



Point 6 de l'ordre du jour

CX/RVDF10/19/6
Avril 2010

PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES
COMITÉ DU CODEX SUR LES RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES DANS LES
ALIMENTS

Dix-neuvième session

Burlington, Vermont, États-Unis d'Amérique, 30 août - 3 septembre 2010

DOCUMENT DE TRAVAIL SUR LES MÉTHODES D'ANALYSE POUR LES RÉSIDUS DE
MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES DANS LES ALIMENTS

(Rapport du groupe de travail électronique chargé de préparer un document de travail contenant des propositions pour l'évaluation des méthodes d'analyse fournies par le JECFA ainsi que des conseils sur l'élaboration de caractéristiques de performance pour les analyses multi-résidus)

Généralités

1. À la 18^{ème} session du Comité du Codex sur les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (CCRVDF), à Natal au Brésil (11-15 mai 2009), le Comité a décidé de constituer un groupe de travail électronique sous la présidence du Royaume-Uni et du Canada. Le mandat de ce groupe était le suivant :

- (a) préparer un document de travail contenant des propositions pour l'évaluation des méthodes d'analyse fournies par le JECFA; et
- (b) préparer des conseils sur l'élaboration de caractéristiques de performance pour les analyses multi-résidus

pour examen par la 19^{ème} session du CCRVDF.

Délibérations du groupe de travail électronique

2. Le Groupe de travail a surtout travaillé par l'échange de messages électroniques et d'observations; l'échange de documents a été facilité par la mise en place d'un forum électronique par le Royaume-Uni. Les rapports des deux volets du mandat sont présentés dans les Annexes I et II respectivement. Le premier avant-projet de chacune de ces annexes a été préparé par un petit groupe de rédaction, et chaque annexe a ensuite été distribuée au groupe de travail complet afin de recueillir des observations et des révisions, et ce en trois temps. Les annexes ci-jointes reflètent les avis des pays et des organisations suivantes:

- (a) Royaume-Uni, Canada, États-Unis d'Amérique, Costa Rica, Brésil, Pologne, Pays-Bas, Allemagne, Suède, Australie, France, AIEA et IFAH.

Recommandations émanant de l'évaluation des méthodes d'analyse fournie par le JECFA (Annexe I)

3. Le Groupe de travail a examiné l'évaluation des méthodes d'analyse menée par le JECFA et a constaté avec satisfaction que les évaluations ont été menées de manière appropriée par des experts. Lorsqu'il est parvenu à cette conclusion (abordée en détail dans l'Annexe I), le Groupe de travail a formulé un certain nombre de recommandations pour examen par le Comité. Ces recommandations sont énoncées ci-dessous.

- (a) *Il est recommandé que les futures évaluations du JECFA suivent les directives de validation par un laboratoire unique (SLV) adoptées lors de la 32^{ème} session de la CCA.*
- (b) *Il est suggéré que le JECFA pourrait peut-être accroître la représentation d'experts pour l'évaluation des méthodes d'analyse.*

- (c) *Il est suggéré que, parce que les compagnies pharmaceutiques n'élaborent pas systématiquement de normes pour chaque résidu marqueur à la disposition des laboratoires d'analyse, le JECFA devrait éventuellement prendre cela en considération lors du choix du résidu marqueur, en particulier pour les médicaments vétérinaires qui ne sont plus sous brevet et qui ne sont pas disponibles dans le commerce.*
- (d) *Il est recommandé que le CCRVDF n'a besoin d'aucune autre évaluation experte des méthodes d'analyse recommandées par le JECFA.*
- (e) *Le CCRVDF devrait examiner comment ces méthodes d'analyse pourraient être mises à la disposition des autorités réglementaires.*
- (f) *Le CCRVDF devrait envisager des mécanismes pour assurer la disponibilité des méthodes de contrôle des résidus aux fins de la surveillance et du suivi des substances pour lesquelles le JECFA n'a pu établir de DJA/LMR.*

Conseils sur l'élaboration de caractéristiques de performance pour les analyses multi-résidus

4. Le Groupe de travail n'a pas eu la tâche facile pour préparer cette Annexe. Il est rapidement apparu évident que les seules sources de conseils au sujet des méthodes d'analyse multi-résidus conçues spécifiquement pour les résidus de médicaments vétérinaires ont été préparés à la suite de la consultation Miskolc, en 1999. Cependant, certaines informations sur ces méthodes telles qu'appliquées aux pesticides sont disponibles et ont été utilisées dans le présent document après avoir été jugées pertinentes. Dans de nombreux domaines, la technologie a évolué depuis la publication de ces documents, et les laboratoires ont généralement accès à des méthodes plus perfectionnées et plus pointues.

5. Par conséquent, il serait opportun d'envisager de créer un groupe d'experts composé de statisticiens, de gens des milieux universitaires, de chercheurs et d'analystes de laboratoire de réglementation actuellement engagés dans l'élaboration de telles méthodes multi-résidus à l'aide des instruments perfectionnés d'aujourd'hui, et de fournir des données issues de leurs propres recherches afin de permettre la fixation de limites appropriées basées sur les données obtenues avec les instruments d'analyse modernes (au lieu de se baser sur des données produites il y a 20 ou 30 ans avec les anciens instruments) pour les paramètres analytiques examinées dans les présentes directives.

6. Le Groupe de travail a préparé un avant-projet qui reprend des éléments des bonnes pratiques internationales actuelles et qui aborde de manière préliminaire les méthodes d'analyse multi-résidus et la manière dont les caractéristiques de performance pourraient être élaborées pour ces méthodes.

7. L'avant-projet ci-joint (Annexe II) s'appuie sur des éléments tirés des documents suivants :

- La consultation Miskolc
- CAC/GL 40-1993 (Directives concernant les bonnes pratiques de laboratoire en matière d'analyse des résidus de pesticides)
- CAC/GL 71-2009 (Directives pour la conception et la mise en œuvre d'un programme national de réglementation d'assurance de la sécurité alimentaire concernant les risques liés à l'utilisation de médicaments vétérinaires sur des animaux producteurs d'aliments)
- CAC/GL 72-2009 (Directives sur la terminologie analytique)
- Procédures de validation des méthodes et de contrôle qualité pour l'analyse des résidus de pesticides dans les denrées alimentaires et aliments du bétail (document SANCO/10684/2009 de la Commission européenne)

Recommandations pour la préparation de conseils sur l'élaboration de caractéristiques de performance pour les méthodes d'analyse multi-résidus (Annexe II)

8. Le Groupe de travail tient à présenter les recommandations suivantes au Comité.

- *Les travaux préalables de préparation des orientations sur les caractéristiques de performance devraient se poursuivre.*

- *Les conseils ne devraient pas viser la plus haute qualité disponible, ni viser la norme qu'un laboratoire moyen devrait atteindre. Ils doivent plutôt être élaborés pour être « adaptés à l'usage », et il convient de reconnaître que plusieurs différentes caractéristiques de performance peuvent convenir à différentes procédures et techniques d'analyse.*
- *Il faudrait former un groupe d'experts constitué de statisticiens et d'analystes ou de chercheurs provenant des laboratoires de réglementation, des universités de recherche et de l'industrie afin de compiler et d'interpréter les données produites pour les méthodes multi-résidus, de manière à définir et à valider les fourchettes et les limites d'analyse en tant que paramètres de performance caractéristiques pour les médicaments vétérinaires traités selon ces méthodes d'analyse multi-résidus.*
- *Le Comité devrait prendre acte de l'importance de faire un lien entre le développement de critères de performance pour les méthodes d'analyse multi-résidus, d'une part, et la nécessité d'élaborer des exigences de validation pour ces méthodes, d'autre part; cette mesure devrait s'appuyer sur les Directives existantes du document CAC/GL 71-2009.*
- *Les conseils élaborés ne devront pas être de nature prescriptive, et il faudra inclure des choix permettant de répondre aux besoins locaux dans la mesure du possible.*
- *Un groupe de travail intra-session devra être convoqué pour discuter de ce document avant sa discussion par le Comité.*

ANNEXE I : Propositions pour l'évaluation de méthodes d'analyse menée par le JECFA**Sommaire exécutif**

- *Le JECFA évalue les méthodes d'analyse et fournit l'assurance que les données sur lesquelles repose l'évaluation toxicologique et la détermination ultérieure d'une LMR est scientifiquement fondées. Pour les futures évaluations, il est recommandé que le JECFA se fonde sur les lignes directrices de validation par un laboratoire unique (SLV) adoptées à la 32^{ème} session de la CCA.*
- *Il est recommandé que le JECFA continue d'accroître la représentation d'experts pour l'évaluation des méthodes d'analyse.*
- *Parce que les compagnies pharmaceutiques n'élaborent pas systématiquement des normes pour chaque résidu marqueur à la disposition des laboratoires d'analyse, il est recommandé que le JECFA prenne ce point en considération lors du choix du résidu marqueur, en particulier pour les médicaments vétérinaires qui ne sont plus sous brevet et qui ne sont pas disponibles dans le commerce.*
- *Il est recommandé que le CCRVDF n'a besoin d'aucune autre évaluation experte des méthodes d'analyse recommandées par le JECFA.*
- *Le CCRVDF devrait examiner comment ces méthodes d'analyse pourraient être mises à la disposition des organismes de réglementation.*
- *Le CCRVDF devrait envisager des mécanismes pour assurer la disponibilité des méthodes de contrôle des résidus pour la surveillance et le suivi des substances pour lesquelles le JECFA n'a pu établir de DJA/LMR.*

Le Royaume-Uni et le Canada, qui coprésident ce GTE, remercient l'Australie, la Suède, le Costa Rica, le Royaume-Uni, le Canada, les États-Unis d'Amérique, le Brésil, la France, l'AIEA et l'IFAH pour leur contribution à la préparation de ce projet de document.

Objectif 1 : Passer en revue la récente monographie n° 6 de la FAO et du JECFA (70^{ème} réunion, 2008) qui décrit en détail les méthodes examinées par le JECFA à la 70^{ème} réunion ainsi que le Rapport technique OMS 954 (« Évaluation de certains résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments ») 70^{ème} rapport du Comité mixte d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires, qui peut être consulté au <http://www.fao.org/docrep/011/i0659f/i0659f00.htm> afin de déterminer s'il est possible de conclure que le JECFA avait fait preuve de diligence raisonnable en s'assurant que toutes les méthodes recommandées au CCRVDF pour faire avancer les LMR proposées répondent effectivement aux critères généralement acceptés d'« adéquation à l'usage ».

1. À la 18^{ème} session du CCRVDF, il a été convenu que le JECFA serait responsable de l'évaluation des méthodes d'analyse à l'appui des LMR proposées. Si le JECFA suit les nouvelles directives de validation par laboratoire unique (SLV), tel qu'indiqué dans les directives récemment adoptées par le CCRVDF « (Directives pour la conception et la mise en œuvre d'un programme national de réglementation d'assurance de la sécurité alimentaire concernant les risques liés à l'utilisation de médicaments vétérinaires sur des animaux producteurs d'aliments » approuvées à la 32^{ème} session de la CCA, en plus de tout ce qui peut être élaboré en réponse à la demande détaillée figurant au paragraphe 111 du rapport de la 18^{ème} séance du CCRVDF, y a-t-il une justification pour tout examen et/ou évaluation complémentaire par le CCRVDF? Ne devrions-nous pas insister pour dire qu'un examen d'expert qui aurait l'avantage d'accélérer le processus de fixation des LMR est suffisant? L'Annexe 1 ci-dessous donne un examen détaillé des évaluations réalisées par le JECFA dans la monographie n° 6, Évaluation du JECFA et le Rapport technique 954 de l'OMS : « Évaluation de certains résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments - Soixante-dixième rapport du JECFA ».

Commentaire général et remarques au sujet de l'Objectif 1 :

2. En général, le JECFA a fait preuve de diligence raisonnable et a déterminé au cours de son évaluation la plus récente que les méthodes évaluées sont « aptes à l'usage » et adaptées à l'analyse de routine de la conformité des médicaments vétérinaires. Toutefois, il convient de noter que, dans le cas de la dexaméthasone, les limites de dosage des méthodes d'analyse fournies ne répondaient pas à l'exigence générale selon laquelle la méthode permet de dépister et de quantifier l'analyte à 0,5 x LMR.

Recommandations découlant de l'Objectif 1 :

3. Le Secrétariat du JECFA devrait continuer à s'assurer que l'équipe chargée de l'examen d'un ou de plusieurs médicaments vétérinaires compte au moins une personne possédant une expertise attestée dans la mise au point et la validation des méthodes d'analyse des médicaments vétérinaires, soit par leurs publications ou en vertu de leur rôle en tant que scientifique ou gestionnaire d'un laboratoire ou d'un programme de contrôle des résidus.

4. En outre, le Secrétariat du JECFA devrait s'assurer que toutes les méthodes recommandées selon le processus JECFA comme étant adaptées aux programmes de surveillance/suivi de routine contiennent un volet sur l'assurance-qualité rédigé d'après les directives SLV recommandées par le CCRVDF, lesquelles exigent que chaque laboratoire soumette des données à des fins d'examen par le JECFA afin de démontrer le niveau d'expertise et de compétence dans l'utilisation de la méthode en produisant des données qui répondent aux normes de spécification de la méthode.

5. Le JECFA est invité à intégrer les nouvelles directives SLV, tel que convenu lors de la 18^e session du CCRVDF, lesquelles directives ont été adoptées à 32^{ème} session de la CCA.

6. Si les recommandations ci-dessus sont adoptées, alors il n'y aura pas besoin d'ajouter d'autre groupe d'experts pour analyser l'évaluation par le JECFA des méthodes adaptées à la surveillance de la conformité.

Objectif 2 : Quelles solutions pouvons-nous élaborer pour faire en sorte que ces méthodes validées évaluées par le JECFA (et jugées adaptées à la conformité réglementaire des médicaments visés, compte tenu de la nature confidentielle de la plupart des méthodes évaluées par le JECFA), soient facilement accessibles à tous les pays membres du Codex?

7. Aux États-Unis et au Canada, les méthodes d'analyse servant au contrôle réglementaire des médicaments vétérinaires utilisés dans l'élevage animaux destinés à la consommation sont considérées comme étant du domaine public. Certaines considérations concernant les problèmes de confidentialité doivent être prises en compte dès lors que les laboratoires commerciaux sont en cause. Cependant, les

contrôles sont menés uniquement dans des laboratoires du gouvernement fédéral ou dans les laboratoires privés liés par contrat avec le gouvernement. Les fabricants de médicaments (promoteurs) sont tenus de divulguer tous les réactifs réguliers ou inhabituels nécessaires à l'analyse du médicament qui a été homologué et approuvé pour utilisation dans la production d'animaux destinés à la consommation.

8. L'approche de l'UE est un peu différente. L'Agence européenne des médicaments (AEM) est responsable de la divulgation des méthodes d'analyse présentées à l'appui d'une demande de LMR aux autorités compétentes (AC). Les autorités compétentes ont l'obligation de fournir la méthode aux laboratoires de contrôle officiels. Par conséquent, un grand nombre de méthodes d'analyse et d'information sur ces méthodes ont déjà été échangés, partagés et distribués, et l'industrie est ouverte à tout système qui garantit une utilisation appropriée de l'information pour des fins de contrôle. Lorsque les analyses de résidus effectuées à des fins de contrôle réglementaire sont effectuées par des laboratoires sous-traitants, la présentation d'un contrat passé avec un gouvernement en précisant le nombre prévu d'analyses pourrait constituer une justification pour l'accès à la méthode et aux éventuelles normes requises. Toutefois, il faut reconnaître que, dans certains cas où on a recours à des laboratoires sous-traitants, il peut être difficile, voire impossible, pour des raisons de confidentialité de rendre leurs méthodes disponibles pour la distribution générale.

9. Les compagnies pharmaceutiques peuvent fournir des normes d'analyse des résidus marqueurs aux autorités nationales lorsque ces résidus marqueurs sont le médicament vétérinaire parent. Cependant, il peut être difficile d'obtenir des stocks de métabolites ou de ses dérivés comme marqueur de ces résidus, ce qui complique la surveillance des résidus. En tant que gestionnaire de risque, le CCRVDF doit envisager des moyens pour encourager la présentation de normes de référence pour les marqueurs résidus recommandés par le JECFA lors de l'évaluation des médicaments aux fins des LMR du Codex.

10. Tant aux États-Unis que dans l'Union européenne, les méthodes d'analyse fournies par l'industrie (promoteur) sont celles qui ont été élaborées spécifiquement pour les études sur la dissipation des résidus dans les tissus, aux termes des exigences d'homologation et d'approbation des médicaments. Dans l'UE, tant les laboratoires communautaires de référence (LCR) et les laboratoires nationaux de référence (LNR) mettent au point des méthodes de dépistage systématique, quantitatives et de confirmation aux fins de la surveillance de la conformité, le cas échéant. Ces méthodes, qui sont généralement multi-résidus par nature et applicables à plusieurs matrices différentes, sont mises au point pour assurer l'utilisation efficace des ressources de laboratoire et pour assurer le renvoi des résultats dans de brefs délais. Ces méthodes sont susceptibles de mieux répondre aux besoins des pays du Codex que les méthodes développées par l'industrie qui, par nécessité, se concentrent uniquement sur l'analyse du résidu marqueur dans les tissus de la cible appropriée et pour une demande de LMR donnée.

11. La présentation aux laboratoires nationaux de renseignements commerciaux exclusifs sur les méthodes d'analyse est la responsabilité des gouvernements nationaux, et non du CCRVDF.

12. Dans le cas des substances pour lesquelles le JECFA n'a pas pu fixer de DJA/LMR, mais pour lesquelles il faudrait contrôler les résidus, le CCRVDF peut envisager de créer un mécanisme visant à assurer la disponibilité des méthodes analytiques appropriées.

