

DIRECTIVE 1999/27/CE DE LA COMMISSION

du 20 avril 1999

portant fixation des méthodes communautaires d'analyse pour le dosage de l'amprolium, du diclazuril et du carbadox dans les aliments des animaux, modifiant les directives 71/250/CEE, 73/46/CEE et abrogeant la directive 74/203/CEE

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,
vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu la directive 70/373/CEE du Conseil du 20 juillet 1970 concernant l'introduction de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux⁽¹⁾, modifiée en dernier lieu par l'acte d'adhésion de l'Autriche, de la Finlande et de la Suède, et notamment son article 2,

(1) considérant que la directive 70/373/CEE prévoit que les contrôles officiels des aliments des animaux visant à constater le respect des conditions prescrites en vertu des dispositions législatives, réglementaires ou administratives concernant leur qualité et leur composition doivent être effectués selon des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse communautaires;

(2) considérant que la directive 70/524/CEE du Conseil du 23 novembre 1970 concernant les additifs dans l'alimentation des animaux⁽²⁾, modifiée en dernier lieu par le règlement (CE) n° 45/1999 de la Commission⁽³⁾, prescrit que la teneur en amprolium et en diclazuril doit être indiquée dans l'étiquetage lorsque ces substances sont ajoutées aux prémélanges et aux aliments composés des animaux; que l'autorisation d'utilisation du carbadox en tant qu'additif dans l'alimentation des animaux a été retirée par le règlement (CE) n° 2788/98 de la Commission du 22 décembre 1998 modifiant la directive 70/524/CEE du Conseil concernant les additifs dans l'alimentation des animaux en ce qui concerne le retrait de l'autorisation de certains facteurs de croissance⁽⁴⁾ et qu'il est nécessaire de procéder au contrôle officiel des utilisations abusives éventuelles de substances interdites;

(3) considérant qu'il faut définir des méthodes d'analyse communautaires permettant de constater la présence de ces substances;

(4) considérant que la première directive 71/250/CEE de la Commission du 15 juin 1971 portant fixation de méthodes d'analyse communautaire pour le contrôle officiel des aliments des animaux⁽⁵⁾, modifiée en dernier lieu par la directive 98/54/CE⁽⁶⁾, établit des méthodes d'analyse permettant notamment de déterminer la teneur en essence de moutarde et théobromine; que, compte tenu des

progrès des connaissances scientifiques et techniques, les méthodes décrites ne sont plus adaptées au but recherché; qu'il convient donc de supprimer ces méthodes;

(5) considérant que la quatrième directive 73/46/CEE de la Commission du 5 décembre 1972 portant fixation de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux⁽⁷⁾, modifiée en dernier lieu par la directive 98/54/CE, établit des méthodes d'analyse permettant notamment de déterminer la teneur en rétinol (vitamine A); que, compte tenu des progrès des connaissances scientifiques et techniques, la méthode décrite n'est plus adaptée au but recherché; qu'il convient donc de supprimer la méthode concernant le rétinol;

(6) considérant que la cinquième directive 74/203/CEE de la Commission du 25 mars 1974 portant fixation de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux⁽⁸⁾, modifiée par la directive 81/680/CEE⁽⁹⁾, établit des méthodes d'analyse pour le dosage de la teneur en amidon et en produits de dégradation à haut poids moléculaire de l'amidon des aliments qui contiennent des cossettes, des pulpes, des feuilles ou des collets séchés de betteraves, des pulpes de pomme de terre, des levures déshydratées, des produits riches en inuline ou des cretons, et de leurs teneurs en amprolium, éthopabate, dinitolmide (DOT), nicarbazine et ménadione (vitamine K 3); que, compte tenu des progrès des connaissances scientifiques et techniques, aucune des méthodes décrites n'est plus adaptée au but recherché; qu'il convient donc d'abroger cette directive;

(7) considérant que les mesures prévues dans la présente directive sont conformes à l'avis du comité permanent des aliments des animaux,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

Les États membres prescrivent que les analyses effectuées pour les contrôles officiels de la teneur des aliments des animaux et des prémélanges en amprolium, diclazuril et carbadox sont réalisées selon les méthodes exposées à l'annexe de la présente directive.

⁽¹⁾ JO L 170 du 3.8.1970, p. 2.

⁽²⁾ JO L 270 du 14.12.1970, p. 1.

⁽³⁾ JO L 6 du 12.1.1999, p. 3.

⁽⁴⁾ JO L 347 du 23.12.1998, p. 31.

⁽⁵⁾ JO L 155 du 12.7.1971, p. 13.

⁽⁶⁾ JO L 208 du 24.7.1998, p. 49.

⁽⁷⁾ JO L 83 du 30.3.1973, p. 21.

⁽⁸⁾ JO L 108 du 22.4.1974, p. 7.

⁽⁹⁾ JO L 246 du 29.8.1981, p. 32.

Article 2

La directive 71/250/CEE est modifiée comme suit:

- 1) À l'article 1^{er}, les termes «essence de moutarde» et «théobromine» sont supprimés.
- 2) Les points 8 et 13 de l'annexe sont supprimés.

Article 3

La directive 73/46/CEE est modifiée comme suit:

- 1) L'article 2 est supprimé
- 2) L'annexe II est supprimée.

Article 4

La cinquième directive 74/203/CEE est abrogée.

Article 5

Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive au plus tard le 31 octobre 1999. Ils en informent immédiatement la Commission.

Les États membres appliquent les dispositions en cause à compter du 1^{er} novembre 1999.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence lors de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont arrêtées par les États membres.

Article 6

La présente directive entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication du *Journal officiel des Communautés européennes*,

Article 7

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 20 avril 1999.

Par la Commission

Franz FISCHLER

Membre de la Commission

ANNEXE

PARTIE A

DOSAGE DE L'AMPROLIUM

Chlorhydrate du chlorure de 1-[4-amino-2-propyl-5-pirimidin)méthyl]-2-picolinium

1. Objet et domaine d'application

La présente méthode permet de doser l'amprolium dans les aliments des animaux et les prémélanges. La limite de détection est de 1 mg/kg, la limite de dosage est de 25 mg/kg.

