



## MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE RAPIDE ET SIMPLE DE QUATRE TÉTRACYCLINES DANS LES MUSCLES BOVINS PAR HPLC-MS

S. Barrek<sup>a\*</sup>, O. Paisse<sup>b</sup>, H. Zarrouk<sup>a</sup>, M.-F. Grenier-Loustalot<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institut National de Recherche et d'Analyses Physico-chimiques, Pôle Technologique, 2020 Sidi Thabet, Tunisie

<sup>b</sup> Service Central d'Analyse - USR 059 - CNRS, BP 22, 69390 Vernaison, France

(Reçu le 29 Juin 2004, accepté le 9 Mai 2005)

**RESUME** : Le but du présent travail est le développement et la validation d'une méthode d'analyse multirésidus rapide et simple de l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline dans la viande bovine par couplage HPLC-MS. L'extraction de ces antibiotiques a été réalisée sur une cartouche d'extraction SPE de type C<sub>18</sub> qui a été préalablement activée avec 3 ml de méthanol et 6 ml d'eau. L'ensemble est élué par la suite avec 2 ml d'une solution hydroalcoolique (5 % de méthanol). Les antibiotiques sont adsorbés sur la phase stationnaire de la cartouche, puis élués avec 5 ml de méthanol (2 fois 2,5 ml). La séparation a été obtenue en utilisant une phase inversée Omnispher C<sub>18</sub>, la phase mobile étant constituée d'eau (ajustée à pH = 2,7 avec 20 mM d'acide trifluoroacétique (TFA)) et d'acétonitrile. Nous avons appliqué un gradient d'éluion de 20 % pendant 1 min puis de 20 à 100 % d'acétonitrile en 8 min, le débit de la phase mobile étant fixé à 0,25 ml/min. La détermination quantitative des résidus d'antibiotiques a été réalisée par couplage HPLC-MS avec une détection en mode SIM. Cette méthode ainsi mise au point nous a permis de récupérer l'Oxytétracycline avec un rendement de 81,9 ± 2,5 %, la Tétracycline à 89,6 ± 1,5 %, la Chlortétracycline à 80,1 ± 1,6 % et la Doxycycline à 69,6 ± 2,9%.

Mots clés : résidus, antibiotiques, viande bovine, HPLC-MS

**ABSTRACT** : The aim of this work is to develop and validate a multi residue analytical method for a rapid and simple determination of Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline and Doxycycline in bovine meat by HPLC-MS. Solid phase extraction of these antibiotics was made on a C<sub>18</sub> cartridge that was first activated with 3 mL of methanol and 6 mL of water. This mixture was then eluted with 2 mL of a hydroalcoholic solution (5 % methanol). The antibiotic mixture was adsorbed on the stationary phase of the activated cartridge and eluted twice with 2.5 mL of methanol. The chromatographic separation was obtained on a RP-C<sub>18</sub> Omnispher type column and using water (adjusted at pH 2.7 with a 20 mM solution of TFA) and acetonitrile in a gradient elution mode (20 % for 1 min and from 20 to 100 % with acetonitrile in 8 min). The flow was maintained constant at 0.25 mL/min. Quantitative analysis of antibiotics residues was made by HPLC-MS in SIM detection mode. This method allowed the determination of the four antibiotics with good yields: 81.9 ± 2.5 % for Oxytetracycline, 89.6 ± 1.5 % for Tetracycline, 80.1 ± 1.6 % for Chlortetacycline and 69.6 ± 2.9 % for Doxycycline.

Key words: residue, antibiotics, bovine meat, HPLC-MS

### INTRODUCTION

L'agriculture moderne a recours à une très large gamme de médicaments vétérinaires. A l'inverse des médicaments vétérinaires destinés aux animaux de compagnie, l'utilisation de médicaments chez les animaux producteurs de denrées alimentaires peut avoir des conséquences néfastes sur la santé publique. En effet, ces pratiques peuvent induire la présence de résidus dans les produits alimentaires tels que le lait, les œufs et les tissus animaux, les viandes et les abats. Des limites maximales de résidus (LMR) compatibles avec le respect de la santé publique ont été fixées par les pouvoirs publics. Les valeurs des LMRs varient de 1 à 1000 µg/kg selon les denrées alimentaires et

\* correspondant



la nature des molécules actives [1]. A titre d'exemples elles sont fixées à 100 µg/kg dans le lait et les viandes pour la Tétracycline, et à 300 et 600 µg/kg dans le lait et les viandes respectivement pour la Chlortétracycline, l'Oxytétracycline et la Doxycycline [2].

