DOUZIÈME DIRECTIVE 93/117/CE DE LA COMMISSION

du 17 décembre 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 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 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'analyse communautaires ;

considérant qu'il convient d'établir une méthode d'analyse communautaire permettant de contrôler le respect des conditions d'emploi de la robénidine et du méthyl-benzoquate dans les aliments des animaux ;

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 robénidine et en méthyl-benzoquate, soient effectuées selon les méthodes correspondantes décrites en annexe.

Article 2

Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer aux dispositions de la présente directive au plus tard le 30 novembre 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

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

Fait à Bruxelles, le 17 décembre 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

1. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN ROBÉNIDINE

Chlorhydrate de 1,3-*bis*[(4-chlorobenzylidène)amino]guanidine

1. Objet et champ d'application

La présente méthode sert à déterminer la teneur en robénidine dans les aliments pour animaux. La limite inférieure du dosage est de 5 mg/kg.

2. Principe

L'échantillon est extrait à l'aide de méthanol acidifié. L'extrait est séché et une partie aliquote purifiée dans une colonne d'oxyde d'aluminium. La robénidine est éluée de la colonne à l'aide de méthanol, concentrée et portée à un volume adéquat avec la phase mobile. La teneur en robénidine est déterminée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inversée, à l'aide d'un détecteur d'ultraviolets.

3. Réactifs

3.1. *Méthanol*

3.2. *Méthanol acidifié*

Transvaser 4,0 ml d'acide chlorhydrique (p_{20} ca 1,18 g/ml) dans une fiole jaugée de 500 ml, porter au volume avec du méthanol (3.1) et mélanger. Cette solution doit être fraîchement préparée avant l'utilisation.

3.3. *Acétonitrile, qualité CLHP*

3.4. *Tamis moléculaire*

Perles de type 3A, 8-12 mesh (perles de 1,6-2,5 mm, aluminosilicate cristallin, 0,3 nm de diamètre de pores).

3.5. *Oxyde d'aluminium : acide, degré d'activité I pour chromatographie sur colonne*

Transvaser 100 g d'oxyde d'aluminium dans un récipient approprié et ajouter 2,0 ml d'eau. Boucher et agiter pendant environ 20 minutes. Conserver dans un récipient bien fermé.

3.6. *Solution de dihydrogénophosphate de potassium, c = 0,025 mol/l*

Dissoudre 3,40 g de dihydrogénophosphate de potassium dans de l'eau (qualité CLHP) dans une fiole jaugée de 1 000 ml, porter au repère et mélanger.

3.7. *Solution de monohydrogénophosphate disodique, c = 0,025 mol/l*

Dissoudre 3,55 g de monohydrogénophosphate disodique anhydre (ou 4,45 g de dihydrate ou 8,95 g de dodécahydrate) dans de l'eau (qualité CLHP), dans une fiole jaugée de 1000 ml, porter au repère et mélanger.

3.8. *Phase mobile de la CLHP*

Mélanger les réactifs suivants :

650 ml d'acétonitrile (3.3),

250 ml d'eau (qualité CLHP),

50 ml de solution de dihydrogénophosphate de potassium (3.6),

50 ml de solution de monohydrogénophosphate disodique (3.7).

Filtrer à travers un filtre de 0,22 µm (4.6) et dégazer la solution (par exemple, par traitement aux ultrasons pendant 10 minutes).

3.9. *Substance étalon*

Robénidine pure : chlorhydrate de 1,3-*bis*[(4-chlorobenzylidène)amino]guanidine

3.9.1. Solution mère étalon de robénidine : 300 µg/ml

Peser, à 0,1 mg près, 30 mg de substance étalon de robénidine (3.9). Dissoudre dans du méthanol acidifié (3.2), dans une fiole jaugée de 100 ml, porter au repère avec le même solvant et mélanger. Envelopper la fiole dans une feuille d'aluminium et conserver à l'abri de la lumière.

