



manuel

ASSURANCE QUALITÉ POUR LES LABORATOIRES D'ANALYSE D'ALIMENTS POUR ANIMAUX

Photographies de couverture:

Image de gauche: ©FAO/Giuseppe Bizzarri

Image du centre: ©FAO/Ishara Kodikara

Image de droite: ©FAO/Jon Spaul

ASSURANCE QUALITÉ POUR LES LABORATOIRES D'ANALYSE D'ALIMENTS POUR ANIMAUX

**Jim Balthrop, Benedikt Brand, Richard A. Cowie,
Jürgen Danier, Johan De Boever, Leon de Jonge,
Felicity Jackson, Harinder P.S. Makkar et Chris Piotrowski**

Information à l'usage des utilisateurs de ce Manuel

Au cas où vous rencontreriez un problème dans l'emploi des méthodes décrites dans ce manuel, ou si vous désirez poser une question sur l'une d'entre elles, vous pouvez contacter les experts inscrits sur le Réseau FAO d'Expertise:

http://www.fao.org/ag/againfo/home/documents/Network_Quality-control.pdf

Citation recommandée

FAO. 2016. *Assurance qualité pour les laboratoires d'analyse d'aliments pour animaux*. Manuel FAO de Production et Santé Animales No. 14. Rome.

Les appellations employées dans ce produit d'information et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) aucune prise de position quant au statut juridique ou au stade de développement des pays, territoires, villes ou zones ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. La mention de sociétés déterminées ou de produits de fabricants, qu'ils soient ou non brevetés, n'entraîne, de la part de la FAO, aucune approbation ou recommandation desdits produits de préférence à d'autres de nature analogue qui ne sont pas cités.

Les opinions exprimées dans ce produit d'information sont celles du/des auteur(s) et ne reflètent pas nécessairement les vues ou les politiques de la FAO.

ISBN 978-92-5-207050-4

© FAO, 2016

La FAO encourage l'utilisation, la reproduction et la diffusion des informations figurant dans ce produit d'information. Sauf indication contraire, le contenu peut être copié, téléchargé et imprimé aux fins d'étude privée, de recherches ou d'enseignement, ainsi que pour utilisation dans des produits ou services non commerciaux, sous réserve que la FAO soit correctement mentionnée comme source et comme titulaire du droit d'auteur et à condition qu'il ne soit sous-entendu en aucune manière que la FAO approuverait les opinions, produits ou services des utilisateurs.

Toute demande relative aux droits de traduction ou d'adaptation, à la revente ou à d'autres droits d'utilisation commerciale doit être présentée au moyen du formulaire en ligne disponible à www.fao.org/contact-us/licence-request ou adressée par courriel à copyright@fao.org.

Les produits d'information de la FAO sont disponibles sur le site web de la FAO (www.fao.org/publications) et peuvent être achetés par courriel adressé à publications-sales@fao.org.

Contents

Avant-propos	v
Auteurs	vii
Remerciements	viii
Glossaire	ix
Introduction	1
PARTIE I	
Procédures d'assurance qualité et bonnes pratiques de laboratoire	3
Installation d'un système de la qualité pour un laboratoire	5
Qualité et système de contrôle de la qualité	5
Objectif et directives de l'assurance qualité	6
Organisation et responsabilités du laboratoire	7
Formation et qualification du personnel	8
Procédures d'analyse – Sélection et vérification	8
Procédures Standard de Fonctionnement (PSFs)	9
Entretien et maintenance de l'équipement	10
Compte rendu des données d'analyse	11
Exactitude et échantillons de référence	12
Précision et échantillons en double aveugles	12
Traçabilité des résultats	14
Testage de compétence (assurance qualité externe)	14
Schémas de contrôle – Contrôle de processus statistique	15
Documentation et contrôle de documents	16
Sécurité du laboratoire	18
Audits/Actions correctives/Revue de la gestion	18
Procédures de la qualité	21
Validation des nouvelles techniques	21
Qualification (formation) des techniciens de laboratoire	28
Réactifs et produits chimiques	29
Test de valeur aberrante	32
Aide mémoire pour un audit de la qualité du laboratoire	33
Réception des échantillons au laboratoire	42
Manipulation et préparation des échantillons d'aliments pour animaux	44
Utilisation des balances	48
Utilisation des pipettes	52

Fonctionnement du pH mètre	56
Fonctionnement du spectrophotomètre	57
Eau de laboratoire	58
Procédures pour le nettoyage de la verrerie de laboratoire	60
Sécurité du laboratoire	63
Procédures générales – emploi correct de l'équipement de laboratoire	71

PARTIE II

Section analytique **83**

Procédures d'analyse **85**

Introduction	85
Matière sèche	88
Cendre brute	90
Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique	92
Azote et calcul de la protéine brute – Kjeldahl	95
Azote et calcul des matières protéiques brutes – Combustion	98
Lipides bruts – Extraction à l'éther	101
Fibre brute – Méthode par filtration	104
Fibre insoluble par détergent neutre – Méthode de filtration	106
Fibre résistante aux Détergents Acides (FDA) et Lignine (FDL) – Méthodes par filtration	109
Amidon – Enzymatique	112
Réduction des sucres – Méthode de Luff Schoorl	116
Énergie brute	121
Acides Gras Volatils (AGV) dans l'ensilage – Chromatographie en phase gazeuse	124
Acide lactique dans les ensilages – Méthode enzymatique	127
Urée – Méthode spectrophotométrique	129
Minéraux – Spectrophotomètre à Absorption Atomique (SAA)	131
Calcium – Méthode spectrophotométrique	136
Phosphore – Méthode spectrophotométrique	138
Chlore – Méthode par titration	141
Aflatoxines – Méthode CLHP	143
Fumonisinés – Méthode CLHP	151
Zearalenone (ZON) – Méthode CLHP	161
Deoxynivalenol (DON) – Méthode CLHP	168
Digestibilité de la matière sèche – utilisation <i>in vitro</i> du liquide de rumen	175
Analyse par Spectrophotométrie Proche de l'Infra Rouge (SPIR)	179

Avant-propos

L'alimentation animale a des impacts sur de nombreux domaines de l'agriculture: productivité, émissions environnementales, pollution de l'eau, utilisation du sol, sécurité et qualité des produits et bien-être animal.

Chaque secteur de l'industrie animale, les services qui y sont associés, le bien-être à la fois humain et animal sont influencés par l'alimentation animale. Une alimentation animale correcte fournit une ration équilibrée pour l'ensemble des nutriments et exempte de composants délétères, à un niveau qui satisfait l'objectif de la production, prenant en considération l'état physiologique de l'animal, et générant des produits animaux sains pour la consommation humaine. La disponibilité de données analytiques précises, fiables et reproductibles représente un impératif pour une formulation correcte d'aliments pour animaux. De même, seules des données fiables peuvent conduire à la production de données scientifiques.

Les rapports reçus d'experts internationaux en visite dans des laboratoires de nutrition animale, engagés dans l'analyse des ressources alimentaires pour le bétail (RAB) et de leurs ingrédients dans les pays en développement, soulignent la nécessité de renforcer les systèmes d'assurance qualité dans ces laboratoires. Comme ces derniers ne sont pas en place, le personnel de laboratoire n'est pas à même d'évaluer la qualité des données produites. Différents tests menés en pays développés ont démontré une variation inacceptable pour certaines analyses de routine effectuées dans des laboratoires d'analyse des RAB. Une évidence similaire constatée sur la fiabilité des données d'analyse a été constatée par les industries alimentaires animales des pays en développement.

Dès lors, a été perçu le besoin urgent de produire un document couvrant les systèmes d'assurance qualité. Le présent manuel a été développé et préparé par un panel de neuf experts. L'attention a été focalisée sur l'analyse de base utilisée pour déterminer la valeur nutritionnelle des RAB et de leurs ingrédients. Le document fournit un relevé exhaustif des bonnes pratiques de laboratoire, des procédures d'assurance qualité et des exemples de procédures standard de fonctionnement telles que pratiquées dans les laboratoires spécialisés. L'adoption de telles pratiques et procédures aideront les laboratoires dans l'acquisition de la reconnaissance de la compétence requise pour leur certification ou accréditation d'analyse alimentaire animale. De plus, assurer de bonnes pratiques de laboratoire telles que présentées dans ce manuel renforcera la sécurité du personnel de laboratoire, protégera l'environnement des polluants libérés et renforcera l'efficacité. Le document fournira également une base solide pour les laboratoires sur laquelle ils pourront développer un système pouvant satisfaire les besoins standard internationaux. Il sera utile pour les techniciens et gestionnaires de laboratoire, pour les étudiants, les chercheurs et les enseignants et l'on peut espérer qu'il permettra aux travailleurs de l'industrie animale, y compris l'aquaculture, d'apprécier l'importance de données fiables confirmées et les approches associées de garantie de l'assurance qualité. À travers l'amélioration du savoir-faire et des connaissances du personnel de laboratoire, ce document aboutira également à ce que les systèmes de la qualité deviennent part intégrante du fonctionnement du laboratoire d'analyse de RAB. Il

aidera de même les pays à initier le processus d'accréditation aux standards internationaux par leurs laboratoires d'analyses.

Un effet additionnel de la mise en œuvre et de l'adoption des approches de systèmes d'assurance qualité sera de renforcer les capacités de recherche et d'enseignement des étudiants diplômés d'institutions de recherche et développement et la promotion d'un meilleur environnement commercial entre pays en développement et développés.

Ceci apportera des bénéfices à long terme et pourra promouvoir l'investissement à la fois dans les industries alimentaires et les institutions de R & D.

Le manuel servira aussi de base pour mettre au point un module électronique d'auto-apprentissage et pour organiser des ateliers de formation destinés aux gestionnaires et techniciens de laboratoire sur les approches d'assurance qualité. Il pourra être élargi à l'avenir, en se basant sur les retours des utilisateurs, en incluant des techniques importantes pour les additifs alimentaires, la microbiologie des résidus médicamenteux et autres produits indésirables.



Berhe G. Tekola

Directeur,

*Division Santé et Production Animale,
Organisation des Nations unies pour
l'alimentation et l'agriculture*

Auteurs

Jim Balthrop

Office of the Texas State Chemist
Responsable de l'Assurance Qualité
Boîte postale Box 3160
College Station, Texas 77841, USA

Benedikt Brand

Staatliches Veterinäruntersuchungsamt
Arnsberg
Dez. 43: Verbraucherschutz, Futtermittel
Zur Taubeneiche 10-12
59821 Arnsberg
Allemagne

Richard A Cowie

Responsable supérieur de l'Assurance Qualité
SAC
Ferguson Building
Craibstone Estate
Aberdeen
AB21 9YA
Ecosse

Jürgen Danier

c/o Bioanalytic Weihenstephan Unit
Research Center for Nutrition and Food
Science, Technische Universität München
Alte Akademie 10, 85354 Freising
Allemagne

Johan De Boever

Institute for Agricultural and Fisheries
Research
Animal Sciences Unit Scheldeweg 68
9090 Melle
Belgique

Leon de Jonge

Groupe de Nutrition Animale
Wageningen University PO Box 338
6700 AH Wageningen
Pays-bas

Felicity Jackson

Responsable, Laboratoire de Nutrition
Institute of Food, Nutrition &
Human Health
Private Bag 11222, Riddet Rd
Massey University Palmerston North 4474
Nouvelle Zélande

Harinder P.S. Makkar

Fonctionnaire chargé des productions
animales
Division des productions et de la santé
animales
Organisation des nations Unies pour
l'Alimentation et l'Agriculture
Viale delle Terme di Caracalla
00153, Rome, Italie

Chris Piotrowski

Directeur, Aunir
Aunir - a division of AB Agri
The Byre, Pury Hill Business Park
Alderton, Nr Towcester
Northants, NN12 7LS
Angleterre

Remerciements

Nous remercions le Docteur Jim Balthrop pour la préparation du manuscrit initial. Des remerciements spéciaux à Mademoiselle Félicity Jackson et Monsieur Léon de Jonge pour leurs efforts infatigables afin de réunir l'information auprès d'autres contributeurs et de rassembler les contenus en un format uniforme. Nous sommes également reconnaissants au Professeur Tim Herrman pour ses suggestions pendant la phase initiale de la préparation du manuel. Les supports excellents de Monsieur Simon Mack, précédent Chef de la Sous-Division des Systèmes de Production Animale (AGAS); Philippe Ankers, actuel chef de cette Sous-Division et Samuel Jutzi, ex-Directeur de la Division de Production et Santé animales ont été appréciés.

Glossaire

Exactitude. Différence entre une valeur observée ou mesurée et la valeur acceptée ou «vraie». Étant donné que l'exactitude est apportée à la fois par des erreurs aléatoires et systématiques, l'exactitude peut être également définie comme la somme des erreurs aléatoires et systématiques.

Blanc. Échantillon ne contenant pas de réactif ou traité de manière telle que la réaction désirée ne peut se produire, par exemple lorsqu'un des réactifs utilisés pour produire une réaction est oublié.

Coefficient de Variation (Déviation Standard Relative). La déviation standard divisée par la moyenne et multipliée par 100.

Charte de contrôle. Une méthode géographique pour enregistrer les valeurs mesurées qui en installant des limites de contrôle, aide à déterminer si un processus est stable et «sur la cible»; Toutes les chartes de contrôles ont trois composants de base:

La ligne centrale, habituellement la moyenne mathématique de tous les échantillons préparés, une limite supérieure et inférieure de contrôle qui définit les contraintes de variations de causes communes, et les données de performance planifiées au cours du temps. L'emploi de chartes de contrôle des processus statistiques permet le suivi des variations des analyses de laboratoire au cours d'une période déterminée.

Document. Un règlement, une procédure, ou une instruction de travail contrôlée, sous forme écrite qui définit ce que font les personnes et comment le faire. Contrôle signifie que le document précise qui a écrit ou autorisé le règlement ou procédure, quand il a été publié et indique le numéro de la version afin d'éviter l'utilisation d'un document qui n'est plus valide. Le contrôle de la documentation sera normalement sous la responsabilité du gestionnaire de l'assurance qualité.

Limite de Détection (LD). Le signal perceptible le plus faible au-dessus du contexte pour une procédure particulière. La LD est la moyenne du blanc plus trois déviations standard par rapport à celle-ci.

Limite de Quantification (LQ). Le signal le plus faible mesurable expérimentalement obtenu par l'analyste présent, utilisant une procédure particulière. La LQ est définie comme la moyenne du Blanc plus dix déviations standard par rapport à celle-ci.

Linéarité. Lorsqu'une série de points présentant moins de 3% de déviation par rapport à une ligne droite.

Outlier. Une observation qui dévie tellement des autres qu'elle soulève le soupçon d'avoir été générée par une procédure différente ou erronée.

Précision. Une mesure de la dispersion des données autour de la moyenne.

Échantillon d'aptitude. (Échantillon externe d'assurance qualité). Échantillon d'origine extérieure afin de comparer les résultats entre laboratoire: ils peuvent être utilisés comme un échantillon interne de contrôle de la qualité.

Assurance qualité (AQ). Activités planifiées et systématiques menées à l'intérieur du laboratoire pour procurer confiance dans l'exactitude et la fiabilité des résultats obtenus.

Contrôle de la qualité (CQ). Activités menées pour suivre un processus ou pour contrôler un résultat et fournir l'assurance que toutes les activités sont effectuées dans le cadre de limites prédéterminées fixées pour le laboratoire.

Enregistrement. Peut être électronique ou sur papier. Les exemples comprennent: résultats d'échantillons, données de AQ/CQ, résultats d'audits, enregistrements de calibration, etc...

Procédure standard de fonctionnement. Document décrivant les étapes spécifiées à suivre dans une méthode. Cette dernière peut être une procédure analytique spécifique ou un règlement contrôlant un aspect plus générique du travail accompli (enregistrement de formation, doléances sur la manipulation ou emploi de balances).

Traçabilité. La propriété du résultat d'une mesure à être reliée à des références établies, généralement des standards internationaux, à travers une chaîne continue de comparaisons.

Contrôle du travail. Échantillon du contrôle interne de la qualité, de valeur connue, analysée avec chaque groupe d'échantillons afin de suivre la performance de la méthode et de l'analyste (voir Tableau 2).

Introduction

La disponibilité en ressources alimentaires pour le bétail (RAB) et une alimentation efficace représentent les clés d'une production animale réussie. L'administration d'une ration équilibrée et une formulation correcte de celle-ci augmente la productivité animale, la qualité du produit et le bien-être animal. De même, l'administration d'une ration qui satisfasse le statut physiologique de l'animal, est essentielle pour diminuer la pollution de l'environnement associée au bétail.

Pour la meilleure protection sanitaire à la fois du bétail et de la population humaine, et pour faciliter les échanges commerciaux entre pays développés et en développement, l'harmonisation des approches d'assurance qualité est impérative. Un système d'assurance qualité fournit au personnel décisionnaire et d'encadrement ainsi qu'aux consommateurs l'assurance que tous les facteurs humains qui influencent la qualité des résultats obtenus sont sous supervision constante avec comme objectif de prévenir la non-conformité et d'identifier les possibilités d'amélioration.

Ce manuel a été conçu pour décrire un système d'assurance qualité pouvant être utilisé dans les laboratoires de nutrition et d'analyse des RAB et servir de source de référence que des laboratoires spécifiques peuvent appliquer pour exécuter des protocoles appropriés à leurs situations particulières. Toutefois, les principes exposés sont généraux et peuvent ne pas s'appliquer à la situation de chaque laboratoire.

Le système d'assurance qualité décrit dans ce manuel est basé sur les principes ISO 17025:2005 et est orienté pour aider le personnel de laboratoire à maintenir les standards attendus lorsqu'est fourni un service consistant, fiable, efficace et professionnel avec un niveau de qualité demandé par les clients du laboratoire. Cette politique est réalisée à travers l'engagement du personnel de gestion et d'encadrement à tous les niveaux pour appliquer les pratiques de laboratoire qui garantissent la qualité des services de service d'analyse et des résultats fournis.

Comme le travail en laboratoires individuels varie grandement, il est essentiel de recourir à un système d'assurance qualité flexible quoique précis. Le personnel de laboratoire doit posséder une compréhension des principes sous-jacents à l'assurance qualité et doivent les appliquer dans tous les domaines de leur travail.

C'est seulement en suivant cette voie que les laboratoires seront à même de maintenir leur crédibilité, qui représente la qualité la plus importante de tout laboratoire. Le manuel procure une base solide pour assister les laboratoires à développer un système d'assurance qualité pouvant satisfaire la demande des standards internationaux.

Le manuel a été divisé en deux sections principales. La première partie présente les aspects généraux des procédures d'assurance qualité et les bonnes pratiques de laboratoire à mettre en place dans les laboratoires d'analyse d'aliments pour animaux. La partie 2 contient certaines procédures de base pour la détermination des nutriments et les mycotoxines.

Les méthodes décrites pour diverses analyses ont été extraites des méthodes officiellement reconnues, ainsi qu'auprès de laboratoires dont les représentants ont contribué à la production de ce document.

Les techniciens de ces laboratoires ont utilisé celles-ci pendant de nombreuses années et elles se sont révélées fiables. Cependant, d'autres méthodes ou leurs variantes peuvent également être utilisées.

Il a été prévu d'ajouter plusieurs techniques importantes pour les additifs, les agents microbiologiques, les résidus de médicaments, et autres substances indésirables ainsi que des approches associées pour l'assurance qualité dans une prochaine édition de ce manuel..

PARTIE I

**Procédures d'assurance qualité
et bonnes pratiques
de laboratoire**

Installation d'un système de la qualité pour un laboratoire

QUALITÉ ET SYSTÈME DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Cette section explique ce que signifie Qualité et Système d'assurance qualité et comment ceci peut agir sur et améliorer le travail dans un laboratoire.

Que signifie la Qualité?

La qualité n'est pas aisée à définir mais nécessite d'être définie par un laboratoire accrédité. Cependant, dans tous les aspects du travail «Qualité» est devenu un concept très important. Que ce soit une organisation de fabrication ou une organisation multidisciplinaire, toutes les organisations qui réussissent veulent être associés à ce concept.

Ainsi, qu'est-ce que La qualité? *Une définition classique est: la Qualité est l'aptitude à l'objectif envisagé.*

L'Organisation Internationale des Standards (OIS) a produit un document intitulé «Systèmes d'assurance qualité – Fondamentaux et Vocabulaire» dans lequel «Qualité» est définie comme: Degré auquel un ensemble de caractéristiques intrinsèques répondent aux besoins.

Ceci indique clairement que atteindre la qualité signifier répondre aux besoins. Ceux-ci peuvent provenir des consommateurs et, dans certains cas, des autorités de régulation.

Comment la qualité peut-elle être atteinte?

La qualité est la responsabilité de chacun: elle doit être indiquée à chaque étape du processus, à partir de l'identification des besoins des consommateurs, via la planification et l'exécution jusqu'au moment du compte rendu des résultats d'analyse.

Dans certains cas, les besoins de la qualité doivent être contrôlés avant de les livrer au consommateur car la satisfaction de celui-ci peut avoir un impact sur la qualité telle qu'il la perçoit.

Le faire survenir!

Il faut comprendre que la qualité ne s'obtient pas par accident. Le point de départ est d'identifier les besoins des consommateurs et, à partir de là, un plan doit être envisagé pour les processus et ressources et l'application de contrôles de suivi. Le technicien doit continuellement évaluer sa performance en fonction de ses propres objectifs et standards et s'attacher à son amélioration. Puisque la qualité ne s'obtient par accident, il est nécessaire d'établir un système d'assurance Qualité afin de s'assurer que les besoins soient satisfaits efficacement et effectivement. Ce manuel représente un départ à cet effet.

Système d'assurance qualité

Un système d'assurance qualité dirige et contrôle une organisation sur le plan de la qualité en mettant en place des procédures standard de fonctionnement (PSF) auxquelles chacun participe de manière cohérente.

Ceci, combiné avec des contrôles internes réguliers (audits), un système d'enquêtes sur les problèmes (anomalies) et l'identification constante de possibilités d'améliorations, va réduire l'incidence de résultats non fiables.

Pourquoi mettre en œuvre un système d'assurance qualité?

L'existence d'un système documenté amène tout le personnel à fonctionner vers un standard commun et procure aux consommateurs l'assurance de la fiabilité des tests et la conformité du service. Un système d'assurance qualité qui se conforme à un standard international sera reconnu à travers le monde et démontrera sa conformité sur les marchés internationaux.

Que doit-on attendre d'un technicien pour être conforme?

À l'engagement, il sera fourni à tout nouveau personnel une copie de ce manuel. Il est attendu du personnel qu'il le lise et comprenne son contenu (lorsque celui-ci est approprié). Le personnel sera également pourvu d'un fichier de formation dans lequel il puisse démontrer son expérience et sa capacité à suivre le standard, le système d'assurance qualité et sa compétence en procédures d'analyses nutritionnelles.

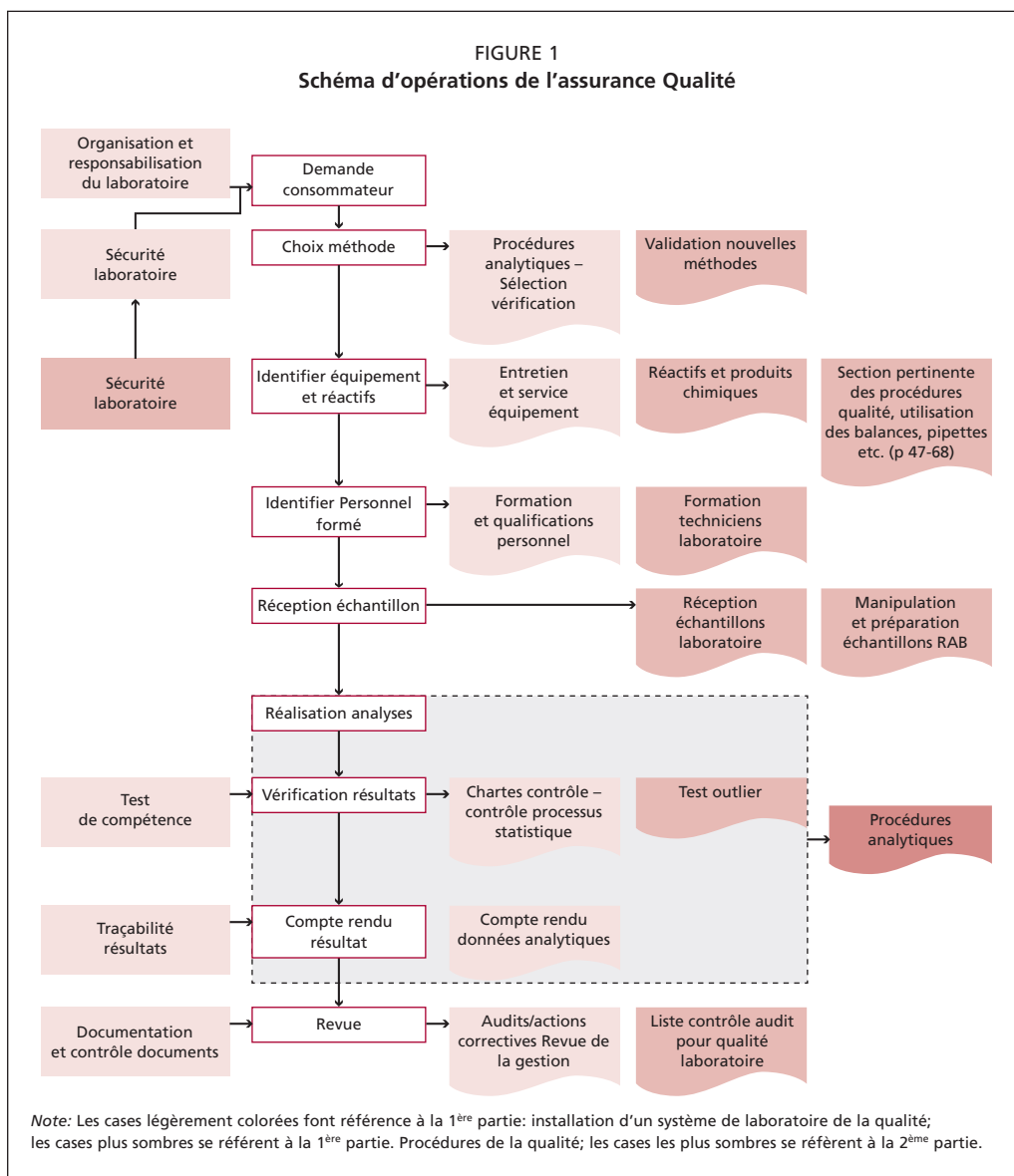
Fichier de formation

Le fichier de formation devra démontrer l'expérience et la compétence du titulaire dans le travail qu'il effectue. Il sera en possession du titulaire et mis à jour au fur et à mesure de la formation, en accord avec le superviseur. Le fichier contiendra une description du travail, une charte d'organisation, un résumé du CV, et des preuves de la formation appropriée et du cursus actualisés. Lorsqu'une nouvelle formation est dispensée, elle sera intégrée dans le fichier avec sa description, et confirmée par un gestionnaire. La compétence en cours sera également confirmée dans une participation documentaire dans les programmes AQE (Assurance Qualité Externe) et AQI (Assurance Qualité Interne) gérés par le laboratoire.

OBJECTIF ET DIRECTIVES DE L'ASSURANCE QUALITÉ

Les programmes de la qualité du laboratoire représentent une composante critique de l'amélioration des laboratoires agricoles dans les pays en développement. Le manuel de la qualité du laboratoire est la source essentielle pour communiquer au personnel la manière dont le testage du laboratoire est mené. L'adhésion du personnel au manuel de la qualité est nécessaire pour s'assurer à la fois de la qualité et de la cohérence. La reconnaissance du manuel peut ne pas recouvrir toutes les situations et variations survenant suite à l'installation du laboratoire; tout départ significatif doit obtenir l'approbation du Gestionnaire et être documenté de façon appropriée.

La gestion au sein du laboratoire est responsable de la qualité et de l'intégrité de toutes les données générées. Elle assure collectivement la qualité en conformité avec le manuel, le plan de garantie, et à travers le développement de l'adhésion aux procédures standard de fonctionnement.



Le schéma d'opérations de la Figure 1 illustre la représentation simplifiée du système d'assurance qualité décrit dans ce Manuel; il ne remplace pas les procédures qui y sont contenues.

ORGANISATION ET RESPONSABILITÉS DU LABORATOIRE

Chaque membre du laboratoire devra avoir clairement identifié et répertorié les responsabilités (description des tâches). Une charte organisationnelle devra être intégrée au document de la qualité du laboratoire et rendue disponible dans les archives des formations du personnel.

Le directeur/gestionnaire est le responsable ultime pour l'exécution du système de la qualité.

Le gestionnaire de la qualité rend compte directement au directeur/gestionnaire du laboratoire et est responsable du maintien et du développement des procédures de la qualité utilisées dans le laboratoire.

Les techniciens du laboratoire sont responsables du suivi de toutes les procédures de la qualité et de l'identification de possibilités d'amélioration.

FORMATION ET QUALIFICATION DU PERSONNEL

Un personnel qualifié et formé est essentiel pour produire des résultats d'analyse de la qualité acceptable. La gestion du laboratoire doit s'assurer que le personnel possède les connaissances, le savoir-faire et les aptitudes pour accomplir leurs fonctions. La compétence est basée sur les études, l'expérience, un savoir-faire confirmé et la formation.

Les fichiers de formation contiennent la documentation à cet effet, pour l'emploi occupé. Les techniciens suivent un programme de formation en accord avec la procédure ad hoc du laboratoire. Le technicien doit démontrer et documenter sa compétence dans une méthode analytique avant d'en rapporter les résultats aux clients du laboratoire. La première étape pour se qualifier dans une nouvelle analyse est de lire la procédure standard de fonctionnement (PSF). Une copie de ce document peut s'obtenir auprès du Directeur/Gestionnaire du laboratoire. La méthode devra être revue avec le technicien par une personne familière avec la procédure et le technicien devra alors procéder à la mise en route d'un nombre spécifié d'échantillons connus ou standards. La formation sera alors enregistrée dans les fichiers individuels de formation. Pour assurer la sécurité de chacun, le stagiaire doit lire le feuillet d'instructions sur la sécurité du matériel (FISM) fournissant l'information sur chaque produit chimique utilisé dans l'analyse. Le niveau de toxicité et la méthode d'élimination des déchets seront clairement compris avant d'entamer l'analyse. Le nombre d'échantillons et de standards à analyser sera précisé par le superviseur. Les résultats seront comparés à ceux obtenus précédemment en utilisant un t-test en doublons. S'il n'existe pas de différence significative à un indice de confiance de 95%, le nouveau technicien peut être considéré qualifié. La compétence actualisée sera démontrée par la participation dans l'assurance Qualité Interne (AQI) ou dans les épreuves en réseau à intervalles réguliers.

PROCÉDURES D'ANALYSE – SÉLECTION ET VÉRIFICATION

Lorsque le client ne spécifie pas les méthodes à employer, il faut accorder la préférence à une méthode standard reconnue. Si une méthode standard n'est pas identifiée, le laboratoire peut utiliser soit une méthode non standard, soit modifier une méthode pour l'utiliser en accord avec le client. Lorsque la méthode proposée par le client semble inappropriée pour l'objectif poursuivi, le laboratoire l'en informe. La méthode standard, non standard ou modifiée doit être suffisamment validée par le laboratoire avant de l'utiliser pour la fourniture de données.

Quand le laboratoire développe des méthodes pour son usage personnel, il détiendra une procédure pour sa mise en œuvre.

Les méthodes non standard sont celles qui ne proviennent pas de sources autorisées et validées. Une méthode non standard ne possède pas des validations éprouvées, telle qu'une étude ou un processus collaboratif pour évaluer ses capacités de fonctionnement.

Des méthodes non standard sont choisies lorsque la requête d'un client ne peut être satisfaite par une méthode standard. De telles méthodes requièrent l'accord du client et sont alors validées. La validation est la confirmation par examen et la fourniture d'une évidence objective que les spécifications particulières pour un objectif défini sont remplies.

Le laboratoire valide des méthodes standard, des méthodes non standard, des méthodes développées, et des méthodes standard modifiées, y compris pour l'utilisation en dehors de la portée considérée et de ses applications. La performance de toutes les méthodes est vérifiée avant de les utiliser pour générer des données rapportables.

Le processus de validation s'adresse aux besoins d'une application donnée. Les attributs et objectifs de la qualité pour les données incluent mais ne se limitent pas aux aspects suivants:

- Exactitude
- Précision
- Limite de détection (LD)
- Limite de quantification (LQ)
- Linéarité

Les limites des cibles d'exactitude et de précision peuvent être extraites d'AOAC (Horwitz). La précision ou la répétabilité est calculée comme la déviation standard relative (coefficient de variation) et l'exactitude est calculée comme le pourcentage de recouvrement (Tableau 1).

PROCÉDURES STANDARD DE FONCTIONNEMENT (PSFs)

Les PSFs sont spécifiques à l'utilisation pour lesquelles elles ont été formulées. L'approbation d'une PSF représente l'engagement d'un domaine spécifique à une action ou à un comportement. Une PSF peut être écrite par un employé compétent au sein d'un laboratoire. La PSF est alors revue quant à son contenu et autorisée par le superviseur ou le gestionnaire dans le domaine où elle sera utilisée. Une fois revue et trouvée acceptable par le superviseur ou gestionnaire, la PSF est transmise au Gestionnaire de la qualité pour approbation et diffusion.

Le format utilisé pour la rédaction de la PSF devra présenter le contenu suivant, s'il est approprié:

- Principe
- Portée
- Responsabilités
- Équipement
- Réactifs
- Procédure
- Contrôle de la qualité
- Réparations
- Remarques
- Références
- Appendices (Schémas d'opérations, Tableaux, Références, etc.)

Les PSFs sont des documents contrôlés et doivent inclure une date de publication (ou de prise d'effet), une date de revue et un numéro de version. Lorsqu'une nouvelle version de la PSF est publiée, un «journal de bord des Mises à jour» résumera les changements par

rapport au document original. Lorsqu'une nouvelle version d'une PSF est distribuée, toutes les versions contrôlées antérieures doivent être retirées.

Il est recommandé d'interdire les versions non contrôlées de PSFs.

ENTRETIEN ET MAINTENANCE DE L'ÉQUIPEMENT

Les procédures pour déterminer, maintenir et contrôler la performance d'un appareil font partie intégrante d'un programme de contrôle de la qualité car elles encouragent un degré élevé dans les résultats d'analyse. Chaque procédure est décrite dans la PSF des équipements respectifs. Chaque équipement essentiel de testage possède sa propre PSF et ses enregistrements de maintenance qui documentent les services de fonctionnement, de calibration et de routine. Le personnel utilisant l'équipement essentiel doit avoir suivi une formation appropriée, notifiée dans leur fichier.

Entretien. Des instructions complètes et précises d'installation, des manuels de fonctionnement, des catalogues de pièces détachées, et les contrats et certificats de garantie écrits sont gardés avec chaque appareil afin d'assurer un fonctionnement correct. L'exécution d'un programme préventif d'entretien, incluant le testage en conformité avec les spécifications et procédures pour la calibration fréquente, le contrôle et le nettoyage est essentiel. La performance des instruments et de l'équipement est régulièrement évaluée afin de s'assurer de leur fonctionnement correct et qu'ils possèdent les archives appropriées pour un audit/évaluation corrects. Les tâches d'entretien de routine comme le nettoyage, l'ajustage, le remplacement des pièces ou la lubrification sont accomplies sur chaque instrument par le technicien responsable conformément aux instructions contenues dans le manuel de fonctionnement ou identifiées par l'expérience passée.

Toutes les tâches d'entretien et les réparations accomplies par le technicien ou le représentant du service sont répertoriées dans le journal de bord de chaque instrument. Les techniciens doivent immédiatement faire rapport de tout dysfonctionnement auprès du fonctionnaire responsable et indiquer clairement qu'il est «hors service» lorsqu'un défaut apparaît.

Si disponibles, des contrats de service, comportant un entretien semestriel ou annuel de certaines pièces d'équipement seront établis.

Calibration. La validité des résultats d'analyse produits est fortement liée au niveau de performance de l'instrumentation employée. Dès lors, il est essentiel que, pour chaque appareil et chaque méthode, des procédures correctes de calibration soient mises en place et que les résultats de calibration soient enregistrées et servent de base pour l'évaluation permanente de la performance instrumentale. Les conditions nécessaires pour la méthode de calibration font partie de celle-ci. La calibration de l'équipement et des instruments ainsi que la traçabilité selon les standards nationaux seront documentées. Les poids et les thermomètres seront certifiés avant usage et la documentation gardée au laboratoire.

Inventaire. Un inventaire permanent de tous les équipements est gardé par le Directeur/Gestionnaire du laboratoire. Il comporte le nom de l'équipement, le numéro du modèle, le numéro de série, le fabricant, la date d'acquisition, le coût original, la localisation actuelle, et tout autre identifiant appliqué localement.

Pièces de rechange et Fournitures. Le technicien doit tenir à jour une liste de pièces de rechange critiques pour le fonctionnement de l'appareil et doit revoir cette liste au moins annuellement. Cette liste doit être gardée dans le journal de bord.

Fonctionnaire Responsable. Un fonctionnaire responsable est affecté à l'équipement essentiel. Normalement, il s'agit du principal utilisateur. Dans le cas d'un équipement partagé, le responsable effectue les contrôles de performance et d'entretien, tandis que les opérateurs vérifient la calibration, effectuent les opérations standard, font fonctionner correctement l'instrument, enregistrent les données comme prévu et informe le responsable de toutes anomalies ou dysfonctionnement.

Les fonctions du responsable sont les suivantes:

- 1) Bien se familiariser, par la formation et l'expérience avec le fonctionnement, l'entretien et les applications de l'appareil.
- 2) Instruire et assister ses collègues dans son utilisation.
- 3) Effectuer des contrôles réguliers de performance de l'appareil comme indiqué dans la documentation et les manuels de laboratoire.
- 4) Effectuer les tâches d'entretien de routine, en accord avec le manuel de l'appareil.
- 5) S'assurer que le journal de bord de l'appareil soit tenu à jour après chaque utilisation.
- 6) S'assurer que les manuels des appareils soient aisément disponibles et tenus à jour comme requis.
- 7) Établir une liste de pièces de rechange critiques afin de garder l'appareil fonctionnel et s'assurer que ces pièces soient présentes en quantité suffisantes. Alternativement, un contrat d'entretien et de maintenance peut être souscrit avec un sous-traitant fiable.

En l'absence du Responsable, peut être identifié un remplaçant pour effectuer ces tâches.

