II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

COMMISSION

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 14 juillet 1987

arrêtant les méthodes à utiliser pour la recherche de résidus de substances à effet hormonal et de substances à effet thyréostatique

(87/410/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu la directive 85/358/CEE du Conseil, du 16 juillet 1985, complétant la directive 81/602/CEE concernant l'interdiction de certaines substances à effet hormonal et des substances à effet thyréostatique [1], modifiée par le règlement (CEE) n° 3768/85 [2], et notamment son article 5,

considérant que, en vertu de l'article 5 paragraphe 2 de la directive 85/358/CEE, il incombe à la Commission de déterminer selon la procédure prévue à l'article 11 de ladite directive les méthodes d'analyse des échantillons à utiliser pour la recherche des résidus des substances à effet hormonal et des substances à effet thyréostatique ;

considérant que, selon l'article 4 paragraphe 1 point b) de la directive 64/433/CEE du Conseil, du 26 juin 1964, relative à des problèmes sanitaires en matière d'échanges intracommunautaires de viandes fraîches [3], modifiée en dernier lieu par la directive 86/587/CEE [4], et l'article 11 paragraphe 4 deuxième alinéa de la directive 85/397/CEE du Conseil, du 5 août 1985, concernant les problèmes sanitaires et de police sanitaire lors d'échanges intracommunautaires de lait traité thermiquement [5], modifiée par le règlement (CEE) n° 3768/85, les examens des résidus doivent être effectués selon des méthodes scientifiquement reconnues, notamment celles qui sont définies dans des directives communautaires ou dans d'autres normes internationales ;

considérant que la détermination de méthodes d'analyse des échantillons comprend la définition des procédés d'analyse à utiliser, des règles à suivre pour l'échantillonnage et des critères relatifs à la mise en œuvre des analyses ;

considérant que les procédés d'analyse retenus doivent être suffisamment sensibles pour détecter la présence de résidus de substances à effet hormonal et de substances à effet thyréostatique ;

considérant que l'échantillonnage constitue une partie essentielle de la méthode d'analyse ; qu'il convient dès lors d'arrêter des règles relatives à la collecte des échantillons ;

considérant que le Conseil a adopté le 20 décembre 1985 la directive 85/591/CEE concernant l'introduction de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle des denrées destinées à l'alimentation humaine [6] ; que, aux fins de la présente décision, il convient de tenir compte des critères prévus au point 1 de l'annexe de la directive précitée ;

considérant que les mesures prévues par la présente décision sont conformes à l'avis du comité vétérinaire permanent,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION :

Article premier

Les procédés d'analyse des échantillons agréés pour la recherche de résidus de substances à effet hormonal et de substances à effet thyréostatique sont les suivants :

[1] JO n° L 191 du 23. 7. 1985, p. 46.
[2] JO n° L 362 du 31. 12. 1985, p. 8.
[3] JO n° 121 du 29. 7. 1964, p. 2012/64.
[4] JO n° L 339 du 2. 12. 1986, p. 26.
[5] JO n° L 226 du 24. 8. 1985, p. 13.
[6] JO n° L 372 du 31. 12. 1985, p. 50.

— immuno-essai (IA),
— chromatographie en couche mince (CCM),
— chromatographie liquide haute performance (CLHP),
— chromatographie en phase gazeuse (CPG),
— spectrométrie de masse (SM),
— spectrométrie (SP).

Article 2

La collecte des échantillons doit s'effectuer selon les règles suivantes :

1) la taille des échantillons doit être suffisante pour permettre une analyse appropriée et pour permettre de répéter cette analyse et de faire des tests de confirmation ;

2) les échantillons doivent être marqués de manière telle que leur identification soit possible à tous les stades de l'examen ;

3) les méthodes de conditionnement, de conservation et de transport des échantillons doivent maintenir leur intégrité et ne pas nuire aux résultats de l'examen.

Article 3

Les critères relatifs à la mise en œuvre des analyses sont indiqués à l'annexe.

Article 4

La présente décision sera réexaminée avant le 1er janvier 1991 afin de tenir compte de l'évolution des connaissances scientifiques et techniques.

Article 5

Les États membre sont destinataires de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 14 juillet 1987.

Par la Commission
Frans ANDRIESSEN
Vice-président

ANNEXE

CHAPITRE PREMIER : CRITÈRES GÉNÉRAUX

Introduction

Pour apprécier objectivement les méthodes de détection des résidus, il faut disposer de données quantitatives concernant certains critères types des procédures: Pour certains de ces critères, il faut en outre prévoir des exigences quantitatives concernant en particulier la finalité de la méthode (par exemple : routine, détermination quantitative, confirmation). Dans le présent chapitre, les critères figurant à l'annexe de la directive 85/591/CEE du Conseil sont définis comme devant s'appliquer à l'examen des méthodes de routine à employer pour l'analyse des résidus de substances à effet hormonal et de substances à effet thyréostatique.

Définition

i) *Spécificité*

La spécificité est la capacité pour une méthode de discerner l'analyte à mesurer des autres substances.

Cette caractéristique est essentiellement une fonction du principe de mesure utilisé. Les informations concernant la spécificité doivent au moins faire état de toutes substances susceptibles de donner un signal lorsque le principe de mesure décrit est utilisé (par exemple : homologues, analogues, produits métaboliques du résidu en cause). Les informations concernant la spécificité doivent permettre de déterminer quantitativement dans quelle mesure la méthode permet de distinguer l'analyte des autres substances dans les conditions expérimentales.

ii) *Exactitude*

Dans le présent document, l'exactitude se réfère à l'exactitude de la moyenne. La définition utilisée ici est donnée dans la norme ISO 3534-1977 au point 2.83 (exactitude de la moyenne : le degré de concordance entre la valeur réelle et la valeur moyenne qu'on obtiendrait en répétant ce procédé expérimental de multiples fois).

