paragraphe 2.7.1.b du Règlement (EU) 2021/808.

CL-SM/SM : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

EC : Energie de Collision

ESI : Source d'ionisation par électrospray

MRM : Multiple Reaction Monitoring

RPA : Reference Point for Action (Regulation (EU) 2019/1871) aussi appelée dans sa version française : Valeur de Référence (Règlement (UE) 2019/1871). Il s'agit de la teneur minimale en analyte dans un échantillon qui doit pouvoir être détectée et confirmée. Cette valeur de référence vise à harmoniser les performances analytiques des laboratoires impliqués dans l'analyse d'échantillons officiels pour la recherche de résidus de substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été fixée.

SIs : Standards Internes

4. Principe de la méthode

La méthode repose sur les étapes suivantes :

- Extraction des métabolites et dérivation simultanée en milieu acide avec le 2-nitrobenzaldéhyde (2-NBA) ;
- Extraction des produits dérivés : 2-NP-AOZ, 2-NP-AMoz, 2-NP-AHD, 2-NP-SEM et 2-NP-DNSH par l'acétate d'éthyle ;
- Purification par SPE ;
- Concentration des échantillons via une phase d'évaporation à sec et de reprise des extraits ;
- Injection et analyse par CL-SM/SM.

Au cours de la préparation des échantillons, les métabolites recherchés sont dérivés en leurs analogues nitrophénylés à l'aide du 2-nitrobenzaldéhyde (2-NBA). En effet, les dérivés nitrophénylés permettent d'améliorer la détection par spectrométrie de masse en tandem (fragmentation plus spécifique, augmentation de la sensibilité). Leur détection est réalisée par couplage avec une interface d'ionisation en mode positif (ESI⁺) pour les dérivés nitrophénylés de l'AOZ, l'AMoz, l'AHD et le SEM. Le dérivé nitrophénylé du DNSH est ionisé en mode négatif (ESI⁻). Des standards internes isotopiquement marqués sont utilisés pour le dosage des cinq analytes :

- Pour l'AOZ : l'AOZ-d₄ (isotope deutéré quatre fois de l'AOZ),
- Pour l'AMoz : l'AMoz-d₅ (isotope deutéré cinq fois de l'AMoz),
- Pour l'AHD : l'AHD-¹³C₃ (isotope marqué de l'AHD intégrant trois ¹³C),
- Pour le SEM : pas de standard interne, utilisé uniquement pour les contrôles qualité.
- Pour le DNSH : le DNSH-¹³C₆ (isotope marqué du DNSH intégrant six ¹³C).

La Figure 1 présentée ci-dessous illustre la première étape du protocole d'analyse permettant de libérer les résidus marqueurs liés aux protéines et d'obtenir leurs dérivés nitrophénylés en milieu acide avec le 2-NBA à partir d'un résidu lié d'AOZ. L'annexe 1 présente la structure des cinq nitrofuranes concernés par la méthode de confirmation, associés à leur métabolite marqueur et dérivé nitrophénylé respectif.

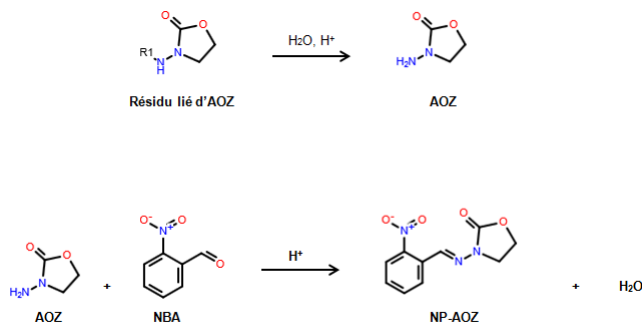


Figure 1 : Schéma réactionnel d'obtention du dérivé nitrophénylé du résidu lié d'AOZ

L'acquisition du signal est réalisée en mode MRM et la caractérisation de chaque analyte est révélée par le suivi de deux transitions MRM, tel que défini dans le Règlement (UE) 2021/808. Ainsi, la séparation chromatographique associée aux deux transitions MRM, permet d'obtenir les cinq points d'identification nécessaires pour les substances interdites. La quantification est réalisée par étalonnage interne en utilisant des standards analogues isotopiquement marqués, à partir d'une gamme d'étalonnage préparée au sein d'une matrice témoin supplémentée (excepté pour le SEM).

5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.1 Eau

5.1.1 Eau ultrapure (Milli-Q-IQ-7000, Millipore)

5.2 Gaz

5.2.1 Air purifié : gaz de nébulisation et séchage

5.2.2 Azote pur à 99,995 % (Air Liquide) : gaz rideau et de collision

5.3 Réactifs [n° CAS]

5.3.1	2-NBA [552-89-6]	(Thermo Scientific, 128400250)
5.3.2	Acétate d'éthyle [141-78-6]	(Fisher Scientific, E/0900/17)
5.3.3	Acide acétique 100% [64-19-7]	(VWR, 20104.298)
5.3.4	Acide chlorhydrique 37% [7647-01-0]	(Merck, 1.00317)
5.3.5	Acétate d'ammonium [631-61-8]	(Merck, 1.01116)
5.3.6	Acétonitrile [75-05-8]	(Fisher, A/0626/17)
5.3.7	Di-hydrogénophosphate de potassium [7778-77-0]	(Merck, 1.04873.1000)
5.3.8	Di-potassium hydrogénophosphate anhydre [7758-11-4]	(VWR, 26931.263)
5.3.9	Méthanol (Reagent Grade) [67-56-1]	(Fisher, M/4000/17)
5.3.10	Méthanol (Optima) [67-56-1]	(Fisher, A456-212)

5.4 Solutions

5.4.1 2-nitrobenzaldéhyde 50 mM (2-NBA) :

Peser 189 ± 1 mg de 2-nitrobenzaldéhyde dans une fiole ambrée et compléter à 25 mL avec du méthanol (5.3.9).

5.4.2 Acide chlorhydrique 1M :

Pipeter 8,33 mL d'acide chlorhydrique 37 % (5.3.4) et introduire dans une fiole de 100 mL contenant au moins 80 ml d'eau ultrapure (5.1.1), puis compléter au trait de jauge avec de l'eau ultrapure (5.1.1).

5.4.3 Acétate d'ammonium 0,5 M :

5.4.3.1 Solution aqueuse :

Peser $3,8 \pm 0,1$ g d'acétate d'ammonium (5.3.5) dans une fiole de 100 mL et dissoudre avec de l'eau ultrapure (5.1.1) jusqu'au trait de jauge.

5.4.3.2 Solution organique :

Peser $3,8 \pm 0,1$ g d'acétate d'ammonium (5.3.5) dans une fiole de 100 mL et dissoudre avec du méthanol (5.3.10) jusqu'au trait de jauge.

