

		n°	page	date
► <u>M1</u>	Règlement (UE) n° 278/2012 de la Commission du 28 mars 2012	L 91	8	29.3.2012
► <u>M2</u>	Règlement (UE) n° 51/2013 de la Commission du 16 janvier 2013	L 20	33	23.1.2013
► <u>M3</u>	Règlement (UE) n° 691/2013 de la Commission du 19 juillet 2013	L 197	1	20.7.2013
► <u>M4</u>	Règlement (UE) n° 709/2014 de la Commission du 20 juin 2014	L 188	1	27.6.2014
► <u>M5</u>	Règlement (UE) 2017/645 de la Commission du 5 avril 2017	L 92	35	6.4.2017
► <u>M6</u>	Règlement (UE) 2017/771 de la Commission du 3 mai 2017	L 115	22	4.5.2017
► <u>M7</u>	Règlement d'exécution (UE) 2020/1560 de la Commission du 26 octobre 2020	L 357	17	27.10.2020
► <u>M8</u>	Règlement d'exécution (UE) 2022/893 de la Commission du 7 juin 2022	L 155	24	8.6.2022
► <u>M9</u>	Règlement d'exécution (UE) 2024/771 de la Commission du 29 février 2024	L 771	1	15.3.2024

▼B**RÈGLEMENT (CE) N° 152/2009 DE LA COMMISSION****du 27 janvier 2009****portant fixation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinées au contrôle officiel des aliments pour animaux****(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)****▼M3***Article premier***▼M9**

Les prélèvements d'échantillons destinés au contrôle officiel des aliments pour animaux sont effectués conformément aux méthodes décrites à l'annexe I, notamment pour ce qui concerne la détermination des constituants — y compris les matières premières contenant des organismes génétiquement modifiés (OGM), consistant en de tels organismes ou produites à partir de ceux-ci —, des additifs pour l'alimentation animale au sens du règlement (CE) n° 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil ⁽¹⁾ et des substances indésirables au sens de la directive 2002/32/CE du Parlement européen et du Conseil ⁽²⁾, à l'exception des prélèvements d'échantillons destinés à la recherche d'une contamination microbiologique.

▼M3

La méthode d'échantillonnage établie à l'annexe I est applicable pour le contrôle des aliments pour animaux en ce qui concerne la détermination des résidus de pesticides tels que définis par le règlement (CE) n° 396/2005 du Parlement européen et du Conseil ⁽³⁾ et la conformité au règlement (UE) n° 619/2011.

▼B*Article 2*

La préparation des échantillons en vue de l'analyse et l'expression des résultats sont effectuées conformément aux méthodes décrites à l'annexe II.

Article 3

L'analyse réalisée aux fins du contrôle officiel des aliments pour animaux est effectuée conformément aux méthodes décrites à l'annexe III (méthodes d'analyse relatives au contrôle de la composition des matières premières pour aliments des animaux et des aliments composés), à l'annexe IV (méthodes d'analyse relatives au contrôle des teneurs en additifs autorisés des aliments pour animaux), à l'annexe V (méthodes d'analyse relatives au contrôle des substances indésirables dans les aliments pour animaux) et à l'annexe VI (méthodes d'analyse applicables en matière d'identification des constituants d'origine animale pour le contrôle officiel des aliments pour animaux).

Article 4

La valeur énergétique des aliments composés destinés à la volaille est calculée conformément à la méthode décrite à l'annexe VII.

⁽¹⁾ Règlement (CE) n° 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux (JO L 268 du 18.10.2003, p. 29).

⁽²⁾ Directive 2002/32/CE du Parlement européen et du Conseil du 7 mai 2002 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux (JO L 140 du 30.5.2002, p. 10).

⁽³⁾ JO L 70 du 16.3.2005, p. 1.

*Article 5*

Les méthodes d'analyse relatives à la détection d'additifs dont la présence n'est plus autorisée dans les aliments pour animaux, décrites à l'annexe VIII, sont appliquées à des fins de confirmation.

Article 6

Les directives 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/CEE, 73/46/CEE, 76/371/CEE, 76/372/CEE, 78/633/CEE, 81/715/CEE, 84/425/CEE, 86/174/CEE, 93/70/CEE, 93/117/CE, 98/64/CE, 1999/27/CE, 1999/76/CE, 2000/45/CE, 2002/70/CE et 2003/126/CE sont abrogées.

Les références faites aux directives abrogées s'entendent comme faites au présent règlement et sont à lire selon le tableau de correspondance figurant à l'annexe IX.

Article 7

Le présent règlement entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Il s'applique à partir du 26 août 2009

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

▼ M9

ANNEXE I

MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE

1. OBJET ET CHAMP D'APPLICATION

Les échantillons destinés au contrôle officiel des aliments pour animaux sont prélevés conformément aux modalités indiquées ci-après. Les échantillons ainsi obtenus sont considérés comme étant représentatifs des portions échantillonnées.

Le but de l'échantillonnage représentatif est d'obtenir une petite fraction d'un lot de façon que la détermination d'une caractéristique particulière de cette fraction représente la valeur moyenne de la caractéristique considérée pour l'ensemble du lot. Le lot est échantillonné par le prélèvement répété d'échantillons élémentaires en différents points du lot. Ces échantillons élémentaires sont combinés par mélange pour former un échantillon global dont sont tirés, par division représentative, des échantillons finals représentatifs.

Si un examen visuel ou un examen fondé sur d'autres informations pertinentes révèle que la qualité de certaines portions de l'aliment pour animaux devant être soumis à l'échantillonnage diffère de celle du reste du même lot, ces portions sont séparées du reste et traitées comme un sous-lot distinct. S'il n'est pas possible de le diviser en sous-lots distincts, l'aliment pour animaux est échantillonné en tant que lot unique. Dans de tels cas, il en est fait mention dans le rapport d'échantillonnage.

Lorsqu'il est constaté que des aliments pour animaux soumis à un échantillonnage conformément aux dispositions du présent règlement, et qui font partie d'un lot de la même catégorie ou correspondant à la même description, ne satisfont pas aux exigences de l'Union européenne, il est présumé que la totalité des aliments de ce lot est défectueuse, sauf si une évaluation détaillée n'a pas fourni d'éléments indiquant que le reste du lot ne répond pas aux exigences de l'Union européenne.

L'échantillonnage peut aussi porter sur les aliments pour animaux mis en vente par les exploitants du secteur de l'alimentation animale au moyen d'une technique de communication à distance conformément à l'article 11, paragraphe 3, du règlement (CE) n° 767/2009 du Parlement européen et du Conseil ⁽¹⁾. Le prélèvement d'échantillons d'aliments pour animaux mis en vente au moyen d'une technique de communication à distance est en principe soumis aux dispositions de la présente annexe. Le point 11 règle les aspects spécifiques du prélèvement d'échantillons de marchandises vendues à distance.

2. DÉFINITIONS

- Lot: quantité identifiée d'aliment pour animaux dont il est établi qu'elle présente des caractéristiques communes, telles que l'origine, la variété, le type d'emballage, l'emballer, l'expéditeur ou l'étiquetage, et, dans le cas d'un processus de production, une quantité de produit fabriquée dans une seule usine en utilisant des paramètres de production uniformes ou plusieurs de ces quantités lorsqu'elles sont produites en ordre continu et entreposées ensemble.
- Portion échantillonnée: lot ou partie identifiée du lot ou du sous-lot.
- Échantillon scellé: échantillon scellé de manière à ce qu'il soit impossible d'accéder à l'échantillon sans briser ou retirer le scellé.

⁽¹⁾ Règlement (CE) n° 767/2009 du Parlement européen et du Conseil du 13 juillet 2009 concernant la mise sur le marché et l'utilisation des aliments pour animaux, modifiant le règlement (CE) n° 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 79/373/CEE du Conseil, la directive 80/511/CEE de la Commission, les directives 82/471/CEE, 83/228/CEE, 93/74/CEE, 93/113/CE et 96/25/CE du Conseil, ainsi que la décision 2004/217/CE de la Commission (JO L 229 du 1.9.2009, p. 1).

▼ **M9**

- Échantillon élémentaire: quantité prélevée en un point de la portion échantillonnée.
- Échantillon global: ensemble d'échantillons élémentaires prélevés sur la même portion échantillonnée.
- Échantillon réduit: partie de l'échantillon global, obtenue par réduction représentative de celui-ci.
- Échantillon final: partie de l'échantillon global (mêlé), de l'échantillon réduit ou de l'échantillon global homogénéisé, selon le type de contrôle (voir le point 9.4).
- Échantillon de laboratoire: échantillon destiné au laboratoire (tel que reçu par le laboratoire) qui peut être l'échantillon final, l'échantillon réduit ou l'échantillon global.
- Échantillon de marchandises vendues à distance: échantillon d'un lot d'aliments pour animaux mis en vente au moyen d'une technique de communication à distance.

3. DISPOSITIONS GÉNÉRALES

- Les échantillons sont prélevés par des personnes habilitées à cet effet par l'autorité compétente.
- Pour un échantillon de marchandises vendues à distance, l'autorité compétente demande une quantité d'aliments pour animaux à l'exploitant du secteur de l'alimentation animale au moyen d'une technique de communication à distance.
- L'échantillon doit être scellé de sorte qu'il soit impossible d'y accéder sans briser ou retirer le scellé.

La marque du scellé doit être clairement identifiable et visible.

- Identification de l'échantillon: l'échantillon doit être pourvu d'une marque indélébile et être identifié de façon à établir un lien non équivoque avec le rapport d'échantillonnage.
- Les échantillons finals suivants sont prélevés sur chaque échantillon global ou échantillon réduit: un échantillon est prélevé à des fins de contrôle (surveillance du respect de la loi) et un autre est prélevé à l'intention de l'exploitant du secteur de l'alimentation animale (à des fins de recours). Enfin, un autre échantillon final peut être prélevé à des fins de référence. Si l'échantillon global complet est homogénéisé, les échantillons finals sont prélevés sur celui-ci, à moins que cette procédure ne soit contraire à la législation des États membres concernant le droit des exploitants du secteur de l'alimentation animale.
- Conformément à l'article 15, paragraphes 1 et 2, du règlement (UE) 2017/625, dans la mesure où c'est nécessaire à la réalisation des échantillonnages officiels, les exploitants du secteur de l'alimentation animale doivent, lorsque les autorités compétentes l'exigent:
 - autoriser l'accès du personnel des autorités compétentes aux équipements sous leur contrôle, y compris, si nécessaire, en mettant à sa disposition l'équipement d'échantillonnage et de protection individuelle adapté,
 - aider le personnel des autorités compétentes et coopérer avec lui afin de permettre le prélèvement d'échantillons, y compris en lui donnant accès aux aliments pour animaux.

▼ **M9**

4. APPAREILLAGE

4.1. Les appareils destinés aux prélèvements doivent être construits en matériaux qui ne contaminent pas les produits à prélever. Les appareils destinés à être utilisés à plusieurs reprises doivent être faciles à nettoyer pour éviter toute contamination croisée.

4.2. **Appareils recommandés pour le prélèvement d'échantillons d'aliments pour animaux solides**4.2.1. *Prélèvement manuel*

4.2.1.1. Pelle à fond plat et à bords verticaux.

4.2.1.2. Sonde à fente longue ou compartimentée. Les dimensions de la sonde doivent être adaptées aux caractéristiques de la portion échantillonnée (profondeur du récipient, dimensions du sac, etc.) et à la taille des particules composant l'aliment.

Si la sonde présente plusieurs orifices, ces derniers doivent être séparés par des compartiments ou répartis de façon séquentielle afin de garantir que l'échantillon est prélevé en divers points autour de la sonde.

4.2.2. *Prélèvement mécanique*

Des appareils mécaniques appropriés peuvent être utilisés pour prélever des échantillons d'aliments en mouvement. Les appareils mécaniques sont réputés appropriés lorsqu'ils permettent de prélever au moins une section complète du flot.

Le prélèvement d'aliments pour animaux en mouvement (à des débits élevés) peut être effectué au moyen d'échantillonneurs automatiques.

4.2.3. *Diviseur*

Le cas échéant, des appareils destinés à diviser l'échantillon en parts approximativement égales devraient être utilisés pour la préparation d'échantillons réduits représentatifs.

5. EXIGENCES QUANTITATIVES CONCERNANT LE NOMBRE D'ÉCHANTILLONS ÉLÉMENTAIRES

— Les exigences quantitatives relatives au nombre d'échantillons élémentaires figurant aux points 5.1 et 5.2 s'appliquent à des portions échantillonnées n'excédant pas 500 tonnes et qui peuvent faire l'objet d'un échantillonnage représentatif. La procédure d'échantillonnage décrite est aussi valable pour des quantités supérieures à la taille maximale prescrite pour la portion échantillonnée, à condition de ne pas tenir compte du nombre maximal d'échantillons élémentaires indiqué dans les tableaux figurant ci-après aux points 5.1.1, 5.1.3 et 5.1.5 — le nombre d'échantillons élémentaires étant déterminé grâce à la formule mathématique indiquée dans la partie pertinente de la procédure (voir le point 5.3) — et d'augmenter proportionnellement la taille minimale de l'échantillon global. Il est néanmoins possible de diviser un lot de grande taille en sous-lots plus petits et d'échantillonner chaque sous-lot conformément à la procédure décrite aux points 5.1 et 5.2.

— La taille de la portion échantillonnée doit être telle que toutes les parties qui la composent puissent être échantillonnées.

— Pour les lots ou sous-lots de très grande taille (> 500 tonnes) et les lots qui sont transportés ou stockés d'une manière qui ne permet pas d'effectuer l'échantillonnage conformément à la procédure prévue aux points 5.1 et 5.2 du présent point, la procédure d'échantillonnage prévue au point 5.3 doit être appliquée.

▼ **M9**

- Pour les échantillons de marchandises vendues à distance, la taille du lot dont une quantité est demandée est généralement inconnue de l'autorité compétente. Par conséquent, la procédure visée aux points 5.1 et 5.2 ne peut être utilisée. En pareil cas, la procédure décrite au point 11 est appliquée.
- Si la législation impose à l'exploitant du secteur de l'alimentation animale de se conformer au présent règlement dans le cadre d'un système de contrôle obligatoire, l'exploitant peut s'écarter des exigences quantitatives prévues au présent point afin de tenir compte de caractéristiques opérationnelles, à la condition qu'il ait démontré, à la satisfaction de l'autorité compétente, l'équivalence de la procédure d'échantillonnage du point de vue de la représentativité, et après avoir obtenu l'autorisation de l'autorité compétente.
- Dans des cas exceptionnels, s'il n'est pas possible d'appliquer la méthode d'échantillonnage décrite en ce qui concerne les exigences quantitatives, parce qu'elle entraînerait une dégradation inacceptable de la valeur commerciale du lot (à cause des formes d'emballage, des moyens de transport, du mode de stockage, etc.), un autre mode de prélèvement peut être appliqué, à condition qu'il soit aussi représentatif que possible et qu'il soit décrit en détail et bien documenté.

5.1. Exigences quantitatives concernant les échantillons élémentaires en rapport avec le contrôle des substances ou produits répartis uniformément dans les aliments pour animaux

5.1.1. *Aliments solides en vrac*

Taille de la portion échantillonnée	Nombre minimal d'échantillons élémentaires
≤ 2,5 tonnes	7
> 2,5 tonnes	√ (20 fois le nombre de tonnes constituant la portion échantillonnée) (*), jusqu'à 40 échantillons élémentaires

(*) Lorsque le résultat obtenu est un nombre décimal, il doit être arrondi au nombre entier immédiatement supérieur.

5.1.2. *Aliments liquides en vrac*

Taille de la portion échantillonnée	Nombre minimal d'échantillons élémentaires
≤ 2,5 tonnes ou ≤ 2 500 litres	4 (*)
> 2,5 tonnes ou > 2 500 litres	7 (*)

(*) S'il n'est pas possible d'homogénéiser le liquide, le nombre d'échantillons élémentaires doit être augmenté.

5.1.3. *Aliments emballés*

Les aliments pour animaux (solides et liquides) peuvent être emballés dans des sachets, des sacs, des boîtes, des barils, etc., qui sont désignés comme des unités dans le tableau ci-après. Les unités de grande taille (≥ 500 kg ou litres) doivent être échantillonnées conformément aux dispositions prévues pour les aliments pour animaux en vrac (voir les points 5.1.1 et 5.1.2).

Taille de la portion échantillonnée	Nombre minimal d'unités sur lesquelles (au moins) un échantillon élémentaire doit être prélevé (*)
De 1 à 20 unités	1 unité (**)
De 21 à 150 unités	3 unités (**)

▼M9

Taille de la portion échantillonnée	Nombre minimal d'unités sur lesquelles (au moins) un échantillon élémentaire doit être prélevé (*)
De 151 à 400 unités	5 unités (**)
> 400 unités	$\frac{1}{4}$ du $\sqrt{}$ (nombre d'unités constituant la portion échantillonnée) (***), jusqu'à 40 unités

(*) Si l'ouverture d'une unité est susceptible d'avoir une incidence sur l'analyse (par exemple s'il s'agit d'aliments pour animaux humides et périssables), l'unité non ouverte constitue un échantillon élémentaire.

(**) Pour les unités dont le contenu n'excède pas 1 kg ou 1 litre, le contenu d'une unité d'origine constitue un échantillon élémentaire.

(***) Lorsque le résultat obtenu est un nombre décimal, il doit être arrondi au nombre entier immédiatement supérieur.

5.1.4. *Aliments en briques et pierres à lécher*

Au minimum une brique ou pierre à prélever par portion échantillonnée de 25 unités, jusqu'à quatre briques ou pierres au maximum.

Pour les briques ou pierres à lécher dont le poids unitaire n'excède pas 1 kg, une brique ou une pierre constituent un échantillon élémentaire.

5.1.5. *Fourrages grossiers/fourrage*

Taille de la portion échantillonnée	Nombre minimal d'échantillons élémentaires (*)
≤ 5 tonnes	5
> 5 tonnes	$\sqrt{}$ (5 fois le nombre de tonnes constituant la portion échantillonnée) (**), jusqu'à 40 échantillons élémentaires

(*) Il est admis que dans certains cas (par exemple, celui des ensilages), il n'est pas possible de prélever les échantillons élémentaires requis sans endommager le lot de façon inacceptable. Dans de telles situations, une autre méthode d'échantillonnage peut être appliquée; des orientations pour l'échantillonnage de ce type de lots ont été élaborées et sont consultables à l'adresse suivante: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf.

(**) Lorsque le résultat obtenu est un nombre décimal, il doit être arrondi au nombre entier immédiatement supérieur.

5.2. **Exigences quantitatives concernant les échantillons élémentaires en rapport avec le contrôle des constituants ou substances susceptibles d'être répartis non uniformément dans les aliments pour animaux**

Ces exigences quantitatives concernant les échantillons élémentaires s'appliquent dans les situations suivantes:

- contrôle de la présence d'aflatoxines, d'ergot de seigle, d'autres mycotoxines et impuretés botaniques nuisibles dans les matières premières des aliments pour animaux,
- contrôle de la contamination croisée par un constituant, y compris le matériel génétiquement modifié, ou une substance susceptibles d'être répartis non uniformément dans les aliments pour animaux.

Si l'autorité de contrôle suspecte fortement qu'une telle répartition non uniforme existe également dans le cas d'une contamination croisée par un constituant ou une substance dans un aliment composé pour animaux, les exigences quantitatives figurant dans le tableau ci-après peuvent être appliquées.

▼M9

Taille de la portion échantillonnée	Nombre minimal d'échantillons élémentaires
< 80 tonnes	Voir les exigences quantitatives au point 5.1. Le nombre d'échantillons élémentaires à prélever doit être multiplié par 2,5.
≥ 80 tonnes	100

5.3. **Exigences quantitatives concernant les échantillons élémentaires dans les cas de lots de très grande taille**

Dans le cas de portions échantillonnées de grande taille (> 500 tonnes), le nombre d'échantillons élémentaires à prélever = 40 échantillons élémentaires + $\sqrt{\text{tonnes}}$ pour le contrôle des substances ou produits répartis uniformément dans les aliments pour animaux, ou 100 échantillons élémentaires + $\sqrt{\text{tonnes}}$ pour le contrôle des constituants ou substances susceptibles d'être répartis non uniformément dans les aliments pour animaux.

6. **EXIGENCES QUANTITATIVES CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS GLOBAUX**

Un seul échantillon global par portion échantillonnée est requis.

	Nature des aliments pour animaux	Taille minimale de l'échantillon global (*) (**)
6.1.	Aliments en vrac	4 kg
6.2.	Aliments emballés	4 kg (***)
6.3.	Aliments liquides ou semi-liquides	4 litres
6.4.	Aliments en briques ou pierres à lécher:	
6.4.1.	d'un poids unitaire excédant 1 kg	4 kg
6.4.2.	d'un poids unitaire n'excédant pas 1 kg	poids de quatre briques ou pierres d'origine
6.5.	Fourrage grossier/fourrage	4 kg (****)

(*) Si la valeur des aliments pour animaux est élevée, il est possible de prélever une plus petite quantité pour l'échantillon global, pour autant que cela soit décrit et documenté dans le rapport d'échantillonnage.

(**) Conformément aux dispositions du règlement (UE) n° 619/2011 de la Commission du 24 juin 2011 fixant les méthodes d'échantillonnage et d'analyse du contrôle officiel des aliments pour animaux en vue de la détection de matériel génétiquement modifié faisant l'objet d'une procédure d'autorisation ou dont l'autorisation a expiré (JO L 166 du 25.6.2011, p. 9), l'échantillon global pour le contrôle de la présence de matériel génétiquement modifié doit contenir au moins 35 000 graines/semences. Cela signifie que l'échantillon global doit peser au moins 10,5 kg pour le maïs et 7 kg pour le soja. Pour d'autres graines ou semences telles que l'orge, le millet, l'avoine, le riz, le seigle, le blé et le colza, un échantillon global de 4 kg correspond à plus de 35 000 graines/semences.

(***) Dans le cas des aliments pour animaux emballés, il peut également s'avérer impossible de constituer un échantillon global de 4 kg, en fonction de la taille des unités individuelles.

(****) S'il s'agit de fourrage grossier ou de fourrage de faible densité relative (du foin ou de la paille, par exemple), l'échantillon global doit peser au moins 1 kg.

▼ M9

7. EXIGENCES QUANTITATIVES CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS FINALS

Échantillons finals

L'analyse d'au moins un échantillon final est requise. La quantité de l'échantillon final destinée à l'analyse ne peut être inférieure aux valeurs suivantes:

Aliments solides	500 g (*) (**) (***) (****)
Aliments liquides ou semi-liquides	500 ml (*)

(*) Conformément aux dispositions du règlement (UE) n° 619/2011, l'échantillon final pour le contrôle de la présence de matériel génétiquement modifié doit contenir au moins 10 000 graines/semences. Cela signifie que l'échantillon final doit peser au moins 3 000 g pour le maïs et 2 000 g pour le soja. Pour d'autres graines ou semences telles que l'orge, le millet, l'avoine, le riz, le seigle, le blé et le colza, un échantillon final de 500 g correspond à plus de 10 000 graines/semences.

(**) Si la taille de l'échantillon global est nettement inférieure à 4 kg ou à 4 litres (voir les notes de bas de page du point 6), il est aussi permis d'en prélever une plus petite quantité pour constituer l'échantillon final, pour autant que cela soit décrit et documenté dans le rapport d'échantillonnage.

(***) En cas d'échantillonnage de légumineuses, de grains de céréales et de fruits à coque visant à déterminer la présence de résidus de pesticides, l'échantillon final doit peser au moins 1 kg, conformément aux dispositions de la directive 2002/63/CE de la Commission du 11 juillet 2002 fixant des méthodes communautaires de prélèvement d'échantillons pour le contrôle officiel des résidus de pesticides sur et dans les produits d'origine végétale et animale et abrogeant la directive 79/700/CEE (JO L 187 du 16.7.2002, p. 30).

(****) En cas d'examen visuel ou microscopique, l'échantillon final destiné à l'examen pèse 1 kg.

8. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE POUR LES LOTS DE TRÈS GRANDE TAILLE OU LES LOTS STOCKÉS OU TRANSPORTÉS DE TELLE MANIÈRE QU'UN ÉCHANTILLONNAGE DANS L'ENSEMBLE DU LOT N'EST PAS POSSIBLE

8.1. Principes généraux

Si le mode de transport ou de stockage d'un lot ne permet pas de prélever des échantillons élémentaires dans l'ensemble du lot, l'échantillonnage doit de préférence être effectué lorsque ce lot est en mouvement.

Dans le cas des grands entrepôts destinés au stockage d'aliments pour animaux, il convient d'encourager les opérateurs à installer dans l'entrepôt des équipements permettant de prélever (automatiquement) des échantillons dans l'ensemble du lot stocké.

Si les procédures d'échantillonnage prévues au présent point sont appliquées, l'exploitant du secteur de l'alimentation animale ou son représentant en sont informés. Si l'exploitant du secteur de l'alimentation animale ou son représentant remettent en cause la procédure d'échantillonnage, ils permettent à l'autorité compétente de prélever des échantillons dans l'ensemble du lot aux frais de l'exploitant.

8.2. Lots de grande taille transportés par bateau

8.2.1. *Échantillonnage dynamique de lots de grande taille transportés par bateau*

L'échantillonnage de lots de grande taille transportés par bateau est effectué de préférence lorsque le produit est en mouvement (échantillonnage dynamique).

L'échantillonnage doit être fait par cale (entité qui peut être physiquement séparée). Cependant, les cales sont vidées partiellement l'une après l'autre, de sorte que la séparation physique initiale n'existe plus après le transfert dans les installations de stockage. L'échantillonnage peut donc être réalisé en fonction de la séparation physique initiale ou en fonction de la séparation après transfert dans les installations de stockage.

▼ **M9**

Le déchargement d'un bateau peut durer plusieurs jours. Normalement, l'échantillonnage doit être effectué à intervalles réguliers tout au long du déchargement. Toutefois, la présence d'un inspecteur officiel chargé de l'échantillonnage pendant toute l'opération de déchargement n'est pas toujours possible ou appropriée. Par conséquent, la réalisation d'un échantillonnage sur une partie (portion échantillonnée) du lot est autorisée. Le nombre d'échantillons élémentaires est déterminé en tenant compte de la taille de la portion échantillonnée.

Si l'échantillonnage d'une partie d'un lot d'aliments pour animaux de la même catégorie ou correspondant à la même description révèle que cette partie du lot ne satisfait pas aux exigences de l'Union européenne, il est présumé que la totalité des aliments de ce lot est défectueuse, sauf si une évaluation détaillée n'a pas fourni d'éléments indiquant que le reste du lot ne répond pas aux exigences de l'Union européenne.

Même si l'échantillon officiel est prélevé automatiquement, la présence d'un inspecteur est nécessaire. Cependant, si l'échantillonnage automatique est effectué selon des paramètres préétablis qui ne peuvent être modifiés durant l'échantillonnage et si les échantillons élémentaires sont collectés dans un réceptacle scellé prévenant toute fraude, la présence d'un inspecteur n'est requise qu'au début de l'échantillonnage, chaque fois que le réceptacle contenant les échantillons doit être changé, ainsi qu'à la fin de l'échantillonnage.

8.2.2. *Échantillonnage statique de lots transportés par bateau*

Si l'échantillonnage est effectué de façon statique, la procédure prévue pour les installations de stockage (silos) accessibles par le haut doit être appliquée (voir le point 8.4.1).

L'échantillonnage doit être effectué sur la partie accessible (par le haut) du lot/de la cale. Le nombre d'échantillons élémentaires est déterminé en tenant compte de la taille de la portion échantillonnée. Si l'échantillonnage d'une partie d'un lot d'aliments pour animaux de la même catégorie ou correspondant à la même description révèle que cette partie du lot ne satisfait pas aux exigences de l'Union européenne, il est présumé que la totalité des aliments de ce lot est défectueuse, sauf si une évaluation détaillée n'a pas fourni d'éléments indiquant que le reste du lot ne répond pas aux exigences de l'Union européenne.

8.3. **Échantillonnage de lots de grande taille stockés dans des entrepôts**

L'échantillonnage doit être effectué sur la partie accessible du lot. Le nombre d'échantillons élémentaires est déterminé en tenant compte de la taille de la portion échantillonnée. Si l'échantillonnage d'une partie d'un lot d'aliments pour animaux de la même catégorie ou correspondant à la même description révèle que cette partie du lot ne satisfait pas aux exigences de l'Union européenne, il est présumé que la totalité des aliments de ce lot est défectueuse, sauf si une évaluation détaillée n'a pas fourni d'éléments indiquant que le reste du lot ne répond pas aux exigences de l'Union européenne.

8.4. **Échantillonnage dans des installations de stockage (silos)**

8.4.1. *Échantillonnage dans des silos (facilement) accessibles par le haut*

L'échantillonnage doit être effectué sur la partie accessible du lot. Le nombre d'échantillons élémentaires est déterminé en tenant compte de la taille de la portion échantillonnée. Si l'échantillonnage d'une partie d'un lot d'aliments pour animaux de la même catégorie ou correspondant à la même description révèle que cette partie du lot ne satisfait pas aux exigences de l'Union européenne, il est présumé que la totalité des aliments de ce lot est défectueuse, sauf si une évaluation détaillée n'a pas fourni d'éléments indiquant que le reste du lot ne répond pas aux exigences de l'Union européenne.

▼M9**8.4.2. Échantillonnage dans des silos inaccessibles par le haut (silos fermés)****8.4.2.1. Silos inaccessibles par le haut (silos fermés) d'une capacité supérieure à 100 tonnes**

Les aliments pour animaux entreposés dans des silos de ce type ne peuvent faire l'objet d'un échantillonnage statique. Par conséquent, si les aliments pour animaux entreposés dans le silo doivent faire l'objet d'un échantillonnage et s'il n'est pas possible de déplacer le lot, il doit être convenu avec l'opérateur qu'il informe l'inspecteur du moment où le silo sera déchargé afin de permettre l'échantillonnage des aliments en mouvement.

8.4.2.2. Silos inaccessibles par le haut (silos fermés) d'une capacité inférieure à 100 tonnes

La procédure d'échantillonnage consiste à transférer dans un réceptacle une quantité comprise entre 50 et 100 kg et à y prélever l'échantillon. La taille de l'échantillon global correspond au lot entier et le nombre d'échantillons élémentaires dépend de la quantité transférée du silo vers le réceptacle en vue de l'échantillonnage. Si l'échantillonnage d'une partie d'un lot d'aliments pour animaux de la même catégorie ou correspondant à la même description révèle que cette partie du lot ne satisfait pas aux exigences de l'Union européenne, il est présumé que la totalité des aliments de ce lot est défectueuse, sauf si une évaluation détaillée n'a pas fourni d'éléments indiquant que le reste du lot ne répond pas aux exigences de l'Union européenne.

8.5. Échantillonnage d'aliments pour animaux en vrac dans des conteneurs fermés de grande taille

Il est fréquent que de tels lots ne puissent faire l'objet d'un échantillonnage que quand ils sont déchargés. Dans certains cas, il est impossible de décharger ce type de conteneurs au point d'importation ou de contrôle; c'est pourquoi l'échantillonnage devrait avoir lieu lorsqu'ils sont déchargés.

9. INSTRUCTIONS CONCERNANT LE PRÉLÈVEMENT, LA PRÉPARATION ET LE CONDITIONNEMENT DES ÉCHANTILLONS**9.1. Généralités**

Prélever et préparer les échantillons sans délai indu en tenant compte des précautions requises pour éviter que le produit ne soit altéré ou contaminé. Les instruments, les surfaces et les récipients destinés à recevoir les échantillons doivent être propres et secs.

9.2. Échantillons élémentaires

Les échantillons élémentaires doivent être prélevés au hasard et uniformément répartis dans l'ensemble de la portion échantillonnée et être approximativement égaux en poids.

La taille minimale de l'échantillon élémentaire est de 100 g ou de 25 g dans le cas de fourrage grossier ou de fourrage de faible densité relative.

Si, conformément aux règles de la procédure d'échantillonnage établie au point 8, moins de 40 échantillons élémentaires doivent être prélevés, la taille des échantillons élémentaires doit être déterminée en fonction de la taille requise pour l'échantillon global à constituer (voir le point 6).

En cas d'échantillonnage de petits lots d'aliments pour animaux emballés sur lesquels, conformément aux exigences quantitatives, un nombre limité d'échantillons élémentaires doit être prélevé, le contenu d'une unité d'origine n'excédant pas 1 kg ou 1 litre constitue un échantillon élémentaire.

En cas d'échantillonnage d'aliments pour animaux emballés composés de petites unités (par exemple < 250 g), la taille de l'échantillon élémentaire dépend de la taille de l'unité.

▼ **M9**

En cas d'échantillonnage de marchandises vendues à distance, la taille de l'échantillon élémentaire dépend de la taille de l'unité et peut également être inférieure à 100 g ou 100 ml dans certains cas.

9.2.1. *Aliments en vrac*

Selon le cas, l'échantillonnage peut avoir lieu lors de la mise en mouvement de la portion échantillonnée (chargement ou déchargement).

9.2.2. *Aliments emballés*

Le nombre requis d'unités à échantillonner étant délimité comme indiqué au point 5, prélever une partie du contenu de chaque unité au moyen d'une sonde ou d'une pelle. Si nécessaire, prélever les échantillons après avoir vidé séparément les unités.

9.2.3. *Aliments liquides ou semi-liquides homogènes ou homogénéisables*

Le nombre requis d'unités à échantillonner étant délimité comme indiqué au point 5, effectuer un prélèvement dans chaque unité après en avoir homogénéisé le contenu, si nécessaire.

Les échantillons élémentaires peuvent être prélevés lors du soutirage du contenu.

9.2.4. *Aliments liquides ou semi-liquides non homogénéisables*

Le nombre requis d'unités à échantillonner étant délimité comme indiqué au point 5, prélever les échantillons à différents niveaux.

Les échantillons peuvent également être prélevés lors du soutirage du contenu, après élimination des premières fractions.

Dans les deux cas, le volume total prélevé ne peut être inférieur à 10 litres.

9.2.5. *Aliments en briques et pierres à lécher*

Le nombre requis de briques ou de pierres à échantillonner étant délimité comme indiqué au point 5, une partie de chaque brique ou pierre peut être prélevée. En cas de suspicion de non-homogénéité d'une brique ou d'une pierre, l'intégralité de cette dernière peut faire office d'échantillon.

Pour les briques ou pierres à lécher dont le poids unitaire n'excède pas 1 kg, une brique ou une pierre constituent un échantillon élémentaire.

9.3. **Préparation des échantillons globaux**

Mélanger les échantillons élémentaires pour constituer un seul échantillon global.

9.4. **Préparation des échantillons finals**

Mélanger soigneusement l'échantillon global ⁽¹⁾.

Introduire chaque échantillon dans un récipient/réceptacle approprié. Prendre toutes les précautions nécessaires pour éviter toute modification de la composition de l'échantillon ou toute contamination ou altération pouvant survenir au cours du transport ou du stockage.

9.4.1. *Substances réparties uniformément*

Pour le contrôle des constituants ou substances répartis uniformément dans les aliments pour animaux, l'échantillon global peut être réduit de façon représentative à 2,0 kg ou 2,0 litres au moins (échantillon réduit) ⁽²⁾, de préférence au moyen d'un diviseur mécanique ou automatique. Pour le contrôle de la présence de résidus de pesticides dans les légumineuses, les grains de céréales et les fruits à coque, la taille minimale

⁽¹⁾ Écraser tous les agrégats (si nécessaire, en les séparant de la masse et en réunissant ensuite le tout).

⁽²⁾ Sauf pour le fourrage grossier ou fourrage de faible densité relative.

▼M9

de l'échantillon réduit est de 3 kg. Si la nature des aliments pour animaux ne permet pas d'utiliser un diviseur ou si ce dernier n'est pas disponible, l'échantillon peut être réduit par la méthode des quartiers.

À partir de l'échantillon global ou des échantillons réduits, prélever des échantillons finals (à des fins de contrôle, de recours et éventuellement de référence) de quantité approximativement égale et conformes aux exigences quantitatives figurant au point 7.

9.4.2. *Substances réparties non uniformément*

En cas de contrôle des constituants, y compris le matériel génétiquement modifié, ou substances susceptibles d'être répartis non uniformément dans les aliments pour animaux, l'échantillon global est:

- i) complètement homogénéisé. Ensuite, à partir de l'échantillon global homogénéisé, prélever des échantillons finals (à des fins de contrôle, de recours et éventuellement de référence) de quantité approximativement égale et conformes aux exigences quantitatives figurant au point 7; ou
- ii) réduit à 2 kg ou 2 litres au moins ⁽¹⁾ au moyen d'un diviseur mécanique ou automatique. Si la nature des aliments pour animaux ne permet pas d'utiliser un diviseur, et dans ce cas uniquement, l'échantillon peut, si nécessaire, être réduit par la méthode des quartiers. Pour le contrôle de la présence de matériel génétiquement modifié dans le cadre du règlement (UE) n° 619/2011, l'échantillon réduit doit contenir au moins 35 000 graines/semences pour permettre d'obtenir des échantillons finals à des fins de contrôle, de recours et éventuellement de référence comportant au moins 10 000 graines/semences [voir la note de bas de page (**) au point 6 et la note de bas de page (*) au point 7].

À partir des échantillons réduits, prélever des échantillons finals de quantité approximativement égale et conformes aux exigences quantitatives figurant au point 7.

9.5. **Conditionnement des échantillons**

Sceller et étiqueter les récipients ou emballages de façon à ce qu'il soit impossible de les ouvrir sans briser le scellé. L'étiquette générale doit être incorporée dans le scellé. L'échantillon peut également être placé dans un récipient pouvant être fermé de manière à ce qu'il soit impossible de l'ouvrir sans endommager irréversiblement le réceptacle ou le contenant, afin d'éviter sa réutilisation.

9.6. **Envoi des échantillons au laboratoire**

Transmettre l'échantillon sans délai indu au laboratoire d'analyse désigné, avec les indications nécessaires à l'analyse.

10. **PROCÈS-VERBAL D'ÉCHANTILLONNAGE**

Pour chaque échantillon, établir un procès-verbal d'échantillonnage permettant d'identifier sans ambiguïté la portion échantillonnée et sa taille.

Mentionner également dans le procès-verbal tout écart par rapport à la procédure d'échantillonnage prévue par le présent règlement.

Mettre le procès-verbal à la disposition du laboratoire de contrôle officiel ainsi que de l'exploitant du secteur de l'alimentation animale et/ou du laboratoire désigné par ce dernier.

⁽¹⁾ Sauf pour le fourrage grossier ou fourrage de faible densité relative.

▼ M9

11. ÉCHANTILLON DE MARCHANDISES VENDUES À DISTANCE

- Pour un échantillon de marchandises vendues à distance, demander les aliments pour animaux à l'exploitant du secteur de l'alimentation animale au moyen d'une technique de communication à distance. Dans ce cas, lorsqu'elle demande des aliments pour animaux, l'autorité compétente ne doit pas décliner son identité officielle à l'exploitant du secteur de l'alimentation animale et peut utiliser une identité d'emprunt.
- L'échantillon global et les échantillons finals de l'échantillon de marchandises vendues à distance doivent être prélevés dès réception de l'envoi par les personnes habilitées à cet effet. Pour former l'échantillon global, un nombre adéquat d'échantillons élémentaires doit être prélevé au hasard et uniformément réparti dans la quantité totale obtenue et soigneusement mélangée/homogénéisée, conformément, dans la mesure du possible, aux principes énoncés au point 5 et aux points 9.2 et 9.3. Si les aliments pour animaux sont emballés dans des unités individuelles, au moins 4 unités doivent être obtenues desquelles au moins un échantillon élémentaire doit être prélevé. S'il devait être constaté, au cas par cas, que les unités obtenues proviennent de lots différents, les échantillons devraient être prélevés dans un nombre d'unités réduites correspondant aux unités provenant du même lot. Lorsque l'analyse de l'échantillon de marchandises vendues à distance concerne la recherche de constituants ou de substances qui ne sont pas répartis uniformément dans les aliments pour animaux, le nombre d'échantillons élémentaires doit être au moins 2,5 fois supérieur à celui des échantillons analysés pour des substances uniformément répartie dans les aliments pour animaux.

Les échantillons finals correspondants sont alors prélevés (à des fins de contrôle, de recours et éventuellement de référence) sur l'échantillon global conformément, dans la mesure du possible, aux principes énoncés au point 9.4 et le procès-verbal d'échantillonnage indique que l'échantillon est un échantillon de marchandises vendues à distance. L'autorité compétente informe alors immédiatement l'exploitant du secteur de l'alimentation animale de l'échantillonnage. L'exploitant du secteur de l'alimentation animale est aussi informé qu'un échantillon est tenu, quand c'est possible, à sa disposition par l'autorité compétente dans un endroit spécifié à des fins de recours ou qu'il est envoyé à l'exploitant du secteur de l'alimentation animale ou au laboratoire désigné par l'exploitant du secteur de l'alimentation animale conformément aux règles nationales en vigueur.

Si l'échantillon est envoyé directement au laboratoire officiel, l'échantillon final doit être préparé et scellé au laboratoire par des personnes habilitées à cet effet ou en présence de personnes habilitées à cet effet. Le procès-verbal d'échantillonnage de l'échantillon de marchandises vendues à distance doit être envoyé immédiatement après la formation des échantillons finals à l'autorité compétente, qui informe l'exploitant du secteur de l'alimentation animale de l'échantillonnage.

On estime que la quantité fournie par l'exploitant du secteur de l'alimentation animale à l'autorité compétente représente une partie d'un lot d'aliments pour animaux de la même catégorie ou correspondant à la même description. Conformément à l'article 15 du règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil ⁽¹⁾, si cette partie du lot est identifiée comme ne satisfaisant pas aux prescriptions de l'Union européenne, il est présumé, dans le cas d'un échantillon de marchandises vendues à distance aussi, que la totalité des aliments pour animaux de ce lot est défectueuse, sauf si une évaluation détaillée montre qu'il n'y a pas de preuve que le reste du lot ne satisfait pas aux exigences de l'Union européenne.

⁽¹⁾ Règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires (JO L 31 du 1.2.2002, p. 1).

▼ **M9***ANNEXE II***DISPOSITIONS GÉNÉRALES CONCERNANT LES MÉTHODES D'ANALYSE DES ALIMENTS POUR ANIMAUX****A. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS EN VUE DE L'ANALYSE****1. Objet**

Les procédures décrites dans la présente annexe portent sur la préparation, en vue de leur analyse, des échantillons envoyés aux laboratoires de contrôle après leur prélèvement conformément aux dispositions de l'annexe I.

La préparation des échantillons de laboratoire doit permettre que les prises d'essais prévues dans les méthodes d'analyse soient homogènes et représentatives des échantillons finals.

Outre les procédures décrites dans la présente annexe, les lignes directrices pour la préparation des échantillons établies par la norme EN ISO 6498 doivent être suivies.

2. Précautions à prendre

La procédure à suivre pour préparer des échantillons dépend des méthodes d'analyse à appliquer et des constituants ou substances à contrôler. Il est donc essentiel que la procédure suivie en la matière soit adaptée à la méthode d'analyse appliquée ainsi qu'aux constituants ou substances à contrôler.

Effectuer toutes les opérations de façon à éviter autant que possible une contamination de l'échantillon ou des modifications de sa composition.

Effectuer les broyages, les mélanges et les tamisages sans délai, en exposant au minimum l'échantillon à l'air et à la lumière. Éviter l'utilisation de moulins ou de broyeurs susceptibles de produire un échauffement notable de l'échantillon.

Le broyage manuel est recommandé pour les aliments particulièrement sensibles à la chaleur. Veiller, en outre, à ce que l'appareillage même ne soit pas une source de contamination.

Homogénéiser l'échantillon en le mélangeant à de l'eau pour en faire une pâte au moyen d'un broyeur à fort taux de cisaillement permet dans certains cas d'obtenir des sous-échantillons plus homogènes que l'homogénéisation ou le broyage à sec, en particulier pour les substances chimiques réparties de manière hétérogène. Néanmoins, l'homogénéisation par broyage à sec suffisant peut aussi donner des sous-échantillons homogènes.

Dans certains cas, comme pour le dosage de l'ergot de seigle, d'impuretés botaniques nuisibles, etc., l'échantillon ne peut être homogénéisé par broyage, mais par un mélange suffisant.

Si la préparation entraîne inévitablement une modification significative de la teneur en humidité de l'échantillon, déterminer sa teneur en humidité avant et après la préparation selon la méthode prévue au point A de l'annexe III.

3. Mode opératoire**3.1. Procédure générale**

L'aliquote de test est prélevée sur l'échantillon homogénéisé final. La méthode des quartiers opposés n'est pas recommandée, car elle peut aboutir à des aliquotes de test présentant une erreur de division élevée.

▼ M9**3.1.1. Aliments pouvant être moulus en l'état**

- Mélanger l'échantillon final et le recueillir dans un récipient approprié, propre et sec, muni d'une fermeture hermétique. Mélanger de nouveau pour garantir une homogénéisation complète, immédiatement avant de prélever la prise d'essai (aliquote de test).

3.1.2. Aliments pouvant être moulus après dessiccation

- Sauf indication spécifique dans les méthodes d'analyse, dessécher l'échantillon, de façon à ramener sa teneur en humidité à un niveau compris entre 8 et 12 %, en appliquant le procédé de prédessiccation décrit au point 4.3 de la méthode de dosage de l'humidité mentionnée au point A de l'annexe III. Procéder ensuite comme indiqué au point 3.1.1.

3.1.3. Aliments liquides ou semi-liquides

- Recueillir l'échantillon final dans un récipient approprié, propre et sec, muni d'une fermeture hermétique. Mélanger soigneusement pour garantir une homogénéisation complète, immédiatement avant de prélever la prise d'essai (aliquote de test).

3.1.4. Autres aliments

- Si l'échantillon final ne peut être préparé selon l'un des procédés indiqués ci-dessus, appliquer tout autre procédé de préparation approprié permettant d'obtenir des prises d'essai (aliquotes de test) homogènes et représentatives des échantillons finals.

3.2. *Procédure spécifique en cas d'examen visuel ou microscopique ou dans les cas où l'échantillon global est entièrement homogénéisé*

- En cas d'examen visuel (sans microscope), l'échantillon global ou final est examiné dans son intégralité.
- En cas d'examen au microscope, le laboratoire peut réduire l'échantillon global ou réduire encore davantage l'échantillon réduit. Les échantillons finals destinés à des fins de recours et, éventuellement, à des fins de référence sont prélevés selon une procédure équivalente à la procédure appliquée pour prélever l'échantillon final destiné à des fins de contrôle.
- Si l'échantillon global est entièrement homogénéisé, les échantillons finals sont prélevés sur l'échantillon global homogénéisé.
- Pour le dosage de l'ergot de seigle et des impuretés botaniques nuisibles, l'échantillon final doit être divisé en deux sous-échantillons d'un poids égal approximatif de 500 grammes. Un sous-échantillon est examiné. Si le résultat des sous-échantillons est inférieur ou égal à 50 % (seuil analytique) de la teneur maximale, l'échantillon est conforme à la teneur maximale. Si le résultat est supérieur à 50 % de la teneur maximale, un autre sous-échantillon doit être examiné et la moyenne des résultats des deux sous-échantillons est utilisée pour vérifier la conformité avec la teneur maximale.

4. Conservation et stockage des échantillons

Conserver les échantillons à une température ne pouvant modifier leur composition. Conserver les échantillons destinés à l'analyse de vitamines ou de substances particulièrement sensibles à la lumière dans des conditions telles qu'ils ne soient pas altérés par la lumière.

▼ **M9****B. DISPOSITIONS CONCERNANT LES RÉACTIFS ET L'APPAREILLAGE UTILISÉS DANS LES MÉTHODES D'ANALYSE**

1. Sauf indication spécifique dans les méthodes d'analyse, tous les réactifs doivent être de qualité «pour analyse» (p.a.). Pour l'analyse des oligo-éléments, la pureté des réactifs doit être contrôlée par un essai à blanc. Selon le résultat obtenu, une purification supplémentaire des réactifs peut être requise.
2. Les opérations de mise en solution, de dilution, de rinçage ou de lavage mentionnées dans les méthodes d'analyse sans indication quant à la nature du solvant ou du diluant impliquent qu'il faut utiliser de l'eau. En règle générale, l'eau doit être déminéralisée ou distillée. Dans des cas particuliers, indiqués dans les méthodes d'analyse, elle doit être soumise à des procédés spécifiques de purification.
3. Compte tenu de l'équipement usuel des laboratoires de contrôle, seuls les instruments et appareils spéciaux ou devant répondre à des conditions spécifiques sont mentionnés dans les méthodes d'analyse. Ce matériel doit être propre, tout particulièrement pour les déterminations de très faibles quantités de substances.

C. APPLICATION DES MÉTHODES D'ANALYSE ET EXPRESSION DES RÉSULTATS**1. Procédé d'extraction**

Plusieurs méthodes déterminent un procédé d'extraction spécifique. En règle générale, des procédés d'extraction autres que celui visé dans la méthode peuvent être appliqués à condition que le procédé d'extraction appliqué ait une efficacité d'extraction équivalente avérée, pour la matrice analysée, à celle du procédé mentionné dans la méthode.

2. Procédé de purification

Plusieurs méthodes déterminent un procédé de purification spécifique. En règle générale, des procédés de purification autres que celui visé dans la méthode peuvent être appliqués, à condition qu'il soit prouvé que le procédé de purification appliqué donne des résultats d'analyse équivalents, pour la matrice analysée, à ceux que donne le procédé mentionné dans la méthode.

3. Nombre de déterminations

Si, lors de l'analyse de substances indésirables, le résultat de la première détermination est nettement ($> 50\%$) inférieur à la spécification à contrôler, il n'est pas nécessaire de procéder à une détermination supplémentaire, à condition que les procédures appropriées en matière de qualité aient été suivies. Dans les autres cas, une double analyse (deuxième détermination) est nécessaire pour exclure la possibilité d'une contamination croisée interne ou un mélange accidentel des échantillons. La moyenne des deux déterminations analytiques sert à approfondir l'évaluation.

Si, lors du contrôle des teneurs minimales ou maximales en additifs pour l'alimentation animale, le résultat de la première détermination est supérieur à la teneur minimale ou inférieure à la teneur maximale, il n'est pas nécessaire de procéder à une détermination supplémentaire, à condition que les procédures appropriées en matière de qualité aient été suivies. Dans les autres cas, une double analyse (deuxième détermination) est nécessaire pour exclure la possibilité d'une contamination croisée interne ou un mélange accidentel des échantillons. La moyenne des deux déterminations analytiques sert à approfondir l'évaluation.

Si, lors du contrôle de la teneur déclarée en une substance ou un ingrédient donné, le résultat de la première détermination confirme l'exactitude de la teneur déclarée (ce qui signifie que l'écart entre le résultat de l'analyse et la teneur déclarée se situe dans la plage admissible), il n'est pas nécessaire de procéder à des déterminations supplémentaires, à

▼ **M9**

condition que les procédures appropriées en matière de qualité aient été suivies. Dans les autres cas, une double analyse (deuxième détermination) est nécessaire pour exclure la possibilité d'une contamination croisée interne ou un mélange accidentel des échantillons. La moyenne des deux déterminations analytiques sert à approfondir l'évaluation (l'écart entre le résultat de l'analyse et la teneur déclarée se situe dans la plage admissible).

Dans certains cas, l'écart admissible est défini par la législation, par exemple par le règlement (CE) n° 767/2009 et le règlement (UE) 2019/4 du Parlement européen et du Conseil ⁽¹⁾.

4. Mention de la méthode d'analyse appliquée

Le bulletin d'analyse doit mentionner la méthode d'analyse appliquée.

5. Indication du résultat de l'analyse

Le résultat de l'analyse doit être exprimé conformément aux indications données dans la méthode d'analyse avec un nombre approprié de chiffres significatifs, et être corrigé, si nécessaire, en fonction de la teneur en humidité de l'échantillon final avant sa préparation.

La plupart des teneurs réglementaires (la teneur maximale et la teneur minimale, par exemple) fixées par la législation de l'UE en matière d'alimentation animale se rapportent à des aliments pour animaux ayant une teneur en humidité de 12 %. Par conséquent, dans ces cas, pour évaluer le résultat de l'analyse effectuée sur l'échantillon au regard de la teneur réglementaire, le résultat de l'analyse doit d'abord être divisé par la teneur en matière sèche de l'échantillon (en %) et multiplié par 88, comme indiqué dans la formule suivante:

$$R_{12\%} = \frac{88 \times R_{ana}}{100 - Mc}$$

où:

Mc : teneur en humidité de l'échantillon (en %). 100 – *Mc* équivaut donc à la teneur en matière sèche de l'échantillon (en %).

R_{ana} : résultat de l'analyse tel que mesuré sur l'échantillon.

R_{12 %} : résultat pour un aliment ayant une teneur en humidité de 12 %; à évaluer au regard de la teneur réglementaire.

En outre, si les conditions suivantes sont remplies:

- le résultat de l'analyse est nettement (> 50 %) inférieur ou supérieur à la spécification/mention d'étiquetage à contrôler (selon que la spécification/mention d'étiquetage est une teneur maximale ou minimale),
- la teneur en humidité des aliments pour animaux échantillonnés est connue et il est possible de déterminer que la correction par la teneur en humidité ne changera pas l'évaluation,

et à condition que les procédures appropriées en matière de qualité aient été suivies et que l'analyse vise uniquement à contrôler si les dispositions légales sont respectées, la correction par la teneur en humidité peut alors être omise (par exemple quand il n'y a pas de spécification ou de teneur réglementaire), sauf si elle est requise pour l'interprétation des résultats.

Si le résultat de l'analyse est corrigé en fonction de la teneur en humidité, l'incertitude de mesure correspondante doit aussi être corrigée avec la même procédure.

⁽¹⁾ Règlement (UE) 2019/4 du Parlement européen et du Conseil du 11 décembre 2018 concernant la fabrication, la mise sur le marché et l'utilisation d'aliments médicamenteux pour animaux, modifiant le règlement (CE) n° 183/2005 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 90/167/CEE du Conseil (JO L 4 du 7.1.2019, p. 1).

▼ M9

En cas de dosage de l'ergot de seigle ou d'impuretés botaniques nuisibles par examen microscopique/visuel, il n'est pas nécessaire de corriger par la teneur en humidité.

6. Incertitude de mesure de l'analyse et taux de récupération en cas d'analyse de substances indésirables

En ce qui concerne les substances indésirables au sens de la directive 2002/32/CE, un produit destiné à l'alimentation animale est considéré comme ne satisfaisant pas à la teneur maximale fixée lorsque le résultat de l'analyse, qui est la moyenne de deux déterminations indépendantes, rapporté à un aliment d'une teneur en humidité de 12 %, est jugé supérieur à la teneur maximale, compte tenu de l'incertitude de mesure élargie calculée au moyen d'un facteur d'élargissement de 2 donnant un niveau de confiance d'environ 95 % et de la correction de la récupération. La concentration analysée, corrigée au titre de la récupération et après soustraction de l'incertitude de mesure élargie, est donc utilisée pour l'évaluation de la conformité. Ce procédé est applicable uniquement dans les cas où la méthode d'analyse autorise l'estimation de l'incertitude de mesure et de la correction de la récupération (ce qui n'est pas requis, par exemple, dans le cas d'une analyse microscopique/visuelle).

Si le résultat de l'analyse de l'échantillon prélevé à des fins de recours dépasse la teneur maximale (compte non tenu de l'incertitude de mesure élargie), il confirme la non-conformité constatée avec l'échantillon témoin, en l'absence de règles nationales spécifiques en la matière.

Le résultat de l'analyse est rapporté comme suit (lorsque la méthode d'analyse appliquée permet d'estimer l'incertitude de mesure élargie):

- a) corrigé au titre de la récupération, le cas échéant et s'il y a lieu, et le taux de récupération doit être indiqué. Le taux de récupération doit être indiqué, sauf si la correction intrinsèque pour biais fait partie de la procédure, le biais étant la différence entre la valeur mesurée et la concentration de référence. La correction de la récupération n'est pas nécessaire lorsque le taux de récupération est compris entre 90 et 110 %;
- b) sous la forme «x +/- U», où x est le résultat de l'analyse et U l'incertitude de mesure élargie, calculée à l'aide d'un facteur d'élargissement de 2 ⁽¹⁾ qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %.