Note : Les principales limites pour l'exactitude sont :

a) les erreurs accidentelles ;

b) les erreurs systématiques.

Pour un nombre très large d'essais (par exemple : faible récupération), l'exactitude de la moyenne approche l'erreur systématique.

Pour une analyse documentaire d'une méthode, le nombre d'essais doit être spécifié.

La mesure de l'exactitude à utiliser est la différence entre la valeur moyenne mesurée pour le matériel de référence et la valeur réelle, exprimée en pourcentage de la valeur réelle.

iii) Précision : Répétabilité dans le même laboratoire et reproductibilité des variabilités au sein du même laboratoire ou dans des laboratoires différents.

Le terme général utilisé en statistique « précision » est utilisé conformément à la définition de la norme ISO 3534-1977, au point 2.84 (précision : le degré de concordance entre les résultats obtenus par application répétée du procédé expérimental dans les conditions prescrites).

Conformément à l'annexe de la directive 85/591/CEE, les valeurs caractérisant la précision des méthodes d'analyse dont l'adoption doit être envisagée conformément aux dispositions de la directive sont déduites d'un essai collectif conduit de préférence selon la norme ISO 5725-1986. À cet effet, les termes « répétabilité » et « reproductibilité » sont ceux définis dans la norme ISO 5725-1986.

Aux fins de présélection des méthodes possibles par analyse documentaire, il suffit de disposer des données sur la répétabilité. À cet effet, le terme répétabilité utilisé ici est celui défini dans la norme ISO 3534-1977 sous le point 2.85 a) [répétabilité : le degré de correspondance entre les résultats successifs obtenus selon la même méthode avec un matériel d'essai identique, dans les mêmes conditions (même opérateur, même appareillage, même laboratoire et intervalles courts)].

La valeur à utiliser au titre de la répétabilité est le coefficient de variation défini dans la norme ISO 3534-1977, au point 2.35 (coefficient de variation : le rapport entre l'écart type et la valeur absolue de la moyenne arithmétique).

iv) *Limite de détection*

La limite de détection représente la teneur minimale mesurée à partir de laquelle il est possible de déduire la présence de l'analyte avec une certitude statistique raisonnable. Elle est égale à la moyenne de la teneur mesurée d'échantillons témoins représentatifs (blancs biologiques) ($n \geq 20$) augmentée de trois fois l'écart-type de la moyenne.

Note : Dans l'hypothèse où il est prévu que des facteurs tels qu'espèce, sexe, âge, etc. peuvent avoir une influence sur les caractéristiques de la méthode, un ensemble de blancs biologiques est requis pour tester chaque population homogène pour laquelle la méthode doit être appliquée.

v) *Sensibilité*

La sensibilité mesure l'aptitude d'une méthode à discerner de faibles différences entre les teneurs en analyte. Dans le présent document, la sensibilité est définie comme étant la pente de la courbe d'étalonnage au niveau recherché.

vi) *Praticabilité et applicabilité*

La praticabilité est une caractéristique non typique d'une méthode d'analyse. Elle est fonction de l'objectif de la méthode et déterminée par des exigences telles que l'utilisation d'échantillons et les coûts.

L'applicabilité concerne une liste de denrées auxquels la méthode envisagée peut s'appliquer telle quelle ou moyennant des modifications mineures.

vii) *Autres critères pouvant être retenus suivant les besoins*

Limite de détermination

La limite de détermination représente la plus petite concentration d'analyte qui, si elle est réellement présente, est détectée avec une certitude statistique raisonnable et peut être identifiée selon les critères d'identification de la méthode.

Uniquement dans le cas où l'exactitude et la précision sont constantes dans un intervalle de concentration situé autour de la limite de détection, la limite de détermination est égale à la moyenne de la teneur mesurée des blancs représentatifs majorée de six fois l'écart type de la moyenne.

Limite de quantification

La limite de quantification représente la plus petite concentration mesurée au-dessus de laquelle une détermination de l'analyte est possible avec un degré déterminé d'exactitude et de répétabilité (dans le même laboratoire).

Exigences relatives à l'exactitude et à la répétabilité

Exactitude

En cas d'analyse répétée de l'échantillon de référence, l'écart de la moyenne par rapport à la valeur réelle, exprimé en pourcentage de la valeur réelle, ne doit pas se situer hors des limites suivante :

	limites
— valeur réelle inférieure ou égale à 1 µg/kg :	— 50 % à + 20 %
— valeur réelle supérieure à 1 µg/kg et inférieure ou égale à 10 µg/kg :	— 30 % à + 10 %
— valeur réelle supérieure à 10 µg/kg :	— 20 % à + 10 %

Répétabilité

En cas d'analyse répétée de l'échantillon de référence, le coefficient de variation (CV) de la moyenne ne doit pas dépasser les valeurs suivantes :

	CV
— moyenne égale ou inférieure à 1 µg/kg :	0,30
— moyenne supérieure à 1 µg/kg et inférieure ou égale à 10 µg/kg :	0,20
— moyenne supérieure à 10 µg/kg :	0,15

Courbes d'étalonnage

Si la méthode à utiliser dépend de courbes d'étalonnage, il convient de fournir les informations suivantes :

— le modèle mathématique qui décrit la courbe d'étalonnage,

— les valeurs chiffrées des paramètres des courbes d'étalonnage avec des intervalles de confiance de 95 % (dans les conditions optimales),

— les intervalles acceptables à l'intérieur desquels les paramètres de la courbe d'étalonnage varient d'un jour à un autre,

— la zone de travail de la courbe d'étalonnage,

— des données relatives à la variance des variables, s'appliquant au moins à la zone de travail de la courbe d'étalonnage.

