DIRECTIVE 98/64/CE DE LA COMMISSION

du 3 septembre 1998

portant fixation des méthodes d'analyse communautaires pour la détermination des acides aminés, des matières grasses brutes et de l'olaquindox dans les aliments des animaux et modifiant la directive 71/393/CEE

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

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

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

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

considérant que la directive 79/373/CEE du Conseil du 2 avril 1979 concernant la commercialisation des aliments composés pour animaux [2], modifiée en dernier lieu par la directive 97/47/CE [3], et la directive 93/74/CEE du Conseil du 13 septembre 1993 concernant les aliments pour animaux visant des objectifs nutritionnels particuliers [4], modifiée en dernier lieu par la directive 96/25/CE [5] prévoient la déclaration des acides aminés et des matières grasses brutes dans l'étiquetage des aliments;

considérant par ailleurs que la directive 70/524/CEE du Conseil du 23 novembre 1970 concernant les additifs dans l'alimentation des animaux [6], modifiée en dernier lieu par la directive 98/19/CE [7] de la Commission prescrit que la teneur de l'olaquindox doit être indiquée lors de l'étiquetage, lorsque cette substance est ajoutée aux aliments composés des animaux;

considérant que la deuxième directive 71/393/CEE de la Commission du 18 novembre 1971 portant fixation des méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux [8], modifiée en dernier lieu par la directive 84/4/CEE [9], établit les méthodes d'analyse pour, entre autres, détermination des matières grasses; le cas échéant en modifiant la méthode décrite;

considérant qu'il y a lieu d'établir des méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle de ces substances;

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 prévues pour les contrôles officiels des aliments des animaux, en ce qui concerne leur teneur en acides aminés, en matières grasses brutes et en olaquindox, soient effectuées selon les méthodes correspondantes décrites en annexe.

Article 2

Le point «4) Détermination des matières grasses brutes» de l'annexe de la directive de la Commission 71/393/CEE est remplacé par la partie B de l'annexe de la présente directive.

Article 3

1. Les États membres mettent en vigueur au plus tard le 31 décembre 1998 les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive. Ils en informent immédiatement la Commission.

Ils appliquent ces dispositions à partir du 1er janvier 1999.

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

[1] JO L 170 du 3. 8. 1970, p. 2.
[2] JO L 86 du 6. 4. 1979, p. 30.
[3] JO L 211 du 5. 8. 1997, p. 45.
[4] JO L 237 du 22. 9. 1993, p. 23.
[5] JO L 125 du 23. 5. 1996, p. 35.
[6] JO L 270 du 14. 12. 1970, p. 1.
[7] JO L 96 du 28. 3. 1998, p. 39.
[8] JO L 279 du 20. 12. 1971, p. 7.
[9] JO L 15 du 18. 1. 1984, p. 28.

2. Les États membres communiquent à la Commission le texte des dispositions essentielles de droit interne qu'ils adoptent dans le domaine régi par la présente directive.

Article 4

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

Article 5

Les États sont destinataires de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 3 septembre 1998.

Par la Commission
Franz FISCHLER
Membre de la Commission

ANNEXE

PARTIE A

DOSAGES DES ACIDES AMINÉS

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

La méthode permet de déterminer les acides aminés libres (de synthèse et naturels) et totaux (liés dans des peptides et libres) dans les aliments des animaux avec 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 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 ajoutés 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 de l'acide cystéique et de la méthionine sulfone avant hydrolyse. La tyrosine doit être dosée dans l'hydrolysat d'échantillons non oxydés. Tous les autres acides aminés indiqués au paragraphe 1 peuvent être dosés soit dans un échantillon oxydé soit dans un échantillon non oxydé.

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 (c = 6 mol/l) pendant 23 heures. L'hydrolysat 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 bi-distillée ou de l'eau de qualité équivalente (conductivité $< 10\ \mu S$).

3.1. Peroxyde d'hydrogène, 30 % (m/m).

3.2. Acide formique, 98-100 % (m/m).

3.3. Phénol.

3.4. Disulfite de sodium.

3.5. Hydroxyde de sodium.

3.6. Acide 5-sulfosalicylique dihydraté.

3.7. Acide chlorhydrique, densité d'environ 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. Ether de pétrole, intervalle d'ébullition de 40 à 60 °C.

