

# Analyse multi-résidus de médicaments vétérinaires dans du foie de bovin par LC/MS/MS

**Agilent Bond Elut QuEChERS  
Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR-Lipid)  
(élimination améliorée de la matrice lipidique)**

## Note d'application

Analyse alimentaire et agriculture

### Auteurs

Limian Zhao et Derick Lucas  
Agilent Technologies, Inc.

### Extrait

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) (élimination améliorée de la matrice lipidique) est un produit de préparation d'échantillons nouvelle génération, qui simplifie l'extraction en phase solide dispersive (dSPE). Le matériau est très sélectif pour la matrice co-extraiet, en particulier d'échantillons à haute teneur en lipides (teneur en lipides > 5 %), sans affecter négativement le rendement des analytes. Cette étude illustre l'utilisation de ce nouveau produit pour l'analyse LC/MS de 30 médicaments vétérinaires représentatifs dans du foie de bovin. La procédure comporte une extraction rapide et efficace par précipitation de protéines avec de l'acétonitrile acidifié, suivie de l'utilisation de l'absorbant dSPE EMR—Lipid et d'un kit de finition pour poursuivre le traitement. La quantité de matrice éliminée par le protocole EMR-Lipid a été déterminée par les expérimentations à la fois du poids des interférences co-extraiet et d'infusion post-colonne. Comparé à d'autres produits utilisés pour le traitement de l'échantillon, l'adsorbant dSPE EMR—Lipid permet d'obtenir une élimination de la matrice plus efficace et un meilleur rendement des analytes. La méthode optimisée EMR—Lipid offre une plus grande propreté, une exactitude et une précision excellentes pour les 30 médicaments vétérinaires à toutes les concentrations, ce qui permet une analyse rapide, robuste et efficace des échantillons à haute teneur en lipides.



**Agilent Technologies**

## Introduction

Les médicaments vétérinaires sont largement utilisés chez les animaux dans l'industrie agroalimentaire afin d'éviter les maladies ou d'accélérer la croissance. Ces médicaments s'accumulent dans le tissu animal et leur utilisation inappropriée peut entraîner l'accumulation de médicaments résiduels dans les tissus comestibles, un risque connu pour la santé humaine. Du fait de l'intérêt croissant pour le contrôle sanitaire des aliments, des réglementations ont été mises en place dans pratiquement tous les pays pour limiter les médicaments utilisés dans la production d'aliments d'origine animale [1-4].

Les aliments d'origine animale tels que les muscles, le foie et les œufs sont généralement complexes chimiquement et il est donc essentiel d'appliquer une méthode de préparation d'échantillons efficace comprenant une extraction générale et un traitement efficace. Les méthodes établies pour la préparation d'échantillons comprennent l'extraction traditionnelle par des solvants, l'extraction en phase solide (SPE) ou la combinaison de plusieurs techniques. Ces méthodes exigent habituellement beaucoup de temps et de travail et ne s'appliquent qu'à un nombre limité de classes de composés et nécessitent le développement de méthodes supplémentaires.

Les méthodes multi-classes et multi-résidus sont de plus en plus populaires dans les programmes de surveillance réglementaire en raison de l'augmentation de leur portée analytique et de leur efficacité en laboratoire. Le nombre de médicaments vétérinaires sous surveillance a augmenté ces dernières années et l'on en signale aujourd'hui plus de 100 [5-8]. Le pré-traitement des échantillons comporte habituellement l'extraction avec un mélange acétonitrile:eau, suivie d'un traitement à base de C18, d'autres techniques de traitement ou les deux. Les adsorbants tels que C18 ne

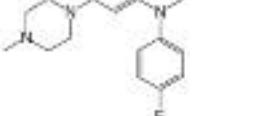
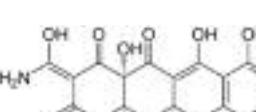
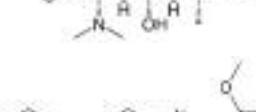
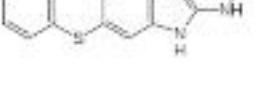
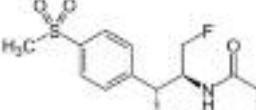
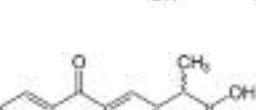
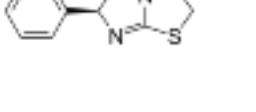
permettent qu'une élimination limitée des lipides co-extrats, ce qui peut entraîner une précipitation dans l'échantillon final après dilution ou reconstitution. La formation d'un précipité nécessite la filtration de l'échantillon avant l'injection dans le LC/MS/MS et peut causer une perte d'analyte. De l'hexane peut être ajouté pendant l'extraction en phase solide dispersive (dSPE) afin d'éliminer les lipides co-extrats mais cela est non sélectif, prend du temps et élimine les analytes hydrophobes. L'utilisation d'un adsorbant à base de zirconium permet un meilleur traitement de la matrice qu'à base de C18 mais entraîne aussi plus de perte d'analytes, notamment les composés contenant des acides carboxyliques et des hydroxyles- tels que les fluoroquinones, les tétracyclines et les macrolides [7,8].

Agilent Bond Elut QuEChERS EMR—Lipid est un nouvel adsorbant qui élimine sélectivement les principales classes de lipides des extraits d'échantillons sans perte des composés d'intérêt. L'élimination des lipides due aux interférences des matrices complexes est particulièrement importante pour les techniques telles que QuEChERS et la précipitation des protéines. Comme ces méthodes simples de préparation d'échantillons ne peuvent pas éliminer un grand pourcentage des lipides, les interférences co-extraiées resteront dans l'extrait final de l'échantillon avec les analytes cibles. Ceci entraîne des anomalies chromatographiques, des résultats peu précis et plus de problèmes de maintenance. Dans cette étude, nous évaluons une nouvelle approche de préparation d'échantillons pour l'analyse de 30 médicaments vétérinaires représentatifs et complexes dans du foie de bovin avec une extraction par précipitation des protéines suivie d'un traitement par EMR-Lipid. Les médicaments vétérinaires sélectionnés représentent 17 classes différentes, dont des médicaments hydrophiles et hydrophobes, acides, neutres et basiques. Le tableau 1 fournit les informations chimiques et réglementaires pour ces médicaments vétérinaires.

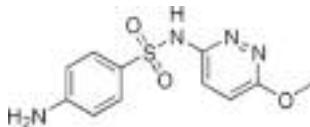
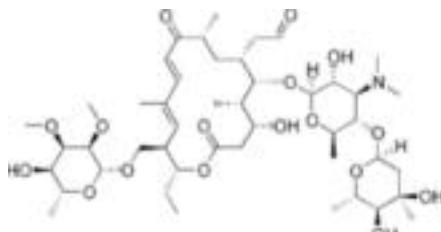
Tableau 1. Propriétés physiques et chimiques des médicaments vétérinaires.

Nom	Classe de médicament	Log P	pKa	Formule moléculaire	Structure	Limite US (µg/g)
2-Thiouracile	Thyréostat	-0,28	7,75	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> OS		n.c
Acétopromazine	Tranquillisant	3,49	9,3	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> OS		n.c
Amoxicilline	β-Lactam	0,86	2,4	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S		0,01

Nom	Classe de médicament	Log P	pKa	Formule moléculaire	Structure	Limite US (µg/g)
Bithionol	Flukicide	5,51	4,82	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S		n.c
Céfazoline	Céphalosporine	-1,5	2,3	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>8</sub> O <sub>4</sub> S <sub>3</sub>		n.c
Chloramphénicol	Phénicol	1,14	5,5	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> C <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		(c)
Chlorpromazine	Tranquillisant	5,20	9,3	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> S		n.c
Chlortétracycline	Tétracycline	0,24	3,3, 7,4, 9,3	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>		2 (d)
Ciprofloxacine	Fluoroquinolone	0,28	6,09, 8,74	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		(c)
Clorsulon	Flukicide	1,25	—	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> C <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>		0,1 (e)
Danofloxacine	Fluoroquinolone	1,2	6,04	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		0,02 (a, e)