5.4.4 Acide acétique 1 % :

5.4.4.1 Solution aqueuse :

Pipeter 1 mL d'acide acétique (5.3.3) dans une fiole de 100 mL et ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultrapure (5.1.1).

5.4.4.2 Solution organique :

Pipeter 1 mL d'acide acétique (5.3.3) dans une fiole de 100 mL et ajuster au trait de jauge avec du méthanol (5.3.10).

5.4.5 Mélange Acétate d'ammonium 2 mM / Acétonitrile (60/40) :

Dans une fiole de 100 mL, ajouter 400 μ L de solution aqueuse d'acétate d'ammonium 0,5 M (5.4.3.1). A l'aide d'une éprouvette ajouter 40 mL d'acétonitrile (5.3.6) puis compléter avec de l'eau ultrapure (5.1.1) jusqu'au trait de jauge.

5.4.6 Mélange Eau/MeOH (60/40 v/v)

A l'aide d'une éprouvette graduée, mélanger 60 mL d'eau ultrapure (5.1.1) et 40 mL de méthanol (5.3.9).

5.4.7 Mélange Eau/MeOH (40/60 v/v)

A l'aide d'une éprouvette graduée, mélanger 40 mL d'eau ultra-pure (5.1.1) et 60 mL de méthanol (5.3.9).

5.4.8 Mélange Eau/MeOH (10/90 v/v)

A l'aide d'une éprouvette graduée, mélanger 10 mL d'eau ultra-pure (5.1.1) et 90 mL de méthanol (5.3.9).

5.4.9 Phase mobile aqueuse : acétate d'ammonium 2 mM + acide acétique 0,01 %

Dans une fiole de 1 L, introduire 4 mL de solution aqueuse d'acétate d'ammonium à 0,5 M (5.4.3.1) et 10 mL de solution aqueuse d'acide acétique à 1 % (5.4.4.1). Compléter au trait de jauge avec de l'eau ultrapure (5.1.1). Préparer fraîchement avant chaque analyse.

5.4.10 Phase mobile organique : acétate d'ammonium 2 mM + acide acétique 0,01 %

Dans une fiole de 1 L, introduire 4 mL de solution organique d'acétate d'ammonium à 0,5 M (5.4.3.2) et 10 mL de solution organique d'acide acétique à 1 % (5.4.4.2). Compléter au trait de jauge avec du méthanol (5.1.10). Préparer fraîchement avant chaque analyse.

5.5 Standards et préparation des solutions mères

5.5.1 Solutions mères des cinq métabolites de nitrofuranes

Les solutions mères (SM) sont préparées indépendamment pour chacune des molécules.

Peser la quantité de poudre nécessaire pour obtenir les solutions mères à la concentration en substance active indiquée dans le Tableau 1 dans une fiole ambrée et dissoudre avec du méthanol (5.3.9), compléter au trait de jauge. Mettre les fioles aux ultrasons. Après dissolution totale, les solutions sont ensuite transférées dans des flacons en polypropylène ambrés à l'abri de la lumière et stockées au réfrigérateur entre +2°C et +8°C pendant 1 an maximum.

Tableau 1 : Composés standards utilisés pour la préparation des solutions mères de standards

Composés	Fournisseur (référence)	N° CAS	Concentration	Solvant	Conditions de stockage	Durée de conservation
3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	LGC (DRE-C10209000)	[80-65-9]	1 mg/mL	Méthanol	+2°C à +8°C	1 an
3-amino-5-morpholinométhyl-2-oxazolidinone (AMoz)	Witega (NF003)	[43056-63-9]	1 mg/mL	Méthanol	+2°C à +8°C	1 an
1-amino-2,4-imidazolidinedione chlorhydrate (AHD)	LGC (DRE-C10203200)	[2827-56-7]	1 mg/mL	Méthanol	+2°C à +8°C	1 an
Semicarbazide hydrochloride (SEM)	LGC (DRE-C16933500)	[563-41-7]	1 mg/mL	Méthanol	+2°C à +8°C	1 an
3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH)	WITEGA (NF028)	[955-07-7]	0,04 mg/mL*	Méthanol	+2°C à +8°C	1 an

* Solutions mères individuelles à 1 mg/mL pour chacun des composés, excepté pour le DNSH dont la solution mère est réalisée à 0,04 mg/mL en raison d'une solubilité partielle à des concentrations plus élevées.

5.5.2 Solutions mères des cinq standards internes

Les solutions mères (SM) sont préparées indépendamment pour chacune des molécules.

Peser la quantité de poudre nécessaire pour obtenir les solutions mères à la concentration en substance active indiquée dans le Tableau 2 dans une fiole ambrée et dissoudre avec du méthanol (5.3.9), compléter au trait de jauge. Mettre les fioles aux ultrasons. Après dissolution totale, les solutions sont ensuite transférées dans des flacons en polypropylène ambrés à l'abri de la lumière et stockées au réfrigérateur entre +2°C et +8°C jusqu'à épuisement.

Tableau 2 : Composés standards utilisés pour la préparation des solutions mères de standards internes

Composés	Fournisseur (référence)	N° CAS	Concentration	Solvant	Conditions de stockage	Durée de conservation
3-amino-2-oxazolidinone-d₄ (AOZ-d₄)	Witega (NF006)	[1188331-23-8]	0,1 mg/mL	Méthanol	+2°C à +8°C	Indéfiniment
3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone-d₅ (AMOZ-d₅)	Witega (NF004)	[1017793-94-0]	0,1 mg/mL	Méthanol	+2°C à +8°C	Indéfiniment
1-amino-2,4-imidazolidinedione-¹³C₃ (AHD-¹³C₃)	Witega (NF002)	[957509-31-8]	0,1 mg/mL	Méthanol	+2°C à +8°C	Indéfiniment
Semicarbazide-¹³C¹⁵N₂ (SEM-¹³C¹⁵N₂)	Witega (NF008)	[1173020-16-0]	0,1 mg/mL	Méthanol	+2°C à +8°C	Indéfiniment
3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide-¹³C₆ (DNSH-¹³C₆)	Witega (NF029)	[CAS] Non Disponible	0,04 mg/mL*	Méthanol	+2°C à +8°C	Indéfiniment

* Solutions mères individuelles à 0,1 mg/mL pour chacun des composés, excepté pour le DNSH-¹³C₆ dont la solution mère est réalisée à 0,04 mg/mL en raison d'une solubilité partielle à des concentrations plus élevées.