L'utilisation des tests immunologiques (ELISA) comme méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale est de plus en plus courante [3]. Ces tests demeurent toutefois très spécifiques et peu sensibles : les résultats qui en sont issus nécessitant d'autres méthodes d'analyse pour la confirmation de la présence des résidus et leur quantification. Généralement, ces méthodes de confirmation font appel à des procédures d'extraction liquide/liquide [4], liquide/solide [2,5-11] ou à la dispersion en phase solide [12,13] et à la chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur à barrette de diode [2, 5, 8, 9], fluorométrique [7, 9,11-13] ou un spectromètre de masse [6, 10, 14]. Dans ces procédures d'analyse de traces, l'étape la plus délicate est la préparation de l'échantillon et en particulier les étapes d'extraction et de concentration des extraits.

Actuellement, l'extraction sur des cartouches SPE de type C<sub>18</sub> est la méthode de choix pour la purification des échantillons pour l'analyse des résidus des tétracyclines (Figure 1) dans des matrices d'origine animale. Cette procédure nécessite une extraction liquide des tétracyclines à partir des viandes. Celle-ci est réalisée en utilisant l'acide trichloroacétique et le tampon de McIlvaine [2, 6, 10]. Cette étape de purification permet de minimiser les interférences matricielles observées notamment lors de l'utilisation d'un détecteur UV. Si le détecteur à barrette de diode a été largement utilisé auparavant dans l'analyse des résidus des tétracyclines, nous constatons qu'il est de plus en plus remplacé par des détecteurs plus spécifiques et plus sensibles comme le détecteur fluorométrique et les spectromètres de masse.

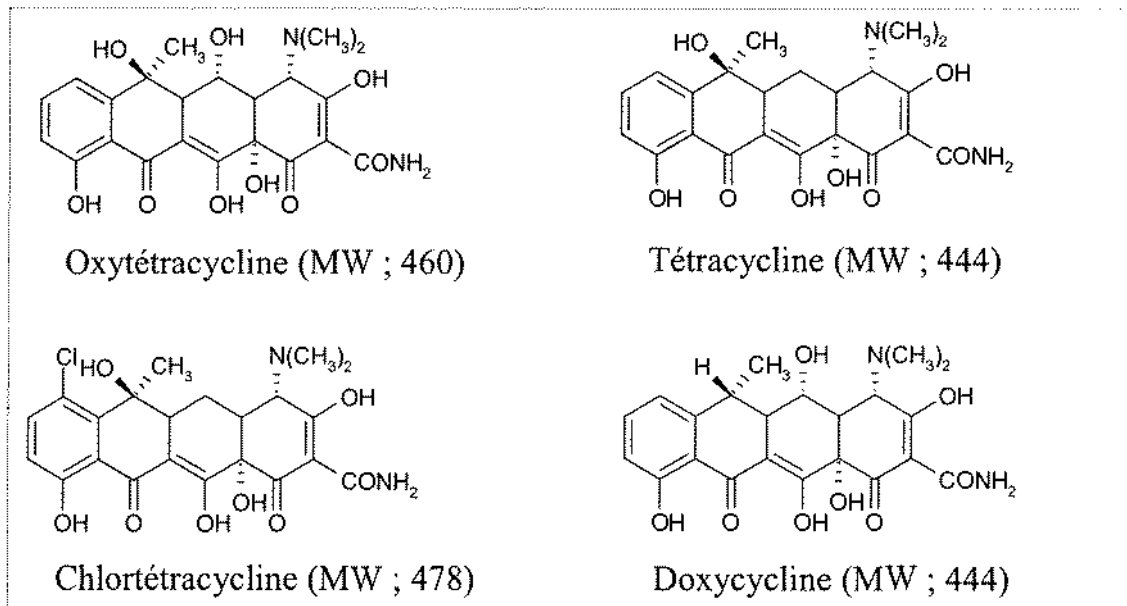


Figure 1 : Structures chimiques de l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline.

Dans le cadre du présent travail, nous nous sommes proposés de développer et valider une méthode d'analyse multirésidus rapide et simple des antibiotiques suivants : l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline dans la viande bovine par couplage HPLC-MS. La détection des produits étudiés est réalisée à l'aide d'une source d'ionisation à pression atmosphérique électrospray (ESI). Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'amélioration des conditions de séparation de ces composés rapportées dans la littérature [2, 10, 14]. Cela a été réalisé



en remplaçant les sels et acides non volatils utilisés dans la phase mobile par la plupart des auteurs (acide oxalique, EDTA) par l'acide trifluoroacétique (TFA) qui présente une meilleure adéquation avec la technique HPLC-MS d'analyse. Par ailleurs, nous avons modifié les conditions d'extraction et de purification décrites par Hisao Oka et al [6] pour améliorer les rendements de recouvrement des tétracyclines.