Recommandations découlant de l'objectif 2 :

13. Les autorités nationales devraient s'assurer que les laboratoires sous-traitants qui fournissent les services d'analyse utilisent des normes internationales reconnues.

14. Il faudrait envisager la possibilité de demander l'accord des laboratoires de résidus ayant des mandats semblables partout dans le monde pour partager leurs méthodes avec la communauté internationale ou avec la communauté des laboratoires de contrôle des pays membres du Codex.

15. Le CCRVDF devrait mettre en place une banque de données dans lesquels figureraient les points de contact des autorités compétentes nationales pour ce qui concerne les médicaments vétérinaires autorisés assortis de LMR lorsque des programmes de contrôle régulier des résidus sont en place. Cela donnerait au pays qui souhaitent mettre en œuvre des programmes de contrôle des résidus un premier «point de contact » pour la présentation des méthodes pratiques d'analyse utilisées dans les programmes de contrôle régulier des résidus et leur permettre de choisir la méthode la mieux adaptée à leurs compétences et à leurs capacités.

16. Lors de la sélection des résidus marqueurs pour les LMR, le JECFA doit être conscient de la difficulté que les organismes de réglementation et les laboratoires pourraient avoir à obtenir les résidus marqueurs qui ne sont pas la molécule mère.
17. Le CCRVDF devrait encourager les fabricants de médicaments vétérinaires à mettre les normes de tous les résidus marqueurs de médicaments vétérinaires assortis de LMR Codex à la disposition des autorités compétentes des pays membres. Le CCRVDF devrait envisager d'ajouter cette condition aux exigences relatives à l'établissement des LMR afin de faciliter les échanges et d'assurer une meilleure protection des consommateurs.
18. Dans le cas des substances pour lesquelles le JECFA n'a pas pu fixer de DJA/LMR, mais pour lesquelles il faut contrôler les résidus, le CCRVDF pourrait envisager de créer un mécanisme visant à assurer la disponibilité des méthodes analytiques appropriées.

ANNEXE I

Examen par le GTE de l'« Évaluation de la monographie no 6 du JECFA et du Rapport technique OMS n° 954 : Évaluation de certains résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments - Soixante-dixième rapport du JECFA »**Avilamycine - évaluée par Dr Adriana Fernandez Suarez (ARG), Dr Bruno Le Bizec (FR) et Dr Richard Ellis (États-Unis d'Amérique).**

Les auteurs ont reconnu que les méthodes LC-MS/MS validées (Eichmeir et al. 2006b) pour la détermination de l'avilamycine dans le gras, les muscles, les reins et le foie des porc, dans les tissus de poulet (Eichmeir et al., 2006a), dans les tissus de dinde (Eichmeir et al., 2006c) et dans les tissus de lapin (Eichmeir et al, 2006 d) servant à mesurer le résidus marqueur acide dichloroisoevorninique (DIA) étaient disponibles et les ont évaluées selon les critères de validation à l'égard de la sélectivité, de la linéarité, de la précision, de la récupération, de la répétabilité, de la robustesse, des limites de quantification, des limites de détection et de la stabilité. Ils ont conclu que, bien qu'il ait fallu recalculer les limites de quantification (LOQ) pour l'avilamycine dans les différentes matrices, la méthode présentée était satisfaisante pour l'analyse quantitative de l'avilamycine dans les tissus de porc, de dinde, de lapin et de poulet.

La méthode recommandée a une limite de quantification d'environ 1/10^e de la LMR recommandée, exprimée en DIA. Les limites de dosage calculées par le promoteur étaient de 150µg DIA/kg pour le foie, de 100µg DIA/kg pour les reins, de 50µg DIA/kg pour la peau/graisse et de 25µg DIA/kg pour les muscles (d'après une exactitude et une précision acceptables) et cadrait davantage avec les LMR proposées les estimations des commentateurs d'après les rapports signal/bruit obtenus.

Les évaluateurs ont indiqué que, du fait que l'instrumentation LC-MS/MS relativement complexe n'est pas forcément disponible dans tous les laboratoires de réglementation, il peut être nécessaire d'utiliser des méthodes de rechange.

	LMR (µg/kg)			
	Muscle (LDD)	Rein (LDD)	Foie (LDD)	Peau/gras (LDD)
Porcs	200 (24)	200 (3,3)	300 (10)	200 (22,4)
Dindes	200 (18,4)	200 (22,4)	300 (30,4)	200 (18,7)
Poule/poulet	200 (18,4)	200 (22,4)	300 (30,4)	200 (18,7)
Lapins	200 (18,4)	200 (22,4)	300 (30,4)	200 (18,7)

[Ref: Eichmeir, L. S. (2006) Validation of an HPLC-MS/MS method for the determination of avilamycin in chicken liver, kidney, muscle and fat/skin. Report No. 49783, ABC Laboratories Inc. Columbia, MO USA (ABC Method 49783-MI Sponsor submitted)]

[Ref: Eichmeir, L. S. (2006) Validation of an HPLC-MS/MS method for the determination of avilamycin in chicken liver, kidney, muscle and fat/skin. Report No. 49784, ABC Laboratories Inc. Columbia, MO USA (ABC Method 49784-MI-01 Sponsor submitted)]

Dexaméthasone - évalué par Dr Bruno Le Bizec (FR).

La dexaméthasone a été évaluée lors de la 42^{ème} réunion du JECFA; les LMR temporaires exprimées sous forme inchangée (résidu marqueur) d'après une DJA de 0 à 0,015 mg/kg de poids corporel ont été recommandées pour les bovins et les porcs, car il n'existait pas de méthode adéquate pour déterminer la conformité aux LMR. Les mêmes LMR ont été recommandées pour les chevaux à la 43^{ème} JECFA. À la 17^{ème} session du CCRVDF, une demande de recommandations de LMR pour les bovins (tissus et lait) et les porcs (tissus) a été présentée.

Trois méthodes ont été fournies pour l'évaluation par le JECFA :

- (1) une analyse LC-MS/MS (ESI-) pour la détermination des résidus de dexaméthasone dans le foie des bovines (méthode 1);

[Ref: National Food Administration, SLV k1-f2-v321 (2008-03-27 BGOS) Validation of the method: analysis of glucocorticosteroids Dexamethasone, Betamethasone, Flumethasone, Prednisolone, and 6-methylprednisolone in bovine liver using LC-MS/MS. (Submitted to FAO by the National Food Administration, Uppsala, Sweden)]

- (2) une analyse LC-MS/MS (ESI-) pour la détermination des résidus de dexaméthasone dans le lait de vache (méthode 2);

[Ref: McDonald, M., Granelli, K., and Sjöberg, P (2007). Rapid multi-residue method for the quantitative determination and confirmation of glucocorticosteroids in bovine milk using LC-tandem mass spectrometry, Anal. Chim. Acta 588, 20-25].

- (3) Une analyse LC-MS/MS (ESI +) pour la détermination des résidus de dexaméthasone dans les muscles et les reins des bovins (méthode 3).

[Ref: Boison, J., Fedeniuk, R., and Chrush, J (2008) A determinative and confirmatory method for 29 antibiotic residues in bovine muscle tissues by LC-tandem mass spectrometry. Project No. SF0103. Improved test capability for banned substances in food of animal origin. Submitted to FAO by the Canadian Food Inspection Agency, Saskatoon Laboratory, Centre for Veterinary Drug Residues, Canada]

L'expert du JECFA a évalué la pertinence des méthodes proposées pour mesurer la dexaméthasone à la LMR temporaire précédemment définie, soit 0,3 µg/L pour le lait, 0,5 µg/kg pour les muscles et les reins de bovins et 2,5 µg/kg pour le foie de bovins.

Il a été conclu après avoir examiné les paramètres d'analyse proposés concernant la sélectivité, la sensibilité, l'exactitude, la précision, la récupération, la robustesse et la stabilité des analytes que :

- (a) Une méthode régulière validée est disponible pour la surveillance des résidus de dexaméthasone dans le lait de bovins à 0,3µg/L (méthode 2);
- (b) Une méthode régulière validée est disponible pour la surveillance des résidus de dexaméthasone dans le foie des bovins à 2,0 µg/kg (méthode 1);
- (c) Une méthode régulière validée est disponible pour la surveillance des résidus de dexaméthasone dans les reins et les tissus musculaires des bovins à 1,0 µg/kg au lieu de la LMR temporaire recommandée de 0,5 µg/kg (méthode 3).

	LMR temporaires (CCA) (µg/kg)	Méthode 1 (µg/kg)	Méthode 2 (µg/L)	Méthode 3 (µg/kg)
Rein de bovin	0,5			1,0
Foie de bovin	2,5	2,0		
Muscle de bovin	0,5			1,0
Lait de vache	0,3		0,3	

Les tissus cibles appropriés sont le foie ou les reins et le lait;

Pour la dexaméthasone

- **La limite de dosage de la méthode utilisant le foie de bovin, soit 2,0 µg/kg, ne représente que les 4/5^e (et non ½) de la LMR temporaire recommandées par le Comité, soit 2,5 µg/kg;**
- **La limite de dosage de la méthode utilisant le lait de vache, soit 0,3 µg/L est égale (et non ½) à la LMR temporaire recommandée du Comité, soit 0,3 µg/L;**

- **La limite de dosage de la méthode utilisant le rein de bovin, soit 1,0 µg/kg, représente le double (et non la moitié de la LMR temporaire recommandée du Comité, soit 0,5 µg/kg;**

NOTA: Il n'existait toujours pas de méthode validée pour les chevaux et les porcs, mais l'expert a mentionné que la méthode fournie pour les bovins pouvait être étendue aux tissus de porc et de chevaux.

Vert malachite (MG) - évalué par Dr Bruno Le Bizec (FR), Dr Dieter Arnold (ALL) et Dr Richard Ellis (États-Unis d'Amérique).

Les auteurs présentent une analyse approfondie des approches visant l'analyse de VM et de vert leucomalachite (VL), mais ils ne fournissent aucune indication selon laquelle des méthodes particulières pour en déterminer l'aptitude/pertinence à la conformité, à l'exception d'une déclaration faite dans le cadre d'un débat sur la cinétique de l'épuisement du VM dans le poisson, selon laquelle une méthode validée par Andersen et al., (2006) a été utilisée pour mesurer la somme des concentrations de VM et de VL dans du saumon traité au VM. Les auteurs ont cerné plusieurs méthodes de dépistage, de quantification et de confirmation assorties de caractéristiques de performance définies, mais sauf dans les cas où ils ont indiqué que les exigences de sensibilité dépassaient les LPMR de l'UE, il n'était pas possible de conclure de manière définitive que l'une ou l'autre des méthodes convenait aux fins du contrôle réglementaire du VM et du VL.

[Ref: Andersen, Et. al., (2006). *Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. J. Agric Food Chem., 54, 4517-4523*]

Monensin - évalué par Dr Lynn Friedlander (É.-U.-A.) et Dr Pascal Sanders (FR).

Les auteurs ont indiqué dans un examen approfondi que plusieurs méthodes ont été utilisées pour générer des données sur l'appauvrissement, mais qu'ils ont résumé les caractéristiques de performance de deux méthodes nouvellement mises au point et validées qui ont servi à estimer les LMR du monensin dans des aliments d'origine animale, l'une utilisant la dérivation après injection et l'autre le dépistage par spectrométrie de masse comme mesure de surveillance de routine acceptable :

- (a) Pour les bovins, la LMR a été estimée à partir d'études d'épuisement de médicaments non étiquetés utilisant la méthode HPLC validée avec dérivation après injection;

[Ref: Anon (undated) *Analytical method AM-AA-CR-R152-AA-791 Determination of monensin in chicken tissues by HPLC using post-column derivatisation. Sponsor submitted*]

- (b) Dans le cas du poulet et de la dinde, la LMR a été estimée à partir d'études sur l'épuisement de médicaments sans étiquette menées selon la méthode validée CLHP-SM/SM;

[Ref: Cordroc'h, S. (2007). *Non-clinical laboratory study (GLP): Validation of an HPLC-MS/MS method for the assay of monensin A in bovine muscle, liver, kidney, fat and milk. Unpublished study No A061485 from Avogadro, Fontenilles, France, Elanco Animal Health, a division of Eli Lilly and Company. Greenfield, IN. Sponsor submitted*]

- (c) Dans le cas du lait de vache, la LMR a été estimée d'après des études d'épuisement de médicaments sans étiquette études menées à l'aide de la méthode validée CLHP-SM/SM.

[Ref: Cordroc'h, S. (2007). *Non-clinical laboratory study (GLP): Validation of an HPLC-MS/MS method for the assay of monensin A in bovine muscle, liver, kidney, fat and milk. Unpublished study No A061485 from Avogadro, Fontenilles, France, Elanco Animal Health, a division of Eli Lilly and Company. Greenfield, IN. Sponsor submitted*]

La LDD (basée sur la plus faible valeur de la courbe standard) obtenue avec la méthode validée pour le lait de vache s'élevait à 1/8^e de la LMR recommandée.

Narasine - évaluée par le Dr Betty San Martin (CHILI) et par Dr Lynn Friedlander (États-Unis d'Amérique).

Les auteurs ont mentionné que plusieurs méthodes ont été utilisées dans les deux études (avec BPL et sans BPL) afin de produire des données sur l'élimination des résidus de narasine. Ils ont cité spécifiquement les cinq méthodes validées : deux méthodes HPLC/UV avec dérivation post-colonne et trois méthodes

CLHP-SM/SM qui selon eux peuvent être considérées adaptées à la surveillance régulière des résidus de narasine dans les tissus de poulet et de porcs. Les méthodes n'ont pas été validées pour les tissus bovins, mais le Comité a néanmoins recommandé les mêmes LMR à titre temporaire pour les bovins. Dans leur évaluation, le foie ou le gras (si disponible) sont proposés comme tissus cibles et la molécule mère comme résidu marqueur.

La méthode HPLC/UV a une limite de dosage de 25 µg/kg, soit la moitié de la LMR recommandée pour le foie (ou le gras) de poulet ou de porc de 50 µg/kg.

[Ref: Method 1. Lacoste, E and Larvor, A (2003). Residue study in edible tissues of broiler chickens fed with narasin at 80 ppm for five consecutive days. European Animal Science Research. Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Report No T2NAFR0103. Sponsor submitted].

La méthode HPLC/UV a une limite de dosage de 7 µg/kg, soit la moitié (0,5 fois) de la LMR recommandée pour le muscle de poulet et les reins de porc, qui s'établit à 15 µg/kg.

[Ref: Method 2. Ward, TL., Moran, JW., Turner, JM., and Coleman, MR. (2005). Validation of a method for the determination of narasin in edible tissues of chickens by liquid chromatography. J. AOAC Intl. 88, 95-101.

Alors que les deux méthodes HPLC/UV ont été validées pour la peau/gras, le muscle, le foie et les reins, il est surprenant que les auteurs aient choisi de définir la LMR pour le foie selon une méthode et pour le rein et les muscles selon une autre méthode, sans aucune justification pour le choix de méthode. En outre, même si les auteurs ont mentionné que les méthodes de dépistage et de confirmation par spectrométrie de masse ont fourni une bonne spécificité et une bonne sensibilité, leurs limites de dosage (soit 1 µg/kg pour le foie et les œufs dans un cas) ne sont aucunement considérées dans la détermination de la LMR.

Nota : Une méthode réglementaire validée accompagnée de toutes ses caractéristiques de performance devra être soumise au JECFA au plus tard à la fin de 2010 avant sa réévaluation de manière à proposer l'évaluation par le JECFA de LMR permanentes pour les résidus de narasine chez les bovins.

Tilmicosine - évaluée par Dr Shixin Xu (RPC) et Dr. Dieter Arnold (ALL).

Les auteurs ont soumis un article très court sur les méthodes d'analyse, soit une méthode HPLC/UV validée pour les tissus de poulet et de dinde avec une limite de dosage de 60 µg/kg pour le foie et les reins et 25 µg/kg pour les muscles et le gras.

[Ref: Lily Method B04228 rev 7. Lily Laboratory Procedure for Method B04228 revision 7. Determination of tilmicosin residues in chicken, swine, cattle, and sheep edible tissues by HPLC. Sponsor submitted]

[Ref: Hawthorne, P (1999). Validation of an analytical method for the determination of tilmicosin residues in turkey liver, kidney, muscle and skin/fat samples. Unpublished Study No CEMS-1035 CEM Analytical Services, Berkshire, England for Elanco Animal Science Research, Lily Industries limited, Basingstoke, UK., Sponsor submitted]

Une méthode LC-MS/MS validée assortie d'une limite de dosage de 25 µg/kg a été présentée pour évaluation.

[Ref: McCracken, B. (2007). Validation of the analytical method, "Method of analysis for the determination of tilmicosin in whole chicken by LC-MS/MS", Study P0002796 includes Appendix I Analytical Method V003516, Method of analysis for the determination of tilmicosin in whole chicken eggs by LC-MS/MS from MPI Research Inc., State College, PA, USA. Sponsor submitted].

Dans le cas de la tilmicosine, les données de l'étude des résidus marqueurs ont permis de calculer la LMR du poulet et de la dinde d'après les limites de confiance de 95 pour cent de la tige unilatérale par rapport au 95^e centile des concentrations de résidus.

	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de la tilmicosine			
	Muscle (LDD)	Rein (LDD)	Foie (LDD)	Peau/gras (LDD)
Poule/poulet	150 (25)	600 (60)	2400 (60)	250 (25)
Dinde	100 (25)	1200 (60)	1400 (60)	250 (25)
Œuf de poule	Méthode LC-MS/MS validée - limite de dosage de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$			
Lait de vache et de brebis	Méthode LC/UV validée avec une LDD de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$			

Triclabendazole - Évaluée par Dr Philip Reeves (AUS) et Dr Gerald Swan (SA).