3.13. Norleucine ou autres composés pouvant être utilisés comme étalons internes.

3.14. Azote gazeux (< 10 ppm d'oxygène).

3.15. 1-Octanol.

3.16. Acides aminés.

3.16.1. Substances étalons visées au paragraphe 1. Composés purs ne contenant pas d'eau de cristallisation. Sécher sous vide sur P_2O_5 ou H_2SO_4 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 (3.5) dans de l'eau et porter à 1 litre.

3.18. Solution d'hydroxyde de sodium, c = 1 mol/l:

dissoudre 40 g de NaOH (3.5) dans de l'eau et porter à 1 litre.

3.19. Solution d'acide formique-phénol:

mélanger 889 g d'acide formique (3.2) et 111 g d'eau en ajoutant 4,73 g de phénol (3.3).

3.20. Mélange à hydrolyser, c = 6 mol HCl/l contenant 1 g de phénol/l:

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

3.21. Mélange d'extraction, c = 0,1 mol HCl/l contenant 2 % de thiodiglycol:

prendre 8,2 ml de HCl (3.7), mélanger dans environ 900 ml d'eau, ajouter 20 ml de thiodiglycol (3.9) et porter à 1 l avec de l'eau (ne pas mélanger directement 3.7 et 3.9).

3.22. Acide 5-sulfosalicylique, ß = 6 %:

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

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

mélanger 0,5 ml de péroxyde d'hydrogène (3.1) avec 4,5 ml d'une solution de phénol et d'acide formique (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 min) avant de l'ajouter à l'échantillon.

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

3.24. Tampon au citrate, c = 0,2 mol de Na^+/l, pH = 2,20:

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

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

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

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

3.27.1. Solution étalon mère d'acides aminés (3.16.1). c = 2,5 µmol/l de chacun dans l'acide chlorydrique. S'obtient dans le commerce.

3.27.2. Solution étalon mère d'acide cystéique et de méthionine sulfone. c = 1,25 µmol/ml.

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

3.27.3. Solution étalon interne, par exemple norleucine. c = 20 µmol/l.

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

3.27.4. Solution d'étalonnage des acides aminés à utiliser avec des hydrolysats, c = 5 nmol/50 µl d'acide cystéique et de méthionine sulfone et c = 10 nmol/50 µl des autres acides aminés.

Dissoudre 2,2 g de chlorure de sodium (3.10) dans un bécher de 100 ml avec 30 ml de tampon au citrate (3.24). Ajouter 4,00 ml de la solution étalon d'acides aminés (3.27.1), 4,00 ml de solution étalon d'acide cystéique et de méthionine de sulfone (3.27.2) et 0,50 ml de solution d'étalon interne (3.27.3) le cas échéant. Ajuster le pH à 2,20 avec de l'hydroxyde de sodium (3.18).

Transférer dans une fiole jaugée de 50 ml et porter au trait avec du tampon au citrate (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 paragraphe 5.3.3.1 et destinés à être utilisés avec des extraits (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 250 ml pourvu d'un condenseur à reflux.

4.2. Flacon en verre de borosilicate de 100 ml avec bouchon à vis avec garniture de caoutchouc/teflon (par exemple Duran, Schott) pouvant être utilisé dans une étuve ± 2 °C.

4.3. Étuve à ventilation forcée et régulation de la température d'une précision supérieure à ± 2 °C.

4.4. pH-mètre (à graduation à trois décimales).

4.5. Filtre membrane (0,2 µm diamètre des pores).

4.6. Centrifugeuse.

4.7. Evaporateur rotatif à 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, dérivatisation postcolonne et détecteur photométrique.

La colonne est remplie avec des résines de polystyrène sulfonées pour 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 approximativement de 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'hydrolysat a une concentration de sodium de c = 0,8 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'hydrolysat 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.

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 séchés 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 (3.12) avant broyage.