## MATERIEL ET METHODES

### Solvants et réactifs

Les différents produits utilisés dans cette étude sont : l'eau qualité HPLC (Millipore), l'acétonitrile, le méthanol (SDS). Tous ces solvants de qualité HPLC ont été utilisés, à la fois, en chromatographie liquide et pour les différentes étapes d'extraction. L'acide trichloroacétique (Merck), l'acide citrique monohydrate, le sel de l'acide éthylènediamine-tétraacétique disodique (Prolabo), l'hydrogénphosphate de disodium dihydrate et l'acide trifluoroacétique (Fluka) sont de qualité pour analyse (PA). Les étalons des antibiotiques sont : la Tétracycline (Aldrich), l'Oxytétracycline, la Doxycycline et la Chlortétracycline (Sigma).

### Les solutions étalons

Nous avons préparé une solution mère à partir d'un mélange des étalons de l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline : 10 mg de chacun des étalons sont dissous dans 10 ml d'une solution hydroalcoolique (20 % de méthanol ; v/v). La concentration finale pour chacun des antibiotiques étudiés est de 1 mg/ml. Les solutions étalons utilisées pour l'étalonnage et le dopage sont préparées par dilution à partir de cette solution mère. Elles sont toutes conservées à -20 °C ; Dans ces conditions les antibiotiques sont stables pour une période minimale de quatre semaines [1].

### Les échantillons de viandes

Les échantillons des muscles utilisés pour la validation de la méthode d'extraction sont achetés d'une firme locale d'abattage. Les échantillons obtenus sont conservés à -20 °C avant l'analyse.

Les échantillons de viandes dopés aux antibiotiques sont préparés par ajout de 5 µl, 10 µl et 15 µl d'une solution (0,1 mg/ml) à une masse de 5 g de viande. Ces échantillons sont préparés la veille de l'analyse et conservés à 4 °C.

### Procédure d'extraction

Une prise d'essai de 5 g de viande congelée est hachée puis placée dans un tube à centrifugation (50 ml). Elle est ensuite additionnée d'un volume de 2 ml d'une solution à 20 % d'acide trichloroacétique. L'échantillon étant bien homogénéisé à l'aide d'une spatule, nous avons ajouté 20 ml d'une solution tampon de McIlvaine (11,8 g d'acide citrique monohydrate ; 13,72 g d'hydrogénphosphate de disodium dihydrate ; 33,6 g d'éthylènediamine-tétraacétique disodique dans 1 litre d'eau). Le mélange obtenu est agité à 1000 rpm pendant 20 min, puis centrifugé à 2000 rpm pendant 20 min. Le liquide surnageant est ensuite déposé sur une cartouche SPE (BAKERBOND spe™ octadecyl (C<sub>18</sub>), (500 mg, 3ml)), cette dernière étant activée préalablement avec 3 ml de méthanol et 6 ml d'eau. L'ensemble est élué avec 2 ml d'une solution hydroalcoolique (5 % de méthanol). Nous avons ainsi purifié l'échantillon. Les antibiotiques sont piégés sur la phase stationnaire de la cartouche ; ils sont élués avec 5 ml de méthanol (2 fois 2,5 ml). Les extraits sont concentrés sous un flux d'azote à 40°C, le résidu est récupéré dans 1 ml de méthanol et filtré avant analyse sur un filtre en téflon de porosité 0,45 µm. Un volume de 5 µl est injecté par la suite dans le système chromatographique HPLC-MS.



### HPLC-MS : conditions et équipement

Les analyses HPLC-MS sont réalisées sur un appareil HP1100-MSD (Agilent). La partie chromatographique est constituée d'un appareil HP 1100 équipé d'une colonne C<sub>18</sub> VARIAN de dimensions (100 × 2,1 d. i) mm. La phase stationnaire est de type Omnispher 5 μm ODS-3, précédée d'une pré-colonne de dimension (10 × 2,1 d. i) mm. Le détecteur UV (barettes de diodes) est fixé à une longueur d'onde λ = 275 nm. La phase mobile est constituée d'eau (ajustée à pH = 2,7 avec 20 mM d'acide trifluoroacétique (TFA) ) et d'acétonitrile. Nous avons appliqué un gradient d'élution de 20 % pendant 1 min puis de 20 % à 100 % d'acétonitrile en 8 minutes, le débit de la phase mobile étant fixé à 0,25 ml/min.

Nous avons utilisé la source d'ionisation électrospray (ESI) à polarité positive. Les conditions de réponse des produits dans la source d'ionisation sont optimisées au préalable. Le débit du gaz de désolvatation est maintenu à 10 L/min à une température de 350 °C. La pression de nébulisation et la tension d'extraction des ions de la source ont été maintenues respectivement à 310,3 kPa et à 3 kV. Nous avons enregistré les chromatogrammes en mode « full scan » avec une tension de fragmentation de 80 V.