La 17^{ème} session du CCRVDF a demandé au JECFA de réévaluer les LMR du triclabendazole chez les bovins et les ovins. Bien qu'aucune nouvelle étude de pharmacocinétique ou du métabolisme n'ait été soumise pour évaluation, trois nouvelles études de résidus chez les bovins utilisant une solution de traitement par voie transcutanée ont été soumises. Le Comité a recommandé que :

- Le résidu marqueur représente la somme de tous les résidus extraits et convertis en céto-triclabendazole;
- Le foie et les muscles sont des tissus cibles appropriés;
- Les LMR du foie, des reins et des muscles des bovins et des ovins ont été calculées à partir de la partie supérieure d'un intervalle de confiance unilatéral de 95 pour cent par rapport au 95^e centile des résidus de céto-triclabendazole au jour 28;
- La LDD de la méthode validée représentait la moitié de la LMR recommandée pour le gras;**
- Les méthodes d'analyse suivantes ont été considérées comme appropriées pour l'analyse de routine des résidus de triclabendazole chez les bovins et les ovins :

[Ref: Adams, S (2004b) Validation of analytical procedure no 193.F00. Tissue residue of triclabendazole, measured as CGA 110754, in cattle following repeated oral dosing with Fasinex 10%, Novartis Animal Health Australasia Pty ltd., Report No 04/02/1875, Study Y03/49

Adams, S (2004c). Validation of analytical procedure no 193.F00. Determination of residues of triclabendazole in animal tissues by HPLC. Novartis Animal Health Australasia Pty ltd., Report No TR 04/05/1886, Study V03/57.

Adams, S (2005). Extended validation of analytical procedure no 193.F00. for sheep and cattle tissues. Novartis Animal Health Australasia Pty ltd., Report No TR 05/06/1945.

Dieterle, R., Kissling, M (1995). Validation of method REM 15/83: Determination of common moiety CGA 110754 in muscle, liver, kidney and fat of cattle as well as in muscle and liver of sheep after administration of 14C-CGA 89317 by HPLC. Ciba-Geigy Report on special study 132/94.

Giannone, C. (1983). Determination of total residues in tissues and fat of sheep and cattle. REM 3-38. Ciba-Geigy Limited.

Giannone, C., and Formica, G (1983). Determination of total residues in tissues and fat. REM 15/83. Ciba-Geigy Limited.

Study No AA031 (2001), Determination of tissue residues following treatment of cattle with an abamectin/triclabendazole pour-on formulation. Sponsor: M. Forster, Ancare NZ Limited. Study Director, B. Chick, Veterinary Health Research Pty Ltd., West Armidale, Australia, Laboratory Amdel New Zealand Ltd., Auckland, NZ.

Study No ANTI274 (2002). Determination of tissue residues in beef cattle following administration of an abamectin and triclabendazole pour-on formulation. Sponsor: M. McArthur, Ancare NZ Limited. Study Director, M. Chambers, Veterinary Health Research Pty Ltd., West Armidale, Australia, Laboratory: D. Hennessy, VHR Analytical Laboratory, North Ryde, Australia.

	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Foie (LDD)	Rein (LDD)	Muscle (LDD)	Gras (LDD)
Bovins	850 (74)	400 (58)	250 (36)	100 (20)
Moutons	300 (24)	200 (34)	200 (41)	100 (42)

Tylosine - évaluée par Dr Jack Lewicki (POL), Dr Philip Reeves (AUS) et Dr Gerald Swan (SA).

Les auteurs ont reconnu que, outre les données provenant d'études radiomarquées, plusieurs méthodes HPLC/UV ou méthodes CLHP-SM/SM pour la tylosine A ont été soumises pour examen par le JECFA. Le JECFA a uniquement évalué les méthodes pleinement validées pour la tylosine. Dans cette méthode décrite par Roberts, « Méthode LC-MS/MS de détermination des résidus de tylosine A dans les tissus comestibles de poulet et d'œuf, avec une limite de dosage de 50 g/kg pour le foie, les reins, les muscles et la peau/gras », la seule valeur jugée appropriée pour l'analyse de routine des résidus de tylosine A dans les tissus comestibles de poulet et d'œuf était de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans les œufs.

[Ref: Roberts, S (2007). *Validation of an analytical method for the determination of tylosin in chicken liver, kidney, muscle, skin with fat and in eggs. Analytical method No 1610. Study No 211608. Charles River Laboratories, Tranent, Edinburgh, UK., Sponsor submitted*]

Les auteurs ont fait remarquer que cette méthode pourrait facilement être étendue à d'autres matrices et qu'elle convient à l'analyse réglementaire de la tylosine A dans les tissus comestibles de bovins, de porcs, de volaille ainsi que dans le lait et les œufs.

Les auteurs ont également examiné plusieurs méthodes validées publiées dans la littérature concernant l'analyse des résidus de tylosine dans :

Les aliments du bétail [Ref: Peng, Z., & Bang-Ce, Y (2006). *Small molecule micro arrays for drug residue detection in feedstuffs. J. Agric Food Chem.*, 54, 6978-6983. Gonzalez de la Huebra et al (2007). *Sample preparation strategy for the simultaneous determination of macrolides antibiotics in animal feeding stuffs by liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ELCD). J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43, 1628-1637.; Vincent et al., (2007). *Validation of an analytical method for the determination of spiramycin, virginiamycin and tylosin in feeding stuffs by TLC and bioautography. J Food Add. Contam.*, 24, 351-359],

Les liquides biologiques et les tissus animaux [Ref: Garcia-Mayor et al., (2006). *Liquid chromatography UV diode array detection method for multi-residue determination of macrolides antibiotics in sheep's milk. J. Chromatogr. A.*, 1122, 76-83.; Tang et al., (2006). *High throughput screening for multi-class veterinary drug residues in animal muscle using LC-tandem mass spectrometry with on-line solid phase extraction. Rapid Commun. Mass Spectrometry* 20, 2565-2572.; Wang et al., (2006). *Determination of five macrolides antibiotic residues in raw milk using LC-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Agric Food Chem.*, 54, 2873-2880],

Le miel [Ref: Wang, J. (2004). *Determination of five macrolides antibiotic residues in honey by LC-ESI-MS and LC-ESI-MS/MS. J. Agric Food Chem.*, 52, 171-181; Benetti, C., et al., (2004). *Unauthorised antibiotic treatments in beekeeping. Development and validation of a method to quantify and confirm tylosin residues in honey using LC-tandem mass spectrometric detection. Anal. Chim. Acta*, 520, 87-92.; Caldow, M., et al., (2005). *Development and validation of an optical SPR biosensor assay for tylosin residues in honey. J. Agric Food Chem.*, 53, 7367-7370.; Thompson, TS., et al., (2005). *Determination of lincomycin and tylosin residues in honey by LC-tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrometry.*, 19, 309-316.; Nalda, MJN., et al., (2006). *Trace analysis of antibacterial tylosin A, B, C and D in honey by LC-electrospray ionization-mass spectrometry. J. Sep. Sci.* 29, 405-413.; Thompson, TS., et al., (2007). *Degradation of incurred tylosin to desmycosin – implications for residue analysis for honey. Anal. Chim. Acta*, 586, 304-311.; Hammel, YA., et al., (2008). *Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by LC-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A.*, 1177, 58-76.] sans toutefois formuler d'observations au sujet de l'acceptabilité des méthodes ou de toute autre mesure de surveillance de la conformité.

Les méthodes validées avaient une limite de dosage de 50 g/kg, cela représente la moitié des LMR pour le lait et les tissus animaux.

	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
	Rein (LDD)	Foie (LDD)	Muscle (LDD)	Peau/gras (LDD)	Lait (LDD)	Œufs (LDD)
Bovins	100 (50)	100 (50)	100 (50)	100 (50)	100 (50)	
Porc	100 (50)	100 (50)	100 (50)	100 (50)		
Poule/poulet	100 (50)	100 (50)	100 (50)	100 (50)		300 (100)

ANNEXE II: AVANT-PROJET DE DIRECTIVES DU CCRVDF POUR L'ÉLABORATION DE CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE POUR L'ANALYSE MULTI-RÉSIDUS.

TABLE DES MATIÈRES

	Paragraphes
Généralités	1-3
Introduction	4-6
Champ d'application	7-10
Critères de performance des méthodes d'analyse	11-37
Caractéristiques de performance des méthodes de dépistage	11-14
Caractéristiques de performance des méthodes quantitatives	15-25
Caractéristiques de performance des méthodes de confirmation	26-37
Caractéristiques générales de performance pour utilisation dans un programme de contrôle réglementaire	38-41
Autres considérations	42-45
Expression des résultats	46
Tableaux 1-5	
Glossaire des termes	
Abréviations	

Généralités

1. La Commission du Codex Alimentarius (CCA) a adopté des directives en 2008 pour concevoir et mettre en œuvre des programmes nationaux de réglementation en matière de salubrité des aliments en regard à l'utilisation de médicaments vétérinaires dans les animaux destinés à la consommation (CAC/GL 71-2009). Ces directives ont été conçues de manière à comprendre une orientation générale au sujet de la validation des méthodes d'analyse pour une utilisation avec des analytes uniques dans les conditions de validation unique en laboratoire (tel qu'indiqué dans le document CAC/GL 71-2009) et de manière à pouvoir être mises à jour selon les besoins pour permettre de couvrir d'autres domaines pertinents.
2. La 18^{ème} session du CCRVDF a reconnu que la pratique ayant cours dans les laboratoires d'analyse qui effectuent ces travaux consiste à appliquer les méthodes d'analyse multi-résidus dans toute la mesure du possible afin d'accroître l'efficacité des travaux tout en maintenant les coûts à un niveau minimal. Toutefois, le Comité a également reconnu à cette même session que les données sur les caractéristiques de performance des méthodes analytiques multi-résidus étaient très limitées. Ce document d'orientation vise à combler ce besoin.
3. Il est tenu pour acquis que les pays en développement pourraient avoir besoin d'une période de transition et/ou d'assistance technique dans leurs démarches visant à intégrer des directives.

Introduction

4. Les méthodes d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments doivent être capables de déceler sans risque d'erreur la présence d'une certaine substance à doser, d'en déterminer la concentration, et d'identifier correctement la substance recherchée. Lorsque des résidus de médicaments vétérinaires approuvés sont détectés à des concentrations supérieures à la limite maximale de résidus (LMRMV), les résultats devraient être confirmés avant de prendre les mesures prévues par la réglementation. Dans le cas de substances dont l'utilisation sur les animaux destinés à l'alimentation a été interdite par une autorité compétente en la matière, ou pour lesquelles on n'a pas établi de DJA ni de LMRMV, la confirmation de la présence de résidus dans une denrée alimentaire, quelle qu'en soit la concentration, peut donner lieu à des mesures réglementaires.
5. Les documents d'orientation technique publiés par la CCA visent à aider les pays engagés dans le contrôle des importations et des exportations de denrées alimentaires à imposer des exigences au chapitre des échanges de denrées alimentaires, dans le but de protéger les consommateurs et de faciliter le commerce. Dans ces documents, on recommande que « les laboratoires spécialisés dans les analyses réglementaires doivent être conformes à la norme ISO/IEC 17025:2005 - Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essai ». Les laboratoires devraient également participer à des programmes de tests d'aptitude pour l'analyse des denrées alimentaires qui respectent les exigences énoncées dans le « Protocole international harmonisé pour les essais d'aptitude des laboratoires d'analyse (chimique) », et, si possible, utiliser des méthodes d'analyse qui ont été validées selon les principes fixés par la CCA (voir CAC/GL 27-1997). En outre, les laboratoires doivent utiliser des procédés internes de contrôle de la qualité qui sont conformes aux procédures décrites dans les « Directives harmonisées sur le contrôle de qualité interne des laboratoires de chimie appliquée. » La section 5.4.5 de l'ISO/IEC 17025:2005 fournit des directives générales sur l'utilisation des méthodes de validation.
6. Les méthodes d'analyse validées sont des méthodes présentant des paramètres opérationnels qui ont été déterminés (soumis à une évaluation indépendante), de manière à pouvoir être « adaptées à l'usage » dans un contexte réglementaire. Ce document d'orientation passe en revue les attributs des méthodes d'analyse applicables à une série de substances dans le cadre de la même analyse et aborde les exigences que ces méthodes doivent respecter avant de pouvoir être considérées comme utilisables dans les programmes de contrôle réglementaire des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments.

Champ d'application

7. Bien que certains programmes de contrôle des résidus puissent inclure d'autres groupes d'analytes, comme les pesticides et les contaminants de l'environnement, ce guide a été préparé spécifiquement pour couvrir uniquement les résidus de médicaments vétérinaires.

8. Ce document d'orientation a été préparé par le CCRVDF pour traiter de la validation dans un laboratoire unique de méthodes portant sur un seul analyte (CAC/GL 71-2009). Toutefois, afin d'accroître l'efficacité des travaux et le cycle de rotation des échantillons, de nombreux laboratoires se tournent vers les méthodes multi-résidus. Ces méthodes peuvent être utilisées pour le dépistage de résidus dans plusieurs analytes de classes identiques ou différentes. Aux fins du présent document, une méthode d'analyse multi-résidus est considérée comme une méthode comprenant au moins trois substances à analyser dans la même catégorie ou plus d'une classe de médicaments vétérinaires dans son champ d'application. Ces méthodes sont le plus couramment utilisées dans les laboratoires pour le dépistage de résidus de médicaments vétérinaires dans les échantillons, mais elles peuvent aussi être utilisées à la fois pour des analyses quantitatives et confirmatoires. Ce document traite donc des trois types d'analyses.

9. Les principes décrits dans cette section sont considérés comme étant d'application pratique et adaptés à la détermination des caractéristiques de performance des méthodes d'analyse multi-résidus dans les programmes de contrôle réglementaire. Ces principes sont fondés sur les recommandations élaborées à l'issue d'une consultation de l'AOAC de la FAO et de l'AIEA tenue à Miskolc, en Hongrie, en 1999 (http://www.iaea.org/programmes/rifa/trc/pest-qa_val_guide.pdf et dans A. Fajgelj & A. Ambrus Principles and Practices of Method Validation, Royal Society of Chemistry, 2000). Toutes les caractéristiques de performance ou un sous-ensemble peuvent être utilisées pour déterminer l'adéquation de la méthode au cours de sa validation (« adaptée à l'usage ») pour utilisation dans un contexte réglementaire. Pour les raisons ci-dessus, les renseignements fournis au tableau 5 ci-dessous (qui émane de la consultation Miskolc (1999) http://www.iaea.org/trc/pest-qa_val_annex2.pdf) ont été gardés intacts, car il s'agit du document d'orientation le plus récent en ce qui touche les travaux du groupe de travail au sujet des résidus de médicaments vétérinaires, et parce que cette information est utile tant pour la validation de la méthode d'analyse que pour la dérivation des caractéristiques de performance.

10. Un document d'orientation sur la validation et le contrôle de qualité a été récemment publié par l'Union européenne (SANCO/10684/2009) pour les analyses de résidus de pesticides. Le document de l'UE couvre les méthodes d'analyse multi-résidus, principalement les analyses de confirmation, mais aborde également plusieurs méthodes de dépistage de résidus par spectrométrie de masse. Des éléments du document SANCO/10684/2009 ont été intégrés dans le présent document lorsqu'il y avait lieu.

Caractéristiques de performance des méthodes d'analyse

Caractéristiques de performance des méthodes de dépistage

[NOTA : Bien que les sections suivantes décrivent les caractéristiques de performance applicables au dépistage et à la confirmation des méthodes quantitatives en général, il faut savoir que ces caractéristiques de performance doivent être définies et mesurées pour chaque analyte répertorié dans le champ d'application de la méthode multi-résidus entièrement optimisée. Il est préférable de procéder de la sorte une fois qu'il a été déterminé que l'élaboration et/ou la modification de la méthode est complète et que la méthode ne subira plus d'autres changements ou modifications. À cet égard, les concepts sont très similaires à ceux décrits dans les documents d'orientation concernant les caractéristiques de performance d'un analyte dans une méthode visant un seul analyte]

11. Les méthodes de dépistage sont généralement de nature qualitative ou semi-quantitative, et ont pour objectif de faire la distinction entre des échantillons ne contenant pas de résidus en quantité dépassant un seuil donné (échantillons « négatifs ») et des échantillons qui peuvent contenir des résidus dépassant ce seuil (échantillons « positifs »). Dès lors, la stratégie de validation consiste à établir un seuil de concentration au-delà duquel les résultats sont « positifs », à déterminer statistiquement un taux pour les résultats « faux positifs » et « faux négatifs », à rechercher les interférences et à fixer des conditions d'utilisation appropriées.

12. On établit la concentration de détection pour le test d'un composé donné en effectuant des expériences de concentration-réponse, généralement en utilisant 30 répliques (provenant d'au moins six sources) enrichies à différentes concentrations croissantes. Une fois que les concentrations ont été établies, à savoir que l'ensemble des 30 répliques donnent une réponse négative et l'ensemble des 30 répliques donnent une réponse positive, l'expérience est répétée en utilisant les matériaux de matrice en blanc enrichis à quatre niveaux de concentration « tous négatifs » et « tous positifs » également espacés. Une série supplémentaire est testée à une concentration de 20 pour cent au-dessus des niveaux de concentration « tout positif ». L'analyse

statistique des résultats permet à l'utilisateur d'établir une concentration de détection fiable à la limite de confiance nécessaire (généralement 95 pour cent)¹.

13. Pour une analyse de dépistage, en particulier pour celles qui font usage de kits de dépistage, le terme « sensibilité » se réfère en général à la plus petite concentration à laquelle la substance à analyser recherchée peut être détectée avec certitude, dans des limites statistiques déterminées. Dans le Performance Tested Program™ de l'AOAC pour les kits de dépistage, elle est déterminée expérimentalement par le dépistage d'un minimum de 30 matériaux d'échantillons exempts de résidus fortifiés par la substance à analyser à la concentration recherchée. Les matériaux d'échantillons devraient provenir de six sources différentes au moins (autrement dit, cinq répliques au moins pour chacune des six sources au moins), tous devant donner un résultat positif lorsqu'ils sont fortifiés à la concentration recherchée. Trois résultats négatifs ou plus constituent un échec du test de sensibilité. Si un ou deux résultats sont négatifs, l'expérience doit être répétée et deux résultats négatifs constitueraient alors un échec. L'expérience doit être répétée avec le matériau absorbé connu à la concentration recherchée, si ce matériau est disponible. D'autres approches, comme les conseils publiés par l'UE au sujet des analyses de dépistage (http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf) peuvent aussi être utiles.