Sensibilité aux perturbations

Pour toutes les conditions expérimentales qui, dans la pratique, sont sujettes à des variations (exemple : stabilité des réactifs, composition de l'échantillon, pH, température), on indiquera toutes les variations pouvant influencer le résultat de l'analyse.

S'il est connu que certains substances peuvent perturber la détermination de l'analyte, le fait doit être indiqué en même temps que tout moyen proposé pour remédier à cette difficulté. Il est de la plus haute importance que toute perturbation pouvant être provoquée par des composants de la matrice soit analysée. C'est pourquoi au moins la plus grande quantité en « équivalent échantillon » qui ne provoque aucune interférence dans la mesure de l'analyte (après toutes les étapes de purification) doit être indiquée.

Rapport entre les tolérances et les limites analytiques par analyse

Pour des substances caractérisées par une tolérance nulle, la limite de détermination de la méthode d'analyse doit être suffisamment basse pour que les taux de résidus qu'on pourrait généralement prévoir après utilisation illégale soient détectés avec une probabilité d'au moins 95 %.

Pour des substances caractérisées par un niveau de tolérance fixé au niveau physiologique maximal, la limite de quantification ne doit pas dépasser ladite tolérance diminuée de trois fois la valeur de l'écart-type trouvé par la méthode sur un échantillon réglé au niveau de tolérance.

Matériel de référence

Le matériel de référence est un échantillon d'une substance ou un produit simple manufacturé dont une ou plusieurs propriétés sont déterminées avec une exactitude suffisante pour qu'il puisse être utilisé pour calibrer un appareil ou vérifier une méthode de mesure.

La garantie doit être basée sur un processus techniquement valable.

Si du matériel de référence n'est pas disponible, les différents paramètres peuvent être évalués par l'analyse de matériel supplémenté.

CHAPITRE II : CRITÈRES DE QUALITÉ POUR L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. Liste des abréviations et symboles

Termes généraux

CG	= chromatographie en phase gazeuse
CLHP	= chromatographie en phase liquide sous haute pression
CCMHP	= chromatographie sur couche mince à haute performance
SMHR	= spectrométrie de masse à haute résolution
IA	= dosage immunologique
IR	= infrarouge
UV	= ultraviolet
SMFR	= spectrométrie de masse à faible résolution
SM	= spectrométrie de masse
RIA	= dosage radio-immunologique
SP	= spectrométrie, par exemple : système à diodes
CCM	= chromatographie en couche mince
/	= techniques couplées autonomes
—	= techniques couplées en lignes

par exemple : CLHP/CG—SM = CLHP autonome suivie par CG avec SM en ligne

RIA

cpm	= coups par minute
dpm	= désintégrations par minute
T	= radioactivité totale (cpm ou dpm) ajoutée à l'échantillon
B	= radioactivité de la fraction liée d'un échantillon
Bo	= radioactivité de la fraction liée de l'échantillon blanc
B/Bo	= fraction de la radioactivité de la fraction liée d'un échantillon par rapport à celle de l'échantillon blanc (« fraction de liaison par rapport à une liaison nulle »)
% B/Bo	= radioactivité de la fraction liée d'un échantillon, exprimée en pourcentage du blanc
Bo/T	= fraction de la radioactivité de la fraction liée d'un blanc par rapport à l'activité ajoutée (« fraction de la liaison nulle par rapport au total »)
NSB	= liaison non spécifique = liaison aspécifique (LAS)

SM

uma	= unité de masse atomique
IC	= ionisation chimique
IE	= ionisation par impact électronique
DISM	= détection d'ions à l'aide de sondes multiples
M	= masse
Z	= charge
HFB	= acide heptafluorobutyrique ou dérivé d'heptafluorobutyryl
MOX	= dérivé de méthoxine
TMS	= dérivé de triméthylsilyl
MOX-TMS	= dérivés de méthoxine et de triméthylsilyl
F^+	= ion fragment
$(F + 1)^+$	= satellite d'isotope naturel, 1 M/Z supérieur à l'ion fragment de l'isotope principal correspondant
M^+	= ion moléculaire
$(M + 1)^+$	= satellite d'isotope naturel, 1 M/Z supérieur à l'ion moléculaire de l'isotope principal correspondant

2. Introduction

Les critères qualitatifs à utiliser pour l'interprétation des résultats obtenus par les méthodes analytiques sont appliqués par les laboratoires effectuant des tests en vue de la détection de résidus de substances à effet hormonal ou thyréostatique conformément aux conditions du présent chapitre. Les critères de qualité sont destinés à l'analyse qualitative et visent à prévenir de faux résultats positifs. Pour qu'une conclusion soit positive, il faut que les résultats d'analyse correspondent aux critères de qualité fixés pour la méthode de détection utilisée.

3. **Définitions concernant la présence d'un analyte**

3.1. *Analyte :* composant d'un échantillon à tester, dont la présence doit être démontrée. Le terme « analyte » inclut les dérivés formés à partir de l'analyte chaque fois que le cas se présente.

3.2. *Matériel étalon :* substance bien définie d'un degré de pureté le plus élevé possible à utiliser comme substance de référence pour l'analyse.

3.3. *Positif :* la présence de l'analyte dans l'échantillon est prouvée conformément à la méthode lorsque les critères généraux et les critères particuliers pour la méthode de détection en cause sont remplis. Le résultat de l'analyse est alors « positif ».

3.4. *Négatif :* le résultat d'une analyse est considéré « négatif » si tous les critères pour la méthode en cause ne sont pas remplis ou si l'analyse ne permet pas de prouver la présence de l'analyte dans l'échantillon en dessus de la limite de détermination.