Journal de bord de l'appareillage. Le principal objectif du journal de bord est de fournir un enregistrement des performances de l'appareil, afin de pouvoir valider les données et de prévoir les besoins de réparation et de remplacement, ainsi que les nouvelles acquisitions. Si adéquat, le numéro de contrat de service est noté dans le journal.

A chaque utilisation de l'appareil, le technicien doit entrer l'information requise dans le journal qui fournira ainsi au laboratoire un enregistrement de l'opération, sa performance, ainsi que des opérations d'entretien et des réparations.

COMPTE RENDU DES DONNÉES D'ANALYSE

Chaque procédure doit spécifier la portée d'application de l'analyte pour laquelle il peut être employé avec une signification réaliste (Limites de l'analyse). Le technicien du laboratoire est obligé d'enregistrer les valeurs numériques qui ne reprennent seulement que les nombres avérés plus un chiffre qui est estimé. Ce groupe de nombres est mentionné comme un chiffre significatif. Si au moins un chiffre incertain est rapporté, le lecteur peut être induit en erreur sur le degré de précision avec lequel la mesure ou l'ensemble des mesures a été effectuée. Pour standardiser le compte rendu des données de laboratoire,

deux conventions seront appliquées. La première a trait à l'arrondissement des chiffres et la seconde avec le compte rendu des chiffres significatifs. Lorsqu'il est nécessaire d'arrondir des nombres, celui-ci sera élevé à la valeur supérieure la plus proche si le chiffre à sa droite est ≥ 5 . Si le dernier chiffre écarté est < 5 , le dernier chiffre retenu demeure inchangé. Si le nombre à droite est 5, suivi seulement de zéros, on arrondit au chiffre pair le plus proche.

La définition proposée pour des chiffres significatifs est qu'elle reprenne pour les nombres à résultat connu avec certitude plus, une valeur incertaine. La position de la virgule décimale n'est pas pertinente.

Lorsque les données sont fournies, les règles suivantes seront appliquées pour déterminer le nombre de chiffres significatifs:

- 1) Fournir seulement le compte rendu des nombreux chiffres significatifs tels que trouvés dans la mesure la moins précise,
- 2) Donner au lecteur la meilleure estimation des erreurs de la mesure.

Quelques exemples: si le zéro est flanqué, à droite comme à gauche, d'un autre nombre, il est toujours significatif; 306 a trois chiffres significatifs. Si le zéro est placé pour fixer la virgule décimale, il n'est jamais significatif 0,0024 à deux chiffres significatifs, 0,00240 à trois chiffres significatifs.

EXACTITUDE ET ÉCHANTILLONS DE RÉFÉRENCE

Pour assurer l'exactitude de la procédure un échantillon de référence (standard de travail) à valeurs connues et stables sera traité dans chaque lot et évalué par le biais d'un schéma de contrôle (voir section sur schéma de contrôle).

Le matériel de référence peut être un matériel de substance pure et la récupération de l'analyte sera la mesure de l'exactitude de la méthode.

Cependant, pour la plupart des analyses d'aliments pour animaux, un matériel certifié de référence (MCR) ou un échantillon de référence produit en laboratoire est utilisé (ERL).

Le MCR peut s'obtenir auprès d'organisations pour tests de compétence des aliments pour animaux (Tableau 4) où les valeurs de référence sont déterminées par plusieurs laboratoires appliquant plusieurs méthodes indépendantes de validation de tests. Un laboratoire peut également produire son propre échantillon de référence. Un matériau d'aliments pour animaux représentatif de la masse d'échantillons analysés par le laboratoire sera choisi à cet effet. Cet échantillon sera analysé en double, au moins en 6 différents essais, répartis sur plusieurs jours/semaines. Dans ces essais, un MCR est analysé préférentiellement et seulement si les valeurs de ce dernier se trouvent dans les limites de contrôle, les résultats du LRM peuvent être pris en compte. Avant de calculer la moyenne et la déviation standard, les résultats clairement déviants seront éliminés. Une quantité suffisante de ERL sera divisée en portions dont l'une suffira pour six mois, les autres étant stockées au congélateur. Les schémas de contrôle seront régulièrement évalués pour les tendances qui peuvent être indicatives de la détérioration de la qualité de la portion. Le même ERL peut être utilisé pour plusieurs méthodes dans le laboratoire.

PRÉCISION ET ÉCHANTILLONS EN DOUBLE AVEUGLES

Pour accroître la précision des résultats (réduction de la dispersion) toutes les analyses sont effectuées préférentiellement en double. Comme ce n'est pas toujours possible pour des raisons financières ou le nombre d'échantillons, il est suggéré qu'un minimum de 10% des

échantillons au sein d'un lot soit traité en double. Les échantillons en double ne devraient pas être connus du technicien (double aveugle) afin d'assurer la précision des échantillons en analyse simple. La portée acceptable des résultats en double varie suivant la méthode, les réquisitions du client et la matrice de l'échantillon. La portée relative ou le pourcentage relatif de différence peut être calculé comme suit:

Pourcentage relatif de différence = $(X_1 - X_2) \times 100 /$ moyenne des valeurs reproduites

Où,

X_1 = valeur la plus grande reproduite

X_2 = valeur la plus petite reproduite

Les directives pour les variations analytiques qui peuvent être attendues d'une analyse double d'un échantillon sont reprises dans le Tableau 1. Dans ce cas, la variation analytique représente deux fois le coefficient de variation ou la déviation standard relative:

TABLEAU 1
Variations analytiques (aV) en [%]; x = concentration analysée

Analysé	AV (%)
Humidité	12
Protéine	$20/x + 2$
Graisse	10
Fibre brute	$30/x + 6$
Cendres	$45/x + 3$
Sucres totaux	12
Calcium	10
Phosphore	$3/x + 8$
Sel	$7/x + 5$
Vitamine A	30

Source: De association of American Control Officials 2011, Official Publication 2011, page 298-299.

Pour les directives concernant l'exactitude ou le pourcentage de récupération des échantillons de contrôle de la qualité ou peut utiliser l'AOAC «International Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods» (Tableau 2).

TABLEAU 2
Limites acceptable de récupération

Concentration	Limites de récupération (%)
100%	98-101
10%	95-102
1%	92-105
0.1%	90-108
0.01%	85-110
10 µg/g (ppm)	80-115
1 µg/g (ppm)	75-120
10 µg/kg (ppb)	70-125

Pour calculer le pourcentage de récupération d'un matériel de référence:

$$\text{Pourcentage récupérable \%} = (X_r / X_k) \times 100$$

Où,

X_r = Valeur observée du matériel référence

X_k = Valeur certifiée ou vraie du matériel de référence

TRAÇABILITÉ DES RÉSULTATS

Comme toutes les mesures effectuées par le laboratoire doivent être traçables pour le Système International des Unités (SIU), passer un contrat avec des métrologistes fournira la preuve de la traçabilité de ses propres standards et instruments de mesure pour le SIU. Plus tard, une documentation sera fournie pour démontrer la capacité à mesurer et la compétence pour accomplir les services de calibration requis par le laboratoire. Les certificats de calibration pour l'appareillage du laboratoire (balances, pipettes, etc.) incluront les résultats de mesure avec la mesure d'incertitude et une déclaration de conformité avec une spécification métrologique identifiée. Les standards obtenus seront accompagnés de certificats d'analyse.

TESTAGE DE COMPÉTENCE (ASSURANCE QUALITÉ EXTERNE)

La participation à des programmes de compétence pour le testage d'échantillons permet l'évaluation de la précision et de l'exactitude des laboratoires. Afin d'évaluer la performance du laboratoire, une valeur Z est calculée. Toute note $Z \leq 2$ est satisfaisante, les notes entre 2 et 3 sont discutables, et une note ≥ 3 est insuffisante, ce qui nécessite une enquête et une action correctives. La valeur Z représente le nombre de déviations standards du laboratoire par rapport à la valeur consensuelle. De tels programmes sont fournis par The Association of American Feed Control Officials (AAFCO), the American Association of Cereal Chemists (AACC), the American Oil Chemists' Society (AOCS). Le système européen d'Information PT entretient une liste actualisée de programmes de compétence disponible. Le laboratoire possèdera un agenda documenté de participation dans les schémas de compétence (Tableau 3).

TABEAU 3
Organisations fournissant des testages de compétence et des échantillons de référence de RAB

Organisation	Adresse	Téléphone	Email	Site Web
AAFCO (Association of American Feed Control Officials)	175 S. University Street IN47907-2063 West Lafayette Indiana USA	+1 7654941565	vsiegel@purdue.edu	www.aafco.org
IAG – Feedingstuffs (International Analytical Group, section feedingstuffs)	191 Spargelfeldstrasse 1220 Vienna Austria	+43 5055532700	Renate.oeschmueller@ages.at	www.ages.at
BIPEA (Bureau InterProfessionnel d'Etude Analytique)	6-14 av. Louis Roche F-92230 Gennevilliers France	+33 147335460	Contact@bipea.org	www.bipea.org
FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme)	Sand Hutton YO41 1 LZ York UK	+44 1904462100	info@fapas.com	www.fapas.com
LGC (Laboratory of the Government Chemist)	1 Chamberhall Business Park BL9 0AP Lancashire UK	+44 1617622500	customersservices@lgcpl.com	www.lgc.co.uk
WEPAL (Wageningen Evaluating Programmes for Analytical Laboratories)	P.O. box 8005 NL-6700 EC Wageningen The Netherlands	+31 317482337	Info.wepal@wur.nl	www.wepal.nl

SCHÉMAS DE CONTRÔLE – CONTRÔLE DE PROCESSUS STATISTIQUE

Pour s'assurer que les méthodes du laboratoire sont sous contrôle statistique, sa performance sera évaluée par usage de schémas de contrôle. Les schémas de moyenne ou X-bar sont conçus pour signaler les changements dans la valeur de la moyenne à long terme pour un échantillon analysé par une méthode spécifique. Les schémas de portée ou R-bar sont conçus pour indiquer les changements dans la répétabilité d'une mesure. Si un logiciel de programme statistique n'est pas disponible, les données peuvent être préparées en utilisant les procédures suivantes:

Construire les schémas de base en calculant la ressource à long terme ou de grande moyenne et la portée de grande moyenne en calculant la moyenne d'au moins 6 ensembles de doubles obtenus sur 3 jours. Dresser le schéma X-bar en décrivant une ligne solide horizontale à travers le centre de la page, qualifier la «0», dessiner deux lignes pointillées ± 1.25 (ce qui représente les limites de protection à 95% de confiance). Dessiner deux lignes supplémentaires à ± 1.88 qui représentent les limites de contrôle à 99% de confiance. Porter ces valeurs sur l'axe 0 en indiquant ce qu'elles représentent, à savoir +1.88 pour la limite supérieure de contrôle et -1.88 pour la limite inférieure. Effectuer la moyenne des deux résultats des échantillons de contrôle. Calculer et placer les valeurs Z le long de l'axe Y avec la date correspondante le long de l'axe X. Valeur Z = (moyenne de 2 contrôles – grande moyenne). Construire le schéma R-bar en dessinant une ligne solide horizontale à travers le bas de la page, en la qualifiant de «0». Dessiner des lignes pointillées à ± 2.51 , ce qui représente le niveau d'alerte à 95% de confiance et les secondes à ± 3.27 qui représente la limite de contrôle à 99% de confiance. Diviser la différence des deux échantillons de contrôle et placer la sur le schéma le long de l'axe des Y avec la date le long de l'axe des Y.

Les schémas de contrôle seront évalués après l'analyse de chaque groupe d'échantillons et les contrôles assument qu'ils se situent à l'intérieur des spécifications avant de transmettre les résultats au client.

Le processus est sous contrôle si:

- 1) Tous les points sur les schémas X-bar et R-bar sont entre les limites de contrôle (sujet aux limitations citées ci-dessous).
- 2) Une valeur moyenne et seulement une parmi les vingt dernières se trouve en dehors des limites de contrôle et la valeur de la portée ne l'est pas.
- 3) Une valeur de la portée et seulement une parmi les 20 dernières se trouve en dehors des limites de contrôle et la valeur de la moyenne ne l'est pas.
- 4) Toute cause spécifique hors de contrôle a été identifiée et éliminée.

Le processus est hors de contrôle, respectivement à la moyenne (schéma X-bar) si:

- 1) Plus d'un point de la moyenne parmi les vingt derniers a dépassé les limites de contrôle supérieur ou inférieur mais la portée est sous contrôle.
- 2) Les deux valeurs individuelles de la moyenne pour un contrôle donné sont en dehors des limites d'alarme même si la moyenne ne l'est pas.
- 3) Sept moyennes consécutives se trouvent toutes sur un des côtés de la ligne «0».
- 4) Sept moyennes consécutives tombent dans un modèle consistant vers le haut ou vers le bas.
- 5) Il existe une série de quatre moyennes entre la limite d'alarme supérieure et la limite supérieure de contrôle ou entre la limite d'alarme inférieure et la limite inférieure de contrôle.

Le processus est hors de contrôle respectivement à la portée (schéma R-bar):

- 1) Plus d'un point parmi les 20 derniers a dépassé la limite de contrôle et les deux valeurs de X sont en-dehors des limites d'alarme sur le schéma X.
- 2) Les points sur la X-bar et le R-bar sont tous deux en dehors des limites de contrôle.
- 3) Sept points consécutifs tombent dans un modèle insistent vers le haut ou vers le bas.
- 4) Il y a une série de quatre points entre la limite d'alarme et la limite de contrôle.

Une méthode n'est pas hors contrôle si le technicien sait qu'il a effectué une manœuvre différente ou qu'une difficulté a été rencontrée avec la procédure ou l'équipement sur un ensemble donné. Ceci sera mentionné sur la feuille de travail appropriée. Les schémas de contrôle permettent seulement de déterminer si la variation observée peut ou non être expliquée par une variation due au hasard. La variation ou les limites acceptables sont déterminées par le client du laboratoire.

Voir Figures 2 et 3 pour des exemples de schéma de contrôle pour Moyenne et Portée.

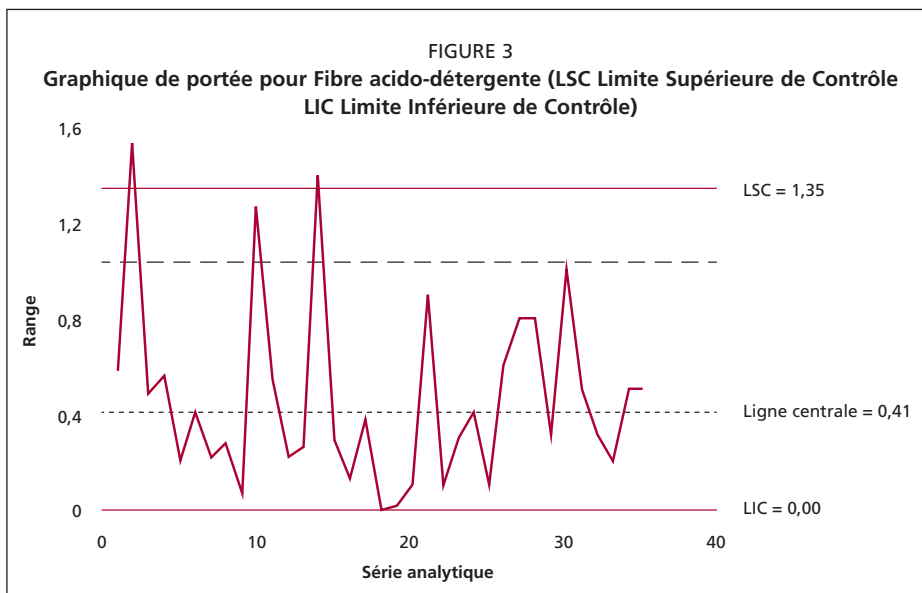
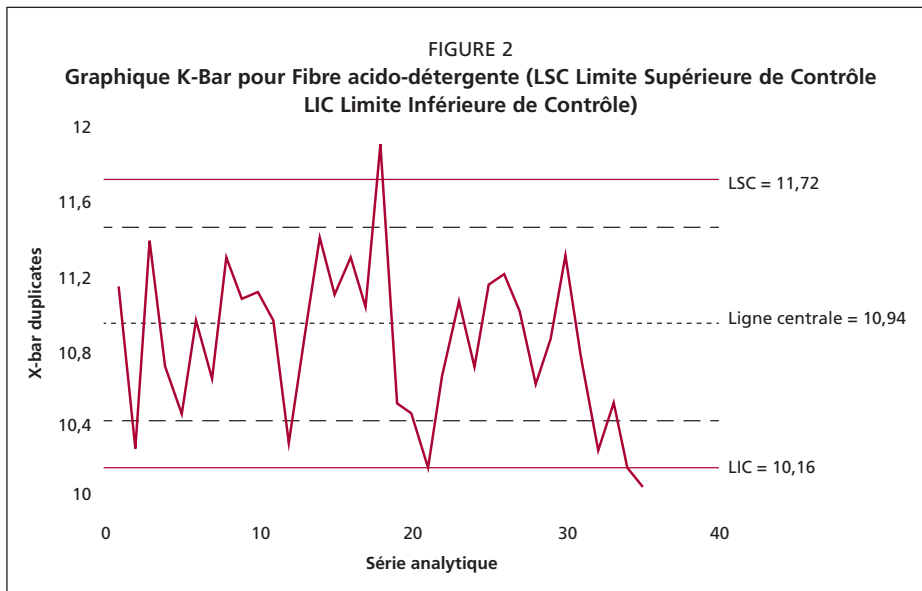
DOCUMENTATION ET CONTRÔLE DE DOCUMENTS

Les documents de la qualité qui constituent le système de gestion doivent être contrôlés. Les procédures de contrôle du document du laboratoire diminuent le processus de surveillance des documents de la qualité requis pour la production de données du laboratoire. Ceux-ci comprennent les documents publiés par le laboratoire et ceux publiés à l'extérieur. Ces derniers incluent les règlements, les standards, les méthodes d'analyse, les instructions et les manuels.

Les documents émis au laboratoire pour le personnel dans le cadre du système de gestion sont révisés et approuvés avant leur émission en accord avec la procédure de contrôle du document de laboratoire et de gestion. La liste de référence des procédures du laboratoire identifie l'état actuel de révision et de distribution de documents via l'utilisation de cette liste, les documents de la qualité sont émis pour le personnel afin d'écartier tout document obsolète.

La liste de référence du laboratoire et la procédure de contrôle du document et de gestion des archives fournissent:

- Les documents autorisés pour la gestion du système et les documents externes sont maintenus en ordre d'utilisation.
- Les documents sont revus en accord avec un agenda et révisés pour s'assurer de leur contenu, pertinence et conformité avec le système de gestion; une date appropriée de révision sera fixée pour chaque document.
- Les documents non valides ou obsolètes sont rapidement écartés de tous les points d'émission ou d'utilisation afin d'éviter tout usage inapproprié.
- Les documents retenus soit pour conservation légale ou à titre de mémoire sont mentionnés comme archivés ou obsolètes.
- Pour éviter d'avoir en circulation différentes procédures au même moment dans différents endroits, les amendements manuels ou les copies non contrôlées ne seront pas autorisés.
- Un en-tête porté sur le document de contrôle – tel que décrit dans le document de contrôle du laboratoire et dans la procédure de gestion – identifie exclusivement les



documents de gestion du système générés par le laboratoire. Une telle identification comporte la date de révision, le nombre d'identification, l'autorité d'émission, et le nombre de pages.

- Les changements proposés pour les documents doivent être revus et approuvés en accord avec les procédures de contrôles de document et de gestion du laboratoire – à moins que précisé autrement, cette procédure est suivie par le même personnel que celui-ci dans la revue ou approbation originales.

- Le texte retouché ou nouveau, est identifié soit sur le document, en couverture, soit dans les annexes. Un journal de bord des mises à jour, inclus dans la première page d'un nouveau document, simplifie l'identification de tout changement.
- La procédure de contrôle de document et de gestion du laboratoire concerne le contrôle des documents électroniques de système de gestion.

SÉCURITÉ DU LABORATOIRE

En tant qu'employé, vous avez la responsabilité d'effectuer votre travail correctement et en sécurité. Une priorité de votre laboratoire est de vous offrir un poste de travail libre de tout risque reconnaissable et évitable pour votre santé et votre sécurité.

La sécurité, toutefois, ne peut être assurée sur commande à un employé. Vous devez plutôt fournir un effort conscient à aider à assurer des conditions sans danger, tant pour vous-mêmes que pour les autres travailleurs du lieu. Cela requiert la compréhension des risques potentiels dans le travail et la connaissance des politiques et règlements liés à ces risques.

Il existe des sources de risque inévitables particulièrement en laboratoire. Pour empêcher ces risques de causer, des dommages, chaque individu doit savoir comment utiliser sans danger les outils et l'équipement et comment agir en cas de feu, blessure ou autre urgence. Cependant, l'information n'est pas tout, la sécurité au travail est tout autant une attitude qu'un savoir. Elle suppose de reconnaître que les accidents ne sont pas limités aux personnes qui ne savent pas comment les prévenir. C'est souvent le vétéran expérimenté, la personne «qui sait mieux» qui devient une victime en permettant à l'accoutumance de s'affranchir des limites de la prudence.

Vous devez maintenir une vigilance constante. Cela suppose votre implication personnelle à effectuer tout travail sans danger potentiel.

Les autres travailleurs doivent être alertés en cas de danger s'ils ne suivent pas les procédures de sécurité et ces cas **doivent être documentés**.

Des superviseurs et des officiers de sécurité seront identifiés. Ces personnes doivent être avisées immédiatement de tout équipement d'urgence défectueux ou d'autres dangers potentiels.

En participant aux comités de sécurité, en assistant aux inspections de sécurité et en assurant que toutes les pratiques à cet effet soient effectuées chaque fois, vous pouvez garantir que tout travail soit exécuté sans danger.

Aucun travail n'est si important qu'il ne soit possible de l'effectuer correctement et sans danger!

Pour une information complémentaire sur la santé et la sécurité, prière se référer à la Sécurité du laboratoire (voir page 61).

AUDITS/ACTIONS CORRECTIVES/REVUES DE LA GESTION

Les audits internes sont menés selon les besoins (au moins annuellement) ils sont menés afin de vérifier que les opérations continuent de satisfaire aux besoins du système d'assurance qualité.

Le programme d'audit interne concerne tous les éléments du système de gestion, y compris les activités d'analyse. Le gestionnaire d'assurance qualité du laboratoire est res-

responsable de la coordination des audits internes, complémentaires aux audits demandés par le Directeur ou identifiés à cause d'anomalies.

Le personnel formé et qualifié est responsable pour mener les audits internes. Ils peuvent auditer dans leur domaine propre mais non dans leur propre travail.

Lorsque les conclusions de l'audit mettent en doute l'efficacité des opérations ou la justesse ou la validité des résultats d'analyse du laboratoire, une procédure d'audit corrective sera initiée.

Le client est avisé si les enquêtes montrent que la non-conformité liée aux résultats de l'audit a affecté le travail qui lui était destiné. Cette modification est documentée et une évaluation de l'impact est effectuée pour identifier de possibles anomalies antérieures.

Des activités de suivi de l'audit sont menées pour vérifier et enregistrer l'exécution et l'efficacité de l'action corrective entreprise. Ce suivi est indiqué comme partie de processus de revue de la gestion.

La procédure de suivi de la gestion du laboratoire inclut un agenda à cet effet. La revue est conduite par :

La gestion exécutive du laboratoire afin d'assurer une adaptation continue pour l'utilisation et l'efficacité du système de gestion et pour introduire les changements nécessaires et identifier les opportunités pour des améliorations.

La revue de la gestion aborde les éléments du système de gestion et comporte – sans s'y limiter – les éléments suivants :

- Pertinence des politiques et procédures;
- Rapports du personnel de gestion et de supervision;
- Conclusions des audits internes récents;
- Évaluation par des comités externes;
- Actions préventives et correctives;
- Résultats des comparaisons inter-labos (tests de compétence);
- Réactions des clients;
- Doléances et;
- Autres facteurs, tels que des activités de contrôles de la qualité, les ressources et la formation du personnel.

Les découvertes et les actions en provenance des revues sont enregistrées en accord avec la procédure de revue de gestion du laboratoire. Chaque action implique une date butoir pour sa résolution.

Procédures de la qualité

VALIDATION DES NOUVELLES TECHNIQUES

Résumé

Cette démarche décrit comment le laboratoire choisira et validera de nouvelles procédures d'analyse. Le laboratoire utilisera les méthodes qui satisferont les besoins de ses clients. Les méthodes standard seront préférables; cependant, des méthodes non standard et des méthodes développées par le laboratoire peuvent être utilisées lorsqu'elles sont jugées plus appropriées.

Portée

Cette démarche s'inscrit dans toutes les procédures analytiques utilisées dans le laboratoire.

Responsabilité

Le technicien de laboratoire enquête sur des méthodes disponibles, effectue le testage, génère et analyse les données.

Le Directeur/Gestionnaire de laboratoire évalue et autorise les méthodes, les revoit et approuve les données.

Le gestionnaire de la qualité spécifie les besoins pour la validation et approuve la méthode.

Procédures

Sélection de la méthode

Le besoin d'une nouvelle méthode sera déterminé. Ceci peut être initié par le gestionnaire du laboratoire, le gestionnaire de la qualité, le technicien ou le client. Les méthodes disponibles seront recherchées et évaluées par le Technicien et le Gestionnaire du laboratoire. Les coûts/bénéfices sont intégrés dans le processus d'évaluation.

Validation/Vérification de la méthode

1. Déterminer les procédures de développement de la méthode (gestionnaire de la qualité).
2. Le Directeur/gestionnaire de la qualité va assigner un (des) technicien(s) au Projet.
3. Le technicien va fournir les produits chimiques, les fournitures et l'équipement appropriés.
4. Le Technicien va préparer une documentation écrite résumant les procédures à utiliser. *NOTE*: des modifications aux procédures utilisées sont souvent requises.
5. Le Gestionnaire de la qualité va approuver les procédures.
6. Le Technicien va collecter les données préliminaires et soumettre les résultats au gestionnaire de la qualité pour revue.
7. Le Technicien va compléter la collecte de données.

8. Le Directeur/Gestionnaire du laboratoire va revoir les données, préparer un résumé, et soumettre un rapport au Gestionnaire de la qualité.
9. Un PSF sera préparé.

Critères minima pour adoption de la validation

1. **Exactitude/Récupération.** Un minimum de 7 analyses indépendantes par niveau de concentration couvrant la portée analytique. Il est préférable d'utiliser des matériaux de référence certifiés (MRC). Si ceux-ci ne sont pas disponibles, des échantillons du programme de testage de compétence peuvent être utilisés. Des produits chimiques/standard purifiés peuvent être utilisés si d'autres échantillons de référence ne sont pas disponibles. Des échantillons peuvent être également nécessaires. La méthode la moins appréciée pour déterminer l'exactitude est de comparer les résultats à ceux obtenus en utilisant une procédure déjà validée.
2. **Précision.** Typiquement, pour une simple validation de laboratoire, le Technicien effectuera r analyses répétées de m portions de test sur une période de d jours pour chaque type d'échantillon (matrice) n où r est le nombre de répétitions (2,3,...), m le nombre de portions de test dans chaque groupe, de l nombre de jours, et n le nombre de différents types d'échantillons.
 $r \times m$ ne sera jamais inférieur à 10
 n sera au moins de 2 (plus si possible)
 d sera au moins de 2
3. **Calibration.** La ligne de calibration inclura 4-5 points de référence. Les calibrations avec un point simple doivent être utilisés avec précaution. Les coefficients de corrélation $>0,99$ doivent être l'objectif mais avec des logiciels appropriés pour les lignes modernes, les lignes de calibration non linéaires sont acceptables.
4. **Limites de détection (LD) et limites de Quantification (LQ).** Pour certains clients, la LD doit être démontrée. Ceci est typiquement défini comme la concentration d'analytes produisant trois fois le signal lors de l'analyse d'un blanc. Pour beaucoup de laboratoires, la LD n'est pas aussi significative que la LQ. Celle-ci est typiquement définie comme la concentration d'analytes produisant 10 fois le signal en analysant un blanc. À moins que ce ne soit spécifié autrement, le laboratoire documentera le typique LD/LQ (3x et 10x blanc). *NOTE:* En général, le laboratoire ne fait pas rapport de résultats d'analyse qui ne sont pas mis entre parenthèses par la courbe de calibration.
5. **Critères.** Les limites ciblées d'exactitude et de précision peuvent être extraites de AOAC (Horwitz). La précision ou la répétabilité est calculée comme la déviation standard relative (coefficient de variabilité) et l'exactitude est calculée en % de récupération.

Validation des calibrations près de l'IR

Principe

L'échantillon représentant la composition chimique du matériau d'échantillonnage est mesuré par spectrométrie proche de l'Infra Rouge (PIR). Les données spectrales dans la région proche de l'Infra Rouge sont collectées et transformées afin de constituer ou paramétrer des concentrations par des modèles de calibration développés sur des échantillons représentatifs.

TABLEAU 1
Limites des cibles d'exactitude et de précision

Concentration	Répétabilité (%)	Récupération (%)
100%	1,3	98-102
10%	1,9	98-102
1%	2,7	97-103
0,1%	3,7	95-105
0,01%	5,3	90-107
0,001%	7,3	80-110
1 ppm	11	80-110
100 ppb	15	80-110
10 ppb	21	60-115
1 ppb	30	40-120

Instruments proches de l'IR (PIR)

Les instruments PIR sont basés sur la réflectance diffuse ou la mesure de la transmission dans la région de longueur d'onde proche de l'Infra Rouge de 700-2500 nm ($14300-4000 \text{ cm}^{-1}$) ou sur des segments de celle-ci ou à des longueurs d'onde choisies, ou sur des numéros d'onde. Le principe optique peut être dispersif (p.ex. monochromateurs à grille) interférométrique, ou non thermique (p.ex. diodes émetteurs de lumière, diodes lasers et lasers). L'instrument doit être pourvu d'un système de diagnostic afin de tester les interférences photométriques et la reproductibilité, l'exactitude de la longueur d'onde/numéro d'onde et la précision de la longueur d'onde/numéro d'onde (pour la spectrophotométrie à balayage). L'instrument mesurera un volume ou une surface suffisamment large d'échantillon afin d'éliminer toute influence significative de manque d'homogénéité provenant de la composition chimique ou des propriétés physiques de l'échantillon à tester. La longueur de trajectoire de l'échantillon (épaisseur de l'échantillon) dans les mesures de transmission sera optimisée, en accord avec la recommandation du fabricant, respectivement à l'intensité du signal afin d'obtenir une linéarité et un ratio maximal signal/interférences. Dans les mesures pour réflectance, une fenêtre à quartz ou à autre matériel d'effets éliminateurs et dessiccateurs couvrira de préférence la couche superficielle interactive de l'échantillon.

Calibration et validation initiale

Avant utilisation, l'instrument doit être calibré. Cette procédure s'adresse aux calibrations produites sur place ou acquises auprès d'un fournisseur externe.

La calibration doit couvrir un nombre suffisant d'échantillons représentatifs, comportant des variations, telles que:

- a) Combinaisons et éventail de composition de composants majeurs et mineurs d'échantillons;
- b) Effets saisonniers, géographiques et génétiques sur les fourrages, les matériaux bruts pour aliments pour animaux, et les céréales;
- c) Techniques et conditions de transformation;
- d) Conditions de stockage;
- e) Température de l'échantillon et de l'instrument.

La calibration doit être fournie avec une information statistique sur leur performance, telles que le nombre et le type d'échantillons, la corrélation erreur standard de calibration, la prédiction, dans un format permettant l'identification des valeurs aberrantes.

Analyses de référence et mesures PIR

Seront utilisées les méthodes de référence internationalement acceptées pour la détermination de l'humidité, des matières grasses et protéiques, et autres constituants.

La méthode de référence utilisée pour la calibration sera sous contrôle statistique pour chaque échantillon; la variabilité consistera en variations au hasard d'un système reproductible. Il est essentiel de connaître la précision de la méthode de référence.

Valeurs aberrantes

Dans beaucoup de situations, des valeurs aberrantes sont observées pendant la calibration et la validation. Ces valeurs peuvent être reliées aux données PIR (points spectraux, référencés ci-après comme x-valeurs aberrantes) ou à des erreurs dans les données ou les échantillons de référence avec une relation différente entre les données de référence et les données PIR (référéncées ci-après comme y-valeurs aberrantes).

Pour l'objectif de validation, les échantillons ne doivent pas être considérés comme des valeurs aberrantes s'ils remplissent les conditions suivantes:

- a) Ils se trouvent à l'intérieur de la portée de travail des constituants/paramètres de calibration;
- b) Ils se trouvent à l'intérieur de la variation spectrale des échantillons de calibration comme estimé par la distance de Mahalanobis;
- c) Et si le résidu spectral est en-dessous d'une limite définie par le processus de calibration.

Concernant les valeurs aberrantes. Si un échantillon semble être une valeur aberrante, il sera alors contrôlé initialement s'il s'agit d'une x-valeur aberrante. S'il dépasse les limites x-valeur aberrante définies pour la calibration, il sera retiré. Si ce n'est par une x-valeur aberrante, alors à la fois la valeur de référence et la valeur PIR prédites seront contrôlées. Si celle-ci confirment les valeurs originales, l'échantillon ne sera pas éliminé et les statistiques de validation l'incluront. Si les valeurs répétées montrent que soit la valeur originale de référence, soit les valeurs PIR prédites sont erronées, alors seront utilisées les nouvelles valeurs.

Validation des modèles de calibration. Avant utilisation, les équations de calibration doivent être validées localement sur un ensemble indépendant de testage, représentatif de la population d'échantillons à analyser. Pour la détermination de biais, 10 échantillons au moins sont nécessaires; pour la détermination d'erreurs standard de prédiction (ESP), 20 échantillons au moins sont requis.

La validation doit être effectuée pour chaque type d'échantillon, constituant/paramètre et température.

NOTE: L'exercice de validation est uniquement valable pour les types d'échantillon, la portée et la température utilisés dans la validation.

Les résultats obtenus dans l'ensemble indépendant de testage sont placés-référenciés face aux PIR et résiduels face aux résultats de référence – afin de donner une impression visuelle de la performance de calibration. L'ESP est calculée et le graphe résiduel de don-

nées corrigé pour l'erreur systématique moyenne, est examiné pour les valeurs aberrantes, à savoir échantillons avec un résidu excédant $3x$ ESP.

Si le processus de validation démontre que le modèle ne peut produire des statistiques acceptables, il ne sera pas utilisé.

Critères de validation

L'étape suivante est de satisfaire PIR et les dates de référence par régression linéaire (référence = $a + b \times \text{PIR}$) afin de fournir des statistiques qui décrivent les résultats de validation.

Correction des biais. Les données sont également examinées pour un biais entre les méthodes. Si la différence entre les moyennes des valeurs PIR prédites et de référence est significative par rapport à 0, alors cela indique que la calibration est biaisée. Un biais peut être supprimé en ajustant le terme constant dans l'équation de calibrations.

Ajustement de la pente. Si la pente (b) est significativement différente de 1, la calibration est biaisée.

Ajuster la pente/intersection de la calibration est généralement non recommandé, à moins que la calibration soit appliquée pour des nouveaux types d'échantillons ou d'instruments.

Si une nouvelle enquête sur la calibration ne détecte pas de valeurs aberrantes, spécialement avec une forte influence, il est préférable d'élargir le set de calibration pour inclure plus d'échantillons. Cependant, si la pente est ajustée, la calibration devra alors être testée au moyen d'un nouvel ensemble indépendant de testage.

Agrandissement du set de calibration. Si l'erreur de calibration ne satisfait pas aux attentes, le set sera élargi afin d'inclure plus d'échantillons ou bien, une nouvelle calibration sera effectuée. Dans tous les cas, lorsqu'est développée une nouvelle calibration sur un nouvel ensemble agrandi, le processus de validation sera répété sur un nouveau set. Si nécessaire, l'agrandissement du set de calibration sera répété jusqu'à ce que des résultats acceptables soient obtenus sur un set de validation.

Changements dans les mesures et les conditions des instruments. À moins qu'une validation supplémentaire soit effectuée, une validation locale d'une méthode PIR fixant son exactitude peut généralement ne pas être considérée valide si les conditions de testage ont changé.

Par exemple, les calibrations développées pour une certaine population d'échantillons peuvent ne pas être valide en dehors de celle-ci, quoique la portée des concentrations d'analytes n'ait pas changé. Une calibration développée sur des ensilages d'herbes peut ne pas fournir la même exactitude sur des ensilages d'une autre région si les paramètres génétiques de croît et de transformation sont différents.

Des changements dans la technique de présentation des échantillons ou des conditions de mesure (par exemple température) non inclus dans l'ensemble de calibration peuvent également influencer sur les résultats.

Les calibrations développées sur un instrument ne peuvent pas toujours être transformées directement sur un instrument identique opérant sur le même principe. Il

peut être nécessaire d'apporter des ajustements de biais et de pente aux équations de calibration. Dans de nombreux cas, il sera nécessaire de standardiser les deux instruments l'un vis-à-vis de l'autre avant que les équations de calibrations puissent être transformées. Les procédures de standardisation peuvent être utilisées pour transférer les calibrations entre des instruments de types différents, sous conditions que les échantillons soient mesurés de la même façon (réflectance, transmission) et que la région spectrale soit commune.

Si les conditions ont changé, une validation supplémentaire sera effectuée.

Les calibrations seront contrôlées chaque fois qu'une partie essentielle de l'instrument (système optique détecteur) aura été changée ou réparée.

Statistiques pour mesure de performance

Les performances d'un modèle de prédiction doivent être déterminées par un ensemble d'échantillons de validation. Cet ensemble consiste en des échantillons indépendants de l'ensemble de calibration. Pour un végétal, ce sera de nouveaux lots; en agriculture, ce sera une nouvelle culture ou un nouvel endroit d'expérimentation. Cet ensemble d'échantillons doit être analysé avec soin en suivant les méthodes de référence. Le soin pris à analyser les échantillons de validation doit être accentué et la précision de ces résultats est plus importante pour le set de validation que pour les échantillons utilisés dans la phase de calibration.

Le nombre d'échantillons de validation doit être 20 au minimum afin d'effectuer les calculs statistiques avec une certaine confiance.

Mettre les résultats sur graphe. Il est important de visualiser graphiquement les résultats, les valeurs prédites vis-à-vis des valeurs de référence ou résiduelles vis-à-vis des prédites.