### Courbes d'étalonnage

La linéarité de la réponse du détecteur de masse a été étudiée avec des solutions étalons de l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline, dans l'intervalle de concentration 0,05 – 10 mg/L. La détermination des rendements d'extractions a été réalisée par étalonnage externe, les solutions étalons étant fraîchement préparées et injectées dans la même série d'analyse que les échantillons. Les courbes d'étalonnage retenues présentent un coefficient de régression linéaire supérieur à 0,999.

### RESULTATS ET DISCUSSION

Le but de notre travail est la mise au point d'une procédure rapide, fiable et reproductible permettant d'analyser les résidus des antibiotiques : l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline dans les viandes bovines. Par couplage LC-UV-MS, nous avons obtenu un chromatogramme typique des standards de l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline (Figure 2). Dans les conditions chromatographiques optimisées, nous avons pu séparer les produits recherchés en 8 min. Les temps de rétention relatifs à l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline sont respectivement 2,5 min, 3,2 min, 6,9 min et 7,5 min.

Le détecteur de masse nous a permis d'enregistrer les spectres de masse de chacun des antibiotiques étudiés (Figure 3). Le spectre de masse réalisé en mode ESI positive de l'Oxytétracycline (Figure 3 A) présente deux pics pseudo-moléculaires à  $m/z$  461 et 483 qui sont attribuées respectivement aux ions  $[M + H]^+$  et  $[M + Na]^+$ . Le pic à  $m/z$  444 correspond à une perte d'une molécule d'ammoniac à partir de l'ion  $[M + H]^+$ . Le pic détecté à  $m/z$  426 correspond à l'élimination d'une molécule d'ammoniac et d'une molécule d'eau  $[M + H - NH_3 - H_2O]^+$ .

Le spectre de masse de la Tétracycline (Figure 3 B) présente deux pics pseudo-moléculaires à  $m/z$  445 et 467 qui sont attribués respectivement aux ions  $[M + H]^+$  et  $[M + Na]^+$ . Le pic à  $m/z$  428 correspond à une perte d'une molécule d'ammoniac à partir de l'ion  $[M + H]^+$ . Le pic détecté à  $m/z$  410 correspond à l'élimination d'une molécule d'ammoniac et d'une molécule d'eau  $[M + H - NH_3 - H_2O]^+$ .

Le spectre de masse de la Chlortétracycline (Figure 3 C) présente un pic pseudo-moléculaire à  $m/z$  479 et 481 (<sup>37</sup>Cl) relatif à l'ion  $[M + H]^+$ . Le pic à  $m/z$  462 et 464 (<sup>37</sup>Cl) correspond à une perte d'une molécule d'ammoniac à partir de l'ion  $[M + H]^+$ . Le pic détecté à  $m/z$  444 et 446 (<sup>37</sup>Cl)

correspond à l'élimination d'une molécule d'ammoniac et d'une molécule d'eau  $[M + H - NH_3 - H_2O]^+$ .

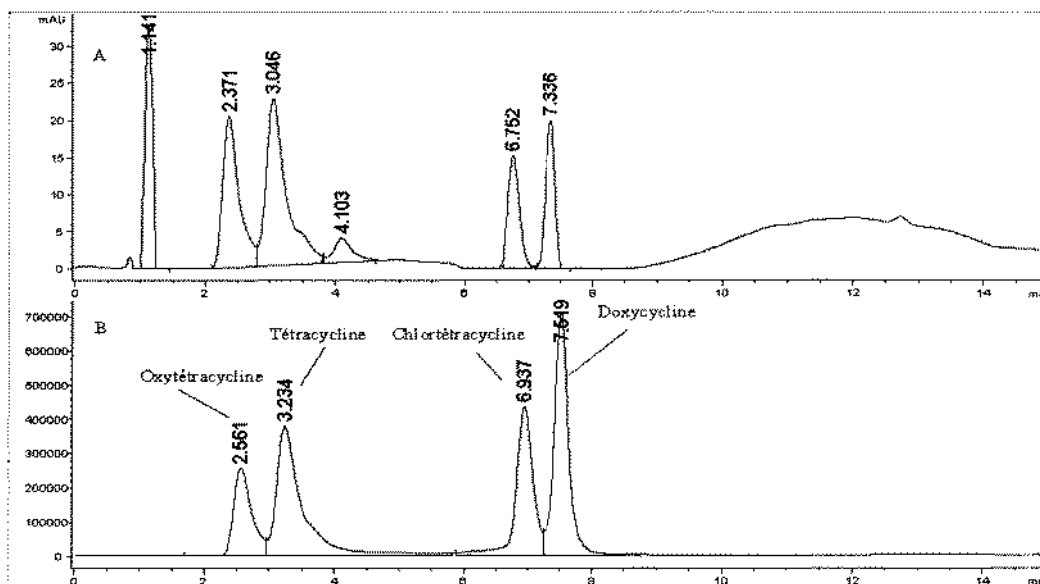


Figure 2 : Chromatogramme des standards des tétracyclines (500 µg/L) obtenus par couplage HPLC-UV-MS, (A) trace UV à 275 nm, (B) courant ionique total enregistré par le spectromètre de masse.