14. La *sélectivité* d'une méthode de dépistage est la capacité de la méthode à déterminer que les échantillons qui donnent un résultat négatif sont réellement négatifs. Le test de dépistage doit aussi pouvoir déterminer le ou les analyte(s) en présence d'interférences d'autres composants dans l'échantillon. Dans une méthode de dépistage, la sélectivité n'est pas aussi grande que dans une méthode quantitative, parce que les méthodes de dépistage s'appuient souvent sur des caractéristiques structurelles communes à un groupe ou à une catégorie de composants. Ces méthodes, qui appartiennent en général à la catégorie des méthodes de Type III, sont souvent fondées sur l'inhibition de la croissance microbologique, des essais d'immunologie, ou des réactions chromogènes qui peuvent identifier un composant de manière non équivoque. On peut augmenter la sélectivité d'une méthode de dépistage en l'utilisant comme système de détection après une chromatographie ou une autre technique de séparation. Pour les tests de dépistage, on recommande un taux de sélectivité de 95 pour cent au moins, avec une certitude de 95 pour cent, et 60 analyses faites sur des matériaux d'échantillons à blanc provenant d'au moins six sources différentes. Tous les résultats devraient être négatifs. On peut ensuite faire des tests supplémentaires pour détecter des interférences potentielles en testant des matériaux d'échantillons à blanc fortifiés de substances interférentes potentielles, comme d'autres médicaments utilisés pour le traitement animal, des contaminants potentiels de l'environnement, des métabolites de médicament ou des substances de même nature chimique. Ici aussi, les résultats devraient être négatifs lorsque ces substances sont présentes à des taux de concentration auxquels on peut s'attendre normalement dans un échantillon.

Caractéristiques de performance des méthodes quantitatives

15. La *sélectivité*, soit l'aptitude d'une méthode d'analyse à détecter et à distinguer le signal d'un composé en présence d'autres composés qui peuvent être présents dans l'échantillon revêt une importance particulière lors de la définition des caractéristiques de performance des méthodes utilisées dans des programmes de contrôle réglementaire des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments. Deux aspects doivent être examinés : l'aptitude de la méthode à fournir un signal qui soit exempt d'éléments provenant de l'interférence d'autres composés pouvant être présents dans un échantillon ou un extrait d'échantillon et l'aptitude de la méthode à identifier sans équivoque un signal comme étant exclusivement lié à un certain composé. Pour une méthode de Type II, la prescription exige que le signal utilisé pour la quantification ne se rapporte qu'à la substance à analyser, sans interférences d'autres composés. Les analyses chromatographiques à base de pics donnent des résultats quantitatifs relativement peu fiables. L'emploi de détecteurs spécifiques de certains éléments, ou de détecteurs par ondes, ou de détecteurs par sélection de masse qui sont plus spécifiques d'un composé ou d'une structure particulière, combiné à une technique de séparation chromatographique, améliore la sélectivité des méthodes quantitatives de contrôle de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments.

¹ Finney, D.J. 1978. *Statistical method in biological assay*. 3rd edition. New York, USA, MacMillan Publishing Co.

[NOTA : Demander les données à compiler et à examiner afin de déterminer si les 5 pour cent (faux positifs/faux négatifs) des méthodes à un seul analyte peuvent s'appliquer par extension aux méthodes multi-résidus, et ce en toute sécurité].

16. En plus de la sélectivité, la méthode doit aussi être apte à fournir des résultats quantitatifs fiables. Cette aptitude est démontrée par les deux facteurs suivants :

- l'étroitesse de l'accord entre le résultat rapporté et une valeur de référence acceptée pour la concentration de substance à analyser présente dans l'échantillon, exprimée en termes de *justesse*, de *vérité* ou de *biais*; et
- l'aptitude de la méthode à fournir des résultats identiques pour des essais répétés (ou des valeurs acceptées dans le cas des matériaux de référence), exprimée en termes de *précision* (*répétabilité* et *reproductibilité*). Les données sur la précision peuvent servir au calcul de la propagation des erreurs expérimentales (incertitude des mesures, MU) de la méthode.

17. Il a été recommandé que les méthodes utilisées pour étayer les LMR du codex soient conformes, en ce qui concerne la justesse et la précision, aux normes de performance figurant dans le tableau 1 ci-après [*sous réserve de vérification que les limites demeurent pertinentes, après la compilation et l'examen d'une vaste banque de données actualisée*], dans lequel CV_A exprime le coefficient de variation déterminé par les portions d'échantillons à blanc fortifiés avant extraction et CV_L exprime la variabilité du laboratoire, laquelle comprend une estimation de 10 pour cent de variabilité dans le traitement des échantillons².

18. La *justesse* d'une méthode peut être déterminée par l'analyse d'un matériau de référence certifié, en comparant ces résultats avec ceux obtenus en utilisant une autre méthode pour laquelle les caractéristiques de performance ont été auparavant rigoureusement établies (autrement dit, une méthode de référence reconnue) ou, en l'absence de matériaux ou méthodes de référence, en déterminant la *récupération* de la substance à analyser fortifiée dans le matériau d'échantillons à blanc connu. La détermination de la justesse en tant que récupération est fréquemment utilisée pour valider les méthodes d'analyse de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments, car il arrive souvent qu'on ne dispose ni de matériaux de référence certifiés, ni de méthodes validées par des études interlaboratoires. La justesse d'une mesure est étroitement liée à l'*erreur systématique* (biais de la méthode d'analyse) et à la récupération de la substance à doser (mesurée en pourcentage de récupération). Le degré de justesse exigé des méthodes variera en fonction de l'utilisation que l'on entend faire des résultats dans le cadre de la réglementation. En règle générale, la justesse devrait être fixée à des concentrations proches de la LMRMV ou du niveau retenu pour une réglementation (en général de 0,5 à 2,0 fois le niveau retenu) pour faire en sorte que des mesures réglementaires ne soient prises que si des échantillons contiennent des résidus excédant les limites réglementaires, dans des limites statistiques de fiabilité.

19. La *récupération* s'exprime habituellement sous forme de pourcentage de la substance à analyser déterminé par des expériences après fortification du matériau d'échantillons à une concentration connue et devrait être évaluée à des concentrations qui couvrent la fourchette d'analyse de la méthode. Lorsqu'on interprète les pourcentages de récupération, il faut bien savoir que la substance à analyser ajoutée intentionnellement à un échantillon ne se comportera pas nécessairement de la même manière que cette même substance absorbée par la voie biologique (résidu de médicament vétérinaire). Dans de nombreux cas, la quantité d'un résidu absorbé qui est extraite (le produit ou la fraction récupérée) est inférieure au total des résidus absorbés présents, du fait de pertes pendant l'extraction, de la liaison intracellulaire des résidus, de la présence de conjugués ou d'autres facteurs qui ne sont pas entièrement représentés par des expériences de récupération réalisées avec des blancs fortifiés de substance à analyser. Aux concentrations relativement élevées, le pourcentage de récupération analytique devrait approcher 100 pour cent. Aux concentrations plus faibles et, en particulier, lorsqu'il s'agit de méthodes faisant appel à plusieurs étapes parmi lesquelles l'extraction, l'isolation, la purification et la concentration, les pourcentages de récupération peuvent être plus faibles. Quels que soient les pourcentages de récupération moyens observés, il est souhaitable que la récupération présente une faible variabilité de manière à ce qu'on puisse faire une correction fiable, si

² Alder, L., Holland, P.T., Lantos, J., Lee, M., MacNeil, J.D., O'Rangers, J., van Zoonen, P. & Ambrus, A. 2000. *Directives sur la validation par un laboratoire unique de méthodes d'analyse pour des concentrations au niveau de trace de produits chimiques organiques* (disponible au http://www.iaea.org/trc/pest-qa_val2.htm).

nécessaire. Les corrections de récupération devraient être conformes aux orientations de la Commission du Codex Alimentarius (CAC/GL 37-2001).

20. La *fidélité*, qui quantifie les écarts entre les résultats d'essais sur des portions d'un même échantillon, est un facteur important à prendre en considération lorsqu'on détermine quand un résidu présent dans un échantillon doit être considéré comme excédant une LMRMV ou une autre limite réglementaire. Elle peut s'exprimer en termes de *répétabilité* (au sein d'un laboratoire) et de *reproductibilité* (interlaboratoires). Pour la validation des méthodes par un laboratoire unique, la précision en tant que répétabilité devrait être déterminée à partir d'expériences réalisées à des jours différents, en utilisant un minimum de six sources de tissus, avec des lots de réactifs différents (et un matériel différent, etc.) et de préférence par des analystes différents. La fidélité d'une méthode s'exprime généralement en écart-type. Une autre expression utile est l'écart-type relatif, ou coefficient de variation (l'écart-type, divisé par la valeur absolue de la moyenne arithmétique). On peut l'exprimer en pourcentage en multipliant par cent.

[NOTA : Les données doivent être demandées, compilées et interprétées afin de déterminer si les fourchettes de récupération actuelles ainsi que les fourchettes d'acceptabilité de justesse représentées dans le tableau 1 sont encore acceptables, ou s'il faut les réviser de façon significative.]

21. Les méthodes quantitatives se fondent généralement sur la comparaison entre la réponse d'une substance à analyser et la réponse d'étalons de la substance à analyser dans des solutions à des concentrations connues. Lors de l'élaboration et de la validation de la méthode, la courbe d'étalonnage devrait être déterminée pour évaluer la réponse du détecteur aux étalons. Les concentrations (un minimum de cinq, plus les blancs) devraient couvrir l'ensemble de la fourchette recherchée d'analyse et la courbe résultante devrait être exprimée statistiquement. Bien qu'il soit recommandé dans la pratique d'inclure un échantillon à blanc dans les étalons d'analyse, ceci n'implique pas pour autant qu'on puisse extrapoler les résultats à la région située en-dessous de la courbe sous l'étalon le plus bas pour obtenir un résultat quantitatif. La fonction d'analyse se rapporte à la réponse pour la substance à analyser récupérée à partir du matériau d'échantillons à différentes concentrations dans la fourchette recherchée d'analyse. Pour les substances à analyser pour lesquelles une LMRMV a été établie dans un matériau d'échantillons particulier (matrice), la réponse est en général déterminée pour un matériau d'échantillons à blanc ou pour des matériaux d'échantillons à blanc fortifiés à chaque 0,5x, 1,0x et 2,0x la LMRMV (il est recommandé d'utiliser six sources différentes de blancs).

22. L'expérience de fonction d'analyse peut être combinée avec l'expérience de récupération décrite plus haut et revêt une importance particulière lorsque la présence de produits co-extraits de la matrice modifie la réponse de la substance à analyser par rapport aux étalons d'analyse. La *linéarité* est déterminée à partir des expériences de fonction d'analyse décrites et elle est l'expression statistique de la courbe obtenue pour l'analyse de matériaux d'échantillons fortifiés à des concentrations recherchées couvrant la limite maximale de résidus. Elle est en générale déterminée à partir d'une analyse de régression linéaire des données, en supposant qu'il y a une réponse linéaire. Il est de plus en plus fréquent dans les méthodes d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments de baser la détermination quantitative sur une courbe type préparée en plus d'un étalon pour connaître le matériau de matrice à blanc représentatif à un éventail de concentrations appropriées couvrant la valeur recherchée. L'utilisation d'une telle « courbe-type de tissus » pour l'étalonnage intègre une correction de la récupération aux résultats d'analyse obtenus.

23. Il faut également fixer les limites inférieures de substances à analyser dont on pourra déceler la présence avec certitude par détection, quantification ou confirmation en utilisant une méthode particulière d'analyse. La *limite de détection* peut se définir en pratique comme la plus petite quantité ou concentration mesurée de substance à analyser qui permet de déduire la présence de la substance dans la prise d'essai (sans pour autant l'identifier ou la confirmer). On peut la calculer à partir de l'écart-type ($s_{y/x}$) à partir de l'analyse de régression linéaire de la courbe-type générée par la fonction d'analyse expérimentée ci-dessus³. La limite de détection est alors calculée en utilisant le point d'interception y (en supposant qu'il s'agit d'une valeur positive) de la courbe et trois fois $s_{y/x}$. Cette approche donne une estimation plus prudente de la limite de détection. La limite de détection peut également être estimée à l'aide de mesures prises sur des substances d'essai représentatives de la réaction la moins appropriée de l'analyte du blanc ajouté au triple de son écart-

³ Miller, J.C. & Miller, J.N. 1993. *Statistics for analytical chemistry*. 3rd Edition. Chichester, UK, Ellis Horwood Ltd.

type. Lorsque l'on a recours à cette approche, il s'avère souvent nécessaire de fortifier les substances d'essai à une concentration entraînant une réaction quasiment indétectable afin d'obtenir un écart-type du blanc approximatif.

24. La *limite de quantification* (LQ) peut être établie à partir des mêmes expériences en utilisant le point d'interception y de la courbe plus dix fois $s_{y/x}$. Pour les méthodes utilisées pour étayer des LMRMV établies par la Commission du Codex Alimentarius, la limite de quantification devrait répondre aux critères de fidélité et de justesse (récupération) du tableau 1 et devrait être égale ou inférieure à 0,5x la LMRMV. Cependant, quand la limite de quantification d'une méthode est plus basse que les concentrations réelles vérifiées pour la conformité à une LMRMV, la validation et l'application ultérieure de la méthode peuvent se baser sur le plus petit niveau étalonné, qui est en général égal à 0,5x la LMRMV. Pour un programme réglementaire, les limites de détection et de quantification sont des paramètres importants si la méthode est destinée à évaluer des expositions à des résidus, lorsqu'il peut être intéressant de contrôler les résidus à des concentrations inférieures à la LMRMV, ou si elle est destinée à rechercher des substances qui n'ont pas de DJA ni de LMRMV. Pour vérifier la conformité à une LMRMV, il est important d'inclure un plus petit niveau étalonné à l'analyse qui démontre de manière adéquate que la concentration de la LMR doit être déterminée avec certitude. Le plus petit niveau étalonné d'une méthode utilisée pour étayer une LMRMV ne devrait pas être inférieur à la limite de quantification. Le *Manuel de procédure* recommande le terme « *limite de détermination* » dans les « Termes à utiliser dans l'approche de critères. »

25. La consultation Miskolc menée en 1999 a reconnu que des approches alternatives pourraient être appliquées à la validation des méthodes. Les approches considérées comprenaient les termes Limite de décision (CC α) et capacité de détection (CC β). Ces termes sont définis dans le glossaire ci-dessous et ont été adoptés subséquemment dans certains pays, par exemple dans l'Union européenne en vertu de la décision 2002/657/CE de la Commission, et devraient être acceptés comme solution de rechange à l'utilisation de la limite de détermination et de la limite de dosage.

Caractéristiques de performance des méthodes de confirmation

26. Lorsque les analyses sont effectuées à des fins de contrôle ou de réglementation, il est particulièrement important que des données confirmatoires soient générées avant de signaler des échantillons contenant des résidus de pesticides qui ne sont pas normalement associés avec ces produits ou lorsque les LMR semblent avoir été dépassées. Dans un premier temps, l'analyse doit être répétée en utilisant la même méthode, si une partie seulement de l'échantillon a été analysée initialement. Cela fournira la preuve de la répétabilité des résultats, si le résidu est confirmé. Il convient de noter que le seul élément de preuve de l'absence de résidus détectables provient des données d'aptitude de performance du système générées en même temps que l'échantillon visé.

27. Les tests de confirmation peuvent être quantitatifs et/ou qualitatifs mais, dans la plupart des cas, les deux types d'information sont exigés. Des problèmes particuliers surviennent quand des résidus doivent être confirmés au seuil de détermination ou à proximité; toutefois, bien qu'il soit difficile de quantifier les résidus à ce niveau, il est essentiel de fournir une confirmation adéquate tant du niveau que de l'identité du résidu.

28. L'utilité des tests de confirmation peut dépendre du type d'échantillons et des faits antérieurs connus. Certains résidus sont associés à des cultures ou produits spécifiques. Pour une série d'échantillons d'origine similaire contenant des résidus du même médicament vétérinaire, il peut suffire de confirmer l'identité des résidus sur une petite portion des échantillons choisis au hasard. Si l'on dispose d'échantillons à blanc, on s'en servira pour déceler la présence éventuelle d'interférents dans les espèces/matrices ciblées.

29. Suivant la technique de détermination utilisée au départ, il peut être nécessaire d'utiliser une autre procédure (qui peut être une technique de détection différente) pour une vérification de la quantité. S'il s'agit d'une confirmation qualitative (identité) il est souhaitable d'utiliser des données de masse spectrale, ou une combinaison de techniques compte tenu des différentes propriétés physico-chimiques (voir tableau 3).

30. L'analyste doit décider lui-même de la marche à suivre pour identifier un résidu de façon certaine; il s'efforcera tout particulièrement de choisir une méthode permettant d'amoinrir les effets des substances perturbatrices. Dans le choix de la (des) technique(s), il faudra également tenir compte du matériel et des compétences techniques disponibles. D'autres méthodes de confirmation sont présentées au tableau 3.

31. La *sélectivité*, ou capacité d'une méthode à identifier un signal comme se rapportant exclusivement à un composé spécifique, est la principale caractéristique des méthodes de confirmation. Certaines techniques

instrumentales, telles que la spectroscopie aux rayons infrarouges ou la spectrométrie de masse peuvent être suffisamment sélectives pour fournir une identification non équivoque. Les méthodes confirmatoires sont souvent fondées sur ces techniques.