5.6 Solutions standards intermédiaires en mélange

5.6.1 Solution fille intermédiaire mixte des cinq métabolites de résidus de nitrofuranes à 0,1 µg/ml : SF 0,1 µg/mL

Les solutions filles (SF) intermédiaires des cinq métabolites de nitrofuranes sont préparées en mélange dans le méthanol (5.3.9) et conservées dans des flacons en polypropylène ambrés à l'abri de la lumière et stockées au réfrigérateur entre +2°C et +8°C. La solution fille intermédiaire à 0,01 mg/mL se conserve 6 mois. La solution fille intermédiaire à 0,1 µg/mL se conserve 2 mois.

Tableau 3 : Préparation des solutions standards intermédiaires

	SF 0,01 mg/mL A préparer dans une fiole de 100 mL	SF 0,1 µg/mL A préparer dans une fiole de 100 mL
AOZ	1 mL de la SM à 1 mg/mL	1 mL de la SF 0,01 mg/mL
AMOZ	1 mL de la SM à 1 mg/mL	
AHD	1 mL de la SM à 1 mg/mL	
SEM	1 mL de la SM à 1 mg/mL	
DNSH	Non préparée	250 µL de la SM à 0,04 mg/mL

5.6.2 Solution fille intermédiaire mixte des cinq standards internes à 1 µg/ml : SF SI 1 µg/mL

La solution fille (SF) intermédiaire mixte des cinq standards internes (SI) est préparée dans le méthanol (5.3.9) et conservée dans un flacon en polypropylène ambré à l'abri de la lumière et stocké au réfrigérateur entre +2°C et +8°C pendant 6 mois.

Tableau 4 : Préparation de la solution en standards internes intermédiaires

	SF SI 1 µg/mL A préparer dans une fiole de 100 mL
AOZ-d₄	1 mL de la SM à 0,1 mg/mL
AMOZ-d₅	1 mL de la SM à 0,1 mg/mL
AHD-13C₃	1 mL de la SM à 0,1 mg/mL
SEM-¹³C¹⁵N₂	1 mL de la SM à 0,1 mg/mL
DNSH-¹³C₆	2,5 mL de la SM à 0,04 mg/mL

5.7 Solutions standards de travail en mélange

5.7.1 Solution de supplémentation mixte des cinq résidus de métabolites de nitrofuranes à 5 ng/mL

Dans une fiole ambrée de 20 mL, introduire 1 mL de la solution fille à 0,1 µg/mL (5.6.1) et compléter avec du méthanol (5.3.9). Cette solution est réalisée le jour même de l'analyse avant supplémentation de la matrice étudiée.

5.7.2 Solution de supplémentation mixte des cinq standards internes à 0,1 µg/mL

Dans une fiole ambrée de 10 mL introduire 1 mL de la solution fille intermédiaire à 1 µg/mL (5.6.2) et compléter avec du méthanol (5.3.9). Cette solution est réalisée le jour même de l'analyse avant supplémentation de la matrice.

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

6.1 Matériel de laboratoire (supplémentation et extraction)

- 6.1.1 Tubes à centrifuger Nunc de 50 mL
- 6.1.2 Tubes en polypropylène de 10 mL
- 6.1.3 Distributeurs de solvants à volume variable (Socorex)
- 6.1.4 Sabots de pesées en verre
- 6.1.5 Balances de précision (résolution \leq 10 mg)
- 6.1.6 Balance analytique (résolution \leq 0,1 mg)
- 6.1.7 Fioles jaugées et fioles jaugées ambrées
- 6.1.8 Eprouvettes graduées
- 6.1.9 Cuve à ultrasons
- 6.1.10 Pipettes automatiques de laboratoire et cônes correspondants (Gilson-Biohit-Sartorius)
- 6.1.11 Agitateur (type Vortex)
- 6.1.12 Agitateur rotatif type Reax II (Heidolph)
- 6.1.13 Centrifugeuse à réfrigération type GR4.22 (Jouan)
- 6.1.14 Système d'évaporation chauffant sous flux d'azote (Toulemonde)
- 6.1.15 Seringues à filtration de 1 mL (Terumo)
- 6.1.16 Filtres de 0,45 µm, diamètre de 13 mm, en PVDF Millex-HV (Millipore)
- 6.1.17 Microvials de 300 µL en polypropylène avec bouchons avec joints intégrés de 8mm

- 6.1.18 Pipettes pasteur 7 mL non-stériles graduées 3 mL (VWR)
- 6.1.19 Bain d'eau chauffant type Polytest 20 (Bioblock)
- 6.1.20 Flacons en polypropylène ambrés de différents volumes
- 6.1.21 Flacons en polypropylène de 20 mL
- 6.1.22 Cartouches Strata-X (60 mg ; 3 mL) (Phenomenex, 8B-S100-UBJ)
- 6.1.23 Cuve à vide & petit matériel (aiguille, robinet) pour SPE
- 6.1.24 Tubes en verre de 5 mL

6.2 Appareillage et matériel de chromatographie

- 6.2.1 Chaîne Nexera (Shimadzu) comprenant les éléments suivants :
 - Pompe CLHP : Deux pompes binaires LC-40D XR, volume mort : 170 µL
 - Contrôleur : CMB-40
 - Sélecteur de solvants : FCV-11AL
 - Dégazeur de solvants en ligne : DGU-405
 - Injecteur automatique : SIL-40C XR
 - Four à colonne : CTO-40C
- 6.2.2 Précolonne C18 : 3 µm, 4 x 2,0 mm (Phenomenex AJO-4286),
- 6.2.3 Colonne Kinetex Biphényl : 2,6 µm, 100 x 2,1 mm (Phenomenex 00D-4622-AN)).

6.3 Appareillage de spectrométrie de masse

- 6.3.1 Spectromètre de masse en tandem de type quadripolaire : API 6500+ (Sciex).
- 6.3.2 Interface : Electrospray chauffée (HESI).
- 6.3.3 Vanne de dérivation Valco ou équivalent
- 6.3.4 Logiciels de pilotage et configuration : SciexOS.

7. Echantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons avant analyse

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Les échantillons de miel sont conservés à environ +4°C dès leur arrivée au laboratoire et ce, jusqu'à préparation avant l'analyse.

7.3 Préparation des échantillons avant analyse

Sans objet

8. Mode opératoire

Dans le cadre d'une analyse de dépistage : réaliser l'analyse des échantillons officiels, d'un QC supplémenté (QC2) ainsi que d'un blanc matrice (QC1) et d'un blanc réactif (QC-BR).

Dans le cadre d'une analyse de confirmation : réaliser l'analyse en double des échantillons suspects, d'une gamme de calibration d'échantillons supplémentés tel que décrit au paragraphe 8.3, d'un blanc réactif (QC-BR), d'un blanc matrice (QC1), et de deux QC supplémentés (QC2 et QC3) puis dérivation, extraction et dosage. L'échantillon correspondant au premier point de gamme supplémenté (selon le couple analyte/matrice, tel que défini dans le Tableau 12), est utilisé comme contrôle qualité (QC2).