Nom	Classe de édicament	Log P	pKa	Formule moléculaire	Structure	Limite US (µg/g)
Difloxacine	$\beta$ -Lactam	2,78	5,85	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		n.c
Doxycycline	Tétracycline	-0,54	3,4	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>		n.c
Fenbendazole	Antihelminlique	3,75	10,27	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S		0,4 (e, h), 2 (b)
Florfénicol	Phénicol	-0,12	10,73	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> C <sub>12</sub> FNO <sub>4</sub> S		0,2 (b)
Kétoprofène	Tranquillisant	2,81	3,88	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>		n.c
Lévamisole	Antihelminlique	1,85	8,0	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> S		0,1 (e)
Lincomycine	Lincosamide	0,91	7,8	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S		0,1 (b)
Mélengestérol acétate (MGA)	Autre	4,21	11,42	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>		0,025 (g)



Nom	Classe de médicament	Log P	pKa	Formule moléculaire	Structure	Limite US (µg/g)
Sulfaméthoxypyridazine	Sulfamide	0,32	6,7	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S		n.c
Tylosine	Macrolide	3,27	7,7	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>		0,2 (f)

a Limite dans le foie de bovin (pour la tulathromycine, un résidu marqueur a été établi)

b Limite dans le muscle de cochon

c Interdiction d'utilisation hors AMM

d La limite est la somme des résidus de tétracycline, y compris la chlortétracycline, l'oxytétracycline et la tétracycline dans le muscle

e Limite dans le muscle de bovin

f Limite dans la graisse, le muscle, le foie et le rein de bœuf crus

g Limite dans la graisse de bœuf

h Limite dans le muscle de chèvre

## Données expérimentales

Tous les réactifs et solvants sont de grade HPLC ou analytique. L'acétonitrile (ACN) provient de Honeywell (Muskegon, MI, USA). Le diméthyl sulfoxyde (DMSO), les étalons de médicaments vétérinaires et l'étalon interne proviennent de Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, MO, USA). L'acide formique de grade réactif (AF) provient d'Agilent (Réf. G2453-86060). L'acétate d'ammonium (NH<sub>4</sub>OAc) provient de Fisher Chemicals (Fair Lawn, NJ, USA).

## Solutions et étalons

L'acide formique (5 %) dans de l'acétonitrile est préparé en ajoutant 5 mL d'acide formique à 95 mL d'ACN. La solution mère d'acétate d'ammonium (1 M) est préparée par dissolution de 19,27 g de NH<sub>4</sub>OAc dans 250 mL d'eau Milli-Q. La solution est conservée à 4 °C. Une solution d'acétate d'ammonium 5 mM dans de l'eau est préparée en ajoutant 5 mL de solution mère d'acétate d'ammonium 1 M à 1 L d'eau Milli-Q.

Les solutions mères d'étalons et d'étalons internes (EI) sont préparées dans du DMSO à une concentration de 2,0 mg/mL, excepté pour la solution mère de danofloxacine dans du DMSO à 1,0 mg/mL et la solution mère de ciprofloxacine dans du DMSO à 0,25 mg/mL. Les solutions mères d'amoxicilline et de céfazoline sont préparées dans de l'eau à une concentration de 2,0 mg/mL. Toutes les solutions mères

sont préparées dans des flacons en verre ambré, excepté l'amoxicilline et la céfazoline qui sont préparées dans des flacons en plastique. Toutes les solutions mères sont conservées à -20 °C. Les 30 composés sont assignés à deux groupes, G1 et G2, selon leur réponse à l'instrument. Une solution de travail d'étalons combinés de 25/5 µg/mL (G1/G2) est préparée dans de l'ACN/eau 1/1. Une solution de travail d'étalon interne de flunixin-d<sub>3</sub> (25 µg/mL) est préparée dans de l'ACN/eau 1/1.

## Équipement

L'équipement et les matériaux utilisés pour la préparation d'échantillons comprennent :

- Broyeur Geno/Grinder (SPEX, Metuchen, NJ, USA)
- Centrifugeuse Centra CL3R (Thermo IEC, MA, USA)
- Microcentrifugeuse Eppendorf, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA
- Agitateur vortex et agitateur vortex multi-tubes, VWR, Radnor, PA, USA
- Distributeur pour flacon, VWR, So. Plainfield, NJ, USA
- Pipettes et répétiteur Eppendorf
- Tubes Agilent Bond Elut EMR—Lipid (Réf. 5982-1010) et tubes de finition Agilent Bond Elut Final Polish (Réf. 5982-0101)

## Instruments

L'analyse est effectuée sur un système Agilent 1290 Infinity LC comportant :

- Une pompe quaternaire Agilent 1290 Infinity (G4204A)
- Un passeur automatique d'échantillons Agilent 1290 Infinity haute performance (G4226A) équipé d'un thermostat Agilent 1290 Infinity (G1330B) et d'un compartiment à colonne thermostaté Agilent 1290 Infinity (G1316C)

Le système UHPLC est couplé à un système LC/MS à triple quadripôle Agilent 6490 équipé d'une source d'ionisation électrospray Agilent Jet Stream et d'une technologie Agilent iFunnel. Un logiciel de station de travail Agilent MassHunter est utilisé pour l'acquisition et l'analyse des données.

## Conditions relatives à l'instrument

### Conditions de HPLC

Colonne :	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 150 mm, 2,7 µm (Réf. 693775-902), Agilent Poroshell 120 EC-C18 UHPLC Guard, 2,1 × 5 mm, 2,7 µm (Réf. 821725-911)
Phase mobile :	A) AF à 0,1 % dans de l'eau B) AF à 0,1 % dans de l'acétonitrile
Débit :	0,3 mL/min
Température de colonne :	40 °C
Température du passeur automatique d'échantillons	4 °C
Volume d'injection :	3 µL
Rinçage de l'aiguille :	1:1:1 ACN:MeOH:IPA:H2O avec AF à 0,2 %
Gradient :	Temps (min) %B 0 10 0,5 10 8,0 100
Fin d'analyse :	12 min
Temps post-analyse :	3 min

### Conditions, MS

Mode positif/négatif	
Température de gaz :	120 °C
Débit :	14 L/min
Nébuliseur :	40 psi
Chauffage pour gaz de gainage :	400 °C
Débit du gaz de gainage	12 l/min
Capillaire :	3 000 V
Paramètres de iFunnel :	Positif Négatif
RF haute pression	90 V 90 V
RF basse pression	70 V 60 V

Les conditions de MS DMRM pour les analytes sont indiquées dans le tableau 2, et la figure 1 montre un chromatogramme type.

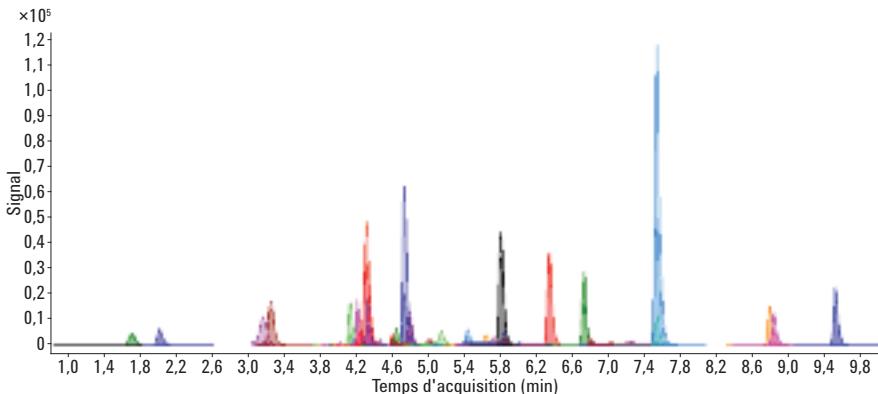
## Préparation d'échantillons

La procédure finale de préparation d'échantillons est optimisée avec les étapes suivantes :

1. Peser 2 g ( $\pm 0,1$  g) de foie de bovin homogénéisé dans des tubes à centrifugeuse de 50 mL.
2. Ajouter 10 mL d'acétonitrile acidifié (contenant de l'AF à 5 %).
3. Mélanger les échantillons sur un agitateur mécanique pendant 2 min.
4. Centrifuger à 5 000 rpm (tr/min) pendant 5 minutes.
5. Ajouter 5 mL de tampon d'acétate d'ammonium (5 mM) à un tube d'SPE EMR-Lipid de 15 mL.
6. Transférer 5 mL de surnageant dans un tube EMR—Lipid.
7. Agiter au vortex immédiatement pour disperser l'échantillon, puis mélanger pendant 60 sec sur un plateau vortex multi-positions.
8. Centrifuger à 5 000 rpm (tr/min) pendant 3 minutes.
9. Transférer 5 mL de surnageant dans un tube de finition EMR—Lipid de 15 mL contenant 2 g de sels (1:4, NaCl:MgSO<sub>4</sub>) et agiter au vortex pendant 1 min.
10. Centrifuger à 5 000 rpm (tr/min) pendant 3 minutes.
11. Combiner 200 µL de la couche d'ACN supérieure et 800 µL d'eau dans un flacon à échantillon de 2 mL et agiter au vortex.