Néanmoins, si le résultat de l'analyse est nettement (> 50 %) inférieur à la spécification à contrôler, et à condition que les procédures appropriées en matière de qualité aient été suivies et que l'analyse vise uniquement à contrôler si les dispositions légales sont respectées, la mention du taux de récupération et de l'incertitude de mesure élargie peut être omise (par exemple quand il n'y a pas de spécification ou de teneur réglementaire), sauf si l'incertitude de mesure est requise pour l'interprétation des résultats.

7. Incertitude de mesure de l'analyse et taux de récupération en cas d'analyse de la teneur en additifs pour l'alimentation animale

Aux fins du contrôle de la conformité avec les teneurs minimales et maximales autorisées en additifs pour l'alimentation animale, la présence d'un additif pour l'alimentation animale est considérée comme ne satisfaisant pas aux teneurs minimale et maximale fixées lorsque le résultat de l'analyse, qui est la moyenne de deux déterminations indépendantes, rapporté à un aliment d'une teneur en humidité de 12 %, est jugé:

- supérieur à la teneur maximale, compte tenu de l'incertitude de mesure élargie et de la correction de la récupération. La concentration analysée

⁽¹⁾ L'intervalle de confiance de 95 % peut être atteint en utilisant un autre facteur, tel le facteur de Student.

▼ M9

(soit la moyenne de deux déterminations analytiques), corrigée au titre de la récupération et après soustraction de l'incertitude de mesure élargie, est donc utilisée pour l'évaluation de la conformité,

- inférieur à la teneur minimale, compte tenu de l'incertitude de mesure élargie et de la correction de la récupération. La concentration analysée (soit la moyenne de deux déterminations analytiques), corrigée au titre de la récupération et après addition de l'incertitude de mesure élargie, est donc utilisée pour l'évaluation de la conformité.

Si le résultat de l'analyse de l'échantillon prélevé à des fins de recours dépasse la teneur maximale (compte non tenu de l'incertitude de mesure élargie), il confirme la non-conformité constatée avec l'échantillon témoin, en l'absence de règles nationales spécifiques en la matière.

Le résultat de l'analyse est rapporté comme suit (lorsque la méthode d'analyse appliquée permet d'estimer l'incertitude de mesure élargie):

- a) corrigé au titre de la récupération, le cas échéant et s'il y a lieu, et le taux de récupération doit être indiqué. Le taux de récupération doit être indiqué, sauf si la correction intrinsèque pour biais fait partie de la procédure, le biais étant la différence entre la valeur mesurée et la concentration de référence. La correction de la récupération n'est pas nécessaire lorsque le taux de récupération est compris entre 90 et 110 %;
- b) sous la forme « $x \pm U$ », où x est le résultat de l'analyse (moyenne de deux déterminations analytiques) et U l'incertitude de mesure élargie, calculée à l'aide d'un facteur d'élargissement de 2 ⁽¹⁾ qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %.

⁽¹⁾ L'intervalle de confiance de 95 % peut être atteint en utilisant un autre facteur, tel le facteur de Student.

▼ **M9***ANNEXE III***MÉTHODES D'ANALYSE RELATIVES AU CONTRÔLE DE LA COMPOSITION DES MATIÈRES PREMIÈRES POUR ALIMENTS DES ANIMAUX ET DES ALIMENTS COMPOSÉS****A. DOSAGE DE L'HUMIDITÉ****1. Objet et champ d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en humidité des aliments pour animaux. Dans le cas d'aliments pour animaux contenant des substances volatiles telles que des acides organiques, il a été observé qu'un nombre significatif de substances volatiles était dosée en même temps que la teneur en humidité.

Elle ne concerne pas l'analyse des produits laitiers en tant que matières premières pour aliments des animaux et aliments composés essentiellement composés de produits laitiers, l'analyse des graisses et des huiles animales et végétales, ni l'analyse des graines et des fruits oléagineux.

La teneur en humidité des graines oléagineuses doit être dosée au moyen de la méthode établie par la norme EN ISO 665 «Graines oléagineuses — Détermination de la teneur en eau et en matières volatiles», étant entendu que le soja doit être broyé avant la détermination de la teneur en humidité.

2. Principe

L'échantillon est soumis à la dessiccation dans des conditions définies, variant en fonction de la nature de l'aliment pour animaux. La perte de poids est déterminée par pesée. Il est nécessaire de procéder à une prédessiccation lorsqu'il s'agit d'aliments solides qui ont une teneur en humidité élevée.

3. Appareillage

- 3.1. Broyeur construit en matériau n'absorbant pas l'humidité, facile à nettoyer, permettant un broyage rapide et uniforme sans provoquer d'échauffement sensible, évitant au maximum le contact avec l'air extérieur et permettant de satisfaire aux exigences énoncées aux points 4.1.1 et 4.1.2 (par exemple, microbroyeurs à marteaux ou à refroidissement à eau, moulins à cônes démontables, broyeurs à mouvement lent ou à disques dentés).
- 3.2. Balance d'analyse d'une précision de 1 mg.
- 3.3. Récipients secs en métal inoxydable ou en verre munis d'un couvercle hermétique; surface utile permettant d'obtenir une répartition de la prise d'essai de 0,3 g par cm².
- 3.4. Étuve isotherme (± 2 °C) à chauffage électrique, assurant une régulation rapide de la température et convenablement ventilée⁽¹⁾.
- 3.5. Étuve à vide, à chauffage électrique réglable, munie d'une pompe à huile et soit d'un dispositif à introduction d'air chaud déshydraté, soit d'un déshydratant (par exemple, de l'oxyde de calcium).
- 3.6. Dessiccateur à plaque en métal ou en porcelaine, épaisse, perforée, contenant un déshydratant efficace.

⁽¹⁾ Pour la dessiccation des céréales, des farines, des gruaux et des semoules, l'étuve doit avoir une capacité calorifique telle que, réglée préalablement à une température de 131 °C, elle puisse de nouveau atteindre cette température moins de 45 minutes après la mise en place du nombre maximal de prises d'essai à sécher simultanément. Elle doit avoir une ventilation telle que, en séchant pendant deux heures toutes les prises d'essai de froment tendre qu'elle peut contenir, les résultats présentent une différence inférieure à 0,15 % par rapport aux résultats obtenus après quatre heures de séchage.

▼ M9**4. Mode opératoire**

NB: Les opérations décrites au présent point doivent être effectuées immédiatement après l'ouverture des emballages contenant les échantillons. Les analyses doivent être effectuées au moins en double.

4.1. Préparation**4.1.1. Aliments pour animaux autres que ceux visés aux points 4.1.2 et 4.1.3**

Prélever au moins 50 g de l'échantillon. Si nécessaire, broyer ou diviser de façon appropriée pour éviter toute variation de la teneur en humidité (voir le point 6).

4.1.2. Céréales et gruaux

Prélever au moins 50 g de l'échantillon. Moudre en particules dont au moins 50 % passent par un tamis à mailles de 0,5 mm et ne laissent pas plus de 10 % de refus sur le tamis à mailles rondes de 1 mm.

4.1.3. Aliments liquides ou pâteux, aliments constitués essentiellement de matières grasses

Prélever et peser, à 10 mg près, 25 g environ de l'échantillon, y ajouter une quantité appropriée de sable anhydre, pesée à 10 mg près, et mélanger jusqu'à obtention d'un produit homogène.

4.2. Dessiccation

Sécher un récipient (point 3.3) muni de son couvercle dans l'étuve à une température de 103 °C pendant 30 minutes +/- 1 minute. L'enlever de l'étuve et le laisser refroidir à température ambiante dans le dessiccateur (point 3.6).

4.2.1. Aliments pour animaux autres que ceux visés aux points 4.2.2 et 4.2.3

Tarer, à 1 mg près, le récipient muni de son couvercle. Peser, à 1 mg près, dans le récipient taré 5 g environ de l'échantillon et répartir uniformément la prise d'essai. Placer le récipient, sans son couvercle, dans l'étuve préchauffée à 103 °C. Pour éviter que la température de l'étuve ne descende trop, introduire le récipient en un minimum de temps. Laisser sécher durant 4 heures à partir du moment où l'étuve a de nouveau atteint la température de 103 °C. Ouvrir l'étuve, remettre immédiatement le couvercle sur le récipient, retirer celui-ci de l'étuve, laisser refroidir 30 à 45 minutes dans le dessiccateur (point 3.6) et peser à 1 mg près.

Dans le cas des aliments constitués essentiellement (> 50 %) d'huiles et graisses d'origine animale et végétale, effectuer une dessiccation complémentaire de 30 minutes dans l'étuve à 103 °C. L'écart entre les deux pesées ne peut excéder 0,1 % d'humidité.

4.2.2. Céréales, farines, gruaux et semoules

Tarer, à 0,5 mg près, le récipient muni de son couvercle. Peser, à 1 mg près, dans le récipient taré 5 g environ de l'échantillon broyé et répartir uniformément la prise d'essai. Placer le récipient, sans son couvercle, dans l'étuve préchauffée à 130 °C. Pour éviter que la température de l'étuve ne descende trop, introduire le récipient en un minimum de temps. Laisser sécher durant 2 heures à partir du moment où l'étuve a de nouveau atteint la température de 130 °C. Ouvrir l'étuve, remettre immédiatement le couvercle sur le récipient, retirer celui-ci de l'étuve, laisser refroidir 30 à 45 minutes dans le dessiccateur (point 3.6) et peser à 1 mg près.

▼ **M9**

- 4.2.3. Aliments composés pour animaux contenant plus de 4 % de saccharose ou de lactose: matières premières pour aliments des animaux tels que caroube, produits céréaliers hydrolysés, germes de malt, cossettes de betteraves, solubles de poisson et sucres

Tarer, à 0,5 mg près, le récipient muni de son couvercle. Peser, à 1 mg près, dans le récipient taré 5 g environ de l'échantillon et répartir uniformément la prise d'essai. Placer le récipient, sans son couvercle, dans l'étuve à vide (point 3.5) préchauffée à une température comprise entre 80 et 85 °C. Pour éviter que la température de l'étuve ne descende trop, introduire le récipient en un minimum de temps.

Amener la pression à 100 torrs et laisser sécher à cette pression durant 4 heures, soit sous un courant d'air sec et chaud, soit à l'aide d'un déshydratant (300 g environ pour 20 échantillons). Dans ce dernier cas, couper la connexion avec la pompe à vide lorsque la pression prescrite est atteinte. Compter la durée de séchage à partir du moment où l'étuve a de nouveau atteint la température de 80 à 85 °C. Ramener ensuite avec précaution l'étuve à la pression atmosphérique. Ouvrir l'étuve, remettre immédiatement le couvercle sur le récipient, retirer le récipient de l'étuve, laisser refroidir durant 30 à 45 minutes dans le dessiccateur (point 3.6) et peser à 1 mg près. Procéder à une dessiccation complémentaire de 30 minutes dans l'étuve à vide à la température de 80 à 85 °C et peser de nouveau. L'écart entre les deux pesées ne peut excéder 0,1 % d'humidité.

- 4.3. *Prédessiccation (partielle)*

Il est nécessaire d'effectuer une dessiccation partielle des aliments «humides» ayant une fraction massique inférieure à 85 % de matière sèche [par exemple, le fourrage, les rations uniques et les aliments (non) liquides] avant de les broyer finement afin d'analyser leurs substances stables; la dessiccation partielle des substances instables n'est pas possible.

La dessiccation partielle peut être effectuée soit au moyen d'une étuve à air pulsé ou à micro-ondes, soit par cryodessiccation. Sauf dans le cas de la dessiccation partielle par cryodessiccation, l'objectif est de dessécher l'aliment tout en gardant la température de l'échantillon en dessous de 60 °C de manière à altérer le moins possible sa composition chimique. La dessiccation à des températures supérieures à 60 °C entraîne des modifications chimiques dans l'aliment (telles qu'une dégradation des protéines). On maintient l'aliment desséché à température ambiante pendant environ 15 minutes avant de mesurer la matière partiellement sèche de manière à minimiser le changement d'humidité pouvant subvenir pendant le broyage et le stockage. La dessiccation à des températures inférieures à 60 °C n'enlève pas toute l'eau de l'aliment; par conséquent, la dessiccation partielle (initiale) ne permet pas d'obtenir la matière sèche totale de l'aliment. Après dessiccation, le sous-échantillon est broyé et la matière sèche (finale) de l'échantillon partiellement sec est analysée (l'humidité résiduelle représentant de 3 à 15 %) lorsque les autres constituants chimiques sont déterminés.

Par conséquent, une procédure en deux étapes de détermination de la matière sèche est recommandée. Il faut d'abord déterminer la teneur en matière sèche partielle (s'il y a moins de 85 % de matière sèche), ensuite déterminer la teneur résiduelle en matière sèche sur une prise d'essai broyée et multiplier la matière sèche partielle par la matière sèche résiduelle pour déterminer la teneur en matière sèche totale.

5. **Calcul des résultats**

La teneur en humidité (X), exprimée en pourcentage de l'échantillon, est donnée par les formules suivantes:

▼ M95.1. *Dessiccation sans prédessiccation*

$$X = \left(\frac{m - m_0}{m} \right) \times 100$$

où:

m = poids initial, en grammes, de la prise d'essai,

m_0 = poids, en grammes, de la prise d'essai sèche.

5.2. *Dessiccation avec prédessiccation* ⁽¹⁾

$$X_p = \left[\frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left(1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right)$$

où:

m = poids initial, en grammes, de la prise d'essai,

m_1 = poids, en grammes, de la prise d'essai après prédessiccation,

m_2 = poids, en grammes, de la prise d'essai après broyage ou mouture,

m_0 = poids, en grammes, de la prise d'essai sèche.

5.3. *Répétabilité*

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur un même échantillon ne peut dépasser 0,2 % de l'humidité (valeur absolue), sauf pour les aliments humides pour animaux et les objets à mâcher pour chiens, pour lesquels la différence ne peut dépasser 0,5 % de l'humidité (valeur absolue).

6. **Observation**

Si un broyage se révèle nécessaire et s'il s'avère que celui-ci entraîne une variation de la teneur en humidité du produit, les résultats de l'analyse des composants de l'aliment doivent être corrigés en fonction de la teneur en humidité de l'échantillon initial.

B. DOSAGE DE L'HUMIDITÉ DANS LES GRAISSES ET LES HUILES ANIMALES ET VÉGÉTALES

1. **Objet et champ d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en humidité (eau et autres matières volatiles) des graisses et des huiles animales et végétales.

2. **Principe**

L'échantillon est soumis à la dessiccation à 103 °C jusqu'à cessation de la diminution de la masse (la perte de masse entre deux pesées successives doit être inférieure ou égale à 1 mg). La perte de poids est déterminée par pesée.

3. **Appareillage**

3.1. Récipient à fond plat, en matériau résistant à la corrosion, d'un diamètre de 8 à 9 cm et d'une hauteur de 3 cm environ.

3.2. Thermomètre, avec bulbe renforcé, et chambre de dilatation à l'extrémité supérieure, gradué de 80 °C environ à 110 °C au moins, d'une longueur de 10 cm environ.

3.3. Bain de sable ou plaque chauffante électrique.

⁽¹⁾ Pour de plus amples informations sur le calcul, consulter la norme EN ISO 6498 «Aliments des animaux — Lignes directrices pour la préparation des échantillons».

▼ M9

3.4. Dessiccateur, contenant un déshydratant efficace.

3.5. Balance d'analyse.

4. **Mode opératoire**

Peser, à 1 mg près, 20 g de l'échantillon homogénéisé dans le récipient (point 3.1) sec et taré contenant le thermomètre (point 3.2). Chauffer sur le bain de sable ou la plaque chauffante (point 3.3), en agitant constamment à l'aide du thermomètre, de façon que la température atteigne 90 °C en 7 minutes environ.

Réduire l'intensité du chauffage en suivant la fréquence avec laquelle les bulles montent du fond du récipient. La température ne doit pas dépasser 105 °C. Continuer à agiter en raclant le fond du récipient jusqu'à cessation de la formation de bulles.

Pour assurer l'élimination complète de l'humidité, répéter à plusieurs reprises le chauffage à 103 °C ± 2 °C, en refroidissant à 93 °C entre les chauffages successifs. Laisser refroidir ensuite dans le dessiccateur (point 3.4) jusqu'à température ambiante et peser. Répéter cette opération jusqu'à ce que la perte de poids entre deux pesées successives n'excède plus 2 mg.

NB: Une augmentation de poids de l'échantillon après chauffage répété indique une oxydation de la graisse. Si cela se produit, calculer le résultat à partir de la pesée effectuée immédiatement avant le début de l'augmentation de poids.

5. **Calcul des résultats**

La teneur en humidité (X), exprimée en pourcentage de l'échantillon, est donnée par la formule suivante:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

où:

m = poids, en grammes, de la prise d'essai,

m_1 = poids, en grammes, du récipient avec son contenu, avant le chauffage,

m_2 = poids, en grammes, du récipient avec son contenu, après le chauffage.

Les résultats inférieurs à 0,05 % doivent être rapportés par la mention «moins de 0,05 %».

Répétabilité

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur un même échantillon ne peut dépasser 0,1 % en valeur absolue.

C. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN AZOTE ET CALCUL DE LA TENEUR EN PROTÉINES BRUTES

1. **Objet et champ d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en protéines brutes des aliments pour animaux à partir de la teneur en azote dosée selon la méthode de Kjeldahl ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ La teneur N peut être déterminée dans tous les aliments pour animaux, mais le facteur de conversion de 6,25 servant à calculer la teneur en protéines brutes peut ne pas convenir pour les matières premières pour aliments des animaux à base d'insectes (facteur de conversion inférieur) ni pour certains aliments pour animaux de compagnie et les protéines du plasma sanguin (facteur de conversion supérieur).

▼ **M9****2. Principe**

L'échantillon est minéralisé à l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur. La solution acide est alcalinisée par une solution d'hydroxyde de sodium. L'ammoniac est entraîné par distillation et recueilli dans une quantité déterminée d'acide sulfurique dont l'excès est titré par une solution étalon d'hydroxyde de sodium.

Autre possibilité: l'ammoniac libéré est distillé dans un excès de solution d'acide borique, après quoi l'ammoniac combiné avec l'acide borique est titré par une solution d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique.

3. Réactifs

- 3.1. Sulfate de potassium.
- 3.2. Catalyseur: oxyde de cuivre (II) CuO ou sulfate de cuivre (II) pentahydraté $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 3.3. Zinc en granulés.
- 3.4. Acide sulfurique, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3.5. Acide sulfurique, solution étalon volumétrique, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.6. Acide sulfurique, solution étalon volumétrique, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Acide sulfurique, solution étalon volumétrique, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
- 3.8. Rouge de méthyle (indicateur) dissoudre 300 g de rouge de méthyle dans 100 ml d'éthanol, $\sigma = 95\text{-}96 \text{ \% (v/v)}$.
- 3.9. Solution d'hydroxyde de sodium (utilisation possible de la qualité technique) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$;
- 3.10. Hydroxyde de sodium, solution étalon volumétrique, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11. Hydroxyde de sodium, solution étalon volumétrique, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.12. Granulés de pierre ponce lavés à l'acide chlorhydrique et calcinés.
- 3.13. Acétanilide (point de fusion = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, teneur N = 10,36 %).
- 3.14. Saccharose (exempt d'azote).
- 3.15. Acide borique (H_3BO_3).
- 3.16. Solution d'indicateur de rouge de méthyle: dissoudre 100 mg de rouge de méthyle dans 100 ml d'éthanol ou de méthanol.
- 3.17. Solution de vert de bromocrésol: dissoudre 100 mg de vert de bromocrésol dans 100 ml d'éthanol ou de méthanol.
- 3.18. Solution d'acide borique (de 10 g/l à 40 g/l en fonction de l'appareillage utilisé).

En cas de détection colorimétrique au point d'équivalence, les indicateurs (rouge de méthyle et vert de bromocrésol) doivent être ajoutés aux solutions d'acide borique. Si 1 litre de solution d'acide borique est préparé, avant ajustement du volume, ajouter 7 ml de solution d'indicateur de rouge de méthyle (point 3.16) et 10 ml de solution de vert de bromocrésol (point 3.17).

En fonction de l'eau utilisée, le pH de la solution d'acide borique peut varier d'un lot à l'autre. Le pH de la solution d'acide borique doit être compris entre 4,3 et 4,7. Il est fréquent qu'il faille opérer un ajustement au moyen d'un petit volume d'alcali pour obtenir un blanc positif.

▼ **M9**

NB: L'ajout d'environ 3 à 4 ml de NaOH (point 3.11) dans 1 litre de solution d'acide borique à 10 g/l donne généralement de bons ajustements. Conserver la solution à température ambiante et la protéger de la lumière et des sources de vapeurs d'ammoniac pendant sa conservation.

- 3.19. Acide chlorhydrique, solution étalon volumétrique, $c(\text{HCL}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

NB: Il est permis de modifier les concentrations des solutions volumétriques (points 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 et 3.19), à condition d'apporter les corrections nécessaires dans les calculs. Les concentrations devraient toujours être exprimées par des chiffres à quatre décimales.

4. **Appareillage**

Appareils permettant de réaliser les opérations de minéralisation, de distillation et de titrage selon la méthode de Kjeldahl.

5. **Mode opératoire**

5.1. *Minéralisation*

Peser, à 0,001 g près, 1 g de l'échantillon et introduire la prise d'essai dans le ballon de l'appareil de minéralisation. Ajouter 15 g de sulfate de potassium (point 3.1), une quantité appropriée de catalyseur (point 3.2) [0,3 à 0,4 g d'oxyde de cuivre (II) ou 0,9 à 1,2 g de sulfate de cuivre (II) pentahydraté], 25 ml d'acide sulfurique (point 3.4) et, si nécessaire, quelques grains de pierre ponce (point 3.12) et mélanger.

Chauffer le ballon, avec modération dans un premier temps, en agitant de temps en temps, si nécessaire, jusqu'à carbonisation de la masse et disparition de l'écume; chauffer ensuite plus intensément jusqu'à ébullition régulière du liquide. Le chauffage est approprié si l'acide en ébullition se condense sur la paroi du ballon. Éviter la surchauffe des parois et l'adhérence de particules organiques.

Lorsque la solution apparaît limpide et vert clair, maintenir l'ébullition durant 2 heures puis laisser refroidir.

5.2. *Distillation*

Ajouter avec précaution une quantité suffisante d'eau pour garantir une dissolution complète des sulfates. Laisser refroidir et ajouter, s'il le faut, quelques grains de zinc (point 3.3). Procéder conformément au point 5.2.1 ou 5.2.2.

5.2.1. *Distillation dans de l'acide sulfurique*

Introduire, dans le flacon collecteur de l'appareil à distiller, 25 ml exactement mesurés d'acide sulfurique (point 3.5 ou 3.7), selon la teneur présumée en azote. Introduire quelques gouttes d'indicateur au rouge de méthyle (point 3.8).

Connecter le ballon de minéralisation au réfrigérant de l'appareil à distiller et plonger l'extrémité du réfrigérant sur une hauteur de 1 cm au moins dans le liquide du flacon collecteur (voir observation point 8.3). Verser lentement 100 ml de solution d'hydroxyde de sodium (point 3.9) dans le ballon de minéralisation sans provoquer de perte d'ammoniac (voir observation point 8.1). Chauffer le ballon jusqu'à distillation complète de l'ammoniac.

5.2.2. *Distillation dans de l'acide borique*

Lorsque le titrage de la teneur en ammoniac du distillat est effectué manuellement, le mode opératoire décrit ci-après est applicable. Lorsque l'unité de distillation est entièrement automatisée, y compris pour ce qui concerne le titrage de la teneur en ammoniac du distillat, suivre les instructions d'utilisation de l'unité de distillation fournies par le fabricant.

▼ **M9**

Placer un flacon collecteur contenant de 25 à 30 ml de solution d'acide borique (point 3.18) en sortie du réfrigérant de manière telle que le tube d'évacuation soit plongé dans l'excès de solution d'acide borique. Régler l'unité de distillation pour obtenir 50 ml de solution d'hydroxyde de sodium (point 3.9). Manier l'unité de distillation conformément aux instructions du fabricant et éliminer l'ammoniac libéré par distillation en ajoutant la solution d'hydroxyde de sodium. Recueillir le distillat dans la solution d'acide borique. La quantité de distillat (durée de distillation à la vapeur) dépend de la quantité d'azote dans l'échantillon. Suivre les instructions du fabricant.

NB: Une unité de distillation semi-automatique effectue automatiquement l'addition d'excès d'hydroxyde de sodium et la distillation à la vapeur.

5.3. *Titration*

Procéder conformément au point 5.3.1 ou 5.3.2.

5.3.1. *Acide sulfurique*

Titre, dans le flacon collecteur, l'excès d'acide sulfurique par la solution d'hydroxyde de sodium (point 3.10 ou 3.11), selon la concentration de l'acide sulfurique utilisé, jusqu'à atteindre le point d'équivalence.

5.3.2. *Acide borique*

Titre le contenu du flacon collecteur par la solution étalon volumétrique d'acide chlorhydrique (point 3.19) ou par la solution étalon volumétrique d'acide sulfurique (point 3.6) au moyen d'une burette et lire la quantité de solution titrée utilisée.

En cas de détection colorimétrique au point d'équivalence, le point d'équivalence est atteint dès la première trace de couleur rose dans le contenu. Estimer le contenu de la burette à 0,05 ml près. Un agitateur magnétique illuminé ou un détecteur photométrique peut faciliter la visualisation du point d'équivalence.

Cette étape peut être réalisée automatiquement au moyen d'une unité de distillation à titrage automatique.

Suivre les instructions du fabricant lors de l'utilisation d'une unité de distillation ou d'une unité de distillation avec titreur.

NB: En cas d'utilisation d'un système de titrage automatique, le titrage débute immédiatement après le démarrage de la distillation et la solution d'acide borique à 1 % (point 3.18) est utilisée.

En cas d'utilisation d'une unité de distillation entièrement automatique, le titrage automatique de l'ammoniac peut se faire par détection au point d'équivalence au moyen d'un système potentiométrique (pH).

Dans ce cas, un titreur automatique à pH-mètre est utilisé. Le pH-mètre doit être correctement étalonné dans une plage allant de pH 4 à pH 7 conformément aux procédures d'étalonnage habituelles.

Le point d'équivalence du titrage est atteint à pH 4,6, qui est le point d'inflexion de la courbe de titrage.

5.4. *Essai à blanc*

Pour confirmer que les réactifs sont exempts d'azote, effectuer un essai à blanc (minéralisation, distillation et titrage) en utilisant 1 g de saccharose (point 3.14) en lieu en place de l'échantillon.

▼ M9**6. Calcul des résultats**

Les calculs sont effectués conformément au point 6.1 ou 6.2.

6.1. Calcul pour le titrage conformément au point 5.3.1

La teneur en protéines brutes, exprimée sous forme de pourcentage en poids, se calcule selon la formule suivante:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

où:

V_0 = volume (ml) de NaOH (point 3.10 ou 3.11) utilisé dans l'essai à blanc,

V_1 = volume (ml) de NaOH (point 3.10 ou 3.11) utilisé pour le titrage de l'échantillon,

c = concentration (mol/l) de l'hydroxyde de sodium (point 3.10 ou 3.11),

m = poids (g) d'échantillon.

6.2. Calcul pour le titrage conformément au point 5.3.2**6.2.1. Titrage par une solution d'acide chlorhydrique**

La teneur en protéines brutes, exprimée sous forme de pourcentage en poids, se calcule selon la formule suivante:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

où:

m = poids (g) de la prise d'essai,

c = concentration (mol/l) de la solution étalon volumétrique d'acide chlorhydrique (point 3.19),

V_0 = volume (ml) d'acide chlorhydrique utilisé dans l'essai à blanc,

V_1 = volume (ml) d'acide chlorhydrique utilisé dans la prise d'essai.

6.2.2. Titrage par une solution d'acide sulfurique

La teneur en protéines brutes, exprimée sous forme de pourcentage en poids, se calcule selon la formule suivante:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

formule dans laquelle

m = poids (g) de la prise d'essai,

c = concentration (mol/l) de la solution étalon volumétrique d'acide sulfurique (point 3.6),

V_0 = volume (ml) d'acide sulfurique (point 3.6) utilisé dans l'essai à blanc,

V_1 = volume (ml) d'acide sulfurique (point 3.6) utilisé dans la prise d'essai.

▼ M9**7. Vérification de la méthode****7.1. Répétabilité**

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

- 0,4 % en valeur absolue pour les teneurs en protéines brutes inférieures à 20 %,
- 2,0 % par rapport au résultat le plus élevé, pour les teneurs en protéines brutes comprises entre 20 et 40 %,
- 0,8 % en valeur absolue pour les teneurs supérieures à 40 %.

7.2. Reproductibilité

La différence entre les résultats de deux dosages effectués sur le même échantillon dans des laboratoires différents ne peut dépasser:

- 1,8 % en valeur absolue pour les teneurs en protéines brutes inférieures à 20 %,
- 9,0 % par rapport au résultat le plus élevé, pour les teneurs en protéines brutes comprises entre 20 et 40 %,
- 3,6 % en valeur absolue pour les teneurs supérieures à 40 %.

7.3. Exactitude

Effectuer l'analyse (minéralisation, distillation et titrage) à l'aide d'une quantité appropriée d'acétanilide (point 3.13) (par exemple de 0,2 à 0,3 g) en présence de 1 g de saccharose (point 3.14); 1 g d'acétanilide consomme 14,80 ml d'acide sulfurique (point 3.5). La récupération doit être de 99 % au moins.

8. Observations

- 8.1. L'appareil peut être de type manuel, semi-automatique ou automatique. Si l'appareil nécessite un transfert entre les étapes de minéralisation et de distillation, ce transfert doit être effectué sans perte. Si le ballon de l'appareil à distiller n'est pas équipé d'un entonnoir à robinet, ajouter l'hydroxyde de sodium immédiatement avant la connexion du ballon au réfrigérant en versant lentement le liquide le long de la paroi.
- 8.2. Si le produit minéralisé se solidifie, recommencer la détermination en utilisant une quantité d'acide sulfurique (point 3.4) plus grande que celle indiquée au point 5.1.
- 8.3. Pour les produits à faible teneur en azote, le volume d'acide sulfurique (point 3.7) à mettre dans le ballon collecteur peut être réduit, si nécessaire, à 10 ou à 15 ml et porté à 25 ml par addition d'eau.
- 8.4. Pour les analyses de routine, d'autres méthodes d'analyse peuvent être appliquées pour le dosage des protéines brutes, mais la méthode de Kjeldahl décrite au présent point C est la méthode de référence. L'équivalence entre les résultats de la méthode de substitution (par exemple, la méthode de Dumas) et ceux de la méthode de référence doit être démontrée pour chaque matrice séparément. Étant donné que, même après vérification de l'équivalence, les résultats obtenus au moyen d'une méthode de substitution peuvent s'écarter légèrement des résultats qui auraient été obtenus au moyen de la méthode de référence, il est nécessaire de mentionner sur le bulletin d'analyse la méthode d'analyse appliquée pour le dosage des protéines brutes.

▼ **M9****D. DOSAGE DE L'URÉE****1. Objet et champ d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en urée utilisée comme additif dans l'alimentation des ruminants.

2. Principe

L'échantillon est mis en suspension dans de l'eau en présence d'un défécant. La suspension est filtrée. La teneur en urée du filtrat est déterminée, après addition de 4-diméthylaminobenzaldéhyde (4-DMAB), par mesure de la densité optique à la longueur d'onde de 420 nm.

3. Réactifs

- 3.1. Solution de 4-diméthylaminobenzaldéhyde: dissoudre 1,6 g de 4-DMAB dans 100 ml d'éthanol à 96 % et ajouter 10 ml d'acide chlorhydrique (ρ_{20} 1,19 g/ml). Ce réactif se conserve au maximum deux semaines.
- 3.2. Solution de Carrez I: dissoudre dans l'eau 21,9 g d'acétate de zinc $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 3 g d'acide acétique glacial. Ajuster à 100 ml avec de l'eau.
- 3.3. Solution de Carrez II: dissoudre dans l'eau 10,6 g de ferrocyanure de potassium $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Ajuster à 100 ml avec de l'eau.
- 3.4. Charbon actif n'adsorbant pas l'urée (à contrôler).
- 3.5. Urée, solution à 0,1 % (p/v).

4. Appareillage

- 4.1. Mélangeur (culbuteur): environ 35 à 40 retournements par minute.
- 4.2. Tubes à essais: 160 × 16 mm, à bouchon rodé.
- 4.3. Spectrophotomètre.

5. Mode opératoire**5.1. Analyse de l'échantillon**

Peser, à 1 mg près, 2 g de l'échantillon et les introduire avec 1 g de charbon actif (point 3.4) dans un flacon jaugé de 500 ml. Ajouter 400 ml d'eau et 5 ml de solution de Carrez I (point 3.2), agiter pendant environ 30 secondes et ajouter ensuite 5 ml de solution de Carrez II (point 3.3). Mélanger durant 30 minutes dans le culbuteur. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau, agiter et filtrer.

Prélever 5 ml des filtrats limpides et incolores, les introduire dans les tubes à essais à bouchon rodé, ajouter 5 ml de solution de 4-DMAB (point 3.1) et mélanger. Placer les tubes dans un bain d'eau à 20 °C (+/- 4 °C). Après 15 minutes, mesurer la densité optique de la solution de l'échantillon au spectrophotomètre à 420 nm. Comparer avec la solution de l'essai à blanc des réactifs.

5.2. Courbe d'étalonnage

Prélever des volumes de 1, 2, 4, 5 et 10 ml de la solution d'urée (point 3.5), les introduire dans des fioles jaugées de 100 ml et ajuster au trait de jauge avec de l'eau. Prélever 5 ml de chaque solution, y ajouter chaque fois 5 ml de solution de 4-DMAB (point 3.1), homogénéiser et mesurer la densité optique comme indiqué plus haut par comparaison avec une solution de référence contenant 5 ml de 4-DMAB et 5 ml d'eau exempte d'urée. Tracer la courbe d'étalonnage.

▼ M9**6. Calcul des résultats**

Déterminer la quantité d'urée de la prise d'essai en se référant à la courbe d'étalonnage.

Exprimer le résultat en mg d'urée par kg d'échantillon.

7. Évaluation de la méthode**7.1. Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon dans le même laboratoire et par le même analyste ne doit pas dépasser:

— à 420 nm

— 50 % du résultat supérieur pour les teneurs en urée comprises entre 3 000 mg/kg et moins de 5 000 mg/kg,

— 25 % du résultat supérieur pour les teneurs en urée comprises entre 5 000 mg/kg et moins de 7 000 mg/kg,

— 20 % du résultat supérieur pour les teneurs en urée supérieures ou égales à 7 000 mg/kg;

— à 435 nm

— 40 % du résultat supérieur pour les teneurs en urée comprises entre 3 000 mg/kg et moins de 5 000 mg/kg,

— 25 % du résultat supérieur pour les teneurs en urée comprises entre 5 000 mg/kg et moins de 9 000 mg/kg,

— 5 % du résultat supérieur pour les teneurs en urée supérieures ou égales à 9 000 mg/kg.

7.2. Reproductibilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées sur le même échantillon dans des laboratoires différents et/ou par des opérateurs différents ne peut dépasser:

— à 420 nm

— 3 000 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs en urée comprises entre 3 000 mg/kg et moins de 12 000 mg/kg,

— 4 500 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs en urée supérieures ou égales à 12 000 mg/kg;

— à 435 nm

— 50 % du résultat supérieur pour les teneurs en urée comprises entre 3 000 mg/kg et moins de 8 000 mg/kg,

— 25 % du résultat supérieur pour les teneurs en urée supérieures ou égales à 8 000 mg/kg.

8. Résultats d'une étude collaborative

Un exercice de comparaison interlaboratoire a été organisé dans l'UE et a rassemblé 18 laboratoires. Cinq matériaux positifs d'aliments composés destinés aux ruminants (appelés MAT dans les tableaux 1 et 2) ont été analysés (1 analyse) sous forme de doublets en aveugle et un blanc d'aliments composés destinés aux ruminants a été analysé en simple.

Les calculs des limites de répétabilité [®] et de reproductibilité [®], telles que définies par les lignes directrices internationales, ont été effectués, après le retrait des valeurs aberrantes, en recourant à l'analyse de variance des valeurs valides.

▼ **M9**

Les chiffres calculés de performance de la méthode (répétabilité, reproductibilité) sont présentés dans les tableaux ci-dessous. Aucun faux positif ou négatif n'a été découvert parmi les échantillons testés (y compris le blanc).

Tableau 1

Caractéristiques des performances de la méthode pour l'urée, mesurées à $\lambda = 420$ nm dans toutes les matières premières

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovins	Bovins	Ovins	Ovins	Bovins
Fraction massique cible (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Fraction massique moyenne (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Écart type de reproductibilité, s_R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Écart type de répétabilité, s_r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Écart type relatif de reproductibilité, RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Écart type relatif de répétabilité RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Limite de reproductibilité, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Limite de répétabilité, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tableau 2

Caractéristiques des performances de la méthode pour l'urée, mesurées à $\lambda = 435$ nm dans toutes les matières premières

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovins	Bovins	Ovins	Ovins	Bovins
Fraction massique cible (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Fraction massique moyenne (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Écart type de reproductibilité, s_R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Écart type de répétabilité, s_r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167
Écart type relatif de reproductibilité, RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Écart type relatif de répétabilité RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Limite de reproductibilité, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Limite de répétabilité, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

▼ M9**9. Observations**

- 9.1. Pour les teneurs en urée supérieures à 3 %, réduire la prise d'essai à 1 g ou diluer la solution initiale pour ne pas avoir plus de 50 mg d'urée dans 500 ml.
- 9.2. Pour les faibles teneurs en urée, augmenter la prise d'essai pour autant que le filtrat reste limpide et incolore.
- 9.3. Les résultats ci-dessus des essais interlaboratoires ne montrent pas d'écart significatif de précision entre l'urée mesurée à 420 nm et l'urée mesurée à 435 nm.

E. DOSAGE DES ACIDES AMINÉS (À L'EXCEPTION DU TRYPTOPHANE)

Les méthodes d'analyse à appliquer pour doser les acides aminés (à l'exception du tryptophane) sont celles prévues par:

- la norme EN ISO 13903 «Aliments des animaux — Dosage de la teneur en acides aminés»,
- la norme EN ISO 17180 «Aliments des animaux — Détermination de la teneur en lysine, méthionine et thréonine dans les acides aminés industriels et les pré-mélanges» ⁽¹⁾,
- la méthode d'analyse décrite aux points 1 à 10 ci-après.

1. Objet et champ d'application

La méthode permet de doser les acides aminés libres (de synthèse et naturels) et totaux (liés dans des peptides et libres) dans les aliments pour animaux, les aliments composés et les prémélanges contenant moins de 10 % ⁽²⁾ de chaque acide aminé au moyen d'un analyseur d'acides aminés. Elle s'applique aux acides aminés suivants: cyst(é)ine, méthionine, lysine, thréonine, alanine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, histidine, isoleucine, leucine, phénylalanine, proline, serine, tyrosine et valine.

La méthode ne fait pas de distinction entre les différents sels des acides aminés et ne permet pas de différencier les formes D et L des acides aminés. Elle ne convient pas pour le dosage du tryptophane et des analogues hydroxylés des acides aminés.

2. Principe**2.1. Acides aminés libres**

Les acides aminés libres sont extraits à l'aide d'acide chlorhydrique dilué. Les macromolécules azotées coextraites sont précipitées à l'aide d'acide sulfosalicylique et éliminées par filtration. La solution filtrée est ajustée à pH 2,20. Les acides aminés sont séparés par chromatographie par échange d'ions et dosés par réaction avec la ninhydrine et détection photométrique à 570 nm.

2.2. Acides aminés totaux

Le mode opératoire dépend des acides aminés à examiner. La cyst(é)ine et la méthionine doivent être oxydées pour devenir respectivement de l'acide cystéique et de la méthionine sulfone avant hydrolyse. La tyrosine doit être dosée dans l'hydrolysate d'échantillons non oxydés. Tous les autres acides aminés mentionnés au point 1 (Objet et champ d'application) peuvent être dosés soit dans un échantillon oxydé, soit dans un échantillon non oxydé.

⁽¹⁾ La méthode d'analyse prévue par la norme ISO 17180 est indiquée comme méthode de remplacement à appliquer à des fins de contrôle officiel pour le dosage des acides aminés dans des aliments pour animaux contenant plus de 10 % d'acides aminés.

⁽²⁾ Cette méthode n'a pas été validée dans le cadre d'une étude collaborative pour les prémélanges contenant plus de 10 % d'additifs pour l'alimentation animale. Néanmoins, elle est également applicable à ces matrices moyennant de légères modifications appropriées, à condition que la méthode soit validée en interne. Pour obtenir des informations complémentaires, consulter https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation_en?prefLang=fr

▼ M9

L'oxydation s'effectue à 0 °C à l'aide d'un mélange d'acide performique et de phénol. L'excédent de réactif d'oxydation est décomposé à l'aide de disulfite de sodium. L'échantillon oxydé ou non oxydé est hydrolysé à l'aide d'acide chlorhydrique (point 3.20) pendant 23 heures. L'hydrolysate est ajusté à pH 2,20. Les acides aminés sont séparés par chromatographie par échange d'ions et dosés par réaction à la ninhydrine et détection photométrique à 570 nm (440 nm pour la proline).

3. Réactifs

Utiliser de l'eau bidistillée ou de l'eau de qualité équivalente (conductivité < 10 µS)

- 3.1. Peroxyde d'hydrogène, p (p/p) = 30 %.
- 3.2. Acide formique, p (p/p) = 98-100 %.
- 3.3. Phénol.
- 3.4. Disulfite de disodium.
- 3.5. Hydroxyde de sodium.
- 3.6. Acide 5-sulfosalicylique dihydraté.
- 3.7. Acide chlorhydrique, densité approximative de 1,18 g/ml.
- 3.8. Citrate de tri-sodium dihydraté.
- 3.9. 2,2'-Thiodiéthanol (thiodiglycol).
- 3.10. Chlorure de sodium.
- 3.11. Ninhydrine.
- 3.12. Éther de pétrole, intervalle d'ébullition: 40-60 °C.
- 3.13. Norleucine ou autre composé pouvant être utilisé comme étalon interne.
- 3.14. Azote gazeux (< 10 ppm d'oxygène).
- 3.15. 1-Octanol.
- 3.16. Acides aminés.
- 3.16.1. Substances étalons des acides aminés visés au point 1 (Objet et champ d'application). Composés purs ne contenant pas d'eau de cristallisation. Sécher sous vide sur P₂O₅ ou H₂SO₄ pendant une semaine avant utilisation.
- 3.16.2. Acide cystéique.
- 3.16.3. Méthionine sulfone.
- 3.17. Solution d'hydroxyde de sodium, c = 7,5 mol/l:
dissoudre 300 g de NaOH (point 3.5) dans de l'eau et ajuster à 1 litre.
- 3.18. Solution d'hydroxyde de sodium, c = 1 mol/l:
dissoudre 40 g de NaOH (point 3.5) dans de l'eau et ajuster à 1 litre.
- 3.19. Solution d'acide formique-phénol:
mélanger 889 g d'acide formique (point 3.2) et 111 g d'eau en ajoutant 4,73 g de phénol (point 3.3).

▼ M9

- 3.20. Mélange à hydrolyser, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ contenant 1 g de phénol/l:

ajouter 1 g de phénol (point 3.3) à 492 ml de HCl (point 3.7) et ajuster à 1 litre avec de l'eau.

- 3.21. Mélange d'extraction, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$ contenant 2 % de thiodiglycol: prendre 8,2 ml de HCl (point 3.7), diluer dans environ 900 ml d'eau, ajouter 20 ml de thiodiglycol (point 3.9) et ajuster à 1 litre avec de l'eau (ne pas mélanger directement points 3.7 et 3.9).

- 3.22. Acide 5-sulfosalicylique, $\beta = 6 \%$:

dissoudre 60 g d'acide 5-sulfosalicylique (point 3.6) dans de l'eau et ajuster à 1 litre avec de l'eau.

- 3.23. Mélange d'oxydation (acide performique-phénol):

mélanger 0,5 ml de peroxyde d'hydrogène (point 3.1) avec 4,5 ml d'une solution de phénol et d'acide formique (point 3.19) dans un petit bécher. Incuber à une température de 20 à 30 °C pendant une heure pour obtenir de l'acide performique, laisser refroidir ensuite sur un bain d'eau glacée (15 minutes) avant de l'ajouter à l'échantillon.

Attention: éviter tout contact avec la peau et porter des vêtements de protection.

- 3.24. Tampon au citrate, $c = 0,2 \text{ mol de Na}^+/\text{l}$, $\text{pH} = 2,20$:

dissoudre 19,61 g de citrate de sodium (point 3.8), 5 ml de thiodiglycol (point 3.9), 1 g de phénol (point 3.3) et 16,50 ml de HCl (point 3.7) dans environ 800 ml d'eau. Ajuster le pH à 2,20. Ajuster à 1 litre avec de l'eau.

- 3.25. Tampons d'élution préparés conformément aux prescriptions prévues pour l'analyseur (point 4.9).

- 3.26. Réactif à la ninhydrine préparé conformément aux prescriptions prévues pour l'analyseur (point 4.9).

- 3.27. Solutions étalons d'acides aminés. Conserver ces solutions à une température inférieure à 5 °C.

- 3.27.1. Solution mère étalon d'acides aminés (point 3.16.1).

$c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ de chacun dans l'acide chlorhydrique.

S'obtient dans le commerce.

- 3.27.2. Solution mère étalon d'acide cystéique et de méthionine sulfone, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Dissoudre 0,2115 g d'acide cystéique (point 3.16.2) et 0,2265 g de méthionine sulfone (point 3.16.3) dans du tampon au citrate (point 3.24) dans une fiole jaugée de 1 litre et ajuster au trait de jauge avec du tampon au citrate. Conserver à une température inférieure à 5 °C pendant 12 mois au maximum. Cette solution n'est pas utilisée si la solution mère de l'étalon (point 3.27.1) contient de l'acide cystéique et de la méthionine sulfone.

- 3.27.3. Solution de l'étalon interne, par exemple norleucine. $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Dissoudre 0,6560 g de norleucine (point 3.13) dans du tampon au citrate (point 3.24) dans une fiole jaugée et ajuster à 250 ml à l'aide du tampon au citrate. Conserver à une température inférieure à 5 °C pendant 6 mois au maximum.

▼ M9

3.27.4. Solution d'étalonnage des acides aminés à utiliser avec des hydrolysats, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ d'acide cystéique et de méthionine sulfone et $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ des autres acides aminés. Dissoudre 2,2 g de chlorure de sodium (point 3.10) dans un bécher de 100 ml avec 30 ml de tampon au citrate (point 3.24). Ajouter 4,00 ml de la solution étalon d'acides aminés (point 3.27.1), 4,00 ml de solution étalon d'acide cystéique et de méthionine de sulfone (point 3.27.2) et 0,50 ml de solution de l'étalon interne (point 3.27.3) le cas échéant. Ajuster le pH à 2,20 avec de l'hydroxyde de sodium (point 3.18).

Transférer dans une fiole jaugée de 50 ml, ajuster au trait de jauge avec du tampon au citrate (point 3.24) et mélanger.

Conserver à une température inférieure à 5 °C pendant 3 mois au maximum.

Voir aussi les observations du point 9.1.

3.27.5. Solution d'étalonnage des acides aminés à utiliser avec des hydrolysats préparés conformément au point 5.3.3.1 et destinés à être utilisés avec des extraits (point 5.2). Préparer la solution d'étalonnage conformément au point 3.27.4, mais sans chlorure de sodium.

Conserver à une température inférieure à 5 °C pendant 3 mois au maximum.

4. **Appareillage**

- 4.1. Ballon sphérique de 100 ou de 250 ml pourvu d'un réfrigérant à reflux.
- 4.2. Flacon en verre de borosilicate de 100 ml avec bouchon à vis avec garniture de caoutchouc/téflon (par exemple Duran, Schott) pouvant être utilisé dans une étuve.
- 4.3. Étuve à ventilation forcée et régulation de la température d'une précision supérieure à $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 4.4. pH-mètre (à graduation à trois décimales).
- 4.5. Filtre à membrane (0,22 μm).
- 4.6. Centrifugeuse.
- 4.7. Évaporateur rotatif sous vide.
- 4.8. Agitateur mécanique ou magnétique.
- 4.9. Analyseur d'acides aminés ou équipement pour CLHP avec colonne échangeuse d'ions, dispositif pour ninhydrine, dérivation post-colonne et détecteur photométrique.

La colonne est remplie avec des résines de polystyrène sulfonées capables de séparer les différents acides aminés les uns des autres et d'autres produits réagissant à la ninhydrine. Le flux du tampon et du réactif de ninhydrine est assuré par des pompes dont le degré de stabilité du flux est de $\pm 0,5 \%$ dans la période couvrant l'analyse de la solution d'étalonnage et l'analyse de l'échantillon.

Avec certains analyseurs d'acides aminés, on peut utiliser des méthodes d'hydrolyse dans lesquelles l'hydrolysate a une concentration de sodium de $c = 0,8 \text{ mol/l}$ et contient tout l'acide formique résiduel provenant de l'oxydation. D'autres appareils ne donnent pas une séparation satisfaisante de certains acides aminés si l'hydrolysate contient trop d'acide formique et/ou présente des concentrations élevées d'ions sodium. Dans ce cas, le volume de l'acide est réduit par évaporation à environ 5 ml après l'hydrolyse et avant l'ajustement du pH. L'évaporation doit être faite sous vide à 40 °C au maximum.

▼ **M9****5. Mode opératoire****5.1. Préparation de l'échantillon**

Broyer l'échantillon pour le réduire à une granulométrie de 0,5 mm. Les échantillons à forte teneur en humidité doivent être desséchés à l'air à une température de 50 °C au maximum ou par lyophilisation avant broyage. Les échantillons à forte teneur en matières grasses doivent être extraits par l'éther de pétrole (point 3.12) avant broyage.

5.2. Dosage des acides aminés libres

Peser, à 0,2 mg près, une quantité adéquate (1-5 g) de l'échantillon préparé (point 5.1) dans un erlenmeyer et ajouter 100,0 ml du mélange d'extraction (point 3.21). Agiter le mélange pendant 60 min à l'aide d'un agitateur mécanique ou magnétique (point 4.8). Laisser décanter le sédiment et introduire à la pipette 10,0 ml de la solution surnageante dans un bécher de 100 ml.

Ajouter 5,0 ml de la solution d'acide sulfosalicylique (point 3.22) tout en remuant et poursuivre l'agitation pendant 5 min à l'aide de l'agitateur magnétique. Filtrer ou centrifuger la phase surnageante en vue d'en séparer le précipitat éventuel. Verser 10,0 ml de la solution obtenue dans un bécher de 100 ml, ajuster le pH à 2,20 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (point 3.18), transférer le tout dans une fiole jaugée d'un volume approprié à l'aide du tampon au citrate (point 3.24) et ajuster au trait de jauge avec la solution tampon (point 3.24).

Si un étalon interne est utilisé, ajouter 1,00 ml de l'étalon interne (point 3.27.3) par fraction de 100 ml de la solution finale et ajuster au trait de jauge avec la solution tampon (point 3.24).

Passer à la chromatographie conformément au point 5.4.

Si les extraits ne sont pas chromatographiés le même jour, les conserver à une température inférieure à 5 °C.

5.3. Dosage des acides aminés totaux**5.3.1. Oxydation**

Peser, à 0,2 mg près, entre 0,1 et 1 g de l'échantillon préparé (point 5.1) dans:

- un ballon sphérique de 100 ml (point 4.1) pour hydrolyse ouverte (point 5.3.2.3), ou
- un ballon sphérique de 250 ml (point 4.1) si l'on a besoin d'une faible concentration de sodium (point 5.3.3.1), ou
- un flacon de 100 ml à bouchon à vis (point 4.2) (pour hydrolyse fermée point 5.3.2.4).

La portion d'échantillon pesée doit avoir une teneur en azote d'environ 10 mg et une teneur en humidité de 100 mg au plus.

Placer le ballon sphérique ou le flacon dans un bain d'eau glacée et refroidir à 0 °C; ajouter 5 ml du mélange à oxyder (point 3.23) et mélanger à l'aide d'une spatule de verre à bout courbé. Fermer hermétiquement le ballon/le flacon contenant la spatule à l'aide d'un film hermétique à l'air, placer le bain d'eau glacée avec le récipient ainsi fermé dans un réfrigérateur à 0 °C et l'y laisser séjourner pendant 16 heures. Enlever ensuite le produit du réfrigérateur et décomposer l'excès de réactif d'oxydation par addition de 0,84 g de disulfite de sodium (point 3.4).

Passer à l'opération du point 5.3.2.1.

▼ **M9**

5.3.2. Hydrolyse

5.3.2.1. Hydrolyse des échantillons oxydés

À l'échantillon oxydé préparé conformément au point 5.3.1, ajouter 25 ml du mélange d'hydrolyse (point 3.20) en prenant soin d'éliminer par rinçage tout résidu de l'échantillon adhérant aux parois du récipient et à la spatule.

Selon la méthode d'hydrolyse utilisée, appliquer la méthode visée au point 5.3.2.3 ou 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hydrolyse des échantillons non oxydés

Peser dans un ballon sphérique de 100 ml ou de 250 ml (point 4.1) ou dans un tube de 100 ml pourvu d'un bouchon à vis (point 4.2), à 0,2 mg près, de 0,1 à 1 g de l'échantillon préparé (point 5.1). La portion d'échantillon pesée doit avoir une teneur en azote d'environ 10 mg. Ajouter avec précaution 25 ml du mélange à hydrolyser (point 3.20) et mélanger avec l'échantillon. Procéder conformément au point 5.3.2.3 ou 5.3.2.4.

5.3.2.3. Hydrolyse ouverte

Ajouter 3 billes de verre au mélange contenu dans le ballon (préparé conformément au point 5.3.2.1 ou 5.3.2.2) et faire bouillir sous reflux en bouillonnement constant pendant 23 heures. Après l'hydrolyse, rincer le réfrigérant au moyen de 5 ml du tampon au citrate (point 3.24). Déconnecter le ballon et le faire refroidir dans un bain glacé.

Poursuivre conformément au point 5.3.3.

5.3.2.4. Hydrolyse fermée

Placer le flacon contenant le mélange préparé conformément au point 5.3.2.1 ou 5.3.2.2 dans une étuve (point 4.3) chauffée à 110 ° C. Pendant la première heure, placer le bouchon à vis sur le récipient de manière à éviter une élévation de la pression (due à l'évolution des substances gazeuses) et une explosion. Ne pas fermer le récipient en vissant le bouchon. Après 1 heure, fermer le récipient à l'aide du bouchon à vis et laisser reposer dans l'étuve (point 4.3) pendant 23 heures. Après l'hydrolyse, enlever le flacon de l'étuve, ouvrir avec précaution le bouchon et placer le flacon dans un bain d'eau glacée. Laisser refroidir.

Selon la procédure adoptée pour l'ajustement du pH (point 5.3.3), transférer quantitativement le contenu du flacon dans un bécher de 250 ml ou dans un ballon sphérique de 250 ml à l'aide du tampon au citrate (point 3.24).

Poursuivre conformément au point 5.3.3.

5.3.3. Ajustement du pH

En fonction de la tolérance en sodium de l'analyseur d'acides aminés (point 4.9), procéder conformément aux points 5.3.3.1 ou 5.3.3.2 pour l'ajustement du pH.

5.3.3.1. Pour des systèmes chromatographiques (point 4.9) demandant une faible concentration de sodium

Il est recommandé d'utiliser un étalon interne (point 3.27.3) si on utilise des analyseurs d'acides aminés demandant une faible concentration de sodium (lorsque le volume d'acide doit être réduit).

Dans ce cas, ajouter 2,00 ml de la solution de l'étalon interne (point 3.27.3) à l'hydrolysate avant évaporation.

Ajouter 2 gouttes de 1-Octanol (point 3.15) à l'hydrolysate obtenu conformément à la procédure du point 5.3.2.3 ou 5.3.2.4.

▼ **M9**

À l'aide d'un évaporateur rotatif (point 4.7), réduire sous vide à 40 °C le volume à un niveau compris entre 5 et 10 ml. Si le volume est accidentellement réduit à moins de 5 ml, l'hydrolysate doit être rejeté et l'analyse recommencée.

Ajuster le pH à 2,20 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (point 3.18) et poursuivre conformément au point 5.3.4.