2. Principe

L'échantillon est soumis à une extraction par un mélange méthanol/eau. Après dilution dans une phase mobile et filtration sur membrane, la teneur en amprolium est déterminée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec échange de cations à l'aide d'un détecteur UV.

3. Réactifs

3.1. Méthanol

3.2. Acétonitrile, de qualité CLHP

3.3. Eau, de qualité CLHP

3.4. Solution de phosphate monosodique, $c = 0,1 \text{ mol/l}$

Dissoudre 13,80 g de phosphate monosodique monohydraté dans de l'eau (3.3) dans un ballon jaugé de 1 000 ml, porter au trait avec de l'eau (3.3) et mélanger.

3.5. Solution de perchlorate de sodium, $c = 1,6 \text{ mol/l}$

Dissoudre 224,74 g de perchlorate de sodium monohydraté dans de l'eau (3.3) dans un ballon jaugé de 1 000 ml, porter au trait avec de l'eau (3.3) et mélanger.

3.6. Phase mobile pour CLHP (voir point 9.1).

Mélange d'acétonitrile (3.2), de solution de phosphate monosodique (3.4) et de solution de perchlorate de sodium (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V). Avant l'emploi, faire passer dans un filtre à membrane de 0,22 μm (4.3) et dégazer la solution [par exemple dans un bain ultrasonique (4.4) pendant au moins 15 minutes].

3.7. Substance étalon: amprolium pur, chlorhydrate chlorure de 1-[4-amino-2-propylpirimidin-5-yl)méthyl]-2-méthyl-pyridinium, E 750 (voir 9.2).

3.7.1. Solution mère de l'étalon d'amprolium, 500 $\mu\text{g/ml}$

Peser à 0,1 mg près 50 mg d'amprolium (3.7) dans un ballon jaugé de 100 ml, dissoudre dans 80 ml de méthanol (3.1) et placer le ballon pendant 10 min dans un bain ultrasonique (4.4). Après le traitement ultrasonique, porter la solution à la température ambiante, porter au trait avec de l'eau et mélanger. À une température $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$, la solution est stable pendant un mois.

3.7.2. Solution étalon intermédiaire d'amprolium, 50 $\mu\text{g/ml}$

Pipetter 5,0 ml de la solution mère de l'étalon (3.7.1) dans un ballon jaugé de 50 ml, porter au trait avec le solvant d'extraction (3.8) et mélanger. À une température $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$, la solution est stable pendant un mois.

3.7.3. Solutions d'étalonnage

Transférer 0,5, 1,0 et 2,0 ml de la solution étalon intermédiaire (3.7.2) dans une série de ballons jaugés de 50 ml. Porter au trait avec la phase mobile (3.6) et mélanger. Ces solutions correspondent respectivement à 0,5, 1,0 et 2,0 μg d'amprolium par ml. Elles doivent être renouvelées pour chaque usage.

3.8. Solvant d'extraction

Mélange méthanol (3.1)-eau 2+1 (V+V).

4. **Appareillage**

4.1. Équipement CLHP avec système à injection permettant d'injecter des volumes de 100 µl.

4.1.1. Colonne pour chromatographie liquide de 125 mm × 4 mm à échange de cations remplie de Nucleosil 10 SA de 10 µm, ou équivalent.

4.1.2. Détecteur UV de longueur d'onde variable ou détecteur à barrettes de diodes.

4.2. Filtre à membrane, matériel PTFE, de 0,45 µm.

4.3. Filtre à membrane de 0,22 µm.

4.4. Bain ultrasonique.

4.5. Agitateur mécanique ou mélangeur magnétique.

5. **Mode opératoire**

5.1. *Généralités*

5.1.1. Aliment témoin

Pour procéder au teste de récupération (5.1.2), analyser un aliment témoin pour vérifier l'absence d'amprolium ou de substances interférentes. L'aliment témoin doit être du même type que celui de l'échantillon; il ne doit être détecté ni amprolium, ni substances interférentes.

5.1.2. Test de récupération

Effectuer un test de récupération par analyse de l'aliment témoin auquel a été ajoutée une quantité d'amprolium similaire à celle présente dans l'échantillon. Pour obtenir une concentration de 100 mg/kg, transférer 10,0 ml de la solution mère de l'étalon (3.7.1) dans un ballon conique de 250 ml et concentrer la solution par évaporation à environ 0,5 ml. Ajouter 50 g de l'aliment témoin, mélanger soigneusement et laisser reposer 10 minutes tout en mélangeant de nouveau plusieurs fois avant de procéder à l'extraction (5.2).

Alternativement, en l'absence d'un aliment témoin de même type que celui de l'échantillon (voir 5.1.1), le test de récupération peut être effectué selon la méthode par addition de l'étalon. Dans ce cas, l'échantillon à analyser est supplémenté d'une quantité d'amprolium semblable à celle déjà présente dans l'échantillon. Celui-ci est analysé avec l'échantillon non supplémenté et la récupération peut être calculée par différence.

5.2. *Extraction*

5.2.1. Prémélanges (contenu < 1 % d'amprolium) et aliments des animaux

Peser à 0,01 g près de 5 à 40 g de l'échantillon selon sa teneur en amprolium dans un ballon conique de 500 ml et ajouter 200 ml de solvant d'extraction (3.8). Placer le ballon pendant 15 minutes dans le bain ultrasonique (4.4). Enlever le ballon du bain ultrasonique et le soumettre pendant 1 heure à agitation mécanique ou magnétique (4.5). Diluer une partie aliquote de l'extrait avec la phase mobile (3.6) pour obtenir une teneur en amprolium de 0,5 à 2 µg/ml et mélanger (voir observation 9.3). Filtrer 5 à 10 ml de cette solution diluée sur un filtre à membrane (4.2). Procéder au dosage par CLHP (5.3).

5.2.2. Prémélanges (teneur ≥ 1 % d'amprolium)

Peser à 0,001 g près de 1 à 4 g du prémélange selon sa teneur en amprolium dans un ballon conique de 500 ml et ajouter 200 ml de solvant d'extraction (3.8). Placer le ballon pendant 15 minutes dans le bain ultrasonique (4.4). Enlever le ballon du bain ultrasonique et le soumettre pendant 1 heure à agitation mécanique ou magnétique (4.5). Diluer une partie aliquote de l'extrait avec la phase mobile (3.6) pour obtenir une teneur en amprolium de 0,5 à 2 µg/ml et mélanger. Filtrer 5 à 10 ml de cette solution diluée sur un filtre à membrane (4.2). Procéder au dosage par CLHP (5.3).

