ORDRE DE SERVICE

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE,
DE L'ALIMENTATION, DE LA PECHE ET DES AFFAIRES RURALES

Direction générale de l'alimentation **Sous-direction de la santé et de la protection animales** **Bureau de la pharmacie vétérinaire et de l'alimentation animale** **Sous-direction de la réglementation, de la recherche et de la coordination des contrôles** **Bureau de la recherche et des laboratoires d'analyses** Adresse : 251, rue de Vaugirard 75 732 PARIS CEDEX 15 Dossier suivi par : Lilian Puech Tél. : 01 49 55 47 78 Réf. interne :	**NOTE DE SERVICE** **DGAL/SDSPA/SDRRCC/N2003-8142** **Date : 13 AOÛT 2003** Classement :

Date de mise en application : immédiate
Abroge et remplace :
Date limite de réponse :
Nombre d'annexes : 1
Degré et période de confidentialité :

Objet : Méthode de détection des résidus d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) dans le muscle des animaux de boucherie.

MOTS-CLES : résidus – AINS – muscle – méthode d'analyse

Résumé : La présente note de service référence la méthode d'analyse officielle de détection des résidus d'AINS dans le muscle des animaux de boucherie

Destinataires	
Pour exécution : - Directeurs départementaux des services vétérinaires - Laboratoires vétérinaires départementaux - Laboratoire vétérinaire de Rungis	Pour information : - Préfets - Inspecteurs généraux de la santé publique vétérinaire - Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires - Directeurs des Ecoles nationales vétérinaires - Directeur de l'Ecole nationale des services vétérinaires - Directeur de l'INFOMA - Directeur général de l'AFSSA - LERMVD, AFSSA site de Fougères

J’ai l’honneur de vous faire parvenir les références de la méthode d’analyse officielle de détection des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans le muscle des animaux de boucherie par CLHP référencée LMV/03/01 version 1.

Cette méthode a été développée par le laboratoire national de référence pour le contrôle des médicaments vétérinaires (Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Laboratoire d’études et de recherche sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants –AFSSA LERMVD, site de Fougères).

L’adjoint au Directeur Général
Jean-Jacques RENAULT

ANNEXE : METHODE DE DEPISTAGE DES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIENS DANS LE MUSCLE DES ANIMAUX DE BOUCHERIE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Responsable : B. Roudaut Mars 2003

Laboratoire d'études et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants AFSSA
B.P.90203 - 35302 FOUGERES Cedex
La Haute-Marche - JAVENE - 35133 FOUGERES (France)

Tél : 02 99 94 78 78
Fax : 02 99 94 78 80

AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS DE SECURITE

D'une manière générale, les solvants, acides et bases concentrés sont à manipuler sous une hotte ventilée.

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode a pour objet la détection et le dosage des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans les muscles de bovins, ovins, caprins, porcins, cervidés et équins par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Les limites de détection ont été estimées à 16 µg/kg pour le carprofène, 36 µg/kg pour le kétoprofène, 63 µg/kg pour la flunixine, 73 µg/kg pour l'acide tolfénamique et à 5 µg/kg pour le védaprofène. La phénylbutazone peut se détecter à partir de 50 µg/kg. Pour doser la flunixine et l'acide tolfénamique à la LMR, il est nécessaire d'utiliser un détecteur de masse.

Les Limites Maximales de Résidus (LMR) actuellement en vigueur au niveau de l'Union Européenne sont les suivantes pour les dérivés de l'acide arylpropionique : carprofène : 500 µg/kg (bovins, équins) , kétoprofène : pas de LMR (annexe II) , védaprofène : 50 µg/kg (équins) ; pour les dérivés de l'acide anthranilique : acide tolfénamique : 50 µg/kg (bovins, porcins) ; flunixine : 20 µg/kg (bovins), 50 µg/kg (porcins). La phénylbutazone n'a pas de LMR.

2 – PRINCIPE

La méthode comporte quatre étapes :

- Homogénéisation des échantillons.
- Extraction des résidus par l'acétonitrile après acidification.
- Purification de l'extrait sur colonne d'extraction en phase solide (silice greffée C18).
- Dosage par CLHP en gradient sur colonne de silice greffée C18 et détection dans l'UV à 254 nm pour le kétoprofène et le carprofène, 284 nm pour la flunixine et l'acide tolfénamique et par fluorescence pour le védaprofène. La phénylbutazone peut se détecter en UV à 245 nm.

3 - REACTIFS ET PRODUITS

Au cours de l'analyse, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique et de l'eau ultra-pure. Les références sont données à titre indicatif.