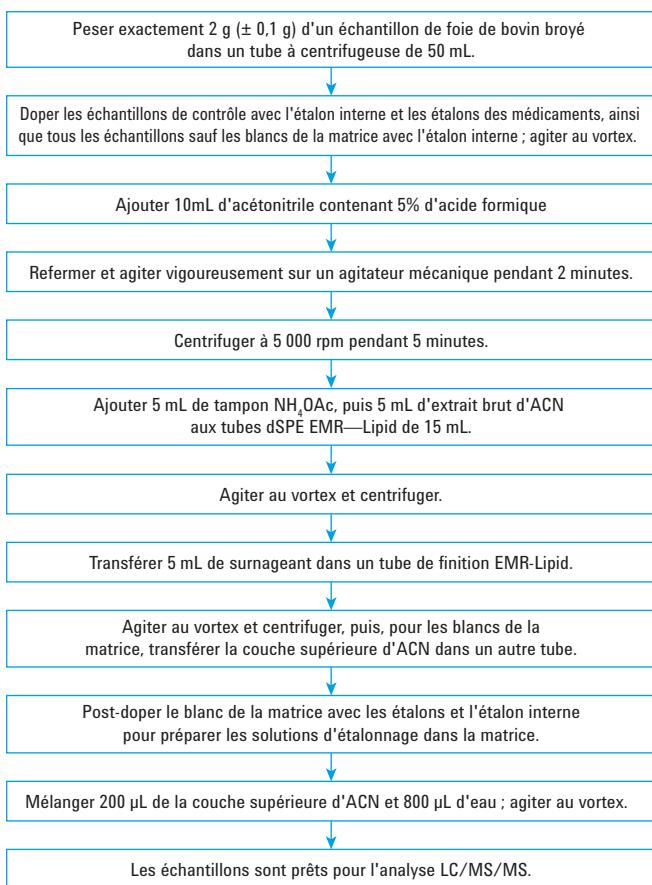
Tableau 2. Paramètres DMRM de LC/MS/MS et temps de rétention pour les analytes cibles.

Analyte	TR (min)	Delta TR (min)	Polarité	Ion parent (m/z)	Ion fils		
					Ion de quantifi- cation	CE (V)	Ion qual. CE (V)
2-Thiouracile	1,41	2	Négatif	127	57,9	17	—
Amoxicilline	1,84	2	Positif	366,1	349,2	5	114
Méthonidazole-OH	2,07	2	Positif	188,1	123,1	9	126,1
Lévamisole	3,4	2	Positif	205,1	178,1	21	91,1
Lincomycine	3,35	2	Positif	407,2	126,1	37	70,1
Norfloxacine	4,22	2	Positif	320,1	302,2	21	276,1
Oxytétracycline	4,24	2	Positif	461,2	426,1	17	443,2
Ciprofloxacine	4,31	2	Positif	332,1	231	45	314,3
Danofloxacine	4,42	2	Positif	358,2	340,2	21	81,9
Ractopamine	4,4	2	Positif	302,2	107	33	77
Morantel	4,9	2	Positif	221,1	123,1	37	76,9
Céfazoline	4,65	2	Positif	455	323,1	9	156
Sulfaméthizole	4,65	2	Positif	271	156,1	13	92
Sulfaméthoxypyridazine	4,69	2	Positif	281,1	92	33	65,1
Difloxacine	4,83	2	Positif	400,2	382	25	356,3
Chlortétracycline	5,11	2	Positif	479,1	444,2	21	462,1
Doxycycline	5,24	2	Positif	445,2	428,1	17	410,2
Florfénicol	5,47	2	Négatif	300,1	268,1	25	159,1
Chloramphénicol	5,68	2	Négatif	321	152	17	257,1
Tylosine	5,85	2	Positif	916,5	173,9	45	772,5
Closulon	5,86	2	Négatif	377,9	341,9	9	—
Prednisone	5,88	2	Positif	359,2	147,2	33	341,2
Acétopromizine	5,93	2	Positif	327,2	86	21	58
Chlorpromazine	6,49	2	Positif	319,1	86	21	58,1
Fenbendazole	6,77	2	Positif	300,1	268,1	25	159,1
Kétoprofène	6,8	2	Positif	255,1	208,9	13	77
Oxyphenbutazone	7,27	2	Négatif	323,1	133,9	25	295
Flunixin-d <sub>3</sub> (NEG)	7,53	2	Négatif	298,1	254,2	17	192
Flunixin-d <sub>3</sub> (POS)	7,53	2	Positif	300,1	282	25	264
Mélengestrol acétate	8,78	2	Positif	397,2	337,4	13	279,2
Niclosamide	8,82	2	Négatif	325	170,9	25	289,1
Bithionol	9,49	2	Négatif	352,9	161	21	191,8



**Figure 1.** Chromatogramme type de LC/MS/MS (DMRM) d'échantillon de foie de bovin dopé avec 50 ng/g d'étalon de médicament vétérinaire et extrait par précipitation de protéines puis traité avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

L'échantillon est prêt pour une analyse LC/MS/MS.  
L'ensemble du parcours de préparation d'échantillons est illustré dans la figure 2.



**Figure 2.** Procédure de préparation d'échantillons avec Agilent Bond Elut EMR—Lipid pour l'analyse de médicaments vétérinaires dans du foie de bovin.

### Étalons pour la calibration et échantillons de contrôle

Les échantillons de contrôle pré-dopés sont dopés de manière appropriée avec une solution de travail d'étalons combinés après l'étape 1 et en 6 réplicats. Pour les analytes G1, les échantillons de contrôle correspondent à 10, 50, 250 et 750 ng/g dans du foie. Pour les analytes G2, les échantillons de contrôle correspondent à 2, 10, 50 et 150 ng/g dans du foie. Tous les échantillons excepté le blanc de matrice sont également dopés avec la solution d'étalon interne à hauteur de 200 ng/g de flunixin-d<sub>3</sub> dans le foie.

Les solutions de calibration dans la matrice sont préparés avec des solutions de travail d'étalon et d'étalon interne. Les concentrations appropriées dans les blancs de la matrice après l'étape 8 correspondent à 5, 25, 50, 250, 750 et 1 000 ng/g dans du foie (G1), ou à 1, 5, 10, 50, 150 et 200 ng/g dans du foie (G2) et 200 ng/g d'EI dans du foie.

## **Mesure de la quantité d'interférences co-extractées**

La quantité d'interférences co-extractées est déterminée par des mesures gravimétriques [7] pour trois techniques de traitement : C18, l'adsorbant à base de zirconium et EMR—Lipid. Les échantillons sont préparés comme suit :

1. Chauffer les tubes à essai en verre pendant ~ 1 h à 110 °C pour éliminer l'humidité.
2. Refroidir les tubes à température ambiante.
3. Pré-peser les tubes.
4. Transférer exactement 1 mL d'extrait initial de blanc de matrice (sans traitement) et les blancs de matrice ayant subi différents traitements, en double à chaque fois.
5. Sécher tous les échantillons sur un CentriVap à 50 °C pendant 1 h ou jusqu'à ce qu'ils soient secs.
6. Chauffer les tubes pendant ~ 1 h à 110 °C pour éliminer l'humidité.
7. Refroidir les tubes à température ambiante.
8. Re-peser les tubes.

La différence entre le poids après l'étape 8 et le poids après l'étape 3 d'un blanc de matrice sans traitement correspond à la quantité totale d'interférences co-extractées dans l'échantillon. La quantité d'interférences co-extractées éliminées par le traitement est représentée par la différence moyenne de poids à l'étape 8 sans et avec traitement.