5.2. *Dosage des acides aminés libres dans les aliments du bétail et les prémélanges*

Peser à 0,2 mg près une quantité adéquate (1-5 g) de l'échantillon préparé (5.1) dans un erlenmeyer et ajouter 100 ml du mélange d'extraction (3.21). Agiter le mélange pendant 60 min à l'aide d'un agitateur mécanique ou magnétique (4.8). Laisser décanter le sédiment et prélever 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 (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 (3.18), transférer le tout dans une fiole jaugée d'un volume approprié à l'aide du tampon au citrate (3.24) et porter au trait avec la solution tampon (3.24).

Si un étalon interne est utilisé, ajouter 1,00 ml de l'étalon interne (3.27.3) par fraction de 100 ml de la solution finale et porter au trait à l'aide de la solution tampon (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, de 0,1 g à 1 g de l'échantillon préparé (5.1) dans:

— un ballon sphérique de 100 ml (4.1) pour hydrolyse ouverte (5.3.2.3), ou

— un ballon sphérique de 250 ml (4.1) pour hydrolyse ouverte (5.3.3.1), si l'on a besoin d'une faible concentration de sodium, ou

— un flacon de 100 ml à bouchon à vis (4.2) (pour hydrolyse fermée 5.3.2.4).

La fraction de l'échantillon pesée devrait 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 (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 imperméable 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 (3.4).

Passer à l'opération du point 5.3.2.1.

5.3.2. Hydrolyse

5.3.2.1. Hydrolyse des échantillons oxydés

À l'échantillon oxydé préparé conformément à 5.3.1, ajouter 25 ml du mélange d'hydrolyse (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 250 ml (4.1) ou dans un tube de 100 ml pourvu d'un bouchon à vis (4.2), à 0,2 mg près, de 0,1 à 1 g de l'échantillon préparé (5.1). La fraction de l'échantillon pesée devrait avoir une teneur en azote d'environ 10 mg. Ajouter avec précaution 25 ml du mélange à hydrolyser (3.20) et mélanger avec l'échantillon. Poursuivre selon la procédure du point 5.3.2.3 ou du point 5.3.2.4.

5.3.2.3. Hydrolyse ouverte

Ajouter 3 billes de verre au mélange contenu dans le ballon (préparé conformément à 5.3.2.1 ou 5.3.2.2) et faire bouillir en bouillonnement constant pendant 23 heures exactement. Après l'hydrolyse rincer le condenseur au moyen de 5 ml du tampon au citrate (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 (4.3) réglée à 110 °C. Pendant la première heure, en vue de prévenir toute pression (due à l'évolution des substances gazeuses) et pour prévenir toute explosion, poser le bouchon à vis sur le récipient. *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 à l'étuve (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 (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 (3.24).

Poursuivre conformément au point 5.3.3.

5.3.3. Ajustement du pH

En fonction de la tolérance des analyseurs d'aicdes aminés en sodium (4.9) procéder selon la méthode 5.3.3.1 ou 5.3.3.2 pour l'ajustement du pH.

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

Il est recommandé d'utiliser un étalon interne (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 d'étalon interne (3.27.3) à l'hydrolysat avant évaporation.

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

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

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

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

Recueillir les hydrolysats obtenus conformément à 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 (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 (3.17) et d'une solution d'hydroxyde de sodium (3.18). Poursuivre conformément au point 5.3.4.

5.3.4. Solution de l'échantillon pour chromatographie

Transférer quantitativement l'hydrolysat à pH ajusté (5.3.3.1 ou 5.3.3.2) avec le tampon au citrate (3.24) dans une fiole jaugée de 200 ml et porter à la marque à l'aide du tampon (3.24).

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

Poursuivre par la chromatographie (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 (5.2) ou l'hydrolysat (5.3.4) à température ambiante. Agiter le mélange et filtrer une partie appropriée à travers un filtre membrane de 0,2 µm (4.5). La solution claire obtenue est soumise à une chromatographie par échange d'ions au moyen d'un appareil analyseur d'acides aminés (4.9).

L'injection peut être opérée manuellement ou automatiquement. Il importe que la même quantité de solution (± 0,5 %) soit toujours ajoutée à la colonne pour l'analyse des solutions de référence ou des échantillons, sauf lorsque l'étalon interne est utilisé, et que les rapports sodium/acide aminé dans les solutions d'étalonnage et les solutions des échantillons soient aussi voisins que possible.