8.1 Echantillons à analyser

- 8.1.1 Peser $1 \pm 0,02$ g de matrice homogénéisée dans un tube de 50 mL. Pour les miels solides, il est possible de placer un aliquot au bain-marie à environ 37°C afin de faciliter l'homogénéisation et la prise d'essai.
- 8.1.2 Ajouter 25 µL de la solution de supplémentation contenant les cinq standards internes (5.7.2). Continuer la procédure d'extraction des échantillons à confirmer au point 8.4 (dérivation). Dans le cas d'une confirmation, la gamme d'échantillons supplémentés et l'échantillon blanc de matrice sont traités au point 8.3.

8.2 Echantillons QC

- 8.2.1 Blanc réactif (QC-BR) : ajouter 1 mL d'eau ultra-pure dans un tube de 50 mL et poursuivre le mode opératoire au point 8.4.
- 8.2.2 Blanc matrice (QC1) : peser $1 \pm 0,02$ g de matrice homogénéisée dans un tube de 50 mL. Dans le cas d'une analyse de confirmation, utiliser le même lot que la matrice utilisée pour la gamme d'échantillons supplémentés (8.3). Poursuivre au point 8.4.
- 8.2.3 Supplémenté au niveau CC β (QC2) : peser $1 \pm 0,02$ g de matrice homogénéisée dans un tube de 50 mL. Supplémenter au niveau CC β tel que décrit dans le Tableau 5. Dans certains cas, le CC β est fixée à 0,10 µg/kg ou 0,25 µg/Kg selon les couples analytes-matrices. Il convient donc, le cas échéant, de réaliser deux QC2 (0,10 et 0,25 µg/Kg). Poursuivre au point 8.4.
- 8.2.4 Supplémenté au niveau RPA (QC3) : peser $1 \pm 0,02$ g de matrice homogénéisée dans un tube de 50 mL. Utiliser un lot de matrice différent de celui qui est utilisé pour la gamme d'échantillons supplémentés (8.3). Supplémenter au niveau RPA tel que décrit dans le Tableau 5. Poursuivre au point 8.4.

8.3 Gamme d'échantillons supplémentés

- 8.3.1** Peser $1 \pm 0,02$ g de matrice homogénéisée ne contenant pas de nitrofuranes dans un tube de 50 mL.
- 8.3.2** Ajouter les volumes de solution de supplémentation contenant les cinq nitrofuranes à 5 ng/mL (5.7.1) et de solution de supplémentation contenant les cinq standards internes (SIs) à 0,1 µg/mL (5.7.2) indiqués dans le Tableau 5 présenté ci-dessous. Continuer la procédure d'extraction des échantillons supplémentés au point 8.4 (dérivation).

Tableau 5 : Préparation de la gamme d'échantillons supplémentés

Concentration des échantillons supplémentés (AOZ-AMAZ-AHD-SEM-DNSH) (µg/kg)	Volume de solution contenant les cinq nitrofuranes à 5 ng/mL (µL)	Volume de solution contenant les cinq SIs à 0,1 µg/mL (µL)
0,00	0	25
0,10*	20	25
0,25	50	25
0,35*	70	25
0,50	100	25
0,75	150	25

* Dans le cas des couples analyte-matrice où le CCβ est fixé à 0,25 µg/kg (AHD et SEM) le niveau à 0,10 µg/kg n'est pas utilisé pour construire la courbe d'étalonnage et est remplacé par le niveau à 0,35 µg/kg. Pour les autres couples analyte-matrice non mentionnés dans ce paragraphe, le niveau à 0,35 µg/kg n'est pas utilisé. Se référer au Tableau 12 pour plus de détails.

8.4 Dérivation

- 8.4.1** Ajouter 4 mL d'eau (5.1.1), 0,5 mL d' HCl 1 M (5.4.2) et 150 µL de solution de dérivation au 2-NBA (5.4.1).
- 8.4.2** Boucher et agiter 10 secondes au Vortex.
- 8.4.3** Protéger de la lumière et placer dans un bain d'eau thermostaté.
- 8.4.4** Laisser incuber environ 16 heures (1 nuit) à environ +37°C.

Note : Pour certains miels, dont la viscosité est très importante, il est préférable d'homogénéiser les échantillons après 30 minutes d'incubation à environ +37°C.

8.5 Extraction des dérivés nitrophénylés

- 8.5.1** Ajouter $1,5 \pm 0,05$ g de di-potassium hydrogénophosphate (5.3.8) et $1,5 \pm 0,05$ g de di-hydrogénophosphate de potassium (5.3.7).
- 8.5.2** Ajouter 5 mL d'acétate d'éthyle (5.3.2) et agiter à l'Heidolph pendant 20 min à environ 100 trs/min.
- 8.5.3** Centrifuger pendant 10 min à 3000 g sous réfrigération à environ +4°C.
- 8.5.4** Transférer le surnageant dans un tube en polypropylène de 10 mL
- 8.5.5** Ré-extraire par 3 mL d'acétate d'éthyle et agiter à l'Heidolph pendant 20 min à environ 100 trs/min.
- 8.5.6** Centrifuger pendant 10 min à 3000 g sous réfrigération à environ +4°C.
- 8.5.7** Transférer le surnageant dans le même tube en polypropylène de 10 mL.
- 8.5.8** Evaporer jusqu'à sec (résidus huileux) sous flux d'azote à environ +45°C.

8.6 Purification des extraits

- Reprendre les résidus par 1 mL de mélange Eau/Méthanol (60/40) (5.4.6). Placer dans une cuve à ultrasons pendant environ 1 minute, vortexer, puis centrifuger à 5500 g pendant 10 minutes à environ +4°C.
- Placer les cartouches Strata-X (60 mg) (6.1.22) sur une cuve à vide et conditionner successivement par 2 mL de méthanol (5.3.9) puis par 2 mL d'eau ultra-pure (5.1.1) ; environ 1 goutte par seconde.
- Déposer les extraits centrifugés sur cartouche. Laisser passer l'ensemble à travers la cartouche, toujours à flux constant d'environ une goutte par seconde.
- Laver les cartouches avec 1 mL de mélange eau/méthanol (40/60) (5.4.7).
- Eluer par 3 mL de mélange eau/méthanol (10/90) (5.4.8) et récupérer les extraits purifiés dans des tubes en verre de 5 mL.
- Evaporer jusqu'à sec (résidus huileux) sous flux d'azote à environ 45°C.

8.7 Reprise des résidus contenant les dérivés nitrophénylés

- 8.7.1** Reprendre les résidus par 400 μ L de la solution d'acétate d'ammonium 2 mM / acétonitrile (60/40) (5.4.5), placer dans une cuve à ultrasons pendant 1 minute environ, et vortexer.
- 8.7.2** Transférer dans des microvials de 300 μ L adaptés pour l'injecteur (attention à éviter la présence de bulles d'air au fond des microvials).