## **Évaluation de l'effet-matrice**

L'effet-matrice chromatographique est évalué par une infusion post-colonne. Les blancs de matrice sont injectés au cours de l'infusion post-colonne de 10 ppb de solution étalon pure de médicament vétérinaire à 60 µL/min. L'ensemble des transitions de composés sont suivies pendant toute la durée du cycle de LC.

En outre, la réponse de l'analyte (surface de pic) des extraits de foie post-dopés et pour des solutions-étalons équivalentes sont comparées. Les extraits de foie post-dopés sont obtenus par ajout de solution étalon au blanc de matrice de foie. La différence de réponse (surface de pic) est directement corrélée avec les effets-matrice.

## **Optimisation, validation et comparaison de la méthode**

Différents tests d'optimisation sont évalués ; AF à 5 % dans de l'ACN versus AF à 1 % dans de l'ACN pour la précipitation des protéines, tampon d'acétate d'ammonium versus de l'eau pour le traitement par EMR—Lipid, et avec ou sans sels de finition après le traitement par EMR—Lipid. Les résultats sont évalués sur la base du taux de récupération des analytes, la précision et d'autres paramètres de quantification. La méthode finale optimisée est ensuite validée en analysant un lot complet de quantification en utilisant des étalons en dupliques pour la courbe d'étalonnage englobant tous les échantillons de contrôle.

Les données de comparaison des taux de récupération sont recueillies avant et après dopage des échantillons de foie à une concentration de 50 ng/g. Les extraits sont traités par des protocoles de traitement acceptables. Pour le protocole EMR—Lipid avec précipitation des protéines, la procédure de traitement décrite dans la figure 2 est employée. Pour QuEChERS, un traitement d'SPE par C18 ou l'adsorbant à base de zirconium est utilisé comme suit :

1. Peser 2 g de foie dans un tube de 50 mL.
2. Ajouter 8 mL de tampon phosphate (pH 7,0) et 10 mL d'ACN acidifié (AF à 5 %).
3. Agiter l'échantillon au vortex pendant 30 sec.
4. Ajouter les sels EN de partition/extraction et agiter vigoureusement sur un agitateur mécanique.
5. Centrifuger à 5 000 rpm (tr/min) pendant 5 minutes.

L'extrait de foie brut dans l'ACN est ensuite traité comme suit :

1. Ajouter 1 mL d'extrait de foie brut dans de l'ACN dans un flacon de 2 mL contenant 25 mg de C18 et 150 mg de MgSO<sub>4</sub> (Réf. 5982-4921), ou dans un flacon de 2 mL contenant 100 mg d'adsorbant à base de zirconium.
2. Reboucher et agiter au vortex pendant 1 min.
3. Centrifuger à 13 000 rpm (tr/min) pendant 3 minutes (microcentrifugeuse).
4. Transférer 200 µL de surnageant dans un autre flacon contenant 800 µL d'eau.
5. Agiter au vortex et filtrer avec un filtre de cellulose régénérée 0,45 µm.

Les échantillons sont alors prêts pour l'analyse LC/MS/MS. Le taux de récupération est calculé à partir du rapport des surfaces de pic d'analytes des échantillons avant et après dopage.

## Résultats et discussion

### Quantité d'interférences co-extractées

Le tableau 3 donne les résultats du test gravimétrique des interférences co-extractées d'un échantillon. Les résultats montrent clairement que la dSPE EMR—Lipid offre une meilleure efficacité de traitement de la matrice par poids que la dSPE avec C18 ou l'adsorbant à base de zirconium.

Tableau 3. Résultats gravimétriques des interférences co-extractées de matrice de foie de bovin pour le traitement par Agilent Bond Elut EMR-Lipid à base de zirconium et C18.

Technique de traitement	Interférences co-extractées pour 1 mL d'extrait final dans de l'ACN (mg) (n = 2)	Efficacité d'élimination des interférences de matrice co-extractées grâce au traitement (%)
Pas de traitement supplémentaire	12,1	—
dSPE EMR—Lipid	5,3	56,2
Séparation avec dSPE et zirconium	6,0	50,4
dSPE C18	7,8	35,5

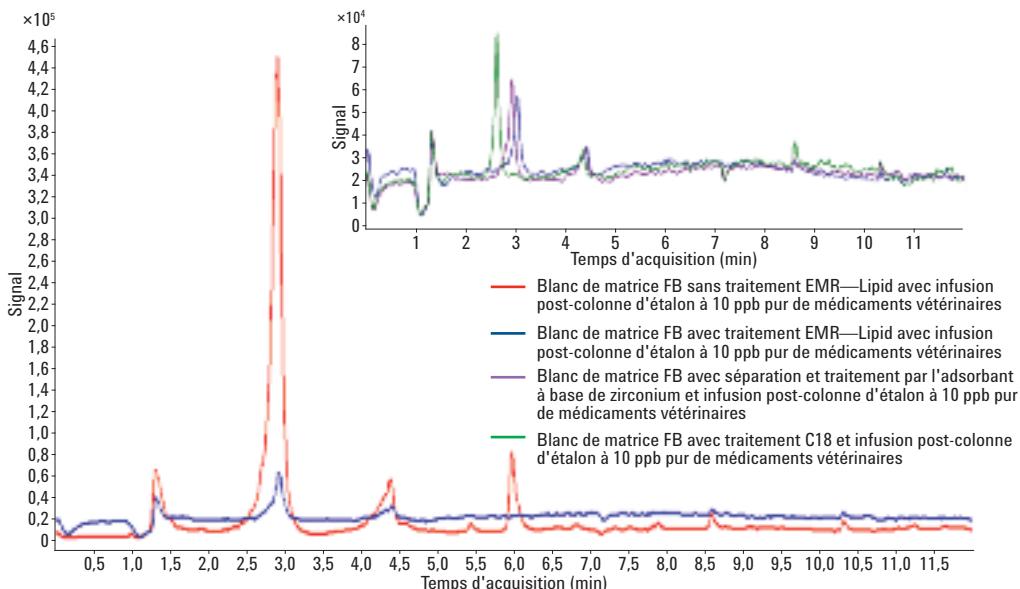


Figure 3. Des profils d'infusion post-colonne ont été générés en injectant un blanc de matrice de foie de bovin (FB) et une infusion post-colonne simultanée de 10 ppb de solution étalon de médicament vétérinaire. Tous les analytes ont été contrôlés pour l'analyse chromatographique et le profil était un chromatogramme d'ions totaux (TIC) combiné de toutes les transitions des analytes contrôlées.

### Évaluation de l'effet-matrice

Une infusion post-colonne (IPC) d'étalons de médicaments vétérinaires est utilisée pour évaluer les effets-matrice dans les extraits bruts d'ACN et trois extraits finaux d'ACN traités par EMR—Lipid, C18 et l'adsorbant à base de zirconium. L'ensemble des analytes sont suivis pendant toute la durée du cycle de LC. Les chromatogrammes de IPC reflètent l'effet-matrice pour les analytes suivis en mode positif et négatif. L'extrait final d'ACN n'est pas dilué avant l'injection et l'ACN est injecté directement. La figure 3 montre les profils de IPC.

Comme le montre le tracé rouge, une suppression significative (ligne de base inférieure) et une intensification dues à la matrice (grands pics) sont observées lors de l'injection d'un blanc de matrice de foie brute sans traitement. Ces effets-matrice auront des effets négatifs très importants sur la fiabilité de la méthode et la qualité des données. Par comparaison, comme le montre le tracé bleu, le traitement par EMR—Lipid permet d'obtenir une amélioration significative, observée par la réduction de la suppression et de l'intensification dues à la matrice.

Le chromatogramme inséré dans la figure 3 montre les profils IPC avec l'injection de blancs de matrice après différents types de traitement. Les profils d'EMR—Lipid (bleu) et de l'adsorbant à base de zirconium (violet) sont semblables. Le profil de traitement à base de C18 (vert) est également similaire aux deux autres mais présente plus de régions d'intensification et de suppression dues à la matrice. Cette comparaison correspond à celle de l'évaluation gravimétrique des interférences co-extractées, dans laquelle le traitement par EMR—Lipid donne un traitement légèrement plus efficace que l'adsorbant à base de zirconium, et tous deux un meilleur traitement que C18.