La fréquence des injections de la solution d'étalonnage dépend de la stabilité du réactif ninhydrine et du système d'analyse en général. La solution étalon ou d'échantillon est diluée avec un tampon au citrate (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 ainsi que la 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 devrait 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 (4.9).

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 devrait 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 soit séparée des «artefacts de lysine» et de l'ornithine.

6. **Calcul des résultats**

La surface des pics de l'échantillon et de la solution de référence est mesurée pour chaque acide aminé particulier et la quantité, exprimée en grammes d'acide aminé par kg d'échantillon, est calculée selon la formule:

$$\frac{A \times E \times PM \times F}{B \times P \times 1\,000} = \text{g d'acide aminé par kg d'échantillon}$$

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

A = surface de pic, hydrolysat ou extrait

B = surface de pic, solution d'étalonnage

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

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

PM = poids moléculaire

E = concentration de l'étalon en µmol/l

P = poids en grammes d'échantillon (corrigé pour obtenir le poids initial si le produit est séché ou dégraissé)

F = ml d'hydrolysat total (5.3.4) ou ml du volume de l'extrait dilué total calculé (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 ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MG 240,30) en utilisant un PM de 120,15 (= 0,5 × 240,30).

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 PM de 149,21 pour la méthionine.

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

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

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

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 différents (aliment composé pour porc, aliment composé pour poulet de chair, concentré protéique, prémélange). La moyenne et l'écart-type des résultats, après élimination des aberrants, figurent au tableau suivant:

Moyennes en g/kg

Substance 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*

Chiffres de répétabilité pour les acides aminés testés. La répétabilité, exprimée sous forme d'«écart-type à l'intérieur du laboratoire» de la comparaison interlaboratoire susvisée, est indiquée dans les tableaux ci-dessous:

Écart-type à l'intérieur du laboratoire (S_r) en g/kg

Substance de référence	Acide aminé			
	Thréonine	Cyst(é)ine	Méthionine	Lysine
Aliment composé pour porcs	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Aliment composé pour poulets de chair	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Concentré protéique	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Prémélange	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = nombre de laboratoires participants

Coefficient de variation (%) pour l'écart-type à l'intérieur du laboratoire (S_r)

Substance 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.

Écart-type entre laboratoires (S_R) en g/kg

Substance de référence	Acide aminé			
	Thréonine	Cyst(é)ine	Méthionine	Lysine
Aliment composé pour porcs	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Aliment composé pour poulets de chair	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Concentré protéique	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Prémélange	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = nombre de laboratoires participants

Coefficient de variation (%) relatif à l'écart-type entre laboratoires (S_R)

Substance 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. **Remarques**

9.1. Par suite des différences entre appareils analyseurs d'acides aminés, les concentrations finales des solutions d'étalonnage des acides aminés (cf. 3.27.4 et 3.27.5) et de l'hydrolysat (cf. 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 de référence 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 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 aliments des animaux contenant plus de 1 % de chlorure (cocnentré, aliments minéraux, aliments complémentaires) pourrait entraîner une sous-estimation de la méthionine et un traitement spécial est à prévoir.

PARTIE B

4. DOSAGE DES MATIÈRES GRASSES BRUTES

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

La méthode est destinée à déterminer la teneur en matières grasses brutes des aliments des animaux. Elle ne concerne pas l'analyse des graines et fruits oléagineux définie dans le règlement nº 136/66/CEE du Conseil du 22 septembre 1966.

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

1.1. *Procédé A — Matières grasses directement extractibles*

Ce procédé est applicable aux aliments simples d'origine végétale à l'exception de ceux inclus dans le domaine d'application du procédé B.

1.2. *Procédé B — Matières grasses brutes totales*

Ce procédé est applicable aux aliments simples d'origine animale et à tous les aliments composés. Il doit être utilisé pour tous les aliments dont les matières grasses ne sont pas complètement extractibles sans hydrolyse préalable, par exemple les glutens, les levures, les protéines de pomme de terre et les aliments 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 résultant de l'application du procédé A, le résultat obtenu par le procédé B sera accepté comme valeur réelle.

