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 animale
Mission de coordination sanitaire internationale
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 75732 Paris cedex 15

Suivi par : Alexandre BLANC-GONNET

Tél : 01 49 55 81 49
Fax : 01 49 55 49 61
Réf. Interne : NS avermectines poisson 0804.doc
Réf. Classement : BRLA/ABG/191-04

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDSPA/SDRRCC/N2004-8213

Date: 17 août 2004

Date de mise en application : Immédiate

Annule et remplace : néant

Date limite de réponse : sans objet

Nombre d'annexes : 1

Le Ministre de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et des affaires rurales

Objet : Méthode de dépistage et de dosage des avermectines et de la moxidectine dans le muscle et la peau de poisson par chromatographie liquide haute performance

Bases juridiques : Directive 96/23/CE du Conseil, du 29 avril 1996, relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits

Résumé : La présente note de service référence la méthode d'analyse officielle de dépistage et de dosage des avermectines et de la moxidectine dans le muscle et la peau de poisson par chromatographie liquide haute performance.

MOTS-CLES : Méthode d'analyse – résidus - avermectines – poisson

Plan de diffusion	
Pour exécution : - Directeurs départementaux des services vétérinaires - Vétérinaires responsables des postes d'inspection frontaliers - LERMVD - Laboratoires vétérinaires départementaux	Pour information : - Préfets - Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires - Directeur de l'Ecole nationale des services vétérinaires - Directeur de l'INFOMA - DGCCRF - AFSSA - Laboratoire vétérinaire de Rungis - COFRAC

J’ai l’honneur de vous faire parvenir les références et le protocole (en annexe) de la nouvelle méthode d’analyse officielle de dépistage et de dosage des avermectines et de la moxidectine dans le muscle et la peau de poisson par chromatographie liquide haute performance.

Méthode	Référence	Remplace
avermectines dans le muscle et la peau de poisson par chromatographie liquide haute performance	LMV/04/03 – 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).

Isabelle CHMITELIN
Directrice Générale Adjointe
C.V.O.

LABORATOIRE D'ETUDES ET DE RECHERCHES SUR LES MEDICAMENTS VETERINAIRES ET LES DESINFECTANTS
LABORATOIRE NATIONAL DE REFERENCE
B.P.90203 - 35302 FOUGERES Cédex
La Haute-Marche - JAVENE - 35133 FOUGERES (France)

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

Référence : LMV/04/03 Juin 2004

Responsable : B. Roudaut

METHODE DE DEPISTAGE ET DE DOSAGE DES AVERMECTINES ET DE LA MOXIDECTINE DANS LE MUSCLE ET LA PEAU DE POISSON PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS DE SECURITE

D'une manière générale, les solvants et réactifs de dérivation sont à manipuler sous une hotte ventilée.

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode a pour objet le dépistage et le dosage par chromatographie liquide haute performance (CLHP) des avermectines (abamectine, doramectine, émamectine et ivermectine) et d'une milbémycine (moxidectine). Elle est applicable au muscle et à la peau de poisson. Les limites de détection ont été estimées à 0,9 µg/kg pour l'abamectine, 0,6 µg/kg pour la doramectine, 0,9 µg/kg pour l'émamectine, 0,7 µg/kg pour l'ivermectine et 0,8 µg/kg pour la moxidectine.

Les Limites Maximales de Résidus (LMR) actuellement en vigueur au niveau de l'Union Européenne sont les suivantes :

- émamectine : 100 µg/kg pour le résidu marqueur B_{1a} dans le muscle et la peau de poisson en proportion naturelle.
- Aucune LMR n'a été fixée pour l'abamectine, la doramectine, l'ivermectine et la moxidectine pour les tissus de poisson.

2 - PRINCIPE

La méthode comporte 5 étapes :

- homogénéisation des échantillons.
- extraction par l'acétonitrile.
- purification sur colonne d'extraction en phase solide (silice greffée C18).
- dérivation par l'anhydride trifluoracétique en présence de N-méthylimidazole.
- séparation par CLHP en mode gradient sur colonne de silice greffée de type C18 et détection fluorimétrique (longueur d'onde d'excitation : 361 nm - longueur d'onde d'émission : 465 nm).

La concentration en avermectine ou moxidectine est calculée par interpolation à partir de la droite d'étalonnage en tenant compte du pourcentage de récupération.