3.9.2. Solution étalon intermédiaire de robénidine : 12 µg/ml

Transvaser 10,0 ml de la solution mère étalon (3.9.1) dans une fiole jaugée de 250 ml, porter au repère avec la phase mobile (3.8) et mélanger. Envelopper la fiole dans une feuille d'aluminium et conserver à l'abri de la lumière.

3.9.3. Solutions d'étalonnage

Dans une série de fioles jaugées de 50 ml, transvaser 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 et 25,0 ml de la solution étalon intermédiaire (3.9.2). Porter au repère avec la phase mobile (3.8) et mélanger. Ces solutions ont des concentrations respectives de 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 et 6,0 µg/ml de robénidine. Elles doivent être fraîchement préparées avant l'utilisation.

4. Appareillage

4.1. *Colonne de verre*

Construite en verre ambré, munie d'un robinet et d'un réservoir d'une capacité d'environ 150 ml, d'un diamètre intérieur de 10-15 mm, d'une longueur de 250 mm.

4.2. *Agitateur manuel de laboratoire*

4.3. *Évaporateur rotatif*

4.4. *Équipement pour CLHP avec détecteur d'ultraviolets à longueur d'onde variable ou détecteur à barettes de diodes fonctionnant dans l'intervalle de 250-400 nm*

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. *Filtres de fibres de verre* (Whatman GF/A ou filtres équivalents)

4.6. *Filtres à membrane de 0,22 µm*

4.7. *Filtres à membrane de 0,45 µm*

5. Mode opératoire

Note : La robénidine est sensible à la lumière. L'emploi de verrerie ambrée est recommandé pour toutes les opérations.

5.1. *Généralités*

5.1.1. Il est recommandé d'analyser un aliment non enrichi (blanc) pour vérifier l'absence de robénidine et de substances interférentes.

5.1.2. Il conviendrait d'effectuer un test de rendement en analysant l'aliment blanc (5.1.1) après l'avoir enrichi par ajout d'une quantité de robénidine similaire à celle présente dans l'échantillon. Pour un enrichissement d'une teneur de 60 mg/kg, transvaser 3,0 ml de la solution mère étalon (3.9.1) dans une fiole conique de 250 ml. Ramener la solution à environ 0,5 ml par évaporation dans un courant d'azote. Ajouter 15 g de l'aliment non enrichi, mélanger et attendre pendant 10 minutes avant de procéder à l'extraction (5.2).

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

5.2. *Extraction*

Peser, à 0,01 g près, environ 15 g de l'échantillon préparé. Transvaser dans une fiole conique de 250 ml et ajouter 100,0 ml de méthanol acidifié (3.2), boucher le récipient et agiter pendant une heure avec l'agitateur (4.2). Filtrer la solution à travers un papier filtre de fibres de verre (4.5) et recueillir la totalité du filtrat dans une fiole conique de 150 ml. Ajouter 7,5 g de tamis moléculaire (3.4), boucher le récipient et agiter pendant 5 minutes. Filtrer immédiatement à travers un papier filtre de fibres de verre. Conserver cette solution pour la purification (5.3).

5.3. *Purification*

5.3.1. Préparation de la colonne d'oxyde d'aluminium

Munir l'extrémité inférieure d'une colonne de verre d'un petit tampon de laine de verre (4.1) et tasser à l'aide d'une baguette de verre. Peser et transvaser dans la colonne 11,0 g d'oxyde d'aluminium préparé (3.5). Il convient de réduire l'exposition à l'air au cours de cette opération. Tapoter l'extrémité inférieure de la colonne remplie pour décanter l'oxyde d'aluminium.

