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/N2003-8144** **Date : 13 AOÛT 2003** Classement :

Date de mise en application : immédiate
Abroge et remplace :
Date limite de réponse :
Nombre d'annexes : 2
Degré et période de confidentialité :

Objet : Méthodes de détection des résidus d'anticoccidiens dans le muscle et de flubendazole dans le muscle et les œufs.

MOTS-CLES : résidus – anticoccidiens – flubendazole - muscle – oeuf – méthode d'analyse

Résumé : La présente note de service référence les méthodes d'analyse officielle de détection des résidus d'anticoccidiens dans le muscle et de flubendazole dans le muscle et les œufs.

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 des méthodes d’analyse officielle de détection des résidus d’anticoccidiens dans le muscle et de flubendazole dans le muscle et les œufs.

Méthodes	Références
Dépistage par chromatographie planaire de résidus de polyéthers ionophores (anticoccidiens) dans le muscle	LMV/03/03 version 1
Dépistage par chromatographie planaire de résidus de flubendazole dans les œufs et dans le muscle de volaille	LMV/03/04 version 1

Ces méthodes ont été développées 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) et, pour la méthode de détection du flubendazole, en collaboration avec le laboratoire Charles Flachat.

L’adjoint au Directeur Général
Jean-Jacques RENAULT

ANNEXE 1 : DEPISTAGE PAR CHROMATOGRAPHIE PLANAIRE DE RESIDUS DE POLYETHERS IONOPHORES (ANTICOCCIDIENS) DANS LE MUSCLE

Responsable : J.P. Abjean Avril 2003

Recherche et développement méthodologique : J.P. Abjean, S. Gautier, R. Gahedi, Y. Pirotais

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

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS DE SECURITE

Cette méthode implique la connaissance par l'opérateur des règles usuelles de manipulation des produits chimiques et des solvants. Elle devra être, autant que possible, mise en œuvre sous hotte ventilée.

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Les polyéthers ionophores sont des substances autorisées comme additifs alimentaires pour leur activité anticoccidienne. Ils permettent en outre une meilleure efficience énergétique de la nourriture fournie aux animaux. Ces substances ne sont pas soumises au règlement « LMR » et il n'existe donc pas de limite maximum en résidus. Cependant, le risque toxicologique ne peut être totalement écarté. La méthode ci-après permet la détection des résidus de monensin, narasin et salinomycine à des concentrations respectivement égales ou inférieures à 50, 200 et 200 µg/ kg.

2 - PRINCIPE

La méthode comprend six étapes principales :

- Extraction par un solvant organique ;
- Purification sur cartouche de gel de silice ;
- Dépôt sur plaque à zone de concentration ;
- Chromatographie ;
- Dérivation sur plaque ;
- Lecture à 366 nm.

Remarque *: Les références des réactifs et matériels indiqués ci–après sont données* ***à titre indicatif*** *et peuvent être remplacés par des réactifs et matériels de spécifications équivalentes. Toutefois, il conviendra de s'assurer au préalable que le(s) remplacement(s) ne compromet(tent) pas la fiabilité de l'essai.*

3 - REACTIFS ET PRODUITS

3.1. Réactifs

3.1.1. Isohexane (Fisher H/0411).

3.1.2. Isooctane (Fisher T/3601)

3.1.3. Méthanol (Fisher M/4000).

3.1.4. Acétate d'éthyle (Fisher E/0900).

3.1.5. Dichlorométhane (Fisher D/1852).

3.1.6. Triéthylamine (Merck 8217.0500).

3.1.7. Acide sulfurique concentré (Merck 1 00 731).

3.1.8. Acide acétique (Labosi A 4701901).

3.1.9. 4 méthoxybenzaldéhyde (Merck 8.22314.0250).

3.1.10. Monensin (Sigma M 5273).

3.1.11. Narasin (Sigma N 1271).

3.1.12. Salinomycine (Sigma S 4526).

3.2. Solutions

3.2.1. Solutions mères à 1 mg/ml de monensin et à 0,1 mg/ml de salinomycine et de narasin préparées dans le méthanol.

3.2.2. Solutions de supplémentation à 10 µg/ml dans de l'acétate d'éthyle, préparées extemporanément à partir des solutions mères.