2. **Principe**

2.1. *Procédé A*

L'échantillon est extrait par de l'éther de pétrole. Le solvant est distillé 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.

3. **Réactifs**

3.1. Éther de pétrole, intervalle d'ébullition: de 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 3 M.

3.4. Adjuvant de filtration par exemple terre de diatomée, Hyflo-supercel.

4. **Appareillage**

4.1. Extracteur. Si l'appreil est muni d'un siphon (appareil de Soxhlet), le débit du reflux doit être réglé de façon à obtenir dix cycles au moins 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 °C ± 3 °C, soit à pression atmosphérique à 100 °C ± 3 °C.

5. **Mode opératoire**

5.1. *Procédé A (voir observation 8.1)*

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

Placer la cartouche dans un extracteur (4.1) et extraire durant 6 heures par de l'éther de pétrole (3.1). Recueillir l'extrait dans un ballon sec, muni de quelques fragments de pierre ponce [1] et tarer.

Éliminer le solvant par distillation. Sécher le résidu en plaçant le ballon pendant une heure et demie dans une étuve à dessiccation (4.3). Laisser refroidir dans un dessiccateur et peser. Sécher à nouveau pendant 30 minutes pour s'assurer que le poids de la matière grasse 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 observation 8.2), les introduire dans un cylindre de 400 ml ou une fiole conique de 300 ml et ajouter 100 ml d'acide chlorhydrique 3 M (3.3) et quelques fragments de pierre ponce. Recouvrir le cylindre 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'ajuvant de filtration (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 100 °C ± 3 °C.

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

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

6. **Calcul des résultats**

Exprimer le résultat de la pesée en parts pourcent d'échantillon.

7. **Répétabilité**

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

— 0,2 %, en valeur absolue, pour les teneurs en matières grasses brutes inférieures à 5 %,

— 4 % 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, difficiles à broyer ou non appropriés au prélèvement d'une prise d'essais réduite homogène, procéder comme suit:

Peser, à 1 mg près, 20 g de l'échantillon et les mélanger à 10 g ou plus de sulfate de sodium anhydre (3.2). Extraire par l'éther de pétrole (3.1) comme indiqué en 5.1. Compléter l'extrait obtenu à 500 ml avec de l'éther de pétrole (3.1) et mélanger. Introduire 50 ml de la solution dans un petit ballon sec, muni de quelques fragments de pierre ponce [1] et tarer. Éliminer le solvant par distillation, sécher et poursuivre le mode opératoire comme indiqué en 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 placer à nouveau dans la cartouche (ne pas ajouter de sulfate de sodium) et poursuivre le mode opératoire comme indiqué en 5.1, deuxième et troisième alinéas.

La teneur en matières grasses brutes en parts pourcent d'échantillon est donnée par la formule:

$(10\ a + b) \times 5$

dans laquelle:

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

b = masse, en grammes, du résidu de la seconde extraction.

8.2. La prise d'essai des produits pauvres en matières grasses peut être portée à 5 g.

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 paragraphe 5.2, il peut être plus efficace d'utiliser de l'eau chaude au lieu d'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 des animaux. Un temps de séchage excessif devrait être évité dans la mesure où il peut donner de faibles résultats. Un four à micro-ondes peut également être utilisé.

8.6. Une première extraction selon le procédé A préalablement à l'hydrolyse et à une deuxième extraction selon le procédé B est recommandée si la teneur en matières grasses brutes est supérieure à 15 %. Dans une certaine mesure, cela dépend de la nature des aliments des animaux et de la nature des matières grasses contenues dans lesdits aliments.

PARTIE C

DOSAGE DE L'OLAQUINDOX

(2-[N-2′-(hydroxyethyl)carbamoyl]-3-methylquinoxaline-N^1,N^4-dioxide)

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

La présente méthode permet de doser l'olaquindox dans les aliments des animaux. La limite inférieure de dosage est de 5 mg/kg.

2. **Principe**

L'échantillon est soumis à une extraction par un mélange eau/méthanol. La teneur en olaquindox est déterminée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inversée, avec détection UV.