3.5. *Co-chromatographie :* appliquer la méthode suivante. Diviser en deux fractions la solution purifiée à tester avant le stade de la chromatographie :

a) une fraction fait l'objet d'une chromatographie en l'état ;

b) ajouter le matériel étalon à identifier à l'autre fraction puis chromatographier ce mélange d'analyte et le matériel de référence.

La quantité de matériel étalon ajouté doit être approximativement égale à la quantité estimative de l'analyte.

4. **Remarques générales concernant la méthode d'analyse**

4.1. *Critères généraux applicables à la méthode*

La méthode doit avoir fait la preuve qu'elle permet de discerner l'analyte parmi tous les éléments perturbateurs contenus dans la matrice à analyser.

Le comportement physique et chimique de l'analyte pendant l'analyse ne devrait pas être différent de celui du matériel étalon placé dans la matrice à analyser.

4.2. *Critères généraux applicables aux techniques de séparation*

Des échantillons de référence contenant des quantités connues des analytes doivent être analysés simultanément avec chaque lot d'échantllons à analyser. Un étalon interne peut aussi être ajouté aux échantillons à analyser.

4.3. *Critère relatif à l'éventuelle préconcentration, purification et séparation physique et/ou chimique autonome*

L'analyte devrait se trouver dans la fraction caractéristique du matériel étalon correspondant contenu dans la matrice appropriée.

4.4. *Critère applicable à une éventuelle séparation en ligne (par exemple CG)*

L'analyte devrait éluer au temps de rétention caractéristique du matériel étalon correspondant contenu dans la matrice appropriée.

4.5. *Préparation de l'échantillon à analyser*

Préparer l'échantillon à analyser à partir de l'échantillon de laboratoire de telle manière que, en cas de présence de l'analyte, les possibilités de la détecter soient maximales.

4.6. *Préparation de la fraction à analyser*

Préparer la fraction à analyser à partir de l'échantillon à analyser de telle manière que, si l'analyte y est présent, les possibilités de le détecter soient maximales.

5. **Exigences de qualité concernant la détermination d'un analyte par RIA**

Pour une pré-sélection :

5.1. Préciser la zone de travail de la courbe d'étalonnage, qui doit généralement couvrir un intervalle de concentration d'au moins dix unités décimales.

5.2. Inclure des échantillons de contrôle dans chaque essai. Taux de concentration : concentrations nulle, faible, moyenne et supérieure de la zone utile. Les résultats de ceux-ci doivent concorder avec les résultats des essais précédents.

5.3. À la limite de détermination, le coefficient de variation pour les échantillons de contrôle doit être inférieur à 0,15.

5.4. Il faut au moins six point d'étalonnage, distribués de façon adéquate le long de la courbe d'étalonnage.

5.5. La récupération doit être contrôlée et déterminée.

5.6. La courbe d'étalonnage doit atteindre sa précision maximale aux environs de la limite de détermination.

5.7. Les paramètres adéquats de contrôle de la qualité doivent correspondre à ceux des essais précédents, exemple : Bo/T, NSB, pente et l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage.

Note : Le respect de ces critères de qualité n'exclut pas la possibilité d'obtenir des résultats faux positifs dus aux erreurs systématiques telles que réactions croisées des anticorps et/ou interférences de matériaux non représentatifs dans l'échantillon.

6. **Critères d'identification d'un analyte par CG**

6.1. L'analyte doit sortir au temps de rétention caractéristique du matériel étalon correspondant.

6.2. Le maximum du pic le plus proche devra être séparé du pic de l'analyte d'une distance au moins égale à la largeur à mi-hauteur maximale du pic de l'analyte.

6.3. Une co-chromatographie supplémentaire dans la phase CG est indispensable à des fins d'identification. En conséquence, seul le pic présumé correspondre à l'analyte doit être intensifié, c'est-à-dire que la largeur à mi-hauteur maximale devrait être la même avec une tolérance de ± 10 % de la largeur originale. Ce critère peut être considéré comme rempli lorsque les temps de rétention sont identiques dans l'intervalle de 10 % de la largeur de pic à mi-hauteur maximale.

7. **Critères d'identification d'un analyte par CCM ou CCMHP**

7.1. La valeur (les valeurs) de R_f de l'analyte doit (doivent) répondre à la valeur (aux valeurs) R_f caractéristique(s) du matériel étalon. Cette exigence est remplie lorsque la valeur (les valeurs) R_f de l'analyte se trouve (se trouvent) dans la limite de ± 3 % de la valeur (des valeurs) R_f du matériel étalon utilisé dans les mêmes conditions.

7.2. L'aspect de l'analyte ne doit pas être distinct de celui du matériel étalon.

7.3. Le centre du point le plus proche de celui imputable à l'analyte devrait être séparé d'au moins la demi-somme des diamètres des points.

7.4. Une co-chromatographie supplémentaire dans la phase CCM s'impose à des fins d'identification. En conséquence, seul le point présumé être celui de l'analyte devrait être intensifié ; un nouveau point ne devrait pas apparaître et son aspect ne devrait pas changer.

7.5. Une CCM à deux dimensions s'impose aux fins de confirmation.

8. **Critères d'identification d'un analyte par CLHP-SP**

8.1. La longueur d'onde d'absorption maximale de l'analyte dans le spectre (UV) devrait être identique à celle du matériel étalon avec une marge déterminée par la résolution du système de détection. Pour la détection par système de diodes, cette valeur se situe typiquement dans l'intervalle ± 2 nm.

8.2.2 Le spectre de l'analyte ne devrait pas être différent visuellement du spectre du matériel étalon pour les éléments des deux spectres caractérisées par une absorbance relative supérieure à 10 %. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et qu'à aucun point observé la différence des deux spectres n'est supérieure à 10 % de l'absorbance caractéristique du matériel étalon.