Une comparaison de la réponse de l'analyte pour les blancs de matrice post-dopés et les étalons purs a également été effectuée afin d'évaluer l'effet-matrice. Pour la plupart des analytes, aucune différence significative de réponse n'a été observée. Cependant, pour les composés plus hydrophobes, qui éluent tardivement, on observe plus de suppression d'ion due à la matrice pour les échantillons traités par C18 et l'adsorbant à base de zirconium. Puisque la plupart des lipides responsables d'interférences éluent tard, la réduction de la suppression d'ions pour les analytes hydrophobes confirme que EMR—Lipid élimine les lipides co-extrai ts de manière plus efficace que la dSPE C18 et l'adsorbant à base de zirconium. La figure 4 montre deux exemples de comment le traitement par EMR—Lipid a réduit les effets de suppression d'ion dus à la matrice.

## Optimisation de la méthode

Le solvant utilisé pour l'étape de précipitation des protéines a également été étudié. Il est connu que l'acétonitrile précipite les protéines de manière efficace avec un rapport échantillon:substance organique de 1:3 à 1:5, et que l'acétonitrile acidifié permet d'avoir plus de précipitation des protéines. Le foie de bovin est une matrice complexe et l'élimination des protéines est essentielle non seulement pour réduire les effets-matrice mais aussi pour faciliter un traitement efficace par EMR—Lipid. Dans cette étude, l'acide formique à 1 % et à 5 % dans de l'ACN a été évalué pour l'étape de précipitation des protéines suivie d'un traitement par EMR—Lipid et d'une analyse par LC/MS/MS. L'utilisation d'AF à 5 % dans de l'ACN a permis d'obtenir une meilleure précision comme le montrent les courbes d'étalonnage (Figure 5). La récupération des analytes a également été comparée, et de nouveau, l'AF à 5 % dans de l'ACN a permis d'obtenir une précision supérieure.

Il est important d'ajouter de l'eau ou du tampon pour activer le matériau EMR-Lipid. Ceci améliore son interaction avec la matrice indésirable de l'échantillon, et en particulier les lipides, ce qui permet l'élimination efficace de la matrice. L'effet de l'utilisation d'un tampon d'acétate d'ammonium (5 mM) pendant le traitement par EMR—Lipid a été évalué et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec de l'eau. Généralement, l'utilisation de tampon d'acétate d'ammonium a amélioré la récupération de 5 à 10 % pour de nombreux analytes, excepté les tétracyclines.

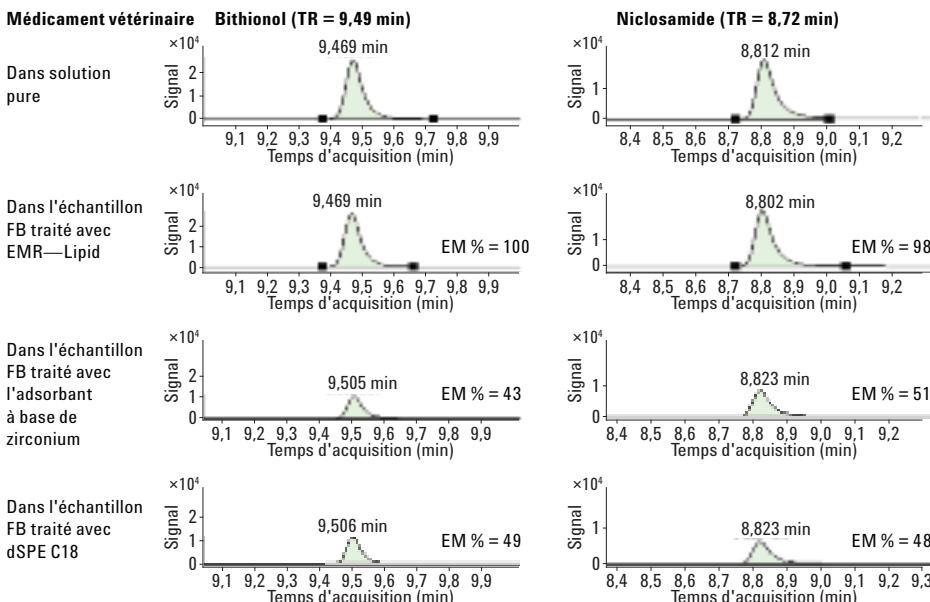


Figure 4. Comparaison de l'effet de suppression d'ions due à la matrice pour les analytes hydrophobes. L'effet-matrice (EM) a été calculé à partir du rapport de surface de pic pour l'extrait de foie post-dopé et l'étalon pur correspondant.

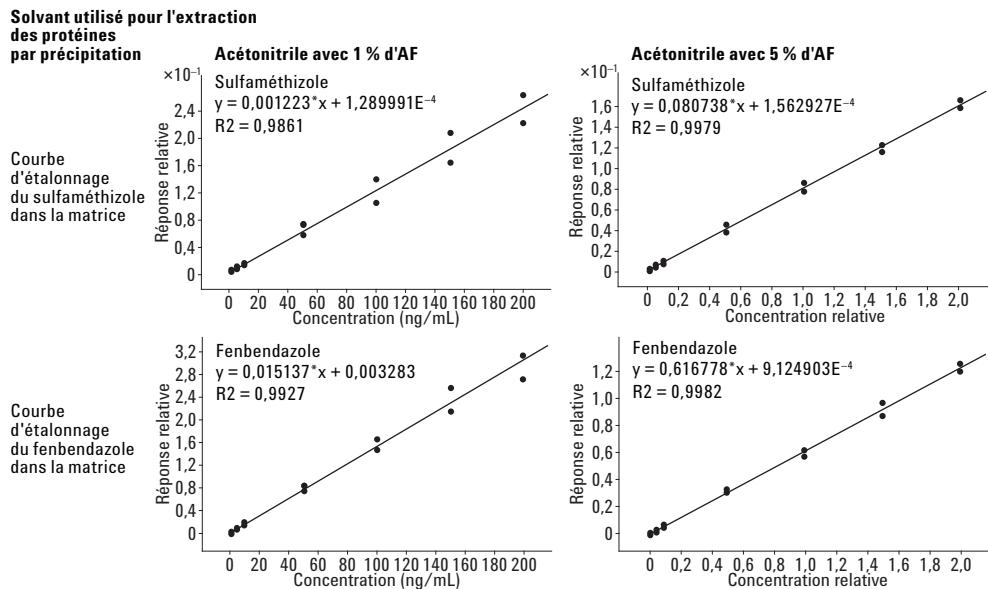


Figure 5. Comparaison de la linéarité de la courbe d'étalonnage lors de l'utilisation d'AF à 1 % versus à 5 % dans de l'ACN pour la précipitation des protéines.

Pour ces composés, l'utilisation du tampon donne une récupération environ 5 % inférieure par rapport à l'utilisation d'eau non tamponnée. Les analytes présentant d'évidentes différences de récupération lors de l'utilisation de tampon au lieu d'eau ont été sélectionnés pour comparaison dans la figure 6. Puisque la récupération d'un plus grand nombre

d'analytes a été améliorée par l'utilisation de tampon et que la perte de tétracycline occasionnée par le tampon était minime, la solution tampon d'acétate d'ammonium 5mM a été utilisée pour le reste de l'étude.