5.3.3.2. Pour tous les autres analyseurs d'acides aminés (point 4.9)

Recueillir les hydrolysats obtenus conformément au point 5.3.2.3 ou 5.3.2.4 et les neutraliser partiellement en ajoutant avec précaution, tout en agitant, 17 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium (point 3.17), la température restant inférieure à 40 °C.

L'ajustement du pH final à 2,20 s'effectue à température ambiante au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium conforme au point 3.17 et, enfin, d'une solution d'hydroxyde de sodium conforme au point 3.18. Poursuivre conformément au point 5.3.4.

5.3.4. Solution d'échantillon pour chromatographie

Transférer quantitativement l'hydrolysate à pH ajusté (point 5.3.3.1 ou 5.3.3.2) avec le tampon au citrate (point 3.24) dans une fiole jaugée de 200 ml et ajuster au trait de jauge à l'aide du tampon (point 3.24).

Si l'étalon interne (point 3.27.3) n'a pas encore été utilisé, en ajouter 2,00 ml et ajuster au trait de jauge avec du tampon au citrate (point 3.24). Mélanger soigneusement.

Poursuivre par la chromatographie (point 5.4).

Si les solutions des échantillons ne sont pas chromatographiées le même jour, les conserver à une température inférieure à 5 °C.

5.4. *Chromatographie*

Avant la chromatographie, porter l'extrait (point 5.2) ou l'hydrolysate (point 5.3.4) à température ambiante. Agiter le mélange et filtrer une partie appropriée à travers un filtre à membrane de 0,22 µm (point 4.5). La solution claire obtenue est soumise à une chromatographie par échange d'ions au moyen d'un analyseur d'acides aminés (point 4.9).

L'injection peut être opérée manuellement ou automatiquement. Il importe que la même quantité de solution ($\pm 0,5\%$) soit toujours ajoutée à la colonne pour l'analyse des étalons et des échantillons, sauf lorsqu'un étalon interne est utilisé, et que les rapports sodium/acide aminé dans les solutions étalons et les solutions des échantillons soient aussi identiques que possible.

En général, la fréquence des injections de la solution d'étalonnage dépend de la stabilité du réactif ninhydrine et du système d'analyse. La solution étalon ou d'échantillon est diluée avec un tampon au citrate (point 3.24) pour donner une surface de pic de la solution étalon de 30 à 200 % de la surface de pic de l'acide aminé dans l'échantillon.

La chromatographie des acides aminés varie légèrement selon le type d'analyseur employé et de résine utilisée. Le système retenu doit permettre de séparer les acides aminés les uns des autres et des substances réagissant à la ninhydrine. Au cours de l'opération, le système chromatographique doit donner une réponse linéaire à des variations des quantités d'acides aminés ajoutés dans la colonne.

Pendant la phase de chromatographie, les rapports de hauteur entre creux et sommets de pics mentionnés ci-dessous sont applicables lorsqu'une solution équimolaire des acides aminés est analysée. Cette solution équimolaire doit contenir au moins 30 % de la charge maximale de chaque acide aminé qui peut être déterminée avec précision à l'aide du système analyseur d'acides aminés (point 4.9).

▼ M9

Pour la séparation thréonine-sérine, le rapport de hauteur entre la vallée et le sommet du plus bas des deux acides aminés chevauchant, dans le chromatogramme, ne doit pas dépasser 2:10 [si le dosage porte seulement sur la cyst(é)ine, la méthionine, la thréonine et la lysine, une séparation insuffisante des pics voisins aura une influence défavorable sur le dosage]. Pour tous les autres acides aminés, la séparation doit être meilleure que 1:10.

Le système doit garantir que la lysine est séparée des «artefacts de lysine» et de l'ornithine.

6. Calcul des résultats

La surface des pics de l'échantillon et de la solution étalon est mesurée pour chaque acide aminé particulier et la quantité (X), exprimée en grammes d'acide aminé par kg d'échantillon, est calculée.

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1000}$$

Si un étalon interne est utilisé, multiplier par: $\frac{D}{C}$

A = surface de pic, hydrolysats ou extrait

B = surface de pic, solution d'étalonnage

C = surface de pic, étalon interne dans l'hydrolysats ou l'extrait

D = surface de pic, étalon interne, solution d'étalonnage

M = poids molaire de l'acide aminé dosé

c = concentration de l'étalon en $\mu\text{mol/ml}$

m = poids en grammes de l'échantillon (corrigé pour obtenir le poids initial si le produit est séché et/ou dégraissé)

V = ml d'hydrolysats total (point 5.3.4) ou ml du volume de l'extrait dilué total calculé (point 6.1)

La cystine et la cystéine sont dosées toutes deux sous forme d'acide cystéique dans les hydrolysats de l'échantillon oxydé mais calculées sous forme de cystine ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, M 240,30 g/mol) en utilisant un M de 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

La méthionine est dosée sous forme de méthionine sulfone dans les hydrolysats de l'échantillon oxydé, mais calculée sous forme de méthionine en utilisant un M de 149,21 g/mol.

La méthionine libre ajoutée est dosée après extraction sous forme de méthionine; pour le calcul, appliquer la même valeur à M.

- 6.1. Le volume de la dilution totale des extraits (F) pour le dosage des acides aminés libres (point 5.2) est calculé comme suit:

$$F = \frac{100 \text{ ml} \times (10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \times \frac{V}{10}$$

V = volume de l'extrait final.

7. Évaluation de la méthode

La méthode a été testée dans une comparaison interlaboratoire internationale faite en 1990 sur la base de quatre aliments pour animaux différents (aliment composé pour porcs, aliment composé pour poulets de chair, concentré protéique, prémélange).

▼ M9

NB: La méthode a été testée lors d'une deuxième comparaison inter-laboratoire internationale faite en 2003 sur la base de paires de doublets en aveugle d'échantillons d'aliments de finition et d'aliments de démarrage pour poulets de chair, de farine de poisson et de farine de volaille. Pour plus de détails, voir la norme EN ISO 13903.

La moyenne et l'écart type des résultats de la comparaison interlaboratoire de 1990, après élimination des aberrants, sont mentionnés dans les tableaux ci-après.

Moyennes en g/kg

Matériau de référence	Acide aminé			
	Thréonine	Cyst(é)ine	Méthionine	Lysine
Aliment composé pour porcs	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Aliment composé pour poulets de chair	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Concentré protéique	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Prémélange	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = nombre de laboratoires participants.

7.1. Répétabilité

La répétabilité, exprimée sous forme d'«écart type à l'intérieur du laboratoire» de la comparaison interlaboratoire du tableau précédent, est indiquée dans les tableaux ci-après.

Coefficient de variation (%) de la répétabilité (CV_r)

Matériau de référence	Acide aminé			
	Thréonine	Cyst(é)ine	Méthionine	Lysine
Aliment composé pour porcs	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Aliment composé pour poulets de chair	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Concentré protéique	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Prémélange	2,2 n = 16	-	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = nombre de laboratoires participants.

7.2. Reproductibilité

Les résultats relatifs à l'écart type entre laboratoires pour la comparaison interlaboratoire mentionnée ci-dessus figurent au tableau ci-dessous.

▼ **M9****Coefficient de variation (%) de la reproductibilité (CV_R)**

Matériau de référence	Acide aminé			
	Thréonine	Cyst(é)ine	Méthionine	Lysine
Aliment composé pour porcs	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Aliment composé pour poulets de chair	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Concentré protéique	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Prémélange	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = nombre de laboratoires participants.

8. Utilisation de matériaux de référence

L'application correcte de la méthode est vérifiée par répétition des mesures des matériaux de référence certifiés éventuellement disponibles. L'étalonnage au moyen d'une solution d'étalonnage certifiée d'acides aminés est recommandée.

9. Observations

- 9.1. Par suite des différences entre appareils analyseurs d'acides aminés, les concentrations finales des solutions d'étalonnage des acides aminés (voir les points 3.27.4 et 3.27.5) et de l'hydrolysate (voir le point 5.3.4) ont un caractère indicatif.

Le champ de la réponse linéaire de l'appareillage doit être vérifié pour tous les acides aminés.

La solution étalon est diluée avec un tampon au citrate pour donner des surfaces de pic se situant au milieu du champ.

- 9.2. Dans les cas où un appareillage de chromatographie en phase liquide à haute performance est utilisé pour analyser les hydrolysats, les conditions d'essai doivent être optimisées conformément aux recommandations du fabricant.
- 9.3. L'application de la méthode aux prémélanges ou aliments composés pour animaux contenant plus de 1 % de chlorure (concentré, aliments minéraux, aliments complémentaires) pourrait entraîner une sous-estimation de la méthionine, et un traitement spécial doit être prévu.

10. Critères de performance

La compilation des résultats (sauf pour la tyrosine) provenant des deux études collaboratives (de 1990, dont les résultats sont exposés ci-avant au point 7, et de 2005, dont les résultats sont exposés dans la norme ISO 13903). Les valeurs dérivées de ces deux essais interlaboratoires peuvent ne pas être applicables aux gammes de concentration et aux matrices autres que celles données.

10.1. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon dans le même laboratoire et par le même analyste ne doit pas dépasser:

- 6 % du résultat supérieur pour les acides aminés totaux dans le cas de la glycine, l'alanine, la lysine, la proline, l'acide glutamique, l'isoleucine et l'histidine,
- 8 % du résultat supérieur pour les acides aminés totaux dans le cas de la thréonine, la phénylalanine, la méthionine, l'acide aspartique et la leucine,

▼ M9

- 10 % du résultat supérieur pour les acides aminés totaux dans le cas de l'arginine et la valine,
- 12 % du résultat supérieur pour la sérine totale,
- 15 % du résultat supérieur pour la cyst(é)ine totale.

10.2. Reproductibilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées sur le même échantillon dans des laboratoires différents et/ou par des opérateurs différents ne peut dépasser:

- 15 % du résultat supérieur pour les acides aminés totaux dans le cas de la glycine, l'alanine et la thréonine,
- 20 % du résultat supérieur pour les acides aminés totaux dans le cas de la lysine, la proline, la phénylalanine, la méthionine et l'acide aspartique,
- 22 % du résultat supérieur pour les acides aminés totaux dans le cas de l'acide glutamique et la leucine,
- 27 % du résultat supérieur pour l'arginine totale,
- 32 % du résultat supérieur pour l'isoleucine totale,
- 35 % du résultat supérieur pour les acides aminés totaux dans le cas de la valine et la sérine,
- 40 % du résultat supérieur pour l'histidine totale,
- 50 % du résultat supérieur pour la cyst(é)ine totale.

F. DOSAGE DU TRYPTOPHANE

Les méthodes d'analyse à appliquer pour doser le tryptophane sont celles prévues par:

- la norme EN ISO 13904 «Aliments des animaux — Dosage du tryptophane»,
- la méthode d'analyse décrite aux points 1 à 9 ci-après.

1. Objet et champ d'application

La méthode permet de doser le tryptophane total et libre dans les aliments pour animaux. Elle ne fait pas de distinction entre les formes D et L.

2. Principe

Pour le dosage du tryptophane total, l'échantillon est hydrolysé en milieu basique avec une solution d'hydroxyde de baryum saturée et il est chauffé à 110 °C pendant 20 heures. Après l'hydrolyse, l'étalon interne est ajouté.

Pour le dosage du tryptophane libre, l'échantillon est extrait dans des conditions d'acidité modérée en présence de l'étalon interne.

Le tryptophane et l'étalon interne dans l'hydrolysate ou dans l'extrait sont dosés par CLHP à l'aide d'un détecteur fluorimétrique.

3. Réactifs

- 3.1. Utiliser de l'eau bidistillée ou de l'eau de qualité équivalente (conductivité < 10 µS/cm).

▼ M9

- 3.2. Substance étalon: tryptophane (pureté/teneur $\geq 99\%$) séché sous vide sur pentoxyde de phosphore.
- 3.3. Étalon interne: α -méthyl-tryptophane (pureté/teneur $\geq 99\%$) séché sous vide sur pentoxyde de phosphore.
- 3.4. Hydroxyde de baryum octahydraté (veiller à ne pas exposer excessivement le $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ à l'air afin d'éviter la formation de BaCO_3 qui pourrait perturber le dosage) (voir l'observation figurant au point 9.3).
- 3.5. Hydroxyde de sodium.
- 3.6. Acide orthophosphorique, p (p/p) = 85 %.
- 3.7. Acide chlorhydrique, ρ_{20} 1,19 g/ml.
- 3.8. Méthanol, de qualité CLHP.
- 3.9. Éther de pétrole, intervalle d'ébullition: 40-60 °C.
- 3.10. Solution d'hydroxyde de sodium, c = 1 mol/l:

dissoudre 40,0 g de NaOH (point 3.5) dans de l'eau et ajuster au litre avec de l'eau (point 3.1).
- 3.11. Acide chlorhydrique, c = 6 mol/l:

prendre 492 ml de HCl (point 3.7) et ajuster au litre avec de l'eau.
- 3.12. Acide chlorhydrique, c = 1 mol/l:

prendre 82 ml de HCl (point 3.7) et ajuster au litre avec de l'eau.
- 3.13. Acide chlorhydrique, c = 0,1 mol/l:

prendre 8,2 ml de HCl (point 3.7) et ajuster au litre avec de l'eau.
- 3.14. Acide orthophosphorique, c = 0,5 mol/l:

prendre 34 ml d'acide orthophosphorique (point 3.6) et ajuster au litre avec de l'eau (point 3.1).
- 3.15. Solution concentrée de tryptophane (point 3.2), c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$:

dans une fiole jaugée de 500 ml, dissoudre 0,2553 g de tryptophane (point 3.2) dans de l'acide chlorhydrique (point 3.13) et ajuster au trait de jauge avec de l'acide chlorhydrique (point 3.13). Conserver à -18°C pendant quatre semaines au maximum.
- 3.16. Solution concentrée de l'étalon interne, c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$:

dans une fiole jaugée de 500 ml, dissoudre 0,2728 g de α -méthyl-tryptophane (point 3.3) dans de l'acide chlorhydrique (point 3.13) et ajuster au trait de jauge avec de l'acide chlorhydrique (point 3.13). Conserver à -18°C pendant quatre semaines au maximum.
- 3.17. Solution d'étalonnage de tryptophane et étalon interne:

prendre 2,00 ml de solution concentrée de tryptophane (point 3.15) et 2,00 ml de solution concentrée de l'étalon interne (α -méthyl-tryptophane) (point 3.16). Diluer avec de l'eau (point 3.1) et du méthanol (point 3.8) approximativement au même volume et approximativement à la même concentration de méthanol (10-30 %) que l'hydrolysats fini.

Cette solution doit être préparée peu avant d'être utilisée.

Se protéger de la lumière directe du soleil pendant la préparation.

▼ M9

- 3.18. Acide acétique.
- 3.19. Trichloro-1,1,1-méthyl-2-propanol-2.
- 3.20. Éthanolamine p (p/p) > 98 %.
- 3.21. Solution de 1 g de trichloro-1,1,1-méthyl-2-propanol-2 (point 3.19) dans 100 ml de méthanol (point 3.8).
- 3.22. Phase mobile pour CLHP: 3,00 g d'acide acétique (point 3.18) + 900 ml d'eau (point 3.1) + 50,0 ml de solution (point 3.21) de trichloro-1,1,1-méthyl-2-propanol-2 (point 3.19) dans du méthanol (point 3.8) (1 g/100 ml). Ajuster le pH à 5,00 à l'aide d'éthanolamine (point 3.20). Ajuster à 1 000 ml avec de l'eau (point 3.1).

4. Appareillage

- 4.1. Équipement pour CLHP avec détection spectrofluorimétrique.
- 4.2. Colonne de chromatographie liquide, 125 mm × 4 mm, C₁₈, particules de 3 µm, ou équivalent.
- 4.3. pH-mètre.
- 4.4. Fiole en polypropylène, capacité 125 ml, à large col et bouchon à vis.
- 4.5. Filtre à membrane de 0,45 µm.
- 4.6. Autoclave, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.
- 4.7. Agitateur mécanique ou magnétique.
- 4.8. Agitateur Vortex.

5. Mode opératoire**5.1. Préparation des échantillons**

Broyer l'échantillon pour le réduire à une granulométrie de 0,5 mm. Les échantillons à forte teneur en humidité doivent être desséchés à l'air à une température de 50 °C au maximum ou par lyophilisation avant broyage. Les échantillons à forte teneur en matières grasses doivent être extraits par éther de pétrole (point 3.9) avant broyage.

5.2. Dosage du tryptophane libre (extrait)

Peser, à 1 mg près, une quantité adéquate (1-5 g) de l'échantillon préparé (point 5.1) dans une fiole erlenmeyer. Ajouter 100,0 ml d'acide chlorhydrique (point 3.13) et 5,00 ml de solution concentrée de l'étalon interne (point 3.16). Agiter ou mélanger pendant 60 minutes à l'aide d'un agitateur mécanique ou magnétique (point 4.7). Laisser décanter le sédiment et introduire à la pipette 10,0 ml de la solution surnageante dans un bécher. Ajouter 5 ml d'acide orthophosphorique (point 3.14). Ajuster le pH à 3 avec de l'hydroxyde de sodium (point 3.10). Ajouter suffisamment de méthanol (point 3.8) pour obtenir une concentration comprise entre 10 et 30 % de méthanol dans le volume final. Transférer dans une fiole jaugée de volume approprié et diluer avec de l'eau au volume nécessaire pour la chromatographie [environ le même volume que la solution étalon de calibration (point 3.17)].

Filtrer quelques millilitres de la solution au travers d'un filtre à membrane de 0,45 µm (point 4.5) avant d'injecter sur la colonne CLHP. Passer à la chromatographie conformément au point 5.4.

Protéger la solution étalon et les extraits de la lumière directe du soleil. Si les extraits ne peuvent pas être analysés le jour même, ils doivent être conservés à une température de 5 °C pendant trois jours au maximum.

▼ **M9**5.3. *Dosage du tryptophane total (hydrolysat)*

Peser, à 0,2 mg près, entre 0,1 et 1 g de l'échantillon préparé (point 5.1) dans la fiole en polypropylène (point 4.4). La portion d'échantillon pesée doit avoir une teneur en azote d'environ 10 mg. Ajouter 8,4 g d'hydroxyde de baryum octahydraté (point 3.4) et 10 ml d'eau. Mélanger avec un agitateur Vortex (point 4.8) ou un agitateur magnétique (point 4.7). Laisser l'aimant enrobé de téflon dans le mélange. Laver les parois du récipient avec 4 ml d'eau. Poser le bouchon à vis et fermer la fiole sans serrer. Transférer dans un autoclave (point 4.6) avec de l'eau bouillante et maintenir en ébullition pendant 30 à 60 minutes. Fermer l'autoclave et le mettre en marche à $110 (\pm 2) ^\circ \text{C}$ pendant 20 heures.

Avant d'ouvrir l'autoclave, réduire la température à un peu moins de $100 ^\circ \text{C}$. Pour éviter la cristallisation de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, ajouter au mélange chaud 30 ml d'eau à la température ambiante. Agiter ou remuer doucement. Ajouter 2,00 ml de la solution concentrée de l'étalon interne (α -méthyl-tryptophane) (point 3.16). Refroidir les récipients dans un bain d'eau/de glace pendant 15 minutes.

Ajouter ensuite 5 ml d'acide orthophosphorique (point 3.14). Maintenir le récipient dans le bain réfrigérant et neutraliser au HCl (point 3.11) tout en remuant, puis ajuster le pH à 3,0 à l'aide de HCl (point 3.12). Ajouter suffisamment de méthanol pour obtenir une concentration comprise entre 10 et 30 % de méthanol dans le volume final. Transférer dans une fiole jaugée de volume approprié et diluer avec de l'eau au volume nécessaire pour la chromatographie (par exemple 100 ml). L'addition de méthanol ne doit pas provoquer de précipitation.

Filtrer quelques millilitres de la solution au travers d'un filtre à membrane de $0,45 \mu\text{m}$ (point 4.5) avant d'injecter sur la colonne CLHP. Passer à la chromatographie conformément au point 5.4.

Protéger la solution étalon et les hydrolysats de la lumière directe du soleil. Si les hydrolysats ne peuvent pas être analysés le jour même, ils doivent être conservés à une température de $5 ^\circ \text{C}$ pendant trois jours au maximum.

5.4. *Dosage par CLHP*

Les conditions suivantes de l'élution isocratique sont proposées à titre indicatif; d'autres conditions peuvent être appliquées, pourvu qu'elles donnent des résultats équivalents (voir également les observations figurant aux points 9.1 et 9.2):

Colonne de chromatographie liquide (point 4.2): 125 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , particules de $3 \mu\text{m}$ équivalent

Température de la colonne: température ambiante

Phase mobile (point 3.22): 3,00 g d'acide acétique (point 3.18) + 900 ml d'eau (point 3.1) + 50,0 ml de solution (point 3.21) de trichloro-1,1,1-méthyl-2-propanol-2 (point 3.19) dans du méthanol (point 3.8). (1 g/100 ml). Ajuster le pH à 5,00 à l'aide d'éthanolamine (point 3.20). Ajuster à 1 000 ml avec de l'eau (point 3.1).

Débit: 1 ml/min

Temps d'élution total: environ 34 minutes

Longueur d'onde de détection: (excitation: 280 nm, émission: 356 nm)

Volume d'injection: 20 μl

▼ M9**6. Calcul des résultats**

La quantité de tryptophane (X), exprimée en g par 100 g d'échantillon, est calculée.

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = surface du pic de l'étalon interne, solution étalon de calibration (point 3.17),

B = surface du pic de tryptophane, extrait (point 5.2) ou hydrolysats (point 5.3),

V₁ = volume en ml (2 ml) de solution concentrée de tryptophane (point 3.15) ajoutée à la solution d'étalonnage (point 3.17),

c = concentration en µmol/ml (= 2,50) de solution concentrée de tryptophane (point 3.15) ajoutée à la solution d'étalonnage (point 3.17),

V₂ = volume en ml de la solution concentrée de l'étalon interne (point 3.16) ajoutée à l'extraction (point 5.2) (= 5,00 ml) ou à l'hydrolysats (point 5.3) (= 2,00 ml),

C = surface du pic de l'étalon interne, extrait (point 5.2) ou hydrolysats (point 5.3),

D = surface du pic de tryptophane, solution étalon de calibration (point 3.17),

V₃ = volume en ml (= 2,00 ml) de la solution concentrée de l'étalon interne (point 3.16) ajoutée à la solution étalon de calibration (point 3.17),

m = poids de l'échantillon en g (corrigé pour obtenir le poids initial si le produit est séché et/ou dégraissé),

M = poids molaire du tryptophane (= 204,23 g/mol).

7. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur le même échantillon ne peut dépasser 10 % par rapport au résultat le plus élevé.

8. Résultats d'une étude collaborative

Une étude collaborative de l'UE (quatrième comparaison interlaboratoire) a été réalisée: douze laboratoires ont analysé trois échantillons pour certifier la méthode par hydrolyse. Chaque essai a été soumis à cinq analyses. Les résultats de l'étude figurent dans le tableau ci-après.

	Échantillon 1 Aliment pour porcs	Échantillon 2 Aliment pour porcs complété par du L-tryptophane	Échantillon 3 Aliment concentré pour porcs
L	12	12	12
n	50	55	50
Moyenne [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV _r [%]	1,9	1,6	1,9
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09

▼ **M9**

	Échantillon 1 Aliment pour porcs	Échantillon 2 Aliment pour porcs complété par du L-tryptophane	Échantillon 3 Aliment concentré pour porcs
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

L = nombre de laboratoires ayant présenté des résultats
 n = nombre de résultats individuels retenus une fois les résultats aberrants éliminés (identifiés selon les tests de Cochran-Dixon)
 s_r = écart type de répétabilité
 S_R = écart type de reproductibilité
 r = répétabilité
 R = reproductibilité
 CV_r = coefficient de variation de la répétabilité (%)
 CV_R = coefficient de variation de la reproductibilité (%)

Une autre étude collaborative de l'UE (troisième comparaison inter-laboratoire) a été réalisée: jusqu'à treize laboratoires ont analysé deux échantillons pour certifier la méthode par extraction du tryptophane libre. Chaque essai a été soumis à cinq analyses. Les résultats de l'étude figurent dans le tableau ci-après:

	Échantillon 4 Mélange de blé et de soja	Échantillon 5 Mélange de blé et de soja (= échantillon 4) avec addition de tryptophane (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Moyenne [g/kg]	0,391	0,931
s _r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV _r [%]	1,34	1,34
S _R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV _R [%]	4,71	5,11

L = nombre de laboratoires ayant présenté des résultats
 n = nombre de résultats individuels retenus une fois les résultats aberrants éliminés (identifiés selon les tests de Cochran-Dixon)
 s_r = écart type de répétabilité
 S_R = écart type de reproductibilité
 r = répétabilité
 R = reproductibilité
 CV_r = coefficient de variation de la répétabilité (%)
 CV_R = coefficient de variation de la reproductibilité (%)

Une autre étude interlaboratoire de l'UE a été réalisée: sept laboratoires ont analysé quatre échantillons pour certifier la méthode par hydrolyse. Chaque essai a été soumis à cinq analyses. Les résultats figurent dans le tableau suivant:

▼ **M9**

	Échantillon 1 Aliment composé pour porcs (CRM 117)	Échantillon 2 Farine de poisson à faible teneur en matières grasses (CRM 118)	Échantillon 3 Farine de soja (CRM 119)	Échantillon 4 Lait écrémé en poudre (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Moyenne [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = nombre de laboratoires ayant présenté des résultats

n = nombre de résultats individuels retenus une fois les résultats aberrants éliminés (identifiés selon les tests de Cochran-Dixon)

s_r = écart type de répétabilité

S_R = écart type de reproductibilité

r = répétabilité

R = reproductibilité

CV_r = coefficient de variation de la répétabilité (%)

CV_R = coefficient de variation de la reproductibilité (%)

9. **Observations**

- 9.1. Les conditions de chromatographie spéciales suivantes peuvent donner une meilleure séparation entre le tryptophane et le α -méthyl-tryptophane.

Élution isocratique suivie d'un nettoyage de la colonne par gradient:

Colonne de chromatographie liquide: 125 mm × 4 mm, C_{18} , particules de 5 μ m, ou équivalent

Température de la colonne: 32 °C

Phase mobile: A: 0,01 mol/l KH_2PO_4 /méthanol, 95 + 5 (V + V).

B: Méthanol.

Programme du gradient: 0 min 100 % A 0 % B

15 min 100 % A 0 % B

17 min 60 % A 40 % B

19 min 60 % A 40 % B

21 min 100 % A 0 % B

33 min 100 % A 0 % B

Débit: 1,2 ml/min

Temps d'élution total: environ 33 minutes

- 9.2. La chromatographie varie selon le type de CLHP et selon le remplissage de la colonne. Le système retenu doit donner un retour à la ligne de base entre les pics du tryptophane et de l'étalon interne. De plus, il est important que les produits de décomposition soient bien séparés du

▼ **M9**

tryptophane et de l'étalon interne. Il faut réaliser un essai sans étalon interne de façon à vérifier l'absence d'impuretés sur la ligne de base au niveau de l'étalon interne. Il est important que le temps d'élution soit suffisamment long pour permettre l'élution de tous les produits de décomposition, faute de quoi des pics d'élution tardifs peuvent interférer avec les opérations de chromatographie ultérieures.

Dans la gamme des opérations, le système chromatographique doit donner une réponse linéaire. Cette réponse doit être mesurée à une concentration constante (la concentration normale) de l'étalon interne et à différentes concentrations de tryptophane. Il est important que la hauteur des pics du tryptophane et de l'étalon interne se situe dans la gamme linéaire du système CLHP/fluorescence. Si le ou les pics du tryptophane et/ou de l'étalon interne sont trop petits ou trop grands, l'analyse doit être répétée avec un échantillon d'une autre dimension et/ou un volume final modifié.

9.3. *Hydroxyde de baryum*

Avec le temps, l'hydroxyde de baryum devient plus difficile à dissoudre. Cela donne une solution trouble pour le dosage par CLHP, ce qui peut entraîner de faibles résultats pour le tryptophane.

G. DOSAGE DES MATIÈRES GRASSES BRUTES

1. **Objet et champ d'application**

La méthode est destinée à déterminer la teneur en matières grasses brutes des aliments pour animaux.

L'application des deux procédés décrits ci-après dépend de la nature et de la composition des aliments pour animaux et de la raison pour laquelle l'analyse est effectuée.

Pour le dosage des matières grasses brutes dans les graines et fruits oléagineux ainsi que dans les aliments pour animaux dont la teneur en matières grasses brutes est supérieure à 15 %, l'extraction doit se faire selon la procédure A et la deuxième extraction selon la procédure B (point 5.3).

1.1. Procédé A — Matières grasses directement extractibles

Ce procédé est applicable aux matières premières pour aliments des animaux d'origine végétale, à l'exception de celles auxquelles s'applique le procédé B.

1.2. Procédé B — Matières grasses brutes totales

Ce procédé est applicable aux matières premières pour aliments des animaux d'origine animale et à tous les aliments composés. Il doit être utilisé pour toutes les matières premières dont les matières grasses ne sont pas complètement extractibles sans hydrolyse préalable, par exemple le gluten, les levures, les protéines de pomme de terre et les produits soumis à des procédés tels que l'extrusion, la floconnisation et le chauffage.

1.3. *Interprétation des résultats*

Dans tous les cas où l'application du procédé B donne un résultat supérieur à celui obtenu grâce à l'application du procédé A, le résultat obtenu au moyen du procédé B est accepté comme valeur réelle.

2. **Principe**

2.1. *Procédé A*

L'échantillon est extrait par de l'éther de pétrole. Le solvant est éliminé par distillation et le résidu est séché et pesé.

2.2. *Procédé B*

L'échantillon est traité à chaud par de l'acide chlorhydrique. Le mélange est refroidi et filtré. Après avoir été lavé et séché, le résidu est soumis à l'analyse selon le procédé A.

▼ M9**3. Réactifs**

- 3.1. Éther de pétrole, intervalle d'ébullition: 40 à 60 °C. L'indice de brome doit être inférieur à 1 et le résidu après évaporation inférieur à 2 mg/100 ml.
- 3.2. Sulfate de sodium, anhydre.
- 3.3. Acide chlorhydrique, $c = 3\text{ mol/l}$.
- 3.4. Adjuvant de filtration, par exemple terre de diatomées, Hyflo-supercel.

4. Appareillage

- 4.1. Extracteur. Si l'appareil est muni d'un siphon (appareil de Soxhlet), le débit du reflux doit être réglé de façon à obtenir environ dix cycles par heure; s'il s'agit d'un appareil sans siphon, le débit de liquide reflué doit être de 10 ml environ par minute.
- 4.2. Cartouches d'extraction, exemptes de matière soluble dans l'éther de pétrole, dont la porosité est compatible avec les exigences du point 4.1.
- 4.3. Étuve à dessiccation, soit par le vide à $75\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$, soit à pression atmosphérique à $100\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

5. Mode opératoire**5.1. Procédé A (voir le point 8.1)**

Peser, à 1 mg près, 5 g de l'échantillon, les introduire dans une cartouche d'extraction (point 4.2) et les recouvrir d'un tampon de coton dégraissé.

Placer la cartouche dans un extracteur (point 4.1) et extraire durant 6 heures par de l'éther de pétrole (point 3.1). Recueillir l'extrait dans une fiole sèche, tarée et contenant des fragments de pierre ponce⁽¹⁾.

Éliminer le solvant par distillation. Sécher le résidu en plaçant la fiole pendant une heure et demie dans l'étuve à dessiccation (point 4.3). Laisser refroidir dans un dessiccateur et peser. Sécher de nouveau pendant 30 minutes pour s'assurer que le poids des matières grasses reste constant (la perte de poids entre deux pesées successives doit être inférieure à 1 mg).

5.2. Procédé B

Peser, à 1 mg près, 2,5 g de l'échantillon (voir le point 8.2), les introduire dans un bécher de 400 ml ou une fiole conique de 300 ml et ajouter 100 ml d'acide chlorhydrique (point 3.3) et des fragments de pierre ponce. Recouvrir le bécher d'un verre de montre ou munir la fiole conique d'un réfrigérant à reflux. Amener le mélange à ébullition douce, à l'aide d'une petite flamme ou d'une plaque chauffante, et l'y maintenir durant une heure. Éviter que le produit adhère aux parois du récipient.

Refroidir et ajouter une quantité d'adjuvant de filtration (point 3.4) suffisante pour éviter toute perte de matières grasses lors de la filtration. Filtrer sur un double papier filtre mouillé, exempt de matières grasses. Laver le résidu à l'eau froide jusqu'à neutralité du filtrat. Vérifier que le filtrat ne contient pas de matières grasses. La présence de celles-ci indique qu'une extraction de l'échantillon par l'éther de pétrole, selon le procédé A, doit être effectuée préalablement à l'hydrolyse.

Placer le double papier filtre contenant le résidu sur un verre de montre et sécher durant une heure et demie dans l'étuve à pression atmosphérique (point 4.3) à $100\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

⁽¹⁾ Remplacer les fragments de pierre ponce par des perles de verre lorsque la matière grasse doit faire l'objet d'examen qualitatifs ultérieurs.

▼M9

Introduire le double papier filtre contenant le résidu sec dans une cartouche à extraction (point 4.2) et le recouvrir d'un tampon de coton dégraissé. Placer la cartouche dans un extracteur (point 4.1) et poursuivre le mode opératoire comme indiqué au point 5.1, deuxième et troisième alinéas.

5.3. *Procédé A et deuxième extraction selon le procédé B*

Pour le dosage des matières grasses brutes dans les graines et fruits oléagineux ainsi que dans les aliments pour animaux dont la teneur en matières grasses brutes est supérieure à 15 %, l'extraction doit se faire selon le procédé A et la deuxième extraction selon le procédé B.

Cela signifie qu'après l'extraction par de l'éther de pétrole (procédé A), le résidu ou une portion du résidu est de nouveau extrait au moyen d'acide chlorhydrique (procédé B). La teneur en matières grasses brutes correspond à la somme des résultats des procédés A et B.

6. **Expression du résultat**

Exprimer le poids du résidu sous forme de pourcentage de l'échantillon.

7. **Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur un même échantillon par le même analyste ne peut dépasser:

- 0,2 %, en valeur absolue, pour les teneurs en matières grasses brutes inférieures à 5 %,
- 4,0 % du résultat le plus élevé pour les teneurs de 5 à 10 %,
- 0,4 %, en valeur absolue, pour les teneurs supérieures à 10 %.

8. **Observations**

8.1. Pour les produits à teneur élevée en matières grasses qui sont difficiles à broyer ou non appropriés au prélèvement d'une prise d'essai réduite homogène, procéder de la manière suivante.

Peser, à 1 mg près, 20 g de l'échantillon et les mélanger à 10 g ou plus de sulfate de sodium anhydre (point 3.2). Extraire par l'éther de pétrole (point 3.1) comme indiqué au point 5.1. Ajuster l'extrait obtenu à 500 ml avec de l'éther de pétrole (point 3.1) et mélanger. Introduire 50 ml de la solution dans une petite fiole sèche, tarée et contenant des fragments de pierre ponce. Éliminer le solvant par distillation, sécher et poursuivre le mode opératoire comme indiqué au point 5.1, dernier alinéa.

Éliminer le solvant du résidu d'extraction se trouvant dans la cartouche, broyer le résidu à la finesse de 1 mm, le replacer dans la cartouche (ne pas ajouter de sulfate de sodium) et poursuivre le mode opératoire comme indiqué au point 5.1, deuxième et troisième alinéas.

Calculer la teneur en matières grasses, exprimée en pourcentage de l'échantillon, au moyen de la formule suivante:

$$(10m_1 + m_2) \times 5$$

où:

m_1 = poids, en grammes, du résidu de la première extraction (partie aliquote de l'extrait),

m_2 = poids, en grammes, du résidu de la seconde extraction.

▼ M9

- 8.2. La prise d'essai de certains produits (p.ex. les produits pauvres en matières grasses) peut être augmentée.
- 8.3. Les aliments pour animaux de compagnie ayant une teneur élevée en eau peuvent devoir être mélangés avec du sulfate de sodium anhydre préalablement à l'hydrolyse et à l'extraction selon le procédé B.
- 8.4. Au point 5.2, il peut être plus efficace d'utiliser de l'eau chaude au lieu de l'eau froide pour laver le résidu après filtration.
- 8.5. Il se peut que le temps de séchage (1 h 30) doive être allongé pour certains aliments pour animaux. Un temps de séchage excessif doit être évité dans la mesure où il peut donner de faibles résultats. Un four à micro-ondes peut également être utilisé.

H. DOSAGE DE LA CELLULOSE BRUTE**1. Objet et champ d'application**

La méthode permet de doser, dans les aliments pour animaux, les matières organiques exemptes de graisses et insolubles en milieu acide et en milieu alcalin, conventionnellement désignées sous le nom de cellulose brute.

La méthode n'est pas applicable dans le cas de la lignocellulose et du carbone végétal (particules trop fines).

2. Principe

L'échantillon, dégraissé si nécessaire, est traité successivement par des solutions bouillantes d'acide sulfurique et d'hydroxyde de potassium de concentrations déterminées. Le résidu est séparé par filtration sur un filtre en verre fritté, lavé, séché, pesé puis incinéré entre 475 et 500 °C. La perte de poids résultant de l'incinération correspond à la cellulose brute de la prise d'essai.

3. Réactifs

- 3.1. Acide sulfurique, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2. Antimousse (n-octanol, par exemple).
- 3.3. Adjuvant de filtration (Celite 545 ou équivalent) chauffé à 500 °C pendant 4 heures (point 8.6).
- 3.4. Acétone.
- 3.5. Éther de pétrole, intervalle d'ébullition: 40-60 °C.
- 3.6. Acide chlorhydrique, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Solution d'hydroxyde de potassium, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Appareillage

- 4.1. Unité de chauffage pour la digestion par des solutions d'acide sulfurique ou d'hydroxyde de potassium. Cette unité est munie d'un support à creuset filtrant (point 4.2) et pourvue d'un tuyau avec vanne vers le vide et la vidange. Elle est éventuellement pourvue d'air comprimé. Avant chaque utilisation journalière, préchauffer l'unité avec de l'eau bouillante pendant 5 minutes.
- 4.2. Creuset filtrant en verre muni d'un filtre en verre fritté de porosité 40-90 µm. Avant la première utilisation, chauffer à 500 °C pendant quelques minutes et refroidir (point 8.6).
- 4.3. Cylindre d'au moins 270 ml avec un réfrigérant à reflux, approprié à l'ébullition.
- 4.4. Étuve avec thermostat.
- 4.5. Four à moufle avec thermostat.
- 4.6. Unité d'extraction comprenant un support pour le creuset filtrant (point 4.2) et un tuyau d'évacuation avec vanne vers le vide et la vidange.

▼ M9

- 4.7. Joints pour assembler l'unité de chauffage (point 4.1), le creuset (point 4.2) et le cylindre (point 4.3), et pour connecter l'unité d'extraction (point 4.6) à froid et le creuset.

5. **Mode opératoire**

Peser, à 1 mg près, 1 g de l'échantillon préparé, le mettre dans le creuset (point 4.2) (voir observations points 9.1, 9.2, 9.3) et ajouter 1 g d'adjuvant de filtration (point 3.3).

Assembler l'unité de chauffage (point 4.1) et le creuset filtrant (point 4.2), puis attacher le cylindre (point 4.3) au creuset. Remplir de 150 ml d'acide sulfurique bouillant (point 3.1) l'ensemble cylindre-creuset et, si nécessaire, ajouter quelques gouttes d'antimousse (point 3.2).

Porter le liquide à ébullition en 5 ± 2 minutes et bouillir vivement pendant 30 minutes exactement.

Positionner la vanne vers le tuyau de vidange (point 4.1) et, sous vide, filtrer l'acide sulfurique à travers le creuset filtrant et laver le résidu avec trois fois 30 ml d'eau bouillante, en veillant à ce que le résidu aille à sec après chaque lavage.

Fermer la vanne de vidange et verser 150 ml de solution bouillante d'hydroxyde de potassium (point 3.7) dans l'ensemble cylindre-creuset et ajouter quelques gouttes d'antimousse (point 3.2). Porter le liquide à ébullition en 5 ± 2 minutes et bouillir vivement pendant exactement 30 minutes. Filtrer et répéter la procédure de lavage comme pour l'acide sulfurique.

Après le lavage final et le séchage, disjoindre le creuset et son contenu et le reconnecter à l'unité d'extraction à froid (point 4.6). Mettre le vide et laver le résidu dans le creuset avec trois portions successives de 25 ml d'acétone (point 3.4) en veillant à ce que le résidu aille à sec après chaque lavage.

Sécher le creuset jusqu'à poids constant à l'étuve à 130 °C. Après chaque séchage, refroidir dans le dessiccateur et peser rapidement. Placer le creuset dans un four à moufle et incinérer jusqu'à poids constant (la perte de poids entre deux pesées successives doit être inférieure ou égale à 2 mg) entre 475 et 500 °C pendant au moins 30 minutes.

Après chaque chauffage, refroidir d'abord dans le four puis dans le dessiccateur avant de peser.

Effectuer un essai à blanc sans l'échantillon. La perte de poids résultant de l'incinération ne peut excéder 4 mg.

6. **Calcul des résultats**

La teneur en cellulose brute exprimée sous forme de pourcentage de l'échantillon est donnée par la formule suivante:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

où:

m = poids de l'échantillon (en g);

m₀ = perte de poids (en g) après incinération, lors du dosage;

m₁ = perte de poids (en g) après incinération, lors de l'essai à blanc.

▼ M9**7. Répétabilité**

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

- 0,6 % en valeur absolue, pour les teneurs en cellulose brute inférieures à 10 %,
- 6 % par rapport au résultat le plus élevé, pour les teneurs en cellulose brute égales ou supérieures à 10 %.

8. Reproductibilité

La différence entre les résultats de deux dosages effectués sur le même échantillon dans des laboratoires différents ne peut dépasser:

- 1,0 % en valeur absolue, pour les teneurs en cellulose brute inférieures à 10 %,
- 10 % par rapport au résultat le plus élevé, pour les teneurs en cellulose brute égales ou supérieures à 10 %.

9. Observations

- 9.1. Les aliments pour animaux contenant plus de 10 % de matières grasses brutes doivent être dégraissés avant l'analyse au moyen d'éther de pétrole (point 3.5). Connecter le creuset filtrant (point 4.2) et son contenu à l'unité d'extraction à froid (point 4.6), appliquer le vide et laver le résidu avec trois fois 30 ml d'éther de pétrole. S'assurer que le résidu est sec. Connecter le creuset et son contenu à l'unité de chauffage (point 4.1) et continuer comme décrit au point 5.
- 9.2. Les aliments pour animaux contenant des matières grasses qui ne peuvent être directement extraites par l'éther de pétrole (point 3.5) doivent être dégraissés comme indiqué au point 8.1 et dégraissés de nouveau après ébullition avec l'acide. Après l'ébullition avec l'acide et les lavages qui suivent, connecter le creuset et son contenu à l'unité d'extraction à froid (point 4.6) et laver trois fois avec 30 ml d'acétone et ensuite trois fois avec 30 ml d'éther de pétrole. Filtrer sous vide jusqu'au séchage et continuer l'analyse telle qu'elle est décrite au point 5 en commençant au niveau du traitement par l'hydroxyde de potassium.
- 9.3. Si l'aliment pour animaux contient plus de 5 % de carbonates, exprimés en carbonate de calcium, connecter le creuset (point 4.2) avec l'échantillon pesé à l'unité de chauffage (point 4.1). Laver l'échantillon avec trois fois 30 ml d'acide chlorhydrique (point 3.6). Après chaque addition, attendre environ 1 minute avant de filtrer. Laver une fois avec 30 ml d'eau et continuer ensuite comme décrit au point 5.
- 9.4. Si un appareil en forme de dressoir est utilisé (plusieurs creusets attachés à la même unité de chauffage), ne pas effectuer deux essais du même échantillon dans la même série.
- 9.5. Si, après ébullition, il est difficile de filtrer les solutions acide et basique, utiliser l'air comprimé par le tuyau de vidange de l'unité de chauffage, puis continuer la filtration.
- 9.6. Il convient que la température d'incinération ne dépasse pas 500 °C, de façon à allonger la durée de vie des creusets filtrants en verre. Prendre soin d'éviter les chocs thermiques excessifs pendant les cycles de chauffage et de refroidissement.

▼ **M9****I. DOSAGE DES SUCRES****1. Objet et champ d'application**

La méthode permet de doser les sucres réducteurs et les sucres totaux après inversion, exprimés en glucose ou, le cas échéant, en saccharose, par conversion à l'aide du facteur 0,95. Elle est applicable aux aliments composés. Des modalités particulières sont prévues pour d'autres aliments. Il convient, si nécessaire, de doser séparément le lactose et d'en tenir compte dans le calcul des résultats.

La méthode doit servir à déterminer la teneur en sucres aux fins du calcul de la valeur énergétique des aliments pour animaux.

D'autres méthodes d'analyse peuvent être utilisées lorsque la teneur en sucres doit être déterminée à d'autres fins.

2. Principe

Les sucres sont dissous dans l'éthanol dilué; la solution est déféquée au moyen des solutions de Carrez I et II. Après élimination de l'éthanol, les dosages sont effectués avant et après inversion, selon la méthode de Luff-Schoorl.

3. Réactifs

3.1. Solution d'éthanol à 40 % (v/v), densité: 0,948 g/ml à 20 °C, amené au point de virage de la phénolphtaléine.

3.2. Solution de Carrez I: dissoudre dans l'eau 21,9 g d'acétate de zinc $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 3 g d'acide acétique glacial. Ajuster à 100 ml avec de l'eau.

3.3. Solution de Carrez II: dissoudre dans l'eau 10,6 g de ferrocyanure de potassium $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Ajuster à 100 ml avec de l'eau.

3.4. Solution à 0,1 % (p/v) de méthylorange.

3.5. Acide chlorhydrique à 4 mol/l.

3.6. Acide chlorhydrique à 0,1 mol/l.

3.7. Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 mol/l.

3.8. Réactif selon Luff-Schoorl:

Verser, tout en agitant prudemment, la solution d'acide citrique (point 3.8.2) dans la solution de carbonate de sodium (point 3.8.3). Ajouter ensuite la solution de sulfate de cuivre (point 3.8.1) et ajuster à 1 litre avec de l'eau. Laisser reposer une nuit et filtrer.

Contrôler la concentration du réactif ainsi obtenu (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l), voir le point 5.4, dernier alinéa. Le pH de la solution doit être de 9,4 environ.

3.8.1. Solution de sulfate de cuivre: dissoudre 25 g de sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, exempt de fer, dans 100 ml d'eau.

3.8.2. Solution d'acide citrique: dissoudre 50 g d'acide citrique, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dans 50 ml d'eau.

3.8.3. Solution de carbonate de sodium: dissoudre 143,8 g de carbonate de sodium anhydre dans environ 300 ml d'eau chaude. Laisser refroidir.

3.9. Solution de thiosulfate de sodium 0,1 mol/l.

3.10. Solution d'amidon: ajouter un mélange de 5 g d'amidon soluble dans 30 ml d'eau à 1 litre d'eau bouillante. Faire bouillir durant 3 minutes, laisser refroidir, ajouter au besoin 10 mg d'iodure mercurique comme agent conservateur.

▼ M9

- 3.11. Acide sulfurique 3 mol/l.
- 3.12. Solution à 30 % (p/v) d'iodure de potassium.
- 3.13. Granulés de pierre ponce bouillis dans l'acide chlorhydrique, lavés à l'eau et séchés.
- 3.14. 3-méthylbutan-1-ol.

4. Appareillage

Mélangeur (culbuteur): environ 35 à 40 retournements par minute.

5. Mode opératoire**5.1. Mise en solution**

Peser, à 1 mg près, 2,5 g de l'échantillon et les introduire dans une fiole jaugée de 250 ml. Ajouter 200 ml d'éthanol (point 3.1) et mélanger pendant une heure dans le culbuteur. Ajouter 5 ml de solution de Carrez I (point 3.2) et agiter pendant environ 30 secondes. Ajouter 5 ml de solution de Carrez II (point 3.3) et agiter de nouveau pendant 1 minute. Ajuster au trait de jauge avec de l'éthanol (point 3.1), homogénéiser et filtrer. Prélever 200 ml du filtrat et évaporer environ la moitié du volume de manière à éliminer la majeure partie de l'éthanol. Transvaser quantitativement le résidu d'évaporation, à l'aide d'eau chaude, dans une fiole jaugée de 200 ml, refroidir, ajuster au trait de jauge avec de l'eau, homogénéiser et filtrer, si nécessaire. Cette solution sera utilisée pour le dosage des sucres réducteurs et, après inversion, pour le dosage des sucres totaux.

5.2. Dosage des sucres réducteurs

Prélever à la pipette une quantité de solution n'excédant pas 25 ml et contenant moins de 60 mg de sucres réducteurs, exprimés en glucose. Si nécessaire, ajuster à 25 ml avec de l'eau distillée et déterminer la teneur en sucres réducteurs au moyen de la méthode de Luff-Schoorl. Le résultat est exprimé sous forme de pourcentage de glucose dans l'échantillon.

5.3. Dosage des sucres totaux après inversion

Prélever à la pipette 50 ml de solution et les porter dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter quelques gouttes de solution de méthylorange (point 3.4), puis, prudemment et tout en agitant, de l'acide chlorhydrique (point 3.5) jusqu'à virage net au rouge. Ajouter 15 ml d'acide chlorhydrique (point 3.6), plonger la fiole dans un bain d'eau à forte ébullition et l'y maintenir durant 30 minutes. Refroidir rapidement à 20 °C environ et ajouter 15 ml de solution d'hydroxyde de sodium (point 3.7). Ajuster à 100 ml avec de l'eau et homogénéiser. Prélever une quantité n'excédant pas 25 ml et contenant moins de 60 mg de sucres réducteurs, exprimés en glucose. Si nécessaire, ajuster à 25 ml avec de l'eau distillée et déterminer la teneur en sucres réducteurs au moyen de la méthode de Luff-Schoorl. Le résultat est exprimé sous forme de pourcentage de glucose ou, le cas échéant, de saccharose, en multipliant par le facteur 0,95.

5.4. Titrage selon la méthode de Luff-Schoorl

Prélever à la pipette 25 ml du réactif selon Luff-Schoorl (point 3.8) et les porter dans un erlenmeyer de 300 ml; ajouter 25 ml, exactement mesurés, de la solution déféquée de sucres. Ajouter deux granulés de pierre ponce (point 3.13), chauffer, en agitant à la main, sur une flamme libre de hauteur moyenne et porter le liquide à ébullition en 2 minutes environ. Placer immédiatement l'erlenmeyer sur une toile métallique pourvue d'un écran d'amiante muni d'un trou de 6 cm environ de diamètre, sous laquelle on a préalablement allumé une flamme. Celle-ci est réglée de façon que seul le fond de l'erlenmeyer soit chauffé. Adapter ensuite un réfrigérant à reflux sur l'erlenmeyer. À partir de ce moment, faire bouillir pendant 10 minutes exactement. Refroidir immédiatement dans l'eau froide et après 5 minutes environ, titrer comme suit:

▼ M9

Ajouter 10 ml de solution d'iodure de potassium (point 3.12) et, immédiatement après et avec prudence (en raison du risque de formation d'une mousse abondante), 25 ml d'acide sulfurique (point 3.11). Titrer ensuite par la solution de thiosulfate de sodium (point 3.9) jusqu'à apparition d'une coloration jaune terne, ajouter l'indicateur à l'amidon (point 3.10) et achever le titrage.

Effectuer le même titrage sur un mélange exactement mesuré de 25 ml de réactif selon Luff-Schoorl (point 3.8) et 25 ml d'eau, après avoir ajouté 10 ml de solution d'iodure de potassium (point 3.12) et 25 ml d'acide sulfurique (point 3.11), sans porter à ébullition.

6. Calcul des résultats

Déterminer, à l'aide de la table, la quantité de glucose (en mg) qui correspond à la différence entre les valeurs des deux titrages, exprimées en ml de thiosulfate de sodium 0,1 mol/l. Exprimer le résultat sous forme de pourcentage de l'échantillon.

7. Modes opératoires particuliers

- 7.1. Pour les aliments très riches en mélasse et d'autres aliments peu homogènes, peser 20 g et les introduire dans une fiole jaugée de 1 litre avec 500 ml d'eau. Mélanger pendant une heure dans le culbuteur. Dégager au moyen des réactifs que sont les solutions de Carrez I (point 3.2) et II (point 3.3) comme décrit au point 5.1 en utilisant, toutefois, une quantité quatre fois plus élevée de chaque réactif. Ajuster au trait de jauge avec de l'éthanol à 80 % (v/v).

Homogénéiser et filtrer. Éliminer l'éthanol comme décrit au point 5.1. En l'absence d'amidon dextrinisé, ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- 7.2. Pour les mélasses et les matières premières pour aliments des animaux riches en sucres et presque exempts d'amidon (caroubes, cossettes séchées de betteraves, etc.), peser 5 g, les introduire dans une fiole jaugée de 250 ml, ajouter 200 ml d'eau distillée et mélanger pendant une heure, ou plus si nécessaire, dans le culbuteur. Dégager ensuite au moyen des réactifs que sont les solutions de Carrez I (point 3.2) et II (point 3.3), comme décrit au point 5.1. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau froide, homogénéiser et filtrer. Pour doser les sucres totaux, poursuivre comme décrit au point 5.3.

8. Observations

- 8.1. Il est recommandé d'ajouter environ 1 ml de 3-méthylbutan-1-ol (point 3.14) (sans tenir compte du volume), avant l'ébullition avec le réactif de Luff-Schoorl, afin d'éviter la formation de mousse.
- 8.2. La différence entre la teneur en sucres totaux après inversion, exprimés en glucose, et la teneur en sucres réducteurs, exprimés en glucose, multipliée par 0,95, donne la teneur en saccharose pour cent.
- 8.3. Pour déterminer la teneur en sucres réducteurs, à l'exclusion du lactose, deux voies peuvent être adoptées.
- 8.3.1. Pour un calcul approximatif, on multiplie par 0,675 la teneur en lactose déterminée par une méthode d'analyse différente et on retranche le résultat obtenu de la teneur en sucres réducteurs.
- 8.3.2. Pour un calcul précis des sucres réducteurs, à l'exclusion du lactose, il est nécessaire de partir du même échantillon pour les deux dosages finals. L'une des analyses est effectuée sur une partie de la solution obtenue en application du point 5.1, l'autre sur une partie de la solution obtenue lors du dosage du lactose selon la méthode prévue à cet effet (après fermentation des autres espèces de sucres et défécation).

▼ M9

Dans les deux cas, la quantité de sucre présente est déterminée selon la méthode de Luff-Schoorl et calculée en mg de glucose. L'une des deux valeurs est retranchée de l'autre et la différence est exprimée en pourcentage de l'échantillon.

Exemple

Les deux volumes prélevés correspondent, pour chaque dosage, à un échantillon de 250 mg.

On consomme 17 ml de solution de thiosulfate de sodium 0,1 mol/l, ce qui correspond à 44,2 mg de glucose, dans le premier cas, et 11 ml de la solution, ce qui correspond à 27,6 mg de glucose, dans le second cas.

La différence s'élève à 16,6 mg de glucose.

La teneur en sucres réducteurs (lactose excepté), calculée en glucose est donc de:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64\%$$

Table des valeurs pour 25 ml de réactif selon Luff-Schoorl

ml de Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l, 2 minutes de chauffage, 10 minutes d'ébullition

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glucose, fructose, sucres invertis C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	différence	mg	différence	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

J. DOSAGE DU LACTOSE**1. Objet et champ d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en lactose des aliments pour animaux qui en contiennent plus de 0,5 %.

2. Principe

Les sucres sont dissous dans l'eau. La solution est soumise à la fermentation par la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui laisse le lactose intact. Après défécation et filtration, la teneur en lactose du filtrat est déterminée par la méthode de Luff-Schoorl.