8.3. Une co-chromatographie dans la phase CLHP s'impose à des fins d'identification. En conséquence, seul le pic présumé être celui de l'analyte devrait être intensifié.

9. **Critères d'identification d'un analyte par CCM-SP ou CCMHP-SP**

9.1. La valeur (les valeurs) R_f de l'analyte devrait (devraient) répondre à la valeur (aux valeurs) R_f caractéristique(s) du matériel étalon. Cette exigence est remplie lorsque la valeur (les valeurs) R_f de l'analyte se trouve (se trouvent) dans l'intervalle de ±3 % de la valeur (des valeurs) R_f du matériel étalon dans les mêmes conditions d'utilisation.

9.2. L'aspect de l'anlyte devrait être indistinct de celui du matériel étalon.

9.3. Le centre du point le plus proche de celui imputable devrait en être séparé par une distance au moins égale à la moitié de la somme des diamètres des points.

9.4. Une co-chromatographie supplémentaire dans la phase CCM s'impose à des fins d'identification. En conséquence, seul le point présumé être celui de l'analyte devrait être intensifié ; aucun nouveau point ne devrait apparaître.

9.5. La longueur d'onde d'absorption maximale de l'analyte dans le spectre devrait être identique à celle du matériel étalon, à l'intérieur d'une marge déterminée par la résolution du système de détection.

9.6. Le spectre de l'analyte ne devrait pas être visuellement différent de celui du matériel étalon.

10. **Critères d'identificatin d'un analyte par CG-SMHR**

10.1. Pour être considérés comme des mesures à haute résolution, les résultats doivent avoir une résolution supérieure à 9 500 avec une vallée entre pics adjacents de 10 % au maximum de la hauteur des pics.

10.2. Le rapport d'intensité de la réponse des ions F^+ et $(F+1)^+$ ou M^+ et $(M+1)^+$ du dérivé du matériel étalon devrait être égal à la valeur théorique à l'intérieur d'une marge de A %.

10.3. La masse fragmentaire du dérivé de l'analyte (déterminée par comparaison des pics) devrait être égale à la valeur théorique du dérivé correspondant du matériel étalon, à l'intérieur d'une marge de B uma.

Note : Pour un certain nombre d'agents anabolisants, les valeurs de A et de B figurent à titre d'exemples au tableau 1 de l'appendice. La méthode ne se limite pas aux agents anabolisants mais son application est générale.

11. **Critères d'identification d'un analyte par CG-SMFR**

11.1. *Critères relatifs à la CG*

11.1.1. Le temps de rétention de l'analyte soumis à une CG doit être le même que celui des étalons de référence, à l'intérieur d'une marge de ± 5 secondes.

11.1.2. Si on utilise un étalon interne, le temps de rétention relatif (B/A) d'un analyte doit être égal à celui du matériel étalon à l'intérieur d'une marge de ± 5/A dans la matrice appropriée.

Dans cette formule :

A = le temps temps de rétention absolu d'un étalon interne, en secondes.

B = le temps de rétention absolu de l'analyte, en secondes.

11.2. *Critères relatifs à la SM*

11.2.1. Tous les ions suivis doivent être dérivés de l'analyte éluée au même temps de rétention.

11.2.2. Déterminer les intensités d'au moins deux ions et de préférence davantage.

Note : Pour une identification non ambiguë d'un analyte, un nombre suffisant d'ions doit être sélectionné, en fonction de la substance examinée et la spécificité des ions sélectionnés. Pour la majorité des dérivés des substances des anabolisants visés aux tableaux 2 à 6 de l'appendice, la sélection de quatre ions au moins est recommandée.

11.2.3. Les intensités relatives des ions détectés, exprimées en pourcentage de l'intensité de l'ion présentant l'intensité la plus forte (pics de base) doivent être les mêmes que celles de l'étalon de référence approprié, dans une marge de ± 20 % (mode IC) ou ± 10 % (mode IE).

11.2.4. L'ion moléculaire du matériel étalon devrait, si possible, se trouver dans le spectre « DISM » de l'analyte.

Note : Dans les tableaux 2 à 6 de l'appendice, les ions moléculaires et les ions fragmentaires des dérivés TMS, MOX-TMS, MOX et HFB d'un certain nombre d'agents anabolisants et composés connexes sont représentés à titre d'exemples. Cependant, les critères ne se limitent pas à ces dérivés agents anabolisants, mais leur application est générale.

12. **Critères d'identification d'un analyte par spectrométrie IR**

12.1. *Définition de pics adéquats*

Les pics adéquats sont des maxima d'absorption dans le spectre IR d'un matériel étalon remplissant les conditions suivantes :

12.1.1. Le maximum d'absorption se trouve dans la gamme d'ondes de 1 800 à 500 cm^{-1}.

12.1.2. L'intensité d'absorption n'est pas inférieure à :

12.1.2.1. un coefficient d'absorption molaire spécifique de :

— 40 pour une absorbance nulle

et

— 20 pour la ligne de base du pic

ou

12.1.2.2. une absorbance relative de :

— 12,5 % de l'absorbance du pic le plus intense dans la zone de 1 800 à 500 cm^{-1} lorsque tous deux sont mesurés par rapport à l'absorbance nulle

et

— 5 % de l'absorbance du pic le plus intense dans la zone de 1 800 à 500 cm^{-1} lorsque les deux sont mesurés par rapport à la ligne de base de leurs pics.

Note : Quoique des pics appropriés conformément au point 12.1.2.1 puissent être préférés en théorie, les pics prévus au point 12.1.2.2 sont plus faciles à déterminer dans la pratique.

