II

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

COMMISSION

ONZIÈME DIRECTIVE 93/70/CEE DE LA COMMISSION

du 28 juillet 1993

portant fixation de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique 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 le règlement (CEE) n° 3768/85 [2], et notamment son article 2,

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

considérant que, pour contrôler le respect des conditions d'emploi de l'halofuginone dans l'alimentation des animaux, il convient d'établir au plan communautaire une méthode d'analyse pour cet additif ;

considérant que les mesures prévues à 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 prévues pour les contrôles officiels des aliments des animaux, en ce qui concerne leur teneur en halofuginone, sont effectuées selon la méthode décrite en annexe.

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 30 juin 1994. Ils en informent immédiatement la Commission.

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

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 28 juillet 1993.

Par la Commission

René STEICHEN

Membre de la Commission

---

[1] JO n° L 170 du 3. 8. 1970, p. 2.
[2] JO n° L 362 du 31. 12. 1985, p. 8.

ANNEXE

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN HALOFUGINONE

DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl) acétonyl]-quinazoline-4-(3H)-one bromhydrate

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

La présente méthode sert à déterminer la teneur en halofuginone des aliments pour animaux. La limite inférieure du dosage 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 sous haute performance (CLHP) en phase inversée à l'aide d'un détecteur d'UV.

3. **Réactifs**

3.1. Acétonitrile, qualité CLHP

3.2. Résine d'Amberlite XAD-2

3.3. Acétate d'ammonium

3.4. Acétate d'éthyle

3.5. Acide acétique

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, 100 µg/ml

Peser 50 mg (à 0,1 mg près) d'halofuginone (point 3.6) dans une fiole jaugée de 500 ml, dissoudre dans une solution tampon d'acétate d'ammonium (point 3.18), porter au volume 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-étalon (point 3.6.1). Porter au volume 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 µg/ml d'halofuginone. Les solutions doivent être fraîchement préparées avant l'utilisation.

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, qualité CLHP

3.15. Solution de carbonate de sodium, θ = 10 g/100 ml

3.16. Solution de carbonate de sodium saturée au chlorure de sodium, θ = 5 g/100 ml

Dissoudre 50 g de carbonate de sodium (point 3.11) dans de l'eau, porter à 1 l 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 l.

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 porter à 1 l.

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. Cuve à ultrasons

4.2. Évaporateur rotatif

4.3. Centrifugeuse

4.4. Équipement pour CLHP avec détecteur d'UV à longueur d'onde variable ou détecteur à barettes de diodes

4.4.1. Colonne de chromatographie liquide, 300 mm × 4 mm, remplie de particules de type C 18 de 10 µm ou une colonne équivalente

4.5. Colonne de verre (300 mm × 10 mm), munie d'un filtre de verre fritté et d'un robinet

4.6. Filtres de fibres de verre, de 150 mm de diamètre

4.7. Filtres à membrane, de 0,45 µm

4.8. Filtres à membrane, de 0,22 µm

5. Mode opératoire

Remarque : l'halofuginone en tant que base libre est instable dans des solutions alcalines et d'acétate d'éthyle. Il ne devrait pas rester dans l'acétate d'éthyle pendant plus de 30 minutes.

5.1. Généralités

5.1.1. Un aliment non enrichi (blanc) doit être analysé afin de vérifier l'absence d'halofuginone ou de substances interférentes.

5.1.2. Un test de rendement doit être effectué en analysant un aliment blanc qui a été enrichi par ajout d'une quantité d'halofuginone similaire à celle présente dans l'échantillon. Pour un enrichissement d'une teneur de 3 mg/kg, ajouter 300 µl de la solution mère-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).

Note : dans le cadre de cette méthode, l'aliment non enrichi doit être d'un type similaire dans sa composition à celui de l'échantillon et lors de l'analyse, l'halofuginone ne doit pas être détectable.