5.3. *Dosage CLHP*

5.3.1. Paramètres

Les conditions suivantes sont proposées à titre indicatif; d'autres conditions peuvent être appliquées si elles donnent des résultats équivalents.

Colonne chromatographique liquide (4.1.1): 125 mm × 4 mm avec échange de cations avec Nucleosil 10 SA de 10 µm, ou équivalent.

Phase mobile (3.6): Mélange d'acétonitrile (3.2), de solution de phosphate monosodique (3.4) et de solution de perchlorate sodique (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V).

Débit: 0,7-1 ml/min.

Longueur d'onde de détection: 264 nm.

Volume d'injection: 100 µl.

Vérifier la stabilité du système chromatographique en injectant plusieurs fois la solution d'étalonnage (3.7.3) contenant 1,0 µg/ml jusqu'à obtention de hauteurs de pic et de temps de rétention constants.

5.3.2. Courbe d'étalonnage

Injecter chaque solution d'étalonnage (3.7.3) plusieurs fois et déterminer les hauteurs (surfaces) moyennes des pics pour chaque concentration. Établir une courbe d'étalonnage en utilisant les hauteurs (surfaces) moyennes des pics des solutions d'étalonnage comme ordonnées et les concentrations correspondantes en µg/ml comme abscisses.

5.3.3. Solution de l'échantillon

Injecter l'extrait de l'échantillon (5.2) plusieurs fois en utilisant le même volume que celui retenu pour les solutions d'étalonnage et déterminer la hauteur (surface) moyenne des pics de l'amprolium.

6. Expression des résultats

À partir de la hauteur (surface) moyenne des pics de l'amprolium de la solution de l'échantillon, déterminer la teneur de la solution de l'échantillon en µg/ml par référence à la courbe d'étalonnage (5.3.2).

La teneur *w* en amprolium, exprimée en mg/kg de l'échantillon, est donnée par la formule suivante:

$$w = \frac{V \cdot \delta \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

formule dans laquelle

V = volume du solvant d'extraction (3.8) en ml selon 5.2 (c'est-à-dire 200 ml).

δ = teneur en amprolium de l'extrait de l'échantillon (5.2) en µg/ml.

f = facteur de dilution selon 5.2.

m = masse de la portion d'essai en g.

7. Validation des résultats

7.1. Identité

L'identité de l'analyte peut être confirmée par cochromatographie ou à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes qui permet de comparer les spectres de l'extrait de l'échantillon (5.2) et de la solution d'étalonnage (3.7.3) contenant 2,0 µg/ml.

7.1.1. Cochromatographie

Un extrait de l'échantillon (5.2) est additionné d'une quantité appropriée de la solution d'étalonnage (3.7.3). La quantité d'amprolium ajoutée doit être semblable à la quantité d'amprolium constatée dans l'extrait de l'échantillon.

Seule la hauteur du pic de l'amprolium doit être augmentée compte tenu de la quantité ajoutée et de la dilution de l'extrait. La largeur du pic à mi-hauteur doit se situer à ± 10 % de la largeur initiale du pic d'amprolium de l'extrait de l'échantillon non supplémenté.

7.1.2. Détection par barrettes de diodes

Évaluer les résultats d'après les critères suivants:

- la longueur d'onde d'absorption maximale des spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrée à l'apex du pic sur le chromatogramme, doit être la même dans une marge déterminée par le pouvoir de résolution du système de détection. Pour la détection par barrettes de diodes, elle est généralement de ± 2 nm;
- entre 210 et 320 nm, les spectres de l'échantillon et de l'étalon enregistrés à l'apex du pic du chromatogramme ne doivent pas être différents pour les parties du spectre situées entre 10 et 100 % de l'absorbance relative. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et qu'en aucun point l'écart observé entre les deux spectres ne dépasse 15 % de l'absorbance de l'étalon de l'analyte;
- entre 210 et 320 nm, les spectres de la courbe ascendante, de l'apex et de la courbe descendante du pic produits par l'extrait de l'échantillon ne doivent pas être différents les uns des autres pour les parties du spectre situées entre 10 et 100 % de l'absorbance relative. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et qu'en aucun point l'écart observé entre les spectres ne dépasse 15 % de l'absorbance du spectre de l'apex du pic.

Si l'un de ces critères n'est pas rempli, la présence de l'analyte n'est pas confirmée.

7.2. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur le même échantillon ne doit pas dépasser

- 15 % du résultat supérieur pour les teneurs en amprolium situées entre 25 et 500 mg/kg,
- 75 mg/kg pour les teneurs en amprolium situées entre 500 et 1 000 mg/kg,
- 7,5 % du résultat supérieur pour les teneurs en amprolium de plus de 1 000 mg/kg.

7.3. Récupération

Pour un échantillon (témoin) supplémenté, le rendement doit être au moins de 90 %.

8. Résultats d'une étude interlaboratoire

Une étude interlaboratoire a été organisée au cours de laquelle trois aliments pour volaille (échantillons 1-3), un aliment minéral (échantillon 4) et un prémélange (échantillon 5) ont été analysés. Les résultats de l'étude figurent ci-après

	Échantillon 1 (aliment témoin)	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Moyenne (mg/kg)	—	45,5	188	5 129	25 140
s_r (mg/kg)	—	2,26	3,57	178	550
CV_r (%)	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R (mg/kg)	—	2,95	11,8	266	760
CV_R (%)	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Teneur nominale [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: nombre de laboratoires.

n: nombre de valeurs individuelles

s_r : écart-type de la répétabilité.

CV_r : coefficient de variation de la répétabilité.

s_R : écart type de la reproductibilité.

CV_R : coefficient de variation de la reproductibilité.