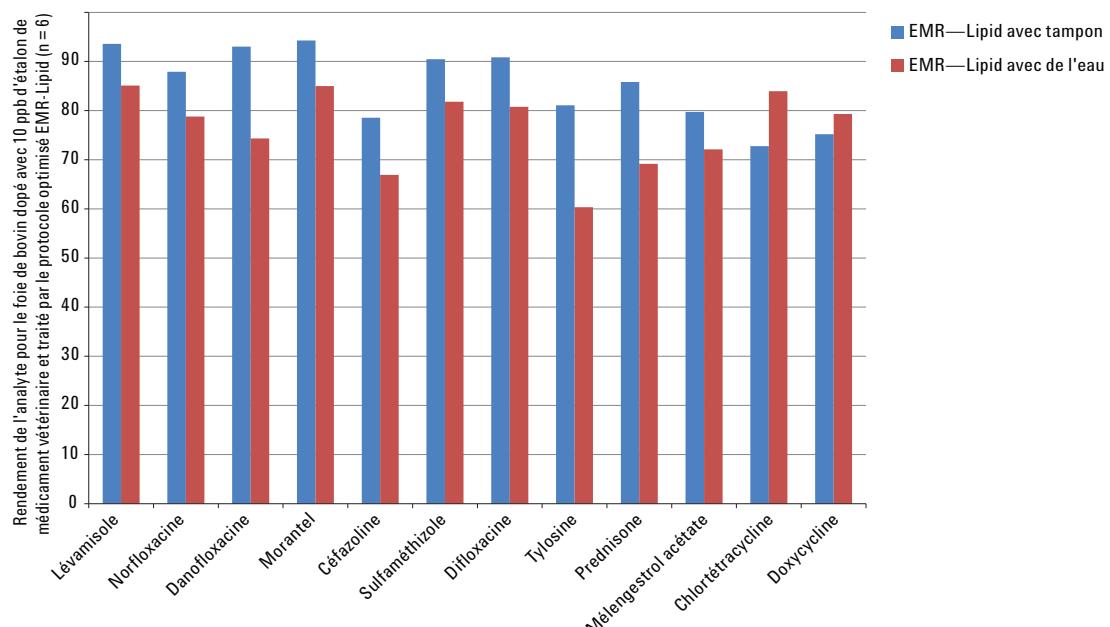


Figure 6. Comparaison de la récupération des analytes lors de l'utilisation de tampon d'acétate d'ammonium 5 mM versus de l'eau à l'étape de traitement avec EMR dSPE.

Après le traitement par EMR—Lipid, le surnageant représente un mélange ACN:eau d'environ 1:1. Une aliquote de surnageant de 5 mL est alors transférée dans un tube de finition EMR—Lipid, contenant 2 g de mélange de sels (4:1 MgSO<sub>4</sub>:NaCl) pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. Cette étape permet non seulement la séparation mais facilite aussi un traitement plus poussé de la matrice et élimine d'autres adsorbants dissous et les sels. Par conséquent, cette étape est hautement recommandée pour les analyses par GC et LC. Pendant notre développement de méthode, de bonnes récupérations d'analyte et une bonne précision ont été obtenues pour tous les analytes excepté les tétracyclines. En poussant plus loin nos observations, nous avons remarqué que la faible récupération des tétracyclines (45 à 68 %) était liée à l'étape de séparation par l'ajout de sel. Afin de réduire la perte de tétracyclines, un protocole alternatif omettant les sels de finition EMR—Lipid (Figure 7) a été étudié. La procédure est similaire sauf que 400 µL d'extrait (de dSPE EMR—Lipid) et 600 µL d'eau ont été mélangés dans un flacon à microcentrifugeuse et agité au vortex pendant une minute sans passer par l'étape de finition. Les échantillons ont été centrifugés sur une microcentrifugeuse à 13 000 rpm (tr/min) pendant trois minutes, puis le surnageant a été transféré dans un flacon à échantillon de 2 mL pour l'analyse par LC/MS/MS. Le post-dopage avec les étalons et l'EI dans le blanc de matrice a été effectué avant l'étape de mélange/dilution. Ce protocole peut être considéré comme sans séparation puisqu'il n'utilise pas de sels.

Les résultats présentés dans la figure 8 montrent clairement que la récupération pour les tétracyclines peut être améliorée de manière conséquente avec ce protocole alternatif. Cependant, les résultats obtenus avec le protocole de finition (présentés dans la figure 2) pour les tétracyclines pourraient être acceptables puisque la précision concerne la quantification. Les faibles récupérations peuvent être corrigées en utilisant un étalon interne approprié, stable et marqué. Dans cette étude, nous avons divisé les échantillons extraits pour le protocole alternatif sans finition après le traitement par EMR—Lipid et nous avons rapporté trois résultats pour les tétracyclines (oxytétracycline, chlortétracycline et doxycycline) avec le protocole alternatif.

## Comparaison des méthodes

La méthode optimisée EMR—Lipid a ensuite été comparée à une méthode QuEChERS traditionnelle avec traitement par dSPE C18 et traitement avec l'adsorbant à base de zirconium. La méthode QuEChERS est souvent utilisée pour l'extraction des analytes ou des résidus et fait appel à une étape de traitement par dSPE. La figure 9 montre les résultats comparant les statistiques de rendement et la figure 10 les résultats comparant certains analytes problématiques. Le protocole optimisé EMR—Lipid offre des améliorations significatives en termes de récupération et de précision pour les analytes problématiques, particulièrement par rapport à l'adsorbant à base de zirconium, qui donne une faible récupération pour les classes de fluoroquinolone et de tétracycline. Seules

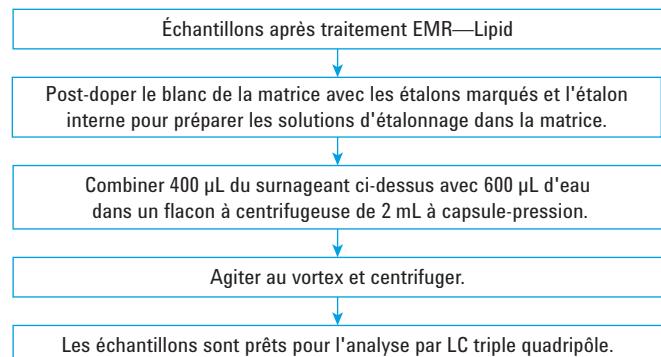


Figure 7. Procédure optionnelle après traitement par Agilent Bond Elut EMR—Lipid pour améliorer la récupération des tétracyclines.

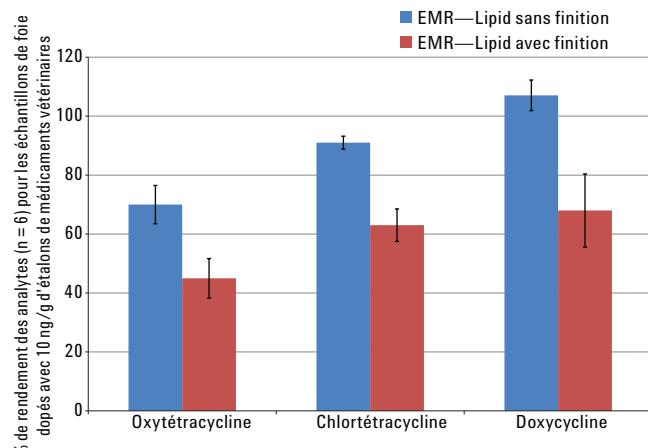


Figure 8. Comparaison de la récupération et de la précision pour les tétracyclines présentes dans les échantillons de foie préparés avec ou sans étape de finition après le traitement par Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

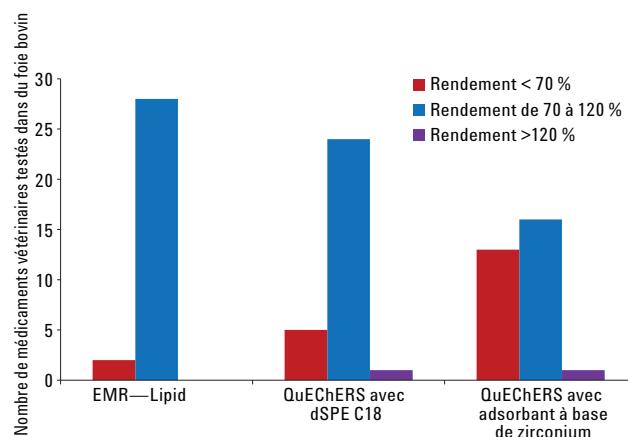


Figure 9. Résultats des statistiques de rendement pour la comparaison entre le protocole Agilent Bond Elut EMR—Lipid et les protocoles QuEChERS traditionnels.

l'oxytétracycline et le niclosamide ont donné des récupérations absolues de seulement 67 % et 68 %, respectivement. Cependant, la précision pour ces deux composés sur six réplicats, avec des RSD de 12,8 % et 2,0 % respectivement, est considérée comme recevable selon les recommandations SANCO (car la reproductibilité est acceptable) [9]. Ces résultats sont meilleurs que les résultats des deux autres protocoles utilisant la dSPE avec C18 et l'adsorbant à base de zirconium.