3.1. Acétonitrile pour HPLC (Fisher A/0626)

3.2. Hexane (Fisher H/0411)

3.3. Ether diéthylique (Fisher Labosi E0532)

3.4. Méthanol (Fisher M/4000)

3.5. Solution hexane/éther diéthylique (1:1, V/V)

3.6. Solution acétonitrile/méthanol (90:10, V/V)

3.7. Acide ascorbique (Prolabo 20155.294) : préparer une solution à 0,01 mol/l (1,76 g/l).

3.8. Acide chlorhydrique 36% (Fisher Labosi A0420) : préparer une solution à 1 mol/l (2,08 ml dans 25 ml d'eau).

3.9. Acide acétique 99-100% (Fisher Labosi A0145) : préparer une solution d'acide acétique à 0,1 mol/l (5,55 ml dans 1 litre d'eau) et un mélange acétonitrile/acide acétique 0,1 mol/l (50/50).

3.10. Etalons :

Carprofène (Pfizer)

Kétoprofène (Sigma K 1751)

Flunixine méglumine (Schering Plough)

Acide tolfénamique (Sigma T 0535)

Phénylbutazone (Sigma P 8386)

Védaprofène (Akzo Nobel)

3.11. Solutions étalons

3.11.1. Solutions mères

Préparer pour chaque molécule une solution-mère à 1000 µg/ml dans le mélange acétonitrile/méthanol (90/10), en pesant dans une fiole de 50 ml la quantité d'étalon correspondant à 50 mg de matière active et en complétant à 50 ml. Placer la fiole 5 min dans une cuve à ultrasons.

Ces solutions se conservent au moins 6 mois au congélateur.

3.11.2. Solutions intermédiaires

Transférer 5 ml de chacune des solutions mères (carprofène, kétoprofène, flunixine et acide tolfénamique) dans une fiole de 100 ml et compléter à 100 ml avec le mélange acétonitrile/méthanol (90/10) pour obtenir une solution intermédiaire à 50 µg/ml de chaque molécule.

Transférer 0,5 ml de la solution mère de védaprofène dans une fiole de 100 ml et compléter à 100 ml avec le mélange acétonitrile/méthanol (90/10) pour obtenir une solution intermédiaire à 5 µg/ml.

Ces solutions se conservent au moins 6 mois au congélateur.

3.11.3. Solutions de supplémentation :

- Pour les échantillons de bovins, ovins, porcins, cervidés : préparer à partir de la solution intermédiaire contenant les quatre molécules, des solutions à 1 - 2,5 - 5 et 7,5 µg/ml par dilution dans un mélange acétonitrile/méthanol (90/10).

Pour le contrôle, préparer une solution à 5 µg/ml pour le carprofène et le kétoprofène et à 1 µg/ml pour la flunixine et l'acide tolfénamique.

• Pour les échantillons d'équins : préparer à partir des solutions intermédiaires des solutions à 1 - 2,5 - 5 et 7,5 µg/ml pour les quatre molécules et à 0,1 – 0,25 – 0,5 et 0,75 µg/ml pour le védaprofène par dilution dans un mélange acétonitrile/méthanol (90/10).
Pour le contrôle, préparer une solution à 5 µg/ml pour le carprofène et le kétoprofène, à 1 µg/ml pour la flunixine et l'acide tolfénamique et à 0,5 µg/ml pour le védaprofène.

Ces solutions se conservent au moins 2 mois au réfrigérateur.

3.11.4. Solutions d'analyse :
Pour les échantillons de bovins, ovins, porcins, cervidés : préparer à partir des solutions de supplémentation des solutions à 200, 500, 1000 et 1500 ng/ml par dilution dans un mélange acétonitrile/acide acétique 0,1 mol/l (50/50).
Pour les échantillons d'équins : préparer à partir des solutions de supplémentation des solutions à 200, 500, 1000 et 1500 ng/ml pour les quatre molécules et à 20, 50, 100 et 150 ng/ml pour le védaprofène.

Ces solutions se conservent au moins 2 mois au réfrigérateur.

3.12. Muscle témoin dépourvu de traces d'anti-inflammatoires non stéroïdiens.

3.13. Echantillons supplémentés
Ajouter 100 µl de solution de supplémentation à 1 g de muscle témoin homogénéisé. Agiter 5 s au vortex. Laisser en contact pendant au moins 15 min.

4 - APPAREILLAGE

Les références ci-dessous sont données à titre indicatif. Tout matériel équivalent peut être utilisé.