9. Observations

- 9.1. Si l'échantillon contient de la thiamine, le pic de la thiamine dans le chromatogramme apparaît peu avant le pic du carbadox. D'après cette méthode, l'amprolium et la thiamine doivent être séparés. Si l'amprolium et la thiamine ne sont pas séparés par la colonne (4.1.1) utilisée dans cette méthode, remplacer jusqu'à 50 % de la portion d'acétonitrile de la phase mobile (3.6) par du méthanol.
- 9.2. Selon la pharmacopée britannique, le spectre de la solution d'amprolium ($c = 0,02$ mol/l) dans l'acide chlorhydrique ($c = 0,1$ mol/l) présente des maxima à 246 nm et 262 nm. L'absorbance sera de 0,84 à 246 nm et de 0,80 à 262 nm.
- 9.3. L'extrait doit toujours être dilué avec la phase mobile, faute de quoi le temps de rétention du pic d'amprolium peut changer de façon significative en raison des variations de la force ionique.

PARTIE B

DOSAGE DU DICLAZURIL

2,6 chloro-alfa-(4-chlorophényl)-4-[4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl]benzène-acétonitrile

1. Objet et domaine d'application

La présente méthode permet de doser le diclazuril dans les aliments des animaux et les prémélanges. La limite de détection est de 0,1 mg/kg; la limite de dosage est de 0,5 mg/kg.

2. Principe

Après l'addition d'un étalon interne, l'échantillon est extrait à l'aide de méthanol acidifié. Pour les aliments des animaux, une partie aliquote de l'extrait est purifiée sur une cartouche C18 pour extraction en phase solide. Le diclazuril est élué de la cartouche à l'aide d'un mélange de méthanol acidifié et d'eau. Après évaporation, le résidu est dissous dans un mélange DMF/eau. Pour les prémélanges, l'extrait est évaporé et le résidu est dissous dans un mélange DMF/eau. La teneur en diclazuril est déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) à gradients ternaires et en phase inversée, à l'aide d'un détecteur UV.

3. Réactifs

- 3.1. Eau, de qualité CLHP.
- 3.2. Acétate d'ammonium.
- 3.3. Hydrogénosulfate de tétrabutylammonium (TBHS).
- 3.4. Acétonitrile, de qualité CLHP.
- 3.5. Méthanol, de qualité CLHP.
- 3.6. N,N-diméthylformamide (DMF).
- 3.7. Acide chlorhydrique, $\rho_{20} = 1,19$ g/ML.
- 3.8. Substance étalon: diclazuril II-24: 2,6 chloro-alfa-(4-chlorophényl)-4-[4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl] benzène-acétonitrile, garanti pur, E771.
- 3.8.1. Solution mère de l'étalon de diclazuril, 500 µg/ml.

Peser à 0,1 mg près 25 mg de substance étalon de diclazuril (3.8) dans un ballon jaugé de 50 ml. Dissoudre dans du DMF (3.6), porter au trait avec du DMF (3.6) et mélanger. Envelopper le ballon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un ballon opaque et le mettre au réfrigérateur. À une température ≤ 4 °C, la solution est stable pendant un mois.

3.8.2. Solution étalon de diclazuril, 50 µg/ml.

Transférer 5,00 ml de la solution mère de l'étalon (3.8.1) dans un ballon jaugé de 50 ml, porter au trait avec du DMF (3.6) et mélanger. Envelopper le ballon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un ballon opaque et le mettre au réfrigérateur. À une température ≤ 4 °C, la solution est stable pendant un mois.

3.9. Étalon interne: 2,6 dichloro-a-(4-chlorophényl)-4-(4,5 dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazine-2 (3H)-yl) α -méthylbenzène-acétonitrile.

3.9.1. Solution mère de l'étalon interne, 500 µg/ml.

Peser à 0,1 ml près 25 ml de substance étalon interne (3.9) dans un ballon jaugé de 50 ml. Dissoudre dans du DMF (3.6), porter au trait avec du DMF (3.6) et mélanger. Envelopper le ballon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un ballon opaque et le mettre au réfrigérateur. À une température ≤ 4 °C, la solution est stable pendant un mois.

3.9.2. Solution de l'étalon interne, 50 µg/ml.

Transférer 5,00 ml de la solution mère de l'étalon interne (3.9.1) dans un ballon jaugé de 50 ml, porter au trait avec du DMF (3.6) et mélanger. Envelopper le flacon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un flacon opaque et le mettre au réfrigérateur. À une température ≤ 4 °C, la solution est stable pendant un mois.

3.9.3. Solution de l'étalon interne pour prémélanges, p/1000 mg/ml (p = teneur nominale en diclazuril du prémélange en mg/kg)

Peser à 0,1 mg p/10 mg de l'étalon interne dans un ballon jaugé de 100 ml, dissoudre dans du DMF (3.6) dans un bain ultrasonique (4.6), porter au trait avec du DMF et mélanger. Envelopper le flacon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un flacon opaque et le mettre au réfrigérateur. À une température ≤ 4 °C, la solution est stable pendant un mois.

3.10. Solution d'étalonnage, 2 µg/ml

Pipetter 2,00 ml de solution de l'étalon de diclazuril (3.8.2) et 2,00 ml de solution de l'étalon interne (3.9.2) dans un ballon jaugé de 50 ml. Ajouter 16 ml de DMF (3.6), porter au trait avec de l'eau et mélanger. Cette solution doit être préparée pour chaque usage.

3.11. Cartouche C 18 pour extraction en phase solide, par exemple, Bond Elut, taille: 1 cc, masse de sorption: 100 ml.

3.12. Solvant d'extraction: méthanol acidifié.

Pipetter 5,0 ml d'acide chlorhydrique (3.7) dans 1 000 ml de méthanol (3.5) et mélanger.

3.13. Phase mobile pour CLHP.

Éluant A: acétate d'ammonium — solution d'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium.

3.13.1. Dissoudre 5 g d'acétate d'ammonium (3.2) et 3,4 g de TBHS (3.3) dans 1 000 ml d'eau (3.1) et mélanger.

3.13.2. Éluant B: acétonitrile (3.4).

3.13.3. Éluant C: méthanol (3.5).

4. Appareillage

4.1. Agitateur mécanique.

4.2. Équipement pour CLHP à gradients ternaires.