8.8 Analyse par CL-SM/SM

8.8.1 Conditions chromatographiques :

- Précolonne Symmetry C18 : 4 x 2,0 mm ; 3 µm (Phenomenex)
- Colonne Kinetex Biphényl : 100 x 2,1 mm ; 2,6 µm (Phenomenex)
- Température du four à colonne : 25°C
- Débit : 0,2 mL/min
- Volume d'injection : 25 µL
- Phase mobile en mode gradient :

Voie A = Phase mobile aqueuse (5.4.9) : Eau + Acétate d'ammonium 2 mM + Acide acétique 0,01 %

Voie B = Phase mobile organique (5.4.10) : Méthanol + Acétate d'ammonium 2 mM + Acide acétique 0,01 %.

Tableau 6 : Gradient d'élution de la phase mobile

Temps (min)	Voie A (%)	Voie B (%)
0	55	45
5	10	90
8	10	90
8,5	55	45
12	55	45

8.8.2 Conditions de détection par spectrométrie de masse (paramètres optimisés sur API 6500+) :

- Interface : HESI en mode positif et négatif
- Température de source : 425°C
- Pression du gaz de nébulisation (Air) : 40 psi
- Pression du gaz de désolvatation (Air) : 50 psi
- Pression du gaz rideau (Air) : 30 psi
- Pression du gaz dans la cellule de collision (Azote) : 7 (unité arbitraire ; medium)
- Tension du capillaire : 5500 V en mode positif ; 4500 V en mode négatif
- Temps d'acquisition : 12 minutes
- Vanne de dérivation : ouverte vers le spectromètre de masse entre 2 et 7 minutes
- Résolution des quadripôles : unitaire
- Temps de cycle : 1,605 seconde

Détection en mode MRM : deux transitions (ion parent > ion produit) sont sélectionnées pour identifier chaque composé.

Tableau 7 : Paramètres de détection composés dépendants

Analyte	Transitions	DP	EC (eV)	CXP	Polarité
NP-AOZ	236,0 > 134,0	55	17	12	Positif
	236,0 > 104,0	55	29	12	
NP-AOZ-d₄	240,0 > 134,0	55	17	12	Positif
NP-AMAZ	335,1 > 291,1	50	17	15	Positif
	335,1 > 100,0	50	40	12	
NP-AMAZ-d₅	340,0 > 296,1	50	17	15	Positif
NP-AHD	249,1 > 134,0	45	18	10	Positif
	249,1 > 104,0	45	29	10	
NP-AHD-¹³C₃	252,1 > 134,0	45	18	10	Positif
NP-SEM	209,0 > 166,0	30	17	10	Positif
	209,0 > 192,1	30	14	10	
NP-SEM¹³C¹⁵N₂	212,0 > 168,0	30	17	10	Positif
NP-DNSH	374,0 > 181,9	-55	-32	-10	Négatif
	374,0 > 182,9	-55	-32	-10	
NP-DNSH-¹³C₆	380,0 > 188,0	-55	-32	-10	Négatif

8.8.3 Acquisition des résultats :

L'ordre d'injection préconisé est le suivant :

- Echantillon blanc réactif (QC-BR)
- Echantillon blanc matrice (QC1)
- Echantillons supplémentés d'étalonnage (pour analyse de confirmation)
- Mélange acétate d'ammonium 2 mM / acétonitrile (60/40) ou autre solvant
- Echantillons QC2 & QC3 (selon analyse de dépistage ou confirmation)
- Mélange acétate d'ammonium 2 mM / acétonitrile (60/40) ou autre solvant
- Echantillon(s) à contrôler (en double pour une analyse de confirmation)
- Mélange acétate d'ammonium 2 mM / acétonitrile (60/40) ou autre solvant
- Echantillon blanc réactif (QC-BR)
- Echantillon blanc matrice (QC1)
- Echantillons supplémentés d'étalonnage (pour analyse de confirmation)

Stabilité des extraits : Dans le cas où une ré-injection des extraits est nécessaire, si les critères d'identification et/ou de confirmation des QCs sont respectés, cela suffit pour valider la série. Pour le dépistage, vérifier que les critères de détection sont valides sur le QC2, et pour la confirmation, que les critères d'identification sont remplis sur le QC2 et le QC3 dans l'intervalle d'acceptabilité déterminé.

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

9.1.1 Analyses de dépistage

- Vérifier que le QC-BM (QC1) et le QC-BR sont exempts de toute contamination/interférence au temps de rétention attendu des composés d'intérêts.
- Vérifier la présence des standards internes (SIs) dans les échantillons à analyser et le QC2.
- Vérifier que les pics chromatographiques d'intérêt ont tous un rapport signal/bruit (S/N) ≥ 3 dans les échantillons à analyser (SIs) et dans le QC2 (SIs et standards) au temps de rétention attendu des composés d'intérêts.

9.1.2 Analyses de confirmation

- Vérifier que le QC-BM (QC1) et le QC-BR sont exempts de toute contamination/interférence au temps de rétention attendu des composés d'intérêts.
- Vérifier la présence des standards internes (SIs) dans chaque échantillon (standards d'étalonnage, QC2, QC3 et échantillons à analyser).
- Vérifier que les pics chromatographiques d'intérêt ont tous un rapport signal/bruit (S/N) ≥ 3 dans les échantillons supplémentés au premier point de gamme utilisé en quantification, ainsi que dans les QC2 et QC3 au temps de rétention attendu des composés d'intérêts.
- Vérifier que les coefficients de détermination des courbes d'étalonnage des transitions utilisées en quantification sont supérieurs à 0,95 pour l'ensemble des substances. Ce critère est un critère interne au Laboratoire de Fougères lié aux résultats de validation.
- La concentration estimée pour le QC3 de chacun des analytes doit être comprise entre les limites indiquées dans le Tableau 8.

Les limites appliquées sont en lien avec les incertitudes type composée calculées pendant la validation effectuée par le LNR 35, multipliées par un facteur d'élargissement de 2,33.