Les résiduelles sont définies comme:

$$\text{Résidu} = y - x$$

Où,

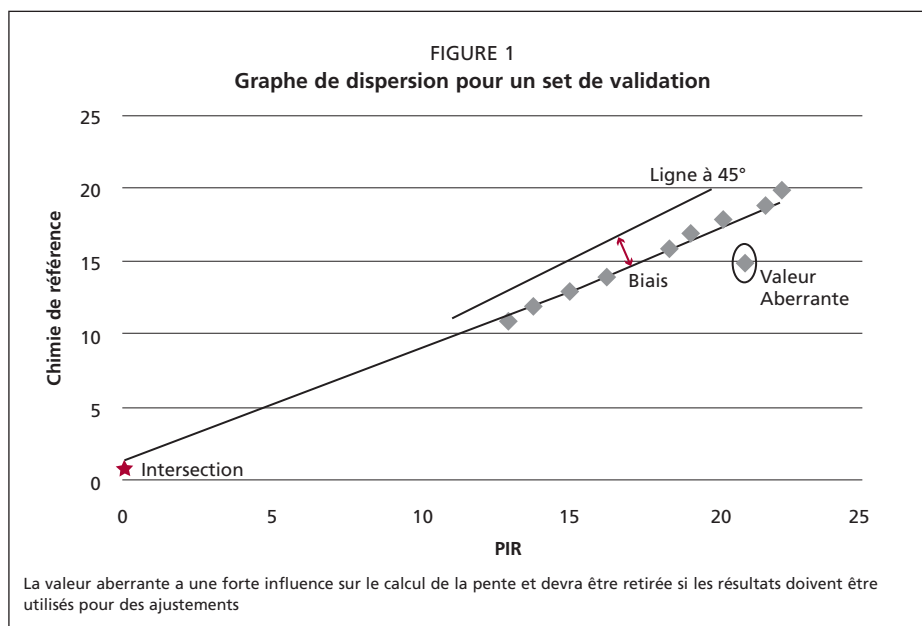
y représente les valeurs de références,

x représente les valeurs prédites, obtenues en appliquant le modèle multivariante PIR.

La façon dont les différences sont calculées, va donner un biais négatif lorsque les prédictions sont trop élevées et un biais positif lorsque les prédictions sont trop basses, par comparaison aux valeurs de référence.

Un graphique de données donne immédiatement un aperçu de la corrélation, du biais, de la pente et de l'intersection, et la présence de valeur aberrantes évidentes (Figure 1).

Le biais. La plupart du temps, un biais ou erreur systématique est observé avec les modèles PIR. Un biais peut apparaître pour plusieurs causes: nouveaux échantillons d'un type non visualisé antérieurement pour le modèle, dérive de l'instrument, dérive de la chimie humide, changements dans le processus, et dans la préparation de l'échantillon. Avec n



comme nombre d'échantillons indépendants, le biais (ou compensation) est la différence moyenne et peut être défini comme:

Biais = Moyenne (données de référence) – Moyenne (données prévues par PIR)

Si le biais est significativement différent de 0, sa valeur peut alors être ajoutée à la valeur constante du modèle de calibration afin de corriger cette erreur systématique.

La pente. La pente b de la régression simple $y = a + bx$ est souvent rapportée dans les rapports et publications PIR

Il faut noter que la pente doit être calculée avec les valeurs de référence comme variable dépendante et les valeurs PIR prédites comme variable indépendante, si la pente calculée doit servir à l'ajustement des résultats PIR. La pente se calcule à partir de la fonction Excel = intersection (valeurs REF, valeurs PIR).

Si la pente est significativement différente de 1, la calibration peut alors être ajustée, en accord avec les instructions des fournisseurs; cependant la procédure recommandée devra inclure les échantillons de validation dans le set de calibration et procéder à une nouvelle calibration.

Afin d'ajuster une calibration avec une pente, l'Intersection sera également requis, et sera calculé à partir de la fonction Excel = Intersection (valeurs REF, valeurs PIR).

Coefficient de détermination (R^2). La corrélation (r) indique le degré d'adaptation. Les valeurs fournies dans la validation ne doivent pas être significativement différentes de celles des statistiques de la calibration originale. Le coefficient de détermination (R^2) peut être calculé à partir de la fonction Excel = RSQ (valeurs REF, valeurs PIR)

Si la corrélation est significativement différente des statistiques de calibration, les échantillons de validation seront ajustés au set de calibration et il sera procédé à une re-calibration.

Erreur standard de prédiction (ESP). Elle fournit l'information sur l'exactitude de la prédiction PIR vis-à-vis des valeurs de référence. ESP peut être calculée à partir de la fonction Excel = STEYX (valeurs REF, valeurs PIR)

Si ESP est significativement différente des statistiques de calibration, des échantillons de validation seront ajoutés au set de calibration, et il sera procédé à une re-calibration.

QUALIFICATION (FORMATION) DES TECHNICIENS DE LABORATOIRE

Résumé

Ce document décrit la Procédure Standard de Fonctionnement (PSF) pour qualifier un technicien de laboratoire pour une méthode d'analyse. Il existe des étapes spécifiques à suivre systématiquement pour parvenir à ce but. Ce document sert à clarifier la procédure/ les critères de qualification.

Portée

La procédure s'applique pour tous les techniciens et méthodes de laboratoire.

Responsabilité

Les techniciens recherchent des méthodes disponibles, effectuent des testages, génèrent et analysent des données et démontrent une compétence continue.

Le Directeur/Gestionnaire du laboratoire évalue et autorise les méthodes, revoit et approuve les données, et démontre une compétence continue.

Le gestionnaire de la qualité spécifie les besoins de validation et approuve la méthode.

Procédures

Rassembler l'information

Le premier pas pour la qualification dans une nouvelle analyse est représenté par la lecture de la PSF. Une copie de ce document est disponible auprès du Directeur/Gestionnaire du laboratoire.

Pour assurer la sécurité de chacun, dans l'exécution d'une nouvelle analyse, le stagiaire doit lire le livret de données sur la sécurité matérielle afin de s'informer sur chaque produit technique utilisé dans l'analyse. Les niveaux de toxicité et les méthodes de l'élimination des déchets seront clairement compris avant d'entamer une analyse. Si une difficulté surgit dans la localisation d'un livret actuel, il convient de contacter le fonctionnaire de sécurité.

Observer et Pratiquer

Une fois familier avec le protocole et les réactifs, le stagiaire observe un technicien qualifié et compétent effectuer la procédure. Afin de s'assurer que le stagiaire comprend complètement l'analyse, il doit exécuter au moins un ensemble d'exercices pratiques avant d'entamer les tests réels de qualification. Les exercices pratiques consistent en une variété

de types d'échantillons et incluent des échantillons difficiles, si disponibles. La qualification peut commencer si:

- 1) Les travaux de contrôle satisfont aux besoins en précision et exactitude dans les exercices pratiques,
- 2) Le Directeur/Gestionnaire de laboratoire donne l'autorisation au stagiaire. Le stagiaire doit convenir avec le Directeur/Gestionnaire du laboratoire des réactifs spécifiques à préparer pour l'analyse.

Sets qualitatifs de testage

Le Directeur/Gestionnaire du laboratoire, ou son représentant, choisit les échantillons à tester. Il est préférable de sélectionner des échantillons qui ont été testés en double et d'utiliser le résultat moyen pour des objectifs de comparaison. Les sets consisteront en une variété de types d'échantillons. Les valeurs cibles des échantillons seront communiquées au stagiaire.

Le nombre et les types d'échantillons analysés seront déterminés par le Directeur/Gestionnaire du laboratoire. Les échantillons peuvent inclure: échantillons de laboratoire, échantillons pour tests de compétence, échantillons de travaux de contrôle, des matériaux standards de référence et des blancs. Un minimum de 3 sets sera analysé.

Interprétation pour la Qualification

Un nombre suffisant d'échantillons disponibles et de valeurs aberrantes sera évalué et retiré en utilisant le test de Dixon pour les valeurs aberrantes. Les données restantes seront comparées en utilisant un 1^{er} test d'appariement. S'il n'y a pas de différences significatives ($P > 0,05$), le technicien est qualifié pour effectuer la procédure d'analyse. S'il existe une différence significative dans les données ($P < 0,05$), le Directeur/Gestionnaire consultera le Gestionnaire d'assurance qualité.

Nombre insuffisant d'échantillons disponibles – Le Directeur/Gestionnaire du laboratoire consultera le Gestionnaire de l'assurance qualité pour développer une procédure de qualification appropriée.

Documentation

Le Directeur/Gestionnaire du laboratoire soumettra un mémo (avec données en annexe) au Gestionnaire de la qualité justifiant la qualification du technicien du laboratoire. Ceci sera enregistré dans les fichiers individuels du stagiaire.

RÉACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES

Résumé

Cette procédure décrit l'étiquetage préconisé et l'usage des réactifs en vrac et des solutions préparés. Elle comporte l'information à prendre en compte sur les étiquettes des réactifs et de préparations.

Portée

Cette procédure s'applique à tous les produits chimiques et réactifs utilisés dans le laboratoire.

Responsabilité

Le technicien recherche les méthodes disponibles, le testage de performance, produit et analyse les données.

Le Directeur/Gestionnaire du laboratoire inclut et autorise les méthodes, revoit et approuve les données.

Le Gestionnaire de la qualité spécifie les besoins de validation et approuve la méthode.

Procédures

Besoins Généraux

Les réactifs en vrac, les produits chimiques, et les solutions devront être correctement étiquetés.

Les dates d'expiration seront cohérentes, les directives et exceptions sont notées dans la PSF des analystes.

A la date d'expiration, les produits chimiques et les solutions préparées (réactifs) seront correctement éliminés

Aucun déchet ne sera stocké dans le laboratoire, sauf dans les récipients désignés à cet effet.

Réactifs en vrac

Il s'agit de produits chimiques reçus d'un distributeur ou fabricant dans les emballages d'origine dûment scellés, tels que bouteilles, bocaux, sacs, seaux. De tels réactifs sont utilisés tels quels ou dans la préparation des solutions utilisées dans les procédures d'analyses. Tous les réactifs en vrac devront être étiquetés avec les dates de réception et d'expiration.

Ces étiquettes contiendront (au moins) les informations suivantes:

- Date de réception,
- Initiales de la personne réceptrice,
- Date d'expiration assignée,
- Date d'ouverture,
- Initiales de la personne ayant procédé à l'ouverture,

Tous les réactifs en vrac, indépendamment de la taille de leur récipient, doivent porter une étiquette ad hoc.

Certains fabricants laissent une place suffisante sur leurs étiquettes afin d'y inscrire toute l'information nécessaire. L'ajout de cette information ne dispense pas d'apposer l'étiquette de réactif en vrac préparée pour le laboratoire.

La règle générale pour indiquer la date d'expiration des réactifs en vrac est de 10 ans, à moins que le produit chimique ne porte une date d'expiration assignée par le fabricant (éther, produits de titration) ou notée dans la PSF des analystes.

Une rotation du stock sera effectuée afin que les produits les plus anciens soient utilisés prioritairement. Il ne faut pas stocker trop longtemps une grande quantité de solvants (pas plus de 6 mois). Si une date d'expiration spécifie le mois, elle s'étend jusqu'à la fin de celui-ci. La date d'expiration de toutes les produits chimiques doit être vérifiée au moins une fois/par mois. Les produits expirés doivent être éliminés. Toute exception doit être approuvée par le Directeur/Gestionnaire du laboratoire. Les produits seront éliminés uniquement par le système prévu à cet effet pour les déchets.

Un certificat d'analyse ou une analyse du lot est fourni avec certains produits, un tel certificat est requis pour un matériel standard de référence. Un fichier des certificats sera gardé au même endroit que les données d'analyse.

Les réactifs en vrac transférés dans un autre récipient (bouteilles, plastiques, pipettes) doivent porter au minimum l'information suivante:

- Nom du réactif
- Numéro original du lot conservé en vrac
- Initiales
- Date d'expiration
- Instruction de sécurité, si nécessaire

Les produits en vrac suivants peuvent être conservés dans des bouteilles standard lavables étiquetées pouvant être achetées dans le commerce:

- Eau désionisée
- Éthanol
- Acétone
- Isopropanol
- Méthanol

Ces bouteilles contiendront l'information telle que le nom chimique, la formule moléculaire, les effets sur l'appareil ciblé et la provenance de l'information, le numéro du certificat d'analyse, et les diamants de mises en garde ou son pictogramme.

Solutions préparées (réactifs).

Il existe deux exigences pour l'étiquetage de solutions préparées (réactifs); ces préalables dépendent de la date d'usage présumée: le jour même ou plus tard.

Jour même – les solutions préparées quotidiennement doivent porter les indications suivantes:

- Nom du réactif (contenu)
- Concentration
- Date de préparation
- Initiales du technicien de laboratoire
- Instruction de sécurité, si nécessaire

Usage étendu – les solutions qui ne seront pas éliminées le jour même porteront les informations suivantes sur une étiquette:

- Nom du réactif (contenu)
- Concentration
- Date de préparation
- Initiales du technicien qui a préparé la solution
- Numéro de préparation
- Date d'expiration
- Instructions de sécurité, si nécessaire sur toutes les préparations préparées sur place avec l'exception suivante: Les dilutions d'une solution de référence stockée afin de préparer une courbe de référence. Dans ce cas, des numéros de préparation ne sont pas nécessaires, mais le numéro de préparation ou l'information sur la solution mère sera enregistré.

Les règles générales pour la date d'expiration des solutions préparées sur place est d'une année. Une exception à cette règle concerne les produits chimiques pour lesquels les fabricants ont intégré la date d'expiration. L'exception peut-être notée dans les procédures pour analytes.

NOTE: La date d'expiration de la solution ne peut dépasser celle d'un de ses composants.

Un format pouvant être utilisé pour les numéros de préparation est XXXX-YYYY, dans lequel XXXX est le numéro de l'agenda du laboratoire et YYYY un numéro séquentiel, commençant par 0001. Les zéros antérieurs sont nécessaires afin d'avoir toujours un numéro à quatre chiffres.

TEST DE VALEUR ABERRANTE

Résumé

Si les résultats des échantillons ne se redoublent pas correctement, il faut procéder à un test de valeur aberrante pour vérifier s'il ne convient pas d'éliminer des résultats spécifiques. Ce test peut également se révéler nécessaire pour d'autres ensembles de données, comme les méthodes de qualification ou de validation. Le laboratoire utilise le Test de Dixon à cet effet (Dixon, 1995) avec des valeurs critiques, à 5% d'erreur comme indiqué dans Wernimont (1995).

Portée

Cette procédure standard de fonctionnement s'applique à toutes les données du laboratoire.

Responsabilité

Le technicien du laboratoire recherché les méthodes disponibles, effectue le testage, et analyse les données.

Le Directeur/Gestionnaire du laboratoire évalue et autorise les méthodes, revue et approuve les données.

Le Gestionnaire de la qualité spécifie les besoins de la qualité et approuve la méthode.

Procédures

Le test de Dixon applicable aux résultats d'analyse

Pour un problème d'échantillon qui ne satisfait pas aux besoins de duplication du laboratoire, il peut s'avérer nécessaire de vérifier si un résultat d'analyse particulier représente une valeur aberrante. Pour ce faire, il faut parcourir les étapes suivantes:

Lorsqu'il y a quatre résultats d'analyse, il faut les classer par ordre de grandeur croissante (W, X, Y, Z).

Calculer la portée (R) des valeurs (de la plus élevée à la plus basse) (Z – W)

Déterminer quel résultat est suspecté comme valeur aberrante (W ou Z).

Calculer la différence (T) entre celle-ci et sa voisine la plus proche:

Si W est suspect: $T_w = X - W$

Si Z est suspect: $T_z = Z - Y$

Calculer le ratio (I):

Si W est suspect: $I = T_W / R$

Si Z est suspect: $I = T_Z / R$

Si I est plus grand ou égal à la valeur critique ($N = 4$) 0,829, le nombre suspect représente alors une valeur aberrante et peut être éliminé. S'il est inférieur à 0,829, ce n'est pas une valeur aberrante il sera gardé pour considération.

Le test de Dixon appliqué à d'autres situations

Le principe ci-dessus peut s'appliquer à des données numériques où N est différent de 4. Le Tableau 2 affiche les valeurs de N entre 3 et 40. *NOTE*: il faut utiliser un calcul différent lorsque $N > 8$ (voir références).

Si un ensemble de données est plus élevé que 40, il faut diviser les données par 2 au hasard, et tester les valeurs aberrantes à chaque extrémité de la range de résultats.

Références bibliographiques

Dixon, W. J. 1953. *Processing Data for Outliers, Biometrics*. International Organization for Standardization (ISO) document ISO 5725-1981, pp. 74-89.

Wernimont, G.T. 1985. *Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods* (W. Spendley, ed.), AOAC, 1985, Arlington, VA. Table A-9, p. 156.

AIDE MÉMOIRE POUR UN AUDIT DE LA QUALITÉ DU LABORATOIRE

Résumé

L'objectif d'un audit de la qualité du laboratoire est d'évaluer systématiquement ses opérations en cours afin que les données d'analyse produites satisfassent aux critères de la qualité établis pour leur utilisation présumée. L'audit est un outil à employer pour s'assurer de l'efficacité du programme de la qualité, pour identifier les opportunités d'amélioration et pour être utilisé dans la formation du personnel aux préalables d'une saine politique de la qualité.

Il est impératif que les données générées par le laboratoire soient solides. Les audits de routine aident à s'assurer que les données générées par le laboratoire soient défendables, à savoir qu'elles satisfont aux standards recommandés pour la précision, l'exactitude, la traçabilité, la complétude et la comparaison.

L'aide-mémoire en annexe couvre les aspects majeurs des opérations du laboratoire. Dans la plupart des situations, il représente un document générique; ainsi, il peut et devra évoluer lorsque besoin il y a de s'accommoder aux changements de système et de procédure.

Ceci est un document conçu pour servir d'aide pendant un audit physique de l'analyse de la procédure d'un laboratoire. La portée de l'audit n'est cependant pas aussi limitée. Beaucoup de fonctions de soutien du laboratoire (p. ex. calibration et maintenance de l'équipement de routine, sécurité, formation, procédures standard de fonctionnement, validation, etc...) sont également prises en compte au cours de l'audit. Un programme efficace d'assurance qualité est compris dans un ensemble intégré d'activités et l'audit examine et réévalue chaque activité de manière régulière.

TABLEAU 2
Valeurs critiques pour l'évaluation du test de Dixon pour les valeurs aberrantes

N	Valeur critique	N	Valeur critique
3	0,970	22	0,468
4	0,829	23	0,459
5	0,710	24	0,451
6	0,628	25	0,443
7	0,569	26	0,436
8	0,608	27	0,429
9	0,564	28	0,423
10	0,530	29	0,417
11	0,502	30	0,412
12	0,479	31	0,407
13	0,611	32	0,402
14	0,586	33	0,397
15	0,565	34	0,393
16	0,546	35	0,388
17	0,529	36	0,384
18	0,514	37	0,381
19	0,501	38	0,377
20	0,489	39	0,374
21	0,478	40	0,371

En préparant l'audit, l'auditeur doit lire soigneusement la procédure standard de fonctionnement à cet effet. La possession d'une liste de détails à vérifier (réactifs, équipements standards, horaires, températures, etc...) aide à centrer l'audit.

En termes généraux, si la réponse à une question d'audit est non, et s'il y a de la place pour des commentaires, une explication pour la déficience est nécessaire.

Portée

La procédure standard de fonctionnement s'applique à toutes les opérations du laboratoire.

Responsabilité

Le technicien recherché les méthodes disponibles, effectue le testage, génère et analyse les données.

Le Directeur/Gestionnaire du laboratoire évalue et autorise les méthodes, revoit et approuve les données.

Le Gestionnaire de la qualité spécifie les besoins de validation et approuve la méthode.

Procédures

Terminologie utilisée dans l'aide-mémoire de l'audit (Tableau 3)

Contrôle – le technicien qui effectue l'analyse de l'analyte contrôlé.

Contrôleur – le gestionnaire de la qualité, ou son représentant officiel, qui révisé le processus et génère un rapport, des conclusions d'audit et identifie des opportunités d'amélioration.

TABLEAU 3
Page de couverture d'audit

Aide-mémoire pour l'analyse échantillon
Date de l'audit:
Auditeur:
Identificateur de l'échantillon:
Analyte:
Date(s) de l'(des)analyse(s):
Audité:
Gestionnaire actuel:
Gestionnaire responsable:

Liste des documents revus pour la préparation et la conduite de l'audit

PSF (incluent les numéros des versions): _____

Documentation relative aux données d'analyse _____

Compte-rendu des feuilles de travail _____

Agenda laboratoire _____

Enregistrements des calibrations de balances _____

Base de données LIMS _____

Données de contrôle du travail _____

Enregistrement de calibration des pipettes _____

Journal de bord du contrôle de l'équipement _____

Autres: _____

Autres: _____

Autres: _____

Documentation

1. Existe-t-il une copie approuvée très récente de la PSF d'analyse pour l'analyste contrôlé à laquelle le technicien puisse se référer pendant l'analyse?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

2. La PSF est-elle cohérente avec la méthode qu'elle représente? (n'y a-t-il pas des déviations à partir de la méthode officielle à valider avant exécution?)

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

3. Toutes les données et documents de support sont-ils immédiatement disponibles et facilement récupérables? Toute documentation liée à une analyse particulière, mais non limitée à celle-ci, feuille de résumé d'analyse, feuille de compte-rendu de mission, agenda de laboratoire avec l'information sur la préparation de solution, la maintenance de l'équipement et journal de bord de calibration, résultats de calcul et d'équipement, schéma de contrôle, etc...

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

4. La documentation contient-elle suffisamment d'information et d'explication pour que le rapport d'analyse soit aisément interprété par des personnes compétentes autres que celles responsables de leur production?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

5. La documentation contient-elle l'information suffisante pour permettre, si nécessaire, une répétition satisfaisante de l'analyse en conditions originales?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

6. Les saisies originales continues dans la documentation sont-elles nettes et lisibles et enregistrées en utilisant une encre bleue ou noire permanente résistante à l'eau?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

7. Si la procédure utilisée pour l'analyse de l'échantillon n'est pas reconnue, a-t-elle été validée?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

8. Si la procédure utilisée pour l'analyse de l'échantillon a été validée, cette validation a-t-elle été archivée et est-elle aisément accessible?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

9. Si des corrections ou des changements ont été apportés aux saisies dans la documentation, ont-ils été correctement effectués ? Des corrections appropriées sont faites comme suit:

- Des effaçures, des liquides ou bandes correctives ne peuvent être utilisés à cet effet.
- Tirer une ligne simple sur la saisie incorrecte; ne pas effacer la saisie originale, il faut qu'elle reste lisible à travers la rature.
- Ecrire la correction aussi près que possible de la saisie originale.
- Les initiales du technicien doivent apparaître près de la correction.
- La date de la correction doit figurer à côté de celle-ci (à moins que ce soit la date qui ait été corrigée, auquel cas il s'agit d'une autocorrection!).

- Si la raison de la correction ne semble pas évidente, une courte explication sera fournie sur la raison du changement, autrement elle pourra se référer ailleurs sur la page ou une feuille annexe en utilisant une «*».

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

10. La feuille de résumé analytique procure-t-elle pour enregistrement les temps de séjour, les températures, les temps de digestion, les températures du bain, etc... pour toutes les étapes critiques définies dans la PSF?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

11. Est-ce que tous les poids inférieurs à 1 gramme sont-ils indiqués sous la forme 0,xxxx (inclus le zéro antérieur)?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

12. Si des encarts sont utilisés (p.ex. papiers tels que chromatogrammes, imprimés) sont-ils affichés sous forme permanente (agrafés, scotchés) ou placés dans une enveloppe séparée (complètement référencés à l'ensemble original et facilement récupérables)?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

13. Pendant l'analyse, les produits d'un instrument ont-ils été générés? Est-ce que toutes les saisies du produit d'un instrument ont-elles correctement étiquetées (p.ex. concentrations de standards de calibration, ID ou standards de travail, numéros d'échantillons individuels pour des échantillons de recherche, dilutions d'échantillons [si différentes de celles décrites dans la PSF] etc...).

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

14. La base de données informatisée est-elle cohérente avec la documentation papier?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

15. Si certains résultats ont été générés via un logiciel externe (p.ex. un programme de tableur) le programme externe a-t-il été validé avant utilisation, et la documentation de validation a-t-elle été archivée et est-elle facilement disponible?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

16. Si certains commentaires sont fournis, sont-ils raisonnables, complets, et au sein du set de documentation?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

17. Le set a-t-il été correctement revu par le réviseur?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

18. Tous les blancs ont-ils été soit remplis soit correctement complètes jusqu'à la fin?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

19. Chaque page de la documentation a-t-elle été correctement numérisée dans le format m/n ou m de n, ou n représente le numéro de page et n le nombre total de pages? (De manière continue, à savoir que les imprimés d'ordinateurs, ou d'instrument, les pages auto-numérisées des tableurs sont considérés comme une page).

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

20. Le numéro d'identificateur du set est-il inclus sur toutes les pages nécessaires de la documentation?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

21. Chaque page nécessaire de la documentation est-elle signée et daté par le technicien responsable?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

Réactifs et préparation de solution

22. Les solutions volumétriques et testage ont-elles été toutes utilisées avant leurs dates respectives d'expiration?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

23. Les réactifs en vrac, les solutions volumétriques, et les solutions de testage utilisées au cours de l'analyse incluse dans la feuille de résumé de l'analyse ont-ils été identifiés par un numéro unique?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

24. Les réactifs en vrac, les solutions volumétriques, et les solutions de testage ont-ils été identifiés par un nombre unique dans le format requis et enregistrés dans l'agenda du laboratoire?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

25. Les réactifs en vrac utilisés pour la préparation de l'analyse contrôlée ont-ils été employés avant leur date respective d'expiration?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

26. Les dates de préparation consignées dans l'agenda du laboratoire pour les solutions volumétriques et de testage sont-elles cohérentes avec celles indiquées dans la feuille de résumé d'analyse?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

27. Les numéros uniques d'identification des solutions volumétriques et de testage actuelles sont-ils cohérents avec les préparations décrites dans l'agenda du laboratoire?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

28. Tous les échantillons, réactifs, extraits, matériels et standards de référence sont-ils stockés de manière à préserver leur identité, concentration, pureté et stabilité?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

29. Tous les matériels standard de calibration ou de référence utilisés dans cette analyse sont-ils traçables à partir d'un matériel (primaire) de référence certifiés tels que NIST ou UCP?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

Agendas du laboratoire

30. Chaque réactif ou préparation de solution séparés mentionnés sur une page donnée de l'agenda du laboratoire portent-elles les initiales du et séparés par le technicien et leur description fournit-elle les éléments suivants?

- Un numéro d'identification unique pour chaque solution préparée.
- Le nom/concentration de la solution préparée volumétrique ou de testage (p.ex. 0,15 N HCl dans méthanol).
- Le nom (et la formule moléculaire si plus d'une présentation est possible) des réactifs en vrac utilisés dans la préparation des solutions volumétriques ou du testage.
- Les poids [(brut, tare, net) ou (poids par différence)] ou les volumes, exprimés en unité appropriés, du réactif en vrac utilisé dans la préparation de la solution volumétrique ou de testage.
- La séquence de dilutions (si nécessaire) utilisée pour préparer la solution finale de la solution volumétrique ou de testage, en y incluant les volumes introduits et finaux.
- L'identification unique de la balance, de la pipette ou de la bouteille doseuse.
- La date d'expiration de la solution préparée.
- L'identification de la source d'eau.

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

Instrumentation et équipement

31. La feuille résumé de l'analyse fournit-elle une entrée pour saisir le numéro unique ID pour chaque pièce critique d'équipement utilisée dans l'analyse? (i.e. balance, four, pipette, pissette, thermomètre, titreuse, réfrigérateur, etc...?)

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

32. La calibration ou la maintenance ont-elles été correctement effectuées sur le matériel mentionné, nécessitant ces opérations?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

33. La calibration quotidienne ou hebdomadaire de la balance utilisée pour l'analyse de contrôle est-elle documentée pour le jour de celle-ci? La balance est-elle sous contrôle? Les calibrations associées sont-elles sous contrôle?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

34. Y a-t-il des enregistrements quotidiens de température hors de contrôle pour des équipements indiqués nécessitent un contrôle quotidien?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

Schémas de contrôle

35. Les données de contrôle de travail pour le set sont-elles consignées sur la feuille de résumé d'analyse et les données sont-elles sous contrôle pour l'analyte contrôlé? S'il existe une tendance dans les données de contrôle de travail au cours des précédentes années, a-t-elle été reportée dans le bloc-notes?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

36. Le schéma de contrôle de la base de données est-il à jour pour l'analyte à contrôler?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

37. Les statistiques du schéma de contrôle ont-elles été correctement calculées? Sont-elles bien documentées?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

Santé & Sécurité

38. L'ensemble du personnel rencontré au cours de ces audits porte-t-il son équipement protecteur?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

39. Un stockage particulier ou des besoins de manipulation sont-ils indiqués dans la documentation sur l'analyse?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

40. Les échantillons nécessitant la même analyse sont-ils correctement stockés/manipulés?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

41. Le technicien présentement en charge de l'analyse à contrôler est-il pourvu de l'équipement de sécurité approprié (i.e. blouse de laboratoire, gants, chaussures renforcées aux orteils, protection du visage, masque à poussière, masque à vapeur, tablier en caoutchouc,...) si nécessaire?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

42. Le technicien actuel connaît-il la localisation du bain oculaire le plus proche, de l'extincteur, de la couverture pour le feu, le nécessaire de nettoyage après débordement, de l'alarme à incendie, de la sortie de secours, du téléphone de secours, de la douche d'urgence? Tous ces appareils sont-ils en état de fonctionnement et à jour?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

Divers

43. Des déviations du protocole apparaissent-elles soit dans la documentation contrôlée soit à partir de l'interview du technicien? Expliquer.

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

44. Si des déviations du protocole existent, ont-elles été approuvées par le superviseur et explicitement?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

45. Quelle était la valeur Z du dernier échantillon contrôlé et les résultats étaient-ils sous contrôle?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

46. Apparaît-il une tendance dans les schémas du contrôle des échantillons de l'année antérieure?

Non _____ Oui _____ Hors sujet _____

Commentaires _____

RÉCEPTION DES ÉCHANTILLONS AU LABORATOIRE

Résumé

Cette section identifie les procédures appliquées pour manipuler les échantillons soumis au laboratoire, depuis la collection et l'envoi par les clients jusqu'à la réception.

Le processus de garde de l'échantillon au sein du laboratoire débute lorsque les échantillons sont physiquement réceptionnés. Les besoins spécifiques de manipulation sont dictés par la nature de chaque échantillon (voir «manipulation d'échantillons d'aliments pour animaux»). Le laboratoire attend que, sur le terrain, le personnel d'inspection parfaitement formé mène un échantillonnage efficace afin de fournir au laboratoire des échantillons représentatifs et cohérents pour évaluation. La mesure dans laquelle l'échantillon représente la population de base est critique si les données retournées au client doivent servir à un objectif utile.

Portée

Cette procédure s'applique à tous les échantillons de d'aliments pour animaux et d'ingrédients de l'aliment pour animal soumis au laboratoire pour testage.

Responsabilité

Le technicien du laboratoire recherche les méthodes, effectue le testage, génère et analyse les données.

Le gestionnaire/Directeur du laboratoire évalue et autorise les méthodes, revoit et approuve les données.

Le Gestionnaire de la qualité spécifie les besoins de validation et approuve la méthode.

Les techniciens affectés aux échantillons deviennent compétents dans la réception, la manipulation et la documentation de ceux-ci.

Procédures

Examen de la Condition de l'échantillon

Chaque échantillon doit arriver en bonne condition physique, emballé dans un récipient à cet effet clairement étiqueté, et accompagné d'un formulaire approprié pour demande d'analyse. Il convient de noter l'état de l'échantillon à son arrivée i.e. congelé, réfrigéré, à la température de la pièce, etc....

Acceptation/Rejet de l'échantillon

Le rejet de l'échantillon peut survenir et être dû à une détérioration physique, à une contamination potentielle liée à une fuite, au bris d'un récipient, à un mélange entre échantillons transmis ensemble, à une quantité insuffisante d'échantillon pour le(s) test(s) sollicité(s), ou à un emballage ou identification défectueux.

Identification ou documentation de l'échantillon

Les échantillons inacceptables sont adressés au superviseur approprié qui informe le client afin de discuter de l'action corrective nécessaire. L'échantillon peut toujours être analysé, à la demande du client, mais tous les rapports générés à partir de tels échantillons, doivent mentionner la réception dans des conditions inacceptables et décrire la nature du pro-

blème. Les échantillons qui ne doivent pas être traités sont identifiés au sein du système et rapportés au client comme «inadapté». Un commentaire décrivant la raison pour laquelle l'échantillon a été déclaré «inadapté» peut être ajouté au document d'identification et au rapport d'analyse. Voir Tableau 3 pour le formulaire d'identification de l'échantillon.

Identification de l'échantillon

Un numéro unique d'identification de l'échantillon est assigné. Il est reporté sur les documents d'échantillons du laboratoire et les échantillon de testage, et est utilisée pour suivre l'échantillon au sein du laboratoire à travers le processus de testage, à savoir échantillons, stockage, récipient, échantillon retenu, rapports d'analyses, documents, feuilles de travail, et livres de travail.

Appendice

Date: _____

Reçu par: _____

NOTE: Entourer le code d'état approprié à côté de chaque numéro d'échantillon

TABLEAU 4

Etat échantillon à l'arrivée

Numéro échantillon	Code état
1	A B C D E F G H J K
2	A B C D E F G H J K
3	A B C D E F G H J K
4	A B C D E F G H J K
5	A B C D E F G H J K
6	A B C D E F G H J K
7	A B C D E F G H J K
8	A B C D E F G H J K
9	A B C D E F G H J K
10	A B C D E F G H J K
11	A B C D E F G H J K
12	A B C D E F G H J K

- A Conditions acceptables
- B Récipient cassé, ou fuyant
- C Sceau de sureté brisé
- D Sceau de sureté manquant
- E Contamination par fuite
- F Humidité, contamination possible
- G Quantité insuffisante
- H Papier de travail manquant
- J Papier de travail reçu sans échantillon
- K Autres problèmes

MANIPULATION ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS D'ALIMENTS POUR ANIMAUX

Résumé

Le protocole décrit la manipulation/le broyage/la préparation corrects d'échantillons d'aliments pour animaux par les Techniciens du laboratoire. Des besoins spécifiques de manipulation sont dictés par la nature de chaque échantillon. La chaîne de sécurité au sein du laboratoire démarre dès la réception physique.

Portée

La procédure s'applique à tous les échantillons d'aliments pour animaux et des ingrédients d'aliments pour animaux.

Responsabilité

Le technicien de laboratoire recherche les méthodes disponibles, effectue le testage, génère et analyse les données.

Le Gestionnaire/Directeur du laboratoire évalue et autorise les méthodes.

Le Gestionnaire de la qualité spécifie les besoins de validation et approuve la méthode.

Échantillonnage

Il peut être de deux types: représentatif ou sélectif.

Échantillon représentatif

Il s'obtient en prélevant une petite fraction d'un volume plus large de telle sorte que la détermination d'une caractéristique requise représentera la valeur moyenne de celle-ci pour tout l'échantillon.

Échantillon sélectif

Si une différence notable est observée dans une portion de l'échantillon à analyser, celle-ci sera séparée et traitée comme un lot séparé. Si ceci n'est pas possible, l'échantillon entier sera traité et la proportion de l'échantillon avec la différence notable sera enregistrée. Dans chaque cas, les détails seront enregistrés dans le rapport final du client.

Considération statistique

L'échantillonnage par adoption est la méthode usuelle pour les laboratoires de nutrition animale. Pour un échantillonnage par caractéristiques, il existe un plan d'échantillonnage théorique basé sur une distribution binomiale. Ce plan a été simplifié à une relation entre racines carrées de la taille du lot et du nombre d'incrémentes.

Avec un produit en vrac, les variances de l'échantillon sont supposées être uniformes si, pour des lots allant jusqu'à 2-5 tonnes, sept incrémentes sont retenus et si, entre 2-5 et 8 tonnes, le nombre d'incrémentes retenu est au moins égal à la $\sqrt{20m}$ (où m = masse en tonnes de l'échantillon). Si le lot dépasse 80 tonnes, la relation entre racines carrées sera toujours applicable mais moins précise.

Équipement

Broyeurs ou moulins. Ceux-ci sont capables de broyer des ingrédients sans causer de changements notables sur le taux d'humidité ni de générer de chaleur excessive (ce qui pourrait avoir un effet dommageable sur l'échantillon). Si l'ingrédient à analyser est susceptible de perdre ou de gagner de l'humidité, un facteur de correction sera appliqué aux résultats. Ceci sera déterminé en comparant le taux d'humidité de l'échantillon préparé (broyé ou moulu) par rapport à une portion de l'échantillon original avant traitement. Une fois moulu ou broyé l'échantillon devrait être apte à passer à travers un tamis approprié. Les broyeurs et moulin doivent être soigneusement nettoyés après usage afin d'éviter toute contamination croisée.

Mixer/homogénéiseur (ou malaxeur mécanique), afin d'homogénéiser les ingrédients humides. Un hachoir avec une lame de 4mm peut également être utile pour les ingrédients congelés.

Tamis, avec des mailles de 1,0 mm, 2,8 mm et 4 mm, en toile métallique, métal tissé ou matériau similaire.

Balance d'analyse, employée pour déterminer le poids de l'échantillon (voir procédure de la qualité Section 8: utilisation des balances).

Shaker Mécanique, pour mélanger les échantillons de mélasses liquides visqueuses.

Appareil, séparateur ou écarteur, tel qu'un séparateur conique ou à tranches multiples avec un système de triage afin de permettre une division uniforme des échantillons du laboratoire.

Outils, marteau tournevis, ciseau, pour casser les blocs de mélasse en pièces plus petites.

Spatule, pour étaler, *mortier ou pilon* pour écraser les échantillons.

Pipette de transfert, pour la distribution d'aliments pour animaux liquides ou humides.

Récipients pour échantillons, ceux-ci seront adoptés pour préserver l'intégrité de l'échantillon en évitant les effets de l'humidité, de la température ou de la lumière. Ils seront de taille appropriée pour permettre le stockage d'une quantité suffisante d'échantillon afin de compléter toutes les déterminations requises (pour moins de 100 gr) et de laisser suffisamment d'air une fois rempli (ceci pour permettre un mélange efficace avant l'échantillonnage pour les tests demandés). Le récipient aura un couvercle de sécurité et sera uniquement identifié avec l'étiquette de l'échantillon qui sera placée sur le corps du récipient et non sur le couvercle.

Si l'échantillon doit être examiné microbiologiquement, il sera manipulé sous conditions stériles afin de préserver le contenu microbien.