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

3. **Réactifs**

3.1. Méthanol

3.2. Méthanol de qualité CLHP

3.3. Eau, de qualité CLHP

3.4. Phase mobile pour CLHP

Mélange d'eau (3.3)-Méthanol (3.2), 900 + 100 (V + V)

3.5. Substance étalon: olaquindox pur 2-[N-2′-(hydroxyethyl)carbamoyl]-3-methylquinoxaline-N^1,N^4-dioxyde, E 851.

3.5.1. Solution étalon mère d'olaquindox, 250 µg/ml

Peser à 0,1 mg près, 50 mg d'olaquindox (3.5) dans un ballon jaugé de 200 ml et ajouter environ 190 ml d'eau. Placer le ballon pendant 20 minutes dans un bain ultrasonique (4.1). Après traitement ultrasonique, porter la solution à température ambiante, porter le contenu jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger. Envelopper le ballon d'une feuille d'aluminium et le placer au réfrigérateur. Renouveler les solutions chaque mois.

3.5.2. Solution étalon intermédiaire d'olaquindox, 25 µg/ml

Transférer 10,0 ml de solution étalon mère (3.5.1) dans un ballon jaugé de 100 ml, porter au trait avec la phase mobile (3.4) et mélanger. Envelopper le ballon d'une feuille d'aluminium et le placer au réfrigérateur. Renouveler les solutions chaque jour.

3.5.3. Solutions étalon de travail

Dans une série de ballons gradués de 50 ml transférer 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 et 20,0 ml de solution étalon intermédiaire (3.5.2). Porter au trait avec la phase mobile (3.4) et mélanger. Envelopper les ballons avec une feuille d'aluminium. Ces solutions correspondent respectivement à 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 et 10,0 µg d'olaquindox par ml. Renouveler les solutions chaque jour.

4. **Appareillage**

4.1. Bain ultrasonique

4.2. Agitateur mécanique

4.3. Équipement CLHP à détecteur UV de longueur d'onde variable ou un détecteur à barrettes de diodes

4.3.1. Colonne de chromatographie de 250 mm × 4 mm, C18, particules de 10 µm, ou équivalent

4.4. Filtre à membrane à 0,45 µm.

5. **Mode opératoire**

NB: l'olaquindox est sensible à la lumière. Effectuer toutes les opérations sous lumière diffuse ou utiliser du verre ambré.

5.1. *Généralités*

5.1.1. Analyser un aliment témoin pour vérifier l'absence d'olaquindox ou de substances interférentes.

5.1.2. Effectuer un test de récupération par analyse d'un aliment témoin auquel il a été ajouté une quantité d'olaquindox, similaire à celle présente dans l'échantillon. Pour obtenir une concentration de 50 mg/kg, transférer 10,0 ml de la solution par étalon mère (3.5.1) 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 attendre 10 minutes tout en mélangeant de nouveau plusieurs fois avant de procéder à l'extraction (5.2)

NB: Aux fins de la présente méthode, l'aliment témoin doit être d'un type similaire à celui de l'échantillon et aucune présence d'olaquindox ne doit y être détectée.

5.2. *Extraction*

Peser à 0,01 g près, environ 50 g de l'échantillon. Transférer dans un ballon conique de 1 000 ml, ajouter 100 ml de méthanol (3.1) et placer le ballon pendant 5 minutes dans un bain ultrasonique (4.1). Ajouter 410 ml d'eau et laisser dans le bain ultrasonique pendant 15 minutes encore. Enlever le ballon du bain ultrasonique, l'agiter pendant 30 minutes sur l'agitateur (4.2) et filtrer à travers un filtre plissé. Transférer 10,0 ml du filtrat dans un ballon jaugé de 20 ml, porté jusqu'au trait à l'aide d'eau et mélanger une partie aliquote et filtrée au travers d'un filtre à membrane (4.4). (Voir point 9 Observation.) Procéder au dosage 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 d'analyse (4.3.1)

Phase mobile (3.4):	mélange d'eau (3.3) — et de méthanol (3.2), 900 + 100 (V + V)
Débit:	1,5 à 2 ml/min
Longueur d'onde de détection:	380 nm
Volume d'injection:	20 µl-100 µl

Vérifier la stabilité du système chromatographique en injectant plusieurs fois la solution étalon de travail (3.5.3) contenant 2,5 µg/ml jusqu'à obtention de hauteurs de pic et de temps de rétention constants.