32. En général, quatre points d'identification au moins sont nécessaires pour répondre aux critères de performance acceptés pour les méthodes réglementaires. Toutefois, la confiance accordée à l'identification augmentera en fonction du nombre croissant de points d'identification, et certains laboratoires peuvent choisir d'utiliser plus de points que le minimum requis de quatre points. Les tableaux 1a et 1b présentent le système de points d'identification publié dans la décision de la Commission européenne 2002/657/EC. Les méthodes basées sur la spectrométrie de masse à haute résolution sont considérées aptes à produire une plus grande fiabilité grâce à une mesure plus précise de la masse que ce qui peut être obtenu en utilisant des techniques de spectrométrie à basse résolution. Les exigences de performance applicables aux méthodes de confirmation basées sur la chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse à faible résolution (GC-MS) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), tel que publiées dans la décision 2002/657/CE de la Commission européenne et par un organisme d'experts internationaux⁴, sont données dans le tableau 2 [sous réserve de révision]

[Les données peuvent être demandées, compilées et examinées afin de déterminer si les limites définies dans le tableau 3 sont encore acceptables et appropriées.]

33. On considère qu'un point d'identification devrait être attribué à chaque fragment d'ion structurellement important détecté par une méthode de spectrométrie de masse à faible résolution. En cas d'utilisation d'un instrument à faible résolution en tandem, comme un spectromètre de masse « quadripolaire triple », des fragments secondaires sont détectés à partir d'un fragment primaire isolé au départ par le spectromètre. Le fait que ces fragments structurellement importants sont produits à partir de la fragmentation d'un fragment plus grand (ion parent ou précurseur) associé à la molécule apporte une plus grande certitude et chaque ion fils ou produit se voit attribuer une valeur de 1,5 points d'identification. Une combinaison d'un ion précurseur et de deux ions produits apporte les quatre points d'identification nécessaires si des instruments SM/SM à faible résolution sont utilisés dans une méthode de confirmation.

34. L'utilisation de spectromètres de masse à haute résolution dans une méthode de confirmation apporte une certitude supplémentaire, étant donné que la haute résolution permet d'identifier la masse de manière plus précise et qu'elle peut être utilisée pour prédire la composition élémentaire de chaque fragment. Pour un seul spectromètre de masse à haute résolution, chaque fragment structurellement important se voit attribuer une valeur de deux points d'identification, tandis que les ions produits générés par des expériences par SM/SM à haute résolution ont chacun une valeur de 2,5 points d'identification. Par ailleurs, au moins un coefficient ionique doit également être mesuré pour éliminer la possibilité que des fragments de la même masse résultent de composés isobares de structure similaire. Les temps de rétention, ou mieux encore, des temps de rétention relatifs doivent également être déterminés pour éviter le risque de fausses identifications lors de l'utilisation des spectromètres de masse à haute résolution.

35. D'autres techniques, lorsqu'elles sont employées en combinaison, peuvent réaliser un degré de spécificité comparable en tant que techniques de confirmation. Par exemple, la spécificité peut être vérifiée en combinant des méthodes telles que :

- la chromatographie en couche mince;
- la chromatographie gaz-liquide spécifique de l'élément considéré avec les systèmes de détection qui l'accompagnent;
- la formation de dérivés caractéristiques suivie de chromatographie additionnelle; ou
- la détermination de temps de rétention relatifs spécifiques des composés faisant appel à plusieurs systèmes chromatographiques de polarités différentes.

⁴ Bethem, R., Boison, J.O., Gale, J., Heller, D., Lehotay, S., Loo, J., Musser, S., Price, P. & Stein, S. 2003. Establishing the fitness for purpose of mass spectrometric methods. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(5): 528–541.

Ces procédures doivent pouvoir s'appliquer à la limite maximale de résidus (LMRMV) retenue pour la substance à doser.

36. Lorsqu'une méthode de confirmation telle que la spectrométrie de masse n'est pas disponible, les informations sur la sélectivité liée à l'analyse d'un résidu de médicament vétérinaire particulier dans un échantillon peuvent être développées à partir de diverses sources⁵. Cette information peut être récupérée dans un document journal structuré contenant toute l'information conduisant à la conclusion qu'une méthode a détecté un composé particulier dans un échantillon, au taux de concentration rapporté. Si aucune analyse séparée ne peut fournir la preuve irréfutable de l'identité du composé et/ou de la quantité présente souhaitée, les informations combinées qui ont été compilées prouvent que l'analyste s'est consciencieusement efforcé d'arriver à un résultat logique conforme aux données et autres informations disponibles. Le tableau 3 résume des exemples de techniques d'analyse qui peuvent convenir pour répondre aux critères de méthodes d'analyse de confirmation.

37. La derivatisation peut également servir à la confirmation des résidus de médicaments vétérinaires et peut être répartie en trois groupes principaux.

a) Réactions chimiques

On a souvent eu recours à des réactions chimiques de faible ampleur pour obtenir des produits de dégradation, d'addition ou de condensation des pesticides, qui sont ensuite réexaminés par des techniques chromatographiques. Les réactions donnent des produits présentant des temps de rétention et des réactions aux détecteurs différents du composé d'origine. Un échantillon du pesticide de référence doit être traité parallèlement au résidu présumé, de façon à permettre une comparaison directe des résultats. Un extrait enrichi doit être également inclus afin de prouver que la réaction s'est produite en présence d'un échantillon du produit à analyser. Il peut y avoir une interférence lorsque des dérivés sont détectés au moyen des propriétés du réactif derivatisant. Les réactions chimiques ont l'avantage d'être rapides et faciles à effectuer, mais il peut être nécessaire d'acheter des réactifs spéciaux et/ou de les purifier.

b) Réactions physiques

Une technique qui peut s'avérer utile pour un nombre limité de médicaments vétérinaires réside dans l'altération photochimique d'un résidu de pesticide en vue d'obtenir un ou plusieurs produits ayant un chromatogramme reproductible. Un échantillon du pesticide de référence et un extrait enrichi doivent toujours être traités en parallèle. Si les échantillons contiennent plus d'un résidu de pesticide, l'interprétation des résultats peut être difficile. Dans ce cas, on peut au préalable séparer certains résidus par CCM, CLHP ou fractionnement de la colonne.

c) Autres méthodes

De nombreux pesticides sont susceptibles d'être dégradés/transformés par des enzymes. Contrairement aux réactions chimiques normales, ces processus sont très spécifiques et consistent en général en conjugaison, oxydation, hydrolyse ou de-alkylation. Les produits de conversion ont des caractéristiques chromatographiques différentes du médicament vétérinaire initial et peuvent servir à la confirmation si on les compare aux produits de réaction obtenus avec des médicaments de référence.

Caractéristiques générales de performance des méthodes destinées à un programme de contrôle réglementaire

38. Il existe un certain nombre d'autres considérations pour la sélection de méthodes appropriées destinées aux programmes de contrôle réglementaires des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments. Les méthodes doivent être suffisamment (**robustes**), efficaces par rapport à leur coût, relativement peu complexes, portatives et susceptibles de traiter simultanément un ensemble de prélèvements dans un bref laps de temps. La stabilité des substances recherchées doit également être établie.

⁵ Stephany, R.W. 2003. *SPECLOG – the specificity log*. CRD-9, Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods, 14th Session, Arlington, USA, 4–7 March.

39. L'analyse de la (*robustesse*) doit être réalisée en utilisant une approche normale de plan factoriel afin de déterminer tout point de contrôle critique⁶. Les facteurs typiques à inclure dans un plan englobent les variations des volumes ou concentrations de réactifs, du pH, de la durée et de la température d'incubation ou de réaction, de la qualité des réactifs et des différents lots ou sources d'un réactif ou d'équipement de chromatographie. L'analyse de la robustesse d'une méthode de confirmation peut être nécessaire si la méthode diffère fortement de la méthode quantitative validée auparavant (si la méthode utilise différentes procédures d'extraction ou de derivatisation que celles qu'utilise la méthode quantitative).

40. Le *rapport coût-efficacité* est l'utilisation de réactifs et de fournitures qui sont facilement disponibles avec la pureté nécessaire auprès des fournisseurs locaux ainsi que de l'équipement dont les pièces et l'entretien sont également facilement disponibles. L'*efficacité de la méthode* est plus grande lorsque plusieurs échantillons peuvent être analysés en même temps. Cela réduit le temps nécessaire à l'analyse par échantillon et réduit en général le coût par échantillon, étant donné qu'il y a certains frais fixes associés à l'analyse d'échantillons, que ce soit séparément ou sous forme de lots plus grands. La capacité d'une méthode à prendre en charge plusieurs échantillons dans un lot est importante lorsqu'un grand nombre d'échantillons doivent être analysés dans un court laps de temps ou pour une date déterminée. La *portabilité* est la caractéristique des méthodes d'analyse qui leur permet d'être transférées d'un endroit à un autre sans perte les caractéristiques de performance d'analyse établies.

41. La *stabilité de la substance* à analyser pendant l'analyse doit être établie pour les étalons et la substance à analyser en présence de matériel étalon, pendant le traitement par l'analyse complète pour toutes les méthodes utilisées dans un programme de contrôle réglementaire et pour les conditions typiques de stockage pendant qu'un échantillon attend d'être analysé. La période choisie pour la stabilité pendant le stockage devrait couvrir la période pendant laquelle un échantillon peut être stocké pour toutes les analyses nécessaires, y compris l'utilisation de méthodes de dépistage, quantitatives et confirmatoires. Il est prudent de procéder à une étude de stockage pour une période supérieure à 90 jours au moins au-delà du temps nécessaire pour réaliser toutes les analyses de dépistage, quantitatives et de confirmation et pour obtenir les résultats, au cas où il y aurait un problème ou une demande de nouvelle analyse. Il est également prudent d'évaluer l'effet que le cycle de gel-dégel pourrait avoir sur la stabilité des analytes congelés. Cela permettra de prendre une décision quant à savoir si un échantillon, une fois décongelé pour l'analyse, peut être retourné ou non à l'entrepôt et analysé de nouveau à une date ultérieure, sans changement significatif par rapport au résultat d'analyse précédent.

Autres considérations

42. Idéalement, une méthode d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires doit être élaborée et caractérisée pour l'analyse des quatre principaux tissus généralement classés comme « tissus comestibles », soit le gras, le foie, les reins et les muscles. En outre, le lait, les œufs et le miel sont commercialisés au niveau international, et des méthodes d'analyse peuvent également être nécessaires pour ces matrices. Les préférences alimentaires locales peuvent nécessiter le recours à des méthodes adaptées à d'autres tissus normalement consommés dans un pays ou une région. En outre, la réglementation peut prévoir la nécessité d'analyser l'urine ou d'autres liquides organiques pour dépister les résidus, en particulier si le programme de réglementation comprend l'expérimentation animale en direct. Du point de vue pratique, l'exigence minimale normale est le recours à une méthode d'analyse qui doit être mise au point pour ce qu'on appelle normalement le « tissu cible », soit le tissu d'un animal traité et dans lequel on peut s'attendre à observer les concentrations les plus élevées et les plus persistants du résidu de médicament. Il s'agira normalement du tissu prélevé lors d'un programme national de surveillance des résidus. En outre, il faut analyser le tissu « dans le commerce » lorsque les produits sont expédiés entre les pays. Le tissu est le plus souvent de type musculaire, mais il peut inclure d'autres tissus. Les Directives générales sur la sélection de tissus cibles appropriés et des tissus que l'on peut s'attendre à retrouver « dans le commerce » sont présentées dans le tableau 4 et dans les rapports du Comité mixte d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires. La connaissance du métabolisme et de la répartition/épuisement des résidus dans les tissus sera idéalement acquise pour chaque résidu de médicament avant la sélection finale des tissus à valider.

⁶ Youden, W.J. & Steiner, E.H. 1975. *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. Gaithersburg, USA, AOAC International.

43. La concentration des analytes utilisés pour caractériser une méthode devrait être choisie de manière à couvrir les limites acceptées (LA, voir Glossaire) de tous les analytes devant être recherchés dans tous les produits.

44. Une fois que les paramètres résumés ci-après sont déterminés pour tous les analytes répertoriés dans le champ d'application d'une méthode multi-résidus, la méthode peut alors être considérée comme prête pour une évaluation plus poussée selon un processus de validation qui servira à établir si la méthode est appropriée (c.-à-d. « apte à l'usage ») pour un programme de contrôle réglementaire des médicaments vétérinaires dans la production alimentaire animale.

45. Le tableau 5 fournit des indications supplémentaires sur la pertinence des paramètres ci-dessous et sur la manière de les évaluer.

- (a) Sélectivité
 - (i) Effets de matrice - effets d'interférence directe (taux de faux négatifs), de masque/amélioration, réactivité croisée
- (b) Sensibilité
 - (i) Fourchette d'étalonnage
 - (ii) Fonction d'étalonnage, limite de détermination, limite de dosage, précision, exactitude (biais), MU, récupération
 - (iii) Paramètres de rétention de séparation chromatographique;
 - (iv) Paramètres de réponse de détecteur qualitatif, quantitatif et/ou de confirmation;
- (c) Robustesse
 - (i) Identification des points de contrôle critiques
 - (ii) Identification des points d'arrêt possible
- (d) Études de stabilité
 - (i) Stabilité de l'analyte dans les extraits d'échantillon et les solutions de référence; stabilité de l'analyte lors du traitement et de l'analyse de l'échantillon
 - (ii) Conditions; stabilité de l'analyte durant la congélation et sous l'effet répété de gel-dégel.
- (e) Études de résidus avérés

Expression des résultats

46. À des fins réglementaires, seules des données confirmées seront enregistrées, exprimées telles que définies par la LMR. Les valeurs nulles devraient être consignées comme étant inférieures à la concentration étalonnée la plus faible, plutôt qu'inférieures à la concentration calculée par extrapolation. En général, les résultats sont corrigés en fonction de la récupération. Si les résultats sont donnés corrigés en fonction de la récupération, il faut donner à la fois les valeurs mesurées et les valeurs corrigées. Il faut aussi indiquer la base adoptée pour la correction. Lorsque des résultats positifs obtenus par des déterminations répétées (par exemple sur différentes colonnes de CG, avec différents détecteurs ou sur la base d'ions différents des spectres de masse) d'une seule portion d'essai (sous-échantillon), on consignera la valeur la plus basse obtenue. Lorsque des résultats positifs dérivent de l'analyse de plusieurs portions d'essai, on enregistrera la moyenne arithmétique des valeurs les plus faibles obtenues dans chaque portion d'essai. Prenant en compte, en général, une précision relative de 20-30 pour cent, les résultats devraient être exprimés seulement avec deux chiffres significatifs (par exemple: 0,11, 1,1, 11 et $1,1 \times 10^2$). Étant donné qu'à de plus faibles concentrations, la précision peut diminuer plus rapidement, les valeurs de résidus inférieures à 100 µg/kg devraient être exprimées par un chiffre significatif uniquement.

Tableau 1 Critères de performance qui devraient être respectés en utilisant les méthodes convenant à l'analyse quantitative à l'appui des LMR de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments⁷[Sous réserve d'examen/révision au besoin]

Concentration	Coefficient de variabilité (CV)				Justesse
	Répétabilité (intra-laboratoire, CV _A)	Répétabilité (intra-laboratoire, CV _L)	Reproductibilité (entre laboratoires, CV _A)	Reproductibilité (entre laboratoires, CV _L)	Fourchette de récupération moyenne en %*
(µg/kg)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
≤ 1	35	36	53	54	50–120
1 à 10	30	32	45	46	60–120
10 à 100	20	22	32	34	70–110
100 à 1 000	15	18	23	25	70–110
≥ 1 000	10	14	16	19	70–110

* Si un laboratoire est tenu de présenter des résultats d'analyse corrigés en fonction de la récupération analytique, la précision de la récupération sera plus importante que la récupération absolue. Toutefois, si les résultats d'analyse sont présentés non corrigés en fonction de la récupération analytique, la récupération absolue sera essentielle.

⁷ *Harmonized IUPAC Guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (CAC/GL 37-2001)*; see also Thompson, M., Ellison, S.L.R., Fajgelj, A., Willetts, P. & Wood, R. 1999. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure Applied Chemistry*, 71(2): 337–348.

Tableau 1a : Rapport entre un éventail de classes de fragment de masse et les points d'identification obtenus

Technique MS	Points d'identification gagnés par ion
Spectrométrie de masse à faible résolution	1,0
Ion précurseur LRMS ⁿ	1,0
Ion de produit de transition LRMS ⁿ	1,5
HRMS	2,0
Ion précurseur HRMS ⁿ	2,0
Ion de produit de transition LRMS ⁿ	2,5

Remarques :

- Chaque ion ne peut être compté qu'une seule fois
- La CG-SM obtenue par ionisation des électrons est considérée comme une technique différente de la CG-SM à ionisation chimique.
- Plusieurs analytes peuvent être utilisés pour augmenter le nombre de points d'identification, mais uniquement si les dérivés utilisent des réactions chimiques différentes.
- Les produits de transition comprennent à la fois des ions de produit et de ions de produit de première génération.