▼ M9**3. Réactifs**

- 3.1. Suspension de *Saccharomyces cerevisiae*: mettre en suspension 25 g de levure fraîche dans 100 ml d'eau. La suspension se conserve une semaine au maximum au réfrigérateur.
- 3.2. Solution de Carrez I: dissoudre dans l'eau 21,9 g d'acétate de zinc $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ et 3 g d'acide acétique glacial. Ajuster à 100 ml avec de l'eau.
- 3.3. Solution de Carrez II: dissoudre dans l'eau 10,6 g de ferrocyanure de potassium $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Ajuster à 100 ml avec de l'eau.
- 3.4. Réactif selon Luff-Schoorl:

Verser, tout en agitant prudemment, la solution d'acide citrique (point 3.4.2) dans la solution de carbonate de sodium (point 3.4.3). Ajouter ensuite la solution de sulfate de cuivre (point 3.4.1) et ajuster à 1 litre avec de l'eau. Laisser reposer une nuit et filtrer. Contrôler la concentration du réactif ainsi obtenu (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/litre). Le pH de la solution doit être de 9,4 environ.
- 3.4.1. Solution de sulfate de cuivre: dissoudre 25 g de sulfate de cuivre $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, exempt de fer, dans 100 ml d'eau.
- 3.4.2. Solution d'acide citrique: dissoudre 50 g d'acide citrique $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ dans 50 ml d'eau.
- 3.4.3. Solution de carbonate de sodium: dissoudre 143,8 g de carbonate de sodium anhydre dans environ 300 ml d'eau chaude. Laisser refroidir.
- 3.5. Granulés de pierre ponce bouillis dans l'acide chlorhydrique, lavés à l'eau et séchés.
- 3.6. Solution à 30 % (p/v) d'iodure de potassium.
- 3.7. Acide sulfurique 3 mol/l.
- 3.8. Solution de thiosulfate de sodium 0,1 mol/l.
- 3.9. Solution d'amidon: ajouter un mélange de 5 g d'amidon soluble dans 30 ml d'eau à 1 litre d'eau bouillante. Faire bouillir durant 3 minutes, laisser refroidir et ajouter, si nécessaire, 10 mg d'iodure mercurique comme agent conservateur.

4. Appareillage

Bain d'eau muni d'un thermostat réglé à 38-40 °C.

5. Mode opératoire

Peser, à 1 mg près, 1 g de l'échantillon et introduire cette prise d'essai dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter 25 à 30 ml d'eau. Placer le ballon pendant 30 minutes dans un bain d'eau bouillante et refroidir ensuite à 35 °C environ. Ajouter 5 ml de suspension de levure (point 3.1) et homogénéiser. Laisser reposer la fiole durant 2 heures dans un bain d'eau, à la température de 38 à 40 °C. Refroidir jusqu'à 20 °C environ.

Ajouter 2,5 ml de solution de Carrez I (point 3.2) et agiter pendant 30 secondes; ajouter ensuite 2,5 ml de solution de Carrez II (point 3.3) et agiter de nouveau pendant 30 secondes. Ajuster à 100 ml avec de l'eau, mélanger et filtrer. Prélever à la pipette une quantité de filtrat n'excédant pas 25 ml et contenant de préférence 40 à 80 mg de lactose et introduire celle-ci dans un erlenmeyer de 300 ml. Si nécessaire, ajuster à 25 ml avec de l'eau.

▼ **M9**

Procéder de la même façon à un essai à blanc avec 5 ml de suspension de levure (point 3.1). Déterminer comme suit la teneur en lactose selon Luff-Schoorl: ajouter 25 ml exactement du réactif selon Luff-Schoorl (point 3.4) et deux granulés de pierre ponce (point 3.5). Chauffer, en agitant à la main, sur une flamme libre de hauteur moyenne et porter le liquide à ébullition en 2 minutes environ. Placer immédiatement l'erlenmeyer sur une toile métallique pourvue d'un écran d'amiante muni d'un trou de 6 cm environ de diamètre, sous laquelle on a préalablement allumé une flamme. Celle-ci est réglée de façon que seul le fond de l'erlenmeyer soit chauffé. Adapter ensuite un réfrigérant à reflux sur l'erlenmeyer. À partir de ce moment, faire bouillir pendant 10 minutes exactement. Refroidir immédiatement dans l'eau froide et après 5 minutes environ, titrer comme suit:

Ajouter 10 ml de solution d'iodure de potassium (point 3.6) et, immédiatement après et avec prudence (en raison du risque de formation d'une mousse abondante), 25 ml d'acide sulfurique (point 3.7). Titrer ensuite par la solution de thiosulfate de sodium (point 3.8) jusqu'à apparition d'une coloration jaune terne, ajouter l'indicateur à l'amidon (point 3.9) et achever le titrage.

Effectuer le même titrage sur un mélange exactement mesuré de 25 ml de réactif selon Luff-Schoorl (point 3.4) et 25 ml d'eau, après avoir ajouté 10 ml de solution d'iodure de potassium (point 3.6) et 25 ml d'acide sulfurique (point 3.7), sans porter à ébullition.

6. **Calcul des résultats**

Déterminer, à l'aide de la table jointe, la quantité de lactose (en mg) qui correspond à la différence entre les résultats des deux titrages, exprimés en ml de thiosulfate de sodium 0,1 mol/l.

Exprimer le résultat sous forme de pourcentage de lactose anhydre dans l'échantillon.

7. **Observation**

1. Pour les produits contenant plus de 40 % de sucres fermentescibles, utiliser plus de 5 ml de suspension de levure (point 3.1).
2. Dans les aliments «à teneur réduite en lactose» (le lait pour chat, par exemple), le lactose est converti en fructose, qui n'est pas entièrement fermenté dans les 2 heures, ce qui donne des résultats supérieurs ou de faux positifs (à cause des résidus de fructose restant dans l'extrait).

Table des valeurs pour 25 ml de réactif selon Luff-Schoorl

ml de Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l, 2 minutes de chauffage, 10 minutes d'ébullition

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glucose, fructose, sucres invertis C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	différence	mg	différence	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14

▼ M9

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glucose, fructose, sucres invertis C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	différence	mg	différence	ml
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

K. DOSAGE DE L'AMIDON**MÉTHODE POLARIMÉTRIQUE****1. Objet et champ d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en amidon et en produits de dégradation à haut poids moléculaire de l'amidon des aliments pour animaux, en vue de contrôler le respect de la valeur énergétique déclarée (dispositions de l'annexe VII) et règlement (CE) n° 767/2009.

La méthode doit servir à déterminer la teneur en amidon aux fins du calcul de la valeur énergétique des aliments pour animaux.

D'autres méthodes d'analyse peuvent être utilisées lorsque la teneur en amidon doit être déterminée à d'autres fins.

2. Principe

La méthode comprend un double dosage. Lors du premier, l'échantillon est traité au moyen d'acide chlorhydrique dilué. Après défécation et filtration, on mesure par polarimétrie le pouvoir rotatoire de la solution.

Lors du second, l'échantillon est extrait au moyen d'éthanol à 40 %. Après acidification du filtrat par l'acide chlorhydrique, défécation et filtration, on mesure le pouvoir rotatoire dans les mêmes conditions que lors du premier dosage.

La différence entre les deux, multipliée par un facteur connu, donne la teneur en amidon de l'échantillon.

3. Réactifs

3.1. Acide chlorhydrique, solution à 25 % (p/p), densité: 1,126 g/ml.

3.2. Acide chlorhydrique, solution à 1,13 % (p/v).

La concentration doit être vérifiée par titrage à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 mol/l en présence de rouge de méthyle à 0,1 % (p/v) dans l'éthanol à 94 % (v/v). 30,94 ml de NaOH 0,1 mol/l sont nécessaires pour la neutralisation de 10 ml.

3.3. Solution de Carrez I: dissoudre 21,9 g d'acétate de zinc Zn(CH₃COO)₂ 2H₂O et 3 g d'acide acétique glacial dans l'eau. Ajuster à 100 ml avec de l'eau.

▼ M9

3.4. Solution de Carrez II: dissoudre 10,6 g de ferrocyanure de potassium $K_4 Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ dans l'eau. Ajuster à 100 ml avec de l'eau.

3.5. Éthanol, solution à 40 % (v/v), densité: 0,948 g/ml at 20 °C.

4. **Appareillage**

4.1. Erlenmeyer de 250 ml à rodage normalisé, avec réfrigérant à reflux.

4.2. Polarimètre ou saccharimètre.

5. **Mode opératoire**

5.1. *Préparation de l'échantillon*

Broyer l'échantillon de façon à ce qu'il passe en totalité au travers d'un tamis à mailles rondes de 0,5 mm de diamètre.

5.2. Détermination du pouvoir rotatoire total (P ou S) (voir observation point 7.1)

Peser, à 1 mg près, 2,5 g de l'échantillon broyé et les introduire dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter 25 ml d'acide chlorhydrique (point 3.2), agiter pour obtenir une bonne répartition de la prise d'essai et ajouter de nouveau 25 ml d'acide chlorhydrique (point 3.2). Plonger la fiole dans un bain d'eau bouillante et, durant les trois premières minutes qui suivent, agiter énergiquement et régulièrement pour éviter la formation d'agglomérats. La quantité d'eau du bain doit être suffisante pour permettre de maintenir le bain en ébullition lorsque la fiole y est plongée. Celle-ci ne peut être retirée du bain au cours de l'agitation. Après 15 minutes exactement, retirer le ballon du bain, y ajouter 30 ml d'eau froide et refroidir immédiatement jusqu'à 20 °C.

Ajouter 5 ml de solution de Carrez I (point 3.3) et agiter pendant environ 30 secondes. Ajouter ensuite 5 ml de solution de Carrez II (point 3.4) et agiter de nouveau pendant 30 secondes environ. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau, mélanger et filtrer. Si le filtrat n'est pas parfaitement limpide (ce qui est rare), recommencer l'analyse en utilisant une plus grande quantité des solutions de Carrez I et II, par exemple 10 ml.

Mesurer le pouvoir rotatoire de la solution dans un tube de 200 mm au polarimètre ou au saccharimètre.

5.3. *Détermination du pouvoir rotatoire (P' ou S') des substances solubles dans de l'éthanol à 40 %*

Peser, à 1 mg près, 5 g de l'échantillon, les introduire dans une fiole jaugée de 100 ml et ajouter 80 ml environ d'éthanol (point 3.5) (voir observation point 7.2). Laisser la fiole reposer durant 1 heure à température ambiante; au cours de ce laps de temps, procéder six fois à une agitation énergique de façon que la prise d'essai soit bien mélangée à l'éthanol. Ajuster au trait de jauge avec de l'éthanol (point 3.5), mélanger et filtrer.

Introduire à la pipette 50 ml du filtrat (= 2,5 g de l'échantillon) dans un erlenmeyer de 250 ml, ajouter 2,1 ml d'acide chlorhydrique (point 3.1) et agiter énergiquement. Ajuster un réfrigérant à reflux à l'erlenmeyer et plonger celui-ci dans un bain d'eau bouillante. Après 15 minutes exactement, retirer l'erlenmeyer du bain, transvaser son contenu dans une fiole jaugée de 100 ml, en rinçant avec un peu d'eau froide, et refroidir jusqu'à 20 °C.

▼ M9

Déféquer ensuite à l'aide des solutions de Carrez I (point 3.3) et II (point 3.4), compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser, filtrer et mesurer le pouvoir rotatoire comme indiqué au point 5.2, deuxième et troisième alinéas.

6. Calcul des résultats

La teneur en amidon (%) est calculée de l'une des manières suivantes.

6.1. Mesures effectuées au polarimètre

$$\text{Teneur en amidon (\%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = pouvoir rotatoire total en degrés d'angle,

P' = pouvoir rotatoire en degrés d'angle des substances solubles dans l'éthanol à 40 % (v/v),

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = pouvoir rotatoire spécifique de l'amidon pur. Les valeurs numériques habituellement acceptées pour ce facteur sont les suivantes:

+ 185,9° : amidon de riz;

+ 185,7° : fécule de pomme de terre;

+ 184,6° : amidon de maïs;

+ 182,7° : amidon de froment (blé);

+ 181,5° : amidon d'orge;

+ 181,3° : amidon d'avoine;

+ 184,0° : autres types d'amidon et mélanges d'amidon dans les aliments composés.

6.2. Mesures effectuées au saccharimètre

$$\text{Teneur en amidon(\%)} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2 N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6 N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

S = pouvoir rotatoire total en degrés de saccharimètre,

S' = pouvoir rotatoire en degrés de saccharimètre des substances solubles dans l'éthanol à 40 % (v/v),

N = poids (g) du saccharose dans 100 ml d'eau produisant une rotation optique de 100 degrés de saccharimètre mesurés à l'aide d'un tube de 200 mm:

16,29 g pour les saccharimètres français,

26,00 g pour les saccharimètres allemands,

20,00 g pour les saccharimètres mixtes.

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = pouvoir rotatoire spécifique de l'amidon pur (voir le point 6.1).

▼ M9**6.3. Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur un même échantillon ne peut dépasser 0,4 en valeur absolue pour les teneurs en amidon inférieures à 40 % et 1 % en valeur relative pour les teneurs en amidon égales ou supérieures à 40 %.

7. Observations

7.1. Lorsque l'échantillon contient plus de 6 % de carbonates, calculés en carbonate de calcium, ceux-ci doivent être détruits par un traitement à l'aide d'une quantité exactement appropriée d'acide sulfurique dilué, avant la détermination du pouvoir rotatoire total.

7.2. Dans le cas des produits à forte teneur en lactose, tels que les poudres de lactosérum ou de lait écrémé, procéder comme suit après l'addition de 80 ml d'éthanol (point 3.5). Ajuster au ballon un réfrigérant à reflux, plonger le ballon durant 30 minutes dans un bain d'eau à 50 °C. Laisser refroidir et poursuivre l'analyse comme indiqué au point 5.3.

7.3. Les matières premières suivantes, lorsqu'elles sont présentes dans des proportions significatives dans les aliments pour animaux, sont réputées donner lieu à des interférences lors de la détermination de la teneur en amidon par la méthode polarimétrique, de sorte que les résultats obtenus pourraient être faussés:

- sous-produits de betterave (sucrière) tels que la pulpe de betterave (sucrière), la mélasse de betterave (sucrière), la pulpe de betterave (sucrière) mélassée, la vinasse de betterave (sucrière), le sucre de betterave,
- pulpe d'agrumes,
- graines de lin; tourteau de pression de graines de lin; tourteau d'extraction de graines de lin,
- graine de colza; tourteau de pression de colza; tourteau d'extraction de colza; pellicules de colza,
- graines de tournesol; tourteau d'extraction de tournesol; tourteau d'extraction de tournesol partiellement décortiqué,
- tourteau de pression de coprah; tourteau d'extraction de coprah,
- pulpe de pommes de terre,
- levures déshydratées,
- produits riches en inuline (par exemple, cossettes et farine de topi-nambour),
- cretons,
- produits à base de soja.

Dans ces cas, la méthode d'analyse prévue par le règlement (CE) n° 121/2008 de la Commission ⁽¹⁾ peut être appliqué. Cette méthode peut être utilisée pour des aliments pour animaux contenant moins de 1 % d'amidon.

⁽¹⁾ Règlement (CE) n° 121/2008 de la Commission du 11 février 2008 définissant la méthode d'analyse pour la détermination de la teneur en amidon des préparations des types utilisés pour l'alimentation des animaux (code NC 2309) (JO L 37 du 12.2.2008, p. 3).

▼ M9**L. DOSAGE DES CENDRES BRUTES****1. Objet et champ d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en cendres brutes des aliments pour animaux.

2. Principe

L'échantillon est incinéré à 550 °C; le résidu est pesé.

3. Réactifs

Nitrate d'ammonium, solution à 20 % (p/v).

4. Appareillage**4.1. Plaque chauffante.****4.2. Four à moufle électrique, avec thermostat.****4.3. Creusets à incinération en silice, porcelaine ou platine rectangulaires (environ 60 × 40 × 25 mm) ou ronds (diamètre: 60 à 75 mm, hauteur: 20 à 40 mm).****5. Mode opératoire**

Peser, à 1 mg près, 5 g environ de l'échantillon (2,5 g pour les produits ayant tendance à gonfler) dans un creuset à incinération préalablement chauffé à 550 °C, refroidi et taré. Placer le creuset sur la plaque chauffante et chauffer progressivement jusqu'à carbonisation de la matière. Incinérer conformément au point 5.1 ou 5.2.

5.1. Introduire le creuset dans le four à moufle réglé à 550 °C. Maintenir à cette température jusqu'à obtention de cendres blanches, gris clair ou rougeâtres, apparemment dépourvues de particules charbonneuses. Placer le creuset dans un dessiccateur, laisser refroidir et peser immédiatement.**5.2. Introduire le creuset dans le four à moufle réglé à 550 °C. Incinérer pendant 3 heures. Placer le creuset dans un dessiccateur, laisser refroidir et peser immédiatement. Incinérer de nouveau pendant 30 minutes pour s'assurer que le poids des cendres reste constant (la perte de poids entre deux pesées successives doit être inférieure à 1 mg).****6. Calcul des résultats**

Calculer le poids du résidu en déduisant la tare.

Exprimer le résultat sous forme de pourcentage de l'échantillon.

7. Observations**7.1. Les cendres des *matières difficiles à incinérer* doivent être soumises à une première incinération de 3 heures au moins, refroidies et additionnées de quelques gouttes d'une solution à 20 % de nitrate d'ammonium ou d'eau (prudemment, pour éviter la dispersion ou le collage des cendres). Poursuivre la calcination après dessiccation à l'étuve. Répéter si nécessaire l'opération jusqu'à incinération complète.****7.2. Pour les *matières qui résistent au traitement* indiqué au point 7.1, opérer comme suit: après une incinération de 3 heures, reprendre les cendres par de l'eau chaude et filtrer sur un petit filtre sans cendres. Incinérer le filtre et son contenu dans le creuset initial. Amener le filtrat dans le creuset refroidi, évaporer à sec, incinérer et peser.****7.3. Dans le cas des *matières grasses*, peser avec exactitude une prise d'essai de 25 g dans un creuset de capacité appropriée. Carboniser en enflammant la matière au moyen d'une mèche de papier filtre sans cendres. Après combustion, humecter par le minimum nécessaire d'eau. Sécher et incinérer comme indiqué au point 5.**

▼M9**M. DOSAGE DES CENDRES INSOLUBLES DANS L'ACIDE CHLORHYDRIQUE****1. Objet et champ d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en matières minérales insolubles dans l'acide chlorhydrique des aliments pour animaux. Deux procédés sont prévus en fonction de la nature de l'échantillon.

1.1. *Procédé A*: applicable aux matières premières organiques pour aliments des animaux et à la plupart des aliments composés.

1.2. *Procédé B*: applicable aux composés et aux mélanges minéraux ainsi qu'aux aliments composés dont la teneur en matières insolubles dans l'acide chlorhydrique, déterminée selon le procédé A, est supérieure à 1 %.

2. Principe

2.1. *Procédé A*: l'échantillon est incinéré, les cendres sont traitées à ébullition par l'acide chlorhydrique et le résidu insoluble est filtré et pesé.

2.2. *Procédé B*: l'échantillon est traité par l'acide chlorhydrique. La solution est filtrée, le résidu est incinéré et les cendres obtenues sont traitées comme dans le procédé A.

3. Réactifs

3.1. Acide chlorhydrique à 3 mol/l.

3.2. Acide trichloracétique, solution à 20 % (p/v).

3.3. Acide trichloracétique, solution à 1 % (p/v).

4. Appareillage

4.1. Plaque chauffante.

4.2. Four à moufle électrique, avec thermostat.

4.3. Creusets à incinération en silice, porcelaine ou platine rectangulaires (environ 60 × 40 × 25 mm) ou ronds (diamètre: 60 à 75 mm, hauteur: 20 à 40 mm).

4.4. Filtres sans cendres.

5. Mode opératoire**5.1. Procédé A**

Incinérer la prise d'essai selon le mode opératoire décrit pour le dosage des cendres brutes. Les cendres obtenues lors de ce dosage peuvent également être utilisées.

Introduire les cendres dans un bécher de 250 à 400 ml à l'aide de 75 ml d'acide chlorhydrique (point 3.1). Porter prudemment le liquide à ébullition douce et maintenir celle-ci pendant 15 minutes. Filtrer la solution chaude sur un papier filtre sans cendres et laver le résidu avec de l'eau chaude jusqu'à disparition de réaction acide. Sécher le filtre contenant le résidu et incinérer dans un creuset taré à une température de 550 °C au moins et de 700 °C au plus. Refroidir dans un dessiccateur et peser.

5.2. Procédé B

Peser, à 1 mg près, 5 g de l'échantillon et les introduire dans un bécher de 250 à 400 ml. Ajouter successivement 25 ml d'eau et 25 ml d'acide chlorhydrique (point 3.1), mélanger et attendre la fin de l'effervescence. Ajouter encore 50 ml d'acide chlorhydrique (point 3.1). Attendre la fin d'un éventuel dégagement gazeux, placer ensuite le bécher dans un bain d'eau bouillante et l'y maintenir pendant 30 minutes ou plus, si nécessaire, afin d'hydrolyser complètement l'amidon éventuellement présent. Filtrer à chaud sur filtre sans cendres et laver le filtre à

▼ M9

l'aide de 50 ml d'eau chaude (voir observation point 7). Placer le filtre contenant le résidu dans un creuset à incinération, sécher et incinérer à une température de 550 °C au moins et de 700 °C au plus. Introduire les cendres dans un bécher de 250 à 400 ml à l'aide de 75 ml d'acide chlorhydrique (point 3.1); poursuivre comme indiqué au point 5.1, deuxième alinéa.

6. Calcul des résultats

Calculer le poids du résidu en déduisant la tare. Exprimer le résultat sous forme de pourcentage de l'échantillon.

7. Observation

Si la filtration se révèle difficile, recommencer le dosage en remplaçant les 50 ml d'acide chlorhydrique (point 3.1) par 50 ml d'acide trichloracétique, solution à 20 % (p/v) (point 3.2), et en lavant le filtre à l'aide d'une solution chaude d'acide trichloracétique à 1 % (point 3.3).

N. DOSAGE DU PHOSPHORE TOTAL

Le dosage du phosphore total est effectué

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 15510 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination des teneurs en calcium, sodium, phosphore, magnésium, potassium, fer, zinc, cuivre, manganèse, cobalt, molybdène et plomb par ICP-AES» ou
- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 15621 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage du calcium, du sodium, du phosphore, du magnésium, du potassium, du soufre, du fer, du zinc, du cuivre, du manganèse et du cobalt après digestion sous pression par ICP-AES» ou
- selon la méthode photométrique, décrite ci-après.

MÉTHODE PHOTOMÉTRIQUE**1. Objet et champ d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en phosphore total des aliments pour animaux. Elle est particulièrement indiquée pour l'analyse des produits pauvres en phosphore. Dans certains cas (produits riches en phosphore), une méthode gravimétrique peut être appliquée.

2. Principe

L'échantillon est minéralisé, soit par voie sèche (pour les aliments organiques), soit par voie humide (pour les composés minéraux et les aliments liquides) et mis en solution acide. La solution est traitée par le réactif vanadomolybdique. La densité optique de la solution jaune ainsi formée est mesurée au spectrophotomètre à 430 nm.

3. Réactifs

- 3.1. Carbonate de calcium.
- 3.2. Acide chlorhydrique, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (environ 6 mol/l).
- 3.3. Acide nitrique, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.
- 3.4. Acide nitrique, $\rho_{20} = 1,38$ à 1,42 g/ml.
- 3.5. Acide sulfurique, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.6. Réactif vanadomolybdique: mélanger 200 ml de solution d'heptamolybdate d'ammonium (point 3.6.1), 200 ml de solution de monovanadate d'ammonium (point 3.6.2) et 134 ml d'acide nitrique (point 3.4) dans une fiole jaugée de 1 litre. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau.

▼ M9

- 3.6.1. Solution d'heptamolybdate d'ammonium: dissoudre dans l'eau chaude 100 g d'heptamolybdate d'ammonium $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Ajouter 10 ml d'ammoniaque (densité 0,91 g/ml) et ajuster à 1 litre avec de l'eau.
- 3.6.2. Solution de monovanadate d'ammonium: dissoudre dans 400 ml d'eau chaude 2,35 g de monovanadate d'ammonium NH_4VO_3 . Ajouter lentement et tout en agitant 20 ml d'acide nitrique dilué [7 ml de HNO_3 (point 3.4) + 13 ml de H_2O] et ajuster à 1 litre avec de l'eau.
- 3.7. Solution étalon à 1 mg de phosphore par ml: dissoudre 4,387 g de dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 dans l'eau. Ajuster à 1 litre avec de l'eau.

4. Appareillage

- 4.1. Creusets à incinération en silice, en porcelaine ou en platine.
- 4.2. Four à moufle électrique, muni d'un thermostat réglé à 550 °C.
- 4.3. Matras de Kjeldahl, 250 ml.
- 4.4. Fioles jaugées et pipettes de précision.
- 4.5. Spectrophotomètre.
- 4.6. Tubes à essai d'un diamètre de 16 mm environ, à rodage normalisé 14,5 mm; capacité: 25 à 30 ml.

5. Mode opératoire**5.1. Préparation de la solution**

Selon la nature de l'échantillon, préparer une solution comme indiqué au point 5.1.1 ou 5.1.2.

5.1.1. Cas général

Peser, à 1 mg près, 1 g ou plus de l'échantillon. Introduire la prise d'essai dans un matras de Kjeldahl, ajouter 20 ml d'acide sulfurique (point 3.5), agiter pour imprégner complètement la matière d'acide et éviter qu'elle n'adhère aux parois du ballon, chauffer et maintenir pendant 10 minutes à ébullition. Laisser refroidir légèrement, ajouter 2 ml d'acide nitrique (point 3.4), chauffer doucement, laisser refroidir légèrement, ajouter à nouveau un peu d'acide nitrique (point 3.4) et porter à ébullition. Répéter ces opérations jusqu'à obtention d'une solution incolore. Refroidir, ajouter un peu d'eau, transvaser le liquide dans une fiole jaugée de 500 ml en rinçant le matras de Kjeldahl à l'eau chaude. Laisser refroidir, ajuster au trait de jauge avec de l'eau, homogénéiser et filtrer.

5.1.2. Échantillons contenant des matières organiques et exempts de dihydrogénophosphates de calcium et de magnésium

Peser, à 1 mg près, 2,5 g environ de l'échantillon dans un creuset à incinération. Mélanger intimement la prise d'essai à 1 g de carbonate de calcium (point 3.1). Incinérer au four à 550 °C jusqu'à obtention de cendres blanches ou grises (une petite quantité de charbon ne gêne pas). Transvaser les cendres dans un bécher de 250 ml. Ajouter 20 ml d'eau et de l'acide chlorhydrique (point 3.2) jusqu'à cessation de l'effervescence. Ajouter encore 10 ml d'acide chlorhydrique (point 3.2). Porter le bécher sur un bain de sable et évaporer à sec pour insolubiliser la silice. Reprendre le résidu par 10 ml d'acide nitrique (point 3.3) et faire bouillir pendant 5 minutes sur le bain de sable ou la plaque chauffante, sans évaporer à sec. Transvaser le liquide dans une fiole jaugée de 500 ml en rinçant le bécher à plusieurs reprises à l'eau chaude. Laisser refroidir, ajuster au trait de jauge avec de l'eau, homogénéiser et filtrer.

▼ M9**5.2. Développement de la coloration et mesure de la densité optique**

Diluer une partie aliquote du filtrat obtenu conformément au point 5.1.1 ou 5.1.2 pour obtenir une concentration de phosphore atteignant au maximum 40 µg/ml. Introduire 10 ml de cette solution dans un tube à essai (point 4.6) et y ajouter 10 ml du réactif vanadomolybdique (point 3.6). Homogénéiser et laisser reposer 10 minutes au moins à la température de 20 °C. Mesurer la densité optique au spectrophotomètre à 430 nm par comparaison avec une solution obtenue par addition de 10 ml du réactif vanadomolybdique (point 3.6) à 10 ml d'eau.

5.3. Courbe d'étalonnage

Préparer à partir de la solution étalon (point 3.7) des solutions contenant respectivement 5, 10, 20, 30 et 40 µg de phosphore par ml. Prélever 10 ml de chacune de ces solutions et y ajouter 10 ml du réactif vanadomolybdique (point 3.6). Homogénéiser et laisser reposer 10 minutes au moins à la température de 20 °C. Mesurer la densité optique comme indiqué au point 5.2. Tracer la courbe d'étalonnage en portant en ordonnée les valeurs de la densité optique et en abscisse les quantités correspondantes de phosphore. La courbe est linéaire pour les concentrations comprises entre 0 et 40 µg/ml.

6. Calcul des résultats

Déterminer la quantité de phosphore de la prise d'essai en se référant à la courbe d'étalonnage.

Exprimer le résultat sous forme de pourcentage de l'échantillon.

Répétabilité

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

- 3 % par rapport au résultat le plus élevé, pour les teneurs en phosphore inférieures à 5 %,
- 0,15 % en valeur absolue pour les teneurs en phosphore égales ou supérieures à 5 %.

O. DOSAGE DU CHLORE DES CHLORURES**1. Objet et champ d'application**

La méthode permet de doser le chlore des chlorures solubles dans l'eau, conventionnellement exprimé en chlorure de sodium. Elle est applicable à tous les aliments pour animaux.

2. Principe

Les chlorures sont dissous dans l'eau. Si le produit contient des matières organiques, on procède à une défécation. La solution est légèrement acidifiée par l'acide nitrique et les chlorures sont précipités sous forme de chlorure d'argent à l'aide d'une solution de nitrate d'argent. L'excès de nitrate d'argent est titré par une solution de thiocyanate d'ammonium, selon la méthode de Volhard.

3. Réactifs

- 3.1. Solution de thiocyanate d'ammonium 0,1 mol/l.
- 3.2. Solution de nitrate d'argent 0,1 mol/l.
- 3.3. Solution saturée de sulfate d'ammonium ferrique (NH₄)Fe(SO₄)₂.
- 3.4. Acide nitrique, densité 1,38 g/ml.

▼ M9

- 3.5. Éther diéthylique.
- 3.6. Acétone.
- 3.7. Solution de Carrez I: dissoudre dans l'eau 21,9 g d'acétate de zinc $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 3 g d'acide acétique glacial. Ajuster à 100 ml avec de l'eau.
- 3.8. Solution de Carrez II: dissoudre dans l'eau 10,6 g de ferrocyanure de potassium $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Ajuster à 100 ml avec de l'eau.
- 3.9. Charbon actif exempt de chlorures et n'en adsorbant pas.

4. Appareillage

Mélangeur (culbuteur): environ 35 à 40 retournements par minute.

5. Mode opératoire**5.1. Préparation de la solution**

Selon la nature de l'échantillon, préparer une solution comme indiqué au point 5.1.1, 5.1.2 ou 5.1.3.

Effectuer, en parallèle, un *essai à blanc* exempt d'échantillon à analyser.

5.1.1. Échantillons exempts de matière organique

Peser, à 1 mg près, une prise d'essai de 10 g au maximum ne contenant pas plus de 3 g de chlore sous forme de chlorures et l'introduire dans un flacon jaugé de 500 ml avec 400 ml d'eau à 20 °C environ. Mélanger durant 30 minutes dans le culbuteur, compléter au volume, homogénéiser et filtrer.

5.1.2. Échantillons contenant des matières organiques, à l'exception des produits mentionnés au point 5.1.3

Peser, à 1 mg près, 5 g de l'échantillon et les introduire avec 1 g de charbon actif dans un flacon jaugé de 500 ml. Ajouter 400 ml d'eau à 20 °C environ et 5 ml de solution de Carrez I (point 3.7), agiter pendant 30 secondes et ajouter ensuite 5 ml de solution de Carrez II (point 3.8). Mélanger durant 30 minutes dans le culbuteur, compléter au volume, homogénéiser et filtrer.

5.1.3. Aliments cuits, tourteaux et farine de lin, produits riches en farine de lin et aux autres produits riches en mucilages ou en substances colloïdales (par exemple, amidon dextriné)

Préparer la solution comme indiqué au point 5.1.2 mais ne pas filtrer. Décantier (si nécessaire, centrifuger), prélever 100 ml du liquide surnageant et les introduire dans une fiole jaugée de 200 ml. Mélanger avec de l'acétone (point 3.6) et ajuster au trait de jauge avec ce solvant, homogénéiser et filtrer.

5.2. Titrage

Introduire à la pipette, dans un erlenmeyer, 25 à 100 ml du filtrat (selon la teneur présumée en chlore) obtenu conformément au point 5.1.1, 5.1.2 ou 5.1.3. La portion aliquote ne peut contenir plus de 150 mg de chlore (Cl). Diluer, si nécessaire, à 50 ml au moins avec de l'eau, ajouter 5 ml d'acide nitrique (point 3.4), 2 ml de solution saturée de sulfate d'ammonium ferrique (point 3.3) et 2 gouttes de solution de thiocyanate d'ammonium (point 3.1) débitées à l'aide d'une burette remplie jusqu'au trait de jauge zéro. Débiter ensuite à l'aide d'une burette la solution de nitrate d'argent (point 3.2) de façon à obtenir un excès de 5 ml. Ajouter 5 ml d'éther diéthylique (point 3.5) et agiter fortement pour rassembler le précipité. Titrer l'excès de nitrate d'argent par la solution de thiocyanate d'ammonium (point 3.1) jusqu'à ce que le virage au rouge-brun persiste pendant 1 minute.

▼ M9**6. Calcul des résultats**

La quantité de chlore (X), exprimée en chlorure de sodium sous forme de pourcentage, est donnée par la formule suivante:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

où:

V_1 = ml de solution de nitrate d'argent 0,1 mol/l ajoutés,

V_2 = ml de solution de thiocyanate d'ammonium 0,1 mol/l utilisés lors du titrage,

m = poids (en g) de l'échantillon dans la partie aliquote.

Si l'essai à blanc indique une consommation de solution de nitrate d'argent 0,1 mol/l, retrancher cette valeur du volume ($V_1 - V_2$).

7. Observations

- 7.1. Le titrage peut également être réalisé par potentiométrie ou ampérométrie.
- 7.2. Pour les produits très riches en matières grasses, procéder à un dégraissage préalable par l'éther diéthylique ou l'éther de pétrole.
- 7.3. Dans le cas des farines de poisson, le titrage peut être effectué selon la méthode de Mohr.

▼ **M9**

ANNEXE IV

MÉTHODES D'ANALYSE RELATIVES AU CONTRÔLE DES TENEURS EN ADDITIFS AUTORISÉS DES ALIMENTS POUR ANIMAUX**A. DOSAGE DE LA VITAMINE A**

La vitamine A doit être dosée:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17547 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination de la teneur en vitamines A, E et D ⁽¹⁾ — Méthode utilisant la purification par extraction en phase solide (SPE) et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP)» ou
- par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (CLHP-PI) à l'aide d'un détecteur UV ou fluorimétrique, conformément aux points 1 à 9.

1. Objet et champ d'application

La méthode permet de déterminer la teneur en vitamine A (rétinol) des aliments pour animaux. La vitamine A comprend le rétinol-all-*trans* et ses isomères-*cis*, qui sont déterminés par cette méthode. La teneur en vitamine A est exprimée en unités internationales (UI) par kg. Une UI correspond à l'activité de 0,300 µg de vitamine A alcool-all-*trans* ou à 0,344 µg de vitamine A acétate all-*trans* ou de 0,550 µg de vitamine A palmitate all-*trans*.

La limite de quantification est de 2 000 UI de vitamine A/kg.

2. Principe

L'échantillon est hydrolysé avec une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique, et la vitamine A est extraite dans de l'éther de pétrole. Le solvant est enlevé par évaporation; le résidu est dissous dans du méthanol et, si nécessaire, dilué à la concentration requise. La teneur en vitamine A est déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (CLHP-PI) à l'aide d'un détecteur UV ou fluorimétrique. Les paramètres de la chromatographie sont choisis de telle sorte qu'il n'y ait pas de séparation entre la vitamine A alcool-all-*trans* et ses isomères-*cis*.

3. Réactifs

- 3.1. Éthanol, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2. Éther de pétrole, intervalle d'ébullition 40 °C-60 °C.
- 3.3. Méthanol.
- 3.4. Solution d'hydroxyde de potassium, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 3.5. Solution d'ascorbate de sodium, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (voir l'observation figurant au point 7.7).
- 3.6. Sulfure de sodium, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$).
- 3.6.1. Solution de sulfure de sodium, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ dans du glycérol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (pour $x = 9$) (voir l'observation figurant au point 7.8).
- 3.7. Solution de phénolphtaléine, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ dans de l'éthanol (point 3.1).

⁽¹⁾ La méthode d'analyse établie par la norme EN 17547 est indiquée comme méthode à appliquer à des fins de contrôle officiel pour le dosage de la vitamine A et de la vitamine E en remplacement de la méthode décrite pour le dosage de la vitamine A dans la partie A de la présente annexe et de celle décrite pour le dosage de la vitamine E dans la partie B de la présente annexe.

▼ M9

- 3.8. Propanol-2.
- 3.9. Phase mobile pour CLHP: mélange de méthanol (point 3.3) et d'eau, par exemple 980 + 20 (v + v). Les proportions exactes sont déterminées par les caractéristiques de la colonne employée.
- 3.10. Azote, libre d'oxygène.
- 3.11. Vitamine A acétate all-*trans*, extra-pure, d'activité garantie, par exemple: $2,80 \times 10^6$ UI/g.
 - 3.11.1. Solution mère de vitamine A acétate all-*trans*: peser, à 0,1 mg près, 50 mg de vitamine A acétate (point 3.11) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans du propanol-2 (point 3.8) et ajuster au trait de jauge avec le même solvant. La concentration nominale de cette solution est de 1 400 UI de vitamine A par ml. La teneur exacte doit être déterminée selon le point 5.6.3.1.
- 3.12. Vitamine A palmitate all-*trans*, extra-pure, d'activité garantie, par exemple: $1,80 \times 10^6$ UI/g.
 - 3.12.1. Solution mère de vitamine A palmitate all-*trans*: peser, à 0,1 mg près, 80 mg de vitamine A palmitate (point 3.12) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans du propanol-2 (point 3.8) et ajuster au trait de jauge avec le même solvant. La concentration nominale de cette solution est de 1 400 UI de vitamine A par ml. La teneur exacte doit être déterminée selon le point 5.6.3.2.
- 3.13. BHT (di-*tert*-butyl-2,6-méthyl-4-phénol) (voir l'observation figurant au point 7.5).
4. **Appareillage**
 - 4.1. Évaporateur rotatif sous vide.
 - 4.2. Verrerie ambrée.
 - 4.2.1. Ballons à fond plat ou coniques, 500 ml, avec col en verre rodé.
 - 4.2.2. Fioles jaugées à bouchon en verre rodé, col étroit, de 10, 25, 100 et 500 ml.
 - 4.2.3. Ampoules à décanter coniques, 1 000 ml, à bouchon en verre rodé.
 - 4.2.4. Ballons piriformes, 250 ml, avec col en verre rodé.
 - 4.3. Réfrigérant d'Allihn, 300 mm de longueur utile, avec joint en verre rodé et adaptateur pour tuyau d'alimentation en gaz.
 - 4.4. Papier filtre plissé pour la séparation des phases, d'un diamètre de 185 mm (par exemple: Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
 - 4.5. Équipement CLHP avec système à injection.
 - 4.5.1. Colonne de chromatographie liquide de 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, particules de 5 ou 10 μ m, ou équivalent (critère de performance: un seul pic pour tous les isomères de rétinol dans les conditions CLHP).
 - 4.5.2. Détecteur UV ou fluorimétrique, de longueur d'onde variable.
 - 4.6. Spectrophotomètre avec cellules de quartz de 10 mm.
 - 4.7. Bain-marie avec agitateur magnétique.
 - 4.8. Appareil d'extraction (voir le graphique 1) se composant:

▼ **M9**

- 4.8.1. d'une éprouvette d'une capacité de 1 litre, à col et à bouchon en verre rodé;
- 4.8.2. d'une pièce à rodage mâle munie d'une tige latérale et d'un tube réglable passant en son centre. Ce tube doit avoir une partie inférieure en U et un bec gicleur à son extrémité opposée, de telle sorte que la couche liquide supérieure dans l'éprouvette puisse être transférée dans une ampoule à décanter.

5. **Mode opératoire**

NB: La vitamine A est sensible à la lumière (UV) et à l'oxydation. Toutes les opérations doivent être réalisées en l'absence de lumière (dans du verre ambré ou protégé d'une feuille d'aluminium) et en l'absence d'oxygène (éliminé avec de l'azote). Pendant l'extraction, l'air au-dessus du liquide doit être remplacé par de l'azote (éviter l'excès de pression en desserrant le bouchon de temps en temps).

5.1. *Préparation de l'échantillon*

Moudre l'échantillon pour qu'il passe par un tamis à mailles de 1 mm, en évitant la production de chaleur. Le broyage doit avoir lieu immédiatement avant la pesée et la saponification, sinon il peut y avoir des pertes en vitamine A. Ne pas broyer le ou les échantillons si la taille des particules est adéquate (par exemple, dans les prémélanges et les additifs pour l'alimentation animale).

5.2. *Saponification*

Selon la teneur en poids de la vitamine A, peser, à 1 mg près, de 2 à 25 g de l'échantillon dans un ballon à fond plat ou conique de 500 ml (point 4.2.1). Par faible concentration, le poids de l'échantillon peut être augmenté pour qu'il y ait assez de particules dans la prise d'essai. Ajouter successivement, tout en remuant, 130 ml d'éthanol (point 3.1), environ 100 mg de BHT (point 3.13), 2 ml de solution d'ascorbate de sodium (point 3.5) et 2 ml de solution de sulfure de sodium (point 3.6). Adapter un réfrigérant (point 4.3) au ballon et immerger celui-ci dans un bain-marie avec agitateur magnétique (point 4.7). Chauffer jusqu'à ébullition et laisser refluer pendant 5 minutes. Ajouter alors 25 ml de solution d'hydroxyde de potassium (point 3.4) par le réfrigérant (point 4.3) et laisser refluer de nouveau pendant 25 min, tout en agitant sous un faible courant d'azote. Rincer alors le réfrigérant avec environ 20 ml d'eau et laisser refroidir le contenu du ballon à la température ambiante.

5.3. *Extraction*

Transférer quantitativement par décantation la solution de saponification en rinçant avec un volume total de 250 ml d'eau dans une ampoule à décanter de 1 000 ml (point 4.2.3) ou dans l'appareil d'extraction (point 4.8). Rincer successivement le ballon de saponification avec 25 ml d'éthanol (point 3.1) et 100 ml d'éther de pétrole (point 3.2) et transférer le liquide de rinçage dans l'ampoule à décanter ou dans l'appareil d'extraction. La proportion d'eau et d'éthanol dans les solutions combinées doit être d'environ 2:1. Secouer énergiquement pendant 2 minutes et laisser reposer pendant 2 minutes.

5.3.1. *Extraction à l'aide d'une ampoule à décanter (point 4.2.3)*

Lorsque les couches sont séparées (voir l'observation figurant au point 7.3), transférer la couche d'éther de pétrole dans une autre ampoule à décanter (point 4.2.3). Répéter deux fois l'opération avec 100 ml d'éther de pétrole (point 3.2), puis deux fois avec 50 ml d'éther de pétrole (point 3.2).

Laver deux fois les extraits combinés dans l'ampoule à décanter en remuant doucement (afin d'éviter la formation d'émulsions) avec des portions de 100 ml d'eau et de nouveau en secouant avec d'autres portions de 100 ml d'eau jusqu'à ce que l'eau demeure incolore après addition de solution de phénolphthaléine (point 3.7) (quatre lavages sont généralement

▼ **M9**

suffisants). Filtrer l'extrait lavé sur un filtre plissé sec pour la séparation des phases (point 4.4) afin d'éliminer l'eau résiduelle et transférer dans une fiole jaugée de 500 ml (point 4.2.2). Rincer l'ampoule à décanter et le filtre avec 50 ml d'éther de pétrole (point 3.2), ajuster au trait de jauge avec de l'éther de pétrole (point 3.2) et bien mélanger.

5.3.2. Extraction à l'aide d'un appareil d'extraction (point 4.8)

Lorsque les couches sont séparées (voir l'observation figurant au point 7.3), remettre le bouchon de l'éprouvette (point 4.8.1) sur la pièce à rodage mâle (point 4.8.2) et placer l'extrémité inférieure en forme de U du tube réglable de telle sorte qu'elle se trouve juste au-dessus du niveau de l'interface. En exerçant une pression d'azote par la tige latérale, transférer la couche supérieure d'éther de pétrole dans une ampoule à décanter de 1 000 ml (point 4.2.3). Ajouter 100 ml d'éther de pétrole (point 3.2) dans le cylindre en verre, boucher et bien secouer. Laisser les couches se séparer et transférer la couche supérieure dans l'ampoule à décanter comme précédemment. Répéter la procédure d'extraction avec de nouveau 100 ml d'éther de pétrole (point 3.2), puis deux fois avec 50 ml d'éther de pétrole (point 3.2) et ajouter les couches d'éther de pétrole dans l'ampoule à décanter.

Laver les extraits combinés d'éther de pétrole selon la procédure décrite au point 5.3.1 et procéder selon ce point.

5.4. Préparation de la solution d'échantillon pour CLHP

Introduire à la pipette une portion aliquote de la solution d'éther de pétrole (issue du point 5.3.1 ou 5.3.2) dans un ballon piriforme de 250 ml (point 4.2.4). Laisser évaporer le solvant presque entièrement dans l'évaporateur rotatif (point 4.1) sous une pression réduite, à une température de bain ne dépassant pas 40 °C. Restaurer la pression atmosphérique en laissant entrer l'azote (point 3.10) et enlever le ballon de l'évaporateur rotatif. Supprimer le reste du solvant dans un courant d'azote (point 3.10) et dissoudre immédiatement le résidu dans un volume connu (10-100 ml) de méthanol (point 3.3) (la concentration de vitamine A doit être de l'ordre de 5 UI/ml à 30 UI/ml).

5.5. Dosage par CLHP

La vitamine A est séparée sur une colonne C_{18} à phase inverse (point 4.5.1), et la concentration est mesurée à l'aide d'un détecteur UV (325 nm) ou d'un détecteur fluorimétrique (excitation: 325 nm, émission: 475 nm) (point 4.5.2).

Injecter une portion aliquote (par exemple: 20 µl) de la solution méthanolique obtenue au point 5.4 et éluer avec la phase mobile (point 3.9). Calculer la hauteur (surface) moyenne du pic de plusieurs injections de la même solution d'échantillon et les hauteurs (surfaces) moyennes des pics de plusieurs injections des solutions d'étalonnage (point 5.6.2).

Conditions CLHP

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

Colonne de chromatographie liquide (point 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C_{18} , particules de 5 ou de 10 µm, ou équivalent
---	--

Phase mobile (point 3.9):	mélange de méthanol (point 3.3) et d'eau, par exemple 980 + 20 (v+v)
---------------------------	--

Débit:	1-2 ml/min
--------	------------

Détecteur (point 4.5.2):	détecteur UV (325 nm) ou détecteur fluorimétrique (excitation: 325 nm/émission: 475 nm)
--------------------------	---

▼ M9**5.6. Étalonnage****5.6.1. Préparation des solutions-étalons de travail**

Introduire à la pipette 20 ml de la solution mère de vitamine A acétate (point 3.11.1) ou 20 ml de la solution mère de vitamine A palmitate (point 3.12.1) dans un ballon à fond plat ou conique de 500 ml (point 4.2.1) et hydrolyser comme décrit au point 5.2, mais sans ajouter de BHT. Procéder ensuite à l'extraction avec de l'éther de pétrole (point 3.2) conformément au point 5.3 et ajuster à 500 ml avec de l'éther de pétrole (point 3.2). Laisser évaporer 100 ml de cet extrait presque entièrement sur l'évaporateur rotatif (voir le point 5.4), enlever le solvant résiduel dans un courant d'azote (point 3.10) et redissoudre le résidu dans 10,0 ml de méthanol (point 3.3). La concentration nominale de cette solution est de 560 UI de vitamine A par ml. La teneur exacte doit être déterminée conformément au point 5.6.3.3. La solution étalon de travail doit être préparée peu avant d'être utilisée.

Introduire à la pipette 2,0 ml de cette solution étalon de travail dans une fiole jaugée de 20 ml, ajuster au trait de jauge avec du méthanol (point 3.3) et mélanger. La concentration nominale de cette solution étalon de travail diluée est de 56 UI de vitamine A par ml.

5.6.2. Préparation des solutions d'étalonnage et de la courbe d'étalonnage

Transférer 1,0, 2,0, 5,0 et 10,0 ml de la solution étalon de travail diluée dans une série de fioles jaugées de 20 ml, ajuster au trait de jauge avec du méthanol (point 3.3) et mélanger. Les concentrations nominales de ces solutions sont de 2,8, 5,6, 14,0 et 28,0 UI de vitamine A par ml.

Injecter plusieurs fois 20 µl de chaque solution d'étalonnage et déterminer les hauteurs (surfaces) moyennes des pics. D'après les hauteurs (surfaces) moyennes des pics, tracer une courbe d'étalonnage tenant compte des résultats du contrôle UV (point 5.6.3.3).

5.6.3. Calibration par UV des solutions étalons**5.6.3.1. Solution mère de vitamine A acétate**

Introduire à la pipette 2,0 ml de la solution mère de vitamine A acétate (point 3.11.1) dans une fiole jaugée de 50 ml (point 4.2.2) et ajuster au trait de jauge avec du propanol-2 (point 3.8). La concentration nominale de cette solution est de 56 UI de vitamine A par ml. Introduire à la pipette 3,0 ml de cette solution de vitamine A acétate diluée dans une fiole jaugée de 25 ml et ajuster au trait de jauge avec du propanol-2 (point 3.8). La concentration nominale de cette solution est de 6,72 UI de vitamine A par ml. Mesurer le spectre UV de cette solution contre du propanol-2 (point 3.8) dans le spectrophotomètre (point 4.6) entre 300 nm et 400 nm. L'extinction maximale doit se situer entre 325 nm et 327 nm.

Calcul de la teneur en vitamine A:

$$\text{UI de vitamine A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ de la vitamine A acétate} = 1530 \text{ à } 326\text{nm dans du propanol} - 2)$$

5.6.3.2. Solution mère de vitamine A palmitate

Introduire à la pipette 2,0 ml de la solution mère de vitamine A palmitate (point 3.12.1) dans une fiole jaugée de 50 ml (point 4.2.2) et ajuster au trait de jauge avec du propanol-2 (point 3.8). La concentration nominale de cette solution est de 56 UI de vitamine A par ml. Introduire à la pipette 3,0 ml de cette solution de vitamine A de

▼ M9

palmitate diluée dans une fiole jaugée de 25 ml et ajuster au trait de jauge avec du propanol-2 (point 3.8). La concentration nominale de cette solution est de 6,72 UI de vitamine A par ml. Mesurer le spectre UV de cette solution contre du propanol-2 (point 3.8) dans le spectrophotomètre (point 4.6) entre 300 nm et 400 nm. L'extinction maximale doit se situer entre 325 nm et 327 nm.

Calcul de la teneur en vitamine A:

$$\text{UI de vitamine A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de la vitamine A palmitate = 957 à 326nm dans du propanol-2)

5.6.3.3. Solution étalon de travail de vitamine A

Introduire à la pipette 3,0 ml de la solution étalon de travail de vitamine A non diluée, préparée conformément au point 5.6.1, dans une fiole jaugée de 50 ml (point 4.2.2) et ajuster au trait de jauge avec du propanol-2 (point 3.8). Introduire à la pipette 5,0 ml de cette solution dans une fiole jaugée de 25 ml et ajuster au trait de jauge avec du propanol-2 (point 3.8). La concentration nominale de cette solution est de 6,72 UI de vitamine A par ml. Mesurer le spectre UV de cette solution contre du propanol-2 (point 3.8) dans le spectrophotomètre (point 4.6) entre 300 nm et 400 nm. L'extinction maximale doit se situer entre 325 nm et 327 nm.

Calcul de la teneur en vitamine A:

$$\text{UI de vitamine A/ml} = E_{325} \times 18,30$$

($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de la vitamine A alcool = 1821 à 325nm dans du propanol-2)

6. Calcul des résultats

À partir de la hauteur moyenne (surface) des pics de vitamine A de la solution d'échantillon, déterminer la concentration de vitamine A dans cette solution, en UI/ml, par référence à la courbe d'étalonnage (point 5.6.2).

La teneur w en vitamine A de l'échantillon, exprimée en UI/kg, est donnée par la formule suivante:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} [\text{UI/kg}]$$

où:

c = concentration de vitamine A dans la solution d'échantillon (point 5.4) en UI/ml,

V_1 = volume de la solution d'échantillon (point 5.4) en ml,

V_2 = volume de la portion aliquote prélevée au point 5.4 en ml,

m = poids de la prise d'essai, en grammes.

7. Observations

- 7.1. Pour les échantillons ayant une faible concentration de vitamine A, il peut être utile de rassembler les extraits dans l'éther de pétrole issus de deux saponifications (quantité pesée: 25 g) à une solution d'échantillon pour dosage par CLHP.

▼ **M9**

- 7.2. L'échantillon prélevé pour l'analyse ne doit pas contenir plus de 2 g de matières grasses.
- 7.3. S'il n'y a pas séparation des phases, ajouter environ 10 ml d'éthanol (point 3.1) pour briser l'émulsion.
- 7.4. Avec de l'huile de foie de morue et d'autres matières grasses pures, le temps de saponification doit être porté à 45-60 minutes.
- 7.5. Le BHT peut être remplacé par de l'hydroquinone.
- 7.6. En utilisant une colonne en phase directe, il est possible de séparer les isomères de rétinol. Dans ce cas, les hauteurs (surfaces) de tous les pics des isomères *cis* et *trans* doivent toutefois être additionnés en vue du calcul des résultats.
- 7.7. La solution d'ascorbate de sodium peut être remplacée par environ 150 mg d'acide ascorbique.
- 7.8. La solution de sulfure de sodium peut être remplacée par environ 50 mg d'EDTA.
- 7.9. En cas d'analyse de la vitamine A dans des aliments d'allaitement, une attention particulière doit être accordée:
- à la saponification (point 5.2): en raison de la quantité de graisse présente dans l'échantillon, il peut être nécessaire d'augmenter la quantité de solution d'hydroxyde de potassium (point 3.4),
 - à l'extraction (point 5.3): en raison de la présence d'émulsions, il peut être nécessaire d'adapter le ratio (2:1) eau/éthanol.

Il convient, pour vérifier si la méthode d'analyse appliquée donne des résultats fiables sur cette matrice spécifique (aliments d'allaitement), d'effectuer un test de récupération sur une prise d'essai supplémentaire. Si le taux de récupération est inférieur à 80 %, le résultat de l'analyse doit être corrigé au titre de la récupération.

8. **Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur le même échantillon ne peut dépasser 15 % par rapport au résultat le plus élevé.