5.3.2. Purification de l'échantillon

À l'aide d'une pipette, transférer sur la colonne 5,0 ml de l'extrait d'échantillon préparé (5.2). Maintenir l'embout de la pipette contre la paroi de la colonne et laisser l'oxyde d'aluminium absorber la solution. Éluer la robénidine de la colonne à l'aide de 100 ml de méthanol (3.1), à un débit de 2-3 ml/min, et recueillir l'éluat dans un ballon à fond rond de 250 ml. Sécher la solution de méthanol par évaporation, à pression réduite, à 40 °C, à l'aide d'un évaporateur rotatif (4.3). Redissoudre le résidu dans 3-4 ml de la phase mobile (3.8) et transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 10 ml. Rincer la fiole avec plusieurs fractions de 1-2 ml de la phase mobile et transvaser ces rinçages dans la fiole jaugée. Porter au repère avec le même solvant et mélanger. Une partie aliquote est filtrée à travers un filtre à membrane de 0,45 µm (4.7). Réserver cette solution pour l'analyse par CLHP (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 s'ils conduisent à des résultats équivalents.

Colonne de chromatographie liquide (4.4.1).

Phase mobile de la CLHP (3.8).

Débit : 1,5-2 ml/minute.

Longueur d'onde de détection : 317 nm.

Volume injecté : 20-50 µl.

Contrôler la stabilité du système chromatographique en injectant plusieurs fois la solution d'étalonnage (3.9.3) à 3,6 µg/ml, jusqu'à 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 (3.9.3) 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 d'échantillon (5.3.2) en utilisant le même volume que pour les solutions d'étalonnage et déterminer la hauteur (surface) moyenne des pics de robénidine.

6. Calcul des résultats

À partir de la hauteur (surface) moyenne des pics de robénidine de la solution échantillon, déterminer la concentration de la solution échantillon en µg/ml par référence à la courbe d'étalonnage (5.4.2).

La teneur en robénidine t (mg/kg) de l'échantillon est donnée par la formule suivante :

$$t = \frac{c \times 200}{m}$$

où :

c = concentration en robénidine de la solution échantillon, en microgrammes par millilitre,

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 co-chromatographie ou à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes, permettant de comparer les spectres de l'extrait d'échantillon et de la solution d'étalonnage (3.6.3) contenant 6,0 µg/ml de robénidine.

7.1.1. Co-chromatographie

Un extrait d'échantillon est enrichi par addition d'une quantité appropriée de solution d'étalonnage (3.9.3). La quantité de robénidine ajoutée doit être similaire à la quantité estimée de robénidine trouvée dans l'extrait d'échantillon.

Seule la hauteur du pic de robénidine devrait augmenter, compte tenu à la fois de la quantité ajoutée et de la dilution de l'extrait. La largeur du pic, à la moitié de sa hauteur, doit être d'environ 10 % de sa largeur initiale.

7.1.2. Détection par barrettes de diodes

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 sur le chromatogramme, 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 de plus ou moins 2 nm.

b) Entre 250 et 400 nm, les spectres de l'échantillon et de l'étalon, enregistrés au sommet des pics sur le chromatogramme, ne 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 spectres ne dépasse 15 % de la densité optique du spectre au sommet du pic.

c) Entre 250 et 400 nm, les spectres de la courbe ascendante, du sommet et de la courbe descendante du pic fourni par l'extrait 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 l'écart observé entre les spectres ne dépasse nulle part 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 de deux analyses parallèles, effectuées sur le même échantillon, ne doit pas dépasser 10 % du résultat le plus élevé des teneurs en robénidine supérieures à 15 mg/kg.

7.3. *Rendement*

Pour l'échantillon enrichi, le rendement doit être de 85 % au minimum.

8. Résultats d'une étude interlaboratoire

Dans le cadre d'une étude interlaboratoire de la Communauté européenne, quatre échantillons d'aliments pour volaille et lapins, sous forme de farine ou de pellets, ont été analysés par douze laboratoires. Chaque échantillon a fait l'objet d'une double analyse. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

	Volaille		Lapin	
	Farine	Pellets	Farine	Pellets
Moyenne (mg/kg)	27,00	27,99	43,6	40,1
E_{tr} (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
E_{tR} (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Rendement (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

E_{tr} = écart type de répétabilité.

CV_r = coefficient de variation de répétabilité.

E_{tR} = écart type de reproductibilité.

CV_R = coefficient de variation de reproductibilité.

2. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN MÉTHYL-BENZOQUATE

7-Benzyloxy-6-butyl-3-méthoxycarbonyl-4-quinolone

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

La présente méthode sert à déterminer la teneur en méthyl-benzoquate dans les aliments pour animaux. La limite inférieure du dosage est de 1 mg/kg.

2. **Principe**

Le méthyl-benzoquate est extrait de l'échantillon dans une solution méthanolique d'acide méthanesulfonique. L'extrait est purifié au dichlorométhane, par chromatographie sur résines échangeuses d'ions, puis à nouveau au dichlorométhane. La teneur en méthyl-benzoquate est déterminée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inversée à l'aide d'un détecteur d'ultraviolets.

3. **Réactifs**

3.1. *Dichlorométhane*

3.2. *Méthanol, qualité CLHP*

3.3. *Phase mobile CLHP:*

mélange de méthanol (3.2) et d'eau (qualité CLHP) 75 + 25 (V + V)

Filtrer à travers un filtre de 0,22 µm (4.5) et dégazer la solution (par exemple, par ultrasonification pendant 10 minutes).

3.4. *Solution d'acide méthanosulfonique,* $\sigma = 2\ \%$

Porter 20,0 ml d'acide méthanesulfonique à 1 000 ml par dilution dans du méthanol (3.2).

3.5. *Solution d'acide chlorhydrique,* $\sigma = 10\ \%$

Porter 100 ml d'acide chlorhydrique (p_{20} ca 1,18 g/ml) à 1 000 ml par dilution dans de l'eau.

3.6. *Résine d'Amberlite échangeuse de cations CG-120 (Na), 100-200 mesh*

La résine est prétraitée avant l'emploi : mélanger 100 g de résine avec 500 ml de solution d'acide chlorhydrique (3.5) et porter le mélange à ébullition sur une plaque chauffante, sans cesser d'agiter. Laisser refroidir et décanter l'acide. Filtrer sous vide à travers un filtre en papier. Laver la résine à deux reprises avec 500 ml d'eau, puis avec 250 ml de méthanol (3.2). Rincer la résine avec à nouveau 250 ml de méthanol (3.2) et sécher par courant d'air à travers le gâteau de filtration. Conserver la résine séchée dans un flacon bouché.

3.7. *Étalon : méthyl-benzoquate pur (7-benzyloxy-6-butyl-3-méthoxycarbonyl-4-quinolone)*

3.7.1. Solution mère étalon de méthyl-benzoquate, 500 µg/ml

Peser 50 mg (à 0,1 mg près) de substance étalon (3.7), dissoudre dans une solution d'acide méthanesulfonique (3.4) dans une fiole jaugée de 100 ml, porter au volume et mélanger.

3.7.2. Solution étalon intermédiaire de méthyl-benzoquate, 50 µg/ml

Transvaser 5,0 ml de solution mère étalon (3.7.1) dans une fiole jaugée de 50 ml, porter au volume avec du méthanol (3.2) et mélanger.

3.7.3. Solutions d'étalonnage

Dans une série de fioles jaugées de 25 ml, transvaser 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 et 5,0 ml de la solution étalon intermédiaire (3.7.2). Porter au volume avec la phase mobile (3.3) et mélanger. Ces solutions ont des concentrations respectives de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 et 10,0 µg/ml de méthyl-benzoquate. Les solutions doivent être fraîchement préparées avant l'utilisation.

4. **Appareillage**

4.1. *Agitateur*

4.2. *Évaporateur rotatif*

4.3. *Colonne de verre (250 mm × 15 mm) munie d'un robinet et d'un réservoir d'environ 200 ml*

4.4. *Équipement pour CLHP avec détecteur d'ultraviolets 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. *Filtres à membrane de 0,22 µm*

4.6. *Filtres à membrane de 0,45 µm*

5. **Mode opératoire**

5.1. *Généralités*

5.1.1. Un aliment non enrichi (blanc) doit être analysé afin de vérifier l'absence de méthyl-benzoquate 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 de méthyl-benzoquate similaire à celle présente dans l'échantillon. Pour un enrichissement d'une teneur de 15 mg/kg, ajouter 600µl de la solution mère étalon (3.7.1) à 20 g d'aliment blanc, mélangez et attendez 10 minutes avant de procéder à l'extraction (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 son analyse, du méthyl-benzoquate ne doit pas être détecté.