5.3.2. Courbe de calibration

Injecter chaque solution de travail (3.5.3) plusieurs fois et déterminer les hauteurs (surfaces) de pic moyennes pour chaque concentration. Établir une courbe de calibration en utilisant les hauteurs (surfaces) de pic moyennes des solutions de travail comme ordonnées et les concentrations correspondantes en µg/ml comme abscisses.

5.3.3. Solution de l'échantillon

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

6. Expression des résultats

À partir de la hauteur (surface) moyenne des pics de l'olaquindox de la solution de l'échantillon, déterminer la concentration de la solution de l'échantillon en µg/ml par référence à la courbe de calibration (5.3.2).

La teneur t en olaquindox, exprimée en mg/kg de l'échantillon, est donnée par la formule suivante:

$$t = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

formule dans laquelle:

c = la concentration en olaquindox dans l'extrait de l'échantillon (5.2) en µg/ml

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

7. Validation des résultats

7.1. *Identité*

L'identité de l'analyte peut être confirmée par co-chromatographie ou à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes qui permet de comparer les spectres de l'extrait de l'échantillon (5.2) et de la solution de travail (3.5.3) contenant 5,0 µg/ml.

7.1.1. Cochromatographie

Un extrait de l'échantillon (5.2) est additionné d'une quantité appropriée de la solution de travail (3.5.3). La quantité d'olaquindox ajoutée doit être semblable à la quantité d'olaquindox constatée dans l'extrait de l'échantillon.

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

7.1.2. Détection par barrettes de diodes

Évaluer les résultats conformément aux critères suivants:

a) la longueur d'onde d'absorption maximale des spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrée à l'apex du pic sur le chromatogramme doit s'établir dans une marge déterminée par le pouvoir de résolution du système de détection. Il est généralement de ± 2 nm;

b) entre 220 et 400 nm, les spectres de l'échantillon et de l'étalon enregistrés à l'apex du pic du chromatogramme, ne doivent pas être différents pour les parties du spectre situées entre 10 et 100 % de l'absorbance relative. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et que, nulle part, l'écart observé entre les spectres ne dépasse 15 % de la densité optique du spectre au sommet du pic;

c) entre 220 en 400 nm, les spectres de la courbe ascendante, de l'apex et de la courbe descendante du pic produits par l'extrait de l'échantillon ne doivent pas être différents les uns des autres pour les parties du spectre situées entre 10 et 100 % de l'absorbance relative. Ce critère est rempli lorsque les mêmes maxima sont présents et qu'en tous point observés, la déviation entre les spectres ne dépasse pas 15 % de l'absorbance du spectre de l'apex du pic.

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

7.2. *Répétabilité*

La différence entre les résultats de deux dosages parallèles effectués sur le même échantillon ne doit pas dépasser 15 % du résultat supérieur pour les teneurs en olaquindox entre 10 et 200 mg/kg.

7.3. *Rendement*

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

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

Une étude interlaboratoire communautaire a été organisée au cours de laquelle 4 échantillons d'aliment pour porcelets, y compris un aliment témoin ont été analysés par 13 laboratoires. Les résultats de l'étude figurent ci-après:

	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
moyenne [mg/kg]	—	14,6	48,0	95,4
S_r [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
S_R [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
CV_r [%]	—	5,6	4,3	6,7
CV_R [%]	—	11,1	8,9	8,8
Contenu nominal [mg/kg]	—	15	50	100
rendement (%)	—	97,3	96,0	95,4

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 l'écart type de la répétabilité
CV_R : coefficient de variation de l'écart type de la reproductibilité.

9. **Observation**

Bien que la méthode n'ait pas été validée pour les aliments contenant plus de 100 mg/kg d'olaquindox, on peut obtenir des résultats satisfaisants en utilisant une prise d'essai plus faible et/ou en diluant l'extrait (5.2) de façon telle que sa concentration se situe dans la zone de la courbe de calibration (5.3.2).