9. **Résultats d'une étude collaborative ⁽¹⁾**

	Prémélange	Aliment prémélangé	Concentré minéral	Concentré protéique	Aliment pour porcelets
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
moyenne [UI/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
sr [UI/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [UI/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [UI/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614

⁽¹⁾ Étude menée par le groupe de travail sur les aliments pour animaux de la Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ **M9**

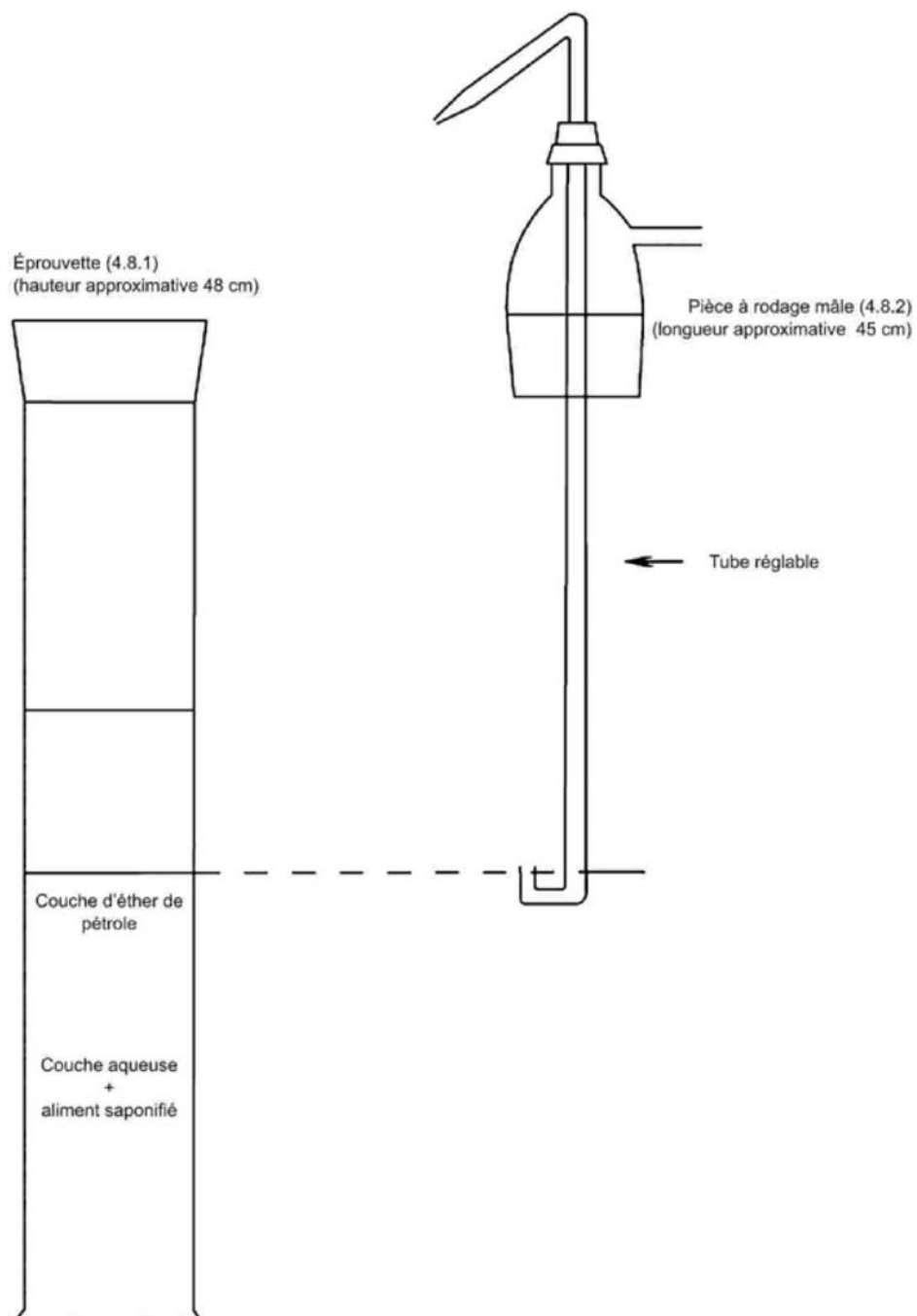
	Prémélange	Aliment prémé- langé	Concentré minéral	Concentré protéi- que	Aliment pour porcelets
R [UI/kg]	$3,81 \times 106$	$0,193 \times 106$	129 640	64 568	10 119
CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: nombre de laboratoires
n: nombre de valeurs individuelles
sr: écart type de répétabilité
sR: écart type de reproductibilité
r: répétabilité
R: reproductibilité
CVr: coefficient de variation de la répétabilité
CVR: coefficient de variation de la reproductibilité

▼ M9

Graphique 1

Appareil d'extraction (point 4.8)



▼ **M9****B. DOSAGE DE LA VITAMINE E**

La vitamine E doit être dosée:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17547 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination de la teneur en vitamines A, E et D ⁽¹⁾ — Méthode utilisant la purification par extraction en phase solide (SPE) et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP)» ou
- par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (CLHP-PI) à l'aide d'un détecteur UV ou fluorimétrique, conformément aux points 1 à 9.

1. Objet et champ d'application

La méthode permet de déterminer la teneur en vitamine E des aliments pour animaux. La teneur en vitamine E est exprimée en mg d'acétate de DL- α -tocophérol par kg. 1 mg d'acétate de DL- α -tocophérol correspond à 0,91 mg de DL- α -tocophérol (vitamine E).

La limite de quantification est de 2 mg de vitamine E/kg. Cette limite de quantification ne peut être atteinte qu'avec un détecteur fluorimétrique. La limite de quantification est fixée à 10 mg/kg en cas d'utilisation d'un détecteur UV.

2. Principe

L'échantillon est hydrolysé avec une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique et la vitamine E est extraite dans de l'éther de pétrole. Le solvant est enlevé par évaporation; le résidu est dissous dans du méthanol et, si nécessaire, dilué à la concentration requise. La teneur en vitamine E est déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (CLHP-PI) à l'aide d'un détecteur UV ou fluorimétrique.

3. Réactifs

- 3.1. Éthanol, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2. Éther de pétrole, intervalle d'ébullition 40 °C-60 °C.
- 3.3. Méthanol.
- 3.4. Solution d'hydroxyde de potassium, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 3.5. Solution d'ascorbate de sodium, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (voir l'observation figurant au point 7.7).
- 3.6. Sulfure de sodium, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$).
- 3.6.1. Solution de sulfure de sodium, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ dans du glycérol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (pour $x = 9$) (voir l'observation figurant au point 7.8).
- 3.7. Solution de phénolphthaléine, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ dans de l'éthanol (point 3.1).
- 3.8. Phase mobile pour CLHP: mélange de méthanol (point 3.3) et d'eau, par exemple 980 + 20 ($v + v$). Les proportions exactes sont déterminées par les caractéristiques de la colonne employée.
- 3.9. Azote, libre d'oxygène.
- 3.10. Acétate de DL- α -tocophérol, extra-pur, d'activité garantie

⁽¹⁾ La méthode d'analyse établie par la norme EN 17547 est indiquée comme méthode à appliquer à des fins de contrôle officiel pour le dosage de la vitamine A et de la vitamine E en remplacement de la méthode décrite pour le dosage de la vitamine A dans la partie A de la présente annexe et de celle décrite pour le dosage de la vitamine E dans la partie B de la présente annexe.

▼ M9

3.10.1. Solution mère d'acétate de DL- α -tocophérol: peser, à 0,1 mg près, 100 mg d'acétate de DL- α -tocophérol (point 3.10) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans de l'éthanol (point 3.1) et ajuster au trait de jauge avec le même solvant. 1 ml de cette solution contient 1 mg d'acétate de DL- α -tocophérol (pour le contrôle UV: voir le point 5.6.1.3, pour la stabilisation: voir l'observation figurant au point 7.4).

3.11. DL- α -tocophérol, extra-pur, d'activité garantie.

3.11.1. Solution mère de DL- α -tocophérol: peser, à 0,1 mg près, 100 mg de DL- α -tocophérol (point 3.11) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans de l'éthanol (point 3.1) et ajuster au trait de jauge avec le même solvant. 1 ml de cette solution contient 1 mg de DL- α -tocophérol (pour le contrôle UV: voir le point 5.6.2.3, pour la stabilisation: voir l'observation figurant au point 7.4).

3.12. BHT (di-*tert*-butyl-2,6-méthyl-4-phénol) (voir l'observation figurant au point 7.5).

4. Appareillage

4.1. Évaporateur rotatif.

4.2. Verrerie ambrée.

4.2.1. Ballons à fond plat ou coniques, 500 ml, avec col en verre rodé.

4.2.2. Fioles jaugées à bouchon en verre rodé, col étroit, de 10, 25, 100 et 500 ml.

4.2.3. Ampoules à décanter coniques, 1 000 ml, à bouchon en verre rodé.

4.2.4. Ballons piriformes, 250 ml, avec col en verre rodé.

4.3. Réfrigérant d'Allihn, 300 mm de longueur utile, avec joint en verre rodé et adaptateur pour tuyau d'alimentation en gaz.

4.4. Papier filtre plissé pour la séparation des phases, d'un diamètre de 185 mm (par exemple: Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5. Équipement CLHP avec système à injection.

4.5.1. Colonne de chromatographie liquide de 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, particules de 5 ou 10 μ m, ou équivalent.

4.5.2. Détecteur UV ou fluorimétrique, de longueur d'onde variable.

4.6. Spectrophotomètre avec cellules de quartz de 10 mm.

4.7. Bain-marie avec agitateur magnétique.

4.8. Appareil d'extraction (voir le graphique 2) se composant:

4.8.1. d'une éprouvette d'une capacité de 1 litre, à col et à bouchon en verre rodé;

4.8.2. d'une pièce à rodage mâle munie d'une tige latérale et d'un tube réglable passant en son centre. Ce tube doit avoir une partie inférieure en U et un bec gicleur à son extrémité opposée, de telle sorte que la couche liquide supérieure dans l'éprouvette puisse être transférée dans une ampoule à décanter.

▼ **M9****5. Mode opératoire**

NB: La vitamine E est sensible à la lumière (UV) et à l'oxydation. Toutes les opérations doivent être réalisées en l'absence de lumière (dans du verre ambré ou protégé d'une feuille d'aluminium) et en l'absence d'oxygène (éliminé avec de l'azote). Pendant l'extraction, l'air au-dessus du liquide doit être remplacé par de l'azote (éviter l'excès de pression en desserrant le bouchon de temps en temps).

5.1. Préparation de l'échantillon

Moudre l'échantillon pour qu'il passe par un tamis à mailles de 1 mm, en évitant la production de chaleur. Le broyage doit avoir lieu immédiatement avant la pesée et la saponification, sinon il peut y avoir des pertes en vitamine E.

5.2. Saponification

Selon la teneur en poids de la vitamine E, peser, à 0,01 g près, de 2 à 25 g de l'échantillon dans un ballon à fond plat ou conique de 500 ml (point 4.2.1). Ajouter successivement, tout en remuant, 130 ml d'éthanol (point 3.1), environ 100 mg de BHT (point 3.12), 2 ml de solution d'ascorbate de sodium (point 3.5) et 2 ml de solution de sulfure de sodium (point 3.6). Adapter le réfrigérant (point 4.3) au ballon et immerger celui-ci dans un bain-marie avec agitateur magnétique (point 4.7). Chauffer jusqu'à ébullition et laisser refluer pendant 5 minutes. Ajouter alors 25 ml de solution d'hydroxyde de potassium (point 3.4) par le réfrigérant (point 4.3) et laisser refluer de nouveau pendant 25 min, tout en agitant sous un faible courant d'azote. Rincer alors le réfrigérant avec environ 20 ml d'eau et laisser refroidir le contenu du ballon à la température ambiante.

5.3. Extraction

Transférer quantitativement par décantation la solution de saponification en rinçant avec un volume total de 250 ml d'eau dans une ampoule à décanter de 1 000 ml (point 4.2.3) ou dans l'appareil d'extraction (point 4.8). Rincer successivement le ballon de saponification avec 25 ml d'éthanol (point 3.1) et 100 ml d'éther de pétrole (point 3.2) et transférer le liquide de rinçage dans l'ampoule à décanter ou dans l'appareil d'extraction. La proportion d'eau et d'éthanol dans les solutions combinées doit être d'environ 2:1. Secouer énergiquement pendant 2 minutes et laisser reposer pendant 2 minutes.

5.3.1. Extraction à l'aide d'une ampoule à décanter (point 4.2.3)

Lorsque les couches sont séparées (voir l'observation figurant au point 7.3), transférer la couche d'éther de pétrole dans une autre ampoule à décanter (point 4.2.3). Répéter deux fois l'opération avec 100 ml d'éther de pétrole (point 3.2), puis deux fois avec 50 ml d'éther de pétrole (point 3.2).

Laver deux fois les extraits combinés dans l'ampoule à décanter en remuant doucement (afin d'éviter la formation d'émulsions) avec des portions de 100 ml d'eau et de nouveau en secouant avec d'autres portions de 100 ml d'eau jusqu'à ce que l'eau demeure incolore après addition de solution de phénolphthaléine (point 3.7) (quatre lavages sont généralement suffisants). Filtrer l'extrait lavé sur un filtre plissé sec pour la séparation des phases (point 4.4) afin d'éliminer l'eau résiduelle et transférer dans une fiole jaugée de 500 ml (point 4.2.2). Rincer l'ampoule à décanter et le filtre avec 50 ml d'éther de pétrole (point 3.2), ajuster au trait de jauge avec de l'éther de pétrole (point 3.2) et bien mélanger.

5.3.2. Extraction à l'aide d'un appareil d'extraction (point 4.8)

Lorsque les couches sont séparées (voir l'observation figurant au point 7.3), remettre le bouchon de l'éprouvette (point 4.8.1) sur la pièce à rodage mâle (point 4.8.2) et placer l'extrémité inférieure en forme de U du tube réglable de telle sorte qu'elle se trouve juste au-dessus du niveau de l'interface. En exerçant une pression d'azote par la tige latérale, transférer la couche supérieure d'éther de pétrole dans une ampoule à décanter de 1 000 ml (point 4.2.3). Ajouter 100 ml d'éther de pétrole (point 3.2) dans le cylindre en verre, boucher et bien

▼M9

secouer. Laisser les couches se séparer et transférer la couche supérieure dans l'ampoule à décanner comme précédemment. Répéter la procédure d'extraction avec de nouveau 100 ml d'éther de pétrole (point 3.2), puis deux fois avec 50 ml d'éther de pétrole (point 3.2) et ajouter les couches d'éther de pétrole dans l'ampoule à décanner.

Laver les extraits combinés d'éther de pétrole selon la procédure décrite au point 5.3.1 et procéder selon ce point.

5.4. *Préparation de la solution d'échantillon pour CLHP*

Introduire à la pipette une portion aliquote de la solution d'éther de pétrole (issue du point 5.3.1 ou de 5.3.2) dans un ballon piriforme de 250 ml (point 4.2.4). Laisser évaporer le solvant presque entièrement dans l'évaporateur rotatif (point 4.1) sous une pression réduite, à une température de bain ne dépassant pas 40 °C. Restaurer la pression atmosphérique en laissant entrer l'azote (point 3.9) et enlever le ballon de l'évaporateur rotatif. Supprimer le reste du solvant dans un courant d'azote (point 3.9) et dissoudre immédiatement le résidu dans un volume connu (10-100 ml) de méthanol (point 3.3) (la concentration de DL- α -tocophérol doit être de l'ordre de 5 µg/ml à 30 µg/ml).

5.5. *Dosage par CLHP*

La vitamine E est séparée sur une colonne C₁₈ à phase inverse (point 4.5.1) et la concentration est mesurée à l'aide d'un détecteur fluorimétrique (excitation: 295 nm, émission: 330 nm) ou d'un détecteur UV (292 nm) (point 4.5.2).

Injecter une portion aliquote (par exemple: 20 µl) de la solution méthanolique obtenue au point 5.4 et élué avec la phase mobile (point 3.8). Calculer les hauteurs (surfaces) moyennes des pics de plusieurs injections de la même solution d'échantillon et les hauteurs (surfaces) moyennes des pics de plusieurs injections des solutions d'étalonnage (point 5.6.2).

Conditions CLHP

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

Colonne de chromatographie liquide (point 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , particules de 5 ou de 10 µm, ou équivalent
Phase mobile (point 3.8):	mélange de méthanol (point 3.3) et d'eau, par exemple 980 + 20 (v + v).
Débit:	1-2 ml/min
Détecteur (point 4.5.2):	détecteur fluorimétrique (excitation: 295 nm/ émission: 330 nm) ou détecteur UV (292 nm)

5.6. *Étalonnage (acétate de DL- α -tocophérol ou DL- α -tocophérol)*

5.6.1. *Solution étalon d'acétate de DL- α -tocophérol*

5.6.1.1. *Préparation de la solution étalon de travail*

Introduire à la pipette 25 ml de la solution mère d'acétate de DL- α -tocophérol (point 3.10.1) dans un ballon à fond plat ou conique de 500 ml (point 4.2.1) et hydrolyser comme décrit au point 5.2. Procéder ensuite à l'extraction avec de l'éther de pétrole (point 3.2) conformément au point 5.3 et ajuster à 500 ml avec de l'éther de pétrole. Laisser évaporer 25 ml de cet extrait presque entièrement sur l'évaporateur

▼ **M9**

rotatif (voir le point 5.4), enlever le solvant résiduel dans un courant d'azote (point 3.9) et redissoudre le résidu dans 25,0 ml de méthanol (point 3.3). La concentration nominale de cette solution est de 45,5 µg de DL-α-tocophérol par ml, équivalent à 50 µg d'acétate de DL-α-tocophérol par ml. La solution étalon de travail doit être préparée peu avant d'être utilisée.

5.6.1.2. Préparation des solutions d'étalonnage et de la courbe d'étalonnage

Transférer 1,0, 2,0, 4,0 et 10,0 ml de la solution étalon de travail dans une série de fioles jaugées de 20 ml, ajuster au trait de jauge avec du méthanol (point 3.3) et mélanger. Les concentrations nominales de ces solutions sont de 2,5, 5,0, 10,0 et 25,0 µg/ml d'acétate de DL-α-tocophérol, soit 2,28, 4,55, 9,10 et 22,8 µg/ml de DL-α-tocophérol.

Injecter plusieurs fois 20 µl de chaque solution d'étalonnage et déterminer les hauteurs (surfaces) moyennes des pics. D'après les hauteurs (surfaces) moyennes des pics, tracer une courbe d'étalonnage.

5.6.1.3. Calibration par UV de la solution mère d'acétate de DL-α-tocophérol (point 3.10.1)

Diluer 5,0 ml de la solution mère d'acétate de DL-α-tocophérol (point 3.10.1), ajuster à 25,0 ml dans de l'éthanol et mesurer le spectre UV de cette solution contre de l'éthanol (point 3.1) dans le spectrophotomètre (point 4.6) entre 250 nm et 320 nm.

L'absorption maximale doit être de 284 nm:

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ à } 284 \text{ nm dans de l'éthanol.}$$

À cette dilution, une valeur d'extinction de 0,84 à 0,88 doit être obtenue.

5.6.2. Solution étalon de DL-α-tocophérol

5.6.2.1. Préparation de la solution étalon de travail

Introduire à la pipette 2 ml de la solution étalon de DL-α-tocophérol (point 3.11.1) dans une fiole jaugée de 50 ml, dissoudre dans du méthanol (point 3.3) et ajuster au trait de jauge avec du méthanol. La concentration nominale de cette solution est de 40 µg de DL-α-tocophérol par ml, équivalent à 44,0 µg d'acétate de DL-α-tocophérol par ml. La solution étalon de travail doit être préparée peu avant d'être utilisée.

5.6.2.2. Préparation des solutions d'étalonnage et de la courbe d'étalonnage

Transférer 1,0, 2,0, 4,0 et 10,0 ml de la solution étalon de travail dans une série de fioles jaugées de 20 ml, ajuster au trait de jauge avec du méthanol (point 3.3) et mélanger. Les concentrations nominales de ces solutions sont de 2,0, 4,0, 8,0 et 20,0 µg/ml de DL-α-tocophérol, soit 2,20, 4,40, 8,79 et 22,0 µg/ml d'acétate de DL-α-tocophérol.

Injecter plusieurs fois 20 µl de chaque solution d'étalonnage et déterminer les hauteurs (surfaces) moyennes des pics. D'après les hauteurs (surfaces) moyennes des pics, tracer une courbe d'étalonnage.

5.6.2.3. Calibration par UV de la solution mère de DL-α-tocophérol (point 3.11.1)

Diluer 2,0 ml de la solution mère de DL-α-tocophérol (point 3.11.1), ajuster à 25,0 ml dans de l'éthanol et mesurer le spectre UV de cette solution contre de l'éthanol (point 3.1) dans le spectrophotomètre (point 4.6) entre 250 nm et 320 nm. L'absorption maximale doit être de 292 nm:

▼ M9

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ à } 292\text{nm dans de l'éthanol.}$$

À cette dilution, une valeur d'extinction de 0,6 doit être obtenue.

6. Calcul des résultats

À partir de la hauteur moyenne (surface) des pics de vitamine E de la solution d'échantillon, déterminer la concentration de vitamine E dans cette solution, en µg/ml, (exprimée en acétate de DL-α-tocophérol) par référence à la courbe d'étalonnage (point 5.6.1.2 ou 5.6.2.2).

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

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} [\text{mg/kg}]$$

où:

c = concentration de vitamine E (calculée en acétate de DL-α-tocophérol) dans la solution d'échantillon (point 5.4) en µg/ml,

V₁ = volume de la solution d'échantillon (point 5.4) en ml,

V₂ = volume de la portion aliquote prélevée au point 5.4 en ml,

m = poids de la prise d'essai, en grammes.

7. Observations

- 7.1. Pour les échantillons ayant une faible concentration de vitamine E, il peut être utile de rassembler les extraits dans l'éther de pétrole issus de deux saponifications (quantité pesée: 25 g) à une solution d'échantillon pour dosage par CLHP.
- 7.2. L'échantillon prélevé pour l'analyse ne doit pas contenir plus de 2 g de matières grasses.
- 7.3. S'il n'y a pas séparation des phases, ajouter environ 10 ml d'éthanol (point 3.1) pour briser l'émulsion.
- 7.4. Une fois la mesure spectrophotométrique de la solution d'acétate de DL-α-tocophérol ou de DL-α-tocophérol effectuée, respectivement selon le point 5.6.1.3 ou 5.6.2.3, ajouter environ 10 mg de BHT (point 3.12) à la solution (point 3.10.1 ou 3.10.2) et conserver cette solution au réfrigérateur (durée maximale de conservation: quatre semaines).
- 7.5. Le BHT peut être remplacé par de l'hydroquinone.
- 7.6. Il est possible d'utiliser une colonne en phase directe pour séparer les tocophérols α, β, γ et δ.
- 7.7. La solution d'ascorbate de sodium peut être remplacée par environ 150 mg d'acide ascorbique.
- 7.8. La solution de sulfure de sodium peut être remplacée par environ 50 mg d'EDTA.
- 7.9. La vitamine E acétate s'hydrolyse très rapidement en milieu alcalin et est dès lors très sensible à l'oxydation, particulièrement en présence d'oligoéléments tels que le fer et le cuivre. Le dosage de la vitamine E dans des prémélanges présentant des teneurs supérieures à 5 000 mg/kg pourrait entraîner une dégradation de la vitamine E. C'est pourquoi il est recommandé d'utiliser, aux fins de la confirmation, une méthode de dosage CLHP comprenant une digestion enzymatique de la vitamine E sans saponification alcaline.

▼ M9**8. Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur le même échantillon ne peut dépasser 15 % par rapport au résultat le plus élevé.

9. Résultats d'une étude collaborative ⁽¹⁾

	Prémélange	Aliment prémé- langé	Concentré minéral	Concentré protéique	Aliment pour porcelets
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Moyenne [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
sr [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
sR [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: nombre de laboratoires

n: nombre de valeurs individuelles

s_r: écart type de répétabilité

s_R: écart type de reproductibilité

r: répétabilité

R: reproductibilité

CV_r: coefficient de variation de la répétabilité

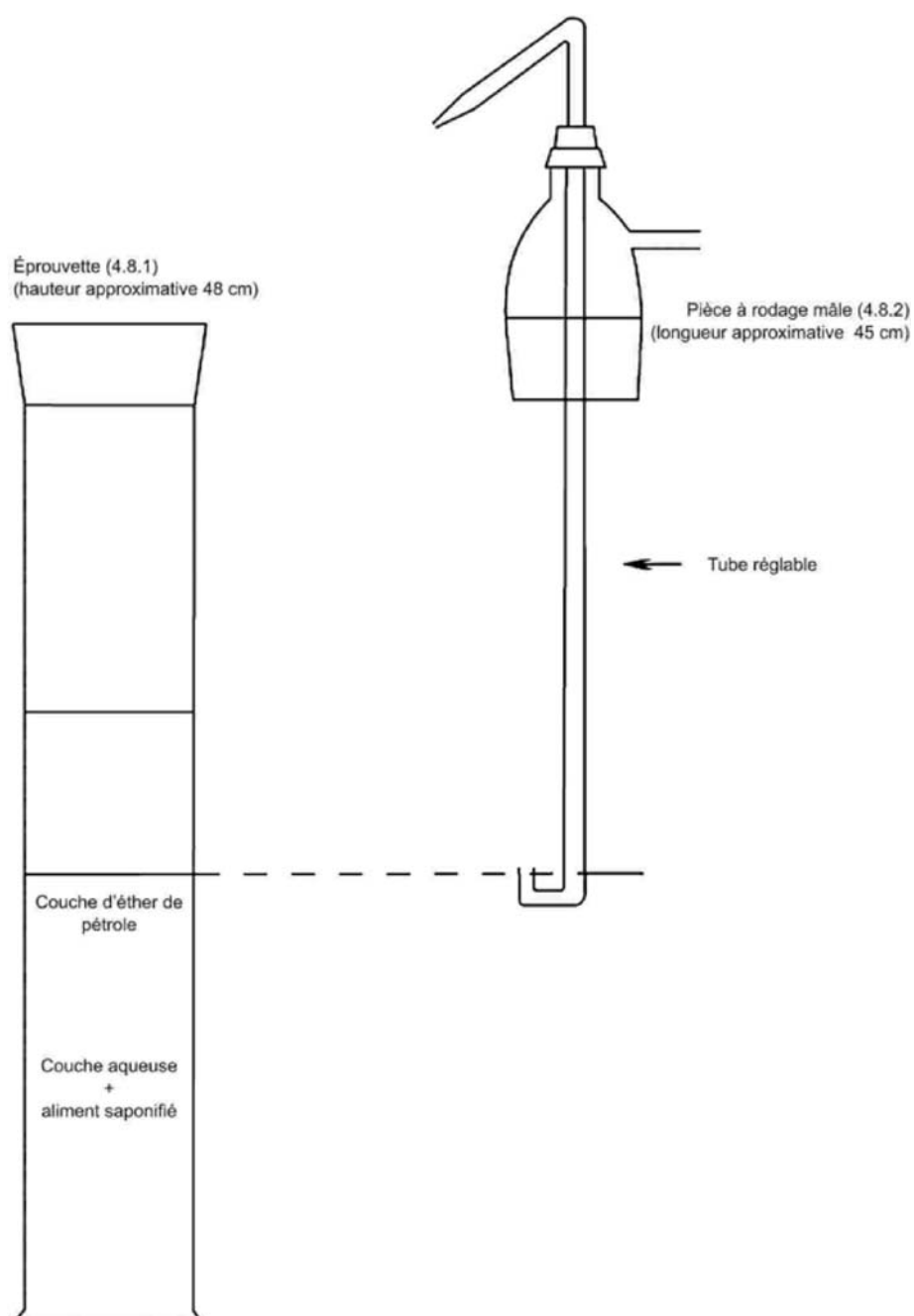
CV_R: coefficient de variation de la reproductibilité

⁽¹⁾ Étude menée par le groupe de travail sur les aliments pour animaux de la Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ M9

Graphique 2

Appareil d'extraction (point 4.8)



▼ M9**C. DOSAGE DES OLIGOÉLÉMENTS FER, CUIVRE, MANGANÈSE ET ZINC**

La teneur en fer, cuivre, manganèse et zinc doit être déterminée:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 15510 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination des teneurs en calcium, sodium, phosphore, magnésium, potassium, fer, zinc, cuivre, manganèse, cobalt, molybdène et plomb par ICP-AES» ou
- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 15621 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage du calcium, du sodium, du phosphore, du magnésium, du potassium, du soufre, du fer, du zinc, du cuivre, du manganèse et du cobalt après digestion sous pression par ICP-AES» ou
- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17053 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage par ICP-MS (multiméthode) des éléments traces, métaux lourds et autres éléments inorganiques présents dans les aliments» ou
- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN ISO 6869 «Aliments des animaux — Détermination des teneurs en calcium, cuivre, fer, magnésium, manganèse, potassium, sodium et zinc — Méthode par spectrométrie d'absorption atomique» ou
- selon la méthode par spectrométrie d'absorption atomique de flamme décrite aux points 1 à 8.

1. Objet et champ d'application

La méthode permet de doser les oligoéléments fer, cuivre, manganèse et zinc dans les aliments pour animaux ⁽¹⁾. Les limites de quantification sont les suivantes:

- fer (Fe): 20 mg/kg
- cuivre (Cu): 10 mg/kg
- manganèse (Mn): 20 mg/kg
- zinc (Zn): 20 mg/kg

2. Principe

L'échantillon est mis en solution dans l'acide chlorhydrique après destruction éventuelle des matières organiques. Les éléments fer, cuivre, manganèse et zinc sont dosés, après dilution appropriée, par spectrométrie d'absorption atomique.

3. Réactifs*Remarques préliminaires*

L'eau utilisée pour la préparation des réactifs et des solutions requises au cours de l'analyse doit être exempte des cations à déterminer. Elle est obtenue soit par double distillation de l'eau dans un appareil en borosilicate ou en quartz, soit par double permutaion sur résine échangeuse d'ions.

Les réactifs doivent être au moins de qualité «pour analyse». L'absence de l'élément à déterminer doit être contrôlée par un essai à blanc. Si nécessaire, les réactifs doivent être soumis à une purification plus poussée.

⁽¹⁾ La méthode a été validée dans le cadre d'une étude collaborative pour plusieurs matrices d'aliments pour animaux. Pour obtenir des informations complémentaires, consulter: https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation_en?prefLang=fr

▼ M9

Les solutions étalons décrites ci-après peuvent être remplacées par des solutions étalons commerciales, à condition que celles-ci soient garanties et contrôlées avant l'emploi.

- 3.1. Acide chlorhydrique (d: 1,19 g/ml).
- 3.2. Acide chlorhydrique (6 mol/l).
- 3.3. Acide chlorhydrique (0,5 mol/l).
- 3.4. Acide fluorhydrique à 38-40 % (v/v), ayant une teneur en fer (Fe) inférieure à 1 mg/l et dont le résidu d'évaporation est inférieur à 10 mg (exprimés en sulfates)/l.
- 3.5. Acide sulfurique (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Peroxyde d'hydrogène Peroxyde d'hydrogène [à environ 100 volumes d'oxygène (30 % en poids)].
- 3.7. Solution étalon de fer (1 000 µg Fe/ml) préparée comme suit, ou solution commerciale équivalente: dissoudre 1 g de fer en fil dans 200 ml d'acide chlorhydrique 6 mol/litre (point 3.2), ajouter 16 ml de peroxyde d'hydrogène (point 3.6.) et ajuster à 1 litre avec de l'eau.
- 3.7.1. Solution étalon de travail de fer (100 µg Fe/ml): diluer une part de la solution étalon (point 3.7) dans neuf parts d'eau.
- 3.8. Solution étalon de cuivre (1 000 µg Cu/ml) préparée comme suit, ou solution commerciale équivalente:
 - dissoudre 1 g de cuivre en poudre dans 25 ml d'acide chlorhydrique 6 mol/l (point 3.2), ajouter 5 ml de peroxyde d'hydrogène (point 3.6) et ajuster à 1 litre avec de l'eau.
- 3.8.1. Solution étalon de travail de cuivre (10 µg Cu/ml): diluer une part de la solution étalon (point 3.8) dans neuf parts d'eau; diluer ensuite une part de la solution obtenue dans neuf parts d'eau.
- 3.9. Solution étalon de manganèse (1 000 µg Mn/ml) préparée comme suit, ou solution commerciale équivalente:
 - dissoudre 1 g de manganèse en poudre dans 25 ml d'acide chlorhydrique 6 mol/l (point 3.2) et ajuster à 1 litre avec de l'eau.
- 3.9.1. Solution étalon de travail de manganèse (10 µg Mn/ml): diluer une part de la solution étalon (point 3.9) dans neuf parts d'eau; diluer ensuite une part de la solution obtenue dans neuf parts d'eau.
- 3.10. Solution étalon de zinc (1 000 µg Zn/ml) préparée comme suit, ou solution commerciale équivalente:
 - dissoudre 1 g de zinc en ruban ou en plaque dans 25 ml d'acide chlorhydrique 6 mol/l (point 3.2) et ajuster à 1 litre avec de l'eau.
- 3.10.1. Solution étalon de travail de zinc (10 µg Zn/ml): diluer une part de la solution étalon (point 3.10) dans neuf parts d'eau; diluer ensuite une part de la solution obtenue dans neuf parts d'eau.
- 3.11. Solution de chlorure de lanthane: dissoudre 12 g d'oxyde de lanthane dans 150 ml d'eau, ajouter 100 ml d'acide chlorhydrique 6 mol/l (point 3.2) et ajuster à 1 litre avec de l'eau.

▼ **M9****4. Appareillage**

- 4.1. Four à moufle, à température réglable et, de préférence, contrôlée.
- 4.2. Verrerie en borosilicate, résistante. Il est recommandé d'utiliser un matériel servant exclusivement aux dosages des oligoéléments.
- 4.3. Spectrophotomètre d'absorption atomique, répondant aux exigences de la méthode en ce qui concerne la sensibilité et la précision dans la gamme des mesures utiles.

5. Mode opératoire ⁽¹⁾**5.1. Échantillons contenant des composés organiques****5.1.1. Incinération et préparation de la solution à analyser ⁽²⁾**

- 5.1.1.1. Placer 5 à 10 g de l'échantillon, pesés à 0,2 mg près, dans un creuset en quartz ou en platine [voir note b)], sécher à l'étuve à 105 °C et introduire le creuset dans le four à moufle (point 4.1) froid. Fermer le four [voir note c)] et élever progressivement sa température pour atteindre 450 à 475 °C en 90 minutes environ. Maintenir cette température durant 4 à 16 h (par exemple, toute une nuit) de façon à éliminer la matière carbonneuse, ouvrir ensuite le four et laisser refroidir [voir note d)].

Humidifier les cendres avec de l'eau et les transférer dans un bécher de 250 ml. Rincer le creuset à l'aide de 5 ml d'acide chlorhydrique (point 3.1) et transvaser lentement et avec précaution la solution de rinçage dans le bécher (une réaction violente peut se produire par formation de CO₂). Ajouter ensuite goutte à goutte de l'acide chlorhydrique (point 3.1), tout en remuant le contenu du bécher, jusqu'à cessation de l'effervescence. Évaporer à sec en remuant périodiquement à l'aide d'une tige de verre.

Ajouter au résidu 15 ml d'acide chlorhydrique 6 mol/l (point 3.2) et ensuite environ 120 ml d'eau. Agiter avec la tige de verre, qu'il importe de laisser dans le bécher, et couvrir ce dernier avec un verre de montre. Porter le liquide à ébullition douce et maintenir l'ébullition jusqu'à ce que les cendres ne se dissolvent apparemment plus. Filtrer sur un papier filtre sans cendres et recueillir le filtrat dans une fiole jaugée de 250 ml. Laver le bécher et le filtre avec 5 ml d'acide chlorhydrique 6 mol/l (point 3.2) chaud et à deux reprises avec de l'eau bouillante. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau (la concentration de HCl est d'environ 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2. Si le résidu se trouvant dans le filtre apparaît noir (charbonneux), le replacer dans le four et incinérer de nouveau à 450-475 °C. Cette incinération, qui requiert seulement quelques heures (3 à 5 heures environ), est complétée lorsque les cendres apparaissent blanches ou

⁽¹⁾ D'autres méthodes de minéralisation peuvent être utilisées, à condition qu'il ait été démontré qu'elles donnaient des résultats similaires (telle la minéralisation sous pression par micro-ondes).

⁽²⁾ Les fourrages verts (frais ou déshydratés) sont susceptibles de contenir de grandes quantités de silice végétale pouvant retenir des oligoéléments et qui doivent être éliminés. Les échantillons de ces aliments pour animaux doivent par conséquent être soumis au traitement suivant. Effectuer l'opération 5.1.1.1. jusqu'au stade de la filtration. Laver le papier filtre contenant le résidu insoluble à deux reprises avec de l'eau bouillante et le placer dans un creuset en quartz ou en platine. Incinérer dans le four à moufle (point 4.1) à une température inférieure à 550 °C jusqu'à ce que toute la matière carbonneuse ait complètement disparu. Laisser refroidir, ajouter quelques gouttes d'eau puis 10 à 15 ml d'acide fluorhydrique (point 3.4) et évaporer à sec à 150 °C environ. Si le résidu contient encore de la silice, dissoudre celle-ci dans quelques ml d'acide fluorhydrique (point 3.4) et évaporer à sec. Ajouter 5 gouttes d'acide sulfurique (point 3.5) et chauffer jusqu'à disparition des fumées blanches. Ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique 6 mol/l (point 3.2) et environ 30 ml d'eau, chauffer, filtrer la solution dans une fiole jaugée de 250 ml et ajuster au trait de jauge avec de l'eau (la concentration en HCl est de 0,5 mol/l environ). Poursuivre le procédé à partir du point 5.1.2.

▼ M9

presque blanches. Dissoudre le résidu dans environ 2 ml d'acide chlorhydrique (point 3.1), évaporer à sec et ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique 6 mol/l (point 3.2). Chauffer, filtrer la solution dans la fiole jaugée et ajuster au trait de jauge avec de l'eau (la concentration de HCl est d'environ 0,5 mol/l).

Notes:

- a) Il est important, lors du dosage des oligoéléments, d'être attentif aux risques de contamination, notamment par le zinc, le cuivre et le fer. Les instruments utilisés pour la préparation des échantillons doivent par conséquent être exempts de ces métaux.

Pour réduire les risques de contamination, il convient de travailler en atmosphère exempte de poussières avec un matériel rigoureusement propre et une verrerie soigneusement lavée. Le dosage du zinc est particulièrement sensible aux nombreux types de contaminations dues, par exemple, à la verrerie, aux réactifs et à la poussière.

- b) Calculer le poids de l'échantillon à incinérer en fonction de la teneur approximative de l'aliment en oligo-élément à doser et de la sensibilité du spectrophotomètre utilisé. Pour certains aliments pauvres en oligo-éléments, il peut être nécessaire de prélever un échantillon de 10 à 20 g et de limiter le volume de la solution finale à 100 ml.

- c) Incinérer dans un four fermé sans injection d'air ou d'oxygène.

- d) La température indiquée par le pyromètre ne peut dépasser 475 °C.

5.1.2. Dosage spectrophotométrique

5.1.2.1. Préparation des solutions d'étalonnage

Préparer, pour chaque oligoélément à doser, une gamme de solutions d'étalonnage à partir des solutions étalons de travail données aux points 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 et 3.10.1, de façon que chaque solution d'étalonnage ait une concentration de HCl d'environ 0,5 mol/l et, dans le cas du fer, du manganèse et du zinc, une concentration de chlorure de lanthane correspondant à 0,1 % de lanthane (p/v).

Les concentrations choisies d'oligoéléments doivent se trouver dans la zone de sensibilité du spectrophotomètre utilisé. Les tableaux ci-après donnent, à titre d'exemple, des types de composition de solution d'étalonnage; selon le type et la sensibilité du spectrophotomètre utilisé, il peut être nécessaire de choisir d'autres concentrations.

Fer

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de solution étalon de travail (point 3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (point 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de solution de chlorure de lanthane (point 3.11); ajuster à 100 ml avec de l'eau.

▼ M9**Cuivre**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solution étalon de travail (point 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (point 3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Manganèse

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solution étalon de travail (point 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (point 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de solution de chlorure de lanthane (point 3.11); ajuster à 100 ml avec de l'eau.

Zinc

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml de solution étalon de travail (point 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (point 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml de solution de chlorure de lanthane (point 3.11); ajuster à 100 ml avec de l'eau.

5.1.2.2. Préparation de la solution à analyser

Pour le dosage du cuivre, la solution préparée conformément au point 5.1.1 peut, en règle générale, être utilisée directement. S'il est nécessaire d'amener sa concentration dans la gamme des concentrations des solutions d'étalonnage, une partie aliquote peut être introduite à la pipette dans une fiole jaugée de 100 ml et ajustée au trait de jauge avec de l'acide chlorhydrique 0,5 mol/l (point 3.3).

Pour le dosage du fer, du manganèse et du zinc, introduire à la pipette une portion aliquote de la solution préparée conformément au point 5.1.1 dans une fiole jaugée de 100 ml; ajouter 10 ml de solution de chlorure de lanthane (point 3.11) et ajuster au trait de jauge avec de l'acide chlorhydrique 0,5 mol/l (point 3.3) (voir aussi point 8 «Observation»).

5.1.2.3. Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc comportant toutes les étapes prescrites du mode opératoire, en excluant la présence de l'échantillon. La solution d'étalonnage «0» ne peut être utilisée comme «blanc».

5.1.2.4. Mesure de l'absorption atomique

Mesurer l'absorption atomique des solutions d'étalonnage et de la solution à analyser, en utilisant une flamme oxydante air-acétylène, aux longueurs d'onde ci-après:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Effectuer chaque mesure quatre fois.

▼ M9**5.2. Aliments minéraux**

En l'absence de matière organique, l'incinération préalable est inutile. Appliquer le mode opératoire à partir du deuxième alinéa du point 5.1.1.1. L'évaporation en présence d'acide fluorhydrique peut être omise.

6. Calcul des résultats

Calculer la concentration d'oligoéléments dans la solution à analyser à l'aide d'une courbe d'étalonnage et exprimer le résultat en mg d'oligo-élément par kg d'échantillon (ppm).

7. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur un même échantillon par le même analyste ne peut dépasser:

- 5 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs en oligoélément concerné allant jusqu'à 50 mg/kg,
- 10 % du résultat le plus élevé pour les teneurs en oligoélément comprises entre 50 et 100 mg/kg,
- 10 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs en oligoélément concerné comprises entre 100 et 200 mg/kg,
- 5 % du résultat le plus élevé pour les teneurs en oligoélément concerné supérieures à 200 mg/kg.

8. Observation

La présence de grandes quantités de phosphates peut interférer dans le dosage du fer, du manganèse et du zinc. Cette interférence doit être corrigée par addition de solution de chlorure de lanthane (point 3.11). Néanmoins, si l'échantillon a un rapport pondéral $\text{Ca} + \text{Mg}/\text{P} > 2$, l'addition de solution de chlorure de lanthane (point 3.11) à la solution à analyser et aux solutions d'étalonnage peut être omise.

D. DOSAGE DE L'HALOFUGINONE

DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl) acétonyl]-quinazoline-4-(3H)-one bromhydrate

L'halofuginone doit être dosé:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17299 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Recherche et dosage dans des aliments composés pour animaux des coccidiostatiques autorisés au taux d'additif et de contamination croisée à 1 % et 3 %, de coccidiostatiques non enregistrés et d'un antibiotique aux taux sub-additifs, par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)» ou
- par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse à l'aide d'un détecteur UV, conformément aux points 1 à 8.

1. Objet et champ d'application

La méthode permet de déterminer la teneur en halofuginone des aliments pour animaux. La limite de quantification est de 1 mg/kg.

2. Principe

Après traitement à l'eau chaude, l'halofuginone est extrait sous forme de base libre dans de l'acétate d'éthyle et ensuite séparé sous forme de chlorhydrate dans une solution acide aqueuse. L'extrait est purifié par chromatographie sur résines échangeuses d'ions. La teneur en halofuginone est déterminée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse à l'aide d'un détecteur d'UV.

▼ M9**3. Réactifs**

3.1. Acétonitrile, de qualité CLHP.

3.2. Résine d'Amberlite XAD-2.

3.3. Acétate d'ammonium.

3.4. Acétate d'éthyle.

3.5. Acide acétique, glacial.

3.6. Halofuginone étalon (DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl) acétonyl]-quinazoline-4(3H)-one bromhydrate, E 764).

3.6.1. Solution mère étalon d'halofuginone, 100 µg/ml

Peser, à 0,1 mg près, 50 mg d'halofuginone (point 3.6) dans une fiole jaugée de 500 ml, dissoudre dans une solution tampon d'acétate d'ammonium (point 3.18), ajuster au trait de jauge avec la solution tampon et mélanger. Cette solution est stable pendant trois semaines à 5 °C si elle est conservée à l'abri de la lumière.

3.6.2. Solutions d'étalonnage

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, transvaser 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 et 6,0 ml de la solution mère de l'étalon (point 3.6.1). Ajuster au trait de jauge avec la phase mobile (point 3.21) et mélanger. Ces solutions ont des concentrations respectives de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 et 6,0 mg/ml d'halofuginone. Les solutions doivent être préparées peu avant d'être utilisées.

3.7. Acide chlorhydrique (ρ_{20} environ 1,16 g/ml).

3.8. Méthanol.

3.9. Nitrate d'argent.

3.10. Ascorbate de sodium.

3.11. Carbonate de sodium.

3.12. Chlorure de sodium.

3.13. EDTA (acide éthylènediamine tétracétique, sel disodique).

3.14. Eau, de qualité CLHP.

3.15. Solution de carbonate de sodium, $c = 10$ g/100 ml.

3.16. Solution de carbonate de sodium saturée au chlorure de sodium, $c = 5$ g/100 ml.

Dissoudre 50 g de carbonate de sodium (point 3.11) dans de l'eau, ajuster à 1 litre et ajouter du chlorure de sodium (point 3.12) jusqu'à saturation de la solution.

3.17. Acide chlorhydrique, environ 0,1 mol/l.

Diluer avec de l'eau 10 ml d'acide chlorhydrique (point 3.7) jusqu'à 1 litre.

3.18. Solution tampon d'acétate d'ammonium, environ 0,25 mol/l.

Dissoudre 19,3 g d'acétate d'ammonium (point 3.3) et 30 ml d'acide acétique (point 3.5) dans de l'eau (point 3.14) et ajuster à 1 litre.

▼ M9**3.19. Préparation de la résine d'Amberlite XAD-2**

Laver une quantité appropriée d'Amberlite (point 3.2) avec de l'eau jusqu'à l'élimination de tous les ions chlorure, indiquée par un essai au nitrate d'argent (point 3.20) réalisé sur la phase aqueuse éliminée. Laver ensuite la résine avec 50 ml de méthanol (point 3.8), écarter le méthanol et conserver la résine sous méthanol frais.

3.20. Solution de nitrate d'argent, environ 0,1 mol/l

Dissoudre 0,17 g de nitrate d'argent (point 3.9) dans 10 ml d'eau.

3.21. Phase mobile de la CLHP

Mélanger 500 ml d'acétonitrile (point 3.1) avec 300 ml de solution tampon d'acétate d'ammonium (point 3.18) et 1 200 ml d'eau (point 3.14). Ajuster au moyen d'acide acétique (point 3.5) à pH 4,3. Filtrer à travers un filtre de 0,22 µm (point 4.8) et dégazer la solution (par exemple, par traitement aux ultrasons pendant 10 minutes). Cette solution est stable pendant un mois si elle est conservée à l'abri de la lumière dans un récipient fermé.

4. Appareillage**4.1. Bain ultrasonique.****4.2. Évaporateur rotatif.****4.3. Centrifugeuse.****4.4. Équipement pour CLHP avec détecteur d'ultraviolets à longueur d'onde variable ou détecteur à barrettes de diodes.****4.4.1. Colonne de chromatographie liquide, 300 mm × 4 mm, C₁₈, particules de 10 µm, ou équivalent.****4.5. Colonne de verre (300 mm × 10 mm), munie d'un filtre de verre fritté et d'un robinet.****4.6. Filtres en fibre de verre, de 150 mm de diamètre.****4.7. Filtre à membrane de 0,45 µm.****4.8. Filtre à membrane de 0,22 µm.****5. Mode opératoire**

NB: L'halofuginone, en tant que base libre, est instable dans des solutions alcalines et d'acétate d'éthyle. Il ne doit pas rester dans l'acétate d'éthyle pendant plus de 30 minutes.

5.1. Généralités**5.1.1. Un aliment blanc doit être analysé afin de vérifier l'absence d'halofuginone ou de substances interférentes.****5.1.2. Effectuer un test de récupération par analyse de l'aliment blanc auquel a été ajoutée une quantité d'halofuginone pareille à celle présente dans l'échantillon. Pour parvenir à une teneur de 3 mg/kg, ajouter 300 µl de la solution mère de l'étalon (point 3.6.1) à 10 g d'aliment blanc, mélanger et attendre 10 minutes avant de procéder à l'extraction (point 5.2).**

NB: Dans le cadre de cette méthode, l'aliment blanc doit être d'un type pareil dans sa composition à celui de l'échantillon et, lors de son analyse, il ne doit pas être détecté d'halofuginone.

▼ **M9**5.2. *Extraction*

Peser, à 0,1 g près, 10 g de l'échantillon préparé dans un tube à centrifuger de 200 ml, ajouter 0,5 g d'ascorbate de sodium (point 3.10), 0,5 g d'EDTA (point 3.13) et 20 ml d'eau, puis mélanger. Placer le tube pendant 5 minutes au bain-marie (80 °C). Après refroidissement à température ambiante, ajouter 20 ml de solution de carbonate de sodium (point 3.15) et mélanger. Ajouter immédiatement 100 ml d'acétate d'éthyle (point 3.4) et agiter vigoureusement à la main pendant 15 secondes. Placer ensuite le tube pendant 3 minutes dans le bain ultrasonique (point 4.1) en dévissant le bouchon. Centrifuger pendant 2 minutes et décanter la phase d'acétate d'éthyle à travers un filtre en fibre de verre (point 4.6) dans une ampoule à décanter de 500 ml. Répéter l'extraction de l'échantillon avec une seconde portion de 100 ml d'acétate d'éthyle. Laver les extraits combinés pendant 1 minute avec 50 ml de la solution de carbonate de sodium saturée au chlorure de sodium (point 3.16) et éliminer la phase aqueuse.

Extraire la couche organique pendant 1 minute avec 50 ml d'acide chlorhydrique (point 3.17). Faire passer la couche acide inférieure dans une ampoule à décanter de 250 ml. Réextraire la couche organique pendant 1,5 minute avec 50 ml d'acide chlorhydrique supplémentaires et combiner avec le premier extrait. Laver les extraits d'acide combinés par agitation pendant environ 10 secondes avec 10 ml d'acétate d'éthyle (point 3.4).

Transvaser quantitativement la couche aqueuse dans un ballon à fond rond de 250 ml et éliminer la phase organique. À l'aide d'un évaporateur rotatif (point 4.2), évaporer totalement le reste d'acétate d'éthyle de la solution acide. La température du bain-marie ne doit pas dépasser 40 °C. Sous un vide partiel d'environ 25 mbar, la totalité de l'acétate d'éthyle résiduel sera éliminée en 5 minutes à 38 °C.

5.3. *Purification*5.3.1. *Préparation de la colonne d'Amberlite*

Pour chaque extrait d'échantillon, préparer une colonne XAD-2. À l'aide de méthanol (point 3.8), transvaser 10 g d'Amberlite préparée (point 3.19) dans une colonne de verre (point 4.5). Ajouter un petit tampon de laine de verre au sommet du lit de la résine. Laisser le méthanol s'écouler de la colonne et laver la résine avec 100 ml d'eau, en arrêtant le débit lorsque le liquide atteint le sommet du lit de la résine. Laisser la colonne se stabiliser pendant 10 minutes avant de l'utiliser. Ne jamais laisser la colonne aller à sec.

5.3.2. *Purification de l'échantillon*

Transvaser l'extrait (point 5.2) quantitativement au sommet de la colonne d'Amberlite préparée (point 5.3.1) et éluer, en écartant l'éluat. La vitesse d'élution ne doit pas dépasser 20 ml/min. Rincer le ballon à fond rond avec 20 ml d'acide chlorhydrique (point 3.17) et utiliser cette solution pour laver la colonne de résine. Faire passer un courant d'air pour éliminer la solution acide restante. Éliminer les liquides du lavage. Ajouter 100 ml de méthanol (point 3.8) à la colonne et laisser éluer 5 à 10 ml en recueillant l'éluat dans un ballon à fond rond de 250 ml. Laisser le reste de méthanol se stabiliser pendant 10 minutes avec la résine et poursuivre l'élution à une vitesse ne dépassant pas 20 ml/min, en recueillant l'éluat dans le même ballon à fond rond. À l'aide d'un évaporateur rotatif (point 4.2), évaporer le méthanol, en veillant à ce que la température du bain-marie ne dépasse pas 40 °C. Transvaser le résidu quantitativement dans une fiole jaugée de 10 ml à l'aide de la phase mobile (point 3.21). Ajuster au trait de jauge avec la phase mobile et mélanger. Une partie aliquote est filtrée à travers un filtre à membrane (point 4.7). Réserver cette solution pour l'analyse par CLHP (point 5.4).

▼ M9**5.4. Dosage par CLHP****5.4.1. Paramètres**

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

Colonne de chromatographie liquide (point 4.4.1).

Phase mobile de la CLHP (point 3.21).

Débit: 1,5 à 2 ml/min.

Longueur d'onde de détection: 243 nm

Volume d'injection: 40 à 100 µl.

Vérifier la stabilité du système chromatographique en injectant plusieurs fois la solution d'étalonnage (point 3.6.2) contenant 3,0 µg/ml jusqu'à obtention de hauteurs (ou surfaces) de pic et de temps de rétention constants.

5.4.2. Courbe d'étalonnage

Injecter plusieurs fois chaque solution d'étalonnage (point 3.6.2) et mesurer les hauteurs (surfaces) des pics pour chaque concentration. Tracer la courbe d'étalonnage en portant les hauteurs ou surfaces moyennes des pics des solutions d'étalonnage en ordonnée et les concentrations correspondantes en µg/ml en abscisse.

5.4.3. Solution d'échantillon

Injecter plusieurs fois l'extrait d'échantillon (point 5.3.2), en utilisant le même volume que pour les solutions d'étalonnage, et déterminer la hauteur (surface) de pic moyenne de l'halofuginone.

6. Calcul des résultats

À partir de la hauteur (surface) moyenne des pics d'halofuginone de la solution d'échantillon, déterminer la concentration d'halofuginone dans cette solution, en µg/ml, par référence à la courbe d'étalonnage (point 5.4.2).

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

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

où:

c : concentration d'halofuginone dans la solution d'échantillon, en µg/ml,

m : poids de la prise d'essai, en grammes.

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 et de la solution d'étalonnage (point 3.6.2) contenant 6,0 µg/ml.

7.1.1. Cochromatographie

Un extrait d'échantillon est supplémenté par ajout d'une quantité appropriée de solution d'étalonnage (point 3.6.2). La quantité d'halofuginone ajoutée doit être pareille à la quantité estimée d'halofuginone trouvée dans l'extrait d'échantillon.

▼ M9

Seule la hauteur du pic d'halofuginone doit être augmentée, compte tenu à la fois de la quantité ajoutée et de la dilution de l'extrait. La largeur du pic, à la moitié de sa hauteur, doit être d'environ 10 % de sa largeur initiale.

7.1.2. Détection par barrettes de diodes

Évaluer les résultats conformément aux critères suivants:

- a) les longueurs d'onde d'absorption maximale des spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrées au sommet des pics sur le chromatogramme, doivent être identiques, dans une marge déterminée par le pouvoir de résolution du système de détection. Dans le cadre d'une détection par barrettes de diodes, elle est généralement d'environ 2 nm;
- b) entre 225 et 300 nm, les spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrés au sommet des pics sur le chromatogramme, ne peuvent être différents pour les parties du spectre comprises entre 10 et 100 % d'absorbance relative. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et que l'écart observé entre les deux spectres ne dépasse nulle part 15 % de l'absorbance de l'analyte étalon;
- c) entre 225 et 300 nm, les spectres de la courbe ascendante, du sommet et de la courbe descendante du pic fourni par l'extrait d'échantillon ne peuvent être visuellement différents les uns des autres pour les parties du spectre comprises entre 10 et 100 % d'absorbance relative. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et que l'écart observé entre les spectres ne dépasse nulle part 15 % de l'absorbance du spectre au sommet 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 des deux analyses parallèles effectuées sur le même échantillon ne peut dépasser 0,5 mg/kg pour des teneurs en halofuginone allant jusqu'à 3 mg/kg.

7.3. Récupération

En ce qui concerne l'échantillon blanc supplémenté, la récupération doit être de 80 % au minimum.

8. Résultats d'une étude collaborative

Dans le cadre d'une étude collaborative ⁽¹⁾, trois échantillons ont été analysés par huit laboratoires.

Résultats

	Échantillon A (blanc) À la réception	Échantillon B (farine)		Échantillon C (granulés)	
		À la réception	Après deux mois	À la réception	Après deux mois
Moyenne [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17

⁽¹⁾ *The Analyst*, n° 108, 1983, p. 1252-1256.

▼ **M9**

	Échantillon A (blanc) À la réception	Échantillon B (farine)		Échantillon C (granulés)	
		À la réception	Après deux mois	À la réception	Après deux mois
Réc. [%]		86	74	88	75

ND = non détecté

S_R = écart type de reproductibilité

CV_R = coefficient de variation de la reproductibilité (%)

Réc. = récupération (%)

E. DOSAGE DE LA ROBÉNIDINE

Chlorhydrate de 1,3-bis [(4-chlorobenzylidène) amino] guanidine

La robénidine doit être dosée:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17299 «Aliments pour animaux — méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Recherche et dosage dans des aliments composés pour animaux des coccidiostatiques autorisés au taux d'additif et de contamination croisée à 1 % et 3 %, de coccidiostatiques non enregistrés et d'un antibiotique aux taux sub-additifs, par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)» ou
- par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse à l'aide d'un détecteur UV, conformément aux points 1 à 8.

1. Objet et champ d'application

La méthode permet de déterminer la teneur en robénidine des aliments pour animaux. La limite de quantification est de 5 mg/kg.