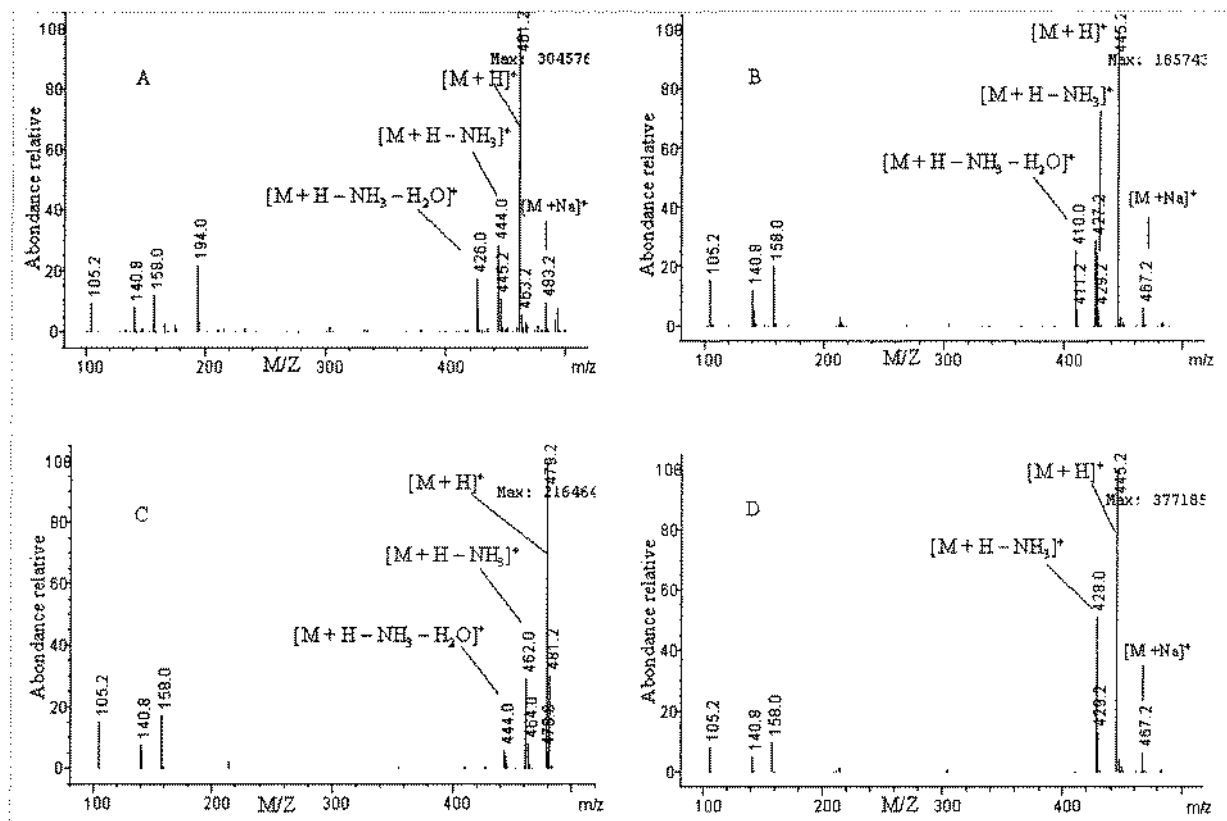


Figure 3 : Spectres de masse des tétracyclines enregistrés avec une source d'ionisation Electrospray (ESI), (A) Oxytétracycline, (B) Tétracycline, (C) Chlorotétracycline et (D) Doxycycline.



Le spectre de masse de la Doxycycline (Figure 3 D) présente deux pics pseudo-moléculaires à  $m/z$  445 et 467 qui sont attribués respectivement aux ions  $[M + H]^+$  et  $[M + Na]^+$ . Le pic à  $m/z$  428 correspond à une perte d'une molécule d'ammoniac à partir de l'ion  $[M + H]^+$ .

A partir des spectres de masses de la figure 3, nous pouvons confirmer que l'absence de l'ion  $[M + H - NH_3 - H_2O]^+$  à  $m/z$  410 indique qu'il s'agit de la Doxycycline par comparaison à la Tétracycline qui a la même masse moléculaire.