12.2. *Nombre de pics adéquats*

Un minimum de six pics adéquats est exigé

12.3. *Codages des pics adéquats*

Les positions exactes des pics adéquats, en nombre d'ondes entières, tiennent lieu de paramètres objectifs, numériques pour juger les spectres des échantillons.

Note : Le tableau 7 de l'appendice indique les pics adéquats, dans le spectre IR, de quarante-neuf agents anabolisants et composés voisins. Toutefois, la méthode ne se limite pas aux agents anabolisants, mais elle peut être appliquée généralement.

12.4. *Utilisation des tableaux de pics adéquats*

12.4.1. Les positions des pics dans le spectre IR de l'analyte sont comparées avec les positions des pics adéquats dans le spectre IR du matériel étalon.

12.4.2. Déterminer le nombre de pics dans le spectre IR de l'analyte dont les fréquences correspondent avec le pic adéquat dans le spectre IR du matériel étalon avec une marge de $\pm$ 1 cm^{-1}.

12.4.3. Calculer le « résultat » du matériel étalon dans le spectre de l'analyte.

12.4.4. Définition du « résultat »

Le « résultat » est le pourcentage de pics adéquats du matériel étalon trouvé dans le spectre IR de l'analyte.

12.5. *Critères*

12.5.1. Le résultat représente au moins 50 %.

12.5.2. La procédure s'applique uniquement aux pics d'absorption dans le spectre de l'échantillon ayant une intensité d'au moins trois fois le pic du bruit de fond.

APPENDICE

TABLEAU 1

Données destinées à la confirmation des agents anabolisants par SMHR

Dérivé (1)	Masse ionique		Rapport d'intensité		Masse ionique	
	Ion F^+ ou Ion M^+, M/Z valeur nominale (uma)	Ion $(F+1)^+$ ou Ion $(M+1)^+$, M/Z valeur nominale (uma)	valeur théorique	A marge (%)	M/Z valeur théorique (2) (uma)	B M/Z marge (uma)
DES-TMS	M^+ 412	413	0,3777	8	412,2254	0,0012
DE-TMS	M^+ 410	411	0,3772	8,5	410,2097	0,0012
HEX-TMS	F^+ 207	208	0,1889	17	207,1205	0,0007
NT-TMS	M^+ 346	347	non appliqué		346,2328	0,0015
NT-TMS	F^+ 256	257	non appliqué		256,1827	0,0015
NT-MOX-TMS	M^+ 375	376	non appliqué		375,2593	0,0015
epi NT-MOX-TMS	M^+ 375	376	non appliqué		375,2593	0,0015
E2-di-TMS	M^+ 416	417	non appliqué		416,2567	0,0015

(1) DES = diéthylstilboestrol
DE = diénoestrol
HEX = hexoestrol
NT = 19-nortestostérone-17β (nandrolone)
epiNT = 19-nortestostérone-17α
E2 = œstradiol-17β.

(2) Calculé sur la base de l'isotope ^{12}C = 12,0000.

TABLEAU 2

Dérivé TMS d'un nombre d'agents anabolisants et composés voisins
Ions à utiliser pour confirmation par SMFR (mode IE)

	MW	M/Z (1)			
Diénoestrol	410	410	395	381	
Diéthylstilboestrol	412	412	397	383	
5α-Œstrane-(3β,17α)diol	422	407	332	242	201
17α-Œstradiol	416	416	401	326	285
17β-Œstradiol	416	416	401	326	285
17β-Œstradiol-16,16,17(d3) (2)	419	419	404	329	285
Éthinylœstradiol	440	440	425	300	285
Hexoestrol	414	207	191	179	
Méthandrostenolone	372	372	357	302	282
Méthyltestostérone	374	359	317	304	284
α-Nortestostérone	346	346	331	256	215
β-Nortestostérone	346	346	331	256	215
Testostérone	360	360	345	270	226
17α-Trenbolone	342	342	252	237	211
17β-Trenbolone	342	342	252	237	211
α-Zéaralanol	538	538	523	433	307
β-Zéaralanol	538	538	523	433	307
Zéaralanone	464	464	449	335	307
Zéaralenone	462	462	429	333	305

(1) Ion souligné : pic de base.
(2) Étalon interne.

TABLEAU 3

Dérivés MOX-TMS d'un certain nombre d'agents anabolisants et composés voisins
Ions à utiliser pour confirmation par SMFR (mode IE)

	MW	M/Z (1)			
Medroxyprogestérone	474	474	459	443	353
Méthandrosténolone	401	401	386	370	280
Méthyltestostérone	403	403	313	298	282
α-Nortestostérone	375	375	360	344	285
6-Nortestostérone	375	375	360	344	285
Testostérone	389	389	374	358	268
α-Trenbolone	371	371	281	266	253
6-Trenbolone	371	371	281	266	253
Zéaralanone	493	493	478	462	406
Zéaralenone	491	491	460	444	333

(1) Ion souligné : pic de base.

TABLEAU 4

Dérivés MOX d'un certain nombre d'agents anabolisants et composés voisins
Ions à utiliser pour confirmation par SMFR (mode IE)

	MW	M/Z (1)			
Médroxyprogestérone acétate	415	415	330	312	287
Mégestrol acétate	413	413	353	338	310
Mélengestrol acétate	425	425	365	350	322
Trenbolone acétate	341	341	298	281	266

(1) Ion souligné : pic de base.

TABLEAU 5

Dérivés HFB d'un certain nombre d'agents anabolisants et composés voisins
Ions à utiliser pour confirmation par SMFR (mode IE)

	MW	M/Z (1)			
Diéthylstilboestrol	660	660	631	447	341
Diénoestrol	658	658	629	445	341
Hexoestrol	662	332	331	304	303
17β-Œstradiol,16,16,17(d3) (2)	667	667	454	412	359

(1) Ion souligné : pic de base.
(2) Étalon interne.