2. Principe

L'échantillon est extrait à l'aide de méthanol acidifié. L'extrait est séché et une partie aliquote purifiée dans une colonne d'oxyde d'aluminium. La robénidine est éluée de la colonne à l'aide de méthanol, concentrée et portée à un volume adéquat avec la phase mobile. La teneur en robénidine est déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse, à l'aide d'un détecteur d'ultraviolets.

3. Réactifs

3.1. Méthanol.

3.2. Méthanol acidifié

Transvaser 4,0 ml d'acide chlorhydrique ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) dans une fiole jaugée de 500 ml, ajuster au trait de jauge avec du méthanol (point 3.1) et mélanger. Cette solution doit être préparée peu avant d'être utilisée.

3.3. Acétonitrile, de qualité CLHP.

3.4. Tamis moléculaire

Type 3A, perles de 8 à 12 *mesh* (perles de 1,6 à 2,5 mm, aluminosilicate cristallin, diamètre des pores de 0,3 mm).

3.5. Oxyde d'aluminium: acide, degré d'activité I pour chromatographie sur colonne

▼ M9

Transvaser 100 g d'oxyde d'aluminium dans un récipient approprié et ajouter 2,0 ml d'eau. Boucher et agiter pendant environ 20 minutes. Conserver dans un récipient bien fermé.

3.6. Solution de dihydrogénophosphate de potassium, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

Dissoudre 3,40 g de dihydrogénophosphate de potassium dans de l'eau (qualité CLHP) dans une fiole jaugée de 1 000 ml, ajuster au trait de jauge et mélanger.

3.7. Solution de monohydrogénophosphate disodique, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

Dissoudre 3,55 g de monohydrogénophosphate disodique anhydre (ou 4,45 g de dihydrate ou 8,95 g de dodécahydrate) dans de l'eau (de qualité CLHP), dans une fiole jaugée de 1 litre, ajuster au trait de jauge et mélanger.

3.8. Phase mobile de la CLHP

Mélanger les réactifs suivants:

650 ml d'acétonitrile (point 3.3),

250 ml d'eau (de qualité CLHP),

50 ml de solution de dihydrogénophosphate de potassium (point 3.6),

50 ml de solution de monohydrogénophosphate disodique (point 3.7).

Filtrer à travers un filtre de $0,22 \mu\text{m}$ (point 4.6) et dégazer la solution (par exemple, par traitement aux ultrasons pendant 10 minutes).

3.9. Substance étalon

Robénidine pure: chlorhydrate de 1,3-bis [(4-chlorobenzylidène) amino] guanidine

3.9.1. Solution mère étalon de robénidine: $300 \mu\text{g/ml}$

Peser, à $0,1 \text{ mg}$ près, 30 mg de substance étalon de robénidine (point 3.9). Dissoudre dans du méthanol acidifié (point 3.2), dans une fiole jaugée de 100 ml , ajuster au trait de jauge avec le même solvant et mélanger. Envelopper la fiole dans une feuille d'aluminium et conserver à l'abri de la lumière.

3.9.2. Solution étalon intermédiaire de robénidine: $12 \mu\text{g/ml}$

Transvaser $10,0 \text{ ml}$ de la solution mère de l'étalon (point 3.9.1) dans une fiole jaugée de 250 ml , ajuster au trait de jauge avec la phase mobile (point 3.8) et mélanger. Envelopper la fiole dans une feuille d'aluminium et conserver à l'abri de la lumière.

3.9.3. Solutions d'étalonnage

Dans une série de fioles jaugées de 50 ml , transvaser $5,0$, $10,0$, $15,0$, $20,0$ et $25,0 \text{ ml}$ de la solution étalon intermédiaire (point 3.9.2). Ajuster au trait de jauge avec la phase mobile (point 3.8) et mélanger. Ces solutions ont des concentrations respectives de $1,2$, $2,4$, $3,6$, $4,8$ et $6,0 \mu\text{g/ml}$ de robénidine. Les solutions doivent être préparées peu avant d'être utilisées.

3.10. Eau de qualité CLHP.

4. **Appareillage**

4.1. Colonne de verre

Colonne construite en verre ambré, munie d'un robinet et d'un réservoir d'une capacité d'environ 150 ml , d'un diamètre intérieur de $10\text{--}15 \text{ mm}$, d'une longueur de 250 mm .

▼ M9

- 4.2. Agitateur mécanique ou magnétique.
- 4.3. Évaporateur rotatif.
- 4.4. Équipement pour CLHP avec détecteur d'ultraviolets à longueur d'onde variable ou détecteur à barrettes de diodes fonctionnant dans l'intervalle de 250-400 nm.
 - 4.4.1. Colonne de chromatographie liquide: 300 mm × 4 mm, C₁₈, particules de 10 µm, ou équivalent.
- 4.5. Papier filtre en fibre de verre (Whatman GF/A ou équivalent).
- 4.6. Filtre à membrane de 0,22 µm.
- 4.7. Filtre à membrane de 0,45 µm.

5. Mode opératoire

NB: La robénidine est photosensible. L'emploi de verrerie ambrée est recommandé pour toutes les opérations.

5.1. Généralités

- 5.1.1. Il est recommandé d'analyser un aliment blanc pour vérifier l'absence de robénidine et de substances interférentes.
- 5.1.2. Effectuer un test de récupération par analyse de l'aliment blanc (point 5.1.1) auquel a été ajoutée une quantité de robénidine pareille à celle présente dans l'échantillon. Pour parvenir à une teneur de 60 mg/kg, transvaser 3,0 ml de la solution mère de l'étalon (point 3.9.1) dans une fiole conique de 250 ml. Ramener la solution à environ 0,5 ml par évaporation dans un courant d'azote. Ajouter 15 g de l'aliment blanc, mélanger et laisser reposer 10 minutes avant de procéder à l'extraction (point 5.2).

NB: Dans le cadre de cette méthode, l'aliment blanc doit être d'un type pareil à celui de l'échantillon et, lors de son analyse, il ne doit pas être détecté de robénidine.

5.2. Extraction

Peser, à 0,01 g près, 15 g de l'échantillon préparé. Transvaser dans une fiole conique de 250 ml et ajouter 100,0 ml de méthanol acidifié (point 3.2), boucher le récipient et agiter pendant une heure avec l'agitateur (point 4.2). Filtrer la solution à travers un papier filtre en fibre de verre (point 4.5) et recueillir la totalité du filtrat dans une fiole conique de 150 ml. Ajouter 7,5 g de tamis moléculaire (point 3.4), boucher le récipient et agiter pendant 5 minutes. Filtrer immédiatement à travers un papier filtre en fibre de verre. Conserver cette solution pour la purification (point 5.3).

5.3. Purification**5.3.1. Préparation de la colonne d'oxyde d'aluminium**

Munir l'extrémité inférieure d'une colonne de verre d'un petit tampon de laine de verre (point 4.1) et tasser à l'aide d'une baguette de verre. Peser et transvaser dans la colonne 11,0 g d'oxyde d'aluminium préparé (point 3.5). Il convient de réduire l'exposition à l'air au cours de cette opération. Tapoter l'extrémité inférieure de la colonne remplie pour décanter l'oxyde d'aluminium.

▼M9**5.3.2. Purification de l'échantillon**

À l'aide d'une pipette, transférer sur la colonne 5,0 ml de l'extrait d'échantillon préparé (point 5.2). Maintenir l'embout de la pipette contre la paroi de la colonne et laisser l'oxyde d'aluminium absorber la solution. Éluer la robénidine de la colonne à l'aide de 100 ml de méthanol (point 3.1), à un débit de 2-3 ml/min, et recueillir l'éluat dans un ballon à fond rond de 250 ml. Sécher la solution de méthanol par évaporation, à pression réduite, à 40 °C, à l'aide d'un évaporateur rotatif (point 4.3). Redissoudre le résidu dans 3-4 ml de la phase mobile (point 3.8) et transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 10 ml. Rincer la fiole avec plusieurs fractions de 1-2 ml de la phase mobile et transvaser ces rinçages dans la fiole jaugée. Ajuster au trait de jauge avec le même solvant et mélanger. Une partie aliquote est filtrée à travers un filtre à membrane de 0,45 µm (point 4.7). Réserver cette solution pour l'analyse par CLHP (point 5.4).

5.4. Dosage par CLHP**5.4.1. Paramètres**

Les conditions ci-après sont proposées à titre indicatif; d'autres conditions peuvent être appliquées si elles donnent des résultats équivalents:

Colonne de chromatographie liquide (point 4.4.1).

Phase mobile de la CLHP (point 3.8).

Débit: 1,5 à 2 ml/minute.

Longueur d'onde de détection: 317 nm.

Volume d'injection: 20 à 50 µl.

Vérifier la stabilité du système chromatographique en injectant la solution d'étalonnage (point 3.9.3) contenant 3,6 µg/ml plusieurs fois jusqu'à obtention de hauteurs de pic et de temps de rétention constants.

5.4.2. Courbe d'étalonnage

Injecter plusieurs fois chaque solution d'étalonnage (point 3.9.3) et mesurer les hauteurs (surfaces) des pics pour chaque concentration. Tracer la courbe d'étalonnage en portant les hauteurs ou surfaces moyennes des pics des solutions d'étalonnage en ordonnée et les concentrations correspondantes en µg/ml en abscisse.

5.4.3. Solution d'échantillon

Injecter plusieurs fois l'extrait d'échantillon (point 5.3.2) en utilisant le même volume que pour les solutions d'étalonnage et déterminer la hauteur (surface) moyenne des pics de robénidine.

6. Calcul des résultats

À partir de la hauteur (surface) moyenne des pics de robénidine de la solution d'échantillon, déterminer la concentration de robénidine dans cette solution, en µg/ml, par référence à la courbe d'étalonnage (point 5.4.2).

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

▼ M9

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

où:

c = concentration de robénidine dans la solution d'échantillon, en µg/ml,

m = poids de la prise d'essai, en grammes.

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 et de la solution d'étalonnage (point 3.9.3) contenant 6 µg/ml.

7.1.1. Cochromatographie

Un extrait d'échantillon est supplémenté par ajout d'une quantité appropriée de solution d'étalonnage (point 3.9.3). La quantité de robénidine ajoutée doit être pareille à la quantité estimée de robénidine trouvée dans l'extrait d'échantillon.

Seule la hauteur du pic de robénidine doit être augmentée, compte tenu à la fois de la quantité ajoutée et de la dilution de l'extrait. La largeur du pic, à la moitié de sa hauteur, doit être d'environ 10 % de sa largeur initiale.

7.1.2. Détection par barrettes de diodes

Évaluer les résultats conformément aux critères suivants:

- a) les longueurs d'onde d'absorption maximale des spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrées au sommet des pics sur le chromatogramme, doivent être identiques, dans une marge déterminée par le pouvoir de résolution du système de détection. Dans le cadre d'une détection par barrettes de diodes, elle est généralement de plus ou moins 2 nm;
- b) entre 250 et 400 nm, les spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrés au sommet des pics sur le chromatogramme, ne peuvent être différents pour les parties du spectre comprises entre 10 et 100 % d'absorbance relative. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et que l'écart observé entre les deux spectres ne dépasse nulle part 15 % de l'absorbance de l'analyte étalon;
- c) entre 250 et 400 nm, les spectres de la courbe ascendante, du sommet et de la courbe descendante du pic fourni par l'extrait d'échantillon ne peuvent être visuellement différents les uns des autres pour les parties du spectre comprises entre 10 et 100 % d'absorbance relative. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et que l'écart observé entre les spectres ne dépasse nulle part 15 % de l'absorbance du spectre au sommet 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 peut dépasser 10 % du résultat le plus élevé pour une teneur en robénidine supérieure à 15 mg/kg.

▼ **M9**7.3. *Récupération*

En ce qui concerne l'échantillon blanc supplémenté, la récupération doit être de 85 % au minimum.

8. **Résultats d'une étude collaborative**

Dans le cadre d'une étude collaborative UE, quatre échantillons d'aliments pour volailles et lapins, sous forme de farine ou de granulés, ont été analysés par douze laboratoires. Pour chaque échantillon, les analyses ont été effectuées en double. Les résultats de l'étude figurent dans le tableau ci-après.

	Volailles		Lapins	
	Farine	Granulés	Farine	Granulés
Moyenne [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Récupération [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = écart type de répétabilité

CV_r = coefficient de variation de la répétabilité (%)

S_R = écart type de reproductibilité

CV_R = coefficient de variation de la reproductibilité (%)

F. DOSAGE DU DICLAZURIL

(+)-4-chlorophényl[2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tétrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl)phényl]acétonitrile.

Le diclazuril doit être dosé:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17299 «Aliments pour animaux — méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Recherche et dosage dans des aliments composés pour animaux des coccidiostatiques autorisés au taux d'additif et de contamination croisée à 1 % et 3 %, de coccidiostatiques non enregistrés et d'un antibiotique aux taux sub-additifs, par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)» ou
- par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) à gradients ternaires et en phase inverse à l'aide d'un détecteur UV, conformément aux points 1 à 9.

1. **Objet et champ d'application**

La méthode permet de déterminer la teneur en diclazuril des aliments composés pour animaux et des prémélanges ⁽¹⁾. La limite de détection est de 0,1 mg/kg; la limite de quantification est de 0,5 mg/kg. Les seuils de quantification peuvent être atteints, mais l'utilisateur devra les valider.

2. **Principe**

Après l'addition d'un étalon interne, l'échantillon est extrait à l'aide de méthanol acidifié. Pour les aliments pour 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

⁽¹⁾ La méthode peut aussi être appliquée pour doser le diclazuril dans les matières premières pour aliments des animaux

▼ **M9**

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 inverse, 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 de diclazuril: (+)-4-chlorophényl[2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tétrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl)phényl]acétonitrile de pureté garantie.

3.8.1. Solution mère étalon de diclazuril, 500 µg/ml

Peser, à 0,1 mg près, 25 mg de substance étalon de diclazuril (point 3.8) dans une fiole jaugée de 50 ml. Dissoudre dans du DMF (point 3.6), ajuster au trait de jauge avec du DMF (point 3.6) et mélanger. Envelopper le flacon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un flacon ambré et le mettre au réfrigérateur. À une température inférieure ou égale à 4 °C, la solution est stable pendant un mois ⁽¹⁾.

3.8.2. Solution étalon de diclazuril, 50 µg/ml

Transférer 5,00 ml de la solution mère de l'étalon (point 3.8.1) dans une fiole jaugée de 50 ml, ajuster au trait de jauge avec du DMF (point 3.6) et mélanger. Envelopper le flacon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un flacon ambré et le mettre au réfrigérateur. À une température inférieure ou égale à 4 °C, la solution est stable pendant un mois.

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

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

Peser, à 0,1 mg près, 25 mg de substance étalon interne (point 3.9) dans une fiole jaugée de 50 ml. Dissoudre dans du DMF (point 3.6), ajuster au trait de jauge avec du DMF (point 3.6) et mélanger. Envelopper le flacon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un flacon ambré et le mettre au réfrigérateur. À une température inférieure ou égale à 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 (point 3.9.1) dans une fiole jaugée de 50 ml, ajuster au trait de jauge avec du DMF (point 3.6) et mélanger. Envelopper le flacon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un flacon ambré et le mettre au réfrigérateur. À une température inférieure ou égale à 4 °C, la solution est stable pendant un mois.

3.9.3. Solution de l'étalon interne pour prémélanges, p/1 000 mg/ml (p = teneur nominale en diclazuril du prémélange en mg/kg)

Peser, à 0,1 mg près, p/10 mg de l'étalon interne dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre dans du DMF (point 3.6) dans un bain ultrasonique (point 4.7), ajuster au trait de jauge avec du DMF et mélanger. Envelopper le flacon dans une feuille d'aluminium ou utiliser un flacon ambré et le mettre au réfrigérateur. À une température inférieure ou égale à 4 °C, la solution est stable pendant un mois.

⁽¹⁾ Il est possible que la solution soit stable pendant une plus longue durée (pouvant atteindre un an), mais cela doit être confirmé par le laboratoire.

▼ M9

3.10. Solutions d'étalonnage

3.10.1. Solution d'étalonnage, 1 µg/ml (diclazuril)

Introduire à la pipette 1,00 ml de solution étalon de diclazuril (point 3.8.2) et 2,00 ml de solution de l'étalon interne (point 3.9.2) dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 17 ml de DMF (point 3.6), ajuster au trait de jauge avec de l'eau (point 3.1) et mélanger. Cette solution doit être préparée peu avant d'être utilisée.

3.10.2. Solution d'étalonnage, 2 µg/ml (diclazuril)

Introduire à la pipette 2,00 ml de solution étalon de diclazuril (point 3.8.2) et 2,00 ml de solution de l'étalon interne (point 3.9.2) dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 16 ml de DMF (point 3.6), ajuster au trait de jauge avec de l'eau (point 3.1) et mélanger. Cette solution doit être préparée peu avant d'être utilisée.

3.10.3. Solution d'étalonnage, 3 µg/ml (diclazuril)

Introduire à la pipette 3,00 ml de solution étalon de diclazuril (point 3.8.2) et 2,00 ml de solution de l'étalon interne (point 3.9.2) dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 15 ml de DMF (point 3.6), ajuster au trait de jauge avec de l'eau (point 3.1) et mélanger. Cette solution doit être préparée peu avant d'être utilisée.

3.10.4. Solution d'étalonnage, 4 µg/ml (diclazuril)

Introduire à la pipette 4,00 ml de solution étalon de diclazuril (point 3.8.2) et 2,00 ml de solution de l'étalon interne (point 3.9.2) dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 14 ml de DMF (point 3.6), ajuster au trait de jauge avec de l'eau (point 3.1) et mélanger. Cette solution doit être préparée peu avant d'être utilisée.

3.10.5. Solution d'étalonnage, 5 µg/ml (diclazuril)

Introduire à la pipette 5,00 ml de solution étalon de diclazuril (point 3.8.2) et 2,00 ml de solution de l'étalon interne (point 3.9.2) dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 13 ml de DMF (point 3.6), ajuster au trait de jauge avec de l'eau (point 3.1) et mélanger. Cette solution doit être préparée peu avant d'être utilisée.

NB: Les solutions d'étalonnage (points 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 et 3.10.5) sont valables pour une concentration de diclazuril dans les aliments comprise entre 0,5 et 2,5 mg/kg lorsqu'on utilise le présent protocole.

3.11. Cartouche C₁₈ pour extraction en phase solide, par exemple Mega Bond Elut, taille: 20 cc, masse de sorption: 5 000 mg (préconditionnement suivant les directives du fournisseur).

3.12. Solvant d'extraction: méthanol acidifié

Introduire à la pipette 5,0 ml d'acide chlorhydrique (point 3.7) dans 1 000 ml de méthanol (point 3.5) et mélanger.

3.13. Phase mobile pour CLHP.

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

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

3.13.2. Éluant B: acétonitrile (point 3.4).

3.13.3. Éluant C: méthanol (point 3.5).

▼ M9**4. Appareillage**

- 4.1. Agitateur mécanique.
- 4.2. Équipement pour CLHP à gradients ternaires.
 - 4.2.1. Colonne pour chromatographie en phase liquide, remplie d'Hypersil ODS de 3 µm, 100 mm × 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.
- 4.4. Filtre à membrane (par exemple du nylon résistant aux substances chimiques) de 0,45 µm.
- 4.5. Seringue jetable de 5 ml.
- 4.6. Distributeur à vide.
- 4.7. Bain ultrasonique.

5. Mode opératoire**5.1. Généralités****5.1.1. Aliment blanc**

Analyser un aliment blanc pour vérifier l'absence de diclazuril ou de substances interférentes. L'aliment blanc 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 blanc auquel a été ajoutée une quantité de diclazuril pareille 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 (point 3.8.1) à 50 g de l'aliment blanc, mélanger soigneusement et laisser reposer 10 minutes, mélanger de nouveau plusieurs fois avant de procéder à l'extraction (point 5.2).

En l'absence d'aliment blanc de même type que celui de l'échantillon (voir le point 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. Cet échantillon est analysé avec l'échantillon non supplémenté et la récupération peut être calculée par différence.

5.2. Extraction**5.2.1. Aliments composés pour animaux**

Peser, à 0,01 g près, environ 50 g de l'échantillon. Transférer dans une fiole erlenmeyer de 500 ml, ajouter 1,00 ml de la solution de l'étalon interne (point 3.9.2), 200 ml du solvant d'extraction (point 3.12) et boucher la fiole. Secouer le mélange sur l'agitateur (point 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 (point 3.1). Transférer cette solution dans une cartouche à extraction (point 3.11) et filtrer sous vide (point 4.6). Laver la cartouche à l'aide de 25 ml du mélange de solvant d'extraction (point 3.12) et d'eau (point 3.1), 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 (point 3.12) et d'eau, 80 + 20 (V + V). Évaporer cette fraction jusqu'à ce qu'elle commence à sécher au moyen d'un évaporateur rotatif (point 4.3) à 60 °C. Dissoudre le résidu dans 1,0 ml de DMF (point 3.6), ajouter 1,5 ml d'eau (point 3.1) et mélanger. Faire passer dans un filtre à membrane (point 4.4) monté sur une seringue jetable (point 4.5). Procéder au dosage par CLHP (point 5.3).

▼ **M9**

5.2.2. Prémélanges

Peser, à 0,001 g près, environ 1 g de l'échantillon. Transférer dans une fiole erlenmeyer de 500 ml, ajouter 1,00 ml de la solution de l'étalon interne (point 3.9.3), 200 ml du solvant d'extraction (point 3.12) et boucher la fiole. Passer le mélange à l'agitateur (point 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. 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 (point 4.3). Redissoudre le résidu dans 10,0 ml de DMF (point 3.6), ajouter 15,0 ml d'eau (point 3.1) et mélanger. Procéder au dosage par CLHP (point 5.3).

5.3. Dosage par 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 ou meilleurs.

— Colonne de chromatographie liquide (point 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, remplie d'Hypersil ODS de 3 µm, ou équivalent

— Phase mobile:

— Éluant A (point 3.13.1): solution aqueuse d'acétate d'ammonium et d'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium

— Éluant B (point 3.13.2): acétonitrile

— Éluant C (point 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)

— Ensuite, rincer avec B pendant 10 minutes

— Débit: 1,5-2 ml/min

— Volume d'injection: 20 µl

— Longueur d'onde de détection: 280 nm

Vérifier la stabilité du système chromatographique en injectant plusieurs fois la solution d'étalonnage (point 3.10.2) contenant 2 µg/ml de diclazuril et d'étalon interne jusqu'à obtention de hauteurs de pic et de temps de rétention constants.

5.3.2. Analyse chromatographique des solutions d'étalonnage

Injecter deux fois 20 µl de chaque solution d'étalonnage (points 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 et 3.10.5), identifier et intégrer les pics du diclazuril et de l'étalon interne; tracer la courbe d'étalonnage en utilisant le rapport entre la hauteur ou surface moyenne des pics du diclazuril et la hauteur ou surface moyenne des pics de l'étalon interne en ordonnée et versus en abscisse la concentration de diclazuril dans les solutions d'étalonnage (µg/ml).

5.3.3. Analyse chromatographique des solutions des échantillons

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

▼ **M9****6. Calcul des résultats****6.1. Aliments composés pour animaux**

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

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ ou } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

où:

- Hauteur(d,s) est la hauteur du pic de diclazuril dans la solution d'échantillon (point 5.2.1)
- Surface(d,s) est la surface du pic de diclazuril dans la solution d'échantillon (point 5.2.1)
- Hauteur(i,s) est la hauteur du pic de l'étalon interne dans la solution d'échantillon (point 5.2.1)
- Surface(i,s) est la surface du pic de l'étalon interne dans la solution d'échantillon (point 5.2.1)
- b est l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage tracée à partir des solutions d'étalonnage (points 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 et 3.10.5) conformément au point 5.3.2
- a est la pente de la courbe d'étalonnage tracée à partir des solutions d'étalonnage (points 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 et 3.10.5) conformément au point 5.3.2
- m est la masse de la prise d'essai, en grammes
- V est le volume final, en millilitres, de l'extrait d'échantillon après une deuxième dissolution conformément au point 5.2.1 (soit 2,5 ml)

6.2. Prémélanges

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

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ ou } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

où:

- Hauteur(d,s) est la hauteur du pic de diclazuril dans la solution d'échantillon (point 5.2.2)
- Surface(d,s) est la surface du pic de diclazuril dans la solution d'échantillon (point 5.2.2)
- Hauteur(i,s) est la hauteur du pic de l'étalon interne dans la solution d'échantillon (point 5.2.2)
- Surface(i,s) est la surface du pic de l'étalon interne dans la solution d'échantillon (point 5.2.2)
- b est l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage tracée à partir des solutions d'étalonnage (points 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 et 3.10.5) conformément au point 5.3.2
- a est la pente de la courbe d'étalonnage tracée à partir des solutions d'étalonnage (points 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 et 3.10.5) conformément au point 5.3.2
- m est la masse de la prise d'essai, en grammes
- V est le volume final, en millilitres, de l'extrait d'échantillon après une deuxième dissolution conformément au point 5.2.2 (soit 25 ml)
- p est la teneur nominale en diclazuril du prémélange, en mg/kg

▼ M9**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 d'échantillon (point 5.2.1 ou 5.2.2) et de la solution d'étalonnage (point 3.10.2).

7.1.1. Cochromatographie

Un extrait d'échantillon (point 5.2.1 ou 5.2.2) est additionné d'une quantité appropriée de la solution d'étalonnage (point 3.10.2). La quantité de diclazuril ajoutée doit être semblable à la quantité de diclazuril constatée dans l'extrait d'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 d'échantillon non supplémenté.

7.1.2. Détection par barrettes de diodes

Évaluer les résultats conformément aux critères suivants:

- a) les longueurs d'onde d'absorption maximale des spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrées au sommet des pics sur le chromatogramme, doivent être identiques, dans une marge déterminée par le pouvoir de résolution du système de détection. Dans le cadre d'une 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 au sommet du pic sur le 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 que, en aucun point, l'écart observé entre les deux spectres ne dépasse 15 % de l'absorbance de l'analyte étalon;
- c) entre 230 et 320 nm, les spectres de la courbe ascendante, du sommet et de la courbe descendante du pic produits par l'extrait d'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 que, en aucun point, l'écart observé entre les spectres ne dépasse 15 % de l'absorbance du spectre au sommet 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 mesures indépendantes effectuées sur deux sous-échantillons ne peut dépasser:

- 30 % du résultat supérieur pour les teneurs en diclazuril comprises entre 0,5 et 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg pour les teneurs en diclazuril comprises entre 2,5 et 5 mg/kg,
- 15 % du résultat supérieur pour les teneurs en diclazuril supérieures à 5 mg/kg.

▼ **M9**7.3. *Récupération*

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

8. **Résultats d'une étude collaborative**

Deux études collaboratives ont été organisées. Dans le cadre de la première, effectuée par un autre groupe de laboratoires en 1994, les analyses ont porté sur les échantillons de deux prémélanges (O 100 et A 100) et sur trois échantillons d'aliments complémentaires pour volaille (L1, Z1 et K1). L'un des échantillons de prémélange a été 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 laboratoires avaient pour instruction d'analyser chacun des échantillons une seule fois ou en double (des informations plus détaillées sur la première étude collaborative ont été publiées dans le *Journal of AOAC International*, volume 77, n° 6, 1994, p. 1359-1361).

Les analyses effectuées dans le cadre de la deuxième étude collaborative ont porté sur trois aliments composés destinés à la volaille, dont deux aliments contenant du diclazuril à des concentrations de 0,9 mg/kg (MAT 1) et de 1,5 mg/kg (MAT 2) et un aliment témoin (MAT 3). Des informations détaillées sur la deuxième étude ont été publiées dans le rapport technique du JRC (en 2016) et dans le *Journal of AOAC International*, volume 102, n° 2, 2019, p. 646-652). Les résultats des deux études collaboratives figurent dans le tableau ci-après.

	Échantillon 1A 100	Échantillon 2O 100	Échantillon 3 L1	Échantillon 4 Z1	Échantillon 5 K1	Échan- tillon 6 MAT 1	Échan- tillon 7 MAT 2	Échan- tillon 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Moyenne (mg/ kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Teneur nomi- nale (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Référence (*)	1 ^{re} étude de 1 994	1 ^{re} étude de 1 994	1 ^{re} étude de 1 994	1 ^{re} étude de 1 994	1 ^{re} étude de 1 994	2 ^e étude de 2 015	2 ^e étude de 2 015	2 ^e étude de 2 015

L = nombre de laboratoires

n = nombre de valeurs individuelles

S_r = écart type de répétabilité

CV_r = coefficient de variation de la répétabilité

S_R = écart type de reproductibilité

CV_R = coefficient de variation de la reproductibilité

LQ = limite de quantification

(*) Première étude de 1994: *Journal of AOAC International*, volume 77, n° 6, 1994, p. 1359-1361; Deuxième étude de 2015: rapport technique du JRC «Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study», 2016.

▼ **M9****9. Remarques générales**

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

La méthode d'analyse peut être remplacée, au moins pour l'analyse du diclazuril dans les aliments composés à forte teneur en matières grasses (excédant 12 % dans ce cas), par d'autres méthodes basées sur la CLHP, par exemple une méthode basée sur la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM), à condition que la méthode de remplacement ait des caractéristiques équivalentes en matière de performances (taux de récupération, précision dans les conditions de répétabilité et de reproductibilité).

G. DOSAGE DU LASALOCIDE-SODIUM

Sel sodique de polyéther de l'acide monocarboxylique, produit par Streptomyces lasaliensis

Le lasalocide-sodium doit être dosé:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17299 «Aliments pour animaux — méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Recherche et dosage dans des aliments composés pour animaux des coccidiostatiques autorisés au taux d'additif et de contamination croisée à 1 % et 3 %, de coccidiostatiques non enregistrés et d'un antibiotique aux taux sub-additifs, par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)» ou
- par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse à l'aide d'un détecteur spectrofluorométrique (spectrométrie de fluorescence), conformément aux points 1 à 8.

1. Objet et champ d'application

La méthode permet de déterminer la teneur en lasalocide-sodium des aliments pour animaux. La limite de détection est de 5 mg/kg; la limite de quantification est de 10 mg/kg.

2. Principe

Le lasalocide-sodium est extrait d'échantillon par du méthanol acidifié et dosé par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse à l'aide d'un détecteur spectrofluorimétrique (spectrométrie de fluorescence).

3. Réactifs

3.1. Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).

3.2. Acide orthophosphorique, p (p/p) = 85 %.

3.3. Solution d'acide orthophosphorique, c = 20 %

Diluer 23,5 ml d'acide orthophosphorique (point 3.2) dans de l'eau et ajuster à 100 ml.

3.4. 6-méthyl-2-heptylamine (1,5-diméthylhexylamine), p (p/p) = 99 %.

3.5. Méthanol, de qualité CLHP.

3.6. Acide chlorhydrique, densité = 1,19 g/ml.

3.7. Solution tampon de phosphate, c = 0,01 mol/l

Dissoudre 1,36 g de KH_2PO_4 (point 3.1) dans 500 ml d'eau (point 3.11), ajouter 3,5 ml d'acide orthophosphorique (point 3.2) et 10,0 ml de 6-méthyl-2-heptylamine (point 3.4). Ajuster le pH à 4,0 à l'aide de la solution d'acide orthophosphorique (point 3.3), diluer à l'eau et ajuster à 1 000 ml (point 3.11).

▼ M9**3.8. Méthanol acidifié**

Transférer 5,0 ml d'acide chlorhydrique (point 3.6) dans une fiole jaugée de 1 000 ml, ajuster au trait de jauge avec du méthanol (point 3.5) et mélanger. Cette solution doit être préparée peu avant d'être utilisée.

3.9. Phase mobile pour CLHP, solution tampon de phosphate et méthanol 5 + 95 (V + V)

Mélanger 5 ml de solution tampon de phosphate (point 3.7) avec 95 ml de méthanol (point 3.5).

3.10. Substance étalon: lasalocide-sodium garanti pur, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (sel sodique de polyéther de l'acide monocarboxylique, produit par *Streptomyces lasaliensis*), E763.**3.10.1. Solution mère étalon de lasalocide-sodium, 500 µg/ml**

Peser, à 0,1 mg près, 50 mg de lasalocide-sodium (point 3.10) dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre dans du méthanol acidifié (point 3.8), ajuster au trait de jauge avec le même solvant et mélanger. Cette solution doit être préparée peu avant d'être utilisée.

3.10.2. Solution étalon intermédiaire de lasalocide-sodium, 50 µg/ml

Introduire à la pipette 10,0 ml de la solution mère de l'étalon (point 3.10.1) dans une fiole jaugée de 100 ml, ajuster au trait de jauge avec du méthanol acidifié (point 3.8) et mélanger. Cette solution doit être préparée peu avant d'être utilisée.

3.10.3. Solutions d'étalonnage

Transférer 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 et 10,0 ml de la solution étalon intermédiaire (point 3.10.2) dans une série de fioles jaugées de 50 ml. Ajuster au trait de jauge avec du méthanol acidifié (point 3.8) et mélanger. Ces solutions correspondent respectivement à 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 et 10,0 µg de lasalocide-sodium par ml. Ces solutions doivent être préparées peu avant d'être utilisées.

3.11. Eau, de qualité CLHP.**4. Appareillage****4.1. Bain ultrasonique (ou bain-marie vibrant) avec réglage de température.****4.2. Filtres à membrane, 0,45 µm.****4.3. Équipement CLHP avec système à injection permettant d'injecter des volumes de 20 µl.****4.3.1. Colonne de chromatographie liquide, 125 mm × 4 mm, en phase inverse C_{18} , particules de 5 µm, ou équivalent.****4.3.2. Spectrofluorimètre avec correction des longueurs d'onde variables (solvitation et émission).****5. Mode opératoire****5.1. Généralités****5.1.1. Aliment blanc**

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

▼ **M9**

5.1.2. Test de récupération

Effectuer un test de récupération par analyse de l'aliment blanc auquel a été ajoutée une quantité de lasalocide-sodium pareille 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 (point 3.10.1) dans une fiole erlenmeyer de 250 ml et concentrer la solution par évaporation à environ 0,5 ml. Ajouter 50 g de l'aliment blanc, mélanger soigneusement et laisser reposer 10 minutes tout en mélangeant de nouveau plusieurs fois avant de procéder à l'extraction (point 5.2).

En l'absence d'aliment blanc de même type que celui de l'échantillon (voir le point 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 par ajout d'une quantité de lasalocide-sodium 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 pour animaux

Peser, à 0,01 g près, de 5 g à 10 g de l'échantillon dans une fiole erlenmeyer de 250 ml avec bouchon. Y introduire à la pipette 100,0 ml de méthanol acidifié (point 3.8). Boucher légèrement et agiter pour obtenir une dispersion. Placer la fiole dans le bain ultrasonique (point 4.1) à 40 °C environ pendant 20 minutes, l'enlever et laisser refroidir à température ambiante. Laisser reposer pendant une heure environ, jusqu'à décantation des matières en suspension, et filtrer une partie aliquote sur un filtre à membrane de 0,45 µm (point 4.2) dans un récipient approprié. Procéder au dosage par CLHP (point 5.3).

5.2.2. Prémélanges

Peser, à 0,001 g près, 2 g de prémélange non broyé dans une fiole jaugée de 250 ml. Ajouter 100,0 ml de méthanol acidifié (point 3.8) et agiter pour obtenir une dispersion. Placer la fiole dans le bain ultrasonique (point 4.1) à 40 °C environ pendant 20 minutes, l'enlever et laisser refroidir à température ambiante. Diluer jusqu'au trait de jauge avec du méthanol acidifié (point 3.8) et mélanger soigneusement. Laisser reposer pendant une heure, jusqu'à décantation des matières en suspension et filtrer une partie aliquote sur un filtre à membrane de 0,45 µm (point 4.2). Diluer un volume adéquat de filtrat clair avec du méthanol acidifié (point 3.8), de manière à obtenir une solution d'essai finale contenant environ 4 µg/ml de lasalocide-sodium. Procéder au dosage par CLHP (point 5.3).

5.3. *Dosage par 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 de chromatographie liquide (point 4.3.1):	125 mm × 4 mm, en phase inverse, C ₁₈ , particules de 5 µm, ou équivalent
---	--

Phase mobile (point 3.9):	Mélange de solution tampon dephosphate (point 3.7) et de méthanol (point 3.5), 5 + 95 (V+V)
---------------------------	---

Débit:	1,2 ml/min
--------	------------

Longueurs d'onde de détection:	Sollicitation: 310 nm
--------------------------------	-----------------------

	Émission: 419 nm
--	------------------

Volume d'injection:	20 µl
---------------------	-------

▼ M9

Contrôler la stabilité du système chromatographique, en injectant plusieurs fois la solution d'étalonnage (point 3.10.3) à 4,0 µg/ml, jusqu'à l'obtention de surfaces ou de hauteurs de pics et de temps de rétention constants.

5.3.2. Courbe d'étalonnage

Injecter chaque solution d'étalonnage (point 3.10.3) 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 d'échantillon

Injecter l'extrait d'échantillon (obtenu conformément au point 5.2.1 ou 5.2.2) plusieurs fois en utilisant le même volume que celui retenu pour la solution d'étalonnage et déterminer les hauteurs (surfaces) moyennes des pics du lasalocide-sodium.

6. Calcul des résultats

À partir de la hauteur (surface) moyenne des pics du lasalocide-sodium de la solution d'échantillon (point 5.3.3), déterminer la concentration de lasalocide-sodium (µg/ml) par référence à la courbe d'étalonnage.

6.1. Aliments pour animaux

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

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

où:

c = concentration de lasalocide-sodium dans la solution d'échantillon (point 5.2.1) en µg/ml,

V_1 = volume de l'extrait d'échantillon selon le point 5.2.1 en ml (soit 100),

m = poids de la prise d'essai, en grammes.

6.2. Prémélanges

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

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

où:

c = concentration de lasalocide-sodium dans la solution d'échantillon (point 5.2.2) en µg/ml,

V_2 = volume de l'extrait d'échantillon selon le point 5.2.2 en ml (soit 250),

f = facteur de dilution selon le point 5.2.2,

m = poids de la prise d'essai, en grammes.

▼M9**7. Validation des résultats****7.1. Identité**

Les méthodes fondées sur la spectrofluorimétrie sont moins sujettes aux interférences que celles qui utilisent un détecteur UV. L'identité de l'analyte peut être confirmée par cochromatographie.

7.1.1. Cochromatographie

Un extrait d'échantillon (point 5.2.1 ou 5.2.2) est additionné d'une quantité appropriée de la solution d'étalonnage (point 3.10.3). La quantité de lasalocide-sodium ajoutée doit être semblable à la quantité de lasalocide-sodium constatée dans l'extrait d'échantillon. Seule la hauteur du pic du lasalocide-sodium 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 $\pm 10\%$ de la largeur initiale du pic de lasalocide-sodium de l'extrait d'échantillon non supplémenté.

7.2. Répétabilité

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

- 15 % du résultat supérieur pour les teneurs en lasalocide-sodium comprises entre 30 mg/kg et 100 mg/kg,
- 15 mg/kg pour les teneurs en lasalocide-sodium comprises entre 100 mg/kg et 200 mg/kg,
- 7,5 % du résultat supérieur pour les teneurs en lasalocide-sodium supérieures à 200 mg/kg.

7.3. Récupération

Pour les échantillons d'aliments pour animaux (blancs) supplémentés, la récupération doit être de 80 % au minimum. Pour les échantillons de prémélanges supplémentés, la récupération doit être de 90 % au minimum.

8. Résultats d'une étude collaborative

Dans le cadre d'une étude collaborative (*), 2 prémélanges (échantillons 1 et 2) et 5 aliments (échantillons 3-7) ont été analysés par 12 laboratoires. Pour chaque échantillon, les analyses ont été effectuées en double. Les résultats de l'étude figurent dans le tableau ci-après:

	Échant. 1 Prémél. poulets	Échant. 2 Prémél. dindes	Échant. 3 Granulés dindes	Échant. 4 Miettes poulets	Échant. 5 Aliment dindes	Échant. 6 Aliment volaille A	Échant. 7 Aliment volaille B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Moyenne [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70

▼ M9

	Échant. 1 Prémél. poulets	Échant. 2 Prémél. dindes	Échant. 3 Granulés dindes	Échant. 4 Miettes poulets	Échant. 5 Aliment dindes	Échant. 6 Aliment volaille A	Échant. 7 Aliment volaille B
Teneur nomi- nale [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (+)	35 (+)

L = nombre de laboratoires

n = nombre de valeurs individuelles

s_r = écart type de répétabilité

s_R = écart type de reproductibilité

CV_r = coefficient de variation de la répétabilité (%)

CV_R = coefficient de variation de la reproductibilité (%)

(*) *Analyst*, 1995, 120, 2175-2180.

(**) Teneur déclarée par le fabricant.

(+) Aliment préparé au laboratoire.

H. DOSAGE DU CHLORHYDRATE D'AMPROLIUM

Chlorhydrate du chlorure de 1-[(4-amino-2-propyl-5-pirimidinyl)méthyl]-2-méthylpyridinium

1. Objet et champ d'application

La méthode permet de déterminer la teneur en amprolium des aliments pour animaux. La limite de détection est de 1 mg/kg et la limite de quantification de 5 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 en phase liquide à 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, $c = 0,1$ mol/l

Dissoudre 13,80 g de phosphate monosodique monohydraté dans de l'eau (point 3.3) dans une fiole jaugée de 1 000 ml, ajuster au trait de jauge avec de l'eau (point 3.3) et mélanger.

3.5. Solution de perchlorate de sodium, $c = 1,6$ mol/l

Dissoudre 224,74 g de perchlorate de sodium monohydraté dans de l'eau (point 3.3) dans une fiole jaugée de 1 000 ml, ajuster au trait de jauge avec de l'eau (point 3.3) et mélanger.

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

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

3.7. Substance étalon: amprolium pur, chlorure de 1-[(4-amino-2-propyl-5-pirimidinyl)méthyl]-2-méthylpyridinium, E 750 (voir le point 9.2).

▼M9**3.7.1. Solution mère de l'étalon d'amprolium, 500 µg/ml**

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

3.7.2. Solution étalon intermédiaire d'amprolium, 50 µg/ml

Transférer, au moyen d'une pipette, 5,0 ml de la solution mère de l'étalon (point 3.7.1) dans une fiole jaugée de 50 ml, ajuster au trait de jauge avec le solvant d'extraction (point 3.8) et mélanger. À une température $\leq 4\text{ °C}$, 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 (point 3.7.2) dans une série de fioles jaugées de 50 ml. Ajuster au trait de jauge avec la phase mobile (point 3.6) et mélanger. Ces solutions correspondent respectivement à 0,5, 1,0 et 2,0 µg d'amprolium par ml. Ces solutions doivent être préparées peu avant d'être utilisées.

3.8. Solvant d'extraction

Mélange de méthanol (point 3.1) et d'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 5 ou 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 en PTFE de 0,45 µm.****4.3. Filtre à membrane de 0,22 µm.****4.4. Bain ultrasonique.****4.5. Agitateur mécanique ou magnétique.****5. Mode opératoire****5.1. Généralités****5.1.1. Aliment blanc**

Pour procéder au test de récupération (point 5.1.2), analyser un aliment blanc pour vérifier l'absence d'amprolium ou de substances interférentes. L'aliment blanc 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 blanc auquel a été ajoutée une quantité d'amprolium pareille 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 (point 3.7.1) dans une fiole erlenmeyer de 250 ml et concentrer la solution par évaporation à environ 0,5 ml. Ajouter 50 g de l'aliment blanc, mélanger soigneusement et attendre 10 minutes tout en mélangeant de nouveau plusieurs fois avant de procéder à l'extraction (point 5.2).

▼ **M9**

En l'absence d'aliment blanc de même type que celui de l'échantillon (voir le point 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 pour animaux

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

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

Peser, à 0,001 g près, de 1 à 4 g du prémélange selon sa teneur en amprolium dans une fiole erlenmeyer de 500 ml et ajouter 200 ml de solvant d'extraction (point 3.8). Placer la fiole dans le bain ultrasonique (point 4.4) pendant 15 minutes. Enlever la fiole du bain ultrasonique et la soumettre pendant 1 heure à une agitation mécanique ou magnétique (point 4.5). Diluer une partie aliquote de l'extrait avec la phase mobile (point 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 (point 4.2). Procéder au dosage par CLHP (point 5.3).

5.3. *Dosage par 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 de chromatographie liquide (point 4.1.1):	125 mm x 4 mm avec échange de cations avec Nucleosil 10 SA, 5 ou 10 µm, ou équivalent
---	---

Phase mobile (point 3.6):	Mélange d'acétonitrile (point 3.2), de solution de phosphate monosodique (point 3.4) et de solution de perchlorate de sodium (point 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 (point 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 (point 3.7.3) plusieurs fois et déterminer les hauteurs (surfaces) moyennes des pics pour chaque concentration. Tracer la courbe d'étalonnage en portant les hauteurs (surfaces) moyennes des pics des solutions d'étalonnage en ordonnée et les concentrations correspondantes en µg/ml en abscisse.

▼M9**5.3.3. Solution d'échantillon**

Injecter l'extrait d'échantillon (point 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. Calcul des résultats

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

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

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

où:

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

c = concentration d'amprolium dans l'extrait d'échantillon (point 5.2) en µg/ml,

f = facteur de dilution selon le point 5.2,

m = poids de la prise d'essai, en grammes.

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 (point 5.2) et de la solution d'étalonnage (point 3.7.3) contenant 2,0 µg/ml.

7.1.1. Cochromatographie

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

7.1.2. Détection par barrettes de diodes

Évaluer les résultats conformément aux critères suivants:

- a) les longueurs d'onde d'absorption maximale des spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrées au sommet des pics sur le chromatogramme, doivent être identiques, dans une marge déterminée par le pouvoir de résolution du système de détection. Dans le cadre d'une détection par barrettes de diodes, elle est généralement de ± 2 nm;
- b) entre 210 et 320 nm, les spectres de l'échantillon et de l'étalon enregistrés au sommet du pic sur le 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 que, en aucun point, l'écart observé entre les deux spectres ne dépasse 15 % de l'absorbance de l'analyte étalon;

▼ M9

c) entre 210 et 320 nm, les spectres de la courbe ascendante, du sommet et de la courbe descendante du pic produits par l'extrait d'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 que, en aucun point, l'écart observé entre les spectres ne dépasse 15 % de l'absorbance du spectre au sommet 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 peut dépasser:

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

7.3. Récupération

Pour un échantillon (blanc) supplémenté, la récupération doit être de 90 % au moins.

8. Résultats d'une étude collaborative

Dans le cadre d'une étude collaborative, 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 dans le tableau ci-après:

	Échantillon 1 (aliment blanc)	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 répétabilité

CV_r: coefficient de variation de la répétabilité

s_R: écart type de reproductibilité

CV_R: coefficient de variation de la reproductibilité

▼ M9**9. Observations**

- 9.1. Si l'échantillon contient de la thiamine, le pic de la thiamine dans le chromatogramme apparaît peu avant le pic de l'amprolium. 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 (point 4.1.1) utilisée dans cette méthode, remplacer jusqu'à 50 % de la portion d'acétonitrile de la phase mobile (point 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 à 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.

I. DOSAGE DE LA NARASINE

La narasine doit être dosée:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17299 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Recherche et dosage dans des aliments composés pour animaux des coccidiostatiques autorisés au taux d'additif et de contamination croisée à 1 % et 3 %, de coccidiostatiques non enregistrés et d'un antibiotique aux taux sub-additifs, par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)» ou
- selon la méthode établie par la norme EN ISO 14183 «Aliments des animaux — Détermination des teneurs en monensine, narasine et salinomycine — Méthode par chromatographie liquide utilisant la dérivation post-colonne».

J. DOSAGE DE LA NICARBAZINE

La nicarbazine doit être dosée:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17299 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Recherche et dosage dans des aliments composés pour animaux des coccidiostatiques autorisés au taux d'additif et de contamination croisée à 1 % et 3 %, de coccidiostatiques non enregistrés et d'un antibiotique aux taux sub-additifs, par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)» ou
- selon la méthode établie par la norme EN 15782 «Aliments des animaux — Détermination de la nicarbazine — Méthode de chromatographie liquide hautes performances».

K. DOSAGE DU DÉCOQUINATE

Le décoquinate doit être dosé:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17299 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Recherche et dosage dans des aliments composés pour animaux des coccidiostatiques autorisés au taux d'additif et de contamination croisée à 1 % et 3 %, de coccidiostatiques non enregistrés et d'un antibiotique aux taux sub-additifs, par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)» ou
- selon la méthode établie par la norme EN 16162 «Aliments des animaux — Dosage du décoquinate par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec détection par fluorescence».

▼ **M9****L. DOSAGE DE LA MONENSINE**

La monensine doit être dosée:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17299 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Recherche et dosage dans des aliments composés pour animaux des coccidiostatiques autorisés au taux d'additif et de contamination croisée à 1 % et 3 %, de coccidiostatiques non enregistrés et d'un antibiotique aux taux sub-additifs, par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)» ou
- selon la méthode établie par la norme EN ISO 14183 «Aliments des animaux — Détermination des teneurs en monensine, narasine et salinomycine — Méthode par chromatographie liquide utilisant la dérivation post-colonne».

M. DOSAGE DE LA SALINOMYCINE

La salinomycine doit être dosée:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17299 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Recherche et dosage dans des aliments composés pour animaux des coccidiostatiques autorisés au taux d'additif et de contamination croisée à 1 % et 3 %, de coccidiostatiques non enregistrés et d'un antibiotique aux taux sub-additifs, par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)» ou
- selon la méthode établie par la norme EN ISO 14183 «Aliments des animaux — Détermination des teneurs en monensine, narasine et salinomycine — Méthode par chromatographie liquide utilisant la dérivation post-colonne».

N. DOSAGE DE LA SEMDURAMICINE

La semduramicine doit être dosée:

- selon la méthode d'analyse établie par la norme EN 17299 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Recherche et dosage dans des aliments composés pour animaux des coccidiostatiques autorisés au taux d'additif et de contamination croisée à 1 % et 3 %, de coccidiostatiques non enregistrés et d'un antibiotique aux taux sub-additifs, par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)» ou
- selon la méthode établie par la norme EN ISO 16158 «Aliments des animaux — Dosage de la semduramicine — Chromatographie liquide utilisant une approche analytique en arbre».

O. NORMES EN

Les normes EN énumérées ci-après sont à prendre en considération aux fins de l'application de l'article 34, paragraphe 2, point a), du règlement (UE) 2017/625:

EN ISO 30024 «Aliments des animaux — Détermination de l'activité phytasique»

EN 17050 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage de l'iode dans les aliments pour animaux par spectrométrie de masse à plasma induit par haute fréquence (ICP-MS)»

EN 17550 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination de la teneur en caroténoïdes des aliments composés et des prémélanges pour animaux par chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV (CLHP-UV)»

EN 15784 «Aliments des animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détection et dénombrement des souches de *Bacillus* spp. utilisées comme additifs pour l'alimentation animale»

▼ M9

EN 15785 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Isolement et dénombrement du *Bifidobacterium* spp.»

EN 15786 «Aliments des animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détection et dénombrement des souches de *Pediococcus* spp. utilisées comme additifs pour l'alimentation animale»

EN 15787 «Aliments des animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détection et dénombrement des souches de *Lactobacillus* spp. utilisées comme additifs pour l'alimentation animale»

EN 15788 «Aliments des animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détection et dénombrement des souches de *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. utilisées comme additifs pour l'alimentation animale»

EN 15789 «Aliments des animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détection et dénombrement des souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées comme additifs pour l'alimentation animale»

EN 15510 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination des teneurs en calcium, sodium, phosphore, magnésium, potassium, fer, zinc, cuivre, manganèse, cobalt, molybdène et plomb par ICP-AES» (pour l'analyse du cobalt et du molybdène en tant qu'additifs pour l'alimentation animale)

EN 15621 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage du calcium, du sodium, du phosphore, du magnésium, du potassium, du soufre, du fer, du zinc, du cuivre, du manganèse et du cobalt après digestion sous pression par ICP-AES» (pour l'analyse du cobalt en tant qu'additif pour l'alimentation animale)

EN 16159 «Aliments pour animaux — Dosage du sélénium par spectrométrie d'absorption atomique par génération d'hydrures (SAAGH) après digestion par micro-ondes (extraction avec de l'acide nitrique à 65 % et du peroxyde d'hydrogène à 30 %)» (pour l'analyse du sélénium en tant qu'additif pour l'alimentation animale)

EN 17053 «Aliments pour animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage par ICP-MS (multiméthode) des éléments traces, métaux lourds et autres éléments inorganiques présents dans les aliments» (pour l'analyse du cobalt, du molybdène et du sélénium en tant qu'additifs pour l'alimentation animale).

▼ M9

ANNEXE V

MÉTHODES D'ANALYSE RELATIVES AU CONTRÔLE DE
SUBSTANCES INDÉSIRABLES DANS LES ALIMENTS POUR
ANIMAUXA. DÉTERMINATION DES TENEURS EN DIOXINES (PCDD/PCDF) ET
EN PCB

CHAPITRE I

MÉTHODES DE PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS ET
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ANALYSE

1. Champ d'application et définitions

Les échantillons destinés au contrôle officiel des teneurs en dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD), en dibenzofuranes polychlorés (PCDF), en polychlorobiphényles (PCB) ⁽¹⁾ de type dioxine et en PCB autres que ceux de type dioxine des aliments pour animaux sont prélevés conformément aux dispositions de l'annexe I. Les exigences quantitatives concernant le contrôle des substances ou des produits répartis uniformément dans les aliments pour animaux prévues au point 5.1. de l'annexe I doivent être appliquées. Les échantillons globaux ainsi obtenus sont considérés comme représentatifs des lots ou sous-lots sur lesquels ils sont prélevés. Le respect des teneurs maximales fixées dans la directive 2002/32/CE est établi sur la base des teneurs déterminées dans les échantillons de laboratoire.

⁽¹⁾ Tableau des facteurs d'équivalence toxique (TEF) pour les PCDD, PCDF et PCB de type dioxine: TEF-OMS pour l'évaluation des risques pour l'homme, fondés sur les conclusions de la réunion des experts du Programme international sur la sécurité des substances chimiques (PISSC) de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), qui s'est tenue à Genève en juin 2005 [Martin van den Berg et al., «The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds», *Toxicological Sciences*, 93(2), 223-241 (2006)].

Congénère	Valeur TEF	Congénère	Valeur TEF
Dibenzo-p-dioxines («PCDD») et Dibenzo-p-furanes («PCDF»)		PCB «de type dioxine» PCB non-ortho + PCB mono-ortho	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB non ortho	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	PCB mono ortho	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Abréviations utilisées: «T» = tétra; «Pe» = penta; «HX» = hexa; «HP» = hepta; «O» = octa; «CDD» = chlorodibenzodioxine; «CDF» = chlorodibenzofurane; «CB» = chlorobiphényle.

▼ **M9**

Aux fins de la présente partie, les définitions figurant à l'annexe I du règlement d'exécution (UE) 2021/808 de la Commission ⁽²⁾ s'appliquent.

Outre ces définitions, les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente partie:

«méthodes de dépistage»: méthodes servant à sélectionner les échantillons dont les teneurs en PCDD, PCDF et PCB de type dioxine dépassent les teneurs maximales ou les seuils d'intervention. Elles offrent une grande capacité de traitement d'échantillons à la fois efficace et économique et augmentent la probabilité de découvrir de nouveaux cas d'exposition élevée susceptibles de mettre la santé des consommateurs en péril. Les méthodes de dépistage sont fondées sur des méthodes de bioanalyse ou sur des méthodes CG-SM. Les résultats des échantillons dépassant la valeur seuil utilisée aux fins du contrôle du respect de la teneur maximale, sont vérifiés; à cette fin, l'échantillon initial est soumis à une nouvelle analyse complète, réalisée au moyen d'une méthode de confirmation;

«méthodes de confirmation»: méthodes qui fournissent des informations complètes ou complémentaires permettant l'identification et la quantification univoque des PCDD, PCDF et des PCB de type dioxine à la teneur maximale ou, en cas de besoin, au seuil d'intervention. Ces méthodes recourent à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (CG-SMHR) ou à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CG-SM/SM).