Tableau 8 : Plages de concentrations limites ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) pour le QC3

Matrice	NP-AHD	NP-AMAZ	NP-AOZ	NP-DNSH	NP-SEM
Miels	0,272 à 0,728	0,374 à 0,626	0,412 à 0,588	0,423 à 0,577	0,250 à 0,750

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Critères de détection dans le cadre du dépistage pour l'envoi en confirmation

La présence d'un analyte dans un échantillon à contrôler est suspectée lorsque :

- Le temps de rétention relatif de l'analyte dans l'échantillon à contrôler correspond au temps de rétention relatif du QC2 avec une tolérance de ± 1 % ou de $\pm 0,1$ min dans le cas du SEM (absence de standard interne). Les temps de rétention fournis dans le Tableau 9 sont donnés à titre indicatif. Une variation de ces temps peut être observée selon le système chromatographique utilisé.
- Les pics chromatographiques d'intérêts (pour chaque transition de l'analyte en question) sont présents avec un rapport signal/bruit (S/N) ≥ 3 .
- La concentration estimée de l'échantillon suspecté à l'aide du QC2-CC β est supérieure ou égale au CC β .

Tableau 9 : Paramètres d'identification composés dépendants

Analyte	Transitions MRM	Temps de rétention (min) de l'ordre de	Intensité relative de l'ordre de
NP-AOZ	236,0 > 134,0 *	5,69 min	100 %
	236,0 > 104,0		42 %
NP-AOZ-d ₄	240,0 > 134,0	5,63 min	-
NP-AMOZ	335,1 > 291,2 *	6,13 min	100 %
	335,1 > 100,0		16 %
NP-AMOZ-d ₅	340,0 > 296,1	6,06 min	-
NP-AHD	249,1 > 134,0	5,11 min	245 %
	249,1 > 104,0 *		100 %
NP-AHD- ¹³ C ₃	252,1 > 134,0	5,10 min	-
NP-SEM	209,0 > 192,1 *	4,26 min	100 %
	209,0 > 166,0		108 %
NP-SEM- ¹³ C ¹⁵ N ₂	212,0 > 168,0	4,25 min	-
NP-DNSH	374,0 > 181,9 *	5,15 min	100 %
	374,0 > 182,9		89 %
NP-DNSH- ¹³ C ₆	380,0 > 188,0	5,16 min	-

* Transition utilisée pour la quantification

L'échantillon suspect est envoyé en confirmation lorsque sa concentration estimée à l'aide du QC2-CC β est supérieure ou égale au CC β .

Tableau 10 : CCβ obtenus lors de la validation (µg/kg)

Matrice	NP-AHD	NP-AMAZ	NP-AOZ	NP-DNSH	NP-SEM
Miels	0,25	0,10	0,10	0,10	0,25

Les CCβ ont été déterminés selon la méthode 2 définie au paragraphe 2.7.1.b de l'Annexe 1 du Règlement (UE) 2021/808.

9.2.2 Critères d'identifications dans le cadre de la confirmation

La présence d'un analyte dans l'échantillon à contrôler est confirmée lorsque les critères définis selon le Règlement (UE) 2021/808 sont réunis, c'est-à-dire :

- Le temps de rétention relatif de l'analyte dans l'échantillon à analyser correspond au temps de rétention relatif des standards d'étalonnage avec une tolérance de ± 1 % ou de $\pm 0,1$ min dans le cas du SEM (absence de standard interne).
- Les pics chromatographiques d'intérêt (un pour chaque transition de l'analyte en question) sont présents avec un rapport signal/bruit (S/N) ≥ 3 .
- Les intensités ioniques relatives des deux pics chromatographiques d'intérêt dans les échantillons à analyser sont comparées aux intensités ioniques relatives des deux pics d'intérêt dans les standards d'étalonnage et respectent une tolérance de ± 40 %.

9.2.3 Détermination de la concentration

Tout échantillon à confirmer est extrait deux fois (deux prises d'essai différentes) et quantifié par rapport à une gamme d'échantillons supplémentés elle-même réinjectée deux fois (avant et après les échantillons à confirmer). Le dosage de chaque prise d'essai est réalisé à partir de la surface de pic des transitions indiquées dans le Tableau 11. Le dosage tient compte également du standard interne analogue marqué isotopiquement pour chacun des analytes d'intérêts, excepté pour le dosage du NP-SEM. La droite d'étalonnage est établie à partir de la gamme d'échantillons supplémentés en incluant l'échantillon blanc témoin (mais sans forcer par le zéro). Un modèle de régression linéaire a été choisi pour l'ensemble des analytes lors de la validation.

Tableau 11 : Transitions d'intérêts et standards internes utilisés pour le dosage

Analyte	Transitions MRM	Standard Interne
NP-AOZ	236,0 > 134,0	NP-AOZ-d ₄
NP-AMAZ	335,1 > 291,2	NP-AMAZ-d ₅
NP-AHD	249,1 > 104,0	NP-AHD- ¹³ C ₃
NP-SEM	209,0 > 192,1	- *
NP-DNSH	374,0 > 181,9	NP-DNSH- ¹³ C ₆

* Absence d'utilisation de standard interne pour le dosage du NP-SEM. En effet, lors de la validation initiale réalisée par le LNR 35, les effets matrices relevés avec correction par le standard interne étaient de l'ordre de 56% contre 31% en absence d'utilisation de celui-ci. De plus, le critère de tolérance défini par le Règlement (EU) 2021/808 concernant le temps de rétention relatif n'était pas respecté. Le Tr absolu est alors utilisé.

Le Tableau 12 précise les niveaux d'étalonnage et le domaine de validité de la gamme au sein de chacune des matrices entrant dans le champ d'application, afin que les paramètres de validation de méthode soient satisfaisants.

9.2.3.1 Courbe d'étalonnage

A partir de la gamme d'échantillons supplémentés, une courbe d'étalonnage d'équation $y = b.x + a$ est établie où :

$$y = \frac{\text{surface du pic de l'analyte}}{\text{surface du Standard Interne}}$$

et $x = \text{concentration de l'échantillon supplémenté}$
Calculer a et b pour chaque analyte considéré.

9.2.3.2 Calcul des concentrations en retour

La concentration (en $\mu\text{g/kg}$) dans l'échantillon à doser est obtenue par la formule :

$$[\text{Analyte}] = \frac{(\text{Surface analyte} / \text{Surface Standard Interne}) - a}{b}$$

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

La concentration dans l'échantillon est établie à partir de la moyenne des concentrations estimées des deux prises d'essai.

Tableau 12 : Etalonnage et domaine de validité selon les matrices

Analyte	Niveaux d'étalonnage ($\mu\text{g/kg}$)	Domaine validé ($\mu\text{g/kg}$)
NP-AOZ	0,10 – 0,25 – 0,50 – 0,75	0,10 – 0,75
NP-AMAZ	0,10 – 0,25 – 0,50 – 0,75	0,10 – 0,75
NP-AHD	0,25 – 0,35 – 0,50 – 0,75	0,25 – 0,75
NP-SEM	0,25 – 0,35 – 0,50 – 0,75	0,25 – 0,75
NP-DNSH	0,10 – 0,25 – 0,50 – 0,75	0,10 – 0,75

9.3 Décision finale – Conformité de l'échantillon

Si tous les critères d'identification sont atteints (temps de rétention, 2 transitions avec le rapport S/B ≥ 3 , intensités ioniques relatives) pour les deux prises d'essai, et si la concentration estimée (moyenne des 2 prises d'essai) est supérieure ou égale à la limite de décision (CC α) indiquée dans le Tableau 13, la présence de résidu de métabolite de nitrofuranes est confirmée et l'échantillon est déclaré non conforme.