Tableau 1b: Exemples du nombre de points d'identification obtenus pour un ensemble de techniques et combinaisons correspondantes (n = nombre entier)

Technique	Source de l'identification	Nombre de points d'identification
CG-SM (EI ou CI)	N	n
CG-SM (EI +CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
CG-SMEI ou CG-SMCI (2 dérivés)	2 (dérivés A) + 2 (dérivés B)	4
CL-SM	N	n
CG-SM/SM	1 ion précurseur + 2 ions produits	4
CL-SM/SM	1 ion précurseur + 2 ions produits	4
CG-SM/SM	2 ions précurseurs, chacun avec 1 ion produit	5
CL-SM/SM	2 ions précurseurs, chacun avec 1 ion produit	5
CL-SM/SM/SM	1 précurseur, 1 ion produit et 2 ions produits de 1 ^{ère} génération	5,5
SGRH	N	2n
CG-SM et CL-SM	2 + 2	4
CG-SM et SGRH	2 + 1	4

Tableau 2 Exigences de performance pour les intensités ioniques relatives (par rapport à l'échantillon de référence) à l'aide de diverses techniques de spectrométrie analytique de masse⁴

Intensité relative des ions (% du pic de référence)	CG-SM (EI) (relative)	CG-SM (CI), CG-SM/SM, CL-SM, CL-SM/SM (relative)
(%)	(%)	(%)
> 50	≤ 10	≤ 20
20–50	≤ 15	≤ 25
10–20	≤ 20	≤ 30
≤10	≤ 50	≤ 50

Tableau 3. Exemples de méthodes de dépistage adaptées à l'analyse confirmatoire des substances, tel que recommandé par la Consultation Miskolc (http://www.iaea.org/programmes/rifa/trc/pest-qa_val_guide.pdf)

Méthode de détection	Critère
CL ou CG et spectrométrie de masse	Si un nombre suffisant de fragments ioniques sont surveillés
CL / DAD	Si le spectre UV est caractéristique
CL/fluorescence	En combinaison avec d'autres techniques
2-D TLC / (spectrophotométrie)	En combinaison avec d'autres techniques
CG/ECD, NPD, FPD	Uniquement en combinaison avec un minimum de deux techniques de séparation ^a
Derivatisation	Si ce n'était pas la méthode préférée
CL/immunogramme	En combinaison avec d'autres techniques
CL / UV / VIS (longueur d'onde unique)	En combinaison avec d'autres techniques

^a Autres systèmes de chromatographie (application des phases stationnaires et/ou des phases mobiles de sélectivité différente) ou autres techniques.

Tableau 4. Conseils pratiques sur le choix des tests de matrice appropriés pour l'examen des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments

Espèce/produits	Tissu cible ou matrice habituellement utilisés pour mettre au point les méthodes	
	Soluble dans l'eau	Liposoluble
Ruminants (bovins, ovins, etc.)*	Foie ou rein, muscles **	Gras, muscle
Non-ruminants (p. ex. porc) *	Foie ou rein, muscles **	Gras, muscle
Volaille (poulet, dinde, etc.)*	Foie, muscle	Gras ou muscle avec adhésion de la peau dans des proportions normales **
Poisson	Muscle avec adhésion de peau dans des proportions normales	Muscle avec adhésion de peau dans des proportions normales
Mollusques/crustacés (crevettes, etc.)	Muscle	Muscle
Lait (généralement du lait de vache)	Lait entier	Lait entier
Miel	Miel	Miel
Œuf	Entier	Entier

* La mise au point de la méthode et la caractérisation des paramètres d'analyse doivent être effectuées pour toutes les principales espèces dont proviennent les échantillons destinés aux tests de routine. Pour les applications à usage limité, il peut être acceptable de démontrer l'applicabilité de la méthode aux nouvelles espèces, si la méthode s'est déjà avérée être applicable à une autre espèce du groupe (par exemple, les ruminants).

** Les résidus de composés solubles dans l'eau sont généralement présents en plus fortes concentrations dans le foie et les reins, le choix des tissus reposant sur les études de répartition fournies par le promoteur du médicament lors de son homologation par une autorité nationale ou régionale. Les composés liposolubles sont généralement présents sous forme de résidus à des concentrations plus élevées en matières grasses, de sorte que dans ce cas les matrices choisies pour les tests sont généralement le gras et les muscles. Toutefois, dans le cas de la volaille et des poissons à nageoire, où les aliments préparés et consommés comprennent souvent à la fois des muscles et de la peau avec des adhésions de gras, la directive pourrait se lire « muscle avec adhésion de peau dans des proportions normales », ce qui correspond aux tissus de muscles, de gras et de peau combinés pouvant être consommés. Ces exigences devraient être clairement établies avec le client (l'acheteur ou l'utilisateur des résultats) avant d'entreprendre la mise au point des méthodes. Les autorités nationales ou régionales peuvent exiger que la méthode s'applique à d'autres matrices.

Tableau 5. Résumé des paramètres et des critères d'adaptation et de validation d'un seul analyte, d'un groupe précis ou de plusieurs résidus
Procédures d'analyse des résidus de médicaments vétérinaires, tel que préparées par la consultation Miskolc. (http://www.iaea.org/trc/pest-qa_val_annex2.pdf)

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
Dans la performance de laboratoire de la méthode optimisée						
1.1 Stabilité de l'analyte durant le stockage de l'échantillon	À proximité de la limite acceptée (LA)	Analyser des échantillons représentatifs (temps 0) et des échantillons stockés selon les procédés normaux du laboratoire (par exemple à $\leq -18^{\circ}\text{C}$). La durée du stockage devrait être à l'intervalle le plus long prévu entre le prélèvement et l'élimination de l'échantillon. Répéter à -70°C si la stabilité de l'analyte ne respecte pas les critères à $\leq -18^{\circ}\text{C}$. ≥ 5 répétitions à chaque point temporel.	Aucune perte significative de l'analyte durant le stockage ($P = 0,05$)	Aucune perte significative de l'analyte durant le stockage ($P = 0,05$)	Pas de faux négatifs à la fin de la période de stockage.	La stabilité de stockage doit être évaluée en utilisant des tissus d'origine, le cas échéant. Sinon, préparer des matériaux d'analyse dopés provenant de différents pools de tissu à blanc afin de prendre en compte variabilité prévue des échantillons dont la méthode doit être appliquée. Stockage validé pour l'utilisation avec tout procédé ultérieur. La validation peut être spécifique à l'analyte. Toutefois, les données sur la stabilité de stockage obtenues avec des matrices d'échantillon représentatives peuvent généralement être considérées comme valables pour des matrices semblables. Les matrices sont choisies en tenant compte de la stabilité chimique de l'analyte. De l'information utile peut être obtenue sur la stabilité pendant le stockage à partir des évaluations du JECFA ou de dossiers soumis pour l'homologation.
1.2 Stabilité de l'analyte durant le traitement de l'échantillon	À proximité de la LA	Traiter les matrices de tissu représentatif avec une quantité connue d'analyte(s). Analyser ≥ 5 répliques de chaque produit représentatif, en post-traitement,	Aucune perte significative de l'analyte au cours du traitement ($P = 0,05$)	Aucune perte significative de l'analyte au cours du traitement ($P = 0,05$).	Pas de faux négatifs à la LA après le traitement.	Des facteurs tels que l'exposition à la lumière, la température de l'échantillon durant le traitement et l'intensité du traitement des échantillons (p. ex. durée d'homogénéisation) peuvent jouer un rôle déterminant. Traitement validé pour être utilisé (...) procédé ultérieur. La validation peut être spécifique à l'analyte et/ou à la matrice de l'échantillon. Pour tester la stabilité, déterminer le taux de récupération moyen et le CV des composés marqueurs. Utiliser ces composés pour les analyses d'AQ internes (voir section 5). Le CV de chaque composé indiquera la répétabilité des traitements intra-laboratoire également.

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
1.3 Stabilité de l'analyte dans les extraits et les solutions de substances étalons.	À la LA, avec des résidus facilement détectables	≥ 5 répliques à chaque point approprié dans le temps (y compris zéro) et pour chaque analyte/produit représentatif. Enrichir les extraits de l'échantillon à blanc pour tester la stabilité des résidus. Comparer la concentration de l'analyte dans des solutions étalons stockées/récemment préparées.	À la fin de la période de stockage, les résidus récupérés doivent se situer dans la fourchette spécifiée au tableau 1. Aucun changement significatif dans la concentration de l'analyte dans les produits étalons stockés à analyser (P = 0,05)	À la fin de la période de stockage, les résidus récupérés doivent se situer dans la fourchette spécifiée au tableau 1. Aucun changement significatif dans la concentration de l'analyte dans les produits étalons stockés à analyser (P = 0,05)	À la fin de la période de stockage, tous les résidus récupérés sont détectables à la LA.	Il faudra procéder à un essai de stabilité des extraits si le matériau semi-traité sera probablement stocké plus longtemps que pour déterminer la précision, ou si l'on obtient de faibles taux de récupération durant l'optimisation de la méthode. Le temps de stockage devrait comprendre la période la plus longue qui sera probablement nécessaire pour terminer l'analyse, y compris pour obtenir une confirmation ultérieure en utilisant l'extrait.
1.4 Efficacité de l'extraction	À proximité de la LA	Analyser ≥ 5 portions identiques d'échantillons ou de matériau de référence contenant des résidus d'origine. Comparer le procédé de référence (ou différent) avec celui faisant l'objet de l'essai.	Pour les échantillons contenant des résidus d'origine, le résultat moyen obtenu avec le procédé de référence et le procédé à l'essai ne devrait pas différer sensiblement de la concentration P = 0,05 en appliquant CV _L dans le calcul. Ou, la valeur convenue du matériau de référence et la moyenne des résidus ne devraient pas différer sensiblement à une concentration de P = 0,05, lorsqu'elles sont calculées avec la CV _A de la méthode testées. Lorsque le CV _A de la méthode dépasse 10 %, il faudrait augmenter le nombre d'analyses répétées pour maintenir l'écart-type relatif de la moyenne < 5 %. Sinon, quantifier et consigner l'efficacité de l'extraction (non compris la récupération de la phase analytique après l'extraction).	Pour les échantillons, le résultat moyen obtenu avec le procédé de référence et le procédé à l'essai ne devrait pas différer sensiblement au niveau de concentration P=0,01 en appliquant le CV _L dans le calcul. Ou, la valeur convenue du matériau de référence et la moyenne des résidus ne devraient pas différer sensiblement à une concentration de P=0,01 lorsqu'elles sont calculées avec le CV _A de la méthode testée. Sinon, quantifier et consigner l'efficacité de l'extraction (la récupération moyenne de l'extrait n'incluant pas la récupération de la phase analytique).	Pas de faux négatifs à la LA	Certains résidus peuvent être conjugués ou liés d'une autre manière à la matrice de tissu, auquel cas un traitement préalable (par exemple au glucuronidase) peut être nécessaire pour libérer ces résidus et ainsi améliorer le taux de récupération de l'analyte. La température de l'extrait, la vitesse et la durée du mélange ou de l'homogénéisation, le temps et le volume d'extraction ainsi que le rapport de solvant d'extraction peuvent influencer considérablement l'efficacité de l'extraction. L'effet de ces paramètres peut être vérifié au moyen d'un test de robustesse. Les conditions optimisées devraient être maintenues constante autant que possible et peuvent être généralement applicables aux matrices et aux analytes présentant des propriétés physiques et chimiques similaires.

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
1.5 Sélectivité de la séparation	À proximité de la LA	Déterminer les valeurs de (tRR) pour tous les analytes à tester par la méthode (pas seulement les composés de référence). Lorsqu'on utilise des techniques chromatographiques sans détection spectrométrique, il faut appliquer différents principes de séparation et/ou déterminer les tRR sur des colonnes à polarité différente. Déterminer et consigner la résolution (RS) et les facteurs de traîne (Tf) des pics critiques.	Le pic maximal le plus proche devrait être séparé du pic désigné de l'analyte par au moins une largeur entière à 10 % de la hauteur du pic; sinon, une détection plus sélective de tous les analytes est nécessaire.	Les pics devraient être résolus d'après le point de référence ou devraient suffisamment séparés pour permettre une quantification précise. Le pic maximal le plus proche devrait être séparé du pic désigné de l'analyte par au moins une largeur entière à 10 % de la hauteur du pic; sinon, une détection plus sélective de tous les analytes sera nécessaire.	Pour les méthodes chromatographiques, les pics doivent être suffisamment résolus pour permettre l'identification provisoire de tous les analytes testés à la LA. D'autres types de méthodes de dépistage, tels que ELISA, devraient détecter les analytes à la LA.	Utiliser les renseignements obtenus à l'issue de ces expériences pour établir les critères d'aptitude de l'analyse. La vérification de la conformité du système consiste à injecter les substances à analyser afin de démontrer le rendement adéquat du système de chromatographie (résolution maximale tel que spécifié dans la méthode ou exigé par le client).
1.6 Spécificité et sélectivité de la détection de l'analyte	À proximité de la LA	Identifier par spectrométrie de masse, ou en combinant de façon appropriée les techniques de séparation et de détection disponibles. Analyser ≥ 5 échantillons à blanc représentatifs de chaque groupe de produits provenant de sources différentes. Consigner l'équivalent de l'analyte dans la réponse du blanc. Déterminer et consigner la sélectivité (δ) du détecteur et les facteurs de réponse relatifs (fRR) des analytes représentatifs avec les détecteurs spécifiques utilisés.	L'analyte peut être identifié et, si nécessaire, quantifié selon la méthode de spectrométrie de masse ou une autre technique appropriée. Analyser ≥ 5 échantillons à blanc représentatifs de chaque groupe de produits provenant de sources différentes. Consigner l'équivalent de l'analyte dans la réponse du blanc. Déterminer et consigner la sélectivité (δ) du détecteur et les facteurs de réponse relatifs (fRR) des analytes représentatifs avec les détecteurs spécifiques utilisés.	Le pic de l'analyte suffisamment résolu à partir d'autres pics dans le chromatogramme pour la détermination quantitative. Une preuve d'absence de co-élution des composés devrait être fournie.	Faux négatifs (erreur- β) $\leq 5\%$; faux positifs (erreur- α) $\leq 10\%$. (voir CAC/GL 40-1993, rév. 1-2003)	S'applique uniquement à une combinaison particulière de techniques de séparation et de détection. Au lieu d'échantillons non traités, on pourra utiliser des échantillons qui ont été soumis à des traitements que l'on connaît. La maturité des matrices de l'échantillon peut influencer dans une large mesure la réponse de l'échantillon à blanc. Il faudra contrôler régulièrement les valeurs du blanc durant la vérification des performances. Consigner les pics typiques présents dans les extraits d'échantillons à blanc. La CEPF devrait de préférence être $\leq 0,5$ LA. Modifier les conditions de chromatographie si la réaction des blancs contredit l'analyte. Les valeurs cibles des taux de faux positifs et de faux négatifs, lors des tests de dépistage, sont basées sur le document CAC/GL 71-2009.

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
1.7 Fonction d'étalonnage Effet de la matrice	À proximité de la LA	Tester les fonctions de réponse de tous les analytes inclus dans la méthode à au moins deux reprises avec ≥ 2 répliques à des concentrations d'analyte ≥ 3 plus le blanc.	Pour l'étalonnage linéaire : coefficient de régression pour des solutions de substances étalons à analyser ($r \geq 0,99$. SD des résidus (Sy/x) $\leq 0,1$	Pour l'étalonnage linéaire : coefficient de régression ($r \geq 0,99$. SD des résidus (Sy / x) $\leq 0,1$	Non applicable	Établir les paramètres d'étalonnage lors de l'optimisation de la procédure et de la détermination de la précision ou de la capacité de détection. Préparer les solutions d'étalonnage pour différentes concentrations de manière indépendante. Pour effectuer l'étalonnage MRM avec des mélanges de substances à analyser ("mélange de référence") facilement séparables par le système chromatographique, afin de tenir compte de l'« effet de composés multiples ».
1.8 Fourchette d'analyse, Exactitude et précision, limite de détection (LD), limite de quantification (LQ)	À proximité de la LA	Analyser ≥ 5 échantillons à blanc et des portions d'analyte dopées au LCL, plus ≥ 3 portions d'analyte dopées chacune avec $\geq 0,5$, 1 et 2 fois la LA. Lorsque c'est possible, les essais de détermination de la performance de la méthode doivent être répartis entre les analystes; on doit alors décider qui appliquera la méthode et les instruments qui seront utilisés dans l'analyse.	La méthode doit confirmer de manière déterminante la présence de l'analyte à la LA et, lorsqu'elle est utilisée pour une détermination quantitative, doit répondre aux critères de performance du tableau 1. La LQ doit être adaptée à l'usage.	La méthode doit répondre aux critères de performance du tableau 1.	Faux négatifs (erreur β) $\leq 5\%$; faux positifs (erreur α) $\leq 10\%$. (Voir CAC/GL 40-1993, rév. 1-2003).	Les analystes doivent démontrer que la méthode convient pour déterminer la présence de l'analyte à la LA visée et avec les erreurs maximales spécifiées. L'intervalle de confiance autour de la moyenne calculée dépend du nombre de points de données utilisés pour le calcul. La limite de décision et la capacité de détection pour une combinaison d'analytes/matrices spécifiés peuvent être déterminés en analysant ≥ 5 des échantillons blancs et des portions d'analyte dopées à la LA et à 0,5 et 2 fois la CL, ou en appliquant la norme ISO 11843. Les estimations de justesse, de précision et de récupération de la méthode doivent être accessibles aux utilisateurs des données générées avec la méthode.
2. Extension de la méthode à de nouveaux analytes et à de nouvelles matrices ayant des propriétés similaires à celles des analytes et des matrices représentatifs						
2.1 Stabilité de l'analyte durant le stockage et le traitement de l'échantillon, et dans des extraits et des solutions de référence	Voir 1.1, 1.2, et 1.3	Voir 1.1, 1.2, 1.3	Voir 1.1, 1.2, 1.3	Voir 1.1, 1.2, 1.3	Voir 1.1, 1.2, 1.3	Voir 1.1, 1.2, 1.3
2.2 Efficacité de l'extraction	À proximité de la LA	Voir 1.4	Voir 1.4	Voir 1.4	Voir 1.4	Voir 1.4
2.3 Sélectivité de la séparation	À proximité de la LA	Voir 1.5	Voir 1.5	Voir 1.5	Voir 1.5	Voir 1.5