5.2. Extraction

Peser, à 0,01 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 la cuve à ultrasons (point 4.1) en devissant le bouchon. Centrifuger pendant 2 minutes et décanter la phase d'acétate d'éthyle à travers un filtre de fibres 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 phase organique pendant 1 minute avec 50 ml d'acide chlorhydrique (point 3.17). Faire passer la phase acide inférieure dans une ampoule à décanter de 250 ml. Réextraire la phase 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 devrait 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 devrait pas dépasser 20 ml/minute. 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/minutes, 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). Porter au repère 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).

5.4. Analyse par CLHP

5.4.1. Paramètres

Les conditions suivantes sont données à titre indicatif. D'autres paramètres peuvent être utilisés à condition qu'ils conduisent à 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/minute

Longueur d'onde de détection : 243 nm

Volume injecté : 40 à 100 µl

Contrôler la stabilité du système chromatographique, en injectant plusieurs fois la solution d'étalonnage (point 3.6.2) à 3,0 µg/ml, jusqu'à l'obtention de hauteurs (surfaces) de pics 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 moyennes des hauteurs ou surfaces de pics des solutions d'étalonnage en ordonnée et les concentrations correspondantes en µg/ml en abscisse.

5.4.3. Solution échantillon

Injecter plusieurs fois l'extrait 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 échantillon, déterminer la concentration de la solution échantillon 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 échantillon, en µg/ml,

— m : masse 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 par l'utilisation d'un détecteur à barrettes de diodes, permettant de comparer les spectres de l'extrait échantillon et de la solution d'étalonnage (point 3.6.2) à 6,0 µg/ml d'halofuginone.

7.1.1. Cochromatographie

Un extrait échantillon est enrichi par addition d'une quantité appropriée de solution d'étalonnage (point 3.6.2). La quantité d'halofuginone ajoutée doit être similaire à la quantité estimée d'halofuginone trouvée dans l'extrait échantillon.

Seule la hauteur du pic d'halofuginone devrait être augmentée en tenant compte 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

Les résultats sont évalués selon les critères suivants :

a) la longueur d'onde d'absorption maximale des spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrée au sommet du pic des chromatogrammes, doit être la même, avec 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 du pic de l'échantillon et de l'étalon, enregistrés au sommet des pics du chromatogramme, ne doivent pas être différents pour les parties du spectre comprises entre 10 et 100 % de densité optique relative. Ce critère est satisfait lorsque les mêmes maxima sont présents et que, nulle part, l'écart observé entre les deux spectres ne dépasse 15 % de la densité optique 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 de l'échantillon ne doivent pas être visuellement différents les uns des autres pour les parties du spectre comprises entre 10 et 100 % de densité optique relative. Ce critère est satisfait lorsque les mêmes maxima sont présents et que, nulle part, l'écart observé entre les spectres ne dépasse 15 % de la densité optique du spectre au sommet du pic.

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

7.2. Répétabilité

La différence entre les résultats des deux analyses parallèles effectuées sur le même échantillon ne doit pas dépasser 0,5 mg/kg pour des teneurs en halofuginone allant jusqu'à 3 mg/kg.

7.3. Rendement

En ce qui concerne l'échantillon supplémenté, le rendement doit être de 80 % au minimum.

8. Résultats d'une étude interlaboratoire

Dans le cadre d'une étude interlaboratoire (1), trois échantillons ont été analysés par huit laboratoires.

Résultats

	Échantillon A (blanc) à sa réception	Échantillon B (fariné)		Échantillon C (pellets)	
		à sa réception	après 2 mois	à sa réception	après 2 mois
Moyen (1)	n.d.	2,80	2,42	2,89	2,45
E_{TR}	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R	—	16	18	14	17
ren		86	74	88	75

(1) : unités en mg/kg.
n.d. : non détecté.
E_{TR} : écart type de reproductibilité.
CV_R : coefficient de variation (%).
ren : rendement (%).

(1) *The Analyst* 108, 1983, pp. 1252-1256.