DIRECTIVE 1999/76/CE DE LA COMMISSION

du 23 juillet 1999

portant fixation d'une méthode communautaire pour le dosage du lasalocide-sodium dans les aliments des animaux

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

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

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

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

(2) considérant que la directive 70/524/CEE du Conseil du 23 Novembre 1970 concernant les additifs dans l'alimentation des animaux [2], modifiée en dernier lieu par le règlement (CE) nº 866/1999 de la Commission [3], prescrit que la teneur en lasalocide-sodium doit être indiquée dans l'étiquetage lorsque ces substances sont ajoutées aux prémélanges ou aux aliments composés des animaux;

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

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

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

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

Article 2

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

Les États membres appliquent les dispositions en cause à compter du 1er février 2000.

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

Article 3

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

Article 4

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 23 juillet 1999.

Par la Commission

Franz FISCHLER

Membre de la Commission

[1] JO L 170 du 3.8.1970, p. 2.
[2] JO L 270 du 14.12.1970, p. 1.
[3] JO L 108 du 27.4.1999, p. 20.

ANNEXE

DOSAGE DU LASALOCIDE-SODIUM

Sel sodique de polyéther de l'acide monocarboxylique, produit par Streptomyces lasaliensis

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de doser le lasalocide-sodium dans les aliments pour animaux et les prémélanges. La limite de détection est de 5 mg/kg, la limite de dosage est de 30 mg/kg.

2. Principe

Le lasalocide-sodium est extrait de l'échantillon par du méthanol acidifié et dosé par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inversée à l'aide d'un détecteur spectrofluorimétrique.

3. Réactifs

3.1. Phosphate monopotassique (KH_2P0_4)

3.2. Acide orthophosphorique, w = 85 %

3.3. Solution d'acide orthophosphorique, σ = 20 %

Diluer 23.5 ml d'acide orthophosphorique(3.2) dans de l'eau et porter à 100 ml.

3.4. 6-méthyl-2-heptylamine (1,5-diméthylhexylamine), w = 99 %

3.5. Méthanol, de qualité CLHP

3.6. Acide chlorhydrique, p_{20} 1,19 g/ml

3.7. Solution tampon de phosphate, c = 0,01 mol/1

Dissoudre 1,36 g de KH_2PO_4 (3.1) dans 500 ml d'eau (3.11), ajouter 3,5 ml d'acide orthophosphorique (3.2) et 10,0 ml de 6-méthyl-2-heptylamine (3.4). Ajuster le pH à 4,0 à l'aide de la solution d'acide orthophosphorique (3.3), diluer à l'eau et porter à 1000 ml (3.11).

3.8. Méthanol acidifié

Transférer 5,0 ml d'acide chlorhydrique (3.6) dans un ballon jaugé de 1 000 ml, porter au trait avec du méthanol (3.5) et mélanger. La solution doit être renouvelée pour chaque usage.

3.9. Phase mobile pour CLHP, solution tampon de phosphate et méthanol 5 + 95 (V + V)

Mélanger 5 ml de solution tampon de phosphate (3.7) avec 95 ml de méthanol (3.5).

3.10. Substance étalon: lasdalocide-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 de l'étalon de lasalocide-sodium, 500 µg/ml

Peser à 0,1 mg près 50 mg de lasalocide-sodium (3.10) dans un ballon jaugé de 100 ml, dissoudre dans le méthanol acidifié (3.8), porter au trait avec le même solvant et mélanger. La solution doit être renouvelée pour chaque usage.

3.10.2. Solution étalon intermédiaire de lasalocide-sodium, 50 µg/ml

Pipetter 10,0 ml de la solution mère de l'étalon (3.10.1) dans un ballon jaugé de 100 ml, porter au trait avec le méthanol acidifié (3.8) et mélanger. La solution doit être renouvelée pour chaque usage.

3.10.3. Solutions d'étalonnage

Transférer 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 et 10,0 ml de la solution étalon intermédiaire (3.10.2) dans une série de ballons jaugés de 50 ml. Porter au trait avec le méthanol acidifié (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 et doivent être renouvelées pour chaque usage.

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 de 0,45 µm

4.3. Équipement CLHP avec système à injection permettant d'injecter des volumes de 20 µl

4.3.1. Colonne pour chromatographie liquide de 125 mm x 4 mm, en phase inversée C18, remplie de 5 µm ou équivalent

4.3.2. Spectrofluorimètre avec correction des longueurs d'onde variables (sollicitation et émission)

5. **Mode opératoire**

5.1. Généralités

5.1.1. Aliment témoin

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

5.1.2. Test de récupération

Effectuer un test de récupération par analyse de l'aliment témoin auquel a été ajoutée une quantité de lasalocide-sodium similaire à celle présente dans l'échantillon. Pour obtenir une concentration de 100 mg/kg, transférer 10,0 ml de la solution mère de l'étalon (3.10.1) dans un ballon conique de 250 ml et concentrer la solution par évaporation à environ 0,5 ml. Ajouter 50 g de l'aliment témoin, mélanger soigneusement et laisser reposer 10 minutes tout en mélangeant de nouveau plusieurs fois avant de procéder à l'extraction (5.2).