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
2.4 Spécificité et sélectivité de la détection de l'analyte	À proximité de la LA	Vérifier la réponse des ≥ 3 différents échantillons à blanc (si disponibles).	Voir 1.6.	Voir 1.6.	Voir 1.6	Certaines autorités recommandent d'utiliser au moins 6 blancs représentatifs pour chaque nouvelle matrice. Si la sélectivité de la détection ne permet pas d'éliminer la réponse de la matrice, utiliser une combinaison appropriée de colonnes de chromatographie qui permet de séparer les analytes des pics de la matrice. Consigner les pics typiques présents dans les extraits de blancs. Voir 1.6
2.5 Fonction de calibrage, effet de la matrice	À proximité de la LA	Voir 1.7	Voir 1.7	Voir 1.7	Voir 1.7	Voir 1.7
2.6 Fourchette d'analyse, exactitude, précision, limite de détection (LD), limite de quantification (LQ)	À proximité de la LA	Doper des portions d'analyte blanc avec les analytes représentatifs pertinents à 3 concentrations et en double exemplaire. Voir 1.8	La méthode doit confirmer de manière déterminante la présence de l'analyte à la LA et, lorsqu'elle est utilisée pour une détermination quantitative, doit répondre aux critères de performance du tableau 1. Voir 1.8	Conforme aux spécifications de performance du tableau 1. Voir 1.8	Les analytes ajoutés à des échantillons blancs à la LA doivent être détectables dans tous les tests. Voir 1.8	Analyte représentatif pertinent : Analyte qui peut être présent dans un échantillon donné. Voir 1.8
2.7 Homogénéité de l'analyte	Voir 1.3.	Voir 1.3.	Voir 1.3.	Voir 1.3.	Voir 1.3.	La variabilité biologique peut entraîner des différences dans l'homogénéité de l'analyte, par exemple avec le foie de différentes espèces.
2.8 Effet de la matrice	À proximité de la LA	Tester l'effet de matrice en utilisant des blancs en combinaison avec 3.4.	La méthode doit confirmer de manière déterminante la présence de l'analyte à la LA et, lorsqu'elle est utilisée pour une détermination quantitative, doit répondre aux critères de performance du tableau 1.	Conforme aux spécifications de performance du tableau 1. Aucun effet de matrice observé.	Les analytes ajoutés à des échantillons blancs à la LA doivent être détectables dans tous les tests.	Si les critères de performance de la méthode ne sont pas réunis en raison des effets de la matrice, la méthode doit être révisée avant d'être appliquée à la nouvelle matrice.
3. Adaptation de la méthode dans un autre laboratoire						
3.1 Pureté et adéquation des produits chimiques, réactifs et ad(ab)sorbants		Tester un blanc de réactif et l'applicabilité des ad(ab)sorbants et réactifs. Produire des dérivés avec et sans échantillon.	Aucune réponse d'interférence.	Aucune réponse d'interférence.	Vérifier que le test de dépistage respecte les spécifications du fabricant.	

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
3.2 « Homogénéité » de l'analyte						Aucun test nécessaire, sauf si les procédés de contrôle de la qualité révèlent de l'hétérogénéité lors de l'application de méthode.
3.3 Sélectivité de la séparation	À proximité de la LA	Vérifier la conformité du système.	Séparations spécifiées obtenues.	Séparation spécifiée obtenue.	Les analytes ajoutés à des échantillons blancs à la LA doivent être détectables dans tous les tests.	Les échantillons servant à tester l'adéquation sont généralement préparés en dissolvant l'analyte(s) dans le solvant utilisé dans l'extrait final de la méthode. Les analytes sont injectés avant le traitement des échantillons pour s'assurer que la séparation chromatographique est obtenue conformément aux exigences de la méthode.
3.4 Fonction d'étalonnage, effet de la matrice	À proximité de la LA	Test des fonctions de réponse des analytes représentatifs inclus dans la méthode lors d'un minimum de 2 reprises avec ≥ 3 niveaux d'analyte plus un blanc, en réplique à chaque instance. Vérifier l'effet de matrice à l'aide d'analytes et de matrices représentatifs.	La méthode doit confirmer de manière déterminante la présence de l'analyte à la LA et, lorsqu'elle est utilisée pour une détermination quantitative, doit répondre aux critères de performance du tableau 1. Aucun effet de matrice observé.	Satisfait aux exigences du tableau 1. Aucun effet de matrice observé.	Les analytes ajoutés à des échantillons blancs à la LA devraient être détectables dans tous les tests.	Les paramètres d'étalonnage peuvent être établis lors de l'optimisation de la procédure, de la la détermination de la précision ou de la capacité de détection. Préparer les solutions d'étalonnage indépendamment de la solution de base. Pour effectuer le calibrage MRM avec des mélanges d'analyte ("mélange de référence"), qui peuvent être correctement séparés au moyen du système de chromatographie afin de tenir compte de l'« effet de multiples composés ». Utiliser les références d'analyse jumelée, si l'effet de matrice est important.
3.5 Spécificité de détection de l'analyte	À proximité de la LA	Vérifier les caractéristiques de performance des détecteurs utilisés et les comparer avec celles spécifiées dans la méthode. Vérifier la réponse d'un blanc de chaque produit représentatif, ou effectuer l'essai selon la description à la section 1.6.	La réponse mesurée est due uniquement à l'analyte. Les performances du détecteur (sensibilité et sélectivité) doivent être égales ou supérieures à celles spécifiées dans la méthode.	Faux négatifs (erreur β) $\leq 5\%$; faux positifs (erreur α) $\leq 10\%$ (voir CAC/GL 40-1993, rév. 1-2003).	La réponse relative des détecteurs spécifiques sensiblement peut varier d'un modèle à l'autre. Une vérification correcte de la spécificité de la détection est essentielle pour obtenir des résultats fiables. Comparer la réponse du blanc observée avec les pics typiques signalés dans les extraits en blanc. Voir d'autres observations à la section 1.6.	
3.6 Fourchette analytique, justesse, précision, la limite de décision, capacité de	À proximité de la LA	Voir 1.8	Voir 1.8	Voir 1.8	S'assurer que les caractéristiques de performance originales de la méthode sont atteintes ou dépassées, ou consigner la performance obtenue. Si la méthode est adaptée aux besoins, établir des critères de	Voir les commentaires au point 1.8.

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
détection					CQ basés sur la performance intra-laboratoire obtenue lors de la validation.	
3.7 Stabilité de l'analyte dans les extraits et les solutions de référence.		Aucun test, à moins que des problèmes se posent lors de l'évaluation de la performance.				Voir 1.9 Si des problèmes surviennent.
4. Contrôle de la qualité (validation de la performance)						
4.1 Méthodes utilisées régulièrement						
4.1.1 Adéquation des produits chimiques, adsorbants et réactifs		Pour chaque nouveau lot : tester des échantillons blancs de réactif et l'applicabilité des ad(ab)sorbants et des réactifs. Effectuer une dérivation sans échantillon.	Aucune réponse d'interférence \geq LCL.	Aucune réponse d'interférence \geq LCL.	Aucune réponse d'interférence à la concentration minimale spécifiée.	
4.1.2 Stabilité de l'analyte au cours du traitement et de l'analyse des échantillons	À proximité de la LA	Doper la matrice échantillon blanc d'origine connue avec les composés d'analyse appropriés (voir 1.2) et les analyser de pair avec d'autres échantillons du lot à analyser.	Si la méthode sert à faire une quantification, les récupérations de composés testés doivent se situer dans les limites du diagramme de contrôle; sinon, l'analyte doit être confirmé à la concentration la plus basse spécifiée.	Les récupérations de composés testés doivent se situer dans les limites spécifiées (généralement 2σ) du diagramme de contrôle.	L'analyte ajouté à la concentration la plus basse spécifiée reste décelable après le stockage.	Tester la stabilité pendant la période où les changements saisonniers peuvent entraîner des fluctuations dans l'environnement de laboratoire (température, humidité relative, etc.)
4.1.3 Homogénéité de l'analyte dans l'échantillon traité	À proximité de la LA	Choisir au hasard un échantillon positif. Répéter l'analyse d'une ou deux autres portions à analyser.	Les répliques doivent se situer dans la limite de reproductibilité du tableau 1, si la méthode comprend la quantification. Pour la confirmation uniquement, les résultats devraient confirmer à l'intérieur des critères de la méthode (p. ex. ratios d'ions).	Les répliques doivent se situer dans la limite de reproductibilité du tableau 1.	Tous les résultats doivent être positifs au niveau ou au-dessus des exigences minimales de détection spécifiées.	Effectuer les essais alternativement de manière à couvrir chaque produit analysé. Tester l'homogénéité au début de la période de croissance ou au début de l'analyse du type donné d'échantillons. Les résultats acceptables de l'essai confirmeront également que la reproductibilité des analyses (CV_A) était appropriée.
4.1.4 Efficacité de l'extraction						L'efficacité de l'extraction ne peut être contrôlée durant l'analyse. Pour garantir une efficacité appropriée, la procédure d'extraction validée devrait être effectuée sans aucun changement.

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
4.1.5 Sélectivité de la séparation, performance des détecteurs	À proximité de la LA	Inclure un mélange d'essai de détection approprié (adéquation du système) dans chaque lot de chromatographie.	Adéquation du système démontrée.	Adéquation du système démontrée.	Non applicable à la plupart des tests de dépistage (kits de test).	Préparer un mélange pour l'essai de détection pour chaque méthode de détection. Sélectionner les éléments du mélange afin d'indiquer les paramètres caractéristiques de la séparation chromatographique et de la détection. Adapter la base de données sur la rétention relative pour les composés du mélange d'essai de détection et les analytes utilisés pour l'étalonnage, au besoin.
4.1.6 Spécificité de la détection de l'analyte	À proximité de la LA	Inclure une matrice en blanc dans le lot d'analytes. Ajouter des substances étalons si on dispose d'un échantillon non traité (semblable à celles utilisées dans le lot). Confirmer l'identité et la quantité de chaque analyte présent à la LA.	Il ne doit pas y avoir de co-extraits d'échantillon causant une interférence avec l'analyte.	Il ne doit pas y avoir de co-extraits d'échantillon causant une interférence avec l'analyte.	Faux négatifs (β -erreur) $\leq 5\%$; faux positifs (α -erreur) $\leq 10\%$. (Voir CAC/GL 40-1993, rév. 1-2003).	Inclure un mélange d'essai de détection approprié dans chaque lot de chromatographie (conformité du système). Procéder à une confirmation quantitative avec des substances étalons préparées dans un extrait de matrice en blanc si l'effet de la matrice est important.
4.1.7 Fourchette d'étalonnage et d'analyse	À proximité de la LA	Généralement préparé à un minimum de 0,5, 1 et 2 fois la LA de chaque série d'analyses.	Les ratios d'ions des pics utilisés pour la confirmation spectrale de masse doivent se situer dans les limites spécifiées de la méthode. Habituellement $r = 0,98$ ou plus pour chaque courbe d'étalonnage utilisée dans la quantification.	Habituellement $r = 0,98$ ou plus pour chaque courbe d'étalonnage.	Habituellement pas applicable. inclure des normes appropriées pour vérifier la performance du test à la concentration minimale spécifiée.	
4.1.8 Exactitude et précision	À l'intérieur de la fourchette d'analyse	Inclure dans chaque lot à analyser ≥ 1 échantillon blanc qui soit : enrichi avec un mélange de substances étalons, une portion réplique d'échantillon positif, ou effectuer une nouvelle analyse d'une portion réplique d'un échantillon positif. Les matériaux d'étalonnage certifiés peuvent aussi être utilisés.	La performance du détecteur et la colonne de chromatographie seront égales ou supérieures à celles spécifiées dans la méthode. Dans le cas des méthodes quantitatives, il est préférable que tous les taux de récupération restent dans la limite d'avertissement du diagramme de contrôle établi à l'aide de CVA spécifiques ou typiques d'analytes. Pour un essai long, un sur 20 ou 100 échantillons peut dépasser les limites spécifiées. Le lot à analyser devrait être répété si un des taux de récupération s'inscrit en dehors des	La performance du détecteur et la colonne de chromatographie seront égales ou supérieures à celles spécifiées dans la méthode. Dans le cas des méthodes quantitatives, il est préférable que tous les taux de récupération restent dans la limite d'avertissement du diagramme de contrôle établi à l'aide de CVA spécifiques ou typiques d'analytes. Pour un essai	Habituellement non applicable. Appliquer les critères des faux positifs et des faux négatifs.	Doper la portion à analyser avec un ou plusieurs mélanges de référence à l'intérieur de la fourchette d'analyse ciblée, en particulier à des concentrations voisine de la LA à détecter.

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
			limites d'action, ou si les résultats des analyses répétées de l'échantillon positif dépassent la gamme critique.	long, un sur 20 ou 100 échantillons peut dépasser les limites spécifiées. Le lot à analyser devrait être répété si un des taux de récupération s'inscrit en dehors des limites d'action, ou si les résultats des analyses répétées de l'échantillon positif dépassent la gamme critique.		
4.1.9 Durée de l'analyse			Les échantillons, extraits, etc. ne doivent pas être stockés pendant un laps de temps dépassant la période pour laquelle la stabilité au stockage a été testée durant la validation de la méthode. Les conditions de stockage doivent être régulièrement contrôlées et consignées.			
4.2 Analyte détecté occasionnellement						
Effectuer les essais décrits en 4.1, avec les exceptions ci-après :						
4.2.1 Exactitude et précision	À proximité de la LA	Analyser une autre portion d'essai; ou ajouter des substances étalons à la concentration de l'analyte mesurée.	Les répliques d'analyse devraient cadrer avec les critères de confirmation de la méthode. Dans le cas de tests quantitatifs, les répliques doivent cadrer avec les spécifications du tableau 1.	Les répliques doivent cadrer avec les spécifications du tableau 1.	Les répliques doivent concorder.	Vérifier l'exactitude si des résidus sont à $\geq 0,5$ de la LA.
4.3 Méthodes utilisées à intervalles irréguliers						
Effectuer les essais décrits en 4.1 avec les exceptions ci-après :						
4.3.1 Exactitude et précision (répétabilité)	À proximité de la LA	Inclure des échantillons enrichis à 0,5, 1 et 2 fois la LA dans chaque lot à analyser. Ajouter des substances étalons si on ne dispose pas d'échantillon	Les répliques d'analyse devraient cadrer avec les critères de confirmation de la méthode. Dans le cas de tests quantitatifs, les répliques doivent cadrer avec les	Les répliques doivent cadrer avec les spécifications du tableau 1.	Les répliques doivent concorder.	Les résultats acceptables démontrent également l'adéquation des substances chimiques, adsorbants et réactifs utilisés. Si les critères de performance ne sont pas observés, la méthode devra être mise en pratique et ses caractéristiques de performance devront être rétablies

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
		non traité (semblable à celles utilisées dans le lot). Procéder à l'analyse avec \geq 2 portions à analyser.	spécifications du tableau 1.			durant la nouvelle validation partielle de la méthode.
4.4 Changements dans l'application de la méthode						
Changement	Paramètres à tester		Pour les méthodes d'essai et les critères d'acceptabilité, voir les sections appropriées de l'Annexe 1.			
4.4.1 Réactif/nouveaux matériaux : différent fournisseur ou différente qualité	Tester la valeur du blanc et effectuer une derivatisation sans échantillon. Vérifier les récupérations dans deux répliques à 0,5, 1 et 2 fois la LA.					Les caractéristiques de performance de la méthode ne devraient pas être modifiées. Modifier le protocole de la méthode de manière à inclure un changement acceptable au niveau de la qualité spécifiée ou du fournisseur.
4.4.2 Colonne de chromatographie	Tester la sélectivité de la séparation, de la résolution, de l'inertie et des valeurs tRR (adéquation du système).					Les caractéristiques de performance ne devraient pas être modifiées de manière significative. Il peut s'avérer nécessaire d'ajuster ou de modifier les conditions chromatographiques et de noter les changements ainsi apportés. Modifier le protocole de la méthode de manière à inclure un changement acceptable au niveau de la qualité spécifiée ou du fournisseur.
4.4.3 Équipement de traitement des échantillons	Homogénéité des échantillons traités; stabilité des analytes					Les caractéristiques de performance ne devraient pas être modifiées. Modifier le protocole de la méthode de manière à inclure un changement acceptable au niveau du produit ou du fournisseur.
4.4.4 Équipement d'extraction	Comparer les résultats à l'aide des échantillons d'origine ou de substituts acceptables (blancs de matrice enrichis si ceux-ci ont déjà démontré qu'ils reflétaient l'extraction d'échantillons d'origine) détectés après extraction avec l'ancien et le nouvel équipement dans \geq 5 répliques.		La moyenne des résidus ne devrait pas être très différente à la concentration $p=0,05$.	Les caractéristiques de performance ne devraient pas être modifiées. Modifier le protocole de la méthode de manière à inclure un changement acceptable au niveau du produit ou du fournisseur.		
4.4.5 Détection	Tester la sélectivité de la séparation et la sélectivité et la sensibilité de la détection.					Tester aussi la détectabilité séparément avec de nouveaux réactifs de détection. Les caractéristiques de performance de la méthode ne devraient pas être changées. Modifier le protocole de la méthode afin d'inclure un changement

Paramètre	Concentration (s)	Nbre d'analyses ou type de test requis	Critères			Observations
			Méthode Codex de niveau I (confirmatoire/quantitative)	Méthode Codex de niveau II (quantitative)	Méthode Codex de niveau III (Dépistage - qualitative ou semi-quantitative)	
						acceptable au niveau du produit ou du fournisseur.
4.4.6 Analyste	≥ 5 essais de récupération pour chaque concentration (CEPF, LA et 2 (3) fois la LA), nouvelle analyse d'un échantillon à blanc et de deux échantillons positifs (non connus de l'analyste).		Tous les résultats devraient être compris dans les limites d'avertissement fixées pour la méthode dans le laboratoire. L'analyse des échantillons répliques sera faite dans la fourchette critique.	Consigner le niveau de familiarisation de l'analyste à la méthode (p. ex. l'analyste est « prêt à mener » des tests sur des échantillons). Il s'agit d'une prescription minimale. Certains laboratoires utilisent un protocole plus détaillé qui comprend: (1) production d'une courbe type dans les critères d'acceptabilité; (2) au minimum 2 analyses pour chaque matrice contenant des analytes représentatifs enrichis par l'analyste à un minimum de 3 concentrations dans la réplique; (3) au minimum une analyse avec des échantillons enrichis ou avec des résidus d'origine, 3 concentrations dans la réplique non connus de l'analyste. Tous les résultats doivent répondre aux critères d'acceptabilité ou être répétés.		
4.4.7 Laboratoire	Justesse et précision de ≥ 3 essais de récupération à chaque concentration, soit 0,5, 1 et 2 fois la LA, par différents analystes et des jours différents.		Tous les résultats devraient être compris dans les limites d'avertissement fixées pour la méthode au laboratoire.			