4.2.1. Colonne pour chromatographie liquide, remplie d'Hypersil ODS de 3 µm, 100 m x 4,6 mm, ou équivalent.

4.2.2. Détecteur UV de longueur d'onde variable ou détecteur à barrettes de diodes.

4.3. Évaporateur rotatif sous vide.

4.4. Filtre à membrane de 0,45 µm.

4.5. Distributeur à vide.

4.6. Bain ultrasonique.

5. Mode opératoire

5.1. Généralités

5.1.1. Aliment témoin

Analyser un aliment témoin pour vérifier l'absence de diclazuril ou de substances interférentes. L'aliment témoin doit être du même type que celui de l'échantillon; il ne doit être détecté ni diclazuril, ni substances interférentes.

5.1.2. Test de récupération

Effectuer un test de récupération par analyse de l'aliment témoin auquel a été ajoutée une quantité de diclazuril similaire à celle présente dans l'échantillon. Pour obtenir une concentration de 1 mg/kg, ajouter 0,1 ml de la solution mère de l'étalon (3.8.1) à 50 g de l'aliment témoin, mélanger soigneusement et laisser reposer 10 minutes, mélanger de nouveau plusieurs fois avant de procéder à l'extraction (5.2).

Alternativement, en l'absence d'un aliment témoin de même type que celui de l'échantillon (voir 5.1.1), le test de récupération peut être effectué selon la méthode par addition de l'étalon. Dans ce cas, l'échantillon à analyser est supplémenté d'une quantité de diclazuril semblable à celle déjà présente dans l'échantillon. Celui-ci est analysé avec l'échantillon non supplémenté et la récupération peut être calculée par différence.

5.2. Extraction

5.2.1. Aliments des animaux

Peser à 0,01 g près environ 50 g de l'échantillon. Transférer dans un ballon conique de 500 ml, ajouter 1,00 ml de la solution de l'étalon interne (3.9.2), 200 ml du solvant d'extraction (3.12) et boucher le ballon. Secouer le mélange sur l'agitateur (4.1) pendant une nuit. Laisser déposer pendant 10 minutes. Transférer une partie aliquote de 20 ml du surnageant dans un récipient en verre approprié et diluer dans 20 ml d'eau. Transférer cette solution dans une cartouche à extraction (3.11) et filtrer sous vide (4.5). Laver la cartouche à l'aide de 25 ml du mélange de solvant d'extraction (3.12) et d'eau, 65 + 35 (V + V). Éliminer les fractions collectées et éluer les composés à l'aide de 25 ml d'un mélange de solvant d'extraction (3.12) et d'eau, 80 + 20 (V + V). Faire évaporer cette fraction jusqu'à ce qu'elle commence à sécher au moyen d'un évaporateur rotatif (4.3) à 60 °C. Dissoudre le résidu dans 1,0 ml de DMF (3.6), ajouter 1,5 ml d'eau (3.1) et mélanger. Faire passer dans un filtre à membrane (4.4). Procéder au dosage par CLHP (5.3).

5.2.2. Prémélanges

Peser à 0,001 g près environ 1 g de l'échantillon. Transférer dans un ballon conique de 500 ml, ajouter 1,00 ml de solution de l'étalon interne (3.9.3) et 200 ml de solvant d'extraction (3.2), puis boucher le ballon. Passer le mélange à l'agitateur (4.1) pendant une nuit. Laisser déposer pendant 10 minutes. Transférer une partie aliquote de 10 000/p ml (p = teneur nominale du prémélange en diclazuril en mg/kg) du surnageant dans un ballon à fond rond de dimension appropriée. Faire évaporer ce mélange jusqu'à ce qu'il commence à sécher, sous une pression réduite et à 60 °C au moyen d'un évaporateur rotatif (4.3). Redissoudre le résidu dans 10,0 ml de DMF (3.6), ajouter 15,0 ml d'eau (3.1) et mélanger. Procéder au dosage par CLHP (5.3).

5.3. Dosage CLHP.

5.3.1. Paramètres

Les conditions suivantes sont proposées à titre indicatif; d'autres conditions peuvent être appliquées si elles donnent des résultats équivalents.

— Colonne chromatographique liquide (4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm, remplie d'Hypersil ODS de 3 µm, ou équivalent	
— Phase mobile:	Éluant A (3.13.1):	solution aqueuse d'acétate d'ammonium et d'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium
	Éluant B (3.13.2):	acétonitrile
	Éluant C (3.13.3):	méthanol

- Mode d'élution: — gradient linéaire
 — conditions initiales: $A + B + C = 60 + 20 + 20$ (V + V + V)
 — au bout de 10 minutes, élution par gradient pendant 30 min jusqu'à: $A + B + C = 45 + 20 + 35$ (V + V + V)
 Rincer avec B pendant 10 minutes
- Débit: 1,5-2 ml/min
- Volume d'injection: 20 μ l
- Longueur d'ondes de détection: 280 nm

Vérifier la stabilité du système chromatographique en injectant plusieurs fois la solution d'étalonnage (3.10) contenant 2 μ g/ml jusqu'à obtention de hauteurs de pic et de temps de rétention constants.

5.3.2. Solution d'étalonnage

Injecter 20 μ l de la solution d'étalonnage (3.10) plusieurs fois et déterminer la hauteur (surface) moyenne des pics du diclazuril et de l'étalon interne.

5.3.3. Solution de l'échantillon

Injecter 20 μ l de la solution de l'échantillon (5.2.1. ou 5.2.2.) plusieurs fois et déterminer la hauteur (surface) moyenne des pics du diclazuril et de l'étalon interne.

6. Expression des résultats

6.1. Aliments

La teneur en diclazuril w (en mg/kg) de l'échantillon est donnée par la formule suivante

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c} \cdot \delta_{d,c} \cdot 10V}{h_{i,s} \cdot h_{d,c} \cdot m} \text{ [mg/kg]}$$

formule dans laquelle:

$h_{d,s}$ = hauteur (surface) du pic de diclazuril dans la solution de l'échantillon (5.2.1).

$h_{i,s}$ = hauteur (surface) du pic de l'étalon interne dans la solution de l'échantillon (5.2.1).

$h_{d,c}$ = hauteur (surface) du pic de diclazuril dans la solution d'étalonnage (3.10).