TABLEAU 6

Dérivés HFB de stilbènes
Ions à utiliser pour confirmation par SMHR (mode IC)

(a) *IC-ammonium*

	MW	M/Z (1)			
Hexoestrol	662	681	680	484	466
Diéthylstilboestrol	660	678	482	464	

(1) Ion souligné : pic de base.

(b) *IC-méthane*

	MW	M/Z (1)			
Diéthylstilboestrol	660	661	465	464	
Diénoestrol	658	659	463	462	369

(1) Ion souligné : pic de base.

Notes

1. Les intensités relatives de certains des ions ci-dessus sont trop faibles (environ 10 %) pour être utilisées de manière fiable à des fins de confirmation.
2. Les intensités relatives des ions peuvent varier avec la quantité d'analyte injectée dans la colonne. Dans le cas du diéthylstilboestrol à faibles concentrations sous IC au méthane, l'ion 661 devient le pic de base (c'est-à-dire qu'il se produit moins de fragmentation vers la forme mono-HFB). C'est pourquoi il est important de comparer les intensités d'ions relatives concernant l'analyte avec celle concernant un étalon de référence d'une concentration à peu près équivalente.
3. L'ionisation au méthane aboutit à une rupture de la molécule hexoestrol. Les ions fragmentaires, de masse plus faible, ne se séparent pas si facilement des produits co-extraits.

TABLEAU 7

Pics adéquats dans les spectres IR de 49 agents anabolisants et composés voisins

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
βE2	αE2	E2Ac	E2diAc	E2P	E2diP	E2S	E2Bz	E2ME	EE
		1 701	1 766 1 734	1 712	1 763 1 757 1 733		1 729		
1 610	1 610	1 620		1 696 1 619			1 600	1 610	1 615
1 586	1 586 1 500	1 584		1 583				1 577 1 502	1 584 1 501
1 498 1 449 1 416	1 443	1 498 1 460	1 494	1 499 1 460 1 444	1 492 1 460 1 419	1 494 1 420	1 498 1 451	1 469 1 444	1 473 1 449 1 433
1 382 1 357 1 320 1 302	1 379 1 352	1 373 1 351	1 375	1 350	1 381 1 351	1 392 1 307	1 380 1 315	1 374 1 334 1 313	1 384 1 358
1 283 1 250 1 231	1 284 1 253 1 234	1 292 1 276 1 248 1 235	1 262 1 248	1 288 1 249 1 225 1 212	1 273 1 247 1 224	1 241	1 266 1 223 1 216	1 291 1 278 1 252 1 236	1 299 1 257 1 203
1 156 1 130 1 118 1 102	1 154 1 119 1 101	1 152	1 198 1 177 1 149	1 151	1 197 1 154 1 139	1 176	1 176 1 152 1 128	1 183 1 153 1 130 1 120	1 184 1 160 1 147 1 135 1 122 1 111
1 056 1 021 1 012	1 074 1 054 1 036 1 013	1 017	1 040 1 015	1 086 1 072 1 012	1 078 1 055 1 033 1 014	1 097 1 075 1 049 1 018	1 067 1 025 1 012	1 055 1 042 1 025	1 069 1 055 1 043 1 022 1 006
962 930 917 905	994 970 945 919		946	962	917	932 908			971 930 914
874 820	866 821	873	885	878 871 816	897 807	887 866 847 822 808	889	898 870 818	880 857 823
786 733	787					770	705	785	789
		624				650	688		646 622
	573					579 519			568

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
M	E1	E3	Eq	Eqln	βT	αT	TAc	TP	TiC
	1 719		1 719	1 717			1 741	1 729	1 733
1 612	1 621	1 610	1 623	1 622	1 666 1 658 1 612	1 654 1 610	1 672 1 618	1 669 1 611	1 667 1 617
1 580 1 506	1 584	1 501	1 588 1 509 1 500	1 599					
1 467 1 449	1 499	1 452	1 470 1 407	1 480 1 460 1 423	1 470 1 432	1 432	1 449 1 433	1 450	1 470 1 450
1 377 1 352 1 325	1 396 1 361	1 384 1 353 1 322	1 354	1 389	1 378 1 360	1 380	1 377 1 362 1 333	1 331	1 378 1 331
1 291 1 255 1 242	1 287 1 250	1 285 1 254 1 238 1 201	1 278 1 246	1 225 1 208	1 277 1 233	1 276 1 231	1 274 1 232	1 270 1 240	1 294 1 272 1 230
1 183 1 165 1 146 1 133 1 121 1 109		1 174 1 149 1 118 1 103	1 158 1 148	1 169	1 199 1 131 1 114	1 189		1 185	1 182 1 125 1 103
1 062 1 036 1 019	1 055	1 068 1 062 1 034	1 056	1 066	1 067 1 056 1 017		1 041 1 022	1 080 1 043 1 020	1 043 1 009
967 905	920	964 943 928 917			957 943		945		941
862 844 833 823	877 819	886 871 851 818	875 810	849 817	870		863	863	864
789 702	788	787							
658 620	673	662							
		582							