La linéarité de la réponse du détecteur de masse, les limites de détection et de quantification ont été étudiées avec les standards de l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline dans l'intervalle de concentration 0,05 – 10 mg/l. Pour améliorer la sensibilité du détecteur de masse, nous avons choisi de mener cette étude en mode (SIM). Les résultats obtenus ainsi que les ions choisis dans les conditions optimales de fragmentation sont présentés dans le tableau I. Pour les quatre composés étudiés, nous avons obtenu un large domaine de linéarité (DL). Les limites de quantification et de détection obtenues se situent en-dessous des limites maximales de résidus (LMR) dans les muscles données par la réglementation, ces derniers sont fixés à 100  $\mu\text{g. kg}^{-1}$  pour la Tétracycline et à 600  $\mu\text{g. kg}^{-1}$  pour la Chlortétracycline, l'Oxytétracycline et la Doxycycline.

Tableau I : Ions sélectionnés pour la validation, DL : domaine de linéarité, LQ : limites de quantification, LD : limites de détection.

	DL (mg/L)	LQ (mg/L)	LD (mg/L)	Ions sélectionnés à $m/z$
Oxytétracycline	10,00 - 0,15	0,10	0,06	426 ; 444 ; 461
Tétracycline	10,00 - 0,05	0,08	0,04	410 ; 427 ; 445
Chlortétracycline	7,00 - 0,15	0,10	0,05	444 ; 462 ; 479
Doxycycline	7,00 - 0,08	0,07	0,03	428 ; 445

Pour étudier la répétabilité de la méthode chromatographique mise au point précédemment, nous avons réalisé trois injections pour chaque point étalon. Cette opération a été réalisée trois jours de suite afin de pouvoir déterminer la reproductibilité. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II. Le calcul du pourcentage du coefficient de variation standard (% CV), relatif à la répétabilité, pour chaque point étalon montre que les erreurs relatives maximales sont de 4,01, 3,31, 2,58 et 2,84 % pour l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline respectivement. Les résultats obtenus pour la reproductibilité sont respectivement 2,94, 3,05, 3,10 et 2,09. A partir de ces valeurs, nous pouvons nous assurer que la méthode optimisée est reproductible avec une erreur inférieure à 5 %.

Pour déterminer les rendements d'extraction, nous avons préparé des échantillons de viandes dopés aux antibiotiques par l'ajout de 5  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  et 15  $\mu\text{l}$  d'une solution (0,1 mg/ml) à une masse de 5 g de viande. La procédure d'extraction, telle qu'elle est décrite dans la partie expérimentale, a été testée sur neuf échantillons de viandes non dopés aux antibiotiques et aucune interférence n'a été observée sur les chromatogrammes (Figure 4). Pour étudier la répétabilité de la méthode d'extraction mise au point précédemment, nous avons réalisé trois extractions pour chaque niveau de concentration (100, 200 et 300  $\mu\text{g. kg}^{-1}$ ). Pour étudier la reproductibilité, nous avons refait cette opération trois jours de suite. Ainsi, nous avons pu déterminer les rendements d'extraction des quatre antibiotiques étudiés. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III. La méthode de préparation des échantillons nous a permis de récupérer les antibiotiques à partir des muscles bovins. Nous avons noté que les plus faibles valeurs du rendement d'extraction sont de 81,94 % pour l'Oxytétracycline avec une erreur de 2,43 %, de 89,61 % pour la Tétracycline avec une erreur de 1,28 %, de 80,11 % pour la Chlortétracycline avec une erreur de 1,63 % . Les valeurs sont



acceptables pour la validation d'une méthode d'analyse des résidus des trois tétracyclines à l'état de traces.

Tableau 11 : Les pourcentages du coefficient de variation standard (% CV) obtenus pour la répétabilité et la reproductibilité en fonction des concentrations et des composés, n : le nombre d'injection.