$h_{i,c}$ = hauteur (surface) du pic de l'étalon interne dans la solution d'étalonnage (3.10).

$\delta_{d,c}$ = teneur en diclazuril de la solution d'étalonnage en μ g/ml (3.10).

m = masse de la portion d'essai en grammes.

V = volume de l'extrait de l'échantillon selon 5.2.1 (c'est-à-dire 2,5 ml).

6.2. Prémélanges

La teneur en diclazuril W (mg/kg) de l'échantillon est donnée par la formule suivante:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c} \cdot \delta_{d,c} \cdot 0,02V \cdot p}{h_{i,s} \cdot h_{d,c} \cdot m} \text{ [mg/kg]}$$

formule dans laquelle:

$h_{d,c}$ = hauteur (surface) du pic de diclazuril dans la solution d'étalonnage (3.10).

$h_{i,c}$ = hauteur (surface) du pic de l'étalon interne dans la solution d'étalonnage (3.10).

$h_{d,s}$ = hauteur (surface) du pic de diclazuril dans la solution de l'échantillon (5.2.2).

$h_{i,s}$ = hauteur (surface) du pic de l'étalon interne dans la solution de l'échantillon (5.2.2).

$\delta_{d,c}$ = teneur en diclazuril de la solution d'étalonnage (3.10).

m = masse de la portion d'essai en grammes.

V = volume de l'extrait de l'échantillon selon 5.2.2 (c'est-à-dire 25 ml).

p = teneur nominale du prémélange en diclazuril en mg/kg.

7. Validation des résultats

7.1. Identité

L'identité de l'analyte peut être confirmée par cochromatographie ou à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes qui permet de comparer les spectres de l'extrait de l'échantillon (5.2.1 ou 5.2.2) et de la solution d'étalonnage (3.10).

7.1.1. Cochromatographie

Un extrait de l'échantillon (5.2.1 ou 5.2.2) est additionné d'une quantité appropriée de la solution d'étalonnage (3.10). La quantité de diclazuril ajoutée doit être semblable à la quantité de diclazuril constatée dans l'extrait de l'échantillon.

Seule la hauteur du pic du diclazuril et du pic de l'étalon interne doit être augmentée compte tenu à la fois de la quantité ajoutée et de la dilution de l'extrait. La largeur du pic à mi-hauteur doit se situer à $\pm 10\%$ de la largeur initiale du pic du diclazuril ou du pic de l'étalon interne de l'extrait de l'échantillon non supplémenté.

7.1.2. Détection par barrettes de diodes

Évaluer les résultats d'après les critères suivants:

- a) la longueur d'onde d'absorption maximale des spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrée à l'apex du pic sur le chromatogramme, doit être la même dans une marge déterminée par le pouvoir de résolution du système de détection. Pour la détection par barrettes de diodes, elle est généralement de ± 2 nm;
- b) entre 230 et 320 nm, les spectres de l'échantillon et de l'étalon enregistrés à l'apex du pic du chromatogramme ne doivent pas être différents pour les parties du spectre situées entre 10 et 100 % de l'absorbance relative. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et qu'en aucun point l'écart observé entre les deux spectres ne dépasse 15 % de l'absorbance de l'étalon de l'analyte;
- c) entre 230 et 320 nm, les spectres de la courbe ascendante, de l'apex et de la courbe descendante du pic produits par l'extrait de l'échantillon ne doivent pas être différents les uns des autres pour les parties du spectre situées entre 10 et 100 % de l'absorbance relative. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et qu'en aucun point l'écart observé entre les spectres ne dépasse 15 % de l'absorbance du spectre de l'apex du pic.

Si l'un de ces critères n'est pas rempli, la présence de l'analyte n'est pas confirmée.

7.2. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur le même échantillon ne doit pas dépasser:

- 30 % du résultat supérieur pour les teneurs en diclazuril situées entre 0,5 et 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg pour les teneurs en diclazuril situées entre 2,5 et 5 mg/kg,
- 15 % du résultat supérieur pour les teneurs en diclazuril de plus de 5 mg/kg.

7.3. Récupération

Pour un échantillon (témoin) supplémenté, la récupération doit être au moins de 80 %.

8. Résultats d'une étude interlaboratoire

Une étude interlaboratoire a été organisée au cours de laquelle cinq échantillons ont été analysés par onze laboratoires. Ces échantillons consistaient en deux prémélanges: l'un était mélangé à une matrice organique (O 100) et l'autre à une matrice inorganique (A 100). La teneur théorique est de 100 mg de diclazuril par kg. Les trois aliments pour volaille mélangés étaient fabriqués par trois producteurs différents (NL) (L1/Z1/K1). La teneur théorique est de 1 mg de diclazuril par kg. Les laboratoires avaient pour instruction d'analyser chacun des échantillons une seule fois ou en double. (Des informations plus détaillées sur cette étude interlaboratoire figurent dans le *Journal of AOAC, Volume 77, n° 6, 1994, pp. 1359 à 1361.*) Les résultats de l'étude figurent ci-après:

	Échantillon 1 A 100	Échantillon 2 O 100	Échantillon 3 L 1	Échantillon 4 Z 1	Échantillon 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Moyenne	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Teneur nominale (mg/kg)	100	100	1	1	1

L: nombre de laboratoires.

n: nombre de valeurs individuelles.

s_r: écart-type de la répétabilité.

CV_r: coefficient de variation de la répétabilité.

S_R: écart type de la reproductibilité.

CV_R: coefficient de variation de la reproductibilité.

9. Observations

Il doit être préalablement démontré que la réaction du diclazuril est linéaire sur toute la gamme des teneurs mesurées.

PARTIE C

DOSAGE DU CARBADOX

Méthyl 3-(2-quinoxalinylméthylène)carbazate N^o,N^o-dioxyde

1. Objet et domaine d'application

La présente méthode permet de doser le carbadox dans les aliments des animaux, les prémélanges et les préparations. La limite de détection est de 1 mg/kg; la limite de dosage est de 10 mg/kg.