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 la CLHP (Fisher A/0626).

3.2. Triéthylamine pour usages biochimiques (Merck 8217).

3.3. Sulfate de sodium (Merck 6649).

3.4. N-méthylimidazole à 99 % (Aldrich Chimie).

3.5. Anhydride trifluoracétique (Merck 808261).

3.6. Méthanol (Fisher M/4000).

3.7. Solution n° 1 : 30 ml acétonitrile + 70 ml d'eau + 0,1 % de triéthylamine.

3.8. Solution n° 2 : 50 ml acétonitrile + 50 ml d'eau.

3.9. Solution n° 3 : 90 ml acétonitrile + 10 ml d'eau.

3.10. Etalons : abamectine MSD (titrant plus de 80 % du composé B_{1a}), doramectine Pfizer, émamectine benzoate Schering Plough (titrant plus de 78 % du composé B_{1a}), ivermectine Sigma (titrant plus de 80 % du composé H_2B_{1a}) et moxidectine Fort Dodge.

3.11. Solutions étalons

3.11.1. Solutions mères : préparer des solutions mères à 1 mg/ml dans du méthanol. Ces solutions se conservent 1 an au congélateur (≤ -16°C).

3.11.2. Solutions intermédiaires : préparer à partir des solutions mères une solution à 10 µg/ml contenant chacune des avermectines dans du méthanol, puis une solution à 0,5 µg/ml. Ces solutions se conservent 2 mois au congélateur (≤ -16°C).

3.11.3. Solutions étalons : préparer des solutions à 50, 40, 30 et 20 ng/ml dans du méthanol. Ces solutions se conservent 2 mois au congélateur (≤ -16°C).

Pour doser l'émamectine au niveau de la LMR, préparer à partir de la solution intermédiaire à 10 µg/ml des solutions à 0,5 - 1 - 1,5 et 2 µg/ml dans du méthanol. Ces solutions se conservent 2 mois au congélateur (≤ -16°C).

3.12. Poisson exempt de traces d'avermectines.

3.13. Supplémentation : préparer des échantillons de poisson supplémentés en ajoutant 0,1 (± 0,002) ml de solution étalon à 1 (± 0,02) g d'échantillon (0,9 g de muscle homogénéisé et 0,1 g de peau découpée en morceaux). Agiter quelques secondes à l'agitateur électrique et laisser en contact au minimum 10 min.

4 - APPAREILLAGE

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

4.1. Verrerie

4.1.1. Tubes à essai en polypropylène ou en verre, 16 x 100 mm.

4.1.2. Tubes à hémolyse en polypropylène à usage unique, 12 x 75 mm, type Poly Labo 05120.

4.1.3. Flacons à vis en polypropylène pour injecteur automatique, type Thermo Separation Products 1413-0574.

4.1.4. Fioles jaugées en verre de 20 et 100 ml.

4.1.5. Eprouvettes de 100 ml.

4.1.6. Pipettes de précision en verre de 5 et 10 ml.

4.2. Matériel

4.2.1. Pipettes automatiques, type Gilson Pipetman M 1000 et M 250.

4.2.2. Distributeur manuel de solvant, type Eppendorf Multipette.

4.2.3. Agitateur vortex, type Heidolph Top-Mix.

4.2.4. Cuve à ultra-sons, type Bransonic 5200.

4.2.5. Centrifugeuse réfrigérée, type Jouan GR 4.11.

4.2.6. Broyeur, type "Moulinette" Moulinex.

4.2.7. Balance de précision analytique, type Sartorius A 120 S**.**

4.2.8. Balance de précision, type Mettler PB 302.

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

4.2.10. Bouteille d'azote avec détendeur deux étages.

4.2.11. Cartouches d'extraction en phase solide, type Sep-Pak C_{18} 1cc Waters 23590, adaptateurs, type Varian AI 1213-1001, réservoirs de 8 ml, type Bond Elut et robinets type Varian AI 1213-1005.

4.2.12. Système d'extraction en phase solide, type Touzart et Matignon relié à une source de vide (trompe à eau ou pompe).

4.2.13. Distributeur automatique de solvant 2-20 ml, type Socorex.

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

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

4.2.16. Détecteur fluorimétrique, type Jasco 821-FP.

4.2.17. Interface, type SP4510 reliée à une station d'acquisition des données ChromQuest (Thermo Separation Products).

4.2.18. Colonne analytique (125 x 4 mm) remplie de silice greffée C18, type Merck Lichrospher 100 RP-18 E, 5 µm, avec précolonne (4 x 4 mm), type Merck remplie de la même phase stationnaire.