4.1. Verrerie

4.1.1. Fioles jaugées en verre de 20, 50 et 100 ml.

4.1.2. Pipettes automatiques, type Gilson Pipetman P100, et P1000.

4.1.3. Tubes à centrifuger en polypropylène, de 50 ml, type Corning VWR 430290.

4.1.4. Tubes à centrifuger en polypropylène de 10 ml (16 x 95 mm), type CML TC10PRO.

4.1.5. Bouchons en silicone, adaptés aux tubes de 10 ml.

4.1.6. Flacons à vis en polypropylène de 500 µl pour injecteur automatique, type Interchim CH 963290.

4.2. Matériel

4.2.1. Râpe à fromage ou moulinette.

4.2.2. Agitateur électrique pour tubes à essai, type Vortex.

4.2.3. Distributeur de solvants 0-10 mL, type Socorex.

4.2.4. Centrifugeuse de laboratoire, type Jouan GR4.11.

4.2.5. Système d'extraction en phase solide, type Lida, Interchim 2100-00, relié à une source de vide (trompe à vide ou pompe).

4.2.6. Colonne d'extraction en phase solide, Chromabond C18-ec, 6cc-500mg, Macherey-Nagel, 730014.

4.2.7. Pompe à vide, type Bioblock 99288.

4.2.8. Bouteille d'azote 99,5 %, munie d'un détendeur à deux étages, type Air liquide.

4.2.9. Concentrateur-évaporateur sous flux d'azote, type Prolabo.

4.2.10. Balance de précision, type Mettler-Toledo PB302.

4.2.11. Balance de précision analytique, type Sartorius A120S.

4.2.12. Bain à ultrasons, type Branson 2210.

4.2.13. Pompe CLHP, type Thermo Separation Products P 4000.

4.2.14. Injecteur automatique, type Thermo Separation Products AS3000 ou injecteur manuel.

4.2.15. Détecteur UV-visible, type Thermo Separation Products UV 6000 LP.

4.2.16. Détecteur fluorimétrique, type Jasco FP 1520.

4.2.17. Station d'acquisition des données, type ChromQuest (Thermo Separation Products) ou intégrateur.

4.2.18. Colonne analytique C18 (150 x 4,6 mm), type Varian Inertsil ODS-3, 5 µm, avec précolonne (10 x 3 mm) du même type.

5. MODE OPERATOIRE

5.1. Extraction

5.1.1. Décongeler et homogénéiser 20 g de muscle.

5.1.2. Transférer 1 (± 0,02) g de muscle homogénéisé dans un tube de 10 ml en polypropylène.

5.1.3. Ajouter 1 ml d'eau, agiter 1 min au vortex

5.1.4. Laisser en contact pendant 10 min.

5.1.5. Ajouter 150 µl d'acide chlorhydrique à 1 mol/l, agiter 5 s au vortex.

5.1.6. Laisser en contact pendant 10 min.

5.1.7. Ajouter 4 ml d'acétonitrile, agiter 1 min au vortex.

5.1.8. Centrifuger 10 min à 2500 *g*.

5.1.9. Transférer le surnageant dans un tube de 50 ml en polypropylène.

5.1.10. Ajouter 8 ml de solution d'acide ascorbique à 0,01 mol/l et agiter manuellement quelques secondes.

5.2. Purification

5.2.1. Adapter la colonne d'extraction sur le système d'extraction.

5.2.2. Laver la colonne d'extraction par 2 ml de mélange hexane/éther diéthylique (50/50).

5.2.3. Conditionner la colonne d'extraction par 2 ml de méthanol, puis 2 ml de solution d'acide ascorbique 0,01 mol/l.

5.2.4. Transférer l'extrait dilué sur la cartouche et filtrer sous vide à un débit de 0,9 ml/min environ.

5.2.5. Rincer le tube d'extrait par 1 ml de solution d'acide ascorbique à 0,01 mol/l et déposer la solution de lavage sur la cartouche.