2. Principe

L'échantillon est équilibré avec de l'eau et soumis à une extraction par un mélange méthanol/acétonitrile. Pour les aliments des animaux, une partie aliquote de l'extrait filtré est nettoyée sur une colonne d'oxyde d'aluminium. Pour les prémélanges et les préparations, une partie aliquote de l'extrait filtré est diluée à une concentration appropriée avec de l'eau, du méthanol et de l'acétonitrile. La teneur en carbadox est déterminée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inversée à l'aide d'un détecteur UV.

3. Réactifs

3.1. Méthanol.

3.2. Acétonitrile, de qualité CLHP.

3.3. Acide acétique, w = 100 %.

3.4. Oxyde d'aluminium: neutre, degré d'activité I.

3.5. Méthanol-acétonitrile 1 + 1 (V + V)

Mélanger 500 ml de méthanol (3.1) à 500 ml d'acétonitrile (3.2).

3.6. Acide acétique, σ = 10 %

Diluer 10 ml d'acide acétique (3.3) dans 100 ml d'eau.

3.7. Acétate de sodium, CH₃COONa.

- 3.8. Eau, de qualité CLHP
- 3.9. Solution tampon à l'acétate, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$
- Dissoudre 0,82 g d'acétate de sodium (3.7) dans 700 ml d'eau (3.8) et régler le pH à 6,0 avec de l'acide acétique (3.6). Transférer dans un ballon jaugé de 1 000 ml, porter au trait avec de l'eau (3.8) et mélanger.
- 3.10. Phase mobile pour CLHP
- Mélange 825 ml de solution tampon à l'acétate (3.9) à 175 ml d'acétonitrile (3.2). Faire passer dans un filtre de $0,22 \mu\text{m}$ (4.5) et dégazer la solution (par exemple par traitement aux ultrasons pendant 10 minutes).
- 3.11. Substance étalon
- Carbadox pur: méthyl 3-(2-quinoxalinylméthylène)carbazate N^1, N^4 -dioxyde, E 850.
- 3.11.1. Solution mère de l'étalon de carbadox, $100 \mu\text{g/ml}$ (voir point 5. Mode opératoire)
- Peser à 0,1 mg près 25 mg de substance étalon de carbadox (3.11) dans un ballon jaugé de 250 ml. Dissoudre dans un mélange de méthanol-acétonitrile (3.5) par traitement aux ultrasons (4.7). Après le traitement ultrasonique, porter la solution à la température ambiante, porter au trait avec du méthanol-acétonitrile (3.5) et mélanger. Envelopper le ballon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un récipient en verre opaque et le mettre au réfrigérateur. À une température de $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$ la solution est stable pendant un mois.
- 3.11.2. Solutions d'étalonnage
- Transférer 2,0, 5,0, 10,0 et 20,0 ml de la solution mère de l'étalon (3.11.1) dans une série de ballons jaugés de 100 ml. Ajouter 30 ml d'eau, porter au trait avec du méthanol-acétonitrile (3.5) et mélanger. Envelopper les ballons dans des feuilles d'aluminium. Ces solutions correspondent respectivement à 2,0, 5,0, 10,0 et 20,0 $\mu\text{g/ml}$ de carbadox. Elles doivent être renouvelées pour chaque usage.
- Note:* Pour doser le carbadox dans des aliments pour animaux contenant moins de 10 mg/kg, il faut préparer des solutions d'étalonnage à des concentrations inférieures à 2,0 $\mu\text{g/ml}$.
- 3.12. Mélange eau-[méthanol-acétonitrile] (3.5), 300 + 700 (V + V)
- Mélanger 300 ml d'eau à 700 ml du mélange de méthanol-acétonitrile (3.5).
- 4. Appareillage**
- 4.1. Agitateur de laboratoire ou mélangeur magnétique.
- 4.2. Papier filtre en fibre de verre (Whatman GF/A ou équivalent).
- 4.3. Colonne de verre (longueur 300 à 400 mm, diamètre interne environ 10 mm), avec cloison en verre fritté et valve d'évacuation
- Note:* il est également possible d'utiliser une colonne de verre munie d'un robinet ou une colonne de verre avec extrémité effilée; dans ce cas, un petit tampon de laine de verre est inséré à l'extrémité inférieure et enfoncé à l'aide d'une baguette de verre.
- 4.4. Équipement CLHP avec système à injection, permettant d'injecter des volumes de 20 μl .
- 4.4.1. Colonne pour chromatographie liquide: 300 mm x 4 mm, C18, particules de 10 μm , ou équivalent.
- 4.4.2. Détecteur UV de longueur d'onde variable ou détecteur à barrettes de diodes opérant entre 225 et 400 nm.
- 4.5. Filtre à membrane de 0,22 μm .
- 4.6. Filtre à membrane de 0,45 μm .
- 4.7. Bain ultrasonique.
- 5. Mode opératoire**
- Note:* Le carbadox est photosensible. Opérer toujours sous lumière tamisée, ou utiliser des récipients en verre opaque ou enveloppés dans une feuille d'aluminium.
- 5.1. Généralités

5.1.1. Aliment témoin

Pour procéder au test de récupération (5.1.2), analyser un aliment témoin pour vérifier l'absence de carbadox ou de substances interférentes. L'aliment témoin doit être du même type que celui de l'échantillon; il ne doit être détecté ni carbadox, ni substances interférentes.

5.1.2. Test de récupération

Effectuer un test de récupération par analyse de l'aliment témoin (5.1.1) auquel a été ajoutée une quantité de carbadox similaire à celle présente dans l'échantillon. Pour obtenir une concentration de 50 mg/kg, transférer 5,0 ml de la solution mère de l'étalon (3.11.1) dans un ballon conique de 200 ml. Concentrer la solution par évaporation à environ 0,5 ml dans un courant d'azote. Ajouter 10 g de l'aliment témoin, mélanger et laisser reposer 10 minutes avant de procéder à l'extraction (5.2).

Alternativement, en l'absence d'un aliment témoin de même type que celui de l'échantillon (voir 5.1.1), le test de récupération peut être effectué selon la méthode par addition de l'étalon. Dans ce cas, l'échantillon à analyser est supplémenté d'une quantité de carbadox semblable à celle déjà présente dans l'échantillon. Celui-ci est analysé avec l'échantillon non supplémenté et la récupération peut être calculée par différence.