Procédure

Pour éviter l'exposition à l'atmosphère, les moutures ou le broyage seront effectués aussi rapidement que possible. Il peut être nécessaire de casser ou broyer l'échantillon préalablement.

Échantillons fins

Si un échantillon peut traverser un tamis de 1,00 mm, il sera mélangé soigneusement et divisé ensuite en utilisant un séparateur ou écarteur (voir 7.)

Échantillons grossiers

Si un échantillon ne peut pas traverser un tamis à 1,00 mm mais bien un tamis à 2,8 mm, il sera broyé jusqu'à ce qu'il puisse passer à travers le tamis de 1,00 mm puis divisé comme un échantillon fin. De même pour l'échantillon qui passe à travers 4,00 mm mais non 2,8 mm.

Difficulté à broyer les échantillons

S'il est difficile de broyer un échantillon, le contenu en humidité d'un sous-échantillon sera déterminé et le reste de l'échantillon sera écrasé au moyen d'un mortier et pilon jusqu'à ce qu'il puisse traverser un tamis de 1,00 mm. Le taux d'humidité sera déterminé afin d'appliquer un facteur de correction.

Ensilage d'herbe ou de céréale

L'échantillon entier sera moulu et mélangé. Certains échantillons peuvent demander un hachage fin ou préalable. Si l'échantillon est inadapté à la mouture ou au hachage, il sera séché dans un four pendant la nuit (60-70 °C), et moulu ensuite. Le contenu en humidité sera déterminé et un facteur de correcteur appliqué.

Échantillons liquides

L'échantillon sera mélangé en utilisant un homogénéiseur afin d'assurer une dispersion ou séparation complète du matériau et l'échantillon transféré en utilisant une pipette de gros calibre.

Dépannage

Un résultat erroné (trop élevé, trop bas) pour un analyte spécifique et/ou une duplication insuffisante peuvent être attribués à une ou plus des causes suivantes:

1. Mélange incomplet ou insuffisant d'échantillons secs, liquides et humides.
2. Ne pas avoir permis à des échantillons réfrigérés ou congelés d'avoir atteint la température de la pièce avant pesée.
3. Ne pas rassembler les portions d'un échantillon de diverses localisations autour du bloc de mélasses/bloc à lécher avant pesée ou ne pas analyser une portion suffisamment importante (le poids d'un échantillon peut nécessiter d'être augmenté pour une duplication correcte).
4. Les échantillons doivent être préparés de telle manière que les quantités pesées en vue des méthodes d'analyse soient homogènes et représentatives des échantillons finaux.

Manipulation de l'échantillon

Préparation d'un échantillon d'aliment sec pour animal.

1. Découper l'échantillon. En général, découper l'échantillon jusqu'à obtenir une taille suffisante. Placer l'échantillon découpé non broyé, dans un sachet zippé (ou similaire) étiqueté et le reste de l'échantillon dans le sachet d'origine. Etiqueter chaque récipient (sac, bouteille, etc...) avec un numéro d'identificateur (code barre p.ex.).
2. Broyer une des portions jusqu'à la mouture appropriée.
3. Le broyage ou la mouture de certains échantillons peut conduire à une perte ou un gain d'humidité ou des matières volatiles et il faut en tenir compte. Le broyage sera effectué le plus rapidement possible afin d'éviter l'exposition à l'atmosphère.
4. Placer l'échantillon broyé sur un papier brun.
5. Mélanger soigneusement l'échantillon avant de prendre la partie destinée au laboratoire
6. Remplir une bouteille de laboratoire pour échantillon avec suffisamment d'échantillon broyé.
7. Retourner dans la salle de stockage d'échantillons immédiatement après analyse.

Procédure pour obtenir un échantillon de laboratoire

1. Laisser l'échantillon se réchauffer à la température de la pièce s'il provient du congélateur ou du réfrigérateur.
2. Mélanger l'échantillon en roulant la bouteille et en l'inclinant de gauche à droite (faire tourner) pendant plusieurs secondes. Ne pas secouer. Certains échantillons nécessitent un mélange supplémentaire (p.ex. graine de coton à 41% m.g.).
3. Peser l'échantillon avec le moyen approprié pour la méthode désirée.
4. Retourner l'échantillon dans la salle de stockage appropriée.

Échantillon de mélasses liquides

1. Les mélasses sont stockées au réfrigérateur.
2. Laisser l'échantillon se réchauffer à la température de la pièce.
3. Secouer vigoureusement l'échantillon pendant une minute pour assurer un bon mélange. Pour les échantillons trop visqueux pour être secoués manuellement, il faudra utiliser un shaker mécanique. Mélanger pendant au moins 15 minutes ou comme indiqué dans le protocole afin d'obtenir un mélange homogène.
4. Peser l'échantillon avec le moyen approprié pour la méthode désirée (nettoyer tout débordement à l'intérieur de la bouteille).
5. Retourner l'échantillon au réfrigérateur approprié.

Échantillon de blocs à lécher mélassés

1. Les échantillons seront stockés au réfrigérateur.
2. Laisser l'échantillon se réchauffer à la température de la pièce.
3. Pour des blocs tendres, couper de petites portions au moyen d'une spatule à partir de différents endroits autour du bloc jusqu'au poids désiré. Mélanger n'est pas pratique.
4. Pour des blocs durs, tailler de petites portions à partir de différents endroits autour du bloc jusqu'au poids désiré (utiliser un marteau et un tournevis/ciseau, s'assurer qu'un équipement personnel de protection soit utilisé).
5. Retourner l'échantillon au réfrigérateur.

Échantillons pour mycotoxines

1. Broyer la totalité de l'échantillon (Moulin Romer ou équivalent). *NOTE:* Le moulin Romer va séparer l'échantillon en deux portions inégales, représentant respectivement $\frac{1}{3}$ et $\frac{2}{3}$ de la masse totale.
2. Broyer la portion d'un $\frac{1}{3}$ à travers un tamis de 1,5 mm en utilisant un appareil approprié (p.ex. SR300 Retsch, Allemagne ou équivalent).
3. Verser cette portion sur un papier brun et joindre les quatre coins.
4. Nettoyer les broyeurs avec de l'air comprimé ou broyer une petite quantité (200 gr) de grains non contaminé.

Références bibliographiques

ISO 6497. 2002. *Animal feeding stuffs – Sampling*. Geneva, Switzerland.

EN ISO 6498. 2009. *Animal feeding stuffs – Guidelines for sample preparation*. Geneva, Switzerland.

UTILISATION DES BALANCES

Résumé

Le document décrit les procédures pour calibrer, nettoyer, les matériels de pesage, et effectuer l'entretien de routine pour des balances digitales et d'analyse.

Portée

Cette procédure standard de fonctionnement s'applique pour tous les techniciens employant des balances digitales et d'analyses.

Responsabilité

Les techniciens recherchent les méthodes disponibles, effectuent le testage, génèrent et analysent les données.

Le Gestionnaire/Directeur du laboratoire inclut et autorise les méthodes, revoit et approuve les données.

Le Gestionnaire de la qualité spécifie les besoins de validation et approuve la méthode.

Équipement

Ensemble de poids, acier inoxydable, NIST/NVLAP ou similaire, certifié annuellement d'une portée 0,1 g, 1 g, 10 g, 50 g, et 100 g.

Procédures

Nettoyage

Le nettoyage est essentiel dans l'usage quotidien des balances afin de maintenir l'assurance qualité dans le laboratoire puisque peser est l'étape la plus basique et aussi l'une des plus importantes d'une analyse. Il est inévitable que les balances et les poids se salissent avec un usage quotidien. Dès lors, il est important de suivre soigneusement les méthodes ad hoc pour obtenir les résultats les plus précis. Les méthodes suivantes de nettoyage des balances et poids ont été mises au point pour assurer des résultats de la qualité.

Déconnecter la balance avant nettoyage et ne pas employer de produits de nettoyage durs ou abrasifs. Ne rien laisser s'introduire à l'intérieur des mécanismes internes. Manipuler le plateau de la balance avec précaution, ne pas toucher les pieds sur lesquels il repose ou l'endroit où la balance sur lesquels il repose. Lorsqu'on nettoie le plateau de pesée avec une solution liquide, il faut le déplacer à l'extérieur du corps de la balance afin d'empêcher le ruissellement de la solution sur les composants électroniques et de causer des dommages. Si un matériau quelconque pénètre dans le corps de la balance, le notifier immédiatement à un superviseur afin que les soins adaptés soient pris afin de limiter les dégâts. La balance sera nettoyée chaque fois que ce sera nécessaire. Pour un simple époussetage, tel qu'enlever un échantillon du plateau, une brosse douce en poils de chameau sera employée.

Il faut être sûr qu'il ne demeure pas de fines particules sur le plateau car même les plus petites d'entre elles peuvent affecter la lecture ultérieure ou détériorer le plateau.

Si la balance ne peut pas être nettoyée simplement au moyen d'une brosse, il faudra utiliser de l'eau pour éponger le plateau. Un chiffon sans peluche sera utilisé pour essuyer toute saleté ou eau sur le plateau. L'eau sera versée sur le chiffon, non sur la balance.

Si nécessaire, une solution à 1% de savon peut être utilisée, mais avec grand soin.

Cette solution devra être soigneusement essuyée. Le savon tend à laisser des résidus sur la balance, ce qui peut affecter les résultats d'une pesée. Un chiffon non pelucheux sera employé pour essuyer le plateau.

Pour les balances d'analyse, les vitres de protection seront nettoyées avec un liquide pour vitres et un chiffon sans peluches. Le nettoyant à vitre sera vaporisé sur le chiffon et appliqué ensuite sur les vitres. Ceci protégera de tout dépôt de spray.

Les poids ne seront jamais manipulés sans chiffons non pelucheux ou de pinces. Pour les poids les plus volumineux, des gants sans poudre peuvent être utilisés si nécessaire. Les empreintes digitales peuvent affecter les résultats d'une pesée et diminuer la précision et l'exactitude.

Pour nettoyer les poids, on utilisera de l'éthyl-éther et un chiffon sans peluches. L'éther sera utilisé seulement dans une hotte à solvant. Sécher le poids jusqu'à ce qu'il soit visuellement propre et qu'il ne reste pas de produits. Les poids seront nettoyés lorsque ce sera nécessaire.

Calibration

Les calibrations représentent un facteur important pour garantir les résultats de la qualité. Sans une calibration correcte, la balance est incapable de fournir des résultats fiables et cohérents. Dès lors, il est essentiel de contrôler la calibration de la balance. Trois méthodes existent et seront incorporées pour établir cette routine.

Tout d'abord, les balances doivent être contrôlées et calibrées annuellement par un service technique certifié. Les enregistrements de cet entretien annuel seront portés dans le journal de bord de la balance avec les enregistrements hebdomadaires de calibration. L'entretien sera également enregistré avec la date, la compagnie, le technicien et la raison du service. Les poids de calibration seront contrôlés simultanément. Tout facteur de correction sera mentionné et utilisé jusqu'à la calibration suivante.

Ensuite, chaque semaine, le technicien, ou son représentant, contrôlera la calibration dans son laboratoire respectif avec des poids certifiés nationalement traçables. Les enregistrements hebdomadaires de calibration indiqueront: titre descriptif, nom, fabricant, numé-

ro de modèle, numéro de série, numéro du local, fréquence de la calibration demandée, limites permises «de travail», initiales et date de la calibration, et revue du technicien responsable. Les poids seront dans la gamme de précision déterminée pour chaque balance.

Finalement, sur une base quotidienne et avant le contrôle de calibration, une calibration interne sera effectuée; les manuels pour chaque balance et les protocoles de calibration seront respectés pour les techniques de calibration. Ils seront enregistrés sur les documents appropriés.

Certaines balances possèdent un poids interne utilisés pour leur calibration. D'autres nécessitent un poids externe à cet effet. Il convient de se référer aux manuels pour la procédure spécifique à chaque balance.

Calibration de balance digitale

Les points suivant doivent être suivis chaque semaine pour calibrer la balance digitale. Une calibration qui couvre approximativement la portée de pesée sera effectuée en utilisant l'ensemble national traçable de poids avec une lecture de calibration simple pour chaque poids; avant cette opération, il faut s'assurer de la propreté de la balance. Ne pas toucher directement les poids avec les mains. Utiliser un gant exempt de poussière, des pinces ou un chiffon sans peluche pour manipuler les poids (voir protocole de nettoyage).

Contrôler avec le niveau à bulle la stabilité de la balance.

Si ce n'est pas le cas, remettre la balance à niveau en ajustant les poids. Le niveau à bulle est généralement situé sur l'arrière des balances digitales. Tourner les pieds dans le sens des aiguilles d'une montre pour relever la balance et en sens contraire pour la rabaisser. La balance ne peut être déplacée et réutilisée sans un réajustement ou un contrôle du niveau.

Le plateau vide, presser le bouton de tare, qui doit indiquer 0,00.

Placer un poids propre sur le plateau de pesée en employant un chiffon sans peluches ou une paire de pinces; enregistrer la valeur sur un formulaire de calibration. Si elle ne se retrouve pas dans les limites de portée, arrêter l'emploi de la balance et étudier le problème (voir Portée et Limites de la Balance ci-dessous). Si la balance a une fonction de calibration, une calibration interne peut être effectuée en utilisant les poids spécifiés (classe S) indiqués dans le manuel de la balance.

Calibration d'une balance d'analyse

Les points suivants seront respectés chaque semaine pour le contrôle correct de la calibration des balances d'analyse. Une calibration qui couvre approximativement la portée de pesée sera effectuée en employant l'ensemble de poids traçables. Avant calibration, s'assurer que la balance est propre. Ne pas toucher la balance directement avec les mains. Employer un gant exempt de poussières, des pinces ou un chiffon sans peluches pour manipuler les poids (voir protocole de nettoyage). S'assurer que les portes soient fermées avant la calibration et durant la pesée pour se mettre à l'abri des courants d'air pouvant affecter la lecture.

Contrôler le niveau à bulle pour s'assurer de la stabilité de la balance. Si tel n'est pas le cas, remettre la balance à niveau en ajustant les pieds. Le niveau à bulle se trouve généralement à l'arrière de la balance. Tourner les pieds dans le sens des aiguilles d'une montre pour relever la balance, dans le sens inverse pour la rabaisser. La balance ne peut être déplacée et réutilisée sans un réajustement ou un contrôle du niveau.

S'assurer que le plateau soit vide. Presser le bouton de tare: le résultat sera 0,0000 ou 0,00000.

Les balances d'analyse peuvent utiliser leurs poids internes pour calibration. Si la balance possède un poussoir de calibration, appuyer sur le bouton pour la calibrer. La lecture va progresser de C à CC. Une fois terminée, la lecture va retourner à 0,0000. Si la balance a un bouton de calibration tourner celui-ci doucement jusqu'apparaisse un C. Continuer à toucher le bouton jusqu'à la position de calibration. La lecture va montrer CC lorsque la calibration est atteinte. Le technicien doit tourner le bouton jusqu'à sa position originale ou moyenne avant la pesée. La lecture sera de nouveau à 0,0000. Voir le manuel de la balance pour les instructions concernant d'autres modèles.

Placer un poids propre sur le plateau de pesée en utilisant un chiffon sans peluches ou une paire de pinces. Enregistrer la valeur sur un formulaire de calibration. Si la portée ne se trouve pas entre les limites, arrêter l'utilisation de la balance et étudier le problème (voir portée et limites).

Portée et limites des balances

La portée de pesée indique les quantités mini et maxi que peuvent peser les balances. Voir manuels individuels des balances pour les spécifications. La limite de précision est employée pour un contrôle hebdomadaire de calibration. La limite indique la quantité dont peut dévier le poids par rapport à la quantité certifiée. Les limites typiques sont indiquées ci-dessous:

Poids balance digitale: < 100 g \pm 0,10 g; > 100 g \pm 0,50 g

Poids balance d'analyse: \pm 0,0005 g

Actions correctives pour problèmes de balance

Si le contrôle hebdomadaire de la balance se situe en dehors des limites, la balance devra être réexaminée. Nettoyer, contrôler le niveau, et recalibrer. Contrôler les courants d'air ou autres conditions, qui pourraient influencer la balance. Contrôler de nouveau la calibration avec le poids. Si cela passe, enregistrer les commentaires sur le journal de bord. Si cela échoue, pour toutes les gammes de poids, la balance sera mise hors service par le technicien et étiquetée de manière à en prévenir l'usage. Si le contrôle passe sur les gammes de poids inférieur, la balance sera utilisée uniquement pour cette portée et un signe d'avertissement sera appliqué sur la balance.

Tout problème de balance, sera notifié au technicien et au superviseur afin qu'elle puisse être réparée au remplacée.

Interférences

Plusieurs anomalies peuvent surgir lors des opérations standard des balances. Un événement commun est la déviation qui peut provenir de plusieurs facteurs. Afin de contrôler la balance pour déviation, il faut la tarer et voir si la mesure demeure stable.

La cause la plus commune d'une déviation de la balance est qu'elle n'est pas à niveau correctement. Il est très important que le niveau à bulle soit contrôlé avant chaque usage et que les poids soient ajustés si nécessaire.

Une déviation peut également survenir sur une balance d'analyse si les portes demeurent ouvertes pendant la pesée. Les portes doivent être fermées solidement; les courants d'air peuvent influencer le poids final. L'effet des courants d'air sur la lecture varient en relation avec les conditions du local dans lequel est utilisée la balance.

Des vibrations dans la pièce peuvent résulter en une déviation de la balance. Ce problème est lié au local et au bâtiment dans lesquels se trouve la balance.

Occasionnellement, il est nécessaire de placer la balance dans un endroit qui présente une quantité sévère de vibrations. Par exemple, lors de pesée de substances toxiques, il est nécessaire de peser dans une hotte de fumée. Le problème de déviation d'une balance peut souvent être résolu en l'installant sur un socle de marbre. Même si la balance ne se trouve pas dans une hotte d'extraction, il est sage d'installer une balance d'analyse sur un socle de marbre pour la protéger de vibrations du bâtiment ou d'un choc accidentel de la paillasse sur laquelle la balance est placée.

Lorsqu'une balance est déplacée d'une pièce à une autre, il convient de la laisser se rééquilibrer dans son nouvel environnement pendant une paire d'heures afin qu'elle se stabilise dans les conditions de température ambiante. Il ne faut pas déplacer une balance calibrée. Si la balance ne se trouve pas en équilibre thermique avec l'environnement, une déviation peut survenir. Lors du déplacement d'une balance d'une pièce fraîche à une pièce plus chaude, laisser la balance s'équilibrer pendant deux heures après l'avoir déconnectée afin d'éviter la condensation de l'humidité sur ou dans la balance. Des variations d'humidité et de températures provoquent des déviations.

Une manière de résoudre le problème d'humidité élevée est l'emploi de dessiccateurs d'air (à base de gel de silice, spéciaux pour balances) placés à l'intérieur de la balance. Un emplacement idéal pour balance est un local climatisé en permanence. Les conditions optimales incluent d'éviter l'exposition aux radiations extrêmes de chaleur et aux relents atmosphériques chimiques agressifs.

Astuces de pesée

Ne pas laisser tomber l'objet à peser sur le plateau de la balance; ceci peut endommager la structure interne et les poids peuvent perdre de leur précision.

Ne pas abandonner un échantillon sur le plateau pendant trop de temps. Il faut également s'assurer que l'échantillon et la balance soient à la même température. Si l'échantillon est froid, une condensation peut se former pendant la pesée de sorte que le poids est faussé.

Après usage, il faut s'assurer que la tare soit réajustée. Lors de coupure de courant, il faut laisser la balance se réchauffer pendant une heure.

Lors de placement d'un objet sur la balance, laisser celle-ci s'équilibrer (apparition du «g»). Lorsque le «g» apparaît, un poids peut être placé ou la graduation peut être tarée.

UTILISATION DES PIPETTES

Résumé

Ce document fournit les procédures de laboratoire utilisées pour les pipettes et les doseurs. Dans ce protocole sont recensées les conditions optimales de calibration, les techniques de calibration, les calculs pour caractériser les pipettes et la résolution de problèmes. Trois types de pipettes y sont décrits. Le premier est la pipette à main, comme la Eppendorf et la

Pipetmann. La Brinkmann ou Repipet est fixée à une bouteille, et est connue sous le nom de flacon doseur. La troisième type a comme la Brinkmann Dosimat, a une unité réservoir doseuse. Le terme «pipette» est employé pour décrire tous ces types, à moins qu'il n'en soit spécifié autrement. Les flacons doseurs n'ont nul besoin d'être calibrés mais seront testés pour s'assurer qu'ils conviennent pour l'usage proposé. Les Dosimats et pipettes classiques seront révisés et calibrés annuellement par un technicien approuvé et documenté dans le registre d'équipement approprié.

Portée

Cette procédure de fonctionnement standard s'applique pour tous les techniciens de laboratoire utilisant des pipettes et des doseurs.

Responsabilité

Le technicien du laboratoire recherche les méthodes disponibles, effectue le testage, génère et analyse les données.

Le Gestionnaire/Directeur du laboratoire évalue et autorise les méthodes, revoit et approuve les données.

Le Gestionnaire de la qualité spécifie les besoins de validation et approuve la méthode.

Équipement

Balance d'analyse,
Pipettes ou doseurs,
Thermomètre.

Procédures

Calibration

Avant calibration, la pipette sera rincée à l'eau ou autre moyen de rinçage pour enlever toute trace de solution antérieure. Le Dosimat sera également rincé avec la solution de pesée avant calibration. Les conditions optimales pour les mesures ou calibration comprennent le type de récipient de pesée, l'environnement, les techniques de testage, et la technique du technicien du laboratoire. Le récipient de pesée sera cylindrique afin que soit gardée plane la surface de l'échantillon liquide. Pour minimiser l'évaporation le récipient sera couvert. Pour minimiser les empreintes digitales, seront utilisées des pinces, des gants ou des chiffons non pelucheux lors de la manipulation du récipient de pesée. Le local dans lequel seront effectuées les mesures doit être exempt de courants d'air et sans exposition solaire directe sur la balance. La pièce sera sous température ambiante normale (19°-23°) pour permettre la pipette de s'équilibrer à la température ambiante avant calibration. La technique du personnel de laboratoire est importante; il convient de suivre le manuel d'instruction et maintenir un timing adapté entre les pesées.

Pour la plupart des pipettes, la solution de testage est représentée par l'eau désionisée. Il est nécessaire qu'une portion de celle-ci soit versée dans le récipient d'échantillonnage pour s'équilibrer une heure avant la calibration. Il est essentiel que la température de l'eau soit mesurée à 0,1 °C d'écart pour les prochains contrôles (voir Tableau 5).

Dans certaines occasions, certains types de pipette ne seront pas calibrés au moyen d'eau, mais avec un solvant compatible. Si celui-ci est hautement volatile, le produit est versé dans le flacon, le couvercle est remplacé, et le flacon est pesé une nouvelle fois afin d'atteindre le poids final. Lorsqu'un solvant est utilisé, la densité (g/ml) de la solution doit être prise en compte; elle remplacera le facteur Z utilisé dans la calibration à l'eau. Pour évaluer la densité la température du local doit être prise.

Les pipettes utilisées régulièrement doivent être calibrées au minimum une fois par mois avec trois séries de cinq pesées. La fréquence peut être réduite, si un faible risque est identifié. Les pipettes fréquemment utilisées seront calibrées à chaque utilisation. Ceci détermine la précision et l'exactitude. Il est également nécessaire de calibrer au moyen de trois séries de cinq pesées lors d'une opération majeure ou lors de l'arrivée d'un nouvel instrument. L'unité d'échange Dosimat sera calibrée une fois l'an par le fabricant.

Ces pesées doivent être effectuées pour trois volumes différents de la pipette. La pesée doit couvrir la portée d'utilisation de la pipette dans le laboratoire. Par exemple, une pipette de 10 ml sera testée pour des volumes de 2,5 ml et 10 ml. Elle sera également calibrée pour une lecture communément employée dans le laboratoire. Si une mesure de 9ml est nécessaire quotidiennement, elle sera calibrée à 2,5 ml et 9 ml. Le technicien déterminera les trois mesures à prendre, en fonction des besoins du laboratoire. Si une pipette sert uniquement à délivrer un volume spécifique, la calibration sera effectuée seulement pour le dernier. Si une pipette sert seulement à compléter un volume ou à délivrer un volume non critique, elle n'a pas besoin d'être calibrée. Ces pipettes particulières doivent être étiquetées pour informer les techniciens de leur statut.

Spécifications

Elles sont déterminées à partir des mesures prises pendant la calibration. Si la pipette ne satisfait pas aux spécifications requises, elle sera examinée sur place ou renvoyée au fabricant pour re-calibration ou remplacement. Lorsque la pipette ne satisfait aux spécifications elle devra aussi être étiquetée comme hors service. Les calculs de spécification sont repris ci-après.

Le poids de l'échantillon est transféré en volume par multiplication du facteur de conversion Z (ml/gr)

Cependant, pour des pipettes devant être calibrées avec un solvant compatible, c'est la densité qui sera utilisée; le poids sera divisé par cette densité (gr/ml). Il faut s'assurer d'utiliser la densité correcte basée sur la température du laboratoire. Une liste de facteurs Z est affichée dans le Tableau 5. La densité peut s'obtenir en consultant le CRC, Handbook of Chemistry and Physics.

$$\% \text{ Erreur (ou Exactitude)} = \frac{(\text{Volume Moyen} - \text{Volume Théorique}) \times 100}{\text{Volume Théorique}}$$

Précision = Déviation Standard = Répétabilité

$$\% \text{ CV (Coefficient de Variation)} = (\text{Déviation Standard}) / (\text{Volume Moyen}) \times 100$$

Les spécifications ou limites de calibration pour une pipette donnée, sont déterminées par son usage dans le laboratoire, dont il existe trois types: l'un est critique, le second non

TABLEAU 5
Facteurs Z pour la conversion des poids de l'échantillon en volumes

Température Eau (°C)	Facteur Z (ml/g)
15	1,002
15,5	1,002
16	1,0021
16,5	1,0022
17	1,0023
17,5	1,0024
18	1,0025
18,5	1,0026
19	1,0027
19,5	1,0028
20	1,0029
20,5	1,003
21	1,0031
21,5	1,0032
22	1,0033
22,5	1,0034
23	1,0035
23,5	1,0036
24	1,0037
24,5	1,0038
25	1,0039
25,5	1,004
26	1,0041
26,5	1,0042
27	1,0043
27,5	1,0044
28	1,0045
28,5	1,0046
29	1,0047

critique et le dernier ne requiert pas de calibration. Seul le gestionnaire possède le pouvoir de changer, les limites. Les limites suggérées pour l'usage critique ou non critique sont fournies ci-dessous.

- Critique: Exactitude: $\leq 2,0\%$
 Précision: $\leq 0,75\%$
- Non-Critique: Exactitude: $\leq 6\%$
 Précision: $\leq 2,5\%$

Dépannage

Des volumes inexacts peuvent apparaître si la procédure correcte de pipetage n'est pas suivie telle quelle. Les tubes ne s'ajustent pas exactement sur la pipette utilisée ou ils ne sont placés étroitement sur la pipette. Ces problèmes peuvent être identifiés en observant le placement du bras éjecteur du pipetteur. S'il interfère avec l'opération de la pipette, il existe une erreur. Un tube cassé ou détendu peut affecter le volume délivré. Tout problème du mécanisme interne de la pipette sera notifié à un technicien expérimenté. Le volume de l'échantillon peut également devenir inexact si ce dernier a giclé dans la pipette.

Évaluation des Pipettes

Doivent être stockées droites. Ne pas les laisser traîner sur la paillasse. Utiliser des filtres en cas de volumes importants ou corrosifs.

FONCTIONNEMENT DU PH MÈTRE

Résumé

La procédure standard de fonctionnement décrit la méthode utilisée pour calibrer et employer des PH mètres de laboratoire.

Portée

La procédure standard de fonctionnement s'applique à l'emploi général des PH mètres.

Réactifs

- Eau distillée
- Tampon PH 4.00 ± 0,01
- Tampon PH 7.00 ± 0,01
- Chlorure Potassium 3 M – poids 224 g KCl dans flacon volumétrique 1L compléter au volume avec eau désionisée.

Équipement

- PH mètre
- Electrode de combinaison
- Vase à bec (vase de Berlin)
- Plaque de mélange
- Baguettes de mélange
- Bouteille d'eau

Procédures

Calibration (quotidienne)

- Verser du tampon frais pH 4 et pH 7 dans de petits vases à bec (retenir les certificats de validation pour les tampons)
- Sur les pH mètre, tourner la mise en marche sur pH
- Rincer l'électrode avec de l'eau désionisée
- Placer l'électrode dans le tampon pH 7. Mélanger le tampon sur une plaque ou remuer manuellement.

- Si nécessaire, ajuster le pH à 7,00 en utilisant le poussoir de calibration.
- Retirer l'électrode du tampon pH 7.
- Rincer l'électrode avec l'eau désionisée.
- Placer l'électrode dans le tampon pH 4. Mélanger le tampon sur une plaque ou remuer manuellement.
- Si nécessaire, ajuster le pH à 4,00, en utilisant le bouton de température.
- Retirer l'électrode et rincer avec l'eau désionisée, garder celui-ci dans un vase à bec avec de l'eau désionisée pendant utilisation, ensuite stockée la solution 3M de KCl.
- Après usage, replacer la mise en route sur pause.
- Jeter le tampon utilisé.

Emploi

- Placer l'électrode dans la solution à mesurer. Celle-ci peut être mélangée si besoin.
- Une fois le pH stabilisé, enregistrer.
- Retirer l'électrode et rincer celle-ci avec de l'eau désionisée.
- Répéter pour chaque échantillon; entre ceux-ci, l'électrode sera gardé dans l'eau désionisée.
- Une fois terminer, les électrodes seront stockées dans la solution 3M KCl et la mise en route retournera sur pause.

FONCTIONNEMENT DU SPECTROPHOTOMÈTRE

Résumé

La spectrométrie est une technique mesurant la quantité d'énergie rayonnante qu'une substance peut absorber à diverses longueurs d'onde lumineuses. La longueur d'onde à laquelle survient le pic d'absorption est utile pour essayer d'identifier une substance inconnue. En mesurant le spectre d'absorption d'une substance, il est possible de l'identifier ou de la classer dans une catégorie de composés. La loi Beer-Lambert décrit la relation entre l'absorbance et la concentration du soluté avec la longueur du chemin lumineux. Dès lors, un graphe d'absorbance en fonction de la concentration produit une ligne droite. Et en créant une série de standards, il est possible de déterminer la quantité d'une substance dans un échantillon.

Portée

La procédure standard de fonctionnement s'applique à un spectrophotomètre de laboratoire basique qui mesure l'absorbance dans la gamme visible (280-760 nm). Les longueurs d'onde plus courtes (UV ou ultraviolet) ou plus larges (IR ou infrarouge) requièrent d'autres instruments.

Réactifs

Eau distillée

Équipement

- Spectrophotomètre
- Cuvettes
- Bouteille d'eau
- Linges de nettoyage (chiffons sans peluches)

Procédure

Afin de mesurer l'absorbance d'une substance particulière au sein d'un mélange réactif, il est d'abord nécessaire de remettre le spectrophotomètre à 0, de sorte que seule la substance d'intérêt soit mesurée. Cela s'effectue avec un blanc, à savoir une cuvette contenant tous les solvants porteurs à l'exception de la substance d'intérêt. *NOTE*: Un blanc séparé est nécessaire pour chaque mélange réactif.

Fonctionnement du Spectrophotomètre.

Mise en route

1. Allumer l'instrument et le laisser réchauffer pendant 5 - 10 minutes.
2. Installer la longueur d'onde en utilisant le bouton approprié.
3. Préparer une cuvette à blanc en ajoutant tous les solvants, à l'exception de la substance à mesurer.
4. En l'absence de tube d'échantillon dans le support, ajouter l'appareil pour lire l'absorbance à l'infini (0% transmission) en utilisant le contrôle approprié.
5. Nettoyer l'extérieur de la cuvette à blanc avec un chiffon sans peluches.
6. Soulever la porte du compartiment pour l'échantillon, placer la cuvette et fermer le couvercle. *NOTE*: Si cuvettes et tubes ne présentent pas de marques d'alignement, prendre un marqueur et inscrire une petite marque verticale au sommet de chaque cuvette afin d'obtenir un alignement correct dans le compartiment d'échantillonnage.
7. En utilisant le contrôle approprié, ajuster pour lire 0,00 absorbance (100% transmission). Ceci est connu également comme l'installation de l'échelle intégrale.

Mesure de l'absorbance ou de la transmission

8. Retirer le blanc et installer la cuvette contenant l'échantillon. Fermer le couvercle.
9. Lire l'absorbance ou la transmission appropriée pour l'échantillon.

NOTE: lorsqu'on prend plusieurs mesures à la même longueur d'ondes sur une courte période, il n'est pas nécessaire de faire un blanc pour chaque échantillon. Sur de longues périodes, l'unité peut dévier et un recalibrage sera nécessaire. Lors de changements de longueur d'onde, une remise à zéro est requise.

Le spectrophotomètre devra être calibré pour l'exactitude de la longueur d'onde à intervalles réguliers (généralement effectué par un ingénieur du service durant l'entretien de routine). Tous les enregistrements de ces calibrations seront gardés dans les archives de l'équipement.

EAU DE LABORATOIRE

Résumé

L'eau purifiée s'obtient par distillation, par traitement d'échange d'ions, par osmose réversible, ou autre traitement pertinent. La fiabilité de l'eau du laboratoire est contrôlée par les procédures de testage suivantes.

Portée

Toute l'eau utilisée par le laboratoire pour préparer des réactifs, laver la verrerie, ou qui entre en contact avec les échantillons.

Responsabilité

Les techniciens du laboratoire effectuent l'analyse de l'eau, en accord avec la PSF.

Le Directeur/gestionnaire du laboratoire s'assure que la PSF est suivie.

Le Gestionnaire de la qualité spécifie que les procédures employées sont appropriées.

Réactifs

1. Solution de testage de mercure alcalin et d'iodure de potassium. Dissoudre 10 gr d'iodure de potassium dans 10 ml d'eau, et ajouter lentement, en remuant, une solution saturée de chlorure de mercure jusqu'à ce qu'un léger précipité rouge demeure non dissous. A ce mélange, ajouter une solution glacée de 30 gr d'hydroxyde de potassium dans 60 ml d'eau, et enfin 1ml de plus de la solution saturée de chlorure de mercure. Diluer avec de l'eau jusqu'à 200 ml. Laisser le précipité se déposer et retirer le liquide clair.
2. Permanganate de Potassium, KMnO_4 (0.1 N) solution de testage. Diluer 100 ml d'une solution à 1 N avec de l'eau jusqu'à 1 litre.
3. Solution de testage au Nitrate d'argent, AgNO_3 (0.1 N).
4. Solution de testage à l'acide sulfurique, H_2SO_4 (2 N). Ajouter 56 ml concentré H_2SO_4 jusqu'à environ 500 ml d'eau dans un flacon de 1 L. Compléter au volume avec de l'eau.
5. Acide Nitrique, HNO_3 (70% w/v).
6. Solution de testage d'hydroxyde d'Ammonium NH_4OH (30 $\mu\text{g}/100$ ml). Prendre 0,1 ml NH_4OH et diluer au volume avec de l'eau dans un flacon volumétrique de 100 ml. Dans un vase de Berlin, ajouter 0,1 ml de la solution ci-dessus. Le vase à bec représente le contrôle pour NH_3 dans de l'eau à haute pureté.

Équipement

- Auto pipette 1 ml
- Auto pipette 5 ml
- Flacon doseur
- Plaque chauffante

Procédures

1. CHLORURE. À 100 ml d'eau de testage, ajouter 5 gouttes d'acide nitrique et 1 ml de nitrate d'argent. Aucun voile nuageux ne doit se produire. *NOTE:* Utiliser de l'eau chlorée du robinet comme contrôle.
2. CONDUCTIVITÉ. Utiliser la conductivité pour vérifier que l'échantillon d'eau à une résistivité supérieure à 16,6 Mégohm à 25 °C.
3. SUBSTANCES OXYDABLES. À 100 ml à tester, ajouter 10 ml d'acide sulfurique 2 N, et chauffer jusqu'à ébullition. Ajouter 0,1 ml de permanganate de Potassium 0,1 N et bouillir pendant 10 minutes. La couleur rose ne doit pas complètement disparaître.
4. AMMONIAQUE. Ajouter 2 ml de solution test d'iodure de potassium et de mercure alcalin à 100 ml d'eau à tester: Toute couleur jaune immédiatement produite ne doit pas être plus foncée que le contrôle contenant 30 μg de NH_3 dans 100 ml de haute pureté.

PROCÉDURES POUR LE NETTOYAGE DE LA VERRERIE DE LABORATOIRE

Résumé

Cette procédure standard de fonctionnement décrit les diverses méthodes utilisées pour nettoyer la verrerie de laboratoire. La verrerie cassée, ébréchée, fêlée ou fissurée sera mise sur le côté pour réparation par un souffleur à cet effet. L'attention portée aux procédures de nettoyage est déterminée par la sensibilité et l'exactitude des résultats requis. Différentes méthodes de nettoyage de la verrerie sont nécessaires pour plusieurs raisons. La verrerie employée pour la préparation de moyens microbiologiques doit être débarrassée de tout matériel bactériostatique ou bactéricide. Le matériel stérile jetable comme les boîtes de Pétri et les pipettes doivent posséder un certificat de stérilité du fabricant avant d'être utilisée dans le laboratoire. Dans certains cas, la verrerie doit être nettoyée en accord avec les normes de sensibilité de l'instrumentation utilisée dans l'analyse. Pour les analyses d'oligo-éléments, la verrerie doit être préalablement nettoyée à l'acide. Dans le cas d'analyse de mycotoxines, la verrerie doit être débarrassée de toute trace de toxine rémanente. Dès lors, il est nécessaire de disposer de plusieurs procédures uniques de nettoyage afin de satisfaire les différents besoins de chaque laboratoire et les analyses qu'il effectue.

Portée

La procédure standard de fonctionnement s'applique à toute la verrerie de laboratoire utilisée pendant la production de réactifs et/ou pour la préparation d'échantillons.

Responsabilité

Les Techniciens de laboratoire nettoient la verrerie selon les normes de la PSF.

Le Directeur/ Gestionnaire du laboratoire s'assurent que les procédures soient respectées.

Le Gestionnaire de la qualité spécifie si les procédures suivies sont appropriées.