2. Conformité du lot ou sous-lot avec la teneur maximale

2.1. Spécifications relatives aux PCB autres que ceux de type dioxine

Le lot ou sous-lot est conforme à la teneur maximale si le résultat d'analyse pour la somme des PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 et PCB 180 (ci-après les «PCB autres que ceux de type dioxine») ne dépasse pas la teneur maximale fixée dans la directive 2002/32/CE, compte tenu de l'incertitude de mesure élargie ⁽³⁾. Le lot ou sous-lot n'est pas conforme à la teneur maximale fixée dans la directive 2002/32/CE si la moyenne des deux résultats d'analyse supérieurs ⁽⁴⁾ obtenus lors d'une double analyse ⁽⁵⁾, dépasse la teneur maximale avec une quasi-certitude, compte tenu de l'incertitude de mesure élargie; la concentration analysée sert ainsi, après déduction de l'incertitude de mesure élargie, à évaluer la conformité.

⁽²⁾ Règlement d'exécution (UE) 2021/808 de la Commission du 22 mars 2021 concernant les performances des méthodes d'analyse des résidus de substances pharmacologiquement actives utilisées chez les animaux producteurs d'aliments et l'interprétation des résultats ainsi que les méthodes à employer pour l'échantillonnage et abrogeant les décisions 2002/657/CE et 98/179/CE (JO L 180 du 21.5.2021, p. 84).

⁽³⁾ Les principes énoncés dans le document «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/PCDF and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf) doivent être suivis lorsqu'ils sont applicables.

⁽⁴⁾ L'«estimation supérieure» est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié égale à la limite de quantification. L'«estimation inférieure» est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié égale à zéro. L'«estimation intermédiaire» est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié égale à la moitié de la limite de quantification.

⁽⁵⁾ La double analyse est l'analyse séparée des analytes visés au moyen d'une deuxième partie aliquote du même échantillon homogénéisé. En général, les exigences en matière de double analyse prévues à l'annexe II, chapitre C, point 3, s'appliquent. Néanmoins, pour les méthodes qui prévoient des étalons internes marqués au ¹³C pour les analytes considérés, la double analyse n'est nécessaire que si le résultat de la première détermination n'est pas conforme. La double analyse est nécessaire pour exclure la possibilité d'une contamination croisée interne ou un mélange accidentel des échantillons. Si l'analyse est effectuée lors d'une contamination, la confirmation par double analyse peut être omise lorsque la traçabilité permet d'établir le lien entre les échantillons prélevés en vue de l'analyse et le cas de contamination et lorsque la teneur constatée est considérablement supérieure à la teneur maximale.

▼ **M9**

L'incertitude de mesure élargie est calculée au moyen d'un facteur d'élargissement de 2, qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %. Un lot ou sous-lot est non conforme si la moyenne des valeurs mesurées, diminuée de l'incertitude élargie de la moyenne, est supérieure à la teneur maximale fixée.

Les règles énoncées aux alinéas précédents du présent point s'appliquent aux résultats d'analyse des échantillons destinés au contrôle officiel. En cas d'analyse à des fins d'obtention de l'avis d'un deuxième expert ou d'arbitrage, les règles nationales s'appliquent.

2.2. *Spécifications relatives aux PCDD/PCDF et aux PCB de type dioxine*

Le lot ou sous-lot est conforme à la teneur maximale si le résultat d'une seule analyse:

- effectuée selon une méthode de dépistage avec un taux de faux conformes inférieur à 5 %, indique que la teneur ne dépasse pas les limites maximales respectives fixées pour les PCDD/PCDF et la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine dans la directive 2002/32/CE,
- effectuée selon une méthode de confirmation, ne dépasse pas les teneurs maximales respectives fixées pour les PCDD/PCDF et la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine dans la directive 2002/32/CE, compte tenu de l'incertitude de mesure élargie.

Pour les analyses de dépistage, une valeur seuil doit être établie pour déterminer la conformité aux teneurs maximales respectives fixées pour les PCDD/PCDF ou pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine.

Le lot ou sous-lot n'est pas conforme à la teneur maximale fixée dans la directive 2002/32/CE si la moyenne des deux résultats d'analyse supérieurs ⁽⁶⁾ obtenus lors d'une double analyse ⁽⁷⁾ à l'aide d'une méthode de confirmation, dépasse la teneur maximale avec une quasi-certitude, compte tenu de l'incertitude de mesure élargie; la concentration analysée sert ainsi, après déduction de l'incertitude de mesure élargie, à évaluer la conformité.

L'incertitude de mesure élargie est calculée au moyen d'un facteur d'élargissement de 2, qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %. Un lot ou sous-lot est non conforme si la moyenne des valeurs mesurées, diminuée de l'incertitude élargie de la moyenne, est supérieure à la teneur maximale fixée.

⁽⁶⁾ L'«estimation supérieure» est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié à l'équivalent toxique (TEQ) égale à la limite de quantification. L'«estimation inférieure» est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié au TEQ égale à zéro. L'«estimation intermédiaire» est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié au TEQ égale à la moitié de la limite de quantification.

⁽⁷⁾ En général, les exigences en matière de double analyse prévues à l'annexe II, chapitre C, point 3, s'appliquent. Néanmoins, pour les méthodes de confirmation qui prévoient des étalons internes marqués au ¹³C pour les analytes considérés, la double analyse n'est nécessaire que si le résultat de la première détermination n'est pas conforme. La double analyse est nécessaire pour exclure la possibilité d'une contamination croisée interne ou un mélange accidentel des échantillons. Si l'analyse est effectuée lors d'une contamination, la confirmation par double analyse peut être omise lorsque la traçabilité permet d'établir le lien entre les échantillons prélevés en vue de l'analyse et le cas de contamination et lorsque la teneur constatée est considérablement supérieure à la teneur maximale.

▼M9

La somme des estimations des incertitudes élargies des résultats d'analyse distincts concernant les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine doit être utilisée pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine.

Les règles énoncées aux alinéas précédents du présent point s'appliquent aux résultats d'analyse des échantillons destinés au contrôle officiel. En cas d'analyse à des fins de recours ou d'arbitrage, les règles nationales s'appliquent.

3. **Résultats dépassant les seuils d'intervention prévus à l'annexe II de la directive 2002/32/CE**

Les seuils d'intervention sont utilisés aux fins de la sélection d'échantillons dans les cas où il est nécessaire de déterminer une source de contamination et de prendre des mesures de réduction ou d'élimination de celle-ci. Les méthodes de dépistage établissent des valeurs seuil appropriées aux fins de la sélection de ces échantillons. S'il est nécessaire d'accomplir des efforts considérables pour déterminer une source et pour réduire ou éliminer la contamination, il convient de confirmer le dépassement des seuils d'intervention en réalisant une double analyse au moyen d'une méthode de confirmation et en tenant compte de l'incertitude de mesure élargie ⁽⁸⁾.

CHAPITRE II

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET PRESCRIPTIONS APPLICABLES AUX MÉTHODES D'ANALYSE À UTILISER POUR LE CONTRÔLE OFFICIEL DES TENEURS EN DIOXINES (PCDD/PCDF) ET EN PCB DE TYPE DIOXINE DES ALIMENTS POUR ANIMAUX

1. **Champ d'application**

Les prescriptions du présent chapitre s'appliquent aux analyses d'aliments pour animaux effectuées aux fins du contrôle officiel des teneurs en PCDD/PCDF substitués en 2,3,7,8 et en PCB de type dioxine, ainsi qu'à d'autres fins réglementaires, y compris les contrôles effectués par l'exploitant du secteur de l'alimentation animale pour veiller au respect des dispositions du règlement (CE) n° 183/2005 du Parlement européen et du Conseil ⁽⁹⁾.

La présence de PCDD/PCDF et de PCB de type dioxine dans les aliments pour animaux peut être contrôlée au moyen des deux types de méthodes d'analyse décrites ci-après.

a) *Méthodes de dépistage*

Les méthodes de dépistage servent à sélectionner les échantillons dont les teneurs en PCDD/PCDF et en PCB de type dioxine dépassent les teneurs maximales ou les seuils d'intervention. Elles doivent offrir une grande capacité de traitement d'échantillons à la fois efficace et économique et augmenter la probabilité de découvrir de nouveaux cas d'exposition élevée des consommateurs et de risques pour leur santé. Leur application doit permettre d'éviter les faux conformes. Elles peuvent comprendre des méthodes de bioanalyse et des méthodes de CG-SM.

Elles permettent de comparer le résultat d'une analyse avec une valeur seuil et de confirmer ou d'infirmer (réponse positive ou négative) l'éventuel dépassement de la teneur maximale ou du seuil d'intervention. La concentration de PCDD/PCDF et la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine dans les échantillons suspectés de non-conformité à la teneur maximale doivent être déterminées ou confirmées au moyen d'une méthode de confirmation.

En outre, les méthodes de dépistage peuvent donner une indication des teneurs en PCDD/PCDF et en PCB de type dioxine des échantillons. En cas d'application de méthodes bioanalytiques de dépistage, le résultat est exprimé en équivalents de bioanalyse (BEQ), alors qu'en

⁽⁸⁾ Les explications et les prescriptions concernant la double analyse applicable aux teneurs maximales figurant à la note de bas de page 5 valent également pour la mesure des seuils d'intervention.

⁽⁹⁾ Règlement (CE) n° 183/2005 du Parlement européen et du Conseil du 12 janvier 2005 établissant des exigences en matière d'hygiène des aliments pour animaux (JO L 35 du 8.2.2005, p. 1).

▼ **M9**

cas d'application de méthodes CG-SM physico-chimiques, il est exprimé en équivalents toxiques (TEQ). Les résultats numériques obtenus au moyen de méthodes de dépistage permettent de démontrer la conformité, la suspicion de non-conformité ou le dépassement des seuils d'intervention et donnent une indication sur la plage des teneurs en cas de suivi au moyen de méthodes de confirmation. Ils ne permettent pas, par exemple, d'évaluer les niveaux de bruit de fond, d'estimer l'ingestion, de suivre l'évolution chronologique des teneurs ou de réévaluer les seuils d'intervention et les teneurs maximales.

b) *Méthodes de confirmation*

Les méthodes de confirmation permettent l'identification et la quantification univoques des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine présents dans un échantillon et de fournir des informations complètes à l'échelle des congénères individuels. Par conséquent, ces méthodes permettent de contrôler les teneurs maximales et les seuils d'intervention et de confirmer les résultats obtenus au moyen des méthodes de dépistage. En outre, les résultats peuvent servir à d'autres fins, telles que la détermination des faibles niveaux de bruit de fond dans le contrôle des aliments pour animaux, le suivi de l'évolution chronologique, l'évaluation de l'exposition et la création d'une base de données en vue de la réévaluation éventuelle des seuils d'intervention et des teneurs maximales. Ils sont aussi importants pour établir les profils de congénères aux fins de la détermination de la source d'une contamination éventuelle. Ces méthodes reposent sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (CG-SMHR). La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CG-SM/SM) peut également être utilisée pour confirmer la conformité ou la non-conformité à la teneur maximale.

2. **Contexte**

Pour le calcul des concentrations d'équivalents toxiques (TEQ), les concentrations des différentes substances dans un échantillon donné sont multipliées par leurs facteurs d'équivalence toxique (TEF) respectifs (voir note de bas de page 1 au chapitre I), puis elles sont additionnées de façon à donner la concentration totale de composés de type dioxine, exprimée en TEQ.

Aux fins de la présente partie A, la limite de quantification spécifique acceptée d'un congénère est la teneur minimale en analyte mesurable avec une certitude statistique raisonnable, satisfaisant aux critères d'identification décrits dans des normes internationalement reconnues, telles que la norme EN 16215:2012 (Aliments des animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage des dioxines, des PCB de type dioxine et des PCB indicateurs par GC-HRMS) et/ou les méthodes EPA 1613 et 1668 révisées.

La limite de quantification d'un congénère peut être:

- a) la concentration d'un analyte dans l'extrait d'un échantillon qui produit une réponse instrumentale à deux ions suivis avec un rapport S/B (signal/bruit) de 3:1 pour le signal de données brut le moins intense; ou
- b) si, pour des raisons techniques, le calcul du rapport signal/bruit ne donne pas des résultats fiables, le point de concentration minimal sur une courbe d'étalonnage qui donne un écart acceptable ($\leq 30\%$) et cohérent (mesuré au moins au début et à la fin d'une série analytique d'échantillons) par rapport au facteur de réponse relatif moyen calculé pour tous les points de la courbe d'étalonnage de chaque série d'échantillons. La limite de quantification est calculée à partir du point de concentration le plus bas, compte tenu du taux de récupération des étalons internes et du prélèvement d'échantillons.

▼ **M9**

Les méthodes bioanalytiques de dépistage ne donnent pas de résultats à l'échelle du congénère mais une simple indication⁽¹⁰⁾ de la valeur TEQ, exprimée en équivalents de bioanalyse (BEQ) compte tenu du fait qu'il est possible que tous les composés présents dans un extrait d'échantillon produisant une réponse lors de l'essai ne remplissent pas l'ensemble des conditions du principe du TEQ.

Les méthodes de dépistage et de confirmation ne peuvent être appliquées aux fins du contrôle d'une matrice donnée que si les méthodes sont suffisamment sensibles pour détecter les teneurs de manière fiable au niveau du seuil d'intervention ou de la teneur maximale.

3. **Prescriptions d'assurance qualité**

- 3.1. Des mesures doivent être prises pour que soit évitée toute contamination croisée à chaque étape de la procédure d'échantillonnage et d'analyse.
- 3.2. Les échantillons doivent être conservés et transportés dans des récipients en verre, en aluminium, en polypropylène ou en polyéthylène adaptés à la conservation, préservant les teneurs en PCDD/PCDF et en PCB de type dioxine dans les échantillons de la moindre influence. Toute trace de poussière de papier doit être enlevée du contenant de l'échantillon.
- 3.3. La conservation et le transport de l'échantillon doivent être effectués d'une façon telle que l'intégrité de l'échantillon d'aliment pour animaux est préservée.
- 3.4. Si nécessaire, chaque échantillon pour laboratoire doit être broyé finement et soigneusement mélangé, selon une méthode garantissant une homogénéisation complète (par exemple de façon à pouvoir passer au travers d'un tamis à mailles de 1 mm). Les échantillons doivent être séchés avant le broyage si leur teneur en humidité est trop élevée.
- 3.5. Il y a lieu de contrôler les réactifs, la verrerie et l'équipement en vue de détecter toute influence des résultats exprimés en TEQ ou en BEQ.
- 3.6. Un essai à blanc est réalisé, en suivant tout le procédé d'analyse, mais sans l'échantillon.
- 3.7. Pour les méthodes de bioanalyse, l'ensemble de la verrerie et des solvants utilisés dans l'analyse doivent faire l'objet d'un dépistage de composés interférant avec la détection des composés cibles dans la plage de travail. La verrerie est rincée à l'aide de solvants ou chauffée à des températures permettant d'éliminer de sa surface les traces de PCDD/PCDF, de composés de type dioxine et de composés interférents.
- 3.8. La quantité de l'extrait doit être suffisamment élevée, de façon à répondre aux prescriptions en ce qui concerne une plage de travail suffisamment basse comprenant les concentrations des teneurs maximales ou du seuil d'intervention.
- 3.9. Les procédures spécifiques de préparation des échantillons utilisées pour les produits considérés doivent être conformes aux lignes directrices internationalement acceptées, à savoir les lignes directrices établies par la norme EN ISO 6498.

⁽¹⁰⁾ Les méthodes de bioanalyse ne sont pas propres aux congénères inclus dans le système des TEF. D'autres composés structurellement proches activant le récepteur aryl hydro-carbone (AhR) et susceptibles d'être présents dans l'extrait d'échantillon contribuent à la réponse générale. Aussi les résultats d'une bioanalyse ne sauraient-ils être une estimation et constituent plutôt une indication de la valeur TEQ dans l'échantillon.

▼ **M9****4. Prescriptions applicables aux laboratoires**

- 4.1. Conformément aux dispositions du règlement (UE) 2017/625, les laboratoires doivent être accrédités par un organisme habilité qui se conforme au guide ISO/IEC 58, de manière qu'ils appliquent les procédures d'assurance qualité à leurs analyses. Les laboratoires doivent être accrédités selon la norme EN ISO/IEC 17025. Les principes énoncés dans les directives techniques pour l'estimation de l'incertitude de mesure et les limites de quantification pour l'analyse des PCDD/PCDF et des PCB doivent être suivis ⁽¹⁾.
- 4.2. L'aptitude des laboratoires doit être prouvée par la participation continue et réussie à des études interlaboratoires sur le dosage des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine dans les matrices d'aliments pour animaux et les plages de concentration correspondantes.
- 4.3. Les laboratoires appliquant les méthodes de dépistage pour les contrôles de routine des échantillons coopèrent étroitement avec les laboratoires appliquant la méthode de confirmation, tant pour le contrôle qualité que pour la confirmation du résultat de l'analyse des échantillons suspects.

5. Prescriptions fondamentales applicables aux procédés d'analyse relatifs aux dioxines (PCDD/PCDF) et aux PCB de type dioxine**5.1. Sensibilité élevée et limite de quantification basse**

En ce qui concerne les PCDD/PCDF, étant donné la toxicité extrêmement élevée de certains de ces composés, les seuils de détection doivent être de l'ordre de quelques femtogrammes (10^{-15} g). Pour la plupart des congénères PCB, une limite de quantification de l'ordre du nanogramme (10^{-9} g) est déjà suffisante. Pour la mesure des congénères PCB de type dioxine plus toxiques (en particulier les congénères non ortho substitués), la limite inférieure de la plage de travail doit être sous le picogramme (10^{-12} g). Pour tous les autres congénères PCB, une limite de quantification de l'ordre du nanogramme (10^{-9} g) est suffisante.

5.2. Grande sélectivité (spécificité)

- 5.2.1. Il est nécessaire de distinguer les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine d'une multitude d'autres composés extraits simultanément de l'échantillon qui sont susceptibles d'interférer et peuvent être présents à des concentrations supérieures, jusqu'à plusieurs ordres de grandeur, à celles des analytes à doser. Pour les méthodes de CG-SM, il est nécessaire d'établir une distinction entre les congénères, notamment entre les congénères toxiques (par exemple, les dix-sept PCDD/PCDF substitués en 2,3,7,8 et les douze PCB de type dioxine) et les autres congénères.
- 5.2.2. Les méthodes de bioanalyse doivent permettre la détection des composés cibles en tant que somme des PCDD/PCDF et/ou des PCB de type dioxine. La purification des échantillons est destinée à éliminer les composés à l'origine de faux non conformes ou les composés susceptibles d'atténuer la réponse et de donner des faux conformes.

⁽¹⁾ «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf), «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf).

▼ **M9**

- 5.3. *Grande exactitude (justesse et fidélité, taux de récupération apparent du bioessai)*
- 5.3.1. Pour les méthodes de CG-SM, le dosage doit fournir une estimation juste de la concentration réelle dans un échantillon. Une grande exactitude est nécessaire pour empêcher que le résultat d'une analyse d'échantillon ne soit écarté en raison du manque de fiabilité de la valeur TEQ déterminée. L'exactitude est une expression de la *justesse* (la différence entre la valeur moyenne mesurée pour un analyte dans un matériau certifié et sa valeur certifiée, exprimée en pourcentage de cette valeur) et de la *fidélité* (RSD_R est l'écart type relatif calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de reproductibilité).
- 5.3.2. Pour les méthodes de bioanalyse, le taux de récupération apparent du bioessai doit être déterminé. Le taux de récupération apparent du bioessai désigne la valeur BEQ calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la TCDD ou du PCB 126 corrigée du blanc, puis divisée par la valeur TEQ déterminée par la méthode de confirmation. Elle vise à corriger des facteurs tels que la perte de PCDD/PCDF et de composés de type dioxine durant les phases d'extraction et de purification, la coextraction de composés qui augmentent ou atténuent la réponse (effets agonistes et antagonistes), la qualité de l'ajustement de la courbe ou les différences entre les valeurs TEF (facteur d'équivalence toxique) et REP (potentiel relatif). Le taux de récupération apparent du bioessai est calculé à partir d'échantillons de référence appropriés avec des profils de congénères représentatifs proches du niveau considéré.
- 5.4. *Validation dans la plage de la teneur maximale et mesures générales de contrôle qualité*
- 5.4.1. Les laboratoires doivent démontrer la validité de la méthode dans une certaine plage proche de la teneur maximale, par exemple à des niveaux correspondant à 0,5 fois, 1 fois et 2 fois la teneur maximale, avec un coefficient de variation acceptable pour les analyses répétées, durant la procédure de validation et l'analyse de routine.
- 5.4.2. Des essais à blanc et des expériences avec enrichissement ou des analyses sur des échantillons témoins (si possible, des matériaux de référence certifiés) sont effectués régulièrement dans le cadre des mesures internes de contrôle qualité. Il est nécessaire de réaliser et de vérifier des cartes de contrôle qualité pour les essais à blanc, les expériences avec enrichissement ou l'analyse des échantillons témoins afin de garantir que les performances analytiques sont conformes aux prescriptions.
- 5.5. *Limite de quantification*
- 5.5.1. Pour une méthode bioanalytique de dépistage, l'établissement de la limite de quantification n'est pas indispensable, mais il doit être démontré que la méthode permet de distinguer la valeur de blanc de la valeur seuil. En cas de transmission d'une valeur BEQ, il est nécessaire d'établir un seuil d'inscription permettant de savoir que faire des échantillons produisant une réponse au-dessous de ce seuil. Le seuil d'inscription doit présenter une différence avérée d'un facteur de trois au moins par rapport aux échantillons du blanc de procédure produisant une réponse au-dessous de la plage de travail. Il est donc calculé à partir d'échantillons contenant les composés cibles proches de la teneur minimale requise et non à partir d'un rapport S/B ou d'un blanc d'essai.
- 5.5.2. La limite de quantification pour une méthode de confirmation est de l'ordre d'un cinquième de la teneur maximale.
- 5.6. *Critères d'analyse*
- La fiabilité des résultats des méthodes de confirmation ou de dépistage impose le respect des critères ci-après dans la plage de la teneur maximale pour la valeur TEQ ou la valeur BEQ, qu'elle soit exprimée en TEQ totaux ou BEQ totaux (somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine) ou séparément pour les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine.

▼ M9

	Dépistage au moyen de méthodes de bioanalyse ou de méthodes physico-chimiques	Méthodes de confirmation
Taux de faux conformes (*)	< 5 %	
Justesse		De –20 % à +20 %
Répétabilité (RSD _r)	< 20 %	
Fidélité intermédiaire (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) Au regard des teneurs maximales.

5.7. Prescriptions spécifiques applicables aux méthodes de dépistage

5.7.1. Le dépistage peut être effectué au moyen de méthodes de CG-SM et de méthodes de bioanalyse. Pour les méthodes de CG-SM, les prescriptions établies au point 6 doivent être appliquées. Pour les méthodes de bioanalyse cellulaire, des prescriptions spécifiques sont établies au point 7.

5.7.2. Les laboratoires appliquant les méthodes de dépistage pour les contrôles de routine d'échantillons coopèrent étroitement avec les laboratoires appliquant la méthode de confirmation.

5.7.3. Les performances de la méthode de dépistage doivent être vérifiées durant l'analyse de routine par un contrôle qualité des analyses et par la validation continue de la méthode. Il doit exister un programme continu de contrôle des résultats conformes.

5.7.4. Contrôle de l'atténuation éventuelle de la réponse cellulaire et cytotoxicité:

20 % des extraits d'échantillons doivent être mesurés par dépistage de routine sans et avec ajout de la 2,3,7,8-TCDD à la teneur maximale ou au seuil d'intervention, pour vérifier si la réponse est éventuellement atténuée par des substances interférentes présentes dans l'extrait d'échantillon. La concentration mesurée dans l'échantillon enrichi doit être comparée à la somme de la concentration de l'extrait non enrichi et de la concentration de l'enrichissement. Si cette concentration mesurée est inférieure de plus de 25 % à la concentration (somme) calculée, cela indique la possibilité d'atténuation du signal et l'échantillon en question doit faire l'objet de l'analyse de confirmation par CG-SMHR. Les résultats sont contrôlés à l'aide de cartes de contrôle de la qualité.

5.7.5. Contrôle de la qualité sur des échantillons conformes:

Environ 2 à 10 % des échantillons conformes, en fonction de la matrice et de l'expérience du laboratoire, doivent être confirmés par CG-SMHR.

5.7.6. Détermination des taux de faux conformes à partir des données du contrôle qualité:

Le taux de faux conformes résultant du dépistage des échantillons au-dessous et au-dessus de la teneur maximale ou du seuil d'intervention doit être déterminé. Les taux réels de faux conformes doivent être inférieurs à 5 %. Dès lors que le contrôle qualité des échantillons conformes fait apparaître au moins vingt résultats confirmés par matrice/groupe de matrices, des conclusions sur le taux de faux conformes doivent être tirées à partir de cette base de données. Les résultats des échantillons analysés au moyen d'essais interlaboratoires

▼ **M9**

ou durant des cas de contamination, jusqu'à concurrence d'une concentration de deux fois la teneur maximale, par exemple, peuvent figurer parmi les vingt résultats à atteindre pour déterminer le taux de faux conformes. Les échantillons couvrent les profils de congénères les plus fréquents, représentant différentes sources.

Bien que les bioanalyses de dépistage servent avant tout à révéler les échantillons dépassant le seuil d'intervention, le critère appliqué pour la détermination des taux de faux conformes est la teneur maximale, compte tenu de l'incertitude de mesure élargie de la méthode de confirmation.

- 5.7.7. Les résultats du dépistage indiquant que des échantillons pourraient être non conformes doivent toujours être vérifiés; à cette fin, l'échantillon initial est soumis à une nouvelle analyse complète, réalisée au moyen d'une méthode de confirmation. Ces échantillons peuvent également servir à l'évaluation du taux de faux non conformes. Pour les méthodes de dépistage, le taux de faux non conformes est la fraction des résultats dont la conformité est confirmée par une analyse de confirmation, alors que lors du dépistage précédent, les échantillons avaient été déclarés potentiellement non conformes. L'évaluation des avantages de la méthode de dépistage doit se fonder sur la comparaison du nombre d'échantillons faussement non conformes et du nombre total d'échantillons contrôlés. Ce taux doit être suffisamment bas pour rendre l'utilisation de la méthode de dépistage avantageuse.
- 5.7.8. Dans des conditions de validation, les méthodes de bioanalyse doivent fournir une indication juste de la valeur TEQ, calculée et exprimée en BEQ.

De plus, pour les méthodes de bioanalyse appliquées dans des conditions de répétabilité, le RSD_i intralaboratoire sera généralement inférieur au RSD_R (conditions de reproductibilité).

6. Prescriptions spécifiques applicables aux méthodes de CG-SM à respecter à des fins de dépistage ou de confirmation

6.1. *Écarts acceptables entre l'estimation supérieure et l'estimation inférieure des OMS-TEQ*

L'écart entre l'estimation supérieure et l'estimation inférieure ne peut dépasser 20 % pour la confirmation du dépassement des teneurs maximales ou, en cas de besoin, des seuils d'intervention.

6.2. *Mesure des taux de récupération*

- 6.2.1. Des étalons internes de PCDD/PCDF substitués en 2,3,7,8 marqués au ¹³C et des étalons internes de PCB de type dioxine marqués au ¹³C doivent être ajoutés au tout début de la méthode d'analyse, par exemple avant la phase d'extraction, afin de valider le procédé d'analyse. Il est nécessaire d'ajouter au moins un congénère pour chacun des groupes d'isomères tétrachlorés à octachlorés des PCDD/PCDF et au moins un congénère pour chaque groupe d'isomères des PCB de type dioxine (une autre méthode consiste à ajouter au moins un congénère pour chaque fenêtre d'acquisition spectrométrique utilisée pour le contrôle des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine). Pour les méthodes de confirmation, il y a lieu d'utiliser l'ensemble des dix-sept étalons internes de PCDD/PCDF substitués en 2,3,7,8 marqués au ¹³C ainsi que l'ensemble des douze étalons internes de PCB de type dioxine marqués au ¹³C.

▼ **M9**

6.2.2. Des facteurs de réponse relatifs doivent également être déterminés dans le cas des congénères pour lesquels aucun analogue marqué au ^{13}C n'est ajouté, en utilisant des solutions d'étalonnage appropriées.

6.2.3. Pour les aliments pour animaux d'origine végétale et les aliments pour animaux d'origine animale contenant moins de 10 % de graisses, il est obligatoire d'ajouter les étalons internes avant la phase d'extraction. Pour les aliments pour animaux d'origine animale contenant plus de 10 % de graisses, les étalons internes sont ajoutés avant ou après l'extraction des graisses. L'efficacité de l'extraction doit faire l'objet d'une validation appropriée, eu égard à la phase au cours de laquelle les étalons internes sont introduits.

6.2.4. Avant l'analyse CG-SM, un ou deux étalons de récupération (substitution) doivent être ajoutés.

6.2.5. Le taux de récupération doit être mesuré. Dans le cas des méthodes de confirmation, les taux de récupération des étalons internes doivent se situer dans une plage comprise entre 60 et 120 %. Pour des congénères individuels, en particulier pour certains dibenzo-p-dioxines et dibenzofuranes heptachlorés et octachlorés, des taux de récupération inférieurs ou supérieurs sont acceptables, à condition que leur contribution à la valeur TEQ ne dépasse pas 10 % de la valeur TEQ totale (sur la base de la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine). Dans le cas des méthodes de dépistage par CG-SM, les taux de récupération doivent se situer dans une plage comprise entre 30 et 140 %.

6.3. *Élimination des substances interférentes*

- Les PCDD/PCDF sont séparés des composés chlorés interférents, tels que les PCB autres que ceux de type dioxine et les diphenyléthers chlorés, au moyen de techniques chromatographiques appropriées (de préférence au moyen d'une colonne de florisol, d'alumine et/ou de charbon).
- La séparation des isomères par chromatographie en phase gazeuse est inférieure à 25 % de pic à pic entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF et 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Étalonnage avec courbe étalon*

La plage de la courbe d'étalonnage doit couvrir la plage correspondante des teneurs maximales ou des seuils d'intervention.

6.5. *Critères spécifiques applicables aux méthodes de confirmation*

— CG-SMHR:

En SMHR, la résolution caractéristique doit être égale ou supérieure à 10 000 pour toute la plage de masse avec une vallée de 10 %.

Les autres critères d'identification et de confirmation sont remplis conformément à des normes internationalement reconnues, telles que la norme EN 16215:2012 (Aliments des animaux — Dosage des dioxines, des PCB de type dioxine et des PCB indicateurs par GC-HRMS) et/ou les méthodes EPA 1613 et 1668 révisées.

— CG-SM/SM:

▼M9

Il s'agit de suivre au moins deux ions précurseurs spécifiques et, pour chacun d'eux, un ion de fragmentation spécifique produit pour tous les analytes marqués et non marqués dans le champ d'application de l'analyse.

La tolérance autorisée maximale des intensités relatives des ions est de $\pm 15 \%$ pour les ions de fragmentation sélectionnés par rapport aux valeurs calculées ou mesurées (moyenne des étalons), dans des conditions SM/SM identiques (notamment en ce qui concerne l'énergie de collision et la pression du gaz de collision), pour chaque transition d'un analyte.

La résolution de chaque quadropôle doit être égale ou supérieure à la résolution massique unitaire (résolution massique unitaire: résolution suffisante pour séparer deux pics d'une unité massique) de manière à minimiser les éventuelles interférences avec les analytes considérés.

Les autres critères sont remplis conformément à des normes internationalement reconnues, telles que la norme EN 16215:2012 (Aliments des animaux — Dosage des dioxines, des PCB de type dioxine et des PCB indicateurs par GC-HRMS) et/ou les méthodes EPA 1613 et 1668 révisées, sauf pour ce qui concerne l'obligation de recourir à la GC-HRMS.

7. Prescriptions spécifiques applicables aux méthodes de bioanalyse

Les méthodes de bioanalyse sont des méthodes fondées sur le recours aux principes biologiques tels que les bioessais cellulaires, les tests d'interaction récepteurs ou les immuno-essais. Le présent point énonce les prescriptions applicables aux méthodes de bioanalyse en général.

Dans une méthode de dépistage, l'échantillon est en principe déclaré conforme ou est déclaré suspecté d'être non conforme. À cette fin, la valeur BEQ calculée est comparée à la valeur seuil (voir le point 7.3). Les échantillons au-dessous de la valeur seuil sont déclarés conformes, et ceux à la valeur seuil ou au-dessus de celle-ci sont déclarés suspectés d'être non conformes et nécessitent une analyse au moyen d'une méthode de confirmation. Dans la pratique, une valeur BEQ équivalant aux deux tiers de la teneur maximale peut servir de valeur seuil, à condition qu'un taux de faux conformes inférieur à 5 % et un taux acceptable de faux non conformes soient garantis. Avec des teneurs maximales distinctes pour les PCDD/PCDF et pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine, le contrôle de la conformité des échantillons sans fractionnement requiert des valeurs seuil de bioessai appropriées pour les PCDD/PCDF. Pour la vérification des échantillons dépassant les seuils d'intervention, la valeur seuil doit être un pourcentage approprié des seuils d'intervention respectifs.

Si une valeur indicative est exprimée en BEQ, les résultats des échantillons doivent se situer dans la plage de travail et dépasser le seuil d'inscription (voir les points 7.1.1 et 7.1.6).

7.1. Évaluation de la réponse à l'essai

7.1.1. Prescriptions générales

- Le calcul des concentrations à partir d'une courbe d'étalonnage de la TCDD fera apparaître une variation importante (coefficient de variation élevé — CV) des valeurs à l'extrémité supérieure de la courbe. La plage de travail est la zone où ce CV est inférieur à 15 %. L'extrémité inférieure de la plage de travail (seuil d'inscription) doit par ailleurs être établie à un niveau supérieur d'un facteur de trois au moins aux blancs de procédure. L'extrémité supérieure de la plage de travail est habituellement représentée par la valeur

▼ **M9**

EC₇₀ (70 % de la concentration effective maximale), mais elle se situe à un niveau inférieur si le CV est supérieur à 15 % dans cette plage. La plage de travail est établie pendant la validation. Les valeurs seuil (point 7.3) doivent se situer dans la plage de travail.

- Les solutions étalon et les extraits d'échantillon doivent être analysés en triple ou au moins en double. En cas d'utilisation de doublets, une solution étalon ou un extrait témoin analysé dans quatre à six puits répartis sur la plaque produisent une réponse ou une concentration (possible uniquement dans la plage de travail) sur la base d'un CV inférieur à 15 %.

7.1.2. Étalonnage

7.1.2.1. Étalonnage avec courbe étalon

- Les teneurs dans les échantillons doivent être estimées par comparaison de la réponse à l'essai avec une courbe d'étalonnage de la TCDD (ou du PCB 126 ou d'un mélange type de PCDD/PCDF/PCB de type dioxine) pour calculer la valeur BEQ dans l'extrait et, par la suite, dans l'échantillon.
- Les courbes d'étalonnage doivent contenir de huit à douze concentrations (au moins en double), la concentration dans la partie inférieure de la courbe (plage de travail) devant être suffisante. Une attention particulière doit être accordée à la qualité de l'ajustement de la courbe dans la plage de travail. La valeur R^2 a peu ou n'a pas de valeur en tant que telle pour l'appréciation de la justesse de l'ajustement en régression non linéaire. La réduction de l'écart entre les valeurs calculées et les valeurs observées dans la plage de travail de la courbe améliorera l'ajustement (la réduction de la somme des résidus au carré, par exemple).
- Le niveau estimatif dans l'extrait d'échantillon doit ensuite être corrigé de la valeur BEQ calculée pour un échantillon blanc de matrice/de solvant (pour tenir compte des impuretés provenant des solvants et substances chimiques utilisés) et du taux de récupération apparent (calculé à partir de la valeur BEQ d'échantillons de référence adéquats avec des profils de congénères représentatifs proches de la teneur maximale ou du seuil d'intervention). Pour la correction par le taux de récupération, le taux de récupération apparent doit se situer dans les limites de la plage requise (voir le point 7.1.4). Les échantillons de référence utilisés pour corriger du taux de récupération doivent respecter les prescriptions énoncées au point 7.2.

7.1.2.2. Étalonnage avec des échantillons de référence

Une autre solution consiste à utiliser une courbe d'étalonnage élaborée à partir d'au moins quatre échantillons de référence (voir le point 7.2.4): une matrice blanche et trois échantillons de référence à 0,5 fois, 1 fois et 2 fois la teneur maximale ou le seuil d'intervention, ce qui permet de se passer de la correction par le blanc et le taux de récupération si les propriétés de la matrice des échantillons de référence correspondent à celles des échantillons inconnus. Dans ce cas, la réponse à l'essai correspondant aux deux tiers de la teneur maximale (voir le point 7.3) peut être calculée directement à partir de ces échantillons et servir de valeur seuil. Pour la vérification des échantillons dépassant les seuils d'intervention, la valeur seuil doit être un pourcentage approprié de ces seuils d'intervention.

▼ **M9****7.1.3. Dosage distinct des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine**

Les extraits peuvent être séparés en fractions contenant des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine, permettant une indication distincte des teneurs en PCDD/PCDF et en PCB de type dioxine (en BEQ). Il convient d'utiliser de préférence une courbe d'étalonnage du PCB 126 pour évaluer les résultats de la fraction contenant les PCB de type dioxine.

7.1.4. Taux de récupération apparents du bioessai

Le «taux de récupération apparent du bioessai» doit être calculé à partir d'échantillons de référence appropriés avec des profils de congénères représentatifs qui sont proches de la teneur maximale ou du seuil d'intervention et être exprimé en pourcentage de la valeur BEQ par rapport à la valeur TEQ. En fonction du type de bioessai et des TEF⁽¹²⁾ utilisés, les écarts entre les facteurs TEF et REP pour les PCB de type dioxine peuvent entraîner des taux de récupération apparents faibles pour les PCB de type dioxine par rapport aux PCDD/PCDF. Par conséquent, en cas de dosage distinct des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine, les taux de récupération apparents du bioessai doivent être de 20 à 60 % pour les PCB de type dioxine et de 50 à 130 % pour les PCDD/PCDF (les plages s'appliquent pour la courbe d'étalonnage de la TCDD). Comme la contribution des PCB de type dioxine à la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine peut varier en fonction des matrices et des échantillons, les taux de récupération apparents du bioessai pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine reflètent ces plages et doivent se situer entre 30 et 130 %. Toute modification substantielle des valeurs TEF aux fins de la législation de l'Union relative aux PCDD/PCDF et aux PCB de type dioxine requiert la révision de ces plages.

7.1.5. Contrôle des taux de récupération de la purification

La perte de composés durant la purification doit être vérifiée pendant la validation. Un échantillon blanc enrichi d'un mélange des différents congénères doit faire l'objet d'une purification ($n = 3$ au moins) et la récupération et la variabilité doivent être vérifiées au moyen d'une méthode de confirmation. Le taux de récupération doit se situer entre 60 et 120 %, surtout pour les congénères contribuant à hauteur de plus de 10 % à la valeur TEQ dans différents mélanges.

7.1.6. Seuil d'inscription

S'agissant de l'inscription des valeurs BEQ dans un rapport, un seuil d'inscription est déterminé à partir des échantillons de matrice considérés associant des profils de congénères types, mais pas à partir de la courbe d'étalonnage des étalons, la précision de la plage inférieure de la courbe n'étant pas suffisante. Les effets de l'extraction et de la purification doivent être pris en compte. Le seuil d'inscription doit être établi à un niveau supérieur d'un facteur de trois au moins aux blancs de procédure.

7.2. Utilisation d'échantillons de référence

7.2.1. Les échantillons de référence représentent la matrice de prélèvement, les profils de congénères et les plages de concentration des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine proches de la teneur maximale ou du seuil d'intervention.

7.2.2. Chaque série d'essais doit comporter une matrice blanche ou, à défaut, un blanc de procédure et un échantillon de référence à la teneur maximale ou au seuil d'intervention. Ces échantillons doivent être extraits et analysés au même moment et dans les mêmes conditions. La réponse de l'échantillon de référence doit être nettement plus élevée que celle de l'échantillon blanc, garantissant ainsi la validité de l'essai. Ces échantillons peuvent être utilisés pour corriger du blanc et du taux de récupération.

⁽¹²⁾ Les prescriptions actuelles sont fondées sur les TEF publiés dans M. Van den Berg et al., *Toxicological Sciences* 93(2), p. 223 à 241 (2006).

▼ M9

7.2.3. Les échantillons de référence choisis pour corriger du taux de récupération doivent être représentatifs des échantillons de l'essai, ce qui signifie que les profils de congénères ne peuvent pas conduire à une surestimation des teneurs.

7.2.4. Des échantillons de référence supplémentaires, d'une concentration égale à 0,5 fois et 2 fois la teneur maximale ou le seuil d'intervention, par exemple, peuvent être inclus pour démontrer l'efficacité de l'essai dans la plage pertinente pour le contrôle de la teneur maximale ou du seuil d'intervention. Agrégés, ces échantillons peuvent servir au calcul des valeurs BEQ dans les échantillons d'essai (voir le point 7.1.2.2).

7.3. Détermination de valeurs seuil

Le lien entre les résultats de bioanalyse en BEQ et les résultats des méthodes de confirmation en TEQ doit être établi, par exemple par des expériences d'étalonnage avec adaptation matricielle, à l'aide d'échantillons de référence enrichis pour atteindre 0, 0,5 fois, 1 fois et 2 fois la teneur maximale, avec six répétitions sur chaque teneur ($n = 24$). Les facteurs de correction (blanc et taux de récupération) peuvent être estimés à partir de ce lien mais doivent être contrôlés conformément au point 7.2.2.

Des valeurs seuil sont établies pour déterminer la conformité de l'échantillon avec les teneurs maximales ou pour vérifier que les seuils d'intervention, s'ils sont considérés, sont conformes aux teneurs maximales ou seuils d'intervention respectifs établis pour les PCDD/PCDF et pour les PCB de type dioxine pris isolément, ou pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine. Elles sont représentées par l'extrémité *inférieure* de la répartition des résultats de bioanalyse (corrigés du blanc et du taux de récupération) correspondant à la limite de décision de la méthode de confirmation fondée sur un niveau de confiance de 95 %, soit un taux de faux conformes inférieur à 5 %, et sur un RSD_R inférieur à 25 %. La limite de décision de la méthode de confirmation est la teneur maximale, compte tenu de l'incertitude de mesure élargie.

La valeur seuil (en BEQ) peut être calculée selon l'une des formules énoncées aux points 7.3.1, 7.3.2 et 7.3.3 (voir le graphique 1).

7.3.1. Utilisation de la plage *inférieure* de l'intervalle de prédiction de 95 % à la limite de décision de la méthode de confirmation.

$$\text{Valeur seuil} = \text{BEQ}_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_I - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

où:

BEQ_{DL}	BEQ correspondant à la limite de décision de la méthode de confirmation, soit la teneur maximale compte tenu de l'incertitude de mesure élargie
$s_{y,x}$	écart type résiduel
$t_{\alpha, f = m-2}$	facteur de Student ($\alpha = 5 \%$, $f = \text{degrés de liberté, unilatéral}$)
m	nombre total de points d'étalonnage (indice j)
n	nombre de répétitions à chaque niveau
x_i	concentration dans l'échantillon (en TEQ) du point d'étalonnage i , déterminée par une méthode de confirmation
$\bar{x}$	concentration moyenne (en TEQ) de tous les échantillons d'étalonnage
$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$	paramètre de la somme des carrés, $i = \text{indice pour le point d'étalonnage } i$

▼ M9

- 7.3.2. Calcul à partir des résultats de bioanalyse (corrigés du blanc et du taux de récupération) de multiples analyses d'échantillons ($n \geq 6$) contaminés à hauteur de la limite de décision de la méthode de confirmation, en tant qu'extrémité *inférieure* de la répartition des données à la valeur BEQ moyenne correspondante:

$$\text{Valeur seuil} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

où:

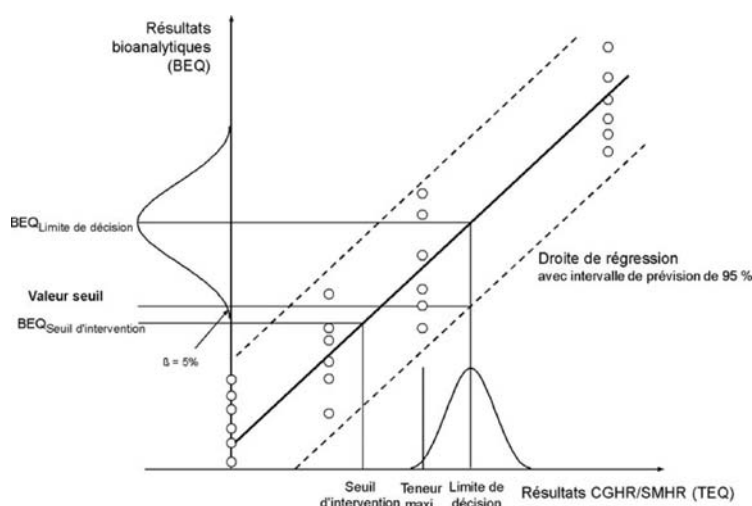
SD_R écart type des résultats de bioanalyse à la BEQ_{DL} , mesuré dans des conditions de reproductibilité intralaboratoire

- 7.3.3. Mesure en tant que valeur moyenne des résultats de bioanalyse (en BEQ, corrigée du blanc et du taux de récupération) à partir de l'analyse multiple d'échantillons ($n \geq 6$) contaminés aux deux tiers de la teneur maximale ou du seuil d'intervention, sachant que ce niveau sera proche de la valeur seuil déterminée conformément au point 7.3.1 ou 7.3.2:

Calcul des valeurs seuil sur la base d'un niveau de confiance de 95 %, soit un taux de faux conformes inférieur à 5 %, et d'un RSD_R inférieur à 25 %:

- 1) à partir de la plage *inférieure* de l'intervalle de prédiction de 95 % à la limite de décision de la méthode de confirmation;
- 2) à partir de l'analyse multiple d'échantillons ($n \geq 6$) contaminés à hauteur de la limite de décision de la méthode de confirmation en tant qu'extrémité *inférieure* de la répartition des données (représentée dans le graphique par une courbe en cloche) à la valeur BEQ moyenne correspondante.

Graphique 1



- 7.3.4. Restriction aux valeurs seuil

Les valeurs seuil fondées sur la valeur BEQ calculées à partir du RSD_R atteint durant la validation à l'aide d'un nombre limité d'échantillons de matrices/profils de congénères différents peuvent être supérieures aux teneurs maximales ou aux seuils d'intervention fondés sur la valeur TEQ en raison d'une plus grande fiabilité que celle qu'il est possible d'atteindre dans les analyses de routine lorsqu'un spectre inconnu de profils de congénères possibles doit être contrôlé. Dans de tels cas, les valeurs seuil sont calculées à partir d'un RSD_R égal à 25 %, ou, de préférence, aux deux tiers de la teneur maximale ou du seuil d'intervention.

▼ M9**7.4. *Caractéristiques de performance***

- 7.4.1. Étant donné qu'aucun étalon interne ne peut être utilisé dans les méthodes de bioanalyse, des tests de répétabilité de ces méthodes doivent être effectués pour obtenir des données sur l'écart type au sein des séries d'essais et entre elles. La répétabilité doit être inférieure à 20 % et la reproductibilité intralaboratoire inférieure à 25 %. Ce calcul doit être fondé sur les valeurs calculées en BEQ après correction par le blanc et le taux de récupération.
- 7.4.2. Dans le cadre de la procédure de validation, l'essai doit permettre de distinguer un échantillon blanc d'une teneur à la valeur seuil, permettant ainsi l'identification des échantillons au-dessus de la valeur seuil correspondante (voir le point 7.1.2).
- 7.4.3. Les composés cibles, les interférences potentielles et les valeurs maximales tolérées pour le blanc doivent être définis.
- 7.4.4. L'écart type relatif de la concentration calculée à partir des réponses (possible uniquement dans la plage de travail) d'un triple dosage d'un extrait d'échantillon ne peut être supérieur à 15 %.
- 7.4.5. Les résultats non corrigés du ou des échantillons de référence exprimés en BEQ (blanc et teneur maximale ou seuil d'intervention) doivent être utilisés pour évaluer les performances de la méthode de bioanalyse dans un intervalle de temps constant.
- 7.4.6. Il convient de réaliser et de vérifier des cartes de contrôle qualité pour les blancs de procédure et chaque type d'échantillon de référence afin de s'assurer que la performance analytique est conforme aux prescriptions, notamment pour les blancs de procédure en ce qui concerne la différence minimale requise par rapport à l'extrémité inférieure de la plage de travail et pour les échantillons de référence en ce qui concerne la reproductibilité intralaboratoire. Les blancs de procédure doivent être bien contrôlés en vue d'éviter les faux conformes lorsqu'ils sont retranchés.
- 7.4.7. Les résultats, obtenus au moyen des méthodes de confirmation, des échantillons suspects et de 2 à 10 % des échantillons conformes (au minimum vingt échantillons par matrice) sont collectés et utilisés pour l'évaluation des performances de la méthode de dépistage et du lien entre les valeurs BEQ et TEQ. Cette base de données peut être utilisée aux fins de la réévaluation des valeurs seuil applicables aux échantillons de routine pour les matrices validées.
- 7.4.8. Les bonnes performances des méthodes peuvent également être démontrées à l'aide d'essais interlaboratoires. Les résultats des échantillons analysés dans des essais interlaboratoires, couvrant une concentration atteignant, par exemple, jusqu'à deux fois la teneur maximale, peuvent également faire partie de l'évaluation du taux de faux conformes, si un laboratoire est en mesure de démontrer ses bonnes performances. Les échantillons couvrent les profils de congénères les plus fréquents, représentant différentes sources.
- 7.4.9. En cas de crise, les valeurs seuil peuvent être réévaluées, reflétant mieux la matrice et les profils de congénères particuliers de ce cas précis.

8. *Inscription des résultats dans un rapport***8.1. *Méthodes de confirmation***

- 8.1.1. Les résultats d'analyse comprennent les teneurs en congénères individuels des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine et les valeurs TEQ sont indiquées en estimation inférieure, estimation supérieure et estimation intermédiaire, afin que soit consigné un maximum de données, ce qui permet une interprétation des résultats en fonction de prescriptions spécifiques.

▼ **M9**

- 8.1.2. Le rapport doit mentionner la méthode utilisée pour extraire les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine.
- 8.1.3. Les taux de récupération des étalons internes individuels doivent être mentionnés s'ils se situent en dehors de la plage mentionnée au point 6.2.5 ou si la teneur maximale est dépassée (dans ce cas, les taux de récupération doivent être fournis pour l'une des deux analyses faites en double). Dans tous les autres cas, ils doivent être communiqués sur demande.
- 8.1.4. L'incertitude de mesure élargie doit également être mentionnée dans le rapport, car ce paramètre doit être pris en compte lorsqu'il s'agit de déterminer la conformité d'un échantillon. Par conséquent, les résultats de l'analyse sont consignés sous la forme $x \pm U$, où x est le résultat de l'analyse et U l'incertitude de mesure élargie calculée au moyen d'un facteur d'élargissement de 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %. En cas de dosage distinct des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine, la somme des estimations de l'incertitude élargie des résultats d'analyse distincts concernant les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine doit être utilisée pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine.
- 8.1.5. Les résultats doivent être exprimés dans les mêmes unités et par au moins le même nombre de chiffres significatifs que les teneurs maximales établies dans la directive 2002/32/CE.
- 8.2. *Méthodes bioanalytiques de dépistage*
- 8.2.1. Le dépistage donne un résultat qui doit être énoncé comme étant «conforme» ou «suspecté d'être non conforme» («suspect») dans le rapport.
- 8.2.2. Le dépistage peut aussi donner, pour les PCDD/PCDF et/ou les PCB de type dioxine, un résultat exprimé en BEQ, et non en TEQ.
- 8.2.3. Les échantillons dont la réponse est au-dessous du seuil d'inscription doivent être énoncés comme étant «sous le seuil d'inscription». Les échantillons dont la réponse est au-dessus de la plage de travail doivent être déclarés comme étant «au-dessus de la plage de travail» et le niveau correspondant à l'extrémité supérieure de la plage de travail doit être indiqué en BEQ.
- 8.2.4. Pour chaque type de matrice de prélèvement, le rapport doit mentionner la teneur maximale ou le seuil d'intervention sur lequel repose l'évaluation.
- 8.2.5. Le rapport doit mentionner le type d'essai appliqué, le principe de base de l'essai et le type d'étalonnage.
- 8.2.6. Le rapport doit mentionner la méthode utilisée pour extraire les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine.
- 8.2.7. Dans le cas d'échantillons suspectés d'être non conformes, le rapport doit comprendre une note sur les mesures à prendre. La concentration de PCDD/PCDF et la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine dans ces échantillons présentant des teneurs élevées doivent être déterminées/confirmées au moyen d'une méthode de confirmation.
- 8.2.8. Les résultats non conformes ne sont mentionnés dans le rapport que sur la base de l'analyse de confirmation.
- 8.3. *Méthodes physico-chimiques de dépistage*
- 8.3.1. Le dépistage donne un résultat qui doit être énoncé comme étant «conforme» ou «suspecté d'être non conforme» («suspect») dans le rapport.
- 8.3.2. Pour chaque type de matrice de prélèvement, le rapport doit mentionner la teneur maximale ou le seuil d'intervention sur lequel repose l'évaluation.

▼M9

- 8.3.3. En outre, les teneurs en congénères individuels des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine et les valeurs TEQ indiquées en estimation inférieure, estimation supérieure et estimation intermédiaire peuvent être données. Les résultats doivent être exprimés dans les mêmes unités et par au moins le même nombre de chiffres significatifs que les teneurs maximales établies dans la directive 2002/32/CE.
- 8.3.4. Les taux de récupération des étalons internes individuels doivent être mentionnés s'ils se situent en dehors de la plage mentionnée au point 6.2.5 ou si la teneur maximale est dépassée (dans ce cas, les taux de récupération doivent être fournis pour l'une des deux analyses faites en double). Dans tous les autres cas, ils doivent être communiqués sur demande.
- 8.3.5. Le rapport doit mentionner la méthode CG-SM appliquée.
- 8.3.6. Le rapport doit mentionner la méthode utilisée pour extraire les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine.
- 8.3.7. Dans le cas d'échantillons suspectés d'être non conformes, le rapport doit comprendre une note sur les mesures à prendre. La concentration de PCDD/PCDF et la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine dans ces échantillons présentant des teneurs élevées doivent être déterminées/confirmées au moyen d'une méthode de confirmation.
- 8.3.8. La non-conformité ne peut être décidée qu'après une analyse de confirmation.

CHAPITRE III

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET PRESCRIPTIONS APPLICABLES AUX MÉTHODES D'ANALYSE À UTILISER POUR LE CONTRÔLE OFFICIEL DES TENEURS EN PCB AUTRES QUE CEUX DE TYPE DIOXINE DES ALIMENTS POUR ANIMAUX

1. Champ d'application

Les prescriptions du présent chapitre s'appliquent aux analyses d'aliments pour animaux effectuées aux fins du contrôle officiel des teneurs en PCB autres que ceux de type dioxine, ainsi qu'à d'autres fins réglementaires, y compris les contrôles effectués par l'exploitant du secteur de l'alimentation animale pour veiller au respect des dispositions du règlement (CE) n° 183/2005.

2. Méthodes de détection applicables

Chromatographie en phase gazeuse/détection à capture d'électrons (CG-DCE), CG-SMBR, CG-SM/SM, CG-SMHR ou méthodes équivalentes.

3. Identification et confirmation des analytes considérés

- 3.1. Temps de rétention relatif par rapport aux étalons internes ou aux étalons de référence (écart admissible de +/- 0,25 %).
- 3.2. Séparation par chromatographie en phase gazeuse des PCB autres que ceux de type dioxine des substances interférentes, surtout les PCB coélués, notamment si les teneurs des échantillons sont dans les limites légales et si la non-conformité doit être confirmée ⁽¹³⁾.
- 3.3. Prescriptions applicables aux techniques de CG-SM

Il s'agit de suivre au moins le nombre suivant d'ions moléculaires ou d'ions caractéristiques du cluster moléculaire:

- a) deux ions spécifiques pour la SMHR;
- b) trois ions spécifiques pour la SMBR;

⁽¹³⁾ Les congénères qui coéluent souvent sont, par exemple, les PCB 28/31, les PCB 52/69 et les PCB 138/163/164. Pour la CG-SM, il faut tenir compte aussi des interférences possibles de fragments de congénères plus fortement chlorés.