3.2.3. Solution de révélation : 100 µl de 4 méthoxybenzaldéhyde + 100 µl d'acide sulfurique concentré, QSP 10 ml avec de l'acide acétique concentré. Préparation extemporanée.

4 - MATERIEL

4.1. Verrerie

4.1.1. Tubes à centrifuger de 20 ml de capacité environ.

4.1.2. Fioles jaugées de 100 ml.

4.1.3. Cuve à chromatographie type Camag 10X20 ou 10X10 (Merck).

4. 2. Autres matériels

4.2.1. Pipettes automatiques de laboratoire et cônes correspondants type Gilson.

4.2.2. Distributeurs de solvants 1-10 ml.

4.2.3. Agitateur électrique « vortex » Top Mix Bioblock.

4.2.4. Balance de précision A 120 S Sartorius (précision au 0,1 mg).

4.2.5. Balance de laboratoire Mettler Toledo PB 302 (précision 10 mg).

4.2.6. Evaporateur sous flux d'azote Prolabo.

4.2.7. Centrifugeuse réfrigérée type GR 412 Jouan.

4.2.8. Cuve pour extraction en phase solide.

4.2.9. Cartouches d'extraction en phase solide Sep-Pak silica 3 cc (Waters 020810).

4.2.10. Table U.V. 366 nm.

4.2.11. Broyeur ménager type Moulinex.

4.2.12. Plaques HPTLC gel de silice Si 60 sans indicateur de fluorescence et avec zone de concentration 10X20 ou 10X10 (Merck 1.13748 ou 1.13749).

5 - ECHANTILLONS

Les échantillons sont stockés avec une identification propre au laboratoire.

6 - MODE OPERATOIRE

6.1. Extraction

6.1.1. Peser 5 ± 0,2 g de muscle broyé.

6.1.2. Pour assurer la qualité des essais, préparer 1 témoin positif en monensin et en salinomycine en ajoutant 25 µl de solution de supplémentation de monensin et 100 µl de solution de supplémentation de salinomycine et 1 témoin positif en monensin et en narasin en ajoutant 25 µl de solution de supplémentation de monensin et 100 µl de solution de supplémentation de narasin.

6.1.3. Ajouter 10 ml de mélange isooctane /acétate d'éthyle 9/1, agiter le tube au vortex pendant 1 min.

6.1.4. Centrifuger 10 min. à 3500 t/ min.

6.2. Purification

6.2.1. Déposer la phase organique sur une cartouche Si 500 mg.

6.2.2. Rincer la cartouche par 10 ml de dichlorométhane.

6.2.3. Eluer par 6 ml de méthanol.

6.2.4. Evaporer à sec sous flux d'azote à 60°C environ.

6.2.5. Reprendre le résidu par 100 µl d'acétate d'éthyle.

6.3. Chromatographie détection U.V. 366 nm

6.3.1. Déposer 10 µl d'extrait à 1,5 cm du bas de la zone de concentration.

6.3.2. Chromatographier sur 4 cm à partir du haut de la zone de concentration avec le mélange hexane /acétate d'éthyle 75/25 – triéthylamine (100 µl de triéthylamine pour 7,5 ml d'hexane et 2,5 ml d'acétate d'éthyle).

6.3.3. Sécher la plaque sous hotte pendant au moins 10 min.

6.3.4. Pulvériser la solution de révélation sur la plaque, jusqu'à l'obtention d'une imprégnation maximale.

6.3.5. Placer la plaque 5 min. à environ 60°C.

6.3.6. Lire la plaque sur une table U.V. 366 nm.

7 - RESULTATS - INTERPRETATION

7.1. Les témoins supplémentés devront permettre de retrouver une tache fluorescente présumant pour les essais une éventuelle contamination par un polyéther ionophore. Dans tous les cas, il est impératif de retrouver une tache fluorescente pour ces essais supplémentés, faute de quoi l'essai devra être déclaré non valide.