5.2.6. Rincer la cartouche par 2 ml de solution d'acide ascorbique à 0,01 mol/l, puis 2 ml d'eau.

5.2.7. Sécher la cartouche sous vide pendant 1 heure.

5.2.8. Eluer par 2,5 ml de mélange hexane/éther diéthylique (50/50).

5.2.9. Evaporer sous flux d'azote, à environ 50°C.

5.2.10. Reprendre par 0,5 ml de mélange acétonitrile/acide acétique 0,1 mol/l (50/50) et agiter 30 s au vortex.

5.2.11. Placer le tube 2 min dans la cuve à ultra-sons.

5.2.12. Transférer dans un flacon pour injecteur.

5.2.13. Injecter 50 µl dans le système chromatographique.

5.3. Dosage chromatographique

- Débit de la pompe : 1 ml/min
- Phase mobile : gradient linéaire d'élution

Pour les échantillons de bovins, ovins, porcins, cervidés :

Temps (min)	Acide acétique 0,1 mol/l (%)	Acétonitrile (%)
0	50	50
10	40	60
20	40	60
21	50	50
25	50	50

Pour les équins :

Temps (min)	Acide acétique 0,1 mol/l (%)	Acétonitrile (%)
0	50	50
10	40	60
24	40	60
25	50	50
30	50	50

- Détection UV: λ = 254 nm pour le carprofène et le kétoprofène
  λ = 284 nm pour la flunixine et l'acide tolfénamique
  λ = 245 nm pour la phénylbutazone

- Détection fluorimétrique : λ_{ex} = 220 nm, λ_{em} = 335 nm pour le védaprofène

- Temps de rétention en min (présentés à titre indicatif) :

Molécule	Temps (min)
Kétoprofène	6,0
Carprofène	9,0
Flunixine	12,1
Acide tolfénamique	17,7
Védaprofène	21,8

La phénylbutazone a un temps de rétention de l'ordre de 12,7 min.

6 - EXPRESSION DES RESULTATS

6.1. Mode de calcul

6.1.1. Etablir la droite d'étalonnage obtenue avec les solutions d'analyse pour chaque molécule. Déterminer l'équation de cette droite :

y = ax + b

y = aire du pic
x = concentration (ng/ml)
a = pente
b = ordonnée à l'origine

6.1.2. Calculer pour chacune des molécules le pourcentage de récupération dans le muscle.
Déterminer la concentration finale de l'extrait (**Cf**) à partir de l'équation de la droite d'étalonnage (6.1.1) :

$$Cf = \frac{Yf - b}{a}$$

Yf : Aire du pic
a : pente de la droite d'étalonnage
b : ordonnée à l'origine

Calculer le pourcentage de récupération:

$$R = \frac{Cf \times 100}{F \times Cv}$$

Cf : concentration finale de l'extrait déterminée à partir de la droite d'étalonnage
Cv : concentration vraie ou concentration de supplémentation (par exemple : 500 µg/kg pour le carprofène et le kétoprofène et 100 µg/kg pour la flunixine et l'acide tolfénamique)
F : facteur de concentration (soit 2 dans ce cas)

Lors de la validation, les pourcentages moyens (n = 12) de récupération pour le muscle de boeuf supplémenté à 500 µg/kg (kétoprofène, carprofène) et à 100 µg/kg (flunixine, acide tolfénamique) et pour le muscle de cheval supplémenté à 50 µg/kg (védaprofène) ainsi que les coefficients de variation de répétabilité, étaient de :

Molécule	Pourcentage de récupération moyen (%)	Ecart-type	CV_r	CV_R
Kétoprofène	84,9	7,6	8,7	9,0
Carprofène	73,6	6,5	9,3	9,3
Flunixine	95,5	12,2	10,0	13,1
Acide tolfénamique	81,4	7,1	7,1	9,0
Védaprofène	69,1	8,4	3,2	13,1

6.1.3. Calculer la concentration (µg/kg) en anti-inflammatoire non-stéroïdien dans les échantillons analysés en tenant compte du pourcentage de récupération et du facteur de concentration :

$$C = \frac{Cf \times 100}{2 \times R}$$

Cf : concentration finale de l'extrait déterminée à partir de la droite d'étalonnage
R : pourcentage de récupération

Les limites de détection ont été estimées à 16 µg/kg pour le carprofène, 36 µg/kg pour le kétoprofène, 63 µg/kg pour la flunixine, 73 µg/kg pour l'acide tolfénamique et 5 µg/kg pour le védaprofène.

6.2. Contrôle de qualité

A chaque série d'échantillons de muscle de bovins, ovins, caprins, porcins et cervidés, ajouter au minimum un échantillon de muscle dépourvu de traces d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et un échantillon de muscle supplémenté à 500 µg/kg de kétoprofène et de carprofène et 100 µg/kg de flunixine et d'acide tolfénamique.

A chaque série d'échantillons de muscle d'équins, ajouter au minimum un échantillon de muscle dépourvu de traces d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et un échantillon de muscle supplémenté à 500 µg/kg de kétoprofène et de carprofène, 100 µg/kg de flunixine et d'acide tolfénamique et 50 µg/kg de védaprofène.