GLOSSAIRE DE TERMES

Limite acceptée (LA)	Valeur de concentration pour un analyte correspondant à une limite réglementaire ou à une valeur de référence qui constitue l'objet de l'analyse, par exemple LMR, LMP; norme commerciale, limite de concentration visée (évaluation de l'exposition d'origine alimentaire), niveau d'acceptation (environnement), etc. Pour une substance sans LMR ou pour une substance interdite, il peut ne pas y avoir de LA (en réalité, elle peut être de zéro ou elle peut faire défaut) ou il peut s'agir de la concentration visée au-dessus de laquelle les résidus détectés devraient être confirmés (limite d'action ou limite administrative)
Exactitude	Étroitesse de l'accord entre un résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.
Erreur alpha (α)	Probabilité que la concentration de l'analyte dans l'échantillon de laboratoire est inférieure à une valeur particulière (par exemple la LA) lorsque les mesures effectuées sur une ou plusieurs portions à analyser/d'essai indiquent que la concentration dépasse cette valeur (faux positif). Les valeurs acceptées pour cette probabilité sont généralement de l'ordre de 1 à 5%.
Analyte	Substance chimique recherchée ou déterminée dans un échantillon.
Homogénéité de l'analyte (dans l'échantillon)	Uniformité de la dispersion de l'analyte dans la matrice. La variabilité dans les résultats d'analyse due à la transformation de l'échantillon est fonction de la dimension de la portion à analyser. La constante d'échantillonnage décrit le rapport entre la dimension de la portion à analyser et la variation prévue dans un échantillon d'analyse bien mélangé : $K_S = w (CV_{Sp})^2$, où w est la masse de la portion à analyser et CV_{Sp} est le coefficient de variation de la concentration de l'analyte dans des portions à analyser répétées de w (g) qui sont prélevées sur l'échantillon analytique.
Portion à analyser	Quantité représentative d'un matériau prélevée sur l'échantillon à analyser et dont la taille convient pour la mesure de la concentration de résidu.
Échantillon à analyser	Matériau préparé pour l'analyse à partir de l'échantillon de laboratoire, par séparation de la portion du produit à analyser, puis par mélange, broyage, hachage, etc. dans le but de prélever des portions à analyser avec une erreur d'échantillonnage minimale.
Applicabilité	Les analytes, matrices et concentrations pour lesquelles il a été démontré qu'une méthode d'analyse est satisfaisante.
Erreur beta (β)	Probabilité que la concentration effective de l'analyte dans l'échantillon de laboratoire est supérieure à une valeur particulière (par exemple la LA) lorsque des mesures prises sur une ou plusieurs portions à analyser indiquent que la concentration ne dépasse pas cette valeur (faux négatif). Les valeurs acceptées pour cette probabilité sont généralement de l'ordre de 1 à 5 %.
Biais	Différence entre la valeur moyenne mesurée pour un analyte et une valeur de référence acceptée pour l'échantillon. Le biais est l'erreur systématique totale par opposition à l'erreur aléatoire. Il peut y avoir un ou plusieurs éléments d'erreur systématiques contribuant au biais. Une différence systématique importante par rapport à la valeur de référence acceptée se traduit par une valeur de biais plus élevée.
Groupe de produits	Groupe de produits destinés à la consommation humaine ou animale ayant en commun des caractéristiques chimiques suffisantes qui les rendent similaires aux fins d'analyse par une méthode. Les caractéristiques peuvent être fondées sur des constituants importants (par exemple, teneur en eau, graisse, sucre et acide) ou sur des rapports biologiques, et peuvent être définies par des règlements.
Méthode de confirmation	Méthode qui fournit des informations complètes ou complémentaires permettant d'identifier l'analyte avec un degré acceptable de certitude [à la limite acceptée ou niveau qui intéresse l'analyste]. Autant que possible, les méthodes de confirmation fournissent des informations sur les propriétés chimiques de l'analyte, de préférence à l'aide de techniques de spectrométrie. Si une technique particulière ne présente pas une spécificité suffisante, on peut recourir à des procédés supplémentaires, par exemple en combinant de manière appropriée purification, séparation chromatographique et détection sélective. Les titrages biologiques peuvent aussi fournir quelques données de confirmation. Outre l'identité de l'analyte, il faudra aussi confirmer sa concentration, par exemple par l'analyse d'une deuxième prise d'essai et/ou d'une nouvelle analyse de la prise d'essai initiale à l'aide d'une autre méthode appropriée (par exemple colonne ou détecteur différents). La confirmation qualitative et quantitative peut aussi être effectuée à l'aide de la même méthode, le cas échéant.

Limite de décision (CCα)	Limite à laquelle il peut être décidé que la concentration de l'analyte présent dans un échantillon dépasse réellement cette limite avec une probabilité d'erreur d'un (faux positif). Dans le cas de substances à zéro AL, la limite de décision est la plus faible concentration, au cours de laquelle une méthode peut distinguer avec une probabilité statistique de $1-\alpha$ si l'analyte identifié est présent. La limite de décision équivaut à la limite de détection (LOD) en vertu de certaines définitions (généralement pour $\alpha = 1\%$). Dans le cas des substances avec une place AL, la limite de décision est la concentration mesurée au-dessus duquel il peut être décidé, avec une probabilité statistique de $1-\alpha$ que la teneur en analyte identifié est vraiment au-dessus de l'AL.
Capacité de détection (CCβ)	C'est la concentration effective la plus faible de l'analyte pouvant être détectée, identifiée et quantifiée dans un échantillon avec une erreur bêta (faux négatif). Dans le cas de substances interdites, la CC β est la concentration la plus faible à laquelle une méthode est capable de déterminer l'analyte dans des échantillons contaminés avec une probabilité statistique de $1 - 13$. Dans le cas de substances pour lesquelles une LMR a été fixée, CC β est la concentration à laquelle la méthode est capable de détecter des échantillons qui dépassent cette LMR avec une probabilité statistique de $1 - \beta$. Quand il est appliqué à la concentration détectable la plus faible, ce paramètre vise à fournir une information équivalente à la limite de quantification (LQ), mais CC β est toujours associée à une probabilité statistique spécifiée de détection, ce qui explique qu'on la préfère à la LQ
Mélange d'essais de détection	Mélange de substances étalons qui permettent de vérifier les conditions de séparation chromatographique et de détection. Le mélange d'essais de détection devrait contenir des analytes fournissant des informations sur la sélectivité et les facteurs de réponse pour les détecteurs, l'inertie (caractérisée par exemple par le facteur de traîne fT) et la capacité de séparation (par exemple la résolution Rs) de la colonne, ainsi que sur la reproductibilité du tRR. Le mélange d'essais de détection pourrait devoir être spécifique de la colonne et du détecteur.
Faux résultat négatif	Voir erreur beta
Faux résultat positif	Voir erreur alpha
Méthode spécifique de groupe	Méthode conçue pour déceler des substances ayant un même groupement ou une structure chimique analogue, par exemple : acides phénoxyacétiques, dithiocarbamates, carbamates de méthyle.
Résidus d'origine	Résidus d'un analyte dans une matrice provenant de la voie par laquelle les résidus à l'état de traces devraient normalement parvenir, par opposition aux résidus provenant de l'enrichissement d'échantillons en laboratoire. Appelés aussi résidus météorisés.
Méthode individuelle	Méthode apte à déterminer la présence d'un ou de plusieurs composés spécifiés. Une méthode individuelle distincte peut être nécessaire, par exemple pour déterminer certains métabolites inclus dans la définition des résidus d'un pesticide ou d'un médicament vétérinaire particulier.
Échantillon de laboratoire	L'échantillon tel qu'il arrive au laboratoire (non compris l'emballage).
Limite de détection (LD)	La plus petite concentration à laquelle l'analyte peut être identifié. Défini communément comme la plus petite concentration d'analyte dans la prise d'essai pouvant être mesurée avec une probabilité établie que l'analyte est présent à une concentration supérieure à celle de l'échantillon témoin. L'UICPA et l'ISO ont recommandé le sigle LD. Voir aussi limite de décision.
Limite de quantification (LQ)	Concentration la plus faible de l'analyte qui peut être quantifiée. Définie communément comme la concentration minimale de l'analyte dans l'échantillon d'essai pouvant être mesurée avec une précision (répétabilité) et une exactitude acceptables dans les conditions de l'essai. Voir aussi capacité de détection.
Concentration étalonnée la plus faible (CEPF)	Concentration la plus faible de l'analyte détectée et mesurée dans l'étalonnage du système de détection. Elle peut être exprimée comme une concentration de la solution dans la prise d'essai ou en tant que masse et ne doit pas comprendre la contribution du témoin.
Matrice	Matériau ou composant échantillonné à des fins d'analyse, à l'exclusion de l'analyte.
Matrice témoin	Échantillon dans lequel les analytes recherchés ne sont pas détectables.

Étalonnage ajusté à la matrice	Étalonnage à l'aide de pesticides de référence préparés dans un extrait du produit analysé (ou d'un produit représentatif). Il s'agit de neutraliser les effets des co-extractifs sur la méthode de détermination. Ces effets sont souvent imprévisibles, mais l'ajustement à la matrice peut être inutile lorsque les co-extractifs ont un effet négligeable.
Méthode	Série d'opérations depuis la réception d'un échantillon à analyser jusqu'à la production du résultat final.
Validation de la méthode	Procédé visant à vérifier qu'une méthode est adaptée à l'objectif.
Méthode multi-résidus, MRM	Méthode convenant pour l'identification et la quantification d'une gamme d'analytes, habituellement dans un certain nombre de matrices différentes.
Résultat négatif	Résultat indiquant que l'analyte n'est pas présent à ou au-dessus de la concentration étalonnée la plus basse (voir aussi limite de détection)
Vérification des performances	Séries de données sur le contrôle de la qualité produites durant l'Analyses des lots d'échantillons pour valider les analyses en cours. Les données peuvent être utilisées pour affiner les paramètres de performance de la méthode.
Résultat positif	Résultat indiquant que l'analyte est présent à une concentration à ou au-dessus de la concentration étalonnée la plus basse.
Précision	Étroitesse de l'accord entre des résultats d'essais indépendants obtenus dans des conditions stipulées
Méthode quantitative	Méthode pouvant donner des résultats, exprimés en valeurs numériques dans des unités appropriées, avec une exactitude et une précision appropriées à l'objectif. Le degré d'exactitude et de précision doit être conforme aux critères spécifiés au tableau 1.
Récupération	Fraction ou pourcentage d'un analyte récupéré après extraction et analyse d'une prise d'essai en blanc à laquelle l'analyte a été ajouté à une concentration connue (échantillon enrichi ou matériau de référence).
Blanc de réactifs	Analyse complète effectuée sans inclure d'échantillons à des fins de contrôle de qualité
Matériau de référence	Matière dont une ou plusieurs concentrations d'analyte sont suffisamment homogènes et bien établies pour être utilisées pour l'évaluation d'une méthode de mesure, ou pour attribuer des valeurs à d'autres matériaux. Dans le contexte du présent document, le terme "matériau de référence" ne se réfère pas aux matières utilisées pour l'étalonnage des appareils.
Méthode de référence	Méthode d'analyse quantitative dont la fiabilité a été démontrée par une exactitude, une spécificité, une précision et une capacité de détection bien établies. Ces méthodes ont généralement fait l'objet d'études inter-laboratoires et s'appuient le plus souvent sur la spectrométrie moléculaire. Le statut des méthodes de référence est valide uniquement si la méthode est appliquée dans un régime approprié d'assurance de qualité.
Procédure de référence	Procédure dont l'efficacité a été démontrée. Lorsque cela n'est pas possible, une procédure de référence pourrait être une procédure en théorie très efficace et fondamentalement différente de celle à l'essai.
Répétabilité	Précision dans des conditions de répétabilité, c'est-à-dire des conditions dans lesquelles des résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des portions d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement dans un court intervalle de temps (ISO 3534-1)
Analyte représentatif	Analyte choisi pour représenter un groupe d'analytes qui ont des chances d'avoir le même comportement durant l'application d'une méthode d'analyse multi-résidus, si l'on en juge par leurs propriétés physico-chimiques, par exemple structure, solubilité dans l'eau, K_{ow} , polarité, volatilité, stabilité hydrolytique, pKa, etc.
Analyte représenté	Analyte dont les propriétés physico-chimiques sont comprises dans la gamme des propriétés des analytes représentatifs.
Reproductibilité	Étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus par la même méthode sur des portions d'essai identiques avec des opérateurs différents utilisant des équipements différents (dans le cadre de la reproductibilité en laboratoire). De la même manière, lorsque les essais sont effectués dans différents laboratoires, on obtient la reproductibilité inter-laboratoires.
Produit représentatif	Aliment destiné à la consommation humaine ou animale utilisé pour représenter un groupe

	de produits à des fins de validation d'une méthode. Un produit sera considéré comme représentatif sur la base de la composition immédiate de l'échantillon, par exemple teneur en eau, graisse/huile, acide, sucre et chlorophylle, ou de similitudes biologiques des tissus, etc.
Robustesse	Capacité d'une méthode de mesure chimique de limiter les variations de résultats d'essais lorsqu'elle est soumise à de faibles variations liées à l'environnement, aux procédures, aux laboratoires, au personnel, etc.
Préparation de l'échantillon	Procédé utilisé, si nécessaire, pour convertir l'échantillon de laboratoire en une prise d'essai, en enlevant les parties (terre, cailloux, os, etc.) ne servant pas pour l'analyse.
Transformation de l'échantillon	Le (ou les) procédé(s) (par exemple découpage, broyage, mélange) utilisés pour rendre la portion d'essai suffisamment homogène pour ce qui concerne la distribution de l'analyte, avant le retrait de la partie à analyser. L'élément transformateur de la préparation doit être conçu de manière à éviter des changements induits dans la concentration de l'analyte.
Méthode de dépistage	Méthode utilisée pour détecter la présence d'un analyte ou d'une classe d'analytes à ou au-dessus de la concentration la plus faible recherchée. Elle devrait être conçue de manière à éviter les faux résultats négatifs à un degré de probabilité spécifié (généralement $b = 5\%$). Il est parfois nécessaire de confirmer les résultats qualitatifs positifs à l'aide d'épreuves de confirmation ou de référence. Voir Limite de décision et capacité de détection.
Sélectivité	Mesure du degré auquel l'analyte a des chances d'être séparé des autres composants, soit par séparation (par exemple chromatographie), soit par réponse relative du système de détection.
Spécificité	Mesure dans laquelle une méthode fournit des réponses à partir du système de détection qui peuvent être considérées propres à l'analyte
Addition de solutions étalons	Procédé par lequel des quantités connues de l'analyte sont ajoutées à des parties d'un extrait d'échantillon contenant l'analyte (sa concentration mesurée au départ étant X), afin de produire de nouvelles concentrations nominales (par exemple, 1,5X et 2X). On mesure les réponses de l'analyte produites par les parties enrichies et l'extrait original, et on détermine la concentration de l'analyte dans l'extrait original (sans ajouter d'analyte) à partir de la pente et de l'intersection de la courbe de réponse. Si la courbe de réponse obtenue n'est pas linéaire, il faut faire preuve de prudence pour interpréter la valeur de X.
Facteur de traîne	Mesure de l'asymétrie du pic de la chromatographie; à 10% de la hauteur maximale du pic, rapport des segments opposés de la largeur du pic, lorsqu'il est séparé par une ligne verticale passant par le pic maximal.
Portion d'essai	Voir « Portion à analyser »
Échantillon d'essai	Voir « Échantillon à analyser »
Fidélité	Étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et la valeur de référence acceptée.
Incertitude de la mesure	Paramètre unique (en général un écart-type ou un intervalle de confiance) exprimant la gamme possible de valeurs autour du résultat mesuré, dans laquelle on prévoit que la vraie valeur aura un degré établi de probabilité. Elle devrait prendre en compte tous les effets reconnus agissant sur le résultat, y compris la précision globale à long terme (dans les limites de la reproductibilité en laboratoire) de la méthode complète; le biais de la méthode; les incertitudes concernant le sous-échantillonnage et l'étalonnage et toutes autres sources connues de variations dans les résultats.

ABRÉVIATIONS

C_{max}	Résidu le plus élevé décelé dans les portions réplique à analyser	MRM	Méthode multi-résidus
C_{min}	Résidu le plus faible décelé dans les portions réplique à analyser	fRR	Facteur de réponse relative
CV_{Atyp}	Coefficient type de variation des résidus déterminés dans une portion à analyser	tRR	Valeur de rétention relative pour un pic
CV_{Ltyp}	Coefficient type de variation des analyses des portions d'un échantillon de laboratoire	Rs	Résolution de deux pics chromatographiques

CV_{sp}	Coefficient de variation des résidus dans les portions à analyser	EC	Écart-type
BPL	Bonnes pratiques de laboratoire	S_{y/x}	Écart-type des résidus calculés à partir de la fonction d'étalonnage linéaire
GSM	Méthode spécifique de groupe	OMS	Organisation mondiale de la santé
LMR	Limites maximales de résidus		