Concentration (mg. L)	10,00	5,00	2,50	1,00	0,50	0,25	0,10	0,05
<b>Oxytétracycline</b>								
<i>répétabilité (jours)</i>	% CV (n = 3)							
1	2,54	1,85	1,78	0,86	0,41	1,10	0,44	1,46
2	0,82	1,20	1,10	2,64	4,01	0,30	0,27	1,14
3	0,57	0,04	0,47	1,34	0,55	2,18	2,73	0,51
<i>reproductibilité</i>	% CV (n = 9)							
	1,73	1,22	1,24	2,94	2,91	1,51	1,62	1,30
<b>Tétracycline</b>								
<i>répétabilité (jours)</i>	% CV (n = 3)							
1	1,06	1,35	1,71	1,42	0,95	0,39	0,61	2,16
2	3,31	1,73	1,97	1,44	1,30	2,17	1,29	2,89
3	0,66	1,02	0,28	2,38	1,58	0,29	1,01	1,51
<i>reproductibilité</i>	% CV (n = 9)							
	2,12	1,42	3,05	1,71	2,55	2,80	0,99	3,02
<b>Chlortétracycline</b>								
<i>répétabilité (jours)</i>	% CV (n = 3)							
1	0,83	0,34	0,71	0,93	1,78	0,57	2,21	1,29
2	0,50	2,36	0,40	0,96	0,83	1,41	2,34	2,58
3	0,33	0,30	1,12	0,69	0,51	0,55	1,27	0,91
<i>reproductibilité</i>	% CV (n = 9)							
	2,26	1,88	1,02	3,10	1,53	1,32	1,79	2,45
<b>Doxycycline</b>								
<i>répétabilité (jours)</i>	% CV (n = 3)							
1	1,07	0,32	0,15	0,99	1,17	0,64	0,58	2,66
2	0,79	2,05	0,29	0,84	0,93	2,84	1,68	1,91
3	0,18	0,20	0,50	0,83	1,47	0,93	0,53	1,77
<i>reproductibilité</i>	% CV (n = 9)							
	0,95	1,79	0,75	1,58	1,19	2,09	1,22	1,86

En ce qui concerne la Doxycycline, les rendements obtenus sont 69,69 % avec une erreur de 2,91 % valeur se trouvant à la limite inférieure acceptée (70 %) pour la validation d'une méthode d'analyse. Les coefficients de variation standard relatifs aux extractions et à l'analyse chromatographique pour les quatre composés étudiés sont tous inférieurs à 5 %.



Tableau III : Les rendements moyens d'extraction et les pourcentages du coefficient de variation standard (% CV) obtenus pour la répétabilité et la reproductibilité en fonction des composés et des concentrations du dopage.

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	100		200		300	
	<i>R</i> moyen	% CV	<i>R</i> moyen	% CV	<i>R</i> moyen	% CV
<b>Oxytétracycline</b>						
<i>répétabilité (jours)</i>						
1	82,03	4,51	82,08	1,72	83,79	0,83
2	81,64	3,11	82,45	2,30	81,42	2,62
3	84,79	2,25	81,29	3,74	83,77	2,87
<i>reproductibilité</i>	<b>82,82</b>	<b>3,61</b>	<b>81,94</b>	<b>2,43</b>	<b>83,00</b>	<b>2,44</b>
<b>Tétracycline</b>						
<i>répétabilité (jours)</i>						
1	90,48	3,37	91,50	1,31	90,12	0,99
2	92,00	0,85	90,09	2,03	89,81	0,76
3	89,32	1,26	88,93	0,53	88,90	1,88
<i>reproductibilité</i>	<b>90,60</b>	<b>2,25</b>	<b>90,17</b>	<b>1,75</b>	<b>89,61</b>	<b>1,28</b>
<b>Chlortétracycline</b>						
<i>répétabilité (jours)</i>						
1	80,80	2,08	79,78	1,37	80,89	1,20
2	80,97	2,70	82,30	1,21	80,55	0,67
3	79,82	1,04	82,05	2,19	78,90	1,85
<i>reproductibilité</i>	<b>80,53</b>	<b>1,91</b>	<b>81,38</b>	<b>2,05</b>	<b>80,11</b>	<b>1,63</b>
<b>Doxycycline</b>						
<i>répétabilité (jours)</i>						
1	72,23	1,87	70,94	2,75	69,62	1,05
2	69,52	1,62	69,69	1,13	70,81	4,84
3	72,10	3,16	70,21	2,40	68,64	1,16
<i>reproductibilité</i>	<b>71,28</b>	<b>2,74</b>	<b>70,28</b>	<b>2,07</b>	<b>69,69</b>	<b>2,91</b>