Tableau 13 : CC α obtenus lors de la validation ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Matrices	NP-AHD	NP-AMAZ	NP-AOZ	NP-DNSH	NP-SEM
Miels	0,420	0,126	0,181	0,132	0,485

Les CC α ont été déterminés selon la méthode 3 définie au paragraphe 2.6.1.c de l'Annexe 1 du Règlement (UE) 2021/808

Tous les CC α calculés sont inférieurs à la RPA adoptée de 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [6].

Informations complémentaires :

Selon l'article 5 du règlement (UE) 2019/1871, deux cas de figures sont possibles :

- Si la concentration de l'échantillon est supérieure ou égale à la RPA (0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) alors l'échantillon est déclaré non conforme et des mesures de gestion de retrait ou de destruction du lot de la denrée sont appliquées.
- Si la concentration de l'échantillon est supérieure ou égale au CC α mais inférieure à la RPA (0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) alors l'échantillon est déclaré non conforme avec notification de présence mais sans mesure de gestion pour le lot concerné alors autorisé à être commercialisé.

10. Caractéristiques de performance de la méthode

10.1 Performances de justesse de la méthode

Tableau 14 : Données de justesse obtenues lors de la validation

NP-AHD (SI = NP-AHD- ¹³ C ₃)	Concentration (µg/kg)	n	Moyenne des concentrations calculées (µg/kg)	Biais relatif (%)	Biais relatif Limites (%)	Recouvrement (%)
Miel	0,25	21	0,227	-9,02	-50 à +20	91,0
	0,35	21	0,338	-3,56	-50 à +20	96,4
	0,50	21	0,481	-3,75	-50 à +20	96,3
	0,75	21	0,756	0,76	-50 à +20	100,8
NP-AMAZ (SI = NP-AMAZ-d ₅)	Concentration (µg/kg)	n	Moyenne des concentrations calculées (µg/kg)	Biais relatif (%)	Biais relatif Limites (%)	Recouvrement (%)
Miel	0,10	21	0,0927	-7,30	-50 à +20	92,7
	0,25	21	0,227	-9,08	-50 à +20	90,9
	0,50	21	0,476	-4,89	-50 à +20	95,1
	0,75	21	0,699	-6,81	-50 à +20	93,2
NP-AOZ (SI = NP-AOZ-d ₄)	Concentration (µg/kg)	n	Moyenne des concentrations calculées (µg/kg)	Biais relatif (%)	Biais relatif Limites (%)	Recouvrement (%)
Miel	0,10	21	0,0897	-10,34	-50 à +20	89,7
	0,25	21	0,226	-9,78	-50 à +20	90,2
	0,50	21	0,467	-6,52	-50 à +20	93,5
	0,75	21	0,693	-7,62	-50 à +20	92,4
NP-DNSH (SI = NP-DNSH- ¹³ C ₆)	Concentration (µg/kg)	n	Moyenne des concentrations calculées (µg/kg)	Biais relatif (%)	Biais relatif Limites (%)	Recouvrement (%)
Miel	0,10	21	0,095	-5,04	-50 à +20	95,0
	0,25	21	0,235	-5,97	-50 à +20	94,0
	0,50	21	0,487	-2,56	-50 à +20	97,4
	0,75	21	0,703	-6,31	-50 à +20	93,7
NP-SEM (SI = NP-SEM- ¹³ C ¹⁵ N ₂)	Concentration (µg/kg)	n	Moyenne des concentrations calculées (µg/kg)	Biais relatif (%)	Biais relatif Limites (%)	Recouvrement (%)
Miel	0,25	21	0,201	-19,48	-50 à +20	80,5
	0,35	21	0,269	-15,42	-50 à +20	84,6
	0,50	21	0,426	-14,81	-50 à +20	85,2
	0,75	21	0,618	-17,65	-50 à +20	82,4

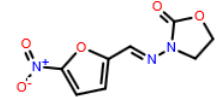

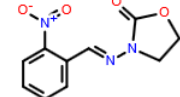
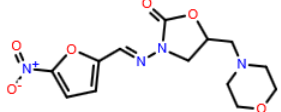
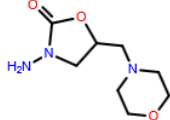
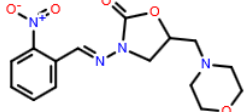
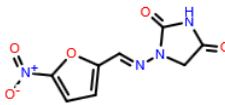
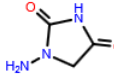
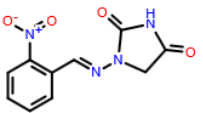
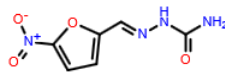

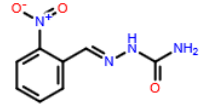
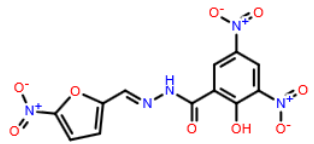
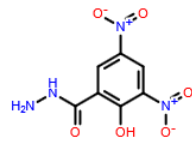
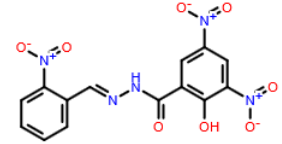
10.2 Performances de fidélité de la méthode

Tableau 15 : Données de fidélité obtenues lors de la validation





NP-AHD <i>(SI = NP-AHD-¹³C₃)</i>	Concentration (µg/kg)	n	Fidélité intermédiaire (CV_R %)	CV_R Limite (%)	Incertitude type composée (%)
Miel	0,25	21	28,50	30,0	29,18
	0,35	21	21,83	30,0	23,16
	0,50	21	18,83	30,0	19,60
	0,75	21	14,52	30,0	15,08
NP-AMAZ <i>(SI = NP-AMAZ-d₅)</i>	Concentration (µg/kg)	n	Fidélité intermédiaire (CV_R %)	CV_R Limite (%)	Incertitude type composée (%)
Miel	0,10	21	10,90	30,0	11,32
	0,25	21	14,57	30,0	15,00
	0,50	21	10,57	30,0	10,82
	0,75	21	14,01	30,0	14,43
NP-AOZ <i>(SI = NP-AOZ-d₄)</i>	Concentration (µg/kg)	N	Fidélité intermédiaire (CV_R %)	CV_R Limite (%)	Incertitude type composée (%)
Miel	0,10	21	32,09	30,0	34,73
	0,25	21	17,07	30,0	17,77
	0,50	21	6,93	30,0	7,60
	0,75	21	8,86	30,0	9,61
NP-DNSH <i>(SI = NP-DNSH-¹³C₆)</i>	Concentration (µg/kg)	N	Fidélité intermédiaire (CV_R %)	CV_R Limite (%)	Incertitude type composée (%)
Miel	0,10	21	13,20	30,0	13,84
	0,25	21	15,69	30,0	16,19
	0,50	21	6,23	30,0	6,61
	0,75	21	8,02	30,0	8,59
NP-SEM <i>(SI = NP-SEM-¹³C¹⁵N₂)</i>	Concentration (µg/kg)	N	Fidélité intermédiaire (CV_R %)	CV_R Limite (%)	Incertitude type composée (%)
Miel	0,25	21	37,37	30,0	40,32
	0,35	21	32,24	30,0	34,06
	0,50	21	26,53	30,0	27,46
	0,75	21	24,94	30,0	25,95