## Validation de la méthode

La méthode optimisée EMR—Lipid a été validée par l'analyse d'un lot complet de quantification, en utilisant la méthode décrite dans la rubrique de préparation des échantillons. Un étalon interne (flunixine-d<sub>3</sub> pour les modes positif et négatif) a été utilisé pour la quantification de l'exactitude et de la précision. La récupération absolue de la flunixine-d<sub>3</sub> allait de 90 à 100 %. Par conséquent, l'exactitude correspond au plus

près à la récupération absolue. Le tableau 4 présente les résultats de quantification. Le résumé de l'exactitude (Figure 11) a été obtenu en déterminant l'exactitude et la précision pour 24 échantillons de contrôle à quatre concentrations différentes ( $G_1 = 10, 50, 250$  et  $750 \text{ ppb}$  et  $G_2 = 2, 10, 50$  et  $150 \text{ ppb}$ ; voir la rubrique sur les solutions d'étalonnage), avec six réplicats pour chaque concentration. Des exactitudes acceptables (70 à 120 %) ont été obtenues pour 93 % des analytes, excepté deux hors limites, qui montrent une récupération légèrement inférieure à 70 % avec des valeurs de RSD satisfaisantes. Les valeurs de RSD des six réplicats pour chaque concentration étaient exceptionnelles, en-dessous de 10 % pour la plupart des composés. Il convient de noter que la ractopamine et le kétoprofène ont été détectés à faible concentration dans le blanc de foie de bovin, entraînant une modification de la plage d'étalonnage.

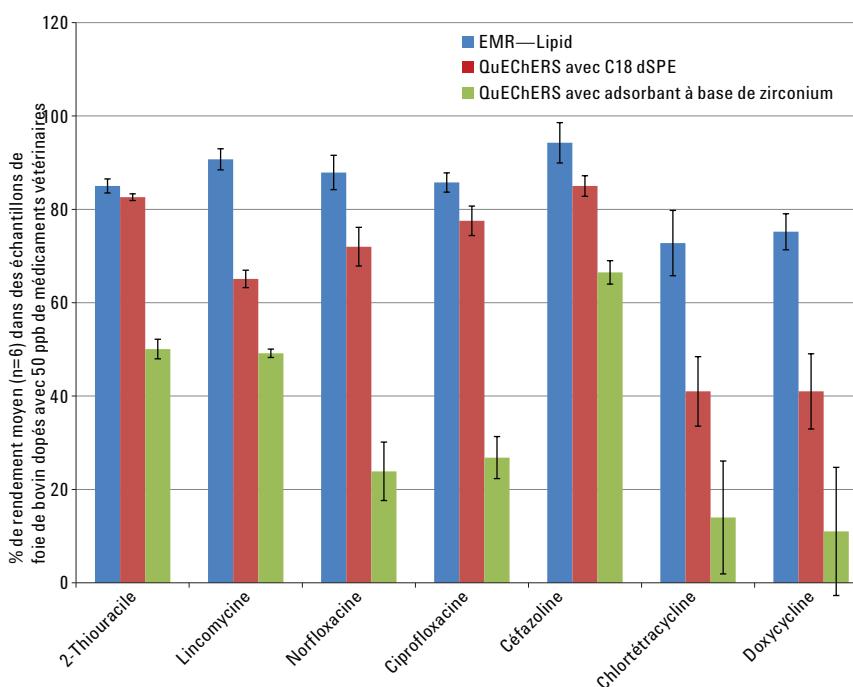


Figure 10. Résultats de récupération d'une sélection d'analytes comparant le protocole Agilent Bond Elut EMR-Lipid et les protocoles traditionnels. Les résultats sur la chlortétracycline et la doxycycline ont été obtenus avec un protocole alternatif indiqué dans la figure 6. Pour le reste des composés, le protocole indiqué dans la figure 1 a été utilisé.

Tableau 4. Résultats de quantification pour les analytes cibles avec Agilent Bond Elut EMR-Lipid. Chaque analyte a été évalué à quatre concentrations en six répliques pour chaque concentration.

N° de groupe	Analyte	Courbe d'étalonnage			Récupération et précision (ng/g CQ) de la méthode											
		Régression linéaire/poids	R <sup>2</sup>	Plage d'étalonnage (ng/g)	2	10	50	150	250	750	% Rdt	RSD	% Rdt	RSD		
1	2-Thiouracile	Linéaire, 1/x	0,9976	5-1 000	—	—	106,6	4,9	93,6	5,4	—	—	87,0	3,0	85,4	8,3
1	Amoxicilline	Linéaire, 1/x	0,9978	5-1 000	—	—	65,9	12,1	74,3	8,8	—	—	79,5	4,1	79,7	4,8
1	Méthonidazole-OH	Linéaire, 1/x	0,9981	5-1 000	—	—	92,6	15,1	89,4	6,6	—	—	89,4	3,5	89,7	3,3
1	Oxytétracycline	Linéaire, 1/x	0,9963	5-1 000	—	—	73,9	19,1	71,2	14,0	—	—	67,0	12,8	63,4	9,0
1	Céfazoline	Linéaire, 1/x	0,9966	5-1 000	—	—	72,1	9,4	81,2	2,7	—	—	86,7	3,8	82,9	3,0
1	Difloxacine	Linéaire, 1/x	0,9978	5-1 000	—	—	79,0	8,3	86,5	5,9	—	—	104,4	5,1	97,7	6,3
1	Chlortétracycline	Linéaire, 1/x	0,9928	5-1 000	—	—	100,6	14,1	96,9	9,5	—	—	93,8	14,0	85,0	11,6
1	Doxycycline	Linéaire, 1/x	0,9972	5-1 000	—	—	118,9	12,0	102,7	10,0	—	—	110,0	7,7	104,5	8,6
1	Florfénicol	Linéaire, 1/x	0,9942	5-1 000	—	—	103,4	6,2	107,9	6,0	—	—	115,2	13,5	107,0	4,0
1	Chloramphénicol	Linéaire, 1/x	0,9962	5-1 000	—	—	103,6	6,6	107,1	7,9	—	—	113,7	9,8	100,9	5,2
1	Closulon	Linéaire, 1/x	0,9954	5-1 000	—	—	77,9	10,3	104,4	6,0	—	—	102,2	7,1	94,3	3,3
1	Prednisone	Linéaire, 1/x	0,9984	5-1 000	—	—	105,9	9,1	92,1	11,1	—	—	103,9	10,5	94,5	2,3
1	Oxyphenbutazone	Linéaire, 1/x	0,9903	5-1 000	—	—	93,6	3,4	91,9	5,2	—	—	93,7	5,6	97,0	4,6
1	Mélenestrol acétate	Linéaire, 1/x	0,9994	5-1 000	—	—	70,6	1,4	77,3	3,0	—	—	82,8	2,1	77,1	2,6
1	Bithionol	Quadratique, 1/x	0,9981	5-1 000	—	—	69,4	6,2	90,4	2,9	—	—	91,3	4,3	83,1	3,7
2	Lévamisole	Linéaire, 1/x	0,9967	1-200	84,5	11,3	95,5	5,1	103,8	5,2	89,4	9,7	—	—	—	—
2	Lincomycine	Linéaire, 1/x	0,9950	1-200	89,5	16,4	79,6	10,6	74,1	4,5	74,8	11,2	—	—	—	—
2	Norfloxacine	Linéaire, 1/x	0,9960	1-200	89,5	9,7	89,2	4,7	95,8	7,4	93,5	7,2	—	—	—	—
2	Ciprofloxacine	Linéaire, 1/x	0,9980	1-200	81,0	5,6	83,6	6,9	96,9	4,1	99,5	5,9	—	—	—	—
2	Danofloxacine	Linéaire, 1/x	0,9985	1-200	78,2	7,8	86,2	5,8	99,5	7,8	96,9	4,8	—	—	—	—
2	Ractopamine	Linéaire, 1/x	0,9961	10-200 <sup>b</sup>	—	—	98,1	15,5	105,0	10,4	102,5	6,8	—	—	—	—
2	Morantel	Linéaire, 1/x	0,9960	1-200	89,5	4,9	95,1	4,5	101,0	8,6	94,1	7,4	—	—	—	—
2	Sulfaméthizole	Linéaire, 1/x	0,9928	1-200	85,7	14,6	89,2	8,1	93,9	4,9	88,0	10,4	—	—	—	—
2	Sulfaméthoxypyridazine	Linéaire, 1/x	0,9973	1-200	84,7	8,1	84,4	2,9	89,9	5,7	84,9	6,2	—	—	—	—
2	Tylosine	Linéaire, 1/x	0,9967	1-200	80,6	11,2	75,6	2,7	71,0	4,5	65,3	2,3	—	—	—	—
2	Acétopromizine	Linéaire, 1/x	0,9973	1-200	74,1	6,3	73,5	3,0	77,2	4,9	75,2	5,3	—	—	—	—
2	Chlorpromazine	Linéaire, 1/x	0,9967	1-200	66,1	6,1	67,8	3,8	73,4	4,3	72,7	6,5	—	—	—	—
2	Fenbendazole	Linéaire, 1/x	0,9988	1-200	74,6	7,7	82,3	4,6	97,9	9,9	84,9	3,5	—	—	—	—
2	Kétoprofène	Linéaire, 1/x	0,9978	5-200 <sup>c</sup>	—	—	88,3	7,2	98,1	6,9	94,5	3,8	—	—	—	—
2	Niclosamide	Linéaire, 1/x	0,9996	1-200	60,0	15,3	66,6	4,7	71,7	2,0	67,6	3,1	—	—	—	—