Réactifs

- Détergent de laboratoire (DeSCAL, Contrad NF, Dri-CONTRAD ou similaire)
- Acide Nitrique, Grade Oligo-éléments
- Eau distillée / désionisée
- Eau de Javel

Équipement

- Lave-vaisselle pour verrerie
- Système de purification pour eau désionisée
- Four de séchage large capacité 75 °C
- Four de séchage large capacité 110 °C

Procédures

Mycotoxine/Biosécurité Verrerie

1. Utiliser de l'acétone pour effacer toute inscription sur la verrerie.
2. Rincer soigneusement avec l'eau du robinet, en s'assurant qu'il ne reste plus de particules sur la verrerie pouvant obstruer le lave-vaisselle.

3. Charger le lave-vaisselle de manière que chaque pièce soit lavée et rincée correctement.
4. Mettre la machine en route et la laisser tourner pendant environ 3 minutes. Ensuite la remplir d'eau et ajouter 350 ml de détergent (DRI-CONTRAD ou similaire).
5. Fermer la porte de la machine et presser «démarrer» sur le Tableau de contrôle.
6. Le cycle terminé, laisser la verrerie refroidir et placer celle-ci dans le four approprié.
7. La verrerie sera placée dans le four à 110 °C et le matériel plastique dans le four à 75 °C. La verrerie contenant des joints de caoutchouc (i.e. bouchons étanches) sera séchée à 75 °C.

Verrerie principale de laboratoire

1. Les objets trop grands pour être lavés efficacement dans la machine, seront plongés dans un bain à 10% de détergent (Contrat NF ou similaire).
2. Utiliser de l'acétone pour effacer toute inscription sur la verrerie.
3. Rincer soigneusement avec l'eau du robinet, en s'assurant qu'il ne reste plus de particules sur la verrerie pouvant obstruer le lave-vaisselle.
4. Charger le lave-vaisselle de manière à ce que chaque pièce soit lavée et rincée correctement.
5. Démarrer la machine.
6. Une fois le cycle de lavage terminé, laisser la verrerie refroidir et placer la dans le four approprié.
7. Verre dans le four à 110 °C, plastique dans le four à 75 °C. La verrerie contenant des joints de caoutchouc (i.e. bouchons étanches) sera séchée dans le four à 75 °C.

Verrerie pour Oligo-éléments

1. Les objets trop grands pour être lavés efficacement dans la machine, seront plongés dans un bain à 10% de détergent (DeSCAL ou similaire).
2. Utiliser de l'acétone pour effacer toute inscription sur la verrerie.
3. Rincer soigneusement avec l'eau du robinet, en s'assurant qu'il ne reste plus de particules sur la verrerie pouvant obstruer le lave-vaisselle.
4. Charger le lave-vaisselle de manière à ce que chaque pièce soit lavée et rincée correctement.
5. Démarrer la machine.
6. Fermer la porte de la machine et presser «démarrer» sur le tableau de contrôle.
7. Le cycle terminé, laisser la verrerie refroidir et placer celle-ci dans le four approprié.
8. La verrerie sera placée dans le four à 110 °C et le matériel plastique dans le four à 75 °C. La verrerie contenant des joints de caoutchouc (i.e. bouchons étanches) sera séchée à 75 °C.

Procédure de nettoyage utilisant des bains (Acide Nitrique à 10%)

Toute verrerie utilisée pour des méthodes minérales doit être nettoyée avec un bain de solution à 10% HNO₃. Seul de l'acide nitrique sans oligo-éléments sera utilisé pour préparer le bain d'acide. *NOTE DE SECURITE*: Revêtir un équipement de protection avant de travailler

avec le bain de solution à 10% HNO_3 qui comprendra: des gants de protection, un masque, un tablier ou blouse de laboratoire.

1. Utiliser de l'acétone pour effacer toute inscription sur la verrerie.
2. Rincer la verrerie aussi bien que possible pour éviter une contamination par le bain de solution à 10% HNO_3 .
3. S'assurer que la verrerie soit complètement immergée dans le bain et la laisser tremper pendant au moins 2 heures.
4. Retirer soigneusement la verrerie du bain en prenant soin de ne pas éclabousser la solution acide sur soi.
5. Rincer correctement avec de l'eau désionisée.
6. Placer la verrerie dans le four à 110 °C et le plastique dans celui à 75 °C. La verrerie contenant des joints de caoutchouc (i.e. bouchons étanches) sera séchée dans le four à 75 °C.

Bain détergent, 10% DeSCAL ou Contrat NF ou similaire.

Toute la verrerie trop grande pour être efficacement lavée dans le lave-vaisselle sera nettoyée dans un bain détergent. *NOTE DE SECURITÉ:* Il faut porter un équipement de protection pour travailler avec un bain de détergent à 10%, à savoir gants de protection, et tablier ou blouse de laboratoire.

1. Utiliser de l'acétone pour effacer toute inscription sur la verrerie.
2. Rincer la verrerie aussi bien que possible pour éviter toute contamination par le bain détergent.
3. S'assurer que la verrerie soit complètement immergée dans le bain et laisser tremper pendant au moins 2 heures.
4. Retirer soigneusement la verrerie du bain, en prenant soin de ne pas éclabousser de solution sur soi.
5. Rincer soigneusement avec l'eau du robinet, suivi par de l'eau désionisée.
6. Placer le verre dans le four à 110 °C et le plastique dans celui à 75 °C. Le verre présentant des joints de caoutchouc (i.e. bouchons étanches) sera séché à 75 °C.

Nettoyage des pipettes en verres

Les bains pour pipettes sont préparés avec une solution de détergent à 10% (DeSCAL ou similaire). Pour préparer une solution fraîche, verser 13,5 L d'eau dans le bain et ajouter 1,5 L de détergent.

1. S'assurer que la verrerie est totalement immergée dans le bain et laisser tremper au moins 2 heures.
2. Retirer soigneusement la verrerie du bain, en prenant soin de ne pas éclabousser la station sur soi.
3. Rincer les pipettes au moins trois fois avec de l'eau désionisée au moyen du laveur de pipettes.
4. Placer les pipettes dans le four à 110 °C pour les sécher.

Procédures spéciales de nettoyage

Creusets Gooch en verre fritté (employer pour certaines méthodes gravimétriques):

1. Rincer avec l'eau du robinet.

2. Laisser tremper dans une solution 1/7 d'hydroxyde d'ammonium pendant 2 heures au moins.
3. Attacher les creusets Gooch à une barre d'aspiration.
4. Rincer trois fois avec de l'eau distillée.
5. Sécher à l'air à température ambiante.

Flacon Volumétrique. Prendre soin de ne pas utiliser une chaleur excessive car elle peut invalider le volume calibré. Des contrôles seront effectués avec de l'eau pesée si une chaleur trop élevée a été utilisée.

SÉCURITÉ DU LABORATOIRE

Résumé

Comme employé, vous avez la responsabilité d'effectuer votre travail correctement et en sécurité. Une priorité du laboratoire est de vous offrir une place de travail indemne de risques évitables pour votre santé et votre sécurité.

La sécurité, cependant ne peut être obligatoire et ne représente pas un élément pouvant être garantie à l'employé. Vous devez plutôt accomplir un effort conscient pour aider à assurer des conditions de sécurité pour vous-même et autres travailleurs dans la zone. Ceci requiert une bonne compréhension des risques potentiels du travail et une connaissance des règles et règlements relatifs à ces risques.

Dans tout environnement de travail, il existe des risques inévitables. Pour enregistrer les risques des causes des blessures, chacun doit savoir comment manipuler prudemment les outils et l'équipement et être informé de ce qu'il faut faire lors d'un feu, d'une blessure, ou d'autre urgence. Toutefois, ce n'est pas suffisant. La sécurité au travail est autant une attitude qu'un savoir.

Cela signifie:

- Reconnaître que les accidents ne se limitent pas aux personnes qui ne savent pas comment les prévenir. Souvent, la victime est un vétéran chevronné, la personne «qui sait mieux» car il laisse émusser sa circonspection.
- Maintenir une attention constante. Cela implique votre équipement personnel à effectuer tout travail prudemment.
- Avertir les autres travailleurs de tout danger lorsqu'ils ne suivent pas les procédures de sécurité.
- Notifier immédiatement le superviseur de toute défectuosité dans l'équipement d'urgence au d'autres dangers potentiels.
- Participer aux comités de sécurité, assister dans des inspections de mise en place sécuritaire, et s'assurer que toutes les pratiques de sécurité sont exécutés en permanence.

La sécurité est une part essentielle de tout travail que vous effectuez, mais il n'existe pas de travail tellement important que ne pas lui accorder le temps nécessaire pour le faire prudemment et correctement!

Portée

Toutes les zones du laboratoire, y compris l'aire de réception et de stockage des échantillons, et les laboratoires d'analyses.

Procédures – Règles générales de sécurité

- On ne mange ni ne boit dans le laboratoire. Il n'est pas autorisé de stocker de la nourriture dans un réfrigérateur du laboratoire, et les machines à faire de la glace ne sont pas à utiliser pour la nourriture et les boissons.
- Les portes du laboratoire doivent rester fermées afin de se conformer aux règles de prévention d'incendie, et d'améliorer le bilan de l'air à l'intérieur du local.
- Il n'est pas permis de fumer.
- Les visiteurs non officiels ne seront pas encouragés à venir au laboratoire. Tout visiteur doit être enregistré à la réception, porter un équipement personnel de protection et être accompagné par un employé pendant la durée de la visite.
- En pénétrant dans le laboratoire, tout visiteur sera prié de porter son équipement personnel de protection (des verres de protection si ses propres lunettes ne sont pas appropriées). En cas de refus, il sera prié poliment de partir, en expliquant que le laboratoire ne peut courir le risque d'une blessure.
- Les enfants en dessous de l'âge légal de travail, ne sont pas autorisés dans le laboratoire, sans l'accord préalable du Gestionnaire ou du Directeur.
- L'aire de travail sera maintenue propre et ordonnée.
- Tout personnel doit être conscient des risques liés à la manipulation de toute substance chimique, à toute tâche ou à toute procédure qu'il est requis de réaliser. Il est de la responsabilité de chacun de s'informer correctement et complètement de toutes solutions et produits chimiques utilisés dans une zone et des risques associés.
- Avant de quitter une zone assignée de travail du laboratoire pour une raison quelconque, il convient de s'assurer de ne créer aucun risque en laissant sans surveillance un équipement/procédure.
- Ne jamais effectuer des procédures à risques en l'absence d'une autre personne présente dans le bâtiment. Consulter le superviseur en cas de doute sur une procédure à risques.
- Informer le personnel approprié et le superviseur dans la zone de travail si des conditions de risque inhabituelles peuvent survenir.
- Afficher des signes d'avertissement dans les zones à risques inhabituelles.
- Mémoriser les emplacements des extincteurs, des douches, des bains oculaires, des nécessaires pour éclaboussures et des nécessaires de première urgence, ainsi que de leur fonctionnement particulier, de sorte qu'ils puissent être utilisés rapidement et efficacement en cas d'urgence.
- Vérifier les douches régulièrement pour leur fonctionnement et leur hygiène.
- Le travail isolé sera évité.

Contactez le superviseur si:

- Il n'existe pas de règles spécifiques pour la manipulation sans risques d'un produit chimique ou pour une procédure, ou si une règle ne semble pas adaptée à un cas spécifique. Consulter le superviseur ou un agent de sécurité avant de procéder.
- Si un doute subsiste sur les précautions correctes à prendre ou en cas d'incompréhension des directives ou sur l'équipement. Se souvenir que c'est de votre santé, de votre sécurité et de celles de vos collègues qu'il s'agit en priorité.

- Avant d'effectuer une procédure pour la première fois, lire soigneusement les instructions et, les discuter avec le superviseur. Ceci évitera toute confusion sur l'exécution prudente de la procédure.
- Seul le personnel complètement formé (avec fichier de formation à jour) est habilité à former les collègues sur l'emploi d'équipement critique

Comment employer un extincteur dans votre laboratoire

Si, un petit feu s'allume, que vous vous sentez capable de maîtriser, suivre la procédure suivante pour le contrôler:

1. Prévenir le personnel de l'existence d'un feu.
2. Localiser l'extincteur le plus proche adapté au type de feu.*
3. Enlever la broche de sécurité du support (casser l'étiquette plastique qui rattache la broche à l'extincteur).
4. Diriger l'embout de l'extincteur à la base de la flamme, puis presser le bras de relâchement.
5. Utiliser l'appareil de cette façon jusqu'à extinction de la flamme, en balayant la zone afin de la couvrir entièrement.
6. S'assurer que le feu soit éteint, et écarté de la zone, et le notifier au superviseur.
7. S'assurer que l'extincteur soit rechargé après chaque utilisation, en le notifiant au Département de Santé de l'environnement et de la Sécurité.

* Ne pas utiliser un extincteur à eau ou à mousse sur un équipement électrique.

Ne pas utiliser un extincteur à base d'eau sur de l'huile ou des solvants.

Les extincteurs CO₂ peuvent être utilisés sur la plupart des types de feux.

SI UN FEU DE GRANDES AMPLEUR SE DÉCLARE, NE PAS ESSAYER DE LE MAÎTRISER SOI-MÊME, MAIS ACTIVER L'ALARME, APPELER LES POMPIERS ET SUIVRE LES PROCÉDURES D'ÉVACUATION

Procédures – Règles de protection pour le personnel

- Une protection appropriée des yeux doit être portée en permanence dans l'enceinte du laboratoire, dans les salles de préparation et les corridors. Elle consistera au moins en verres de vue ou verres de sécurité, qui, pour certaines procédures, protègent insuffisamment. Des masques de laboratoire et/ou des écrans faciaux seront portés lors de manipulation à proximité des procédures suivantes:
 1. Traitement des déchets et nettoyage.
 2. Travail avec des bains acides et nettoyage de la verrerie contenant des substances à risques.
 3. Digestions à l'acide perchlorique.
- Les seules exceptions au port de verres de sécurité sont les examens au microscope, l'installation des réactions PCR, ou le changement des gels d'agarose.
- Le port de blouses de laboratoire est obligatoire dans la plupart des laboratoires.
- Le port de bouchons et de protection d'oreilles est nécessaire dans tout local avec un niveau élevé de bruit.

- Enfiler des gants de protection appropriés lorsque le risque pour la santé est supérieur à 2. Ce risque est identique dans la section bleue du diamant NFPA. Se laver les mains après avoir retiré les gants de protection.
- Les cheveux longs ne seront pas autorisés, lorsqu'on travaille avec des substances chimiques ou un appareil mécanique. Ils seront attachés en arrière en permanence.
- Les sandales ouvertes ou les chaussures libérant les orteils ne peuvent être portés par le personnel du laboratoire ou de préparation des échantillons pendant leur travail.
- Les directives pour des risques chimiques spécifiques peuvent être consultées dans la section CAS SPÉCIAUX de ce manuel.
- Enlever les gants pour toucher les poignées de porte, les téléphones, les interrupteurs, et pour éviter la contamination.

Procédure – Produits chimiques

Entreposage

- Stocker acides et bases dans des endroits séparés, près du niveau du plancher, et dans des meubles étiquetés.
- Isoler l'acide perchlorique des matières organiques et de l'acide sulfurique. Ne pas stocker l'acide perchlorique sur une étagère en bois.
- Séparer les produits chimiques hautement toxiques et cancérigènes des autres substances.
- Ne pas stocker les substances formant du peroxyde (ex. éthyle éther, dioxine) plus de 12 mois ou au-delà de la date recommandée par le fabricant.
- Réfrigérer les substances inflammables dans un réfrigérateur à l'épreuve des étincelles/explosions.
- Les récipients de verre chimiques ne seront jamais entreposés sur le sol.
- S'assurer qu'un plateau de récupération se trouve en dessous des bouteilles en cas d'éclaboussures.

Retourner les produits chimiques, les fournitures, et l'équipement associé à leur place propre après usage.

Si un container doit être utilisé pour des déchets, il faut enlever, couvrir ou déchirer l'étiquette originale. Ensuite, identifiez-le clairement avec un marqueur ou une étiquette afin que son contenu soit évident. Lorsqu'une bouteille pour produit chimique est vide, il faut également enlever ou déchirer l'étiquette.

Mettre à la terre tout récipient en métal avant transfert d'un solvant quelconque. Les bouteilles contenant des produits chimiques seront sécurisées lors de transport entre laboratoires. Ne jamais verser de solvants toxiques, insolubles dans l'eau ou inflammables dans des éviers.

Pour éliminer des containers contenant de l'éthyle éther, verser au préalable du sulfate de fer afin d'éliminer tout risque d'explosion due à la formation de peroxydes.

Lors du mélange de solution, ajouter TOUJOURS les liquides concentrés au liquide diluant. Ajouter TOUJOURS l'acide à l'eau.

Les matières organiques ne seront pas évaporées sous la hotte. Utiliser une poubelle pour les éliminer. Les containers pour déchets organiques seront couverts lorsqu'ils ne sont pas utilisés.

Risques chimiques communs de laboratoire

Les feuilles de données de sécurité pour le matériel doivent être facilement récupérables pour toutes les substances chimiques entreposées dans le laboratoire.

Acide acétique. Dangereux si en contact avec l'acide chromique, le peroxyde de sodium et l'acide nitrique; sera stocké à distance des matériaux oxydables.

Acétone. Liquide volatile. Fournit des vapeurs qui, en contact avec de l'air, forment des mélanges inflammables et explosifs: ne pas mélanger au chloroforme.

Ammoniaque (anhydre). Irritant, liquide et gaz extrêmement caustiques, réagissant violemment avec des agents fortement oxydants. A isoler d'autres produits chimiques, particulièrement chlorure et acides forts.

Éthyle éther. Liquide lentement volatile, spontanément explosif. Des peroxydes se forment parfois en position debout. A isoler et garder à distance de toute source de feu.

Formaldéhyde. L'exposition à de hautes concentrations peut provoquer une irritation de la peau et l'inflammation des membranes muqueuses, des yeux et du tractus respiratoire.

Acide formique. La solution aqueuse est corrosive et irritante. Inflammable, peut former des mélanges explosifs au contact de l'air.

Acide chlorhydrique. La solution aqueuse est corrosive et irritante. Produit des fumées corrosives et irritantes pour les membranes muqueuses. L'hydrogène est libéré au contact des métaux. Laisser à distance des agents oxydants

Acide hydrocyanique. Poison, l'inhalation peut causer une perte de conscience et la mort. Eviter le contact avec la peau: forme des mélanges explosifs avec l'air. Laisser à distance de toute source de chaleur.

Acide fluorhydrique. Acide et vapeur hautement toxiques, irritants pour la peau, les yeux, et le tractus respiratoire. Réagit avec le verre: à isoler et ventiler pendant le stockage.

Peroxyde d'hydrogène. Une exposition prolongée à la vapeur est irritante pour les yeux et les poumons. Cause une irritation de la peau. Peut violemment se décomposer par contamination avec le cuivre, le fer, ou le chrome; stocker dans un local frais à distance de matériaux combustibles.

Méthanol. Inflammable et toxique. Eviter le contact avec les yeux et de respirer les vapeurs.

Acide nitrique. Corrosif, cause des brûlures sévères si contact avec la peau, réagit hautement avec l'aniline, l'hydrogène sulfuré, les solvants inflammables, l'hydrazine et les poudres de métaux.

Acide oxalique. Forme un composé explosif avec l'argent et le mercure. Les oxalates sont toxiques. Eviter les contacts avec la peau.

Cyanure de potassium. Hautement toxique après ingestion. Libère de l'acide hydrocyanique au contact d'acides ou de l'humidité sous forme de gaz.

Hydroxyde de potassium. Génère de la chaleur au contact de l'eau; à stocker au sec.

Acide salicylique. Combustible solide; à stocker au sec.

Hydroxyde de sodium. Même classe que l'hydroxyde de potassium; à isoler de la chaleur et de l'eau. Au contact de celle-ci, produit un excès de chaleur et des gaz irritants.

Acide sulfurique. Corrosif, fumées dangereuses en cas de feu. Peut s'enflammer au contact de matériaux combustibles, corrode le métal. Isoler des matériaux combustibles. Toujours ajouter l'acide à l'eau et non le contraire.

Autres réactifs spéciaux

Éthers. Extrêmement volatiles et inflammables: les vapeurs sont plus denses que l'air ce qui peut résulter en retour de flammes peuvent former des peroxydes explosifs à l'exposition à l'air et à la lumière: stocker dans une pièce bien ventilée; ne pas entreposer dans un réfrigérateur, sauf s'il s'agit d'un type à l'épreuve des explosions.

Acide perchlorique. Réagit violemment avec des matières organiques, un usage prudent requiert une hotte spéciale à fumée avec un système de lavage à l'eau; doit être stocké de manière à éviter le contact avec des matières organiques (ex. bois).

Procédures-Éclaboussures chimiques. Le confinement et le nettoyage des éclaboussures est d'importance critique. Un confinement ou un nettoyage incorrect peuvent empirer la situation. Cette section fournit quelques directives spécifiques pour confiner et nettoyer les éclaboussures.

Il existe six classes de risques associés aux éclaboussures, mais plusieurs d'entre elles peuvent être traitées de la même façon. Les classes générales de risques sont:

Inflammables/Organiques	Réactifs à l'air ou l'eau
Acides	Toxiques
Bases	Biologiques

Ces classes peuvent contenir à la fois des solides et des liquides.

Confinement

S'assurer que le nécessaire de protection contre les éclaboussures de mercure et d'acides sont disponibles et en état d'utilisation.

Simplement énoncé, le confinement consiste à prévenir une éclaboussure d'accroître sa taille et ses effets (propagation). Dépendant de la localisation de l'éclaboussure et des produits chimiques concernés, le confinement peut être aussi simple que refermer une porte (afin de restreindre l'accès et prévenir la production de poussière), ou nécessiter l'emploi de digues, de bondes pour tuyaux, et autres appareils. Le confinement représente la première étape de nettoyage de l'éclaboussure et empêche l'éclaboussure de se propager alors que les premiers secours soignent les blessures et mettent le personnel à l'abri. Avant de s'attaquer à toute éclaboussure, toujours revêtir sa propre protection personnelle. Préparez-vous et protégez-vous du pire scénario possible.

Les souillures chimiques solides sont généralement auto-confinées. Prenez les mesures pour qu'elles ne se répandent pas ou ne génèrent pas de poussières. Restreignez le trafic autour du site et interdisez toute activité de balayage/épongeage dans la zone souillée jusqu'à nettoyage complet de celle-ci.

Les éclaboussures chimiques liquides requièrent un endiguement pour éviter de se répandre. Si possible, il est préférable de contenir les éclaboussures liquides au centre de la pièce. Ceci est particulièrement vrai pour les acides et matières organiques, qui se propagent aisément en-dessous ou à travers les plinthes, les meubles et les placards, et ainsi aggravent sérieusement le problème. Une digue d'encercllement peut être aménagée en utilisant différents matériaux: des serpillères longues et absorbantes, des coussins, du sable, une litière d'argile ou de la vermiculite, tout ce qui pourra empêcher le liquide de se répandre ET qui ne réagit pas avec le liquide éclaboussé. Des paillassons de drainage sont nécessaires pour empêcher les éclaboussures de se propager dans la tuyauterie, les égouts et les canalisations, si un drain existe dans le site de souillure.

Faites preuve de bon sens en empêchant la propagation des éclaboussures: par exemple, tout plancher a un sens d'inclinaison, et c'est de ce côté, que les liquides vont se propager. Au cas où les liquides passent par-dessus les digues, les drains seront prioritairement bloqués. Un confinement correct contribuera à un nettoyage beaucoup plus aisé. Dans certains cas, il pourra être nécessaire d'endiguer et de confiner les éclaboussures en attendant que l'équipe en charge qui aura été appelée, prévoio la relève.

Assurez-vous toujours d'abord de la sécurité du personnel, évacuez la zone et prenez garde aux fumées.

Nettoyage

Le nettoyage d'éclaboussures suivra habituellement les directives générales précisées ci-dessous. Des procédures inhabituelles requerront vraisemblablement la présence de l'équipe spécialisée pour répondre aux débordements. Pour tout incident, l'utilisation d'une équipe correcte de protection et de nettoyage est nécessaire pour nettoyer les éclaboussures de manière efficace et prudente.

Référence sera faite aux évaluations des risques locaux: éclaboussures de solutions chimiques solides sous forme sèche, cristalline, poudreuse:

1. En utilisant un balai et un ramasse- poussière en plastique, ramasser le produit répandu autant que possible. Prendre soin d'utiliser le balai comme un arrêt pour permettre à la ramassette de récolter le produit et non comme un balai pour pousser le produit sur la ramassette, car cela produit de la poussière au cours du nettoyage. Si nécessaire, pulvériser un film d'eau pour éliminer la poussière, mais SEULEMENT s'il est prudent de faire ainsi.
2. Éliminer le produit chimique répandu et tous les objets employés pour le ramasser, dans un sac à cet effet. Fermer le avec un lien et attacher une marque d'identification d'élimination.

Éclaboussures chimiques liquides (y compris organiques/inflammables, acides et bases):

1. Après confinement (décrit antérieurement) commencer à installer des coussins à l'intérieur des digues, en travaillant en direction du centre de la zone. Replacer les coussins une fois imbibés. N'ESSAYEZ PAS de neutraliser les éclaboussures chimiques (ou les coussins d'épongeage) s'il s'agit de souillures acides ou basiques, car cela peut causer des problèmes plus graves (par production de gaz toxique ou génération de chaleur de réaction inutile).
2. Utiliser la ventilation extractive d'urgence pendant le nettoyage afin de chasser les vapeurs accumulées. S'assurer que les hottes à fumée soient complètement ouvertes.
3. Après déplacement du liquide éclaboussé, enlever toutes traces de produit chimique dans la zone de débordement. Pour les éclaboussures acides ou basiques, neutraliser le pH, soit avec une solution vinaigrée (pour les bases) ou une solution de bicarbonate de soude (pour les acides). Contrôler le pH après épongeage avec un papier tournesol (si disponible); le pH de la zone doit être neutre (pH 5-9).
4. ATTENTION: Si l'éclaboussure concerne une solution contenant des métaux lourds (cadmium, arsenic, sélénium, plomb et mercure), l'eau de nettoyage doit être collectée et éliminée en conséquence.

5. Pour une éclaboussure de solvant organique/inflammable, rincer la zone avec de l'eau savonneuse, et éponger avec des coussins appropriés. Selon les substances chimiques, l'accès à la zone de débordement devra être fermée jusqu'à évaporation des résidus.
6. Éliminer les coussins d'épongeage, et tous les objets utilisés pour le nettoyage, dans un sac à cet effet. Fermer avec un lien, et attacher une marque d'identification.

Les types chimiques suivants sont classifiés comme *cas spéciaux*. La manipulation d'éclaboussures impliquant les produits suivants requièrent l'emploi d'une protection personnelle spéciale, d'équipements/matériels et/ou de techniques spéciales de nettoyage. Le nettoyage de ces éclaboussures (à l'exception de souillures biologiques) devra être notifiée au fonctionnaire de sécurité, à la fois pour obtenir son avis ou pour consultation sur votre réponse personnelle.

Le mercure et ses composés présentent un grand potentiel de danger pour la santé et l'environnement car ils forment aisément des vapeurs et sont facilement absorbés par la peau. Des éclaboussures petites et confinées peuvent être manipulées avec des nécessaires spéciaux de nettoyage pour le mercure disponibles dans le commerce. Des quantités plus grandes ou non confinées (comprenant celles de produits standard pur), ou le mercure trouvé dans les bondes de vidange des éviers, doivent être nettoyées par EHSD. La poussière de souffre ne doit pas être utilisée pour nettoyer les éclaboussures de mercure, car même si elle capture correctement le mercure, elle va contrarier les efforts pour restaurer le site souillé à son occupation/activité normale.

Les solvants organiques chlorés présentent des dangers similaires à ceux répertoriés ci-dessus pour les mêmes raisons: ils dégagent facilement des vapeurs et sont facilement absorbés par la peau. Le chloroforme représente le produit le plus commun de cette classe, affectant à la fois le système respiratoire et le système nerveux, avec une perte de conscience après inhalation importante de ses vapeurs. Un soin particulier sera pris lors de l'approche et de la manipulation d'une éclaboussure impliquant ce produit.

Sulfure de Carbone et Hydroxyde d'Ammoniaque dégagent des vapeurs qui se propagent aisément dans les zones avoisinantes et empêchent leur occupation/activité normales. Ces composés sont connus pour les troubles respiratoires et/ou optiques sévères qu'ils occasionnent. Les personnes exposées à des concentrations significatives de ces vapeurs requièrent une attention médicale rapide. Une souillure impliquant l'un de ces produits nécessite une protection personnelle spéciale ainsi qu'une manipulation pour un résultat, confinement et nettoyage de sécurité.

Le sulfure de carbone est extrêmement inflammable, de sorte que l'élimination de toute étincelle ou de flamme est absolument prioritaire. Son point d'ébullition bas (46 °C) demande un temps de réaction très rapide. La protection personnelle doit inclure l'entièreté du visage (les vapeurs entraînent une irritation oculaire) et le matériel de nettoyage ne doit pas contenir de métaux. Les personnes exposées au sulfure de carbone requièrent une attention médicale immédiate, car une inhalation prolongée des vapeurs peuvent causer des dommages à la fois au système nerveux central et périphérique, ainsi qu'au foie et aux reins.

Même s'il n'est pas repris dans la liste *substances chimiques* à risque, l'**hydroxyde d'ammoniaque** est une base très puissante et très nocive qui peut inonder un masque à gaz si son volume dépasse 1 litre. Il cause des brûlures sévères aux muqueuses nasales et

respiratoire et, en cas d'exposition prolongée peut entraîner un collapsus respiratoire. Un équipement respiratoire sera utilisé pour confiner et nettoyer des éclaboussures supérieures à une bouteille de 4 litres.

Éclaboussures biologiques. Il en existe trois types. La première provient d'un épanchement sanguin provenant d'une sévère blessure survenue sur le site de travail. La seconde d'un sac pour autoclave lacéré laissant ruisseler des déchets (avant autoclavage). La troisième implique des éclaboussures ayant comme source des suspensions bactériennes. Chacun de ces trois scénarios est potentiellement dangereux mais géré de manière identique: portant un équipement personnel de protection, essuyer proprement la zone, et poursuivre avec une solution d'hypochlorite de sodium (5%) ou eau de javel (10%). Ceci détruira les agents à risques biologiques qui pourraient se propager à partir du site souillé. Prenez un soin extrême quand vous traitez avec des projections de sang et considérez-les comme potentiellement porteuses d'HIV ou positives pour l'hépatite.

Mycotoxines. Tous les échantillons et standards manipulés dans le laboratoire pour mycotoxines sont hautement cancérigènes, avec comme cible le foie, le cerveau et le système nerveux central. Tous comportent des risques par inhalation et ingestion. Des gants doivent être portés chaque fois que des échantillons de mycotoxines sont manipulés. Chaque projection de mycotoxines nécessite des étapes de nettoyage spéciales et une attention particulière à la sécurité personnelle. Le site souillé doit être décontaminé avec une solution d'hypochlorite de sodium (5%) ou d'eau de javel (10%) pendant 30 minutes puis nettoyée à nouveau avec de l'acétone. Pressez le bouton de ventilation d'urgence et évacuez le local jusqu'à ce que toutes les fumées se soient évacuées.

PROCÉDURES GÉNÉRALES – EMPLOI CORRECT DE L'ÉQUIPEMENT DE LABORATOIRE

1. Autoclaves
2. Électrophorèse
3. Sécurité Microbiologique BSL2 (Niveau de confinement 2)
4. Sécurité Mycotoxine BSL2 (Niveau de confinement 2)
5. Vide/pression
6. Équipement électrique
7. Levage
8. Liquides inflammables
9. Cylindre à gaz
10. Verrerie
11. Instruments tranchants
12. Hotte à fumée
13. Précautions spéciales pour hottes perchloriques

1. Autoclaves

- Les autoclaves fonctionnent sous pression de vapeur de 18-20 psi (0.12-0.14 MPa). Les températures sont de 121 °C) ou plus. Même s'il est déjà familiarisé avec l'usage de cet équipement, le nouveau personnel demandera une assistance pour les procédures de fonctionnement, d'emballage, de changement et d'étiquetage avant emploi.

- Pour que le procédé soit efficace pour la stérilisation, une température et un temps suffisant, ainsi qu'un contact direct avec la vapeur sont essentiels. L'air doit être complètement retiré de la chambre de stérilisation de tout matériel pour permettre la pénétration de la vapeur afin que le matériel à autoclaves soit à la température de traitement pendant un temps suffisant pour réaliser la stérilisation.
- Les pressions de la gaine vont demeurer à 18-20 psi (0.12-0.14 MPa) et 121 °C. La pression de la chambre atteindra 18-20 psi (0.12-0.14 MPa) et 121 °C pendant la stérilisation.
- Les liquides super chauffés sont fréquemment portés à ébullition lorsqu'ils sont légèrement remués et peuvent causer des brûlures. Toujours porter la protection recommandée pour manipuler des matériels chauds.
- Utiliser le cycle approprié (dense ou liquide) pendant le temps nécessaire à l'autoclave de l'objet.
- En cas de doute sur l'emploi de l'équipement, demander au superviseur.

Conditionnement

- Utiliser des emballages étiquetés «Risques biologiques» pour des déchets microbiens.
- Ne pas fermer trop fort les récipients ou sacs.
- Ne pas mettre d'objets acérés, comme des débris de verre dans un sac pour autoclave.
- Il faut placer un morceau de bande pour autoclave (change de couleur après autoclavage à 121 °C) sur tout objet à autoclaver ou inclure un indicateur fiable (ex. Tube de Browne) afin de s'assurer que la température ciblée a été atteinte.

Changement

- Placer les récipients qui peuvent déborder ou ruisseler (plaques d'agar, etc...)
- Ne jamais placer des objets en contact direct avec le bas de l'autoclave.
- Ne jamais surcharger; laisser suffisamment d'espace pour une circulation correcte de la vapeur.
- S'assurer que la protection de la prise de courant dans le bas de l'autoclave soit propre.

Documentation

- Documenter le traitement de chaque chargement de déchet autoclave avec la date du traitement, la quantité de déchets traitée, la méthode de traitement, la date et les initiales.

2. Électrophorèse

L'équipement d'électrophorèse peut représenter une source majeure de risqué électrique au sein d'un laboratoire. La présence simultanée d'un voltage élevé et de fluide conducteur présente une combinaison potentiellement létale.

Beaucoup de personnes sont inconscientes des risques associés à cet appareil; même une électrophorèse standard fonctionnant à 100 volts peut libérer une décharge létale de 25 milliampères. De plus, une fuite même légère dans l'appareil peut provoquer un choc sérieux.

Il faut se protéger des risques d'électrophorèse et des décharges électriques en prenant les précautions suivantes:

- Installer des barrières physiques pour se prémunir des contacts par inadvertance avec l'appareil.
- Utiliser des prises de courant encastrées.
- Vérifier fréquemment l'intégrité de l'équipement d'électrophorèse.
- Utiliser des signes d'avertissement pour alerter les collègues des fils conducteurs électriques.
- Utiliser seulement des connecteurs de fils isolés.
- Fermer le courant avant de connecter les fils conducteurs.
- Connecter un fil à la fois en utilisant une seule main.
- Assurez-vous que vos mains soient sèches quand vous connectez les fils.
- Garder l'appareil à distance de l'eau et des sources d'eau.
- Coupez le courant avant d'ouvrir le couvercle ou de toucher la chambre.
- Ne pas endommager les moyens de sécurité.
- Suivre les instructions de fonctionnement de l'équipement.

3. Sécurité Microbiologique BSL2 (Confinement niveau 2)

- L'accès au laboratoire de microbiologie est strictement limité au personnel qui y travaille.
Le superviseur doit s'assurer que le personnel travaillant dans le laboratoire BSL2 reçoive la formation appropriée à ses tâches, les précautions nécessaires pour prévenir les expositions, et les procédures pour l'évaluation des expositions. La formation doit être documentée dans le dossier individuel ad hoc.
- Les personnes présentant un risque accru d'infection (immunité déficiente) ou pour lesquelles une infection peut entraîner des conséquences sérieuses (cf. les femmes enceintes) peuvent ne pas avoir accès au laboratoire de microbiologie ou y voir leur travail restreint. Le directeur du laboratoire dispose de la responsabilité finale pour évaluer chaque circonstance et déterminer qui peut y entrer et/ou y travailler.
- Le personnel du laboratoire recevra les immunisations appropriées ou sera testé pour les agents manipulés ou potentiellement présents.
- Si approprié, en fonction des agents manipulés, un échantillon basique de sérum sera récolté et entreposé pour le personnel du laboratoire de microbiologie et autre staff à risque.
- Le personnel doit recevoir annuellement une formation de sécurité spécifique.
- Il doit recevoir une formation complémentaire lorsque surviennent des changements de procédure ou de politique.
- L'état de santé individuel peut intervenir sur la susceptibilité à l'infection, l'aptitude à recevoir des immunisations ou des interventions prophylactiques. Dès lors, tout le personnel de laboratoire et particulièrement les femmes en âge de procréer seront informés de leurs capacités immunitaires et des conditions prédisposantes à une infection. Les personnes présentant de telles conditions seront encouragées à contacter le conseiller sanitaire pour conseil et instructions appropriés.
- Procédure à l'entrée:
 - Porter une blouse de laboratoire propre en pénétrant dans le laboratoire ou en enfiler une immédiatement.