5.2. *Extraction*

Peser, à 0,01 g près, environ 20 g de l'échantillon préparé et transverser dans une fiole conique de 250 ml. Ajouter 100 ml d'acide méthanesulfonique (3.4) et agiter mécaniquement (4.1) pendant 30 minutes. Filtrer la solution à travers un filtre en papier et conserver le filtrat pour la séparation liquide-liquide (5.3).

5.3. *Séparation liquide-liquide*

Transvaser 25 ml du filtrat (5.2) dans une ampoule à décanter de 500 ml contenant 100 ml de solution d'acide chlorhydrique (3.5). Ajouter 100 ml de dichlorométhane (3.1) dans l'ampoule et agiter pendant 1 minute. Après séparation des phases, laisser la phase inférieure (dichlorométhane) s'écouler dans un ballon à fond rond de 500 ml. Répéter l'extraction de la phase aqueuse avec deux autres portions de dichlorométhane de 40 ml et combiner celles-ci avec le premier extrait dans le ballon rond. Évaporer totalement l'extrait de dichlorométhane au moyen de l'évaporateur rotatif (4.2), qui doit assurer une température de 40 °C et fonctionner à pression réduite. Dissoudre le résidu dans 20 à 25 ml de méthanol (3.2), boucher le ballon et conserver la totalité de l'extrait pour la chromatographie par échange d'ions (5.4).

5.4. *Chromatographie par échange d'ions*

5.4.1. Préparation de la colonne d'échange de cations

Introduire un petit tampon de laine de verre dans l'extrémité inférieure d'une colonne de verre (4.3). Préparer une boue de 5 g de résine échangeuse de cations traitée (3.6) et de 50 ml d'acide chlorhydrique (3.5), verser dans la colonne et laisser reposer. Laisser l'acide s'écouler de manière à établir son niveau juste au-dessus de la surface de la résine et laver la colonne à l'eau jusqu'à ce que l'effluent soit neutre au papier de tournesol. Transvaser 50 ml de méthanol (3.2) dans la colonne et le laisser s'écouler jusqu'à ce qu'il atteigne la surface de la résine.

5.4.2. Chromatographie sur colonne

Au moyen d'une pipette, transvaser soigneusement l'extrait de l'opération (5.3) dans la colonne. Rincer le ballon à fond rond avec deux portions de 5 à 10 ml de méthanol (3.2) et transvaser ces liquides de lavage dans la colonne. Laisser l'extrait s'écouler jusqu'à la surface de la résine et laver la colonne avec 50 ml de méthanol en veillant à ce que le débit ne dépasse pas 5 ml/minute. Éliminer l'effluent. Éluer le méthyl-benzoquate de la colonne au moyen de 150 ml de solution d'acide méthanesulfonique (3.4) et recueillir l'éluat de la colonne dans une fiole conique de 250 ml.

5.5. *Séparation liquide-liquide*

Transvaser l'éluat de l'opération (5.4.2) dans une ampoule à décanter de 1 l. Rincer la fiole conique avec 5 à 10 ml de méthanol (3.2) et combiner le liquide de lavage avec le contenu de l'ampoule à décantation. Ajouter 300 ml de solution d'acide chlorhydrique (3.5) et 130 ml de dichlorométhane (3.1). Agiter pendant 1 minute et laisser les phases se séparer. Laisser s'écouler la phase inférieure (dichlorométhane) dans un ballon à fond rond de 500 ml. Répéter l'extraction de la phase aqueuse avec deux nouvelles portions de 70 ml de dichlorométhane et combiner ces extraits avec le premier dans le ballon à fond rond.