5.2. Extraction

5.2.1. Aliments des animaux

Peser à 0,01 g près environ 10 g de l'échantillon et transférer dans un ballon conique de 200 ml. Ajouter 15,0 ml d'eau, mélanger et équilibrer pendant 5 minutes. Ajouter 35,0 ml de méthanol-acétonitrile (3.5), boucher et soumettre pendant 30 minutes à agitation mécanique ou magnétique (4.1). Faire passer la solution par un papier filtre en fibre de verre (4.2). Conserver cette solution pour la phase de purification (5.3).

5.2.2. Prémélanges (0,1-2,0 %)

Peser à 0,001 g près environ 1 g de l'échantillon non broyé et transférer dans un ballon conique de 200 ml. Ajouter 15,0 ml d'eau, mélanger et équilibrer pendant 5 minutes. Ajouter 35,0 ml de méthanol-acétonitrile (3.5), boucher et soumettre pendant 30 minutes à agitation mécanique ou magnétique (4.1). Faire passer la solution par un papier filtre en fibre de verre (4.2). Pipetter une partie aliquote du filtrat dans un ballon jaugé de 50 ml. Ajouter 15,0 ml d'eau, porter au trait avec du méthanol-acétonitrile (3.5) et mélanger. La teneur en carbadox de la solution finale doit être d'environ 10 µg/ml. Une partie aliquote est passée par un filtre de 0,45 µm (4.6). Procéder au dosage CLHP (5.4).

5.2.3. Préparations (> 2 %)

Peser à 0,001 g près environ 0,2 g de l'échantillon non broyé et transférer dans un ballon conique de 250 ml. Ajouter 45,0 ml d'eau, mélanger et équilibrer pendant 5 minutes. Ajouter 105,0 ml de méthanol-acétonitrile (3.5), boucher et homogénéiser. Soumettre l'échantillon aux ultrasons (4.7) pendant 15 minutes, puis à une agitation mécanique ou magnétique pendant 15 minutes (4.1). Faire passer la solution par un papier filtre en fibre de verre (4.2). Diluer une partie aliquote du filtrat avec le mélange eau-méthanol-acétonitrile (3.12) jusqu'à une concentration finale en carbadox de 10 à 15 µg/ml (pour une préparation à 10 %, le facteur de dilution est de 10). Une partie aliquote est passée par un filtre de 0,45 µm (4.6). Procéder au dosage CLHP (5.4).

5.3. Purification

5.3.1. Préparation de la colonne d'oxyde d'aluminium.

Peser 4 g d'oxyde d'aluminium (3.4) et transférer dans la colonne de verre (4.3).

5.3.2. Purification de l'échantillon

Faire passer 15 ml de l'extrait filtré (5.2.1) dans la colonne d'oxyde d'aluminium et éliminer les deux premiers ml de l'éluat. Collecter les 5 ml suivants et faire passer une partie aliquote par un filtre de 0,45 µm (4.6). Procéder au dosage CLHP (5.4).

5.4. Dosage CLHP

5.4.1. Paramètres

Les conditions suivantes sont proposées à titre indicatif; d'autres conditions peuvent être appliquées si elles donnent des résultats équivalents.

Colonne chromatographique liquide 300 mm × 4 mm, C18, particules de 10 µm, ou équivalent.
(4.1.1):

Phase mobile (3.10): Mélange de solution tampon à l'acétate (3.9) et d'acétonitrile (3.2), 825 + 175 (V + V).

Débit: 1,5-2 ml/min.

Longueur d'onde de détection: 365 nm.

Volume d'injection: 20 µl.

Vérifier la stabilité du système chromatographique en injectant plusieurs fois la solution d'étalonnage (3.11.2) contenant 5,0 µg/ml, jusqu'à obtention de hauteurs (surfaces) de pics et de temps de rétention constants.

5.4.2. Courbe d'étalonnage

Injecter chaque solution d'étalonnage (3.11.2) plusieurs fois et déterminer les hauteurs (surfaces) des pics pour chaque concentration. Établir une courbe d'étalonnage en utilisant les hauteurs ou surfaces moyennes des pics des solutions d'étalonnage comme ordonnées et les concentrations correspondantes en µg/ml comme abscisses.

5.4.3. Solution de l'échantillon

Injecter l'extrait de l'échantillon [(5.3.2) pour les aliments des animaux, (5.2.2) pour les prémélanges et (5.2.3) pour les préparations] plusieurs fois et déterminer la hauteur (surface) moyenne des pics du carbadox.

6. Expression des résultats

À partir de la hauteur (surface) moyenne des pics du carbadox de la solution de l'échantillon, déterminer la teneur de la solution de l'échantillon en µg/ml par référence à la courbe d'étalonnage (5.4.2).

6.1. Aliments des animaux

La teneur w en carbadox, exprimée en mg/kg, de l'échantillon est donnée par la formule suivante:

$$w = \frac{\delta \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

formule dans laquelle:

δ = teneur en carbadox de l'extrait de l'échantillon (5.3.2) en µg/ml.

V_1 = volume d'extraction en ml (c'est-à-dire 50 ml).

m = masse de la portion d'essai en grammes.

6.2. Prémélanges et préparations

La teneur w en carbadox, exprimée en mg/kg, de l'échantillon est donnée par la formule suivante:

$$w = \frac{\delta \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

formule dans laquelle

δ = teneur en carbadox de l'extrait de l'échantillon (5.2.2 ou 5.2.3) en µg/ml.

V_2 = volume d'extraction en ml (c'est-à-dire 50 ml pour les prémélanges et 150 ml pour les préparations).

f = facteur de dilution selon 5.2.2 (prémélanges) ou 5.2.3 (préparations).

m = masse de la portion d'essai en grammes.

Tableau 2. Résultats de l'étude interlaboratoire des prémélanges et des préparations

	Prémélanges				Préparations		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
N	14	14	14	14	16	16	16
Moyenne (mg/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r (mg/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R (mg/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Teneur nominale (mg/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: nombre de laboratoires.

n: nombre de valeurs individuelles.

s_r : écart-type de la répétabilité.

CV_r : coefficient de variation de la répétabilité.

S_R : écart-type de la reproductibilité.

CV_R : coefficient de variation de la répétabilité.