21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
TD	TUn	TPP	TBz	MT	MT-D9 (11)	βNT	αNT	NTP	NTD
1 734	1 738	1 734	1 709					1 741	1 734
1 670 1 618	1 674 1 610	1 672 1 615	1 673 1 617	1 664 1 611	1 651 1 607	1 666 1 619	1 663 1 643 1 615	1 650 1 620	1 676 1 619
1 471 1 415	1 473	1 455 1 424	1 452 1 435	1 450		1 412		1 448 1 422	1 465 1 453
1 379 1 352 1 327	1 379 1 335 1 315	1 381	1 316	1 374	1 370 1 348 1 332	1 335		1 346	1 381 1 332
1 291 1 256 1 216	1 276 1 249 1 208	1 298 1 270 1 229	1 275 1 229	1 297 1 278 1 234	1 274 1 232	1 259 1 228 1 206	1 258 1 211	1 265 1 202	1 258 1 212
1 180	1 172	1 171	1 178 1 110	1 190 1 156	1 188 1 173 1 153 1 128 1 104	1 133	1 135		1 177
		1 068 1 009	1 070 1 023	1 091		1 075 1 052 1 023	1 051	1 085 1 052 1 025	
		944	998 941	950	956 937	967	968	968	
867	887	862	866	873	882	885	880	884	
		748 709	719						
		699	688		692				

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
NTL	NTPP	Eti	βTB	αTB	TBA	P	MP	MPA	MGA
1 735	1 730				1 737			1 732 1 717	1 731 1 710
1 676 1 619	1 675 1 618	1 659 1 612	1 639	1 643	1 660	1 699 1 663 1 616	1 696 1 664 1 603	1 673 1 608	1 664 1 629
	1 501		1 569	1 578	1 573				1 584
1 473 1 418	1 447	1 430 1 418	1 438	1 450 1 435	1 439	1 439	1 448		1 460 1 447
1 381 1 335	1 330	1 383 1 331	1 379 1 353 1 346 1 322	1 391 1 369 1 346 1 321 1 310	1 375	1 386 1 358 1 328	1 349	1 365	1 390 1 366
1 299 1 269 1 240 1 205	1 297 1 259 1 205	1 288 1 232	1 288 1 267 1 226	1 279 1 240 1 229	1 245	1 279 1 237 1 228 1 204	1 271 1 233	1 261 1 253	1 269 1 260 1 247 1 224
1 175	1 177	1 191 1 125	1 199 1 101	1 198 1 150 1 126		1 162	1 186 1 123	1 187	1 167 1 143 1 127 1 109
1 053	1 080 1 049	1 068 1 060	1 075 1 054 1 017	1 088 1 028 1 011	1 096 1 053 1 023		1 093	1 080 1 056	1 083 1 059 1 014
	965			937	987	948		965	963
	879	869		852		871	871		878
	752 704	724		795 762					
		697							
							597		

41	42	43	44	45	46	47	48	49
MLGA	DE	DES	HEX	DEdiAc	DESdiP	Z	Cort	HCort
1 738 1 716				1 757	1 763 1 754			1 714
1 666 1 625	1 619 1 608	1 609	1 613			1 644 1 615	1 694 1 648 1 618	1 644 1 610
1 579	1 591 1 513	1 590 1 514	1 598 1 516	1 503	1 504	1 587		
1 444 1 416	1 426	1 462 1 427	1 458 1 440		1 459	1 464	1 447 1 413	1 432
1 389 1 372 1 318	1 333	1 337		1 368	1 363	1 381 1 353 1 311	1 391	
1 260 1 245 1 231 1 205	1 247 1 205	1 282 1 247 1 204	1 218	1 218	1 210	1 259 1 200	1 269	1 271 1 237
1 123	1 171 1 102	1 173 1 114	1 174 1 107	1 196 1 164	1 157	1 167	1 186 1 159	1 133 1 115
1 037		1 012		1 019	1 076 1 019	1 096 1 075	1 075 1 064 1 037	1 047 1 006
972 953 930				910		989		942 900
881	853 834 826	851 831 805	847 830 804	865	895	840	875	865
	775	721	716					
627 612	649 620	646	646	679				
551	520	586	573 510					

Liste des abréviations

1	βE2	Œstradiol-17β
2	αE2	Œstradiol-17α
3	E2Ac	Œtradiol-17-acétate
4	E2diAc	Œstradiol diacétate
5	E2P	Œstradiol-17-propionate
6	E2diP	Œstradiol dipropionate
7	E2S	Œstradiol-3-suphate
8	E2Bz	Œstradiol-3-benzoate
9	E2ME	Œstradiol-3-méthyléther
10	EE	Éthinylœstradiol
11	M	Mestranol
12	E1	Œstrone
13	E3	Œstriol
14	Eq	Équilin
15	Eqln	Équilenin
16	βT	Testostérone-17β
17	αT	Testostérone-17α
18	TAc	Testostérone acétate
19	TP	Testostérone propionate
20	TiC	Testostérone isocaproate
21	TD	Testostérone décanoate
22	TUn	Testostérone undécanoate
23	TPP	Testostérone phénylpropionate
24	TBz	Testostérone benzoate
25	MT	Méthyltestostérone-17α
26	MT-D9(11)	Méthyltestostérone-D9(11)
27	βNT	Nortestostérone-17β
28	αNT	Nortestostérone-17α
29	NTP	Nortestostérone propionate
30	NTD	Nortestostérone décanoate
31	NTL	Nortestostérone laurate
32	NTPP	Nortestostérone phénylpropionate
33	Eti	Éthistérone
34	βTB	Trenbolone-17β
35	αTB	Trenbolone-17α
36	TBA	Trenbolone acétate
37	P	Progestérone
38	MP	Médroxyprogestérone
39	MPA	Médroxyprogestérone acétate
40	MGA	Mégestrol acétate
41	MLGA	Mélengestrol acétate
42	DE	Diénoestrol
43	DES	Diéthylstilboestrol
44	HEX	Hexoestrol
45	DEdiAc	Diénoestrol diacétate
46	DESdiP	Diéthylstilboestrol dipropionate
47	Z	Zéranol
48	Cort	Corticostérone
49	HCort	Hydrocortisone