▼ M9

- c) deux ions précurseurs spécifiques et, pour chacun d'eux, un ion de fragmentation spécifique produit pour la SM-SM.

Tolérances maximales admises applicables aux rapports isotopiques des fragments de masse sélectionnés:

écart relatif entre le rapport de l'ion cible (l'ion recherché le plus abondant) et du ou des ions qualificateurs et le rapport théorique de ces ions ou celui déterminé grâce à un standard d'étalonnage: $\pm 15 \%$.

3.4. Prescriptions applicables aux techniques de CG-DCE

Les résultats dépassant la teneur maximale doivent être confirmés avec deux colonnes de CG présentant des phases stationnaires de polarité différente.

4. Démonstration des performances de la méthode

Les performances de la méthode doivent être validées dans la plage autour de la teneur maximale (0,5 à 2 fois la teneur maximale) avec un coefficient de variation acceptable pour les analyses répétées (voir les prescriptions relatives à la fidélité intermédiaire au point 9).

5. Limite de quantification

La somme des limites de quantification ⁽¹⁴⁾ des PCB autres que ceux de type dioxine ne peut être supérieure à un tiers de la teneur maximale ⁽¹⁵⁾.

6. Contrôle qualité

Essais à blanc, analyse d'échantillons enrichis, échantillons servant au contrôle qualité, participation à des études interlaboratoires sur les matrices pertinentes à intervalles réguliers.

7. Mesure des taux de récupération

- 7.1. Des étalons internes appropriés présentant des propriétés physico-chimiques comparables à celles des analytes considérés doivent être utilisés.

- 7.2. Ajout d'étalons internes:

ajout dans les échantillons (avant l'extraction et la purification).

- 7.3. Prescriptions applicables aux méthodes recourant aux six congénères des PCB autres que ceux de type dioxine marqués d'un isotope:

- a) les résultats doivent être corrigés des taux de récupération des étalons internes;
- b) les taux de récupération des étalons internes marqués d'un isotope doivent se situer entre 60 et 120 %;
- c) les taux de récupération inférieurs ou supérieurs pour les congénères individuels avec une contribution à la somme des PCB autres que ceux de type dioxine inférieure à 10 % sont acceptables.

- 7.4. Prescriptions applicables aux méthodes ne recourant pas à l'ensemble des six étalons internes marqués d'un isotope ou recourant à d'autres étalons internes:

- a) le taux de récupération du ou des étalons internes doit être mesuré pour chaque échantillon;
- b) les taux de récupération du ou des étalons internes doivent se situer entre 60 et 120 %;
- c) les résultats doivent être corrigés des taux de récupération des étalons internes.

⁽¹⁴⁾ Les principes décrits dans le document «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» (<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>) doivent être suivis lorsqu'ils sont applicables.

⁽¹⁵⁾ Il est fortement recommandé d'avoir une contribution de la valeur de blanc de réactif inférieure à la teneur en un contaminant d'un échantillon. Il incombe au laboratoire de contrôler la variation des valeurs de blanc, notamment si ces valeurs sont soustraites.

▼M9

- 7.5. Les taux de récupération des congénères non marqués doivent être vérifiés à l'aide d'échantillons enrichis ou d'échantillons de contrôle qualité présentant des concentrations de l'ordre de la teneur maximale. Les taux de récupération pour ces congénères sont réputés acceptables s'ils se situent entre 60 et 120 %.

8. **Prescriptions applicables aux laboratoires**

Conformément aux dispositions du règlement (UE) 2017/625, les laboratoires doivent être accrédités par un organisme habilité qui se conforme au guide ISO/IEC 58, de manière qu'ils appliquent les procédures d'assurance qualité à leurs analyses. Les laboratoires doivent être accrédités selon la norme EN ISO/IEC 17025. En outre, les principes énoncés dans les directives techniques pour l'estimation de l'incertitude de mesure et les limites de quantification pour l'analyse des PCB doivent être suivis ⁽¹⁶⁾.

9. **Caractéristiques des performance: critères afférents à la somme des PCB autres que ceux de type dioxine à la teneur maximale**

	Spectrométrie de masse par dilution isotopique (*)	Autres techniques
Justesse	De – 20 % à + 20 %	De – 30 % à + 30 %
Fidélité intermédiaire (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Différence entre l'estimation supérieure et l'estimation inférieure	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Les six analogues marqués au ¹³C doivent être utilisés comme étalons internes.

10. **Inscription des résultats dans un rapport**

- 10.1. Les résultats d'analyse comprennent les teneurs en congénères individuels des PCB autres que ceux de type dioxine et la somme des PCB autres que ceux de type dioxine et sont indiqués en estimation inférieure, estimation supérieure et estimation intermédiaire, afin que soit consigné un maximum de données, ce qui permet une interprétation des résultats en fonction de prescriptions spécifiques.
- 10.2. Le rapport mentionne la méthode utilisée pour extraire les PCB.
- 10.3. Les taux de récupération des étalons internes individuels doivent être fournis s'ils se situent en dehors de la plage mentionnée au point 7 ou si la teneur maximale est dépassée. Dans tous les autres cas, ils doivent être fournis sur demande.
- 10.4. L'incertitude de mesure élargie doit également être inscrite dans le rapport, car ce paramètre doit être pris en compte lorsqu'il s'agit de déterminer la conformité d'un échantillon. Par conséquent, les résultats de l'analyse sont consignés sous la forme $x \pm U$, où x est le résultat de l'analyse et U l'incertitude de mesure élargie calculée au moyen d'un facteur d'élargissement de 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %.
- 10.5. Les résultats doivent être exprimés dans les mêmes unités et par au moins le même nombre de chiffres significatifs que les teneurs maximales établies dans la directive 2002/32/CE.

B. NORMES EN

Les normes EN énumérées ci-après sont à prendre en considération aux fins de l'application de l'article 34, paragraphe 2, point a), du règlement (UE) 2017/625:

⁽¹⁶⁾ Voir la note de bas de page 9.

▼M9

EN 17194 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination du déoxynivalénol, de l'aflatoxine B1, de la fumonisine B1 et B2, des toxines T-2 et HT-2, de la zéaralénone et de l'ochratoxine A dans les matières premières pour aliments et les aliments composés pour animaux par CL-SM/SM»

EN 17270 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination par chromatographie en phase liquide de la teneur en théobromine dans les matières premières destinées aux aliments des animaux et dans les aliments composés pour animaux, y compris les ingrédients issus du cacao»

EN 17504 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage du gossypol dans les graines de coton et les aliments pour animaux par CL-SM/SM»

EN 17362 «Aliments pour animaux: méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination de la teneur en pentaclorophénol (PCP) dans les matières premières pour aliments des animaux et les aliments composés pour animaux par CL-SM/SM»

EN 16279 «Aliments des animaux — Détermination de la teneur en fluorure, après traitement à l'acide chlorhydrique, selon la méthode utilisant une électrode sélective d'ions (ISE)»

EN 17053 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage par ICP-MS (multiméthode) des éléments traces, métaux lourds et autres éléments inorganiques présents dans les aliments»

En 15550 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage du cadmium et du plomb par spectrométrie d'absorption atomique à l'aide d'un four graphite après minéralisation sous pression»

EN 16206 «Aliments pour animaux — Dosage de l'arsenic par spectrométrie d'absorption atomique par génération d'hydrures (SAAGH) après digestion sous pression par micro-ondes (digestion à l'acide nitrique à 65 % et au peroxyde d'hydrogène à 30 %)»

EN 16277 «Aliments des animaux — Dosage du mercure par spectrométrie d'absorption atomique à vapeur froide (SAAVF) après digestion sous pression par micro-ondes (extraction avec de l'acide nitrique à 65 % et du peroxyde d'hydrogène à 30 %)»

En 16278 «Aliments des animaux — Dosage de l'arsenic inorganique par spectrométrie d'absorption atomique par génération d'hydrures (SAA-GH) après extraction par micro-ondes»

EN 17374 «Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Détermination de la teneur en arsenic inorganique dans les aliments pour animaux, par CLHP avec échange d'anions et spectrométrie de masse à plasma induit par haute fréquence (ICP-SM)»

▼ **M2**

ANNEXE VI

MÉTHODES D'ANALYSE APPLICABLES EN MATIÈRE D'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'ORIGINE ANIMALE POUR LE CONTRÔLE OFFICIEL DES ALIMENTS POUR ANIMAUX▼ **M8**

1. OBJET ET CHAMP D'APPLICATION

L'identification des constituants d'origine animale dans les aliments pour animaux doit être effectuée à l'aide de la microscopie optique ou d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), conformément aux dispositions prévues dans la présente annexe.

Ces deux méthodes permettent de détecter la présence de constituants d'origine animale dans les prémélanges, dans les matières premières pour aliments des animaux et dans les aliments composés pour animaux. Toutefois, elles ne permettent pas de calculer la quantité de ces constituants dans les prémélanges, dans les matières premières pour aliments des animaux et dans les aliments composés pour animaux. La limite de détection des deux méthodes est inférieure à 0,1 % (p/p).

L'amplification en chaîne par polymérase permet d'identifier le groupe taxinomique des constituants d'origine animale présents dans les prémélanges, dans les matières premières pour aliments des animaux et dans les aliments composés pour animaux.

Ces méthodes s'appliquent au contrôle de l'application des interdictions prévues à l'article 7, paragraphe 1, du règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil ⁽¹⁾, à l'annexe IV dudit règlement et à l'article 11, paragraphe 1, du règlement (CE) n° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil ⁽²⁾.

En fonction du type d'aliment pour animaux soumis aux essais, ces méthodes peuvent être utilisées, suivant un protocole opérationnel unique, individuellement ou conjointement conformément aux modes opératoires normalisés (MON) établis par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux (EURL-AP) et publiées sur son site web ⁽³⁾.

▼ **M2**

2. MÉTHODES

▼ **M8**

2.1. Microscopie optique

2.1.1. Principe

Les constituants d'origine animale susceptibles d'être présents dans les prémélanges, dans les matières premières pour aliments des animaux et dans les aliments composés pour animaux envoyés pour analyse sont identifiés sur la base de caractéristiques typiques et identifiables au microscope, telles que les fibres musculaires et autres particules de viande, les cartilages, les os, la corne, les poils, les soies, les fragments de cuticules d'invertébrés, les structures trachéales d'insectes, les produits sanguins, les globules de lait, les cristaux de lactose, les plumes, les coquilles d'œuf, les arêtes et les écailles de poisson.

⁽¹⁾ Règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles (JO L 147 du 31.5.2001, p. 1).

⁽²⁾ Règlement (CE) n° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) n° 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux) (JO L 300 du 14.11.2009, p. 1).

⁽³⁾ <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>

▼M8

Les examens microscopiques sont effectués après la préparation des échantillons par sédimentation.

Les échantillons sont soumis à une étape de sédimentation de la manière suivante:

- a) pour la détection des constituants d'origine animale provenant d'animaux autres que les invertébrés terrestres, une étape de sédimentation unique dans du tétrachloréthylène (TCE), comme indiqué au point 2.1.3.4.3;
- b) pour la détection des constituants d'invertébrés terrestres, une étape de double sédimentation dans de l'éther de pétrole et du tétrachloréthylène (EP/TCE), comme indiqué au point 2.1.3.4.4.

2.1.2. *Réactifs et appareillage*

2.1.2.1. Réactifs

2.1.2.1.1. Agent de concentration

- Tétrachloréthylène (densité relative 1,62).
- Éther de pétrole (EP) point d'ébullition: 40-60 °C (densité relative: 0,65).

2.1.2.1.2. Réactif de coloration

- Solution de rouge d'alizarine (diluer 2,5 ml d'acide chlorhydrique 1 M dans 100 ml d'eau et ajouter 200 mg de rouge d'alizarine à cette solution).

2.1.2.1.3. Milieux de montage

- Lessive de soude et de potasse (NaOH à 2,5 % p/v ou KOH à 2,5 % p/v).
- Glycérol (non dilué, viscosité: 1 490 cP) ou un milieu de montage ayant des propriétés équivalentes pour la préparation de lames non permanentes.
- Norland ® Adhésive optique 65 (viscosité: 1 200 cP) ou un milieu de montage ayant des propriétés équivalentes pour la préparation de lames non permanentes.

2.1.2.1.4. Milieux de montage avec propriétés de coloration

- Solution de lugol (dissoudre 2 g d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau et ajouter 1 g d'iode en agitant fréquemment).
- Réactif cystinique (2 g d'acétate de plomb, 10 g NaOH/100 ml d'eau).
- Liqueur de Fehling [préparée avant l'utilisation à partir de parts égales (1/1) de deux solutions-mères A et B. Solution A: dissoudre 6,9 g de sulfate de cuivre (II) pentahydraté dans 100 ml d'eau. Solution B: dissoudre 34,6 g de tartrate double de sodium et de potassium tétrahydraté et 12 g de NaOH dans 100 ml d'eau].
- Tétraméthylbenzidine/péroxyde d'hydrogène [dissoudre 1 g de 3,3', 5,5' tétraméthylbenzidine (TMB) dans 100 ml d'acide acétique glacial et 150 ml d'eau. Avant l'utilisation, mélanger 4 parts de cette solution de TMB avec 1 part de peroxyde d'hydrogène à 3 %].

2.1.2.1.5. Agents de rinçage

- Éthanol ≥ 96 % (qualité technique).
- Acétone (qualité technique).

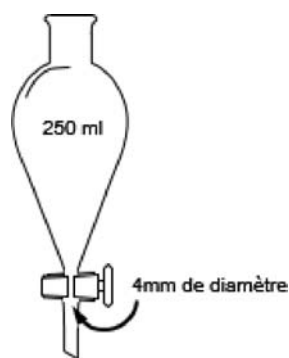
2.1.2.1.6. Réactif de blanchiment

- Solution commerciale d'hypochlorite de sodium (9-14 % de chlore actif).

▼ **M8**

2.1.2.2. Appareillage

- Balance de précision à 0,001 g.
- Équipement de broyage: broyeur à couteaux ou à rotors. Si un broyeur à rotors est utilisé, les tamis pour broyeur $\leq 0,5$ mm sont interdits.
- Tamis à mailles carrées de 0,25 mm et 1 mm de largeur. À l'exception du prètamisage des échantillons, le diamètre des tamis ne doit pas dépasser 10 cm pour éviter la perte de matières. L'étalonnage des tamis n'est pas requis.
- Ampoule à décanter conique en verre d'une capacité de 250 ml munie d'un robinet en téflon ou en verre rodé à la base du cône. Le diamètre de l'ouverture du robinet doit être supérieur ou égal à 4 mm. Pour la sédimentation unique TCE uniquement, un bécher de décantation à fond conique peut également être utilisé, à condition que le laboratoire ait démontré que les niveaux de détection sont équivalents à ceux obtenus en utilisant l'ampoule à décanter conique en verre.

*Ampoule à décanter*

- Microscope stéréoscopique couvrant une plage de grossissement final allant de 6,5 à 40 fois au minimum.
- Microscope composé à fond clair par éclairage à transmission couvrant une plage de grossissement final allant de 100 à 400 fois au minimum. Un microscope en lumière polarisée, à contraste interférentiel différentiel peut également être utilisé.
- Verrerie courante de laboratoire.
- Matériel pour la préparation sur lame: lames de microscope classiques, lames creuses, lamelles (20 × 20 mm), brucelles, spatule fine.
- Étuve de laboratoire.
- Centrifugeuse.
- Papier filtre: filtre qualitatif en cellulose (taille des pores: 4-11 μ m).

2.1.3. *Échantillonnage et préparation des échantillons*

2.1.3.1. Échantillonnage

Utiliser un échantillon représentatif prélevé conformément à l'annexe I.

▼M8

2.1.3.1.1. Dessiccation des échantillons

Les échantillons présentant une teneur en humidité supérieure à 14 % doivent être desséchés avant le traitement conformément à l'annexe III.

2.1.3.1.2. Prétamissage des échantillons

Afin de recueillir des informations sur une éventuelle contamination de l'environnement des aliments pour animaux, il est recommandé de prétamiser les aliments pour animaux en granulés et les bouchons à l'aide d'un tamis à mailles de 1 mm, puis de préparer et d'analyser les deux fractions obtenues et d'en rendre compte séparément, car elles doivent être considérées comme deux échantillons distincts.

2.1.3.2. Précautions à prendre

Afin d'éviter une contamination croisée en laboratoire, tous les équipements recyclables doivent être soigneusement nettoyés avant l'emploi. Les éléments de l'ampoule à décanter doivent être démontés avant le nettoyage. Les éléments de l'ampoule à décanter et la verrerie doivent être prélavés manuellement puis lavés en machine. Les tamis doivent être nettoyés à l'aide d'une brosse à poils synthétiques durs. Un dernier nettoyage des tamis avec de l'acétone et de l'air comprimé est recommandé après le tamisage de matières grasses telles que des farines de poisson.

2.1.3.3. Préparation des échantillons constitués de matières grasses ou d'huiles

Le protocole suivant doit être respecté pour la préparation des échantillons constitués de matières grasses:

- S'il s'agit de graisse solide, chauffer celle-ci dans un four jusqu'à ce qu'elle devienne liquide.
- Au moyen d'une pipette, transvaser 40 ml de graisse du fond de l'échantillon dans un tube de centrifugation.
- L'échantillon doit être centrifugé pendant 10 minutes à 4 000 tours/min.
- Si la graisse s'est solidifiée pendant la centrifugation, la réchauffer au four jusqu'à ce qu'elle redevienne liquide.
- La centrifugation doit être répétée pendant 5 minutes à 4 000 tours/min.
- À l'aide d'une petite cuillère ou d'une spatule, transvaser une moitié des impuretés obtenues sur des lames microscopiques pour examen. Il est recommandé d'utiliser du glycérol comme milieu de montage.
- Utiliser les impuretés restantes pour la préparation du résidu, comme décrit au point 2.1.3.4.3, premier tiret.

Le même protocole, à l'exception des premier et quatrième tirets, doit être appliqué à la préparation des échantillons constitués d'huile.

2.1.3.4. Préparation des échantillons autres que les matières grasses ou les huiles

2.1.3.4.1. Sous-échantillonnage et broyage: au moins 50 g de l'échantillon doivent être séparés en sous-échantillons destinés à être analysés puis broyés.

2.1.3.4.2. Préparation des matières premières: une portion d'au moins 5 g du sous-échantillon broyé doit être préparée. Elle est tamisée à 0,25 mm et les deux fractions qui en résultent sont examinées.

▼ **M8**

- 2.1.3.4.3. Sédimentation unique TCE pour la détection de constituants d'origine animale provenant d'animaux autres que les invertébrés terrestres.

— Extraction et préparation du résidu:

Transvaser une portion de 10 g (exactitude de 0,01 g) du sous-échantillon broyé dans l'ampoule à décanter ou le bécher de décantation à fond conique et ajouter 50 ml de tétrachloréthylène. La portion transvasée dans l'ampoule est limitée à 3 g dans le cas des farines de poissons ou d'autres produits d'origine animale purs, d'ingrédients minéraux ou de prémélanges générant plus de 10 % de résidu. Agiter vigoureusement le mélange pendant au moins 30 secondes et ajouter avec précaution 50 ml de tétrachloréthylène en lavant la surface intérieure de l'ampoule pour éliminer les particules adhérentes. Laisser le mélange obtenu se décanter pendant au moins 5 minutes avant de séparer le résidu en ouvrant le robinet.

Si un bécher de décantation à fond conique est utilisé, agiter vigoureusement le mélange pendant au moins 15 secondes et laver soigneusement la surface intérieure avec au moins 10 ml de tétrachloréthylène propre pour éliminer les particules adhérentes aux parois du bécher. Laisser le mélange se décanter pendant 3 minutes et agiter à nouveau pendant 15 secondes puis laver soigneusement la surface intérieure avec au moins 10 ml de tétrachloréthylène propre pour éliminer les particules adhérentes aux parois du bécher. Laisser le mélange obtenu se décanter pendant au moins 5 minutes puis retirer la fraction liquide, l'éliminer en la laissant soigneusement se décanter et en prenant soin de ne rien perdre du résidu.

Le résidu doit être recueilli sur du papier-filtre placé dans un entonnoir afin de permettre la séparation du tétrachloréthylène restant tout en évitant le dépôt de matières grasses dans le résidu. Le résidu doit être séché. Il est recommandé de peser ensuite le résidu (avec une exactitude de 0,001 g) pour contrôler l'étape de sédimentation. Enfin, le résidu doit être passé à travers un tamis à mailles de 0,25 mm et les deux fractions obtenues doivent être examinées, sauf si le tamisage n'est pas jugé nécessaire.

— Extraction et préparation des matières flottantes:

Après récupération du résidu au moyen de la méthode décrite ci-dessus, deux phases restent dans l'ampoule à décanter: une phase liquide constituée de tétrachloréthylène et une phase solide constituée de matières flottantes. Cette phase solide (les matières flottantes) est récupérée par le versement complet du tétrachloréthylène hors de l'ampoule en ouvrant le robinet. L'ampoule à décanter doit être retournée, et les matières flottantes doivent être transvasées dans une grande boîte de Pétri et séchées à l'air dans une hotte de laboratoire. Elle est tamisée à 0,25 mm et les deux fractions qui en résultent sont examinées.

— Utilisation de réactifs de coloration

Pour faciliter l'identification correcte des constituants d'origine animale, l'opérateur peut utiliser des réactifs de coloration au cours de la préparation de l'échantillon, conformément aux orientations formulées par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiées sur son site web.

▼M8

Si la solution de rouge d'alizarine est utilisée pour la coloration du résidu, le protocole suivant doit être appliqué:

- Transvaser le résidu séché dans une éprouvette en verre et le rincer deux fois avec environ 5 ml d'éthanol (agiter chaque fois au vortex pendant 30 secondes, laisser le solvant se décanter pendant environ 1 minute 30 secondes puis l'éliminer).
- Blanchir le résidu avec au moins 1 ml de solution d'hypochlorite de sodium. Laisser réagir pendant 10 minutes; remplir l'éprouvette d'eau, laisser le résidu se décanter pendant 2 à 3 minutes puis éliminer doucement l'eau et les particules en suspension.
- Rincer deux fois le résidu avec environ 10 ml d'eau (agiter au vortex pendant 30 secondes, laisser se décanter et, chaque fois, éliminer l'eau).
- Ajouter 2 à 10 gouttes de solution de rouge d'alizarine et agiter le mélange au vortex. Laisser réagir pendant 30 secondes et rincer deux fois le résidu coloré avec environ 5 ml d'éthanol, puis une nouvelle fois avec de l'acétone (agiter chaque fois au vortex pendant 30 secondes, laisser le solvant se décanter environ une minute puis l'éliminer).
- Sécher le résidu coloré.

2.1.3.4.4. Double sédimentation EP/TCE pour la détection de constituants d'invertébrés terrestres.

Toutes les étapes doivent être réalisées dans une ampoule à décanter conique en verre de 250 ml, comme décrit au point 2.1.2.2, quatrième tiret.

- Une portion de 10 g (précision à 0,01 g) du sous-échantillon broyé est transférée dans l'ampoule à décanter et soumise d'abord à une sédimentation unique TCE, comme décrit au point 2.1.3.4.3, avec récupération du résidu sur un papier-filtre placé sur un entonnoir. Ce résidu peut être utilisé comme indiqué au point 2.1.3.4.3.
- Le petit volume de TCE qui s'est écoulé avec le résidu doit être transféré dans une éprouvette graduée. En ouvrant le robinet de l'ampoule à décanter, remplir l'éprouvette graduée jusqu'à obtention de 30 ml de TCE. Une fois ce volume atteint, le robinet d'arrêt est fermé.
- Ce volume de TCE collecté est remplacé en ajoutant un volume de 30 ml d'éther de pétrole dont le point d'ébullition est compris entre 40 °C et 60 °C dans l'ampoule à décanter. Le contenu de l'ampoule à décanter doit être soigneusement mélangé pour obtenir un mélange 30 % EP/70 % TCE (avec une densité d'environ 1,26 g.cm⁻³). Laisser reposer la matière pendant 10 min. Deux nouvelles fractions se formeront: un deuxième résidu et les matières flottantes finales (< 1,26 g.cm⁻³). Le deuxième résidu doit être récupéré dans une boîte de Petri (ou un papier-filtre placé sur un entonnoir) en ouvrant le robinet jusqu'à ce que seul un peu de mélange des solvants et les matières flottantes finales restent dans l'ampoule à décanter. Le liquide restant et les matières flottantes finales sont collectés séparément sur un papier-filtre placé sur un entonnoir. La paroi de l'ampoule à décanter doit être rincée avec de l'éther de pétrole afin de recueillir toutes les matières flottantes finales. On laisse sécher les matières flottantes finales. Enfin, les matières flottantes finales doivent être passées à travers un tamis à mailles de 0,25 mm et les deux fractions obtenues doivent être examinées aux fins de la détection de constituants d'invertébrés terrestres, sauf si le tamisage n'est pas jugé nécessaire.

▼M8

2.1.4. *Examen microscopique*

2.1.4.1. Préparation des lames

Les lames microscopiques sont préparées à partir du résidu et, selon le choix de l'opérateur, à partir des matières flottantes ou de la matière première. Le cas échéant, pour la détection des constituants d'invertébrés terrestres uniquement, des lames doivent également être préparées à partir des matières flottantes finales obtenues conformément au point 2.1.3.4.4. Les deux fractions obtenues (la fine et la grossière) doivent être préparées. Les prises d'essai des fractions étalées sur les lames doivent être représentatives de la fraction entière.

Un nombre suffisant de lames doit être préparé afin de garantir la réalisation d'un protocole d'examen complet, tel que prévu au point 2.1.4.2.

Les lames microscopiques doivent être montées avec le milieu de montage adéquat, conformément au MON établi par l'EURL-AP et publié sur son site web. Elles sont recouvertes de lamelles.

2.1.4.2. Protocoles d'observation pour la détection de particules animales dans les aliments composés pour animaux, les matières premières pour aliments des animaux et les prémélanges

Les lames microscopiques préparées doivent être observées conformément aux protocoles d'observation établis dans les schémas 1 et 2.

Le résidu et, selon le choix de l'opérateur, les matières flottantes ou la matière première doivent être observés au microscope composé. En outre, pour la détection des constituants d'invertébrés terrestres, les matières flottantes finales obtenues conformément au point 2.1.3.4.4 doivent être observées conformément au schéma 3. Les fractions grossières peuvent en outre être examinées au microscope stéréoscopique. Chaque lame doit être observée entièrement à différents grossissements. Des explications précises sur la manière d'utiliser les protocoles sont détaillées dans un mode opératoire normalisé (MON) établi par l'EURL-AP et publié sur son site web.

Le nombre minimal de lames à observer à chaque étape des protocoles d'observation doit être strictement respecté, à moins que l'ensemble des matières de la fraction ne permette pas d'atteindre le nombre de lames prescrit, par exemple lorsque aucun résidu n'est obtenu. Il ne peut pas être utilisé plus de 6 lames par détermination pour l'enregistrement du nombre de particules.

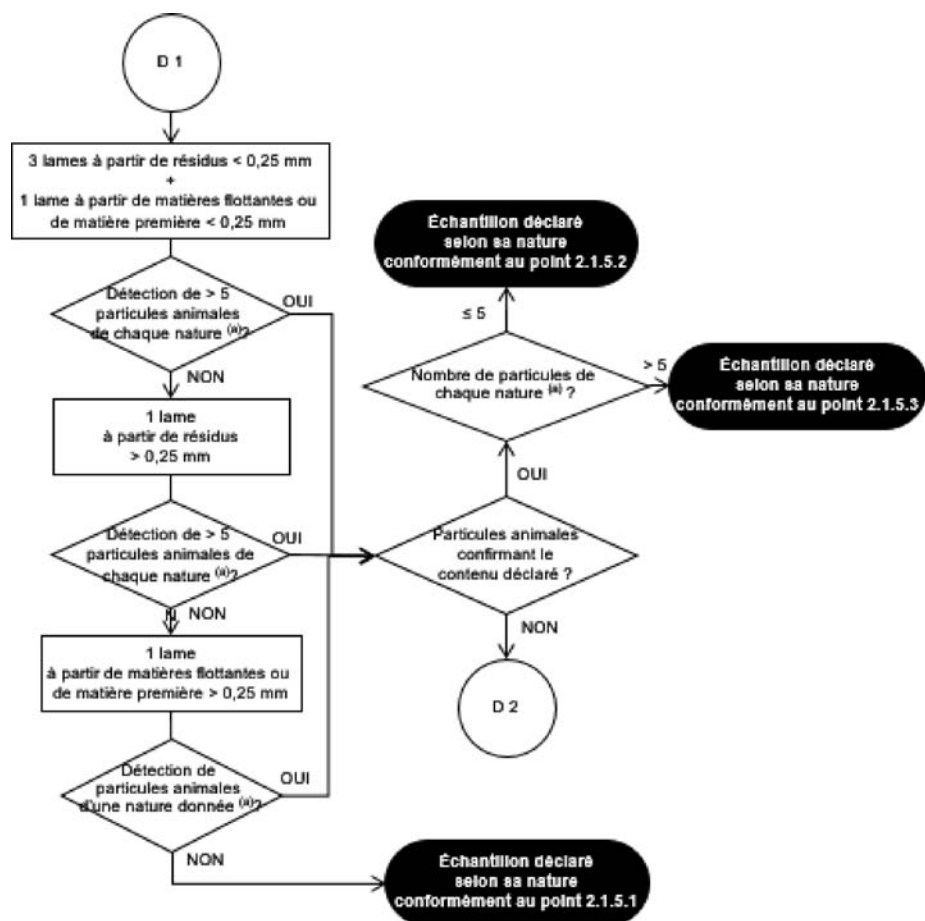
Lorsque des lames supplémentaires sont préparées avec un milieu de montage plus spécifique ayant des propriétés de coloration, comme indiqué au point 2.1.2.1.4, pour les matières flottantes ou la matière première afin de caractériser davantage les structures (par ex. plumes, poils, particules musculaires ou sanguines) qui ont été détectées sur des lames préparées avec d'autres milieux de montage, comme indiqué au point 2.1.2.1.3, le nombre de particules doit être compté sur la base d'un nombre de lames par détermination ne dépassant pas 6, les lames supplémentaires avec un milieu de montage plus spécifique étant comprises dans ce nombre. Les lames supplémentaires préparées à partir des matières flottantes finales obtenues, comme indiqué au point 2.1.3.4.4, pour la détection des constituants d'invertébrés terrestres ne sont pas prises en considération pour l'identification d'autres natures (vertébrés terrestres et poissons).

Afin de déterminer plus facilement la nature et l'origine des particules, l'opérateur peut utiliser des outils d'aide tels que des systèmes d'aide à la décision, des bibliothèques d'images et des échantillons de référence.

▼ M8

Schéma 1

Protocole d'observation après sédimentation unique TCE pour la détection de particules d'animaux autres que les invertébrés terrestres dans les aliments composés pour animaux, les matières premières pour aliments des animaux et les prémélanges aux fins de la première détermination



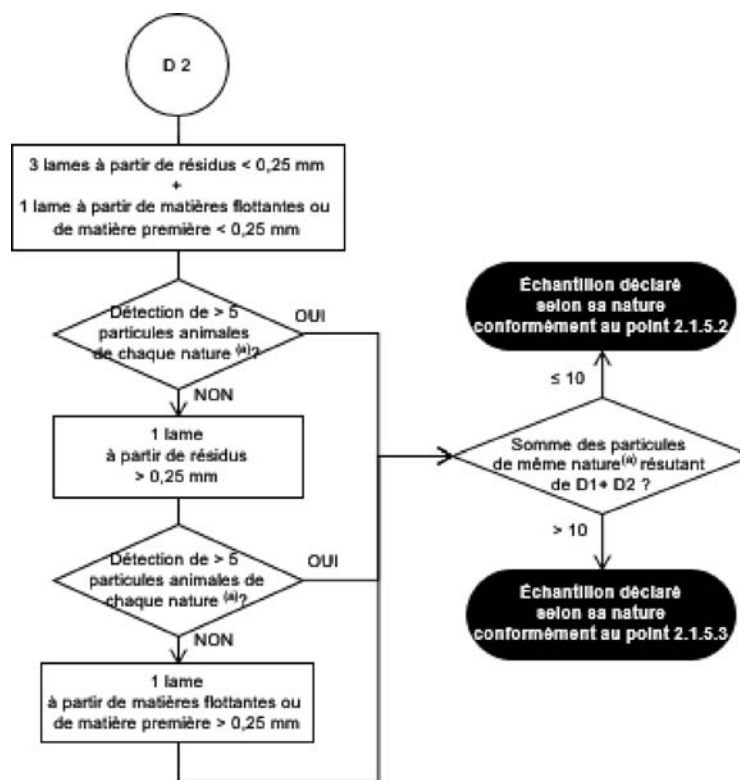
[«D1» et «D2» renvoient respectivement à la première et à la seconde détermination;

(a): vertébrés terrestres, poisons]

▼ **M8**

Schéma 2

Protocole d'observation après sédimentation unique TCE pour la détection de particules d'animaux autres que les invertébrés terrestres dans les aliments composés pour animaux, les matières premières pour aliments des animaux et les prémélanges aux fins de la seconde détermination

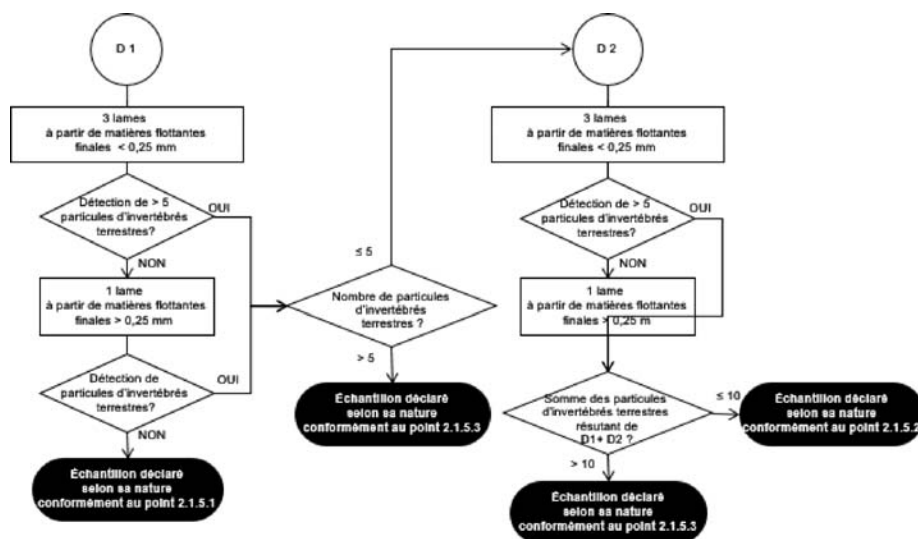


[«D1» et «D2» renvoient respectivement à la première et à la seconde détermination;
(a): vertébrés terrestres, poissons]

▼M8

Schéma 3

Protocole d'observation après double sédimentation EP/TCE pour la détection de constituants d'invertébrés terrestres dans les aliments composés pour animaux, les matières premières pour aliments des animaux et les prémélanges



(«D1» et «D2» renvoient respectivement à la première et à la seconde détermination)

2.1.4.3. Nombre de déterminations

Les déterminations doivent être effectuées sur différents sous-échantillons de 50 g chacun.

Si, à l'issue de la première détermination effectuée conformément au protocole d'observation établi dans le schéma 1, ou le schéma 3 selon le cas, aucune particule animale n'est détectée, il n'est pas nécessaire de procéder à une détermination supplémentaire, et le résultat de l'analyse doit être rapporté selon les libellés prévus au point 2.1.5.1.

Si, à l'issue de la première détermination effectuée conformément au protocole d'observation établi dans le schéma 1, une ou plusieurs particules animales d'une nature donnée (c'est-à-dire provenant d'un vertébré terrestre ou d'un poisson) sont détectées et si la nature de la ou des particules mises en évidence confirme le contenu déclaré de l'échantillon, il n'est pas nécessaire de procéder à une seconde détermination. Si le nombre de particules animales d'une nature donnée détectées au cours de cette première détermination est supérieur à 5, le résultat de l'analyse doit être rapporté par nature de l'animal selon les libellés prévus au point 2.1.5.3. Dans le cas contraire, le résultat de l'analyse doit être rapporté par nature de l'animal selon les libellés prévus au point 2.1.5.2.

Si, à l'issue de la première détermination effectuée conformément au protocole d'observation établi dans le schéma 3, plus de 5 particules d'invertébrés terrestres sont détectées, il n'est pas nécessaire de procéder à une seconde détermination, et le résultat de l'analyse doit être rapporté selon les libellés prévus au point 2.1.5.3 pour cette nature.

▼M8

Dans tous les autres cas, y compris lorsque aucune déclaration du contenu n'a été fournie au laboratoire, une seconde détermination doit être effectuée à partir d'un nouveau sous-échantillon. Si, à l'issue de la deuxième détermination effectuée conformément au protocole d'observation établi dans le schéma 2, ou le schéma 3 selon le cas, la somme des particules animales d'une nature donnée détectées sur l'ensemble des deux déterminations est supérieure à 10, le résultat de l'analyse doit être rapporté par nature de l'animal selon les libellés prévus au point 2.1.5.3. Dans le cas contraire, le résultat de l'analyse doit être rapporté par nature de l'animal selon les libellés prévus au point 2.1.5.2.

2.1.5. *Expression des résultats*

Lorsqu'il rapporte les résultats, le laboratoire doit indiquer le type de matière sur lequel l'analyse a porté (résidu, matières flottantes, matières flottantes finales ou matière première). Le rapport doit indiquer clairement le nombre de déterminations qui ont été effectuées et si le tamisage des fractions avant la préparation des lames, conformément au point 2.1.3.4.3., premier tiret, troisième alinéa, ou au point 2.1.3.4.4, troisième tiret, n'a pas été effectué.

Le rapport du laboratoire doit contenir au minimum des informations concernant la présence de constituants dérivés de vertébrés terrestres et de poissons.

Les différents cas doivent être présentés de la façon suivante:

2.1.5.1. Aucune particule animale d'une nature donnée n'a été détectée:

- «L'échantillon soumis à l'analyse ne contient aucune particule dérivée de vertébrés terrestres détectable au microscope optique.»
- «L'échantillon soumis à l'analyse ne contient aucune particule dérivée de poisson détectable au microscope optique.»
- «L'échantillon soumis à l'analyse ne contient aucune particule dérivée d'invertébrés terrestres détectable au microscope optique.»

2.1.5.2. Entre 1 et 5 particules animales d'une nature donnée ont été détectées alors qu'une seule détermination a été effectuée, ou entre 1 et 10 particules d'une nature donnée ont été détectées à la suite de deux déterminations [le nombre de particules détectées est inférieur à la limite de décision fixée dans le MON de l'EURL-AP et publiée sur son site web]:

Lorsqu'une seule détermination a été effectuée:

- «L'échantillon soumis à l'analyse ne contient pas plus de 5 particules dérivées de vertébrés terrestres détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [de l'os, du cartilage, du muscle, des poils, de la corne, autre chose (préciser de quoi il s'agit)]. Cette présence faible est inférieure à la limite de décision fixée pour cette méthode d'examen au microscope.»
- «L'échantillon soumis à l'analyse ne contient pas plus de 5 particules dérivées de poisson détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [des arêtes, des écailles de poisson, du cartilage, du muscle, des otolithes, des branchies, autre chose (préciser de quoi il s'agit)]. Cette présence faible est inférieure à la limite de décision fixée pour cette méthode d'examen au microscope.»

▼ **M8**

Lorsque deux déterminations ont été effectuées:

- «L'échantillon soumis à l'analyse dans le cadre de deux déterminations ne contient pas plus de 10 particules dérivées de vertébrés terrestres détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [de l'os, du cartilage, du muscle, des poils, de la corne, autre chose (préciser de quoi il s'agit)]. Cette présence faible est inférieure à la limite de décision fixée pour cette méthode d'examen au microscope.»
- «L'échantillon soumis à l'analyse dans le cadre de deux déterminations ne contient pas plus de 10 particules dérivées de poisson détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [des arêtes, des écailles de poisson, du cartilage, du muscle, des otolithes, des branchies, autre chose (préciser de quoi il s'agit)]. Cette présence faible est inférieure à la limite de décision fixée pour cette méthode d'examen au microscope.»
- «L'échantillon soumis à l'analyse dans le cadre de deux déterminations ne contient pas plus de 10 particules dérivées d'invertébrés terrestres détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [des fragments de cuticules, des parties de bouche, du muscle, des structures trachéales, autre chose (préciser de quoi il s'agit)]. Cette présence faible est inférieure à la limite de décision fixée pour cette méthode d'examen au microscope.»

Par ailleurs:

- En cas de prètamisage de l'échantillon, le rapport de laboratoire doit mentionner la fraction (fraction tamisée, fraction de granulés ou de bouchons) dans laquelle les particules animales ont été détectées, dans la mesure où seule la détection de particules animales dans la fraction tamisée peut être le signe d'une contamination de l'environnement.
- Lorsque seules sont détectées des particules animales qui ne peuvent pas être classées comme provenant de vertébrés terrestres ou de poissons (par exemple, des fibres musculaires), le rapport doit indiquer que seules de telles particules animales ont été détectées et qu'il ne peut être exclu qu'elles proviennent de vertébrés terrestres.

- 2.1.5.3. Plus de 5 particules animales d'une nature donnée ont été détectées alors qu'une seule détermination a été effectuée, ou plus de 10 particules d'une nature donnée ont été détectées à la suite de deux déterminations:

Lorsqu'une seule détermination a été effectuée:

- «L'échantillon soumis à l'analyse contient plus de 5 particules dérivées de vertébrés terrestres détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [de l'os, du cartilage, du muscle, des poils, de la corne, autre chose (préciser de quoi il s'agit)].»
- «L'échantillon soumis à l'analyse contient plus de 5 particules dérivées de poisson détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [des arêtes, des écailles de poisson, du cartilage, du muscle, des otolithes, des branchies, autre chose (préciser de quoi il s'agit)].»
- «L'échantillon soumis à l'analyse contient plus de 5 particules dérivées d'invertébrés terrestres détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [des fragments de cuticules, des parties de bouche, du muscle, des structures trachéales, autre chose (préciser de quoi il s'agit)].»

▼ M8

Lorsque deux déterminations ont été effectuées:

- «L'échantillon soumis à l'analyse dans le cadre de deux déterminations contient plus de 10 particules dérivées de vertébrés terrestres détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [de l'os, du cartilage, du muscle, des poils, de la corne, autre chose (préciser de quoi il s'agit)].»
- «L'échantillon soumis à l'analyse dans le cadre de deux déterminations contient plus de 10 particules dérivées de poisson détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [des arêtes, des écailles de poisson, du cartilage, du muscle, des otolithes, des branchies, autre chose (préciser de quoi il s'agit)].»
- «L'échantillon soumis à l'analyse dans le cadre de deux déterminations contient plus de 10 particules dérivées d'invertébrés terrestres détectables au microscope optique. Les particules ont été identifiées comme étant... [des fragments de cuticules, des parties de bouche, du muscle, des structures trachéales, autre chose (préciser de quoi il s'agit)].»

Par ailleurs:

- En cas de prétamassage de l'échantillon, le rapport de laboratoire doit mentionner la fraction (fraction tamisée, fraction de granulés ou de bouchons) dans laquelle les particules animales ont été détectées, dans la mesure où seule la détection de particules animales dans la fraction tamisée peut être le signe d'une contamination de l'environnement.
- Lorsque seules sont détectées des particules animales qui ne peuvent pas être classées comme provenant de vertébrés terrestres ou de poissons (par exemple, des fibres musculaires), le rapport doit indiquer que seules de telles particules animales ont été détectées et qu'il ne peut être exclu qu'elles proviennent de vertébrés terrestres.

▼ M2

2.2. **Amplification en chaîne par polymérase**

2.2.1. *Principe*

Des fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN) d'origine animale susceptibles d'être présents dans les matières premières pour aliments des animaux et les aliments composés pour animaux sont détectés selon une technique d'amplification génique (amplification en chaîne par polymérase, PCR), en ciblant des séquences d'ADN spécifiques par espèce.

L'amplification en chaîne par polymérase nécessite tout d'abord une étape d'extraction de l'ADN. L'extrait d'ADN ainsi obtenu est ensuite soumis à l'étape d'amplification, afin de détecter l'espèce animale visée par l'essai.

2.2.2. *Réactifs et appareillage*

2.2.2.1. Réactifs

2.2.2.1.1. Réactifs pour l'étape d'extraction de l'ADN

Seuls les réactifs approuvés par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiés sur son site internet doivent être utilisés.

2.2.2.1.2. Réactifs pour l'étape d'amplification génique

▼ **M2**

2.2.2.1.2.1. Amorces et sondes

Seules les amorces et les sondes présentant des séquences d'oligonucléotides validées par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux doivent être utilisées ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Mélange maître

Seules des solutions de mélanges maîtres ne contenant pas de réactifs susceptibles de fausser les résultats en raison de la présence d'ADN animal doivent être utilisées ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Réactifs de décontamination

2.2.2.1.2.3.1. Solution d'acide chlorhydrique (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Eau de Javel (solution d'hypochlorite de sodium à 0,15 % de chlore actif)

2.2.2.1.2.3.3. Réactifs de décontamination non corrosifs pour des dispositifs coûteux tels que des balances de précision (exemple: DNA Erase™ de MP Biomedicals)

2.2.2.2. Appareillage

2.2.2.2.1. Balance de précision à 0,001 g

2.2.2.2.2. Équipement de broyage

2.2.2.2.3. Thermocycleur permettant la PCR en temps réel

2.2.2.2.4. Microcentrifugeuse pour tubes de microcentrifugation

2.2.2.2.5. Ensemble de micropipettes permettant d'introduire à la pipette de 1 µl à 1 000 µl

2.2.2.2.6. Matériel en plastique standard de biologie moléculaire: tubes de microcentrifugation, embouts à filtres pour micropipettes, microplaques adaptées au thermocycleur.

2.2.2.2.7. Congélateurs pour la conservation des échantillons et des réactifs

2.2.3. *Échantillonnage et préparation des échantillons*

2.2.3.1. Échantillonnage

Utiliser un échantillon représentatif prélevé conformément aux dispositions fixées à l'annexe I.

2.2.3.2. Préparation de l'échantillon

Effectuer la préparation d'échantillons de laboratoire précédant l'extraction de l'ADN dans le respect des exigences fixées à l'annexe II. Au moins 50 g de l'échantillon doivent être séparés en sous-échantillons destinés à être analysés puis broyés.

Conformément à la norme ISO 24276, l'échantillon doit être préparé dans une salle différente de celles qui sont utilisées pour l'extraction de l'ADN et les réactions d'amplification génique.

Préparer deux prises d'essai d'au moins 100 mg chacune.

2.2.4. *Extraction de l'ADN*

L'extraction de l'ADN doit être effectuée sur chaque prise d'essai préparée suivant les procédures opérationnelles normalisées établies par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiées sur son site internet.

Conformément à la norme ISO 24276, deux témoins d'extraction doivent être préparés pour chaque série d'extractions:

- un témoin d'extraction à blanc,
- un témoin positif d'extraction de l'ADN.

⁽¹⁾ La liste des amorces et sondes pour chaque espèce animale ciblée par l'essai est disponible sur le site web du laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux.

⁽²⁾ Des exemples de mélanges maîtres utilisables sont disponibles sur le site web du laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux.

▼ **M2**2.2.5. *Amplification génique*

L'amplification génique doit être effectuée suivant les méthodes validées pour chaque espèce devant être identifiée. Ces méthodes sont fixées dans les procédures opérationnelles normalisées établies par le laboratoire de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiées sur son site internet. Chaque extrait d'ADN doit être analysé au moins à deux dilutions différentes afin d'évaluer l'inhibition.

Conformément à la norme ISO 24276, deux témoins d'amplification doivent être préparés pour chaque espèce cible:

- un témoin positif de l'ADN cible doit être utilisé pour chaque plaque ou série d'épreuves PCR,
- un témoin du réactif d'amplification (également appelé «témoin négatif») doit être utilisé pour chaque plaque ou série d'épreuves PCR.

2.2.6. *Interprétation et expression des résultats*

Lorsqu'il rapporte les résultats, le laboratoire doit indiquer au moins la masse des prises d'essai utilisées, la technique d'extraction utilisée, le nombre de déterminations effectuées et la limite de détection de la méthode.

Les résultats ne doivent pas être interprétés et rapportés si le témoin positif d'extraction de l'ADN et le témoin positif de l'ADN cible ne donnent pas de résultats positifs pour la cible faisant l'objet des essais alors que le témoin du réactif d'amplification est négatif.

Si les résultats des deux prises d'essai ne sont pas cohérents, renouveler au moins la phase d'amplification génique. Si le laboratoire soupçonne que les extraits d'ADN peuvent être la cause de l'incohérence des résultats, une nouvelle extraction d'ADN suivie d'une amplification génique doit être effectuée avant l'interprétation des résultats.

L'expression définitive des résultats repose sur l'intégration et l'interprétation des résultats des deux prises d'essai, conformément aux procédures opérationnelles normalisées établies par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux et publiées sur son site internet.

2.2.6.1. *Résultat négatif*

Un résultat négatif est rapporté comme suit:

Aucun ADN de X n'a été détecté dans l'échantillon soumis à l'analyse (X étant l'espèce animale ou le groupe d'espèces animales visé par l'essai).

2.2.6.2. *Résultats positifs*

Un résultat positif est rapporté comme suit:

De l'ADN de X a été détecté dans l'échantillon soumis à l'analyse (X étant l'espèce animale ou le groupe d'espèces animales visé par l'essai).

▼ **M9***ANNEXE VII***MÉTHODE DE CALCUL DE LA VALEUR ÉNERGÉTIQUE DES ALIMENTS COMPOSÉS DESTINÉS À LA VOLAILLE****1. MODE DE CALCUL ET EXPRESSION DE LA VALEUR ÉNERGÉTIQUE**

La valeur énergétique des aliments composés destinés à la volaille doit être calculée selon la formule ci-après, à partir des pourcentages de certains composants analytiques des aliments. Cette valeur est exprimée en mégajoules (MJ), d'énergie métabolisable (EM), corrigée en azote, par kilogramme d'aliment composé:

$\text{MJ/kg d'EM} = 0,1551 \times \% \text{ protéine brute} + 0,3431 \times \% \text{ matières grasses brutes} + 0,1669 \times \% \text{ amidon} + 0,1301 \times \% \text{ sucres totaux (exprimés en saccharose).}$

2. TOLÉRANCES APPLICABLES AUX VALEURS DÉCLARÉES

Si, à la suite des contrôles officiels, on constate un écart entre le résultat du contrôle et la valeur énergétique déclarée constituant une augmentation ou une diminution de la valeur énergétique de l'aliment, une tolérance de 0,4 MJ/kg d'énergie métabolisable est appliquée.

3. EXPRESSION DU RÉSULTAT

Le résultat obtenu, après application de la formule ci-avant, est indiqué à une décimale près.

4. MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET D'ANALYSE

Le prélèvement de l'échantillon de l'aliment composé et la détermination des teneurs en composants analytiques indiquées dans la méthode de calcul sont réalisés respectivement selon les méthodes d'échantillonnage et d'analyse de l'Union destinées au contrôle officiel des aliments pour animaux.

Doivent être appliqués:

- pour le dosage des matières grasses brutes: le procédé B de la méthode de dosage des matières grasses brutes, prévu au point G de l'annexe III,
- pour le dosage de l'amidon: la méthode polarimétrique, prévue au point K de l'annexe III.

MÉTHODE DE CALCUL DE LA VALEUR ÉNERGÉTIQUE DES MATIÈRES PREMIÈRES POUR ALIMENTS DES ANIMAUX ET DES ALIMENTS COMPOSÉS DESTINÉS AUX CHIENS ET AUX CHATS

La valeur énergétique des matières premières pour aliments des animaux et des aliments composés destinés aux chiens et aux chats est calculée conformément à la norme EN 16967 «Aliments pour animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Équations prédictives de l'énergie métabolisable dans les matières premières pour aliments et les aliments composés (aliments pour animaux de compagnie) pour chats et chiens, y compris les aliments diététiques».

▼ **M9**▼ **B***ANNEXE IX***TABLEAUX DE CORRESPONDANCE VISÉS À L'ARTICLE 6****1. Directive 71/250/CEE**

Directive 71/250/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er} , premier alinéa	Article 3
Article 1 ^{er} , deuxième alinéa	Article 2
Article 2	—
Article 3	—
Annexe, point 1	Annexe II
Annexe, point 2	—
Annexe, point 3	—
Annexe, point 4	Annexe III, point O
Annexe, point 5	Annexe III, point M
Annexe, point 6	Annexe III, point N
Annexe, point 7	Annexe III, point Q
Annexe, point 9	Annexe III, point K
Annexe, point 10	—
Annexe, point 11	—
Annexe, point 12	Annexe III, point J
Annexe, point 14	Annexe III, point D
Annexe, point 16	—

2. Directive 71/393/CEE

Directive 71/393/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 3
Article 2	—
Article 3	—
Annexe, point 1	Annexe III, point A
Annexe, point 2	Annexe III, point E
Annexe, point 3	Annexe III, point P
Annexe, point 4	Annexe III, point H

3. Directive 72/199/CEE

Directive 72/199/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 3
Article 2	—
Article 3	—
Article 4	—
Annexe I, point 1	Annexe III, point L
Annexe I, point 2	Annexe III, point C
Annexe I, point 3	—
Annexe I, point 4	—
Annexe I, point 5	Annexe V, point A
Annexe II	—

4. **Directive 73/46/CEE**

Directive 73/46/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 3
Article 3	—
Article 4	—
Annexe I, point 1	Annexe III, point B
Annexe I, point 2	—
Annexe I, point 3	Annexe III, point I

5. **Directive 76/371/CEE**

Directive 76/371/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 1 ^{er}
Article 2	—
Article 3	—
Annexe	Annexe I

6. **Directive 76/372/CEE**

Directive 76/372/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	—
Article 2	—
Article 3	—
Annexe	—

7. **Directive 78/633/CEE**

Directive 78/633/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 3
Article 2	—
Article 3	—
Annexe, point 1	—
Annexe, point 2	—
Annexe, point 3	Annexe IV, point C

8. **Directive 81/715/CEE**

Directive 81/715/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	—
Article 2	—
Article 3	—
Annexe	—

9. **Directive 84/425/CEE**

Directive 84/425/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	—
Article 2	—
Article 3	—
Annexe	—

10. **Directive 86/174/CEE**

Directive 86/174/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 4
Article 2	—
Article 3	—
Annexe	Annexe VII

11. **Directive 93/70/CEE**

Directive 93/70/CEE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 3
Article 2	—
Article 3	—
Annexe	Annexe IV, point D

12. **Directive 93/117/CE**

Directive 93/117/CE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Articles 3 et 5
Article 2	—
Article 3	—
Annexe, point 1	Annexe IV, point E
Annexe, point 2	Annexe VIII, point A

13. **Directive 98/64/CE**

Directive 98/64/CE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Articles 3 et 5
Article 2	—
Article 3	—
Article 4	—
Annexe, partie A	Annexe III, point F
Annexe, partie C	Annexe VIII, point B

14. **Directive 1999/27/CE**

Directive 1999/27/CE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Articles 3 et 5
Article 2	—
Article 3	—
Article 4	—
Article 5	—
Article 6	—
Article 7	—
Annexe, partie A	Annexe VIII, point C
Annexe, partie B	Annexe IV, point F
Annexe, partie C	Annexe VIII, point D

▼B**15. Directive 1999/76/CE**

Directive 1999/76/CE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 3
Article 2	—
Article 3	—
Article 4	—
Annexe	Annexe IV, point G

16. Directive 2000/45/CE

Directive 2000/45/CE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 3
Article 2	—
Article 3	—
Article 4	—
Annexe, partie A	Annexe IV, point A
Annexe, partie B	Annexe IV, point B
Annexe, partie C	Annexe III, point G

17. Directive 2002/70/CE

Directive 2002/70/CE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 1 ^{er}
Article 2	Articles 2 et 3
Article 3	—
Article 4	—
Article 5	—
Annexe I	Annexe I et Annexe V, point B.I
Annexe II	Annexe II et Annexe V, point B.II

18. Directive 2003/126/CE

Directive 2003/126/CE	Le présent règlement
Article 1 ^{er}	Article 3
Article 2	—
Article 3	—
Article 4	—
Article 5	—
Article 6	—
Annexe	Annexe VI