- Porter des gants de protection avant de manipuler des matériaux potentiellement infectieux.
- Les personnes non répertoriées sur la liste du staff autorisé, présents à l'intérieur du laboratoire ne peuvent être admis que par le Directeur ou le Superviseur du laboratoire de Microbiologie et doivent être accompagnés en permanence par un membre habilité.
- Effectuer toutes les procédures avec précaution afin de minimiser la création d'éclaboussures ou d'aérosols.
- Décontaminer toutes les surfaces de travail après achèvement d'une opération ou en fin de journée et après toute souillure ou éclaboussure de matériel viable avec des désinfectants efficaces contre les agents concernés.
- Un grand degré de précaution sera toujours observé avec tout objet acéré contaminé, incluant aiguilles, seringues, lames, tubes capillaires et scalpels.
- Chaque fois que c'est possible, substituer le plastique au verre.
- Pour injection et aspiration de matériaux infectieux, utiliser des seringues autobloquantes ou jetables.
- Les aiguilles jetables ne doivent pas être pliées, cisailées, cassées, recapuchonnées, enlevées de seringues jetables ou manipulées avant d'être jetées; elles seront plutôt placées prudemment dans des récipients résistants aux piqûres, autoclavables utilisés pour l'élimination des objets acérés et situés à des emplacements commodes.
- Le verre brisé ne doit pas être directement manipulé, mais déplacé avec des moyens mécaniques comme une brosse et une ramassette, des pinces ou des péans. Les récipients contenant des aiguilles contaminées des équipements acérés et du verre brisé seront décontaminés avant jetage, suivant les règles locales en vigueur.
- Les cultures, tissus, spécimens de liquide corporels, ou déchets potentiellement infectieux sont placés dans un récipient avec couvercle afin de prévenir les écoulements pendant la collecte, la manipulation, la transformation, le transport ou le convoyage.
- L'équipement contaminé doit subir une décontamination en accord avec les règles applicables avant de l'envoyer pour réparation ou entretien, ou de l'emballer pour transport. La décontamination sera documentée.
- Notifier immédiatement toute souillure ou tout incident pouvant résulter d'une exposition manifeste à des matériaux infectieux au Directeur du laboratoire et à l'Agent de Sécurité.
- Fournir les évaluations médicales, la surveillance et le traitement appropriés et conserver des rapports écrits.
- Notifier immédiatement toute souillure ou tout incident pouvant résulter d'une exposition évidente à des organismes contenant de l'ADN recombiné.
- Un programme de contrôle des insectes et des rongeurs doit être mis en œuvre.
- Un cabinet de sécurité biologique entretenu doit être utilisé chaque fois que seront conduites des procédures pouvant créer des aérosols ou des éclaboussures biologiques.
- Des chaises revêtues de tissu ne sont pas autorisées dans un laboratoire microbiologique.
- Une protection du visage (lunettes, masque, écran facial ou autres protections contre les éclaboussures) doit être utilisée comme prévention contre les éclaboussures ou

pulvérisations de matériel infectieux ou à risques sur le visage lorsque des microorganismes doivent être manipulés à l'extérieur du cabinet de biosécurité.

- Des gants doivent être portés en permanence lors de manipulation de matériaux potentiellement infectieux, de surfaces ou d'équipement contaminés.
- Jeter les gants chaque fois qu'ils sont clairement contaminés, lorsque le travail avec le matériel infectieux est terminé, ou lorsque l'intégrité d'un gant est compromise. Les gants jetables ne doivent pas être lavés, réutilisés ou utilisés pour toucher des surfaces propres (claviers, téléphone, etc...).
- Des blouses de laboratoire de protection doivent être portées dans l'enceinte du laboratoire de microbiologie.
- Les blouses sales seront stérilisées et lavées. Si vous avez l'intention de la porter à nouveau, il faut l'accrocher sur la patère à l'intérieur du laboratoire. Les blouses ne doivent en aucun cas être portées à l'extérieur du laboratoire, après utilisation interne.
- Les blouses seront mises à laver par le personnel BSL2.
- Ne pas passer ou recevoir d'appel téléphonique à l'intérieur du laboratoire de microbiologie.
- Le personnel doit se laver les mains après avoir manipulé des matériaux viables, après avoir retiré les gants et avant de quitter le laboratoire de microbiologie.
- Procédure de sortie:
 - Enlever les gants.
 - Oter la blouse de laboratoire.
 - Accrocher la blouse ou l'apporter à la stérilisation et au lavage.
 - Se laver les mains.
- Les tâches de surveillance doivent être effectuées par le personnel BSL2 sous la direction du superviseur du laboratoire de microbiologie.
- Les matériaux à décontaminer en dehors du laboratoire sont placés dans un sac poubelle durable, résistant à l'écoulement, autoclavable biologiquement et fermé pour transport.
- Tous les récipients et flacons seront rincés avec une solution à 10% d'eau de javel, ou 5% d'hypochlorite de sodium ou à 70% alcool avant de quitter le laboratoire BSL, pour entreposage. *NOTE*: Éviter l'usage de l'alcool sur les ampoules pour prévenir l'effacement des marques d'identification.

4. Sécurité contre mycotoxines BSL2 (Confinement niveau 2)

- L'accès au laboratoire de mycotoxines est limité au personnel qui y travaille.
- Les personnes courant un risque médical accru du fait de l'exposition aux toxines ne sont pas autorisées au sein du laboratoire de mycotoxines. C'est au Directeur qu'appartient la responsabilité finale de l'évaluation de chaque circonstance et de déterminer qui peut avoir accès au et travailler dans le laboratoire.
- Le personnel du laboratoire aura accès aux tests médicaux appropriés pour les agents manipulés ou potentiellement présents dans le laboratoire de mycotoxine.
- Considérant les agents manipulés, un échantillon de sérum de base sera, si cela s'avère approprié, récolté et entreposé par le staff du laboratoire de mycotoxine et autre personnel à risque.

- Toutes les personnes travaillant dans le laboratoire de mycotoxines seront formées de manière appropriée aux risques associés avec le type de travail, les précautions nécessaires à prendre pour prévenir les expositions, et les procédures d'évaluation des expositions.
- Procédure d'entrée
 - A chaque entrée dans le laboratoire, porter une blouse propre ou enfiler celle-ci à l'entrée.
 - Porter des gants de protection avant de manipuler des matériaux potentiellement toxiques.
- Les personnes non répertoriées sur la liste du staff autorisé, présentes à l'intérieur du laboratoire, ne peuvent être admises que par le Directeur ou le Superviseur du laboratoire de mycotoxines et/ou doivent être accompagnées en permanence par un membre habilité.
- Les échantillons de toxines et les standards peuvent seulement quitter le laboratoire BSL2 de Toxines dans des flacons CLHP afin d'être testés sur un instrument d'analyse et tous les autres travaux sur toxine doivent s'accomplir au sein du laboratoire.
- Tous les échantillons de toxines, les extraits et les standards doivent être stockés dans le laboratoire BSL2 de Toxines.
- Décontaminer toutes les surfaces de travail après achèvement d'une opération ou en fin de journée et après toute souillure ou éclaboussure de matériel viable avec des agents de désactivation efficaces contre les toxines concernées. Pour la plupart de ces dernières, on utilisera une solution à 10% d'eau de Javel, suivie d'une solution à 5% d'acétone.
- Un grand degré de précaution sera toujours observé avec tout objet acéré, contaminé, incluant aiguilles, seringues, lames, tubes capillaires et scalpels.
- Chaque fois que c'est possible, substituer du plastique au verre.
- Le verre brisé ne doit pas être manipulé directement mais déplacé avec des moyens mécaniques, comme une brosse et une ramassette, des pinces ou des péans. Les récipients contenant des aiguilles contaminées, les équipements acérés, et le verre brisé seront préalablement décontaminés avant jetage suivant les règles locales, nationales ou régionales en vigueur.
- Les déchets potentiellement toxiques seront placés dans un récipient avec couvercle pour prévenir les écoulements pendant la collecte, la manipulation, la transformation, le transport et le convoyage.
- L'équipement contaminé doit subir une décontamination préalable en accord avec les règles locales avant de l'envoyer pour réparation ou entretien ou de l'emballer pour transport.
- Notifier immédiatement toute souillure ou tout incident pouvant résulter en exposition manifeste à des matériaux toxiques au Directeur de laboratoire et à l'agent de sécurité.
- Fournir des évaluations médicales, la surveillance et le traitement appropriés et conserver des rapports écrits.
- Un programme de contrôle des insectes et des rongeurs doit être mis en œuvre.
- Des chaises revêtues de tissu ne sont pas autorisées dans un laboratoire de mycotoxines.

- Jeter les gants chaque fois qu'ils sont clairement contaminés, lorsque le travail avec le matériel toxique est terminé, ou lorsque l'intégrité d'un gant est compromise. Les gants jetables ne doivent pas être lavés, réutilisés ou utilisés pour toutes les surfaces «propres» (clavier, téléphones, etc...).
- Des blouses de laboratoire de protection doivent être portées dans l'enceinte du laboratoire de mycotoxine.
- Mettre les blouses de laboratoire sales dans un panier (tapissé d'un sac à linge soluble à l'eau chaude) situé au sein du laboratoire à mycotoxines. Si vous avez l'intention de les porter à nouveau, il faut les accrocher sur la patère à l'intérieur du laboratoire. Les blouses ne doivent en aucun cas être portées à l'extérieur du laboratoire de mycotoxines, après utilisation interne.
- Les blouses seront mises à laver par le personnel BSL2; si nécessaire, elles seront stérilisées d'abord.
- Ne pas passer ou recevoir d'appel téléphonique à l'intérieur du laboratoire de mycotoxines.
- Le personnel doit se laver les mains après avoir retiré les gants et avant de quitter le laboratoire de mycotoxines
- Procédure de sortie:
 - Enlever les gants
 - Oter la blouse de laboratoire
 - Accrocher ou poser la blouse de laboratoire sur la patère (située au sein du laboratoire de mycotoxines).
 - Se laver les mains
- Les tâches de surveillance doivent être effectuées par le personnel BSL2 sous la direction du superviseur de mycotoxines.
- Tout le matériel en verre ou plastique devant être envoyé à la salle de lavage sera décontaminé à l'eau de Javel avant de quitter le laboratoire de mycotoxines.

5. Vide/Pression

- Fermer le dispositif à vide lorsqu'il n'est pas utilisé.
- Employer uniquement des tubes à vide pour les connexions à l'équipement à vide.
- Appliquer le vide seulement sur la verrerie produite spécifiquement pour cet objectif, et emballer les flacons avec du ruban flexible (chatterton, toile isolante) avant de mettre la succion en route.
- Relâcher lentement le vide dans toutes les parties du système avant d'ouvrir l'appareil.
- Inspecter toutes les parties de l'équipement à vide pour détecter d'éventuels défauts avant utilisation. Éliminer tout verre à vide fêlé, cassé ou brisé.

6. Équipement électrique

- Ne pas utiliser un équipement électrique s'il n'est pas en bon état de marche. Vérifier si les câbles ne sont pas effilochés ou endommagés ou si les interrupteurs ne sont pas cassés.
- Le testage local de sécurité électrique sera effectué à des intervalles réguliers spécifiques (généralement une fois par an).

- Eviter tout contact avec l'eau en cas d'utilisation d'un appareil électrique.
- Utiliser des prises fixées au sol avec des coupe-circuits, pas de rallonges.
- S'assurer que les appareils utilisés en série aient le même voltage.
- S'assurer que l'interrupteur central soit sur OFF et les appareils débranchés avant emploi si possible.
- Ne jamais court-circuiter un appareil de sécurité.
- Ne pas utiliser d'appareils électriques tels que des mixeurs ou des plaques chauffantes auprès de solvants inflammables.
- En cas de feu dans un ou à proximité d'un appareil électrique, utiliser seulement des extincteurs à dioxyde de carbone ou à poudre sèche.
- En cas de coupure de courant, éteindre ou débrancher les appareils afin de prévenir toute avarie; si des fumées apparaissent, fermer les portes et hottes appropriées. Si nécessaire, procéder à l'évacuation.
- N'utiliser aucun appareil ou pièce d'équipement excédant l'ampérage du circuit concerné. Se souvenir qu'aucun autre appareil sur le circuit ne doit être pris en considération pour calculer le nombre total d'ampères à tirer. En cas d'incertitude sur le taux d'ampérage pour un circuit donné, demander au superviseur de requérir l'assistance du staff de maintenance approprié.
- Si, au cours d'une expérimentation, un disjoncteur saute, débrancher tous les appareils électriques sur ce circuit et prévenir le superviseur.
- Lors d'utilisation de prises multiples sur une sortie de courant, prendre soin de ne pas excéder le taux d'ampérage sur le circuit. L'appareil devrait posséder son propre disjoncteur. Si le nombre de sorties s'avère insuffisant, il sera temps de réévaluer la charge du circuit.

7. Levage

- Les différences morphologiques entre travailleurs n'autorisent pas à fixer des limites de levage uniformes pour tous. La taille et le poids ne permettent pas nécessairement d'apprécier la capacité de soulever.
- Pour soulever un objet, il faut suivre les directives suivantes:
 - Inspecter l'objet à soulever.
 - Regarder et savoir où aller.
 - Porter l'équipement de protection nécessaire, comme des gants, un tablier et des chaussures de sécurité.
 - Si la charge est trop lourde ou trop volumineuse à manipuler seul, demander de l'aide.
 - Si un travail requiert deux personnes ou plus, travailler ensemble et demander à l'un d'entre vous de donner les signaux.
 - Employer des méthodes de soulèvements correctes:
 - Faire un jugement préliminaire avant le soulèvement afin d'être sûr de pouvoir l'effectuer.
 - Planter les pieds solidement, l'un légèrement devant l'autre.
 - S'accroupir aussi près que possible de la charge.
 - Garder le dos droit.

- Agripper fermement l'objet en utilisant les paumes des mains.
- Avant de poser la charge, s'assurer que doigts et orteils soient dégagés.
- En cas de changement de direction, ne pas tourner le corps; utiliser les pieds pour mouvoir l'ensemble du corps.
- Si disponible, utiliser une ceinture spéciale pour les objets lourds.
- Un entraînement approprié sera dispense pour les procédures de manipulation.

8. Liquides Inflammables

- **Les feuilles de données pour la sécurité du matériel devront être aisément récupérables pour tous les produits/substances chimiques entreposées dans le laboratoire.**
- Tous les solvants seront manipulés avec prudence, même si d'un point de vue chimique, ils peuvent être relativement inactifs. Quelques-uns des solvants communément utilisés sont volatiles et peuvent être nocifs même lorsque de petites quantités sont inhalées. Certains sont facilement absorbés à travers la peau et sont très inflammables.
- Éviter la production d'étincelles statiques en mettant à la terre le bidon à partir duquel est transféré un solvant inflammable.
- Entreposer les volumes importants de liquides inflammables dans un container adapté à un stockage sécurisé. Ne garder que des quantités minimales de liquides inflammables à l'intérieur du laboratoire. Utiliser en priorité les réactifs les plus anciens. Tous les liquides inflammables doivent être stockés dans un récipient de sécurité approuvé. Ne jamais retourner les liquides dans les récipients d'origine.
- Manipuler les matériaux inflammables dans une hotte à fumée, en évitant l'utilisation simultanée d'oxydants.
- S'assurer que les récipients à solvant sont entreposés sur des plateaux d'égouttage.

9. Bouteilles de gaz

- S'assurer que le couvercle est fermement fixé lors du stockage ou de déplacement d'un cylindre (cela protège la queue de robinet d'être accidentellement endommagée). Pour déplacer la bouteille de gaz, utiliser un diable. Le capuchon protecteur doit être mis en place avant de retirer la bouteille de gaz de son support
- Toujours soutenir les bouteilles de gaz avec des sangles, des chaînes, ou une base convenable afin d'empêcher qu'elles ne tombent.
- Fermer toutes les bouteilles et retirer les valves lorsqu'elles ne sont pas utilisées.
- S'assurer que le régulateur approprié soit utilisé sur chaque bouteille.
- Ne jamais utiliser une bouteille dont le contenu ne puisse être correctement identifié.
- Ne jamais forcer une valve de bouteille.
- Ne jamais utiliser de l'huile ou de la graisse sur un régulateur ou une valve de réservoir.
- Ne jamais utiliser un régulateur ou réservoir s'il y a présence d'huile, de graisse ou d'un autre oxydant. Les substances combustibles sont explosives lorsqu'elles sont en contact avec un oxydant.
- Les réactions requérant des bouteilles de gaz toxiques, inflammables ou réactives, seront employées dans des hottes à fumée, et des râteliers seront utilisés pour maintenir les bouteilles.

- En cas de feu, éteindre le gaz inflammable, ensuite le gaz oxydant si possible
- Ne pas éteindre une flamme provenant d'un gaz hautement combustible jusqu'à ce que la source de gaz soit arrêtée. Autrement il peut se rallumer avec une explosion.
- Enlever le régulateur d'une bouteille propane vide et replacer le capuchon immédiatement en plaçant une bande, une marque, une étiquette avec la mention «VIDE».
- Pour les bouteilles utilisées dans les analyses GC/CLHP, des capteurs d'humidité seront employés et contrôlés régulièrement.

10. Verrerie

- Porter des gants thermorésistants ou utiliser des pinces lors de la manipulation de verrerie ou d'équipement qui a été chauffé.
- Lorsque la verrerie est prête à être nettoyée, transportez-la à l'aire de lavage et spécifier toutes instructions particulières de nettoyage.
- Lubrifier toutes les surfaces de contact et porter des mitaines de protection résistantes pour introduire le verre dans un bouchon ou un tube de telle manière que la force appliquée soit extérieure au corps.
- Éliminer le verre ébréché et brisé dans le récipient ad hoc. Tout verre brisé doit immédiatement être balayé du plan de travail ou du plancher et vidé dans un récipient utilisés uniquement à cet effet.
- Ne pas mettre de verre dans une poubelle pour déchets communs.
- Notifier à votre superviseur toute casse significative.
- Le verre brisé peut être disposé dans un récipient rigide, scellé (une boîte par ex.). Étiquetez le «verre brisé».

11. Instruments tranchants

- Prendre soin de ne pas se piquer avec une aiguille.
- Ne pas placer des seringues usagés dans des plateaux contenant des pipettes ou autre verrerie nécessitant un tri.
- Ne pas re-capuchonner des aiguilles usagées.
- Éliminer les aiguilles dans un récipient autorisé pour matériel acéré autolavable.
- Après stérilisation du récipient, du plâtre de Paris peut être ajouté et séché avant élimination. Cet additif va fixer les éléments tranchants et assurer que personne ne soit accidentellement blessé.
- Les aiguilles, lames, etc... sont considérées à risques même stériles re-capuchonnées et conditionnées dans le récipient original.

12. Hottes à fumée

- Les hottes seront éteintes et la fenêtre à guillotine fermée lorsqu'elles ne fonctionnent pas. S'il s'agit d'un modèle à vitesse variable, elle ne peut être éteinte et il faut s'assurer que la fenêtre à guillotine soit fermée en cas de non fonctionnement.
- L'équipement et les autres matériaux seront disposés et le travail effectué au moins 15 cm (6 pouces) derrière l'ouverture de la fenêtre à guillotine. Ainsi, l'exposition du laboratoire aux fumées provoquées par le mouvement de l'air, sera réduite.
- Lorsque la hotte fonctionne, la fenêtre à guillotine sera maintenue à la hauteur optimale pour le flux d'air. Un autocollant directement à côté de la fenêtre indique cette

hauteur. Cette fenêtre particulière représente votre première protection contre feux et explosions pouvant se produire dans les hottes à fumée.

- Papiers et autres matériaux ne peuvent pénétrer dans le tuyau d'évacuation de la hotte. Des objets étrangers peuvent être attirés dans le conduit et le ventilateur d'évacuation, et va affecter la performance de la hotte à fumée.
- Les hottes ne sont pas indiquées pour entreposer des produits chimiques ou de l'équipement. Toutes les réserves seront stockées dans des locaux désignés à cet effet.
- L'équipement et autres matériaux ne seront pas entreposés contre la zone des bouches d'air (située à l'arrière de la hotte). Ces bouches facilitent le mouvement de l'air à travers la hotte à fumées. Si elles sont bloquées, la hotte ne pourra procurer un mouvement constant de l'air.
- L'équipement volumineux placé dans la hotte à fumée sera placé à une hauteur minimale de 3-4 cm (1 ½") au-dessus de la surface de travail pour permettre à l'air de circuler librement par dessous.
- Lorsque le personnel travaille dans la hotte à fumée, la fenêtre à guillotine sera baissée jusqu'à un niveau protégeant le visage de l'utilisateur et le haut du thorax. Le seul moment où la fenêtre sera complètement ouverte sera lors de l'installation d'un équipement pour une procédure.
- Ne pas se fier à la ventilation de la hotte à fume pour se prémunir des étincelles ou projectiles
-- PORTER UN ÉQUIPEMENT DE PROTECTION APPROPRIÉ, EN RELATION AVEC LE TYPE DE PRODUIT ET D'ÉQUIPEMENT UTILISÉ.
- Si vous vous demandez si la hotte fonctionne correctement, faites appel au Département de la Santé environnementale et de la Sécurité.

13. Précautions spéciales pour les hottes pour acide perchlorique

- Les personnes employant de l'acide perchlorique seront familiarisés avec en détail ses risques.
- Les éclaboussures d'acide perchlorique seront débarrassées avec de grandes quantités d'eau.
- L'utilisation de matériaux organiques ou chimiques sera évitée dans la hotte.
- Les flammes gazeuses ou les bains d'huile ne seront pas utilisés au sein de la hotte.
- Des lunettes et écrans faciaux seront utilisés chaque fois qu'il est possible de même que la fenêtre à guillotine.

Procédure de lavage de la hotte à fumée pour acide perchlorique

1. Cette procédure sera mise en œuvre après chaque utilisation d'acide perchlorique.
2. Débrancher tout appareil dans la hotte
3. Fermer la fenêtre à guillotine
4. Ouvrir le spray pour le douchage.
5. La pulvérisation doit se poursuivre au moins pendant 15 minutes.

PARTIE II

Section analytique

Procédures d'analyse

INTRODUCTION

Une production animale optimale est déterminée principalement par une alimentation animale adéquate des points de vue physiologique, économique et écologique. Afin de fournir aux animaux les nutriments nécessaires pour satisfaire leurs besoins d'entretien, de croissance, de gestation et de production de viande, de lait, d'œufs, de laine et de travail, de réduire les risques pour la santé et de minimiser les excréments et émissions, dans l'environnement, la valeur nutritive des aliments pour animaux utilisée dans la ration doit être connue de manière précise. La plupart des aliments pour animaux comme le fourrage et les sous-produits de l'alimentation humaine et de la production de bio énergie ont une qualité variable qui nécessite une analyse par lot. Comme les besoins en nutriments sont estimés en utilisant des méthodes standard, il est extrêmement important que le contenu des ressources alimentaires en nutriments soit analysé en utilisant des méthodes standard identiques ou similaires. De plus, l'utilisation de méthodes standard améliore la transparence des données entre laboratoires, instituts et compagnies.

Dans la seconde partie de ce manuel, sont décrites des méthodes communément employées pour déterminer la composition chimique et minérale des aliments pour animaux, ainsi que quelques importantes mycotoxines. La description de ces méthodes est en accord avec un ordre fixe de sujets, débutant avec le principe, la portée, les responsabilités, l'équipement, les réactifs, la procédure, le calcul, le contrôle de la qualité, les remarques, les interférences, le dépannage et les références. Pour l'équipement et les réactifs, seuls sont mentionnés les besoins spécifiques du laboratoire. La préparation de l'échantillon n'est pas décrite dans la procédure, mais des directives ont été fournies dans la première partie de ce manuel. En ce qui concerne le contrôle de la qualité, l'utilisation d'un échantillon de contrôle dans chaque opération est extrêmement importante pour garantir la précision. De plus, la duplication des analyses est recommandée et des limites strictes pour évaluer ces duplications, sont notifiées. Lorsqu'un laboratoire n'est pas capable d'atteindre ces limites, la responsabilité spécifique à l'intérieur du laboratoire sera déterminée et cotée lorsque demandée. Ci-après, le contexte et la pertinence des méthodes pour l'analyse des aliments pour animaux seront discutés.

Depuis que Henneberg et Stohmann ont développé le schéma d'analyse de Weende en 1860, les composantes chimiques principales des aliments pour animaux sont analysées suivant des méthodes empiriques, p. ex. humidité, protéine brute, lipides bruts, cendres brutes, tandis que la partie résiduelle des extractifs libres d'azote est calculée par différence. En 1963, Van Soest a développé un schéma spécifique d'analyse tendant à une caractérisation meilleure de la nature des parois cellulaires. Dans le Tableau 1, ces deux schémas d'analyse sont fournis simultanément avec les constituants chimiques incriminés. La détermination de l'humidité, suivie de celle des cendres brutes, aboutit au contenu en matière organique incluant les substances nutritives pour l'animal. La cendre brute est

représentée par la cendre insoluble sans intérêt pour l'animal ainsi que par les minéraux et oligo-éléments.

La protéine brute est considérée comme l'azote qui provient de la protéine réelle, principalement des aminoacides et peptides pour une part et de non-protéine comme l'ammoniaque, l'urée, les nitrates, les amines d'autre part.

La première fournira les blocs directs de construction pour les protéines animales. L'azote non protéique en présence d'énergie stimulera la croissance des bactéries du rumen, source de protéine de haute qualité pour l'animal.

Les lipides bruts contiennent les acides gras et, quelquefois, des pigments et des cires. Les premiers fournissent l'énergie, mais également des blocs de construction de graisse animale et une source de vitamines.

La fraction majeure de la plupart des aliments pour animaux est représentée par les hydrates de carbone, qui libèrent l'énergie et peuvent être très divers quant à leur nature. Ils se distinguent en structurels et non structurels. Il existe plusieurs méthodes pour caractériser les hydrates de carbone structurels. La fibre brute consiste principalement en cellulose, un polymère linéaire du glucage, de plus, en lignine, un polymère d'acides phénoliques. La fibre insoluble dans les détergents neutres représente l'ensemble des parois cellulaires: hémicellulose, cellulose et lignine. La fibre insoluble dans les détergents acides est similaire à la fibre brute. La différence entre les deux représente la mesure de l'hémicellulose, qui est un polymère ramifié de différents sucres. La différence entre la fibre insoluble dans les détergents acides et la lignine représente la mesure de la cellulose. La cellulose et l'hémicellulose sont partiellement digestibles par les ruminants, mais majoritairement non digestibles par les monogastriques: leur digestibilité dépend principalement de leur degré de lignification. La fibre non digestible par les détergents acides peut contenir de l'azote provenant de la dénaturation protéique par colique enzymatique (réaction de Maillax). Les gestions sont également des matrices de polysaccharides mais elles sont hautement digestibles. Parmi les hydrates de carbone non structurés, l'amidon, les fructosones et les sucres sont des composants importants.

La détermination du contenu des aliments pour animaux en énergie haute fournit une idée de leurs valeurs caloriques.

Les fourrages récoltés en bonnes conditions climatiques peuvent être ensilés pour l'alimentation du bétail en périodes moins favorables. Pendant l'ensilage, les sucres sont fermentés essentiellement en acides lactiques et acétique, un peu d'éthanol et, quelquefois, en acides butyrique moins désirable. La caractérisation des produits de fermentation permet d'évaluer la qualité de l'ensilage et peut également être utilisée pour corriger le taux de MS des ensilages après perte des substances volatiles durant le séchage au four.

En plus de protéines et d'énergie, les animaux ont besoin de minéraux et d'oligo-éléments. Le calcium et le phosphore représentent deux éléments majeurs pour le développement osseux, mais également pour la production de lait et d'œufs. Le magnésium, le potassium et le sodium sont d'autres éléments importants. Du fait que la plupart des végétaux fournissent insuffisamment de sodium pour l'alimentation animale et peuvent manquer de chlorures, la supplémentation en sel est critique pour une ration nutritionnellement équilibrée. Les oligo-éléments sont essentiels aux réactions enzymatiques corporelles; leurs biodisponibilités peuvent varier considérablement. Les plus importants sont le fer, le cuivre, le zinc, le manganèse, le cobalt, l'iode et le sélénium.

TABLEAU 1
Schéma de Weende et Van Soest pour l'analyse des aliments pour animaux
et constituants chimiques correspondants

Analyse de Weende	Constituants chimiques			Analyse de Van Soest					
Humidité	Water								
Protéine brute	Matière sèche	Matière organique	Protéine	Fibre insoluble dans détergents neutres					
			Azote non protéique						
Lipide brut			lipides						
Extractifs libres d'azote			Pigments						
			Amidon						
			Sucres						
			Acides organiques						
			Pectines						
Fibre brute			Hémicellulose			ADF		NDF	
			Cellulose						
	lignine								
	Fibre liée à N								
Cendre brute	Matière non organique	Cendre Insoluble	Silice						
		Cendre Soluble							

ADF = Fibre insoluble dans détergents acides

NDF = Fibre insoluble dans détergents neutres

Note: Les valeurs de tous les constituants donnés dans le Tableau 1 et analyses par les méthodes données ci-dessous doivent être reportées avec seulement une décimale.

Du fait que les ruminants sont capables de digérer les fourrages et les aliments moins digestibles comme la paille et le son, une méthode de digestibilité in vitro s'avère très informative pour l'évaluation des ressources alimentaires.

A côté des substances nutritives, les aliments pour animaux peuvent également contenir des substances indésirables. Ces composés, qualifiés de substances ou produits sont présents dans et/ou sur le produit destiné aux ressources alimentaires et présentent un danger potentiel pour la santé animale ou humaine, ou pour l'environnement, ou peuvent apporter négativement la production du bétail. Les mieux connus sont les dioxines, les PCB, les métaux lourds et les mycotoxines. Comme certainement typiques, il est impossible d'éliminer complètement leur présence mais il est important de réduire leur contenu dans les produits destinés à l'alimentation animal, compte tenu de leur toxicité aigüe, de leur bioaccumulation et de leur dégradation, afin de prévenir des efforts indésirables et nocifs.

Dans la plupart des pays, des niveaux maxima ont été fixés pour les substances indésirables. En cas de dépassement, il est interdit d'importer le produit et de s'en servir comme aliments pour animaux. Dès lors, une analyse précise est essentielle pour ces produits. Dans ce document, sont fournies des méthodes pour les mycotoxines les plus importantes (aflatoxines, fumonisines, deoxynivalenol et zearalenone).

MATIÈRE SÈCHE

1. Principe

La matière sèche est déterminée par gravimétrie, comme le résidu rémanent après séchage au four ventilé à 103 °C.

2. Portée

Cette procédure est applicable pour la matière sèche dans les ressources alimentaires, et leurs ingrédients, et les fourrages partiellement déshydratés (85% MS) avec un contenu faible en acides volatils. Pour le grain entier, l'ensilage et les aliments pour animaux riches en sucres une procédure différente est utilisée (remarque 9.1).

3. Responsabilités

Le laboratoire effectuera les analyses par le biais de cette méthode. C'est sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées sont rencontrées et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur

4. Équipement

- 4.1 Plateau en aluminium, approximativement 50mm diamètre, 40mm profondeur, couvert.
- 4.2 Balance d'analyses électronique, précision 0,1 mg.
- 4.3 Four de séchage, à air forcé à 103 ± 2 °C. Le four sera équipé d'une étagère afin de permettre la circulation de l'air. Il fonctionnera avec les bouches d'aération ouvertes.
- 4.4 Dessiccateur.

5. Réactifs

Aucun.

6. Procédure

- 6.1 Sécher le plateau aluminium couvert (4.1) à 103 ± 2 °C pendant 2 heures au moins.
- 6.2 Couvrir les plateaux et les transférer vers le dessiccateur (4.4).
- 6.3 Couvrir immédiatement le dessiccateur et laisser les plateaux couverts se refroidir à la température du local. Ne pas les laisser plus de deux heures dans le dessiccateur.
- 6.4 Peser les plateaux couverts (W1) à 0,1 mg près, en un retirant un à la fois du dessiccateur et en gardant celui-ci fermé entre les sorties de plateau. Utiliser des pinces pour manipuler les béchers.
- 6.5 Ajouter approximativement 2 g d'échantillon broyé sur chaque plateau. Enregistrer les poids du risque couvert avec l'échantillon (W2) à 0,1 mg près.
- 6.6 Secouer doucement le plateau pour répartir l'échantillon uniformément et exposer le maximum de surface pour séchage.
- 6.7 Introduire les échantillons (avec les couvercles déplacés sur le côté) dans un four préchauffé à 103 ± 2 °C (4.3) et sécher pendant 2 heures au moins, en démarrant le minutage dès que le four a atteint la température (sécher jusqu'à poids constant,

il peut être nécessaire de contrôler ceci pour différents types d'échantillons, une fois confirmé, utiliser ce temps de séchage).

- 6.8 Déplacer les échantillons vers un dessiccateur (4.4), recouvrir chaque plateau, sceller le dessiccateur et laisser refroidir à la température du local. Ne pas laisser les échantillons dans le dessiccateur plus de 2 heures.
- 6.9 Peser le plateau avec le couvercle et échantillon séché (W3), et enregistrer le poids à 0,1 mg près.

7. Calcul

Pourcentage Matière Sèche (% MS):

$$\% \text{ MS} = (W3 - W1) \times 100 / (W2 - W1)$$

où,

W1 = poids plateau vide (g),

W2 = poids plateau et échantillon (g),

W3 = poids plateau et échantillon après séchage (g).

Pourcentage humidité:

$$\% = 100 - \% \text{ MS (voir remarque 9.2)}$$

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un contrôle standard (CQ échantillon) sera analysé. L'échantillon CQ du laboratoire peut être produit à partir d'un échantillon d'aliment pour animaux/fourrage, similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon de CQ sélectionné, broyer afin de passer à travers un tamis de mailles de 1 mm et stocker dans un local frais et sec. Analyser 15 à 20 fois l'échantillon de CQ, prendre la moyenne et considérer celle-ci ± 2 DS comme une gamme acceptable.

Les échantillons seront analysés par doublons. La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon n'excèdera pas 0,2% de la valeur absolue de MS. Si elle excède 2%, répéter l'analyse.

9. Remarques

- 9.1 Pour la détermination de la MS des grains, sécher à 135 ± 2 °C pendant 2 heures; pour les ensilages (taille échantillon minimale: 500 gr) sécher à 60 ± 1 °C pendant 24 heures et pour des échantillons à forte teneur en sucres (p. ex. mélasses, bagasses, aliment composé contenant plus de 4% de sucrose ou lactose), sécher à 80-85 °C dans un four à vide.
- 9.2 En plus de l'humidité, d'autres composés volatils, comme l'ammoniaque et les acides gras volatils, disparaissent pendant le séchage. Ceci doit être pris en compte lors du calcul du contenu en humidité.

10. Interférences, dépannage et sécurité

- 10.1 Temps et température doivent être respectés scrupuleusement.
- 10.2 Les échantillons seront placés dans le four à sécher de manière à ce que l'air circule librement.
- 10.3 Les plateaux d'échantillons ne seront pas trop rapprochés dans le dessiccateur. Le mouvement de l'air est nécessaire pour refroidir les plateaux d'échantillons.

- 10.4 Ouvrir le dessiccateur chargé très lentement après refroidissement des échantillons. Un vide se crée durant le refroidissement et une ouverture brusque provoque une turbulence qui peut souffler les échantillons en dehors des plateaux découverts.
- 10.5 Le couvercle du dessiccateur sera maintenu ouvert pour l'enlèvement de chaque récipient et contenu fermé pendant la pesée. Laisser le couvercle ouvert permet aux échantillons d'absorber l'humidité.
- 10.6 Utiliser toujours des pinces pour manipuler les béchers.

11. Références bibliographiques

- AOAC 930.15.** 2000. *Moisture in animal feed, loss on drying at 135 °C for 2 hours*. Gaithersburg, MD, USA.
- ISO 6496.** 1999. *Animal feeding stuffs – Determination of moisture and other volatile matter content*. Geneva, Switzerland.
- Commission Regulation (EC) No 152/2009.** 27 Jan 2009. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Annex III, A, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009.

CENDRE BRUTE

1. Principe

La cendre est déterminée par gravimétrie comme le résidu après incinération à 550 °C.

2. Portée

Cette procédure est applicable pour la détermination de la cendre dans les aliments pour animaux et leurs ingrédients. Cette méthode ne peut être utilisée pour des mélanges de minéraux.

3. Responsabilités

Les techniciens de laboratoire effectueront l'analyse au moyen de cette méthode. Il est de la responsabilité du Technicien de s'assurer que toutes les conditions exposées dans la méthode sont satisfaites et strictement respectées. Toutes déviations à partir de la méthode seront enregistrées et notifiées au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Plateau d'incinération.
- 4.2 Balance d'analyse électronique, exacte à 0,1 mg près.
- 4.3 Four à moufle, capable de maintenir des températures de 550 ± 20 °C.
- 4.4 Dessiccateur.

5. Réactifs

Aucun.

6. Procédure

- 6.1 Sécher le plateau à incinération (4.1) à 103 °C pendant au moins deux heures, retirer du four et refroidir au dessiccateur.

- 6.2 Peser le plateau vide (4.1) à 0,1 mg près (W1).
- 6.3 Ajouter approximativement 5 g d'échantillon au plateau et peser à 0,1 mg près (W2).
- 6.4 Placer le plateau dans le four à moufle préchauffé à 550 ± 20 °C (4.3) pendant 3 heures.
- 6.5 Vérifier de visu si le résidu est exempt de particules carbonées (voir remarque 9.1).
- 6.6 Transférer le plateau dans le dessiccateur (4.4) et laisser refroidir à la température du local (45 minutes environ).
- 6.7 Peser le plateau à 0,1 mg près (W3).

7. Calcul

Pourcentage cendres (% CENDRES):

$$\% \text{ CENDRES} = (W3 - W1) \times 100 / (W2 - W1)$$

où,

W1 = Poids du plateau vide (g),

W2 = Poids du plateau et échantillon (g), et

W3 = Poids du plateau et du résidu après incinération (g).

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un standard de contrôle (échantillon CQ) sera analysé. L'échantillon CQ de laboratoire peut être produit à partir d'un échantillon similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, moudre à travers un tamis à grilles de 1 mm et entreposer dans une pièce froide et sèche. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, calculer la moyenne et considérer celle-ci additionnée de 2 DS comme une portée acceptable.

Les échantillons seront analysés par doublons. La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon ne doit pas dépasser 0,2 % en termes absolus pour des contenus inférieurs à 10%, et 2% en relation avec des valeurs plus élevées pour des contenus $\geq 10\%$ (avec une différence maximale de 0,5% unités).

9. Remarques

- 9.1 Si le résidu contient des particules carbonées, humidifier avec de l'eau distillée, évaporer l'eau prudemment à siccité à 103 ± 2 °C et incinérer pendant 1 heure à 550 ± 20 °C.

10. Interférences, dépannage et sécurité

- 10.1 Ne pas laisser l'échantillon se refroidir à moins de 200 °C dans le four à incinération avant de le transférer dans un dessiccateur car l'échantillon peut se ré-humidifier.
- 10.2 Ne pas laisser l'échantillon dans le dessiccateur à la température du local plus de 2 heures avant la pesée.
- 10.3 Ouvrir le dessiccateur prudemment pour éviter des pertes de cendres.
- 10.4 Le dessiccateur doit rester frais et le couvercle du dessiccateur correctement fermé avec de la graisse à vide élevé, un lubrifiant siliconé.
- 10.5 S'assurer que toutes les surfaces avec lesquelles les creusets entrent en contact soient propres, spécialement le dessiccateur où de la graisse à vide est utilisée.

- 10.6 Retirer la balance entre chaque pesée.
- 10.7 Le four ne sera pas préchauffé. Ceci prévient la combustion rapide de l'échantillon et ralentit la perte de l'humidité. Une combustion rapide peut entraîner la production de flammes et une perte rapide d'humidité peut causer l'éparpillement de l'échantillon; chacune de ces situations peut entraîner la perte de l'échantillon.
- 10.8 Garder à l'esprit que certains échantillons peuvent mousser hors du creuset. Si cela survient, répéter l'analyse en utilisant du sable lavé et/ou employer un creuset plus grand.