4.2.19. Four pour colonne analytique réglé à 35 (± 1) °C.

5 - PREPARATION DES REACTIFS DE DERIVATION ET DES SOLUTIONS DERIVEES

5.1. Préparation des réactifs pour la dérivation

5.1.1. Préparer une solution d'anhydride trifluoroacétique dans l'acétonitrile (1/2, V/V).

5.1.2. Préparer une solution de N-méthylimidazole dans l'acétonitrile (1/1, V/V).

Ces deux réactifs doivent être préparés le jour de l'utilisation. Ils peuvent être gardés quelques heures à température ambiante.

5.2. Préparation des solutions étalons dérivées

5.2.1. Pour préparer une gamme à 8, 12, 16 et 20 ng/ml, transférer respectivement 0,1 (± 0,002) ml des solutions étalons à 20, 30, 40 et 50 ng/ml dans un tube en polypropylène.

Pour quantifier l'émamectine au niveau de la LMR, préparer une gamme à 200, 400, 600 et 800 ng/ml, transférer respectivement 0,1 (± 0,002) ml des solutions étalons à 0,5 - 1 - 1,5 et 2 µg/ml dans un tube en polypropylène.

5.2.2. Evaporer sous flux d'azote à 60 (± 5) °C.

5.2.3. Reprendre le résidu sec par 100 (± 5) µl de la solution de N-méthylimidazole. Agiter 10 s à l'agitateur électrique.

5.2.4. Ajouter 150 (± 5) µl de la solution d'anhydride trifluoroacétique. Agiter 10 s à l'agitateur électrique. La réaction est pratiquement instantanée (durée inférieure à 30 s). Transférer dans un flacon à vis en polypropylène et conserver à l'abri de la lumière.

Des conditions anhydres sont impératives pour éviter toute hydrolyse des dérivés acétylés en C_4. Les dérivés doivent être injectés dans le système chromatographique moins de 8 h après dérivation. Il est conseillé d'utiliser un injecteur automatique avec système de réfrigération des échantillons réglé à environ +15°C.

6 - MODE OPERATOIRE

Lors de ces différentes opérations, limiter la lumière directe du soleil et éviter l'éclairage par des tubes fluorescents.

6.1. Extraction

6.1.1. Homogénéiser environ 20 g de muscle et découper la peau en morceaux de 2 x 2 mm environ. *Ne pas recongeler l'échantillon à ce stade.*

6.1.2. Peser 0,9 (± 0,01) g de muscle homogénéisé et 0,1 (± 0,01) g de peau découpée en morceaux dans un tube à essai.

6.1.3. Ajouter 0,1 ml de méthanol puis 5 ml d'acétonitrile et agiter 10 s à l'agitateur à vitesse modérée.

6.1.4. Placer les tubes 10 min dans la cuve à ultra-sons.

6.1.5. Centrifuger 10 min à 3500 tr/min (2600 g)**.**

6.1.6. Récupérer la totalité du surnageant dans un tube gradué de volume supérieur à 10 ml.

6.1.7. Evaporer sous flux d'azote à 60°C jusqu'à obtention d'un volume inférieur à 3 ml.

6.1.8. Ajuster à 3 ml avec de l'acétonitrile.

6.1.9. Ajouter 7 ml d'eau et agiter 10 s à l'agitateur à vitesse modérée.

6.2. Purification et dérivation

6.2.1. Adapter la cartouche d'extraction sur le système d'extraction en phase solide et un réservoir de 8 ml sur la cartouche d'extraction.

6.2.2. Conditionner la cartouche par passage de 5 ml d'acétonitrile, puis de 5 ml de la solution acétonitrile/eau (30:70) + 0,1 % de triéthylamine.

6.2.3. Transférer le contenu du tube (6.1.9) dans le réservoir et filtrer sous vide pendant environ 15 à 30 min.

6.2.4. Rincer le tube avec deux fois 1 ml de la solution acétonitrile/eau (30:70) + 0,1 % de triéthylamine et déposer les solutions de lavage sur la cartouche.