<sup>a</sup> Les analytés du groupe 1 ont une plage d'étalonnage allant de 5 à 1 000 ng/g, et des concentrations de dopage de CQ de 10, 50, 250 et 750 ng/g. Les analytés du groupe 2 ont une plage d'étalonnage allant de 1 à 200 ng/g, et des concentrations de dopage de CQ de 2, 10, 50 et 150 ng/g.

<sup>b</sup> Modification de la plage d'étalonnage en raison de la ractopamine détectée dans le blanc de contrôle de FB.

<sup>c</sup> Modification de la plage d'étalonnage en raison du kétoprofène détecté dans le blanc de contrôle de FB.

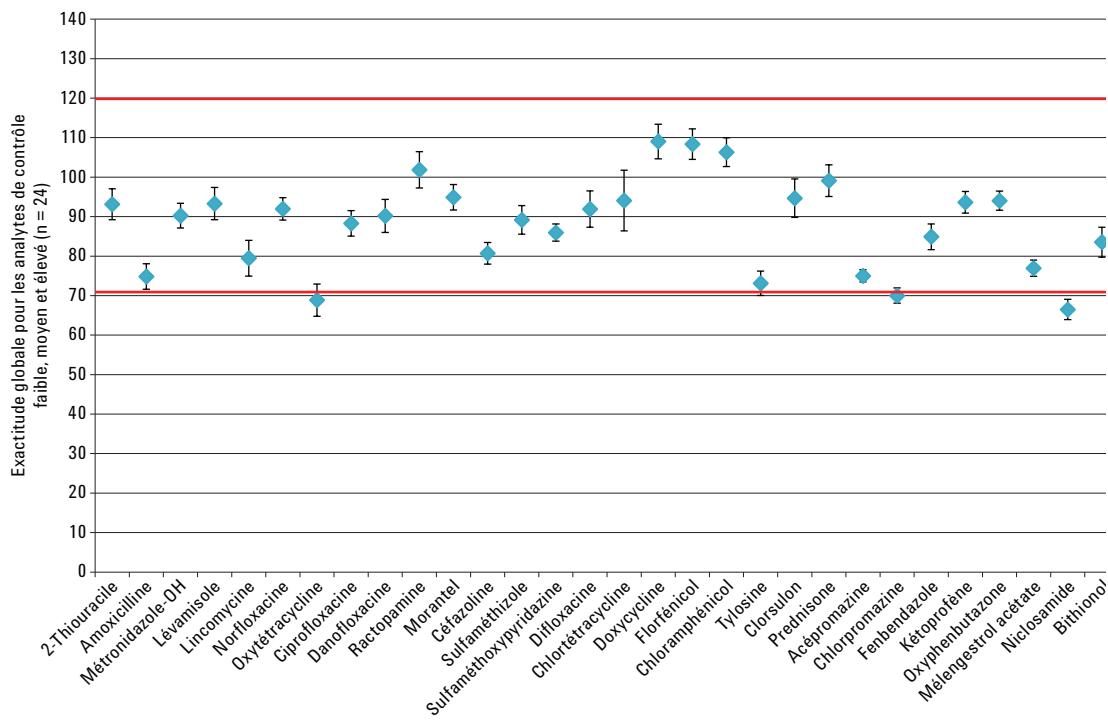


Figure 11. Quantification de 30 médicaments vétérinaires représentatifs analysés dans du FB avec le protocole optimisé Agilent Bond Elut EMR-Lipid. Les données d'exactitude et de précision ont été calculées à partir de 24 réplicats à quatre concentrations différentes de dopage ( $n = 6$  pour chaque concentration). Barre d'erreur = IC à 95 %. Les résultats sur trois composés de type tétracycline ont été obtenus avec un protocole alternatif indiqué dans la figure 6. Pour le reste des composés, le protocole indiqué dans la figure 1 a été utilisé.

## Conclusions

Une méthode rapide, fiable et robuste faisant appel à une extraction par précipitation des protéines suivie d'un traitement par dSPE Agilent Bond Elut EMR—Lipid et finition EMR—Lipid a été optimisée et validée pour l'analyse de multi-résidus de médicaments vétérinaires dans du foie de bovin. Les effets-matrice ont été soigneusement évalués et comparés aux traitements traditionnels par dSPE C18 ou adsorbant à base de zirconium. Les résultats montrent que la méthode EMR-Lipid optimisée offre un meilleur traitement de la matrice ainsi qu'une exactitude et une précision excellentes pour ce type d'application.

Il est important de noter que la dilution directe avec de l'eau a été utilisée avant l'injection pour rendre les échantillons analysables par LC/MS/MS et maintenir l'intégrité des pics d'analytes qui éluent en premier. Le système de LC/MS/MS que nous avons utilisé dans cette étude a fourni une sensibilité adéquate pour pouvoir utiliser une dilution directe

des échantillons tout en répondant aux exigences de limite de détection. Comparé au protocole ordinaire de séchage-et-reconstitution, ce protocole a permis d'économiser beaucoup de temps et d'effort, et a également évité d'éventuelles déviations et la perte d'analyte. Si la sensibilité de l'instrument ne peut pas répondre aux besoins lorsque les échantillons sont simplement dilués, une étape finale de concentration doit encore être envisagée. Ceci se fait généralement par évaporation et reprise de l'échantillon. Cette application montre que l'élimination sélective de la matrice avec EMR-Lipid offre des avantages significatifs pour les échantillons complexes tels que le foie de bovin en permettant d'obtenir des échantillons plus propres ainsi qu'une récupération et une précision supérieures pour l'analyse de résidus de médicaments vétérinaires.

Les études à venir porteront sur d'autres matrices riches en lipides et des analytes cibles complexes afin de démontrer les avantages d'avoir des échantillons propres après une élimination améliorée de la matrice.

## Références

1. Anon. *A Description of the U.S. Food Safety System*, mars 2000; U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, Washington DC. [www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.htm](http://www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.htm).
2. Anon. Commission européenne, Décision de la Commission du 12 août 2002 appliquant la Directive 96/23/CE du conseil concernant la performance des méthodes analytiques et l'interprétation des résultats ; *Off. J. Eur. Comm.* **2002**, L122, 8.
3. Anon. *Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) set by Canada*, mai 2012 ; Health Canada, Ottawa. [www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt\\_formats/pdf/vet/mrl-lmr\\_versus\\_new-nouveau-eng.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.pdf).
4. Ellis, R. L. *Food Addit. Contam. A* **2008**, 25, 1432-1438.
5. Fagerquist, C. K.; Lightfield, A. R.; Lehotay, S. J. *Anal. Chem.* **2005**, 5, 1473-1482.
6. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1202, 118-123.
7. Geis-Asteggiante, L.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Dulko, T.; Ng, C.; Bluhm, L. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1258, 43-54.
8. Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 4423.
9. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*, SANCO/12571/2013, 19 novembre 2013 ; Commission européenne, Direction générale pour la santé et la protection des consommateurs, Bruxelles, Belgique.

## Pour plus d'informations

Ces données représentent des résultats types. Pour plus d'informations sur nos produits et services, consultez notre site Internet sur [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs dans le présent document, ainsi qu'en cas de dommages fortuits ou consécutifs à la fourniture, aux performances ou à l'utilisation de ce matériel.

Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2015  
Imprimé aux USA  
Le 30 juillet 2015  
5991-6096FR



**Agilent Technologies**