RISQUES: Utiliser des pinces à grandes branches et des gants pour se prémunir des brûlures aux bras et aux mains en chargeant ou déchargeant du four à incinération. Se placer sur le côté et ouvrir prudemment le four à moitié. Ne pas ouvrir le four chaud avant que l'échantillon soit complètement incinéré car des flammes peuvent survenir.

11. Références bibliographiques

AOAC 942.05. 2000. *Ash of animal feed*. Gaithersburg, MD, USA.

ISO 5984. 2002. *Animal feeding stuffs – Determination of crude ash*. Geneva, Switzerland.

Commission Regulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Annex III, M, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009.

CENDRES INSOLUBLES DANS L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

1. Principe

Les cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique (CIA) sont déterminées par gravimétrie comme le résidu demeurant après ébullition de la fraction des cendres avec de l'acide chlorhydrique.

2. Portée

Cette procédure s'applique pour la détermination des cendres dans les aliments pour animaux et leurs ingrédients. Cette méthode ne peut être utilisée pour les mélanges de minéraux.

3. Responsabilité

Les Techniciens de laboratoire effectueront l'analyse en suivant la méthode. Il est de la responsabilité du Technicien de s'assurer que toutes les conditions exposés dans la méthode sont satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode prescrite sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Plateau d'incinération.
- 4.2 Balance d'analyse électronique, exacte à 0,1 mg près.
- 4.3 Four à moufle, capable de maintenir des températures de 550 ± 20 °C.
- 4.4 Dessiccateur.
- 4.5 Plaque chauffante.

- 4.6 Papier filtre exempt de cendres.
- 4.7 Four de séchage à air pulsé capable de maintenir une température de 103 ± 2 °C. Le four sera équipé d'une étagère afin de permettre la circulation de l'air. Il sera utilisé avec les bouches à air ouvertes.

5. Réactifs

- 5.1 Acide chlorhydrique 3 M.

6. Procédure

- 6.1 Sécher le plateau à incinération (4.1) à 103 °C pendant au moins deux heures, retirer du four et refroidir au dessiccateur.
- 6.2 Peser le plateau vide (4.1) à 0,1 mg près (W1).
- 6.3 Ajouter approximativement 5 g d'échantillon au plateau et peser à 0,1 mg près (W2).
- 6.4 Placer le plateau dans le four à moufle préchauffé à 550 ± 20 °C (4.3) pendant 3 heures.
- 6.5 Vérifier de visu si le résidu est exempt de particules carbonées (voir remarque 9.1).
- 6.6 Transférer le plateau dans le dessiccateur (4.4) et laisser refroidir à la température du local (45 minutes environ).
- 6.7 Transférer quantitativement les cendres dans un bécher en utilisant 75 ml d'acide chlorhydrique 3 M (5.1).
- 6.8 Chauffer prudemment le mélange sur une plaque chauffante jusqu'à ébullition et (4.5), laisser bouillir pendant 15 minutes.
- 6.9 Filtrer le mélange sur papier filtre exempt de cendres (4.6) et laver avec de l'eau distillée chaude jusqu'à ce que les lessives soient exemptes d'acide.
- 6.10 Transférer le papier filtre avec le résidu sur un plateau à incinération.
- 6.11 Sécher le plateau à incinération pendant la nuit dans le four de séchage (4.7) ajusté à 103 ± 2 °C.
- 6.12 Sécher celui-ci dans le four à moufle préchauffé (4.3) ajusté à 550 ± 20 °C pendant 2 heures.
- 6.13 Transférer le plateau dans un dessiccateur (4.4) et laisser refroidir à la température du local (environ 45 minutes).
- 6.14 Peser le plateau et le résidu à 0,1 mg près (W3)

7. Calcul

Pourcentage CIA (% CIA)

$$\% \text{ CIA} = (W3 - W1) \times 100 / (W2 - W1)$$

où,

W1 = poids du plateau vide (g),

W2 = poids du plateau et de l'échantillon (g), et

W3 = poids du plateau et du résidu incinéré (g).

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un standard de contrôle (échantillon CQ) sera analysé. L'échantillon CQ du laboratoire peut être produit à partir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage

similaire aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, le broyer à travers un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un local froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter 2 DS pour avoir une portée acceptable.

Les échantillons seront analysés par doublons. La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon ne dépassera pas 10% par rapport à la valeur la plus haute et avec une différence maximum de 0,5% d'unités.

9. Remarques

9.1 Si le résidu contient des particules carbonées, humidifier avec de l'eau distillée, évaporer prudemment l'eau jusqu'à siccité à 103 ± 2 °C, et incinérer pendant 1 heure à 550 ± 20 °C.

10. Interférences, dépannage et sécurité

10.1 Ne pas laisser l'échantillon se refroidir à moins de 200 °C dans le four à incinération avant de le transférer dans un dessiccateur car l'échantillon peut se ré-humidifier.

10.2 Ne pas laisser l'échantillon dans le dessiccateur à la température du local plus de 2 heures avant la pesée.

10.3 Ouvrir prudemment le dessiccateur pour éviter des pertes de cendres.

10.4 Le dessiccateur doit être conservé frais et le couvercle du dessiccateur correctement scellé avec de la graisse à vide élevé, un lubrifiant siliconé.

10.5 S'assurer que toutes les surfaces avec lesquelles les creusets viennent en contact soient propres, spécialement le dessiccateur où est utilisée de la graisse à vide.

10.6 Retirer la balance entre chaque pesée.

10.7 Le four ne sera pas préchauffé. Ceci prévient la combustion rapide de l'échantillon et ralentit la perte de l'humidité. Une combustion rapide peut provoquer des flammes et une perte rapide d'humidité peut engendrer un éparpillement des cendres; ces deux situations peuvent provoquer la perte de l'échantillon et par conséquent de faibles résultats.

10.8 Prendre en compte que certains échantillons peuvent mousser, une fois hors du creuset. En cas d'incident de type, répéter l'analyse en utilisant du sable lavé à l'acide et/ou utiliser un creuset plus grand.

RISQUES: Utiliser des pinces à longs bras et des gants pour se prémunir des brûlures aux bras et aux mains en chargeant ou déchargeant du four à incinération chaud. Se placer sur le côté et ouvrir prudemment à moitié la porte du four. Ne pas ouvrir un four chaud avant que l'échantillon ne soit complètement incinéré car il peut s'enflammer.

11. Références bibliographiques

AOAC 942.05. 2000. *Ash of animal feed*. Gaithersburg, MD, USA.

ISO 5985. 2002. *Animal feeding stuffs – Determination of ash insoluble in hydrochloric acid*. Geneva, Switzerland.

Commission Regulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Annex III, N, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009.

AZOTE ET CALCUL DE LA PROTÉINE BRUTE – KJELDAHL

1. Principe

Pour la détermination de l'azote, l'échantillon est digéré en utilisant de l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur pour transformer l'échantillon azoté en sulfate d'ammonium. La solution acide est alcalinisée avec de l'hydroxyde de sodium. Les sels d'ammonium sont distillés et récoltés dans un excès de solution d'acide borique, ceci suivi d'une titration avec la solution d'acide sulfurique. Pour détermination de la protéine brute, l'azote est multiplié par le facteur 6,25 (ou un facteur approprié, voir remarque 9.3).

2. Portée

La méthode décrite est applicable pour la détermination de l'azote dans les aliments pour animaux.

3. Responsabilité

Les Techniciens du laboratoire effectueront l'analyse via cette méthode. Il est de la responsabilité du technicien de s'assurer que toutes les conditions exposées sont satisfaites et strictement respectées. Toutes déviations par rapport à la méthode préconisée seront enregistrées et notifiées au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance d'analyse électronique, précise à 0,1 mg près.
- 4.2 Tubes de digestion adaptés à l'unité Kjeldahl de digestion.
- 4.3 Unité Kjeldahl de digestion avec tubulure pour rejet de fumées.
- 4.4 Appareil Kjeldahl de distillation.
- 4.5 Unité de Titration (4.4 est combiné à 4.5 dans un équipement sophistiqué).

5. Réactifs

- 5.1 Acide sulfurique concentré 95-98% (w/v), degré réactif.
- 5.2 Tablettes Kjeldahl d'analyse (voir remarque 9.5).
- 5.3 Acide borique, 10 g/litre.
- 5.4 Solution NaOH, 40% (w/v).
- 5.5 Solution indicateur: indicateur au rouge méthyle dissoudre 1 g de méthyle rouge (sel de sodium) dans 100 ml de méthanol ou d'éthanol.
- 5.6 Acide chlorhydrique standard, solution volumétrique, $c = 0,1 \text{ M}$ (précision à 0,1000 M).

6. Procédure

- 6.1 Digestion
 - 6.1.1 Peser approximativement 1 g d'échantillon à 0,1 mg (W) et transférer au tube de digestion (4.2). Pour chaque lot, utiliser un tube sans échantillon comme test à blanc.
 - 6.1.2 Ajouter deux tablettes Kjeldahl (5.2) et 20 ml d'acide sulfurique (5.1). Si les fumées représentent un problème, additionner quelques gouttes d'agent anti-moussant.

- 6.1.3 Placer les tubes dans l'unité de digestion (4.3) et relier à la tubulure pour rejet de fumées.
- 6.1.4 Digérer l'échantillon pendant au moins 1 heure à 420 ± 20 °C.
- 6.1.5 Arrêter la digestion, retirer les tubes et laisser refroidir pendant 10-20 minutes.
- 6.1.6 Ajouter de l'eau distillée dans chaque tube de façon à atteindre un volume total d'environ 80 ml.

6.2 Distillation et titration.

La procédure suivante décrit la méthode de distillation et titration du manuel. Si une unité automatique de distillation et de titration est opérationnelle, suivre les instructions du fabricant.

- 6.2.1 Placer un flacon conique contenant 25-30 ml de l'acide borique concentré (5.3) en dessous de l'embouchure d'un condensateur de l'unité de distillation (4.4) de telle sorte que le tube déverseur se trouve plus bas que la surface de la solution d'acide borique.
- 6.2.2 Ajouter 50 ml NaOH (5.4) et distiller l'ammonium en suivant les instructions du fabricant.
- 6.2.3 Titrer le contenu du flacon conique avec la solution standard d'acide chlorhydrique (5.6) (voir remarque 9.4) après addition de quelques gouttes de la solution d'indicateur (5.5), en utilisant l'unité de titration (4.5) et lire la quantité de titreur utilisé. Le point terminal est atteint à la première trace de couleur rose dans le contenu.
- 6.2.4 Enregistrer la quantité d'acide utilisée à 0,05 ml près pour le test à blanc (Vb) et pour chacun des échantillons (Vs).

7. Calcul

Pourcentage d'azote (% N)

$$\% N = (V_s - V_b) \times M(\text{HCl}) \times 1 \times 14,007 / (W \times 10)$$

où,

V_s = ml HCl nécessaire pour titrer l'échantillon,

V_b = ml HCl nécessaire pour le test à blanc,

M(HCl) = molarité de HCl,

1 = facteur d'acidité,

1,007 = poids moléculaire de N,

10 = conversion de mg/g en %, et

W = poids de l'échantillon (g).

Calcul pourcentage Protéine brute (% CP):

$$\% \text{MPB} = \% N \times F$$

où,

F = 6,25 pour tous fourrages, aliments pour animaux et mélanges alimentaires,

F = 5,70 pour les grains, et

F = 6,38 pour lait et produits laitiers.

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un standard de contrôle sera analysé (échantillon CQ). L'échantillon CQ du laboratoire peut provenir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, moulin afin de passer par un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter ± 2 SD pour obtenir une portée acceptable.

Les échantillons seront analysés en doublons.

Utiliser un standard chimique hautement purifié (> 99,7%) et séché pour tester l'entièreté de la procédure. Le chlorhydrate de lysine, l'acétanilide et le tryptophane peuvent être employés. Les sels d'ammonium peuvent être employés pour tester la phase de distillation et titration.

Répétabilité

La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon ne peut pas dépasser:

- 0,2% en valeur absolue pour des contenus en MPB inférieurs à 20%,
- 1,0% en relation avec la valeur la plus élevée, pour des contenus en MPB de 20% à 40%, et
- 0,4% en valeur absolue, pour des contenus en MPB supérieurs à 40%.

Récupération

Le test de récupération sera effectué et évalué périodiquement. La récupération pour la procédure partielle (distillation seule) et totale (digestion et distillation) doit être > 99%.

9. Remarques

- 9.1 Pour des échantillons frais, une plus grande quantité sera utilisée.
- 9.2 Cette méthode peut également être employée pour la détermination de l'ammoniaque dans des échantillons d'ensilage. La procédure sera alors appliquée sans digestion.
- 9.3 Le facteur de conversion international (F) est basé sur la composition moyenne en acides aminés des protéines des ingrédients alimentaires. Le facteur exact peut dès lors varier entre les ingrédients individuels.
- 9.4 Si de l'acide sulfurique est employé pour la titration, le facteur d'acidité sera de 2.
- 9.5 Le catalyseur peut être produit par le laboratoire, il contiendra 3,5 g de sulfate de potassium et 0,4 g de sulfate pentahydrate de cuivre.

10. Interférences, dépannage et sécurité

- 10.1 Les proportions de réactifs, le degré de chaleur, et le temps de digestion sont des facteurs critiques – ne pas les changer.
- 10.2 Des distributeurs sont disponibles pour une fourniture correcte des mélanges de catalyseurs en poudre.

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ:

- 10.3 Manipuler prudemment l'acide. Utiliser une hotte à fumée résistante à l'acide. Toujours ajouter l'acide à l'eau à moins que cela ne soit mentionné différemment dans la

méthode. Porter des écrans faciaux et des gants épais pour se protéger des éclaboussures acides ou alcalines. Si de l'acide est projeté sur la peau, laver avec de grandes quantités d'eau.

- 10.4 L'acide sulfurique et l'hydroxyde de sodium peuvent brûler sérieusement la peau, les yeux, et le tractus respiratoire. Utiliser des dispositifs de rejet de fumées afin de se protéger des fumées acides, des poussières, alcalines, et des vapeurs. Toujours ajouter l'acide sulfurique concentré ou les pellets d'hydroxyde de sodium à l'eau, et non l'inverse. L'hydroxyde de sodium concentré peut rapidement et aisément provoquer la cécité. En cas de projections sur la peau ou les yeux, rincer abondamment avec de l'eau et chercher une assistance médicale.
- 10.5 Garder du bicarbonate et du vinaigre à portée de mains en cas de projections chimiques.
- 10.6 Les fumées d'oxyde de soufre produites pendant la digestion sont dangereuses à respirer. Ne pas inhaler.
- 10.7 Les produits de digestion ne doivent être refroidis avant que l'eau de dilution soit ajoutée afin d'éviter une réaction violente que l'acide peut initier en dehors du flacon. De même, le produit de digestion dilué doit être refroidi avant l'addition d'hydroxyde de sodium afin d'éviter une réaction violente similaire.
- 10.8 Vérifier avec les autorités locales les procédures d'élimination correctes des solutions de déchets contenant du cuivre.

11. Références bibliographiques

- AOAC 984.13.** 2000. *Protein (crude) in animal feed and pet food, copper catalyst Kjeldahl method.* Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC 988.05.** 2000. *Protein (crude) in animal feed and pet food: CuSO₄/TiO₂ mixed catalyst Kjeldahl method.* Gaithersburg, MD, USA.
- AOCS Ba4d-90.** *Nitrogen-ammonia-protein modified Kjeldahl method, titanium dioxide + copper sulphate catalyst.* Gaithersburg, MD, USA.
- ISO 5983-2.** 2009. *Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content – Part 2: block digestion/steam distillation method.* Geneve, Switzerland.
- Commission Regulation (EC) No 152/2009.** 27 Jan 2009. *Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.* Annex III, C, Official Journal of the European Union L54/1 from 26/02/2009.

AZOTE ET CALCUL DES MATIÈRES PROTÉIQUES BRUTES – COMBUSTION

1. Principe

L'azote est déterminé par combustion totale de l'échantillon à 950 °C en présence d'oxygène, dans laquelle l'azote est transformé en gaz de NO_x (principe de Dumas). Le NO_x est réduit en N₂ mesuré dans une cellule thermique de conductivité. Le pourcentage de protéines est calculé en multipliant l'azote enregistré par 6,25, ou le facteur de conversion applicable au type d'échantillon (voir remarque 9.3).

2. Portée

La méthode décrite est applicable pour la détermination de l'azote dans tous les aliments pour animaux.

3. Responsabilité

Le Technicien de laboratoire effectuera les analyses suivant cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées dans la méthode sont remplies et strictement respectées. Toutes déviations par rapport à la méthode prescrite seront enregistrées et notifiées au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance d'analyse précise à 0.1 mg.
- 4.2 Appareil de Dumas, capable d'effectuer l'ensemble de la détermination.

5. Réactifs

Les produits chimiques et jetables nécessités par l'équipement seront spécifiés par le fabricant.

- 5.1 EDTA, acide éthylène diamine tétra acétique, $C_{10}H_{16}N_2O_8$, sous forme de poudre. Le produit est utilisé comme calibration standard pour cette analyse.

6. Procédure

- 6.1 Peser dans une coupelle d'étain environ 0,22 g d'échantillon ou d'EDTA (5.1) à 0,1 mg près (W). Les échantillons d'aliments pour animaux liquides seront pesés dans une capsule d'étain en utilisant une pipette (voir remarque 9.1). Le poids suggéré pour les liquides: 0,2-0,5 g, en relation avec la concentration attendue.
- 6.2 Fermer prudemment la coupelle et placer celle-ci dans l'auto-échantillonneur de l'équipement (4.2).
- 6.3 Analyser le standard et les échantillons selon les instructions du fabricant.
- 6.4 Calculer les résultats en utilisant le standard de calibration (effectué la plupart du temps de manière automatique par l'appareil).

7. Calcul

Le pourcentage d'azote (% N) est calculé automatiquement par l'appareil (voir remarque 9.2). Calcul de la MPB (% MPB):

$$\% \text{ MPB} = \% \text{ N} \times F$$

où,

F = 6,25 pour fourrages, aliments pour animaux, et mélanges,

F = 5,70 pour grains de blé, et,

F = 6,38 pour lait et produits laitiers.

8. Contrôle de la qualité

Chaque lot inclura un blanc (coupelle vide ou capsule), un échantillon de chlorhydrate de lysine de pureté élevée, et un ou plus d'échantillons pour contrôle de la qualité (CQ). Un échantillon CQ de laboratoire peut provenir d'un aliment pour animaux/fourrage similaire

par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, broyer pour passer à travers un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit frais et sec.

Analyser l'échantillon CQ 15-20 fois, prendre la moyenne et ajouter ± 2 SD pour fixer une portée acceptable. Les échantillons seront analysés en doublon.

Répétabilité

La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon ne devra pas dépasser:

- 0,2% en valeur absolue, pour les contenus en MPB de moins de 20%,
- 1,0% en relation avec la valeur la plus haute, pour les contenus en MPB de 20% à 40%, et
- 0,4% en valeur absolue, pour les contenus en MPB de plus de 40%.

9. Remarques

- 9.1 Pour les aliments pour animaux pauvres en azote, le poids de l'échantillon sera augmenté.
- 9.2 Le calcul du contenu en N est basé par comparaison aux zones de pics transmis pour le standard de calibration (EDTA) et les échantillons.
- 9.3 Le facteur de conversion international est basé sur la composition moyenne d'acides aminés dans les protéines des ingrédients. Le facteur exact peut dès lors varier entre les différents aliments pour animaux.
- 9.4 L'azote et dès lors les valeurs de MPB calculées peuvent légèrement différer de celles analysées par la méthode Kjeldahl.

10. Interférences, dépannage et sécurité

- 10.1 Erreurs systématiques
 - 10.1.1 Calibrations incorrectes des blancs et/ou des standards de calibration.
 - 10.1.2 Toujours re-calibrer l'appareil après l'entretien de routine.
 - 10.1.3 Le dépassement des contre limites pour les creusets/aliquotes de réactifs et en tubes de réduction de plus de 20% peut causer un blocage.
 - 10.1.4 Ne pas trop remplir le creuset.
 - 10.1.5 Si le compte du filtre de ballast est autour de 800 et si les échantillons de calibration et de contrôle fonctionnent trop lentement, il peut être nécessaire de changer le filtre.
 - 10.1.6 Pour des erreurs spécifiques, vérifier les instructions du fabricant.
- 10.2 Erreurs aléatoires
 - 10.2.1. Déviations significatives à partir des portées de poids données pour un échantillon. Trop peu ou trop d'échantillon peut donner des résultats imprécis.
 - 10.2.2 Perte d'un échantillon après pesée, due à un mauvais pliage de la feuille d'étain de la coupelle/capsule ou à des trous/déchirures de la feuille, peut donner des résultats imprécis.
 - 10.2.3. Perte d'une partie de la feuille d'étain de la coupelle/capsule après tarage. La torsion des bords de la feuille de la coupelle ou de la capsule provoque des erreurs de pesée.

11. Références bibliographiques

AOAC 990.03. 2000. *Protein (crude) in animal feed, combustion method.* Gaithersburg, MD, USA.

AOCS BA4e-93. *Generic combustion method for determination of crude protein. Instruction manual of manufacturer.* Gaithersburg, MD, USA.

LIPIDES BRUTS – EXTRACTION A L'ETHER

1. Principe

La graisse est extraite de l'échantillon en utilisant l'éther de pétrole. Le solvant est distillé et le résidu est séché et pesé. La graisse peut être mesurée avec ou sans hydrolyse préalable à l'acide chlorhydrique. Cette hydrolyse préalable produit des résultats meilleurs, spécialement pour les aliments pour animaux traités à la chaleur et ceux d'origine animale.

2. Portée

La détermination des lipides peut être appliquée pour les aliments pour animaux et leurs ingrédients dont le contenu en graisse est inférieur à 20%. Pour les aliments pour animaux a contenu lipidique plus élevé – par exemple, graisses oléagineuses, voir remarques 9.1 et 9.2.

3. Responsabilité

Le Technicien de laboratoire effectuera l'analyse en suivant cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées dans la méthode soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance pour analyse, précise à 0.1 mg près.
- 4.2 Appareil de chauffage avec thermostat.
- 4.3 Dés d'extraction, exempt de graisse et lavés à l'éther.
- 4.4 Appareil de chauffage.
- 4.5 Unité de reflux.
- 4.6 Extracteur du type Soxhlet.
- 4.7 Four à vide chauffé électriquement.
- 4.8 Dessiccateur.
- 4.9 Entonnoir Buchnel connecté au dispositif de succion.

5. Réactifs

- 5.1 Ether de pétrole léger (température d'ébullition 40-60 °C), purifié pour extraction de lipides (i.e. le résidu d'évaporation sera inférieur à 20 mg/litre).
- 5.2 Acide chlorhydrique 3 M.

6. Procédure

Pour la détermination sans hydrolyse, passer à 6.2.

Pour la détermination avec hydrolyse, démarrer du point 6.1.

La procédure décrit la méthode du manuel pour les deux types de déterminations (voir remarque 9.3).

6.1 Hydrolyse

- 6.1.1 Peser au moins 5 g d'échantillon dans un bécher, ou un flacon conique et enregistrer le poids à 0,1 mg près (W1).
- 6.1.2 Ajouter 100 ml d'acide chlorhydrique (5.2) et des chips de carbide de silicone à l'échantillon et couvrir le bécher avec un verre de montre ou adapter au flacon conique un condensateur à reflux (4.5).
- 6.1.3 Porter le mélange à ébullition modérée sur un appareil de chauffage (4.4) et maintenir à cette température pendant 1 heure. Remuer toutes les 10 minutes afin d'éviter que le produit ne se colle aux parois du récipient.
- 6.1.4 Filtrer le mélange à travers un papier à double filtrage exempt de graisses dans un entonnoir Buchner à succion (4.9).
- 6.1.5 Laver le résidu avec de l'eau distillée froide jusqu'à l'obtention d'un filtrat neutre.
- 6.1.6 Transférer prudemment le papier filtrer avec le résidu dans un dé à extraction (4.3) et sécher dans un four à vide (4.7) pendant 60 minutes à 80 ± 2 °C.
- 6.1.7 Retirer le dé du four et couvrir avec un bourrage de coton ou de laine exempt de graisse. Suivre la procédure donnée dans 6.2.2

6.2 Extraction

- 6.2.1 Peser au moins 5 g d'échantillon à 0,1 mg près (W1) dans le dé à extraction (4.3) et couvrir avec un bourrage de coton ou de laine exempt de graisse. Cette phase sera seulement effectuée pour la détermination de graisse sans hydrolyse
- 6.2.2 Transférer quelques chips de carbide de silicone dans un flacon sec et peser à 0,1 mg près (W2), ajouter 95 ml d'éther de pétrole (5.1).
- 6.2.3 Placer le dé dans un extracteur (4.6) et connecter au flacon séché (6.2.2) et à l'unité de reflux (4.5).
- 6.2.4 Extraire à l'éther de pétrole pendant 6 heures et régler l'appareil de chauffage (4.4) pour obtenir au moins 10 siphonages par heure, ou suivre les directives du fabricant.
- 6.2.5 Distiller le solvant jusqu'à ce qu'il ait pratiquement disparu du flacon, laisser dans une hotte à fumée pendant la nuit afin de s'assurer que tout le solvant soit évaporé.
- 6.2.6 Sécher le flacon avec le résidu pendant 1h30 dans un four à vide (4.7) à 80 ± 2 °C.
- 6.2.7 Refroidir dans un dessiccateur (4.8) et peser à 0,1 mg près(W3).

7. Calcul

Le pourcentage de lipides bruts avec ou sans hydrolyse:

$$\% \text{ lipides bruts} = (W3 - W2) \times 100 / W1$$

où,

W1 = Poids d'échantillon initial en grammes,

W2 = Poids tare de flacons en grammes

W3 = Poids du flacon et du résidu lipides en grammes.

Les résultats rapportés noteront si une hydrolyse a été pratiquée.

8. Contrôle de la qualité

Inclure un réactif à blanc et un ou plus d'échantillons de contrôle de la qualité (CQ) dans chaque série. Sélectionner des échantillons CQ en confrontant des niveaux d'analyte et matrices d'échantillons CQ aux échantillons du lot. Inclure au moins un jeu de doublons dans chaque série. Par exemple, un échantillon brut de tourteau d'huile oléagineuse peut être considéré comme un échantillon CQ avec chaque lot; faire la moyenne de 15-20 répétitions et ajouter ± 2 DS pour une portée acceptable. Les échantillons seront analysés en doublons.

NOTE: L'échantillon CQ pour la détermination des lipides sera changé tous les 6 mois du fait de l'instabilité des graisses. L'échantillon CQ sera gardé à 2-8 °C.

La différence entre les doublons d'échantillons sera inférieure à 0,25% en valeur absolue dans la procédure sans hydrolyse et 0,5% pour celle avec hydrolyse.

9. Remarques

- 9.1 Les échantillons à haut contenu en lipides subiront une extraction préliminaire avec de l'éther de pétrole léger suivant la procédure décrite dans la préparation des échantillons SOP (voir pages 42-47).
- 9.2 Pour les graines oléagineuses, une double extraction à l'éther de pétrole est recommandée. Une méthode alternative pour ces produits est spécifiée dans ISO 659:2009.
- 9.3 Un équipement semi-automatique pour la détermination des lipides est disponible. Dans ce cas, suivre les instructions du fabricant.

10. Interférences, dépannage et sécurité

- 10.1 L'éther a un point de déflagration extrêmement faible.
- 10.2 Éviter d'inhaler les vapeurs d'éther.
- 10.3 Entreposer l'éther dans des récipients métalliques.
- 10.4 Manipuler les récipients ouverts (récipients à réactifs et béciers avec graisses) dans une hotte à fumées.
- 10.5 Conduire les extractions dans une zone bien ventilée.
- 10.6 Les peroxydes peuvent s'accumuler dans des récipients d'éther ouverts. Ils sont explosifs et sensibles aux chocs. Vérifier chaque récipient ouvert pendant plus de 30 jours. Les peroxydes contenant de l'éther doivent être éliminés au moyen de techniques spéciales. Des jauges sont disponibles pour contrôler les niveaux de peroxydes.
- 10.7 L'équipement électrique sera enterré. Les extracteurs seront résistants aux étincelles.
- 10.8 S'assurer que l'éther soit évaporé des béciers avant d'introduire ceux-ci dans le four, afin d'éviter incendie ou explosion. Laisser les béciers dans une hotte à fumée pendant la nuit.

11. Références bibliographiques

AOAC 920.39. 2000. *Fat (crude) or ether extract in animal feed.* Gaithersburg, MD, USA.

ISO 6492. 1999. *Animal feeding stuffs – Determination of fat content.* Geneva, Switzerland.

Commission Regulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. *Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.* Annex III, H, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009.

FIBRE BRUTE – MÉTHODE PAR FILTRATION

1. Principe

Après dégraissage, l'échantillon est successivement traité à l'acide sulfurique dilué bouillant, et une solution bouillante d'hydroxyde de potassium. La perte en masse après incinération correspond à la masse de fibre brute.

2. Portée

La méthode décrite s'applique à la détermination des aliments pour animaux dont le contenu en fibre brute est supérieur à 1%. Si l'échantillon contient >10% lipides, extraire préalablement la graisse avant d'entamer l'analyse.

3. Responsabilité

Le Technicien de laboratoire effectuera l'analyse suivant cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les indications exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance pour analyse, précise à 0.1 mg près.
- 4.2 Creusets avec filtre en verre, P100.
- 4.3 Appareil de chauffage.
- 4.4 Équipement de filtration, connecté à un système à vide, par exemple le Fibertec.
- 4.5 Dessiccateur.
- 4.6 Four à séchage ventilé, capable d'être maintenu à une température de 103 ± 2 °C.
- 4.7 Four à moufle, capable d'être maintenu à une température de 550 ± 20 °C.

5. Réactifs

- 5.1 Éther de pétrole (point d'ébullition 40 à 60 °C).
- 5.2 Acide sulfurique, 0,15 M.
- 5.3 Acétone de la qualité technique.
- 5.4 Hydroxyde de potassium, 0,23 M.

6. Procédure

- 6.1 Pré-traitement
 - 6.1.1 Pour chaque creuset P100 (4.2) peser 1 g de l'échantillon à 0,1 mg près (W1).
 - 6.1.2 Placer les creusets dans l'équipement de filtration (4.4) et ajouter environ 30 ml d'éther de pétrole (5.1) dans chaque creuset et filtrer avec l'aide du vide.
 - 6.1.3 Répéter le lavage 2 fois.
 - 6.1.4 Sécher le résidu à l'air et transférer quantitativement dans un bécher.
- 6.2 Digestion
 - 6.2.1 Dans chaque bécher ajouter 150 ml d'acide sulfurique (5.3) et faire bouillir pendant 30 ± 1 minutes. Si de la mousse apparaît, ajouter quelques gouttes d'un agent anti-mousse.

- 6.2.2 Filtrer le mélange à travers un creuset (4.2) en utilisant le vide (4.4).
- 6.2.3 Laver le résidu 5 fois, chaque fois avec 10 ml d'eau distillée chaude.
- 6.2.4 Ajouter un volume d'acétone (5.4) pour couvrir simplement le résidu. Retirer l'acétone après quelques minutes en appliquant une légère succion.
- 6.2.5 Transférer quantitativement le résidu dans un bécher.
- 6.2.6 Ajouter 150 ml d'hydroxyde de potassium (5.1.8) dans chaque bécher et faire bouillir pendant 30 ± 1 minutes.
- 6.2.7 Filtrer le mélange à travers un creuset (4.2) en utilisant le vide (4.4).
- 6.2.8 Laver le résidu avec de l'eau distillée chaude jusqu'à neutralisation des rinçages.
- 6.2.9 Laver le résidu 3 fois, chaque fois avec 30 ml d'acétone (5.4).
Sécher le résidu par succion après chaque lavage.
- 6.3 Séchage et incinération
 - 6.3.1 Introduire les creusets dans un four (4.6) ajusté à 103 ± 2 °C et sécher pendant 4 heures. Le temps de séchage démarre lorsque le four atteint 103 °C.
 - 6.3.2 Placer les creusets dans un dessiccateur et laisser sécher.
 - 6.3.3 Peser les creusets immédiatement (4.5) après l'avoir retiré du dessiccateur à 0,1 mg près (W2).
 - 6.3.4 Placer les creusets dans un four à moufle (4.7), et incinérer les échantillons pendant 2 heures à 550 ± 20 °C. La durée de l'incinération démarre lorsque le four atteint 550 °C.
 - 6.3.5 Placer les creusets dans un dessiccateur (4.5) et laisser refroidir.
 - 6.3.6 Peser le creuset directement après l'avoir retiré du dessiccateur à 0.1 mg près (W3).

7. Calcul

Pourcentage fibre brute (% FB):

$$\% \text{ FB} = (W2 - W3) \times 100 / W1$$

où,

W1 = poids échantillon (g),

W2 = poids creuset et résidu après séchage (g), et

W3 = poids creuset et résidu après incinération (g).

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un standard de contrôle sera analysé (échantillon CQ). L'échantillon CQ du laboratoire peut provenir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, broyer jusqu'à passage par un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter ± 2 SD pour obtenir une portée acceptable.

Les échantillons seront analysés en doublons.

La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon n'excédera pas:

0.3% en valeurs absolues pour des contenus inférieurs à 10% en FB,

3% en relation avec la valeur la plus élevée pour des contenus $\geq 10\%$.

9. Remarques

- 9.1 Pour la détermination de fibre brute, il existe d'autres méthodes disponibles qui appliquent le lavage automatique de sacs avec les réactifs décrits. Pour utiliser, ces méthodes, suivre les instructions du fabricant. Leur emploi peut conduire à des résultats différents de ceux observés par la méthode par filtration.
- 9.2 Si se rencontrent des problèmes de filtration, une couche de sable de mer peut être employée comme aide de filtration.

10. Référence bibliographique

ISO 6865. 2000. *Animal feeding stuffs – Determination of crude fibre content – Method with intermediate filtration.* Geneva, Switzerland.

Commission Regulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. *Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.* Annex III, 1, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009.

FIBRE INSOLUBLE PAR DÉTERGENT NEUTRE – MÉTHODE DE FILTRATION

1. Principe

L'échantillon après dégraissage est bouilli avec le réactif détergent neutre (FDN); il subit ensuite un traitement à l'amylase dans une solution tampon pour dissoudre l'amidon rémanent. La perte en poids résultant de l'incinération du résidu sec correspond à celui de la fibre insoluble par détergent neutre.

2. Portée

La méthode décrite s'applique pour la détermination des aliments pour animaux avec un contenu en FDN supérieur à 1%.

3. Responsabilité

Le Technicien de laboratoire effectuera les analyses suivant cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées dans la méthode sont remplies et strictement respectées. Toutes déviations par rapport à la méthode prescrite seront enregistrées et notifiées au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance pour analyse, précise à 0.1 mg près.
- 4.2 Creusets avec filtre en verre, P100 ou équivalent.
- 4.3 Appareil de chauffage.
- 4.4 Équipement de filtration, connecté à un système à vide, par exemple le Fibertec.
- 4.5 Dessiccateur.
- 4.6 Four à séchage ventilé, capable d'être maintenu à une température de 103 ± 2 °C.
- 4.7 Four à moufle, capable d'être maintenu à une température de 550 ± 20 °C.

5. Réactifs

- 5.1 Acétone, qualité technique.

- 5.2 Solution détergente neutre (SDN), contenant pour 1 litre d'eau distillée:
30 g Lauryl sulfate de sodium- (=dodecyl-Na-sulfate)
6,81 g tetra borate de sodium $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$.
4,56 g phosphate hydrogéné de sodium Na_2HPO_4 or 5.72 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
18,61 g Acide tetraacétique éthylène diamine sel disodique.
10 ml 2-éthoxy-éthanol
Ajuster le pH de la solution à 6.9-7.1 en utilisant de l'hydroxyde de sodium ou de l'acide chlorhydrique.
- 5.3 Solution d'amylase. Dissoudre 2,5 mg d'analyse thermostable dans 60,6 ml de 0,1 M disodium hydrogène phosphate (Na_2HPO_4) et 39,2 ml de 0.1 M potassium dihydrogène phosphate (KH_2PO_4).

6. Procédure

- 6.1 Pré-traitement
- 6.1.1 Peser chaque creuset P100 (4.2).
- 6.1.2 Peser 0,5 g de l'échantillon à 0.1 mg près (W1) dans un creuset.
- 6.1.3 Placer les creusets dans l'équipement de filtration (4.4), ajouter environ 30 ml d'acétone (5.1) dans chaque creuset et filtrer sous vide.
- 6.1.4 Répéter le lavage 2 fois.
- 6.1.5 Sécher le résidu à l'air et transférer quantitativement dans un bécher.
- 6.2 Digestion
- 6.2.1 Ajouter dans chaque creuset 50 ml de SDN (5.2) et laisser bouillir pendant 60 ± 1 minutes sous reflux; si de la mousse apparaît, verser quelques gouttes d'un agent anti-moussant.
- 6.2.2 Filtrer le mélange sous vide (4.2) à travers un creuset (4.4).
- 6.2.3 Laver le résidu 2 fois, avec chaque fois, 10 ml d'eau distillée chaude.
- 6.2.4 Verser un volume d'acétone (5.1) afin de couvrir à ras le résidu. Enlever l'acétone par légère succion après quelques minutes.
- 6.2.5 Transférer quantitativement le résidu dans un bécher.
- 6.2.6 Ajouter 1-2 ml de la solution d'amylase dans chaque bécher et ensuite 30 ml d'eau distillée bouillante. Laisser reposer 5-10 minutes.
- 6.2.7 Transférer le mélange dans un creuset (4.2) et laver deux fois avec de l'eau distillée chaude et 2 fois avec de l'acétone (5.1) jusqu'à ce que la lessive soit propre. Après chaque lavage, sécher le résidu par succion.
- 6.3 Séchage et incinération
- 6.3.1 Placer les creusets dans un four (4.6) ajusté à 103 ± 2 °C et sécher au moins 4 heures. La durée de séchage débute lorsque le four a atteint 103 °C.
- 6.3.2 Placer les creusets dans un dessiccateur (4.5) et laisser refroidir.
- 6.3.3 Peser le creuset immédiatement après retrait du dessiccateur à 0,1 mg près (W2).
- 6.3.4 Placer les creusets dans le four à moufle (4.7), et incinérer pendant 2 heures à $55 \text{ °C} \pm 20 \text{ °C}$. La durée d'incinération démarre à partir du moment où le four a atteint 550 °C.
- 6.3.5 Après incinération, placer les creusets dans un dessiccateur (4.5) et laisser refroidir.