Évaporer totalement l'extrait de dichlorométhane au moyen de l'évaporateur rotatif (4.2), qui doit assurer une température de 40 °C et fonctionner à pression réduite. Dissoudre le résidu dans le ballon dans environ 50 ml de méthanol (3.2) et transvaser quantitativement cette solution dans une fiole graduée de 10 ml. Rincer le ballon à fond rond avec deux nouvelles portions de 1 à 2 ml de méthanol et transvaser le liquide dans la fiole graduée. Porter au volume avec du méthanol et mélanger. Filtrer une portion aliquote à travers un filtre à membrane (4.6). Réserver cette solution pour l'analyse par CLHP (5.6).

5.6. *Analyse par CLHP*

5.6.1. Paramètres

Les conditions suivantes sont données à titre indicatif. D'autres paramètres peuvent être utilisés à condition de produire des résultats équivalents.

Colonne de chromatographie liquide (4.4.1).

Phase mobile de la CLHP (3.3).

Débit : de 1 à 1,5 ml/minute.

Longueur d'onde de détection : 265 nm.

Volume injecté : de 20 à 50 µl.

Contrôler la stabilité du système chromatographique, en injectant plusieurs fois la solution d'étalonnage (3.7.3) à 4,0 µg/ml, jusqu'à l'obtention de surfaces ou hauteurs de pics et de temps de rétention constants.

5.6.2. Courbe d'étalonnage

Injecter plusieurs fois chaque solution d'étalonnage (3.7.3) 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.

5.6.3. Solution échantillon

Injecter plusieurs fois l'extrait échantillon (5.5), en utilisant le même volume que pour les solutions d'étalonnage, et déterminer la hauteur (surface) de pic moyenne du méthyl-benzoquate.

6. Calcul des résultats

À partir de la hauteur (surface) moyenne des pics du méthyl-benzoquate de la solution échantillon, déterminer la concentration de la solution échantillon en µg/ml par référence à la courbe d'étalonnage (5.6.2).

La teneur en méthyl-benzoquate t (mg/kg) de l'échantillon est donnée par la formule suivante :

$$t = \frac{c \times 40}{m}$$

où

c = la concentration de méthyl-benzoquate dans la solution échantillon, en microgrammes par millilitre,

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

7. Validation des résultats

7.1. *Identité*

L'identité de l'analyte peut être confirmée par co-chromatographie ou par l'utilisation d'un détecteur à barrettes de diodes, qui permet de comparer les spectres de l'extrait échantillon et de la solution d'étalonnage (3.7.3) à 10 µg/ml de méthyl-benzoquate.

7.1.1. Co-chromatographie

Un extrait échantillon est enrichi par addition d'une quantité appropriée de solution d'étalonnage (3.7.2). La quantité de méthyl-benzoquate ajoutée doit être similaire à la quantité estimée de méthyl-benzoquate trouvée dans l'extrait échantillon.

Seule la hauteur du pic de méthyl-benzoquate 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 de plus ou moins 2 nm.

b) Entre 220 et 350 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 l'écart observé entre les deux spectres ne dépasse nulle part 15 % de la densité optique de l'analyte étalon.

c) Entre 220 et 350 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 l'écart observé entre les spectres ne dépasse nulle part 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 10 % du résultat le plus élevé pour des teneurs en méthyl-benzoquate comprises entre 4 et 20 mg/kg.

7.3. *Rendement*

En ce qui concerne l'échantillon enrichi, le rendement doit être de 90 % au minimum.

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

Cinq échantillons ont été analysés par dix laboratoires dans le cadre d'une étude interlaboratoire. Chaque échantillon a fait l'objet d'une analyse en double.

Résultats

	Blanc	Farine 1	Pellets 1	Farine 2	Pellets
Moyenne (mg/kg)	n.d.	4,50	4,50	8,90	8,70
E_{tr} (mg/kg)	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r (%)	—	6,70	4,40	6,70	5,70
E_{tR} (mg/kg)	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R (%)	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Rendement (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

n.d. = non détecté,

E_{tr} = écart type de répétabilité,

CV_r = coefficient de variation de répétabilité,

E_{tR} = écart type de reproductibilité,

CV_R = coefficient de variation de reproductibilité.