7.2. Tout essai présentant une tache fluorescente en aspect et en Rf. comparable à celle des témoins devra faire l'objet d'une analyse de confirmation.

ANNEXE 2 : DEPISTAGE PAR CHROMATOGRAPHIE PLANAIRE DE RESIDUS DE FLUBENDAZOLE DANS LES ŒUFS ET DANS LE MUSCLE DE VOLAILLE

Responsable scientifique : J.P. Abjean Mai 2003

Recherche et développement méthodologique :
Afssa-Fougères : J.P. Abjean, S. Gautier
Laboratoire Charles Flachat

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

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS DE SECURITE

Cette méthode implique la connaissance par l'opérateur des règles usuelles de manipulation des produits chimiques et des solvants. Elle devra être, autant que possible, mise en œuvre sous hotte ventilée.

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Le flubendazole est un antiparasitaire utilisé en élevage aviaire. Il est inscrit en annexe I du règlement 2377/90/CEE. Les limites maximales autorisées sont de 50 µg /kg pour le muscle et de 400µg /kg pour l'œuf. Le résidu marqueur pour le muscle est exprimé comme la somme du flubendazole et du (2 amino 1H benzimidazole 5-yl) (4fluoro-phenyl méthanone) : M7. Le résidu marqueur pour les œufs est le flubendazole. Les données pharmacocinétiques indiquent que 6 heures après l'administration la proportion en M7 est de 50 % pour le muscle de volaille; pour l'œuf la concentration en M7 est d'environ 40%. Cette méthode basée sur la recherche du métabolite M7 et tenant compte de ces données pharmacocinétiques, permet la mise en évidence de la présence de résidus de flubendazole à une concentration compatible avec la LMR.

2 - PRINCIPE

La méthode comprend six étapes principales :
- Extraction par un solvant organique ;
- Purification sur cartouche de gel de silice ;
- Dépôt sur plaque à zone de concentration ;
- Pré-chromatographie purificatrice ;
- Chromatographie ;
- Lecture à 366 nm.

Remarque *: Les références des réactifs et matériels indiqués ci–après sont données* ***à titre indicatif*** *et peuvent être remplacées par des réactifs et matériels de spécifications équivalentes. Toutefois, il conviendra de s'assurer au préalable que le(s) remplacement(s) ne compromet(tent) pas la fiabilité de l'essai.*

3 - REACTIFS ET PRODUITS

3.1. Réactifs

3.1.1. Hexane (Merck 104371).

3.1.2. Propanol 1 (Merck 10997).

3.1.3. Méthanol (Fischer A 484 1822).

3.1.4. Acétate d'éthyle (Merck 109623).

3.1.5. Ammoniaque (Merck 105432).

3.1.6. 2 amino 1H benzimidazole 5-yl, 4fluoro-phenyl méthanone (Jansen research product)