Annexes






Annexe 1 : Structure des nitrofuranes concernés par la méthode de confirmation, associés à leur métabolite marqueur et dérivé nitrophénylé.

Nitrofurane		Métabolite marqueur		Dérivé nitrophénylé du métabolite marqueur		
Nom et abréviation	Formule développée	Nom et abréviation	Formule développée	Abréviation	Formule développée	Formule brute et Masse moléculaire
Furazolidone (FZD)		3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)		NP-AOZ		C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₄ 235,20
Furaltadone (FTD)		3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ)		NP-AMOZ		C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₅ 334,33
Nitrofurantoïne (NFT)		1-amino-2,4-imidazolidinedione (AHD)		NP-AHD		C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₄ 248,20
Nitrofurazone (NFZ)		Semicarbazide hydrochloride (SEM)		NP-SEM		C ₈ H ₈ N ₄ O ₃ 208,17
Nifursol (NFS)		3,5-dinitrosalicylic acid hydrazide (DNSH)		NP-DNSH		C ₁₄ H ₉ N ₅ O ₈ 375,25

Annexe 2 : Mentions de dangers

Analytes	Pictogrammes de danger	Code	Mentions de danger
3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) et analogue marqué		H315 H319 H335	Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.
1-amino-2,4-imidazolidinedione (AHD) et analogue marqué		H302	Nocif en cas d'ingestion.
Semicarbazide hydrochloride (SEM) et analogue marqué		H301	Toxique en cas d'ingestion.
3,5-dinitrosalisyllic acid hydrazide (DNSH) et analogues marqués		H302 H312 H315 H319 H332 H335	Nocif en cas d'ingestion. Nocif par contact cutané. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Nocif par inhalation. Peut irriter les voies respiratoires.

Réactifs	Pictogrammes de danger	Code	Mentions de danger
2-NBA		H302 H315 H319 H335 H412	Nocif en cas d'ingestion. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
Acétate d'éthyle		H225 H319 H336 EUH066	Liquide et vapeurs très inflammables. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer somnolence ou vertiges. L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau.
Acide acétique 100%		H226 H314	Liquide et vapeurs inflammables. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
Acide chlorhydrique 37%		H290 H314	Peut être corrosif pour les métaux. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.

		H335	Peut irriter les voies respiratoires.
Acétonitrile	 	H225 H302 H312 H319 H332	Liquide et vapeurs très inflammables. Nocif en cas d'ingestion. Nocif par contact cutané. Provoque une sévère irritation des yeux. Nocif par inhalation.
Méthanol	  	H225 H301 H311 H331 H370	Liquide et vapeurs très inflammables. Toxique en cas d'ingestion. Toxique par contact cutané. Toxique par inhalation. Risque avéré d'effets graves pour les organes.

Bibliographie

- Barbosa, J., Freitas, A., Mourão, J. L., Noronha da Silveira, M. I., & Ramos, F. (2012). Determination of Furaldone and Nifursol Residues in Poultry Eggs by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4227-4234. <https://doi.org/10.1021/jf205186y>
- Bock, C., Stachel, C., & Gowik, P. (2007). Validation of a confirmatory method for the determination of residues of four nitrofurans in egg by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with the software InterVal. *Papers Presented at the 5th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis*, 586(1), 348-358. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.11.001>
- Finzi, J. K., Donato, J. L., Sucupira, M., & De Nucci, G. (2005). Determination of nitrofurans metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 824(1), 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.05.01>
- Guichard, P., Laurentie, M., Hurtaud-Pessel, D., & Verdon, E. (2020). Confirmation of five nitrofurans metabolites including nifursol metabolite in meat and aquaculture products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry : Validation according to European Union Decision 2002/657/EC. *Food Chemistry*, 128389. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.12838>
- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., & Widmer, M. (2015). Determination of nitrofurans and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 862, 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.12.036>
- Lv, Z., Luo, Z., Lu, J., Xu, Z., Zhang, W., & Chen, A. (2021). Analysis of metabolites of nitrofurans antibiotics in animal-derived food by UPLC-MS/MS. *International Food Research Journal*, 28(3), 467-478. <https://doi.org/10.47836/ifrj.28.3.06>
- Mulder, P. P. J., Zuidema, T., Keestra, N. G. M., Kooij, P. J. F., Elbers, I. J. W., & van Rhijn, J. A. (2005). Determination of nifursol metabolites in poultry muscle and liver tissue. Development and validation of a confirmatory method. *Analyst*, 130(5), 763-771. <https://doi.org/10.1039/B414320E>
- Park, M. S., Kim, K. T., & Kang, J. S. (2017). Development of an analytical method for detecting nitrofurans in bee pollen by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1046, 172-176. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.042>
- Ramos, F., Santos, L., & Barbosa, J. (2017). Chapter 43—Nitrofurans Veterinary Drug Residues in Chicken Eggs. In P. Y. Hester (Éd.), *Egg Innovations and Strategies for Improvements* (p. 457-464). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00043-3>
- Torre, C. A. L. de la., Blanco, J. E., Silva, J. T., Paschoalin, V. M. F., & Conte, C. A.. (2015). Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 82, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000532013>
- Vahl, M. (2005). Analysis of nifursol residues in turkey and chicken meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants*, 22(2), 120-127. <https://doi.org/10.1080/02652030500037670>

- Verdon, E., Couedor, P., & Sanders, P. (2007). Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry—In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. Papers Presented at the 5th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 586(1), 336-347. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.01.024>
- Wang, C., Qu, L., Liu, X., Zhao, C., Zhao, F., Huang, F., Zhu, Z., & Han, C. (2017). Determination of a metabolite of nifursol in foodstuffs of animal origin by liquid–liquid extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Journal of Separation Science, 40(3), 671-676. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600996>