6.2.5. Rincer la cartouche par 1 ml de la solution acétonitrile/eau (50:50) sous faible dépression.

6.2.6. Laisser la cartouche sous dépression pour la sécher pendant 1 min environ.

6.2.7. Installer un tube en polypropylène contenant 0,4 g de sulfate de sodium et éluer par 2 (± 0,1) ml de la solution acétonitrile/eau (90:10).

6.2.8. Agiter le tube quelques secondes à l'agitateur et centrifuger 10 min à 3500 tr/min (2600 *g*) à une température proche de 0°C.

6.2.9. Transvaser le surnageant dans un tube en polypropylène.

6.2.10. Evaporer sous flux d'azote à 60 (± 5) °C.

6.2.11. Reprendre le résidu sec par 100 (± 5) µl de la solution de N-méthylimidazole. Agiter 10 s à l'agitateur.

6.2.12. Ajouter 150 (± 5) µl de la solution d'anhydride trifluoracétique. Agiter 10 s à l'agitateur. Transférer le contenu du tube dans un flacon à vis en polypropylène et conserver à l'abri de la lumière jusqu'à l'injection.

6.2.13. Injecter dans le système chromatographique une quantité suffisante de la solution dérivée.

6.3. Dosage chromatographique

- Débit de la pompe : 1ml/min
- Longueur d'onde d'excitation : 361 nm
- Longueur d'onde d'émission : 465 nm
- Volume d'injection : 50 µl (ce volume peut être ramené à 20 µl en fonction de la sensibilité du détecteur)
- Phase mobile : gradient d'élution

Temps (min)	Acétonitrile (%)	Eau (%)
0	94	6
10	94	6
11	99	1
16	99	1
17	94	6

Temps de rééquilibrage de la colonne : 3 min

Entre chaque injection, rincer le système d'injection avec un volume suffisant d'acétonitrile.

- Temps de rétention présentés à titre indicatif :

moxidectine : 7,8 min

émamectine : 11 min pour le résidu marqueur B_{1a}

abamectine : 13,7 min pour le résidu marqueur B_{1a}

doramectine : 15,6 min

ivermectine : 17,9 min pour le résidu marqueur H_2B_{1a}

Les composés B_{1b} de l'émamectine, de l'abamectine et de l'ivermectine ont, respectivement, pour temps de rétention 9,1 min, 11,5 min et 16,8 min. Un pic provenant de la matrice poisson est aussi présent à 8,6 min.

L'utilisation d'un four à colonne est recommandée pour obtenir une bonne répétabilité des temps de rétention.

7 - EXPRESSION DES RESULTATS

7.1. Mode de calcul

7.1.1. 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

7.1.2. 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 (7.1.1.) :

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

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 (2 µg/kg ou 100 µg/kg)

F : facteur de concentration (soit 4 dans ce cas)

Lors de la validation, les pourcentages de récupération moyens (n = 8) pour le muscle et la peau de poisson supplémenté à 2 µg/kg, ainsi que les coefficients de variation de répétabilité étaient de :

Molécule	Pourcentage de récupération moyen (%)	Ecart-type	CV_r
Moxidectine	94,5	11,8	12,5
Emamectine	87,6	9,5	10,8
Abamectine	93,4	11,6	12,4
Doramectine	82,5	7,0	8,5
Ivermectine	78,3	7,1	9,0

Le pourcentage de récupération moyen (n = 8) de l'émamectine dans le muscle et la peau de poisson supplémenté à 100 µg/kg (LMR) était de 81,2 % et le coefficient de variation de répétabilité était de 7,3 %.

Les limites de décision sont inférieures à 2 µg/kg pour l'ensemble des avermectines.

7.1.3. Calculer la concentration (µg/kg) en avermectine dans les échantillons analysés en utilisant la courbe d'étalonnage et en tenant compte du pourcentage de récupération ou en utilisant la formule suivante :

$$C = \frac{Cf \times 100}{4 \times R}$$

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

R : pourcentage de récupération

7.2. Contrôle de qualité

A chaque série d'échantillons de poisson, ajouter au minimum un poisson témoin dépourvu de traces d'avermectines et un poisson supplémenté à 2 µg/kg pour la moxidectine, l'ivermectine, la doramectine et l'abamectine. Pour quantifier l'émamectine au niveau de la LMR, ajouter au minimum un poisson témoin dépourvu de traces d'avermectines et un poisson supplémenté à 100 µg/kg.