3.1.7. Eau désionisée.

3.2. Solutions

3.2.1. Solution mère à 1 mg/ml de 2 amino 1H benzimidazole 5-yl, 4fluoro-phenyl méthanone préparée dans le méthanol.

3.2.2. Solution de supplémentation à 10 µg /ml de 2 amino 1H benzimidazole 5-yl, 4fluoro-phenyl méthanone dans de l'eau.

3.2.3. Solution de supplémentation à 1 µg/ml de 2 amino 1H benzimidazole 5-yl, 4fluoro-phenyl méthanone dans de l'eau.

4 - MATERIEL

4.1. Verrerie

4.1.1. Tubes 12x100 et 16x100 mm.

4.1.2. Fioles jaugées de 100 ml.

4.1.3. Cuve à chromatographie type Camag 10x20 ou 10x10 (Merck)

4.2. Autres matériels

4.2.1. Pipettes automatiques de laboratoire et cônes correspondants Gilson.

4.2.2. Pipettes automatiques Multipette et réservoirs correspondants Eppendorf.

4.2.3. Distributeurs de solvants 1-10 ml.

4.2.4. Agitateur électrique « vortex » Top Mix Bioblock.

4.2.5. Balance de précision A 120 S Sartorius (précision au 0,1 mg).

4.2.6. Balance de laboratoire E 200 Mettler (précision à 10 mg).

4.2.7. Evaporateur sous flux d'azote Prolabo.

4.2.8. Centrifugeuse réfrigérée type GR 412 Jouan.

4.2.9. Cuve pour extraction en phase solide.

4.2.10. Cartouches d'extraction en phase solide Sep-Pak silica 3 cc (Waters 020810).

4.2.11. Table U.V. 366 nm.

4.2.12. Broyeur ménager type Moulinex.

4.2.13. Plaques HPTLC gel de silice Si 60 sans indicateur de fluorescence et avec zone de concentration 10x20 ou 10x10 (Merck 1.13748 ou 1.13749).

5 – ECHANTILLONS

5.1. Les échantillons sont stockés avec une identification propre au laboratoire.

5.2. Les œufs sont préparés dès que possible après leur arrivée au laboratoire. Pour ce faire, les jaunes et les blancs sont mélangés soigneusement puis congelés.

6 – MODE OPERATOIRE

6.1. Extraction

6.1.1. Peser 2 ± 0,1 g de coule d'œuf ou de muscle broyé dans un tube.

6.1.2. Pour assurer la qualité des essais, préparer 2 témoins positifs en ajoutant pour l'œuf : 40 µl de solution de supplémentation à 10 µg/ml, pour le muscle : 50 µl de solution de supplémentation à 1 µg/ml.

6.1.3. Ajouter 4 ml d'acétate d'éthyle, agiter le tube au vortex pendant 1 min.

Remarque :

- *Pour les œufs (il se produit rapidement une gélification du milieu), ajouter 4 ml d'hexane (pour casser l'émulsion) et agiter 1 min. au vortex.*
- *Pour les muscles, centrifuger 10 min. à 3000 g. Récupérer la phase organique dans un tube propre et sec de 10 ml. Ajouter 4 ml d'hexane et agiter 1 min. au vortex*

6.1.4. Centrifuger 10 min. à 3000 g. Récupérer la phase acétate d'éthyle.

6.2. Purification

6.2.1. Déposer la phase acétate d'éthyle sur une cartouche Si 500 mg en veillant à ne pas prélever de phase aqueuse.

6.2.2. Rincer la cartouche par 3 ml d'acétate d'éthyle/hexane 1/1 (v/v), assécher brièvement la cartouche pour éliminer le solvant interstitiel.

6.2.3. Eluer par 3 ml d'un mélange acétate d'éthyle/1-propanol 60 /40 (v/v) ; éliminer le premier ml d'éluat.

6.2.4. Evaporer à sec sous flux d'azote.

6.2.5. Reprendre le résidu par 250 µl de méthanol et agiter au vortex. Evaporer à sec. Reprendre le résidu sec par 50 µl de méthanol. Agiter au vortex et boucher.

6.3. Chromatographie détection U.V. 366 nm

6.3.1. Déposer 50 µl d'extrait à 1 cm du bas de la zone de concentration.

6.3.2. Chromatographier avec de l'acétate d'éthyle jusqu'à la fin de la zone de concentration, sécher la plaque sous un flux d'air chaud.

6.3.3. Chromatographier sur 4 cm avec le mélange hexane/1-propanol 6 ml / 4 ml + 3 gouttes d'ammoniaque. *Le volume de solution d'élution doit être suffisant pour que la zone des dépôts soit complètement immergée*.

6.3.4. Sécher la plaque sous un flux d'air chaud.

6.3.5. Lire la plaque sur une table U.V. 366 nm.

7 – RESULTATS - INTERPRETATION

7.1. Les témoins supplémentés devront permettre de retrouver une tache fluorescente (Rf. approximatif de 0,5) permettant de présumer pour les essais une éventuelle contamination par le flubendazole. Dans tous les cas, il est impératif de retrouver une tache fluorescente pour ces essais supplémentés, faute de quoi l'essai devra être déclaré non valide.

7.2. Tout essai présentant une tache fluorescente dont l'aspect et le Rf sont identiques à ceux des témoins, et dont l'intensité est voisine ou supérieure à celle des témoins devra faire l'objet d'une analyse de confirmation quantitative.