Alternativement, en l'absence d'un aliment témoin de même type que celui de l'échantillon (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 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 des animaux

Peser à 0,01 g près de 5 g à 40 g de l'échantillon dans un ballon conique de 250 ml avec bouchon. Y pipetter 100,0 ml de méthanol acidifié (3.8). Boucher légèrement et agiter pour obtenir une dispersion. Placer le ballon dans le bain ultrasonique (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 (4.2) dans un récipient approprié. Procéder au dosage par CLHP (5.3).

5.2.2. Prémélanges

Peser à 0,001 g près 2 g environ de prémélange non broyé dans un ballon jaugé de 250 ml. Ajouter 100,0 ml de méthanol acidifié (3.8) et agiter pour obtenir une dispersion. Placer le ballon et son contenu dans le bain ultrasonique (4.1) à 40 °C environ pendant 20 minutes, l'enlever et laisser refroidir à température ambiante. Porter au trait avec le méthanol acidifié (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 (4.2). Diluer un volume adéquat de filtrat clair avec le méthanol acidifié (3.8), de manière à obtenir une solution d'essai finale contenant environ 4 µg/ml de lasalocide-sodium. Procéder au dosage par CLHP (5.3).

5.3. Dosage CLHP

5.3.1. Paramètres

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

Colonne chromatographique liquide (4.3.1):	125 mm × 4 mm, en phase inversée C18, remplie de 5 µm ou équivalent
Phase mobile (3.9):	Mélange de solution tampon de phosphate (3.7) et de méthanol (3.5), 5 + 95 (V + V)
Débit:	1,2 ml/min
Longueur d'onde de détection:	
— Sollicitation	310 nm
— Émission	419 nm
Volume d'injection	20 µl

Vérifier la stabilité du système chromatographique en injectant plusieurs fois la solution d'étalonnage (3.10.3) contenant 4.0 µg/ml jusqu'à obtention de hauteurs (surfaces) de pic et de temps de rétention constants.

5.3.2. Courbe d'étalonnage

Injecter chaque solution d'étalonnage (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 de l'échantillon

Injecter l'extrait de l'échantillon (5.2.1 ou 5.2.2) plusieurs fois en utilisant le même volume que celui retenu pour les solutions d'étalonnage et déterminer la hauteur (surface) moyenne des pics du lasalocide-sodium.

6. **Expression des résultats**

À partir de la hauteur (surface) moyenne des pics du lasalocide-sodium de la solution de l'échantillon (5.3.3), déterminer la teneur en lasalocide-sodium (µg/ml) par référence à la courbe d'étalonnage.

6.1. Aliments des animaux

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

$$w = \frac{\beta \cdot V_1}{m} \text{ (mg/kg)}$$

formule dans laquelle:

β =teneur en lasalocide-sodium de la solution de l'échantillon (5.2.1) en µg/ml

V_1 =volume de l'extrait de l'échantillon selon 5.2.1 en ml (soit 100)

m =masse de la portion d'essai en g

6.2. Prémélanges

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

$$w = \frac{\beta \cdot V_2 \cdot f}{m} \text{ (mg/kg)}$$

formule dans laquelle:

β =teneur en lasalocide-sodium de la solution de l'échantillon (5.2.2) en µg/ml

V_2 =volume de l'extrait de l'échantillon selon 5.2.2 en ml (soit 250)

f =facteur de dilution selon 5.2.2

m =masse de la portion d'essai en g

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 de l'échantillon (5.2.1 ou 5.2.2) est additionné d'une quantité appropriée de la solution d'étalonnage (3.10.3). La quantité de lasalocide-sodium ajoutée doit être semblable à la quantité de lasalocide-sodium constatée dans l'extrait de l'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 ± 10 % de la largeur initiale du pic de lasalocide-sodium de l'extrait de l'échantillon non supplémenté.

7.2. Répétabilité

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

— 15 % du résultat supérieur pour les teneurs en lasalocide-sodium situées entre 30 mg/kg et 100 mg/kg,

— 15 mg/kg pour les teneurs en lasalocide-sodium situées entre 100 mg/kg et 200 mg/kg,

— 7,5 % du résultat supérieur pour les teneurs en lasalocide-sodium de plus de 200 mg/kg.

7.3. Récupération

Pour un échantillon (témoin) supplémenté, le rendement doit être au moins de 80 %. Pour les échantillons de prémélanges supplémentés, le rendement doit être au moins de 90 %.

8. **Résultats d'une étude interlaboratoire**

Une étude interlaboratoire [1] a été organisée au cours de laquelle 2 prémélanges (échantillons 1 et 2) et 5 aliments (échantillons 3-7) ont été analysés par 12 laboratoires. Chaque échantillon a fait l'objet d'une analyse en double. Les résultats de l'étude figurent ci après:

[1] Analyst, 1995, 120, 2175-2180.

	Echantillon 1 Prémélange poulets	Echantillon 2 Prémélange dindes	Echantillon 3 Granulés dindes	Echantillon 4 Miettes poulets	Echantillon 5 Aliment dindes	Echantillon 6 Aliment volaille A	Echantillon 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
Teneur nominale (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 la répétabilité
S_R: écart type de la reproductibilité
CV_r: coefficient de variation de la répétabilité, %
CV_R: coefficient de variation de la reproductibilité, %
* teneur déclarée par le fabricant
+ aliment préparé au laboratoire