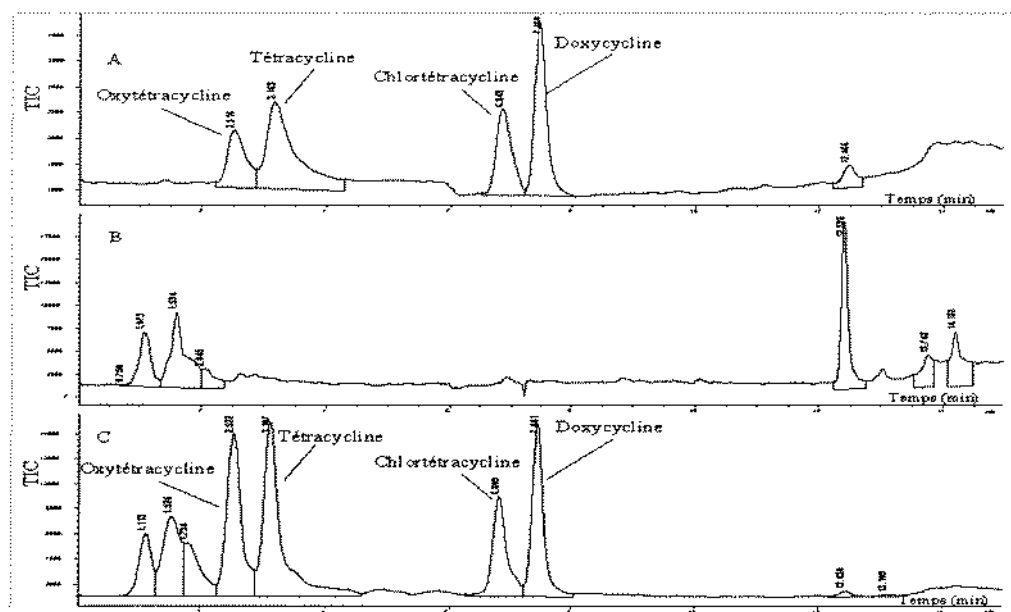


Figure 4 : Courant ionique total enregistré par le spectromètre de masse, (A) chromatogramme des standards des tétracyclines (100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ), (B) chromatogramme d'un extrait de viande non dopé aux antibiotiques, (C) chromatogramme d'un extrait de viande dopé aux antibiotiques (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) enregistré dans les conditions décrites dans le tableau I.



## CONCLUSION

Le but du présent travail est le développement et la validation d'une méthode d'analyse multirésidus, rapide et simple de l'Oxytétracycline, la Tétracycline, la Chlortétracycline et la Doxycycline dans la viande bovine par couplage HPLC-MS. L'extraction des antibiotiques a été réalisée sur une cartouche d'extraction SPE de type C<sub>18</sub>. La détermination quantitative des résidus d'antibiotiques a été réalisée par couplage HPLC-MS avec une détection en mode SIM. Par cette méthode, nous avons pu récupérer l'Oxytétracycline à  $81,9 \pm 3$  %, la Tétracycline à  $89,6 \pm 2$  %, la Chlortétracycline à  $80,1 \pm 2$  % et la Doxycycline à  $69,6 \pm 3$ %. Cette méthode validée peut être mise en application sur des échantillons de viandes bovines. Par ailleurs, nous envisageons de développer davantage ce travail en utilisant le couplage HPLC-MS-MS comme technique analytique et en mettant en œuvre d'autres conditions permettant d'améliorer le rendement d'extraction de la Doxycycline.

## REFERENCES

- [1] M. M. L. Aerts, A. C. Hogenboom, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. B.*, **1995**, 667, 1.
- [2] A. L. Cinquina, F. Longo, G. Anastasi, L. Giannetti, R. Cozzani, *J. Chromatogr. A.*, **2003**, 987, 227.
- [3] P. Edder, C. Corvi, *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **2001**, 92, 218.
- [4] G. Carignan, K. Carrier, S. Sved, *J. Assoc. Of. Anal. Chem.*, **1993**, 76, 325.
- [5] M. Horie, K. Saito, R. Ishii, T. Yoshida, Y. Haramaki, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A.*, **1998**, 812, 295.
- [6] H. Oka, Y. Ikai, Y. Ito, J. Hayakawa, K. Harada, M. Suzuki, H. Odani, K. Maeda, *J. Chromatogr. B.*, **1997**, 693, 337.
- [7] P. Edder, A. Cominoli, C. Corvi, *Trav. Chim. Aliment., Hyg.* **1998**, 89, 369.
- [8] P. Edder, A. Cominoli, C. Corvi, *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **1999**, 90, 291.
- [9] P. Edder, A. Cominoli, C. Corvi, *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **2000**, 91, 172.
- [10] W. J. Blanchflower, R. J. McCracken, A. S. Haggan, D. G. Kennedy, *J. Chromatogr. B.*, **1997**, 692, 351.
- [11] P. Edder, A. Cominoli, C. Corvi, *J. Chromatogr. A.*, **1999**, 830, 345.
- [12] S. Le Boulair, J. C. Bauduret, F. Andre, *J. Agric. Food chem.*, **1997**, 45, 2134.
- [13] M. McGrane, M. O'Keeffe, M. R. Smyth, *Analyst.*, **1998**, 123, 2779.
- [14] N. V. Eeckhout, J. C. Perez, J. Claereboudt, R. Vandeputte, C. Van Peteghem, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, 14, 280.