6.3.6 Peser le creuset immédiatement après retrait du dessiccateur à 0,1 mg près (W3).

7. Calcul

Pourcentage FDN (%FDN):

$$\%FDN = (W2 - W3) \times 100 / W1$$

où,

W1 = poids échantillon (g),

W2 = poids du creuset et du résidu après séchage (g), et

W3 = poids du creuset et du résidu après incinération (g).

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un standard de contrôle sera analysé (échantillon CQ). L'échantillon CQ du laboratoire peut provenir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage similaire par nature aux échantillons à analyser.

Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, broyer jusqu'à passage par un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter ± 2 SD pour obtenir une portée acceptable.

Les échantillons seront analysés en doublons. La différence entre les valeurs obtenues de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon ne dépassera pas: 0,3% en termes absolus pour des contenus inférieurs à 10% et 3% en relation avec la valeur la plus élevée pour des contenus égaux ou supérieurs à 10%.

9. Remarques

- 9.1 Pour la détermination de FDN, sont également disponibles des méthodes qui appliquent le lavage automatique de sacs avec les réactifs décrits. Pour effectuer ces méthodes, suivre les instructions du fabricant. L'utilisation de ces méthodes peut conduire à des résultats différents de ceux obtenus par la méthode par filtration.
- 9.2 Une incubation à la protéase supplémentaire peut être employée pour déplacer les restes de protéines insolubles dans le résidu.
- 9.3 Du fait du traitement à l'amylase dans une solution tampon afin de dissoudre l'amidon rémanent, la fraction fibreuse est également nommée «à FDN». L'emploi d'a-amylase peut être négligé si les échantillons (p.ex. foins ou pailles) sont pauvres en amidon.
- 9.4 Si se rencontrent des problèmes de filtration, une couche de sable de mer peut être utilisée comme aide à la filtration

10. Références bibliographiques

Robertson, J.B. & Van Soest, P.J. 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods, In *The Analysis of Dietary Fibre in Food*. Vol 3. Chapter 8, (W.P.T. James and O. Theander, eds.), Marcel Dekker, Inc.: New York.

Van Soest, P.J. & Robertson, J.B. 1985. *Analysis of forage and fibrous foods*. A Laboratory Manual for Animal Science 613. Cornell University, Ithaca, New York, USA.

FIBRE RÉSISTANTE AUX DÉTERGENTS ACIDES (FDA) ET LIGNINE (FDL) – MÉTHODES PAR FILTRATION

1. Principe

Après dégraissage, l'échantillon est bouilli avec une solution de détergent acide. La perte de poids résultant de l'incinération du résidu sec correspond au poids de la FDA.

Pour la détermination de la FDL, une ébullition complémentaire avec de l'acide sulfurique sera effectuée avant les mesures de la perte de poids résultant de l'incinération du résidu sec.

2. Portée

La méthode décrite est applicable pour la détermination des aliments pour animaux avec un contenu en FDA ou FDL plus élevé que 1%.

3. Responsabilité

Le Technicien de laboratoire effectuera les analyses suivant cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées dans la méthode sont remplies et strictement respectées. Toutes déviations par rapport à la méthode prescrite seront enregistrées et notifiées au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance pour analyse, précise à 0,1 mg près.
- 4.2 Creusets avec filtre en verre, P100 ou équivalent.
- 4.3 Appareil de chauffage.
- 4.4 Équipement de filtration, connecté à un système à vide, par exemple le Fibertec.
- 4.5 Dessiccateur.
- 4.6 Four à séchage ventilé, capable d'être maintenu à une température de 103 ± 2 °C.
- 4.7 Four à moufle, capable d'être maintenu à une température de 550 ± 20 °C.

5. Réactifs

- 5.1 Acétone, qualité technique.
- 5.2 Solution détergente acide (SDA), qui contient 20 g cetyl triméthyl ammonium bromide 0,5 M acide sulfurique dans 1 litre d'eau distillée.
- 5.3 72% Acide Sulfurique (w/w).

6. Procédure

- 6.1 Pré-traitement
 - 6.1.1 Peser les creusets vides (4.2) à 0,1 mg près (voir remarque 9.4).
 - 6.1.2 Peser 1 g de l'échantillon à 0,1 mg près (W1) dans les creusets (4.2).
 - 6.1.3 Placer les creusets dans l'appareillage de filtration (4.4) et ajouter environ 30 ml d'acétone (5.1) dans chaque creuset et filtrer sous vide.
 - 6.1.4 Répéter 2 fois le lavage.
 - 6.1.5 Sécher le résidu à l'air et transférer quantitativement dans un bécher.
- 6.2 Digestion

- 6.2.1 Ajouter 50 ml SDA (5.2) à chaque bécher et faire bouillir pendant 60 ± 1 minutes même sous reflux. Si de la mousse apparaît, ajouter quelques gouttes d'un agent anti-moussant.
- 6.2.2 Filtrer le mélange sous vide à travers un creuset (4.2).
- 6.2.3 Laver 2 fois le résidu, chaque fois avec 10 ml d'eau distillée chaude.
- 6.2.4 Ajouter une petite quantité d'acétone (5.1) afin de couvrir au plus près le résidu. Retirer l'acétone après quelques minutes.
- 6.3 Premier séchage
- 6.3.1 Placer les creusets dans un four (4.6) ajuster à 103 ± 2 °C et sécher pendant 4 heures au moins. Le séchage démarre lorsqu'est atteinte la température de 103 °C.
- 6.3.2 Placer les creusets dans un dessiccateur (4.5) et laisser refroidir.
- 6.3.3 Peser le creuset immédiatement après l'avoir retiré du dessiccateur à 0.1 mg (W2).
- 6.4 Digestion.
- NOTE: Porter des lunettes de sécurité et des gants lors du travail avec l'acide sulfurique à 72%.**
- 6.4.1 Ajouter 10 ml d'acide sulfurique à 72% (5.3) dans chaque creuset et mélanger prudemment avec une tige de verre afin de briser tous les agrégats (voir remarque 9.3)
- 6.4.2 Remplir à moitié les creusets avec l'acide et mélanger toutes les 30 minutes.
- 6.4.3 Après 3 heures, retirer par filtration sous vide autant d'acide que possible et laver les contenus avec de l'eau distillée chaude jusqu'à disparition de l'acide.
- 6.5 Second séchage
- 6.5.1 Placer les creusets dans un four (4.6) ajusté à 103 ± 2 °C et sécher pendant 4 heures. Le temps de séchage démarre lorsque le four atteint 103 °C.
- 6.5.2 Placer les creusets dans un dessiccateur (4.5) et laisser refroidir.
- 6.5.3 Peser immédiatement le creuset après retrait du dessiccateur à 0,1 mg près (W3).
- 6.6 Incinération
- 6.6.1 Placer les creusets dans le four à moufle (4.7), et incinérer les échantillons pendant 2 heures à $550 \text{ °C} \pm 20 \text{ °C}$. L'incinération démarre lorsque le four atteint 550 °C.
- 6.6.2 Placer les creusets dans un dessiccateur (4.5) et laisser refroidir.
- 6.6.3 Peser le creuset directement après retrait du dessiccateur à 0,1 mg près (W4).

7. Calcul

Pourcentage FAD (% FAD):

$$\% \text{ FAD} = (W2 - W4) \times 100 / W1$$

Pourcentage LAD (% LAD)

$$\% \text{ LAD} = (W3 - W4) \times 100 / W1$$

où,

W1 = poids échantillon (g),

W2 = poids creuset et résidu après premier séchage (g),

W3 = poids creuset et résidu après second séchage (g), et

W4 = poids du creuset et résidu après incinération (g).

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un standard de contrôle sera analysé (échantillon CQ). Les échantillons de laboratoire CQ peuvent provenir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, broyer jusqu'à passage par un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter ± 2 SD pour obtenir une portée acceptable.

Les échantillons seront analysés en doublons. La différence de deux déterminations parallèles de même échantillon ne pourra pas dépasser:

0,3% en valeurs absolues pour des contenus < 10%,

3% par rapport à la valeur la plus élevée pour des contenus $\geq 10\%$.

9. Remarques

- 9.1 Pour la détermination de la FAD, des méthodes disponibles appliquent le lavage automatique de sacs avec les réactifs décrits. Pour effectuer ces méthodes, suivre les instructions du fabricant. Leur utilisation peut conduire à des résultats différents par rapport à ceux obtenus avec la méthode par filtration.
- 9.2 Une incubation complémentaire avec de l'amylase peut être utilisée pour enlever les restes d'amidon non soluble dans le résidu.
- 9.3 Prendre soin de ne pas endommager le verre fritté du creuset en utilisant la tige de verre.
- 9.4 Certains laboratoires omettent l'étape d'incinération (6.6). En ce cas, le résidu insoluble en détergent acide (RPA) est déterminé comme la somme de la FAD et de la fraction rémanente de cendres.

Pourcentage RDA (% RDA):

$$\% \text{ RDA} = (W2 - W0) \times 100 / W1$$

où,

W0 est le poids du creuset vide obtenu à l'étape 6.1.1. Si la correction n'est pas effectuée, il faut la mentionner dans le rapport.

- 9.5 Si sont rencontrés des problèmes de filtration, une couche de sable de mer peut être utilisée en appui.

10. Références bibliographiques

- AOAC 973.18.** 2010. *Fiber (acid detergent) and lignin (H_2SO_4) in animal feed*. Gaithersburg, MD, USA.
- Robertson, J.B. & Van Soest, P.J.** 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods, In *The Analysis of Dietary Fibre in Food*, Vol 3. Chapter 8, (W.P.T. James and O. Theander, eds.). Marcel Dekker, Inc.: New York.
- Van Soest, P.J. & Srobertson, J.B.** 1985. Analysis of forage and fibrous foods. In *A Laboratory Manual for Animal Science* 613. Cornell University, Ithaca, New York, USA.

AMIDON – ENZYMATIQUE

1. Principe

L'amidon est déterminé par extraction préliminaire de l'échantillon dans 40% d'éthanol afin de déplacer les sucres solubles, suivie par la stabilisation de l'amidon dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO) et par conversion quantitative de l'amidon en glucose par l'amyloglucosidase. Le glucose libère est mesuré spectrométriquement par la méthode de l'hexokinase.

2. Portée

La méthode peut être utilisée pour tous les aliments pour animaux avec un contenu en amidon > 2% (voir remarque 9.1).

3. Responsabilité

Le Technicien de laboratoire effectuera les analyses suivant cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées dans la méthode sont remplies et strictement respectées. Toutes déviations par rapport à la méthode prescrite seront enregistrées et notifiées au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance pour analyse, précise à 0.1 mg près.
- 4.2 Centrifugeuse de laboratoire, d'une capacité de 3000 tours.
- 4.3 Bain Marie capable d'être maintenu à 60 ± 1 °C.
- 4.4 Bain Marie avec ébullition à 95-100 °C.
- 4.5 Mixer Vortex.
- 4.6 PH mètre.
- 4.7 Spectrophotomètre.

5. Réactifs

- 5.1 Éthanol, 40%
Mélanger éthanol et eau distillée en proportions 2/3.
- 5.2 Diméthyle sulfoxyde 90% (DMSO)
Mélanger DMSO pur et eau distillée en proportions 9/1.
- 5.3 Acide hydrochlorique, 12 M.
- 5.4 Solution aqueuse d'Hydroxyde de sodium, 4 M
Peser 40 g NaOH dans un flacon volumétrique de 250 ml et porter à volume avec de l'eau distillée H₂O.
- 5.5 Solution d'acide acétique, 2 M
Verser environ 200 ml d'eau distillée et 59 ml d'acide acétique dans un flacon volumétrique de 500 ml. Porter à volume avec de l'eau distillée.
- 5.6 Solution d'acétate de Sodium, 2 M
Dissoudre 82 g d'acétate de sodium dans environ 300 ml d'eau distillée dans un flacon volumétrique de 500 ml. Porter à volume avec de l'eau distillée.
- 5.7 Tampon acétate de sodium, 2 M, pH = 4.8
Mélanger 41 ml d'acide acétique (5.5) avec 59 ml de solution d'acétate de sodium (5.6). Contrôler le pH et ajuster si nécessaire.

- 5.8 Solution hexacyanoferrate de Potassium (II) 0,25 M
Dans un flacon volumétrique de 1 litre, dissoudre 106 g d'hexacyanoferrate de Potassium trihydrate et 30 g d'acide acétique glacial dans de l'eau distillée et ensuite diluer à volume avec de l'eau distillée.
- 5.9 Acétate de zinc (1 M) dans 0,5 M acide acétique
Dans un flacon volumétrique de 1 litre, dissoudre 219,5 g d'acétate de zinc déshydrate et 30 g d'acide acétique glacial dans de l'eau distillée et diluer à volume avec de l'eau distillée.
- 5.10 Solution d'iode dans de l'iodure de potassium
Dans un flacon volumétrique de 1 litre, dissoudre 12,7 g d'iode et 24 g d'iodure de potassium dans de l'eau distillée et dissoudre à volume avec de l'eau distillée.
- 5.11 Solution standard de glucose
Pour des échantillons contenant 200-1000 g/kg d'amidon. Préparer trois solutions séparées de glucose (0,0194 M). Dans chaque flacon volumétrique de 1000 ml, dissoudre 350 mg \pm 1 mg de glucose anhydre, diluer à volume avec de l'eau distillée.
Pour des échantillons contenant 40-200 g/kg d'amidon. Préparer trois solutions séparées de glucose (0,0039 M). Dans un flacon volumétrique de 500 ml, dissoudre 350 mg \pm 1 mg de glucose anhydre, diluer à volume avec de l'eau distillée.
- 5.12 Solution d'amyloglucosidase 160 U/ml (AMG)
Dissoudre dans un mélange de 9 ml d'H₂O distillée + 1 ml de tampon d'acétate de sodium (5.7), 267 mg d'AMG (EC 3.2.1.3 (*Aspergillus niger*, Roche Diagnostics, No.1 202 367, 6 U/mg). Suivre instructions de stockage fournies par le fabricant.
NOTE: 1 unité d'AMG va libérer 1 μ mol de glucose à partir de glycogène en 1 minute à 25 °C à un pH 4.75.
- 5.13 Un kit de test UV G-Glucose pour quantifier par enzymes le glucose par la méthode à l'hexokinase (R-Biopharm, No. 10 716 251 035) conformément aux instructions du fabricant. Les kits non utilisés peuvent être utilisés pendant 1 an à 4 °C.
D'autres kits commerciaux de test pour la détermination du glucose basée sur la méthode à l'hexokinase peuvent également être employés.

6. Procédure

- 6.1 Extraction du sucre libre
- 6.1.1 Peser environ 0,2 g de l'échantillon 0,1 mg (W) dans un tube à centrifugation (4.2).
- 6.1.2 Ajouter 10 ml éthanol à 40% (5.1), mélanger bien au mixeur et agiter pendant 10 minutes.
- 6.1.3 Centrifuger pendant 10 minutes à 3000 tours et éliminer le liquide surnageant.
- 6.1.4 Répéter les étapes 6.1.2 et 6.1.3.
- 6.2 Désintégration de l'amidon
Inclure un tube vide comme blanc à ce moment de la méthode.
- 6.2.1 Ajouter 15 perles de verre dans le tube à centrifugation (6.1.4) et ajouter 10 ml de solution de DMSO (5.2) en mélangeant au vortex en continu (voir remarque 9.3), fermer le tube avec un bouchon à visser.
- 6.2.2 Agiter les tubes au Bain-Marie à ébullition pendant 30 minutes.

- 6.2.3 Retirer les tubes, laisser refroidir, ajouter 1,7 ml acide hydrochlorique (5.3) en utilisant une pipette et mélanger correctement.
- 6.2.4 Fermer les tubes et agiter pendant 30 minutes dans un Bain-Marie ajusté $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.2.5 Refroidir le tube et transférer quantitativement dans un flacon volumétrique de 100 ml.
- 6.2.6 Ajouter 5,0 ml d'hydroxyde de sodium aqueux (5.4) et 2,5 ml de tampon à l'acétate de sodium (5.7) et mélanger la solution avec soin. Ajuster, si nécessaire le pH, à $4,8 \pm 0,1$ avec de l'acide chlorhydrique dilué ou de l'hydroxyde de sodium. Porter à volume de 100 ml avec de l'eau distillée.
- 6.3 Conversion enzymatique de l'amidon en glucose
- 6.3.1 Pipeter 5,0 ml de la solution (6.2.6) dans un autre tube à centrifugation et ajouter 0,125 ml de la solution enzymatique d'AMG (5.12). Fermer le tube et mélanger soigneusement.
- 6.3.2 Incuber pendant 16 heures dans un bain-marie ajusté à $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.3.3 Ensuite, placer les tubes dans un bain-marie bouillant pendant 15 minutes pour arrêter la réaction.
- 6.3.4 Refroidir les tubes à température ambiante et ajuster 0,125 ml de solution d'hexacyanoferrate de potassium (II) (5.8) et agiter pendant 1 minute.
- 6.3.5 Ajouter 0,125 ml de solution d'acétate de zinc (5.9), agiter pendant 1 minute, centrifuger pendant 10 minutes à 3000 tours.
- 6.3.6 Transférer le liquide surnageant dans un autre tube (voir remarque 9.4).
- 6.4 Détermination enzymatique du contenu en glucose
- 6.4.1 Diluer respectivement 0,5 ml des liquides surnageants (6.3.6), des standards (5.11), et du blanc avec 9,5 ml d'eau distillée pour un contenu en amidon $>200\text{ g/kg}$. Dans le cas d'un contenu en amidon plus faible, un volume plus élevé de lipides surnageant sera prélevé et le volume porté à 10 ml avec de l'eau distillée.
- 6.4.2 Mesurer le glucose des solutions diluées par la méthode de l'hexokinase en suivant les instructions du fabricant. Mesurer l'absorbance à 340 nm au spectrophotomètre.

7. Calcul

Calculer le contenu en glucose dans la solution mesurée par régression linéaire. Le pourcentage d'amidon est calculé comme:

$$\% \text{ amidon} = (C \times V \times DF \times 162/180) / (W \times 10)$$

où,

C = concentration glucose dans la solution mesurée (mg/l),

V = volume de la solution (en litre, i.e. 0,1),

DF = facteur de dilution (4 ou 10),

162/180 = facteur pour convertir le glucose en amidon,

W = poids de l'échantillon (g), et

10 = facteur pour convertir g/kg en %

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un standard de contrôle sera analysé (échantillon CQ). Les échantillons de laboratoire CQ peuvent provenir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, broyer jusqu'à passage par un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter ± 2 DS pour obtenir une portée acceptable.

Les échantillons seront analysés en doublons. La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon sera $< 0,5\% + 1\%$ par rapport à la moyenne des valeurs dupliquées. Par exemple, si la moyenne est de 12%, la différence entre les doublons ne pourra être plus élevée que 0,5% plus 0,12% (1% de 12%) i.e. 0,62%.

9. Remarques

- 9.1 Un traitement technologique peut induire la dégradation de l'amidon en oligomères de glucose (dextrines) qui ne sont pas mesurés par cette méthode.
- 9.2 Il est recommandé de broyer l'échantillon jusqu'à passer par un tamis à mailles de 0,5 mm pour la détermination d'amidon.
- 9.3 Une homogénéisation/mélange pendant l'addition de PMSO est nécessaire pour prévenir la formation de grumeaux.
- 9.4 Pour contrôler si tout l'amidon est converti, un test à l'iode peut être pratiqué. Ajouter quelques ml d'eau distillée au tube, faire bouillir pendant 10 minutes, refroidir et ajouter 2 ml d'iode (5.10). Une couleur bleue indique la présence d'amidon et, donc, une conversion incomplète. En ce cas, l'analyse sera répétée.
- 9.5 Si le contenu en amidon de l'échantillon est inconnu, la mesure sera effectuée en appliquant deux taux de dilution. Les résultats devront coïncider au moins avec les exigences des doublons.

10. Interférences, dépannage et sécurité

- 10.1 Réactifs et solutions seront préparés avec des eaux de laboratoire non purifiées.
- 10.2 L'efficacité des enzymes et les conditions doivent être validées.
- 10.3 Les concentrations de $>0,50$ de glucose dans les préparations enzymatiques peuvent causer des lectures d'absorbance dues au contexte et interférer avec les mesures de l'échantillon.

11. Références bibliographiques

ISO 15904. 2004. *Animal feeding stuffs – Enzymatic determination of total starch content.* Geneva, Switzerland.

Commission Regulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. *Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.* Annex III, L, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009 – Polarimetric method for the determination of starch.

RÉDUCTION DES SUCRES – MÉTHODE DE LUFF SCHOOL

1. Principe

Les sucres sont extraits dans de l'éthanol dilué et la solution est clarifiée avec les solutions Carrez I et II. Après avoir retiré l'éthanol, les sucres à réduire sont déterminés en utilisant le réactif de Luff-School.

Cette méthode détermine la quantité des sucres à réduire et, après conversion, le total des sucres, exprimé en glucose ou, lorsqu'il est approprié, en sucre, en convertissant par le facteur 0,95.

2. Portée

Applicable aux ingrédients, incluant les aliments composés pour le bétail.

3. Responsabilité

Le Technicien de laboratoire effectuera les analyses suivant cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées dans la méthode sont remplies et strictement respectées. Toutes déviations par rapport à la méthode prescrite seront enregistrées et notifiées au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance pour analyse, précise à 0.1 mg près.
- 4.2 Mixer, environ 35 à 40 t/m.
- 4.3 Unité de titration.

5. Réactifs

- 5.1 Solution éthanol 40% (v/v), densité: 0,948 g/ml à 20 °C, neutralisée par une solution de phénolphtaléine à 1% (5.18). (Si nécessaire, ceci peut être réalisé en plaçant la solution d'éthanol sur une plaque vibrante et en ajoutant goutte à goutte NaOH 5 M jusqu'à ce que l'eau tourne au rose. Ajouter H₂SO₄ 0,5 M goutte à goutte, prudemment jusqu'à ce que le rose se clarifie puis retourne au rose avec NaOH 0.5 M).
- 5.2 Solution de Carrez I
Dissoudre 21,9 g d'acétate Zn(CH₃COO)₂.2 H₂O et 3 g d'acide acétique glacial dans de l'eau distillée. Porter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- 5.3 Solution de Carrez II
Dissoudre 10,6 g de ferrocyanure de potassium K₄Fe(CN)₆.3 H₂O dans de l'eau distillée. Porter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- 5.4 Solution de méthyle orange, 0.1% (w/v).
- 5.5 Acide chlorhydrique 4 M.
- 5.6 Acide chlorhydrique 0,1 M.
- 5.7 Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M.
- 5.8 Solution de sulfate de cuivre
Dissoudre 25 g de sulfate de cuivre, CuSO₄.5 H₂O, exempt de fer, dans 100 ml d'eau distillée.
- 5.9 Solution d'acide citrique
Dissoudre 50 g d'acide citrique, C₆H₈O₇.H₂O dans 50 ml d'eau distillée.

- 5.10 Solution de carbonate de sodium
Dissoudre 143.8 g de carbonate de sodium anhydre dans environ 300 ml d'eau distillée chaude. Laisser refroidir.
- 5.11 Réactif de Luff-Schoorl
En agitant, verser prudemment la solution d'acide citrique (5.9) dans la solution de carbonate de sodium (5.10). Ajouter la solution de sulfate de cuivre (5.8) et porter à 1 litre avec de l'eau distillée. Laisser reposer la nuit et filtrer. Contrôler la concentration du réactif obtenu (Cu 0.05 M; Na₂CO₃ 1 M), voir (6.4) dernier paragraphe. Le pH de la solution sera environ 9,4.
- 5.12 Solution de thiosulfate de sodium, 0,1 M
Dissoudre 24.8 g de Na₂S₂O₃·5H₂O dans un flacon de 1 L et porter à volume avec de l'eau distillée.
- 5.13 Solution d'amidon
Ajouter un mélange de 5 g d'amidon soluble dans 30 ml d'eau distillée à 1 l d'eau distillée bouillante. Laisser bouillir pendant 3 minutes, laisser refroidir et, si nécessaire, ajouter 10 mg d'iodure de mercure comme préservant.
- 5.14 Acide sulfurique, 3 M.
- 5.15 Solution 30% d'iodure de potassium (w/v).
- 5.16. Pierre ponce en granulés (peut s'obtenir par exemple auprès de Sigma-Aldrich), bouillie dans l'acide chlorhydrique, lavée à l'eau distillée et séchée.
- 5.17 3-méthylbutan-1-ol.
- 5.18 1% Phénolphtaléine
Peser 1 g phénolphtaléine dans 1 bécher de 200 ml, ajouter 60 ml d'alcool, 40 ml d'eau distillée et mélanger.

6. Procédure

- 6.1 Extraction de l'échantillon
- 6.1.1 Peser approximativement 2.5 g de l'échantillon à 0,1 mg près et introduire dans un flacon volumétrique de 250 ml.
- 6.1.2 Ajouter 200 ml d'éthanol (5.1) et agiter pendant 1 heure.
- 6.1.3 Ajouter 5 ml de Solution de Carrez (5.2) et agiter pendant environ 30 secondes.
- 6.1.4 Ajouter 5 ml de Solution de Carrez II (5.3) et agiter pendant environ 1 minute.
- 6.1.5 Porter à 250 ml avec de l'éthanol (5.1), mélanger soigneusement et filtrer.
- 6.1.6 Retirer 200 ml du filtrat et évaporer jusqu'à moitié du volume afin de déplacer la majorité de l'éthanol.
- 6.1.7 Transférer quantitativement le résidu évaporé dans un flacon volumétrique de 200 ml en utilisant de l'eau distillée chaude, refroidir, porter à volume avec de l'eau distillée, mélanger soigneusement et filtrer si nécessaire.
Cette solution sera utilisée pour déterminer la quantité de sucres à réduire et, après inversion, du total de sucres à réduire.
- 6.2 Détermination des sucres réducteurs.
- 6.2.1 Avec une pipette, retirer au plus 25 ml de la solution (6.1.7) contenant moins de 60 mg de sucres réducteurs exprimés en glucose (voir remarque 9.4).
- 6.2.2 Déterminer le contenu de sucre réducteur dans la solution par la méthode de Luff-Schoorl (6.4).

- 6.3 Détermination des sucres réducteurs après inversion.
 - 6.3.1 Au moyen d'une pipette, transférer 50 ml de la solution (6.1.7) dans un flacon volumétrique de 100 ml.
 - 6.3.2 Ajouter prudemment quelques gouttes de solution de méthyl orange (5.4), et, en agitant sans arrêt, ajouter de l'acide chlorhydrique (5.5) jusqu'à ce que le liquide se maintienne au rouge.
 - 6.3.3 Ajouter 15 ml d'acide chlorhydrique (5.6) et immerger le flacon dans un bain contenant de l'eau en vigoureuse ébullition pendant 30 minutes.
 - 6.3.4 Refroidir rapidement jusqu'à environ 20 °C et ajouter 15 ml de solution d'hydroxyde de sodium (5.7). Un bain de glace peut être employé pour le refroidissement.
 - 6.3.5 Porter à 100 ml avec de l'eau distillée et mélanger avec soin.
 - 6.3.6 Retirer au maximum 25 ml contenant moins de 60 mg de sucres réducteurs exprimés en glucose (voir remarque 9.4).
 - 6.3.7 Déterminer le contenu des sucres réducteurs dans la solution par la méthode de Luff-Schoorl (6.4).
- 6.4 Titration par la méthode de Luff-Schoorl
 - 6.4.1 Au moyen d'une pipette, transférer 25 ml du réactif de Luff-Schoorl (5.11) dans un flacon Erlenmeyer de 300 ml.
 - 6.4.2 Ajouter exactement 25 ml de la solution de sucre clarifiée.
 - 6.4.3 Ajouter 2 granules de pierre ponce (5.16), chauffer sur une flamme libre de hauteur moyenne et porter le liquide à ébullition en 2 minutes environ. Pendant le chauffage, maintenir à la main la solution en mouvement.
 - 6.4.4 Placer immédiatement l'Erlenmeyer sur un bâti d'asbeste revêtu de gaze avec un trou d'environ 6 cm de diamètre sous lequel a été allumée une flamme. Cette dernière sera réglée de manière à ce que seule soit chauffée la base de l'Erlenmeyer.
 - 6.4.5 Fixer un condensateur à reflux sur l'Erlenmeyer. Faire bouillir pendant exactement 10 minutes.
 - 6.4.6 Refroidir immédiatement dans de l'eau froide et, après environ 5 minutes, démarrer la titration.
 - 6.4.7 Ajouter 10 ml de solution d'iodure de potassium (5.15) et immédiatement après, (prudemment, à cause des risques de mousses abondantes), ajouter 25 ml d'acide sulfurique (5.14).
 - 6.4.8 Titrer avec la solution de thiosulfate (5.12) jusqu'à ce qu'apparaisse un contenu jaune pâle, ajouter l'indicateur d'amidon (5.13), compléter la titration et enregistrer le volume utilisé (Vs).
 - 6.4.9 Effectuer la même titration sur un mélange exactement mesuré de 25 ml de réactif Luff-Schoorl (5.8), 25 ml d'eau, 10 ml de solution d'iodure de potassium (5.15) et 25 ml d'acide sulfurique (5.14) sans bouillir et enregistrer le volume utilisé (Vb).

7. Calcul

Pour chaque échantillon, calculer la différence entre les volumes de titration utilisés pour le blanc (Vb) et l'échantillon (Vs). Employer le Tableau 2 pour traduire la différence (exprimée

TABLEAU 2

Valeurs pour 25 ml de réactif Luff-Schoorlml de Na₂S₂O₃ (0.1 M), 2 minutes au chauffage, 10 minutes d'ébullition

Na ₂ S ₂ O ₃	Glucose, fructose, sucre inverti
0.1 M	C ₆ H ₁₂ O ₆
ml différence	mg
1	2,4
2	4,8
3	7,2
4	9,7
5	12,2
6	14,7
7	17,2
8	19,8
9	22,4
10	25
11	27,6
12	30,3
13	33
14	35,7
15	38,5
16	41,3
17	44,2
18	47,1
19	50

dans la première colonne) en quantité correspondante de glucose en mg (exprimée dans la seconde colonne). Exprimer le résultat en pourcentage de l'échantillon:

Contenu glucose [%] = quantité glucose [mg] / (poids échantillon [g] x 10)

Exemple: Pour chaque détermination, les deux volumes pris correspondant à un échantillon de 250 mg. Dans le 1^{er} cas, 17 ml de solution de thiosulfate de sodium (0,1M) correspondant à 44,2 mg de glucose consommé; et dans le 2^{ème}, 11 ml correspondant à 27,6 mg de glucose.

La différence est de 16,6 mg de glucose. Le contenu de sucres réducteurs (à l'exclusion du lactose) calculé en glucose est donc:

Contenu glucose [%] = 16,6 mg / (0,25 g x 10 g) = 6,64%

NOTE: La différence entre le contenu total des sucres réducteurs après inversion (exprimé en glucose) et le contenu de sucres réducteurs (exprimé en glucose), multipliée par 0,95 donne le contenu de sucre en pourcentage.

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un standard de contrôle sera analysé (échantillon CQ). Les échantillons de laboratoire CQ peuvent provenir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, broyer jusqu'à passage par un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter ± 2 DS pour obtenir une portée acceptable.

Les échantillons seront analysés en doublons. La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles pratiqués sur le même échantillon devra être $<12\%$ par rapport à la valeur la plus haute.

9. Remarques

- 9.1 Dans le cas d'aliments pour animaux riches en mélasse ou non particulièrement homogènes, peser 20 g et introduire dans un flacon volumétrique de 1 L avec 500 ml d'eau distillée. Mélanger pendant 1 heure dans un mixer. Clarifier en utilisant les réactifs Carrez I (5.2) et II (5.3) comme décrit en 6.1; cette fois cependant en utilisant quatre fois les quantités de chaque réactif. Porter au volume de 1 litre avec l'éthanol aqueux à 80% (v/v). Mélanger avec soin et filtrer. Éliminer l'éthanol comme décrit en 6.1. S'il n'y a pas d'amidon dextrinisé, porter au volume de 1 litre avec de l'eau distillée.
- 9.2 Dans le cas de mélasses ou de matériaux d'aliments pour animaux riches en sucre et quasiment exempts d'amidon (p.ex. caroubes, cossettes sèches de betteraves, etc.) peser 5 g, introduire dans un flacon volumétrique de 250 ml, ajouter 200 ml d'eau distillée et mélanger dans un mixer pendant 1 heure ou plus si nécessaire. Clarifier en utilisant les réactifs Carrez I (5.2) et II (5.3) comme décrit en 6.1. Porter à volume avec de l'eau distillée froide, mélanger avec soin et filtrer. Afin de déterminer la quantité totale de sucres, continuer comme décrit en 6.3.
- 9.3 Du fait que le lactose est également un sucre réducteur, cette méthode capture aussi le contenu de lactose. Dans le cas de substituants de lait ou autres aliments pour animaux contenant lait ou produits laitiers, on notera que le contenu en sucres réducteurs concerne également le lactose.
- 9.4 Si le contenu en sucre réducteur dans la portion de 25 ml est trop élevé, un aliquot plus petit sera pris de la solution. Le volume total sera ajusté à 25 ml par addition d'eau distillée.

10. Interférences, dépannage et sécurité

Afin de prévenir la formation de mousse, il est recommandé d'ajouter (indépendamment du volume) environ 1 ml of 3-méthylbutan-1-ol (3.14) avant de faire bouillir avec le réactif de Luff-Schoorl.

11. Référence bibliographique

Commission Regulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. *Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.* Annex III, J, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009.

ÉNERGIE BRUTE

1. Principe

L'énergie brute est mesurée par combustion d'un échantillon en présence d'un surplus d'oxygène dans une bombe calorimétrique sous des conditions standard. La valeur calorifique brute est calculée à partir de l'augmentation de température de l'eau dans le réservoir du calorimètre et la moyenne calorifique effective du calorimètre.

2. Portée

Cette méthode s'applique pour tous les aliments pour animaux (voir remarque 9.1).

3. Responsabilité

Le Technicien de laboratoire effectuera les analyses suivant cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées dans la méthode sont remplies et strictement respectées. Toutes déviations par rapport à la méthode prescrite seront enregistrées et notifiées au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance, précise à 0,1 g, d'une capacité de 5000 g.
- 4.2 Balance d'analyse, précise à 0,1 mg près.
- 4.3 Bombe calorimétrique automatique, adiabatique.
- 4.4 Unité de fourniture d'oxygène.
- 4.5 Unité de titration (optionnelle).

5. Réactifs

- 5.1 Ficelle de coton.
- 5.2 Fil de platine.
- 5.3 Acide benzoïque (tablettes de combustion ou cristaux standard, non purifiés).
- 5.4 Indicateur Phénolphthaleïne (0,1% dans 95% éthanol).
- 5.5 Hydroxyde de Baryum, 0,1 N (17.13 g/litre).
- 5.6 Carbonate de sodium, 0,1 N (14.2 g/litre).
- 5.7 HCl, 0,1 N (verser 500 ml dans un flacon d'1 L, ajouter 8,73 ml HCl concentré, diluer à 1 litre avec de l'eau distillée).
- 5.8 Méthyl orange.

6. Procédure

Avant de démarrer la procédure, vérifier également les instructions du fabricant.

La procédure se divise en trois parties. La première (6.1) décrit la détermination de l'équivalent hydrothermique de la bombe calorimétrique et doit être effectuée annuellement ou lorsqu'il survient au changement d'équipement comme l'emploi d'un nouveau réservoir ou après l'entretien de celui-ci.

La deuxième (6.2) partie décrit la procédure de mesure des échantillons. La troisième (6.3) décrit la détermination de l'acidité, facteur de correction pour la valeur observée. C'est au laboratoire de décider d'utiliser cette correction sur base de ses besoins de précision (voir remarque 9.2).

- 6.1 Déterminer l'équivalent hydrothermique (valeur de l'eau) de la bombe calorimétrique
 - 6.1.1 Utiliser un échantillon de valeur calorique connue (tablette de combustion à l'acide benzoïque) afin de déterminer l'équivalent hydrothermique (élévation de la température) en joules/degres) de la bombe, du réservoir, et de l'eau. Calculer l'élévation de température en appliquant la procédure ci-dessus. Faire quatre déterminations et calculer la valeur moyenne (cette valeur ne changera pas à moins de remplacement de certaines pièces).
 - 6.1.2 Sécher l'acide benzoïque (5.3) à 105 ± 2 °C pendant la nuit et refroidir au dessiccateur. Peser 1 g de cristaux secs d'acide benzoïque, en faire une tablette et repeser. Déterminer l'élévation de température à partir de la combustion de l'acide benzoïque dans la bombe calorimétrique.
 - 6.1.3 Pour les calculs requis pour la détermination de l'équivalent hydrothermique, incluant les corrections pour la ficelle de coton, le fil de platine, et la chaleur libérée dans la formation de l'acide (voir 7. Calcul).
- 6.2 Mesure des échantillons
 - 6.2.1 Peser environ 1 g d'échantillon à 0,1 mg près (W1) (voir remarque 9.1) et l'introduire dans la coupelle de combustion.
 - 6.2.2 Attacher 10 cm de fil de platine (5.2) entre les électrodes de la bombe et installer le creuset de combustion avec l'échantillon dans la boucle de l'électrode
 - 6.2.3 Attacher 6,5 cm de ficelle de coton au milieu du fil. Ajuster la ficelle de sorte qu'elle touche l'échantillon.
 - 6.2.4 Assembler la bombe, serrer le bouchon à vis, fermer la valve de pression et remplir d'oxygène jusqu'à 25-30 atmosphères.
 - 6.2.5 Peser 2000 g d'eau distillée dans le réservoir de calorimètre et placer celui-ci dans le calorimètre. Installer la bombe dans le réservoir et attacher la pince terminale.
 - 6.2.6 Fermer le couvercle, abaisser les thermomètres et démarrer le moteur de circulation d'eau. Retirer le bouchon du couvercle de la gaine et remplir le couvercle d'eau jusqu'à ce qu'elle s'écoule du tuyau de drainage.
 - 6.2.7 Ajuster la température de l'eau dans la gaine extérieure jusqu'à ce qu'elle soit approximativement égale à celle du calorimètre en ajoutant de l'eau chaude ou froide, et laisser une minute pour atteindre l'équilibre.
 - 6.2.8 Lire et enregistrer la température initiale au 0,002 °C près et enflammer l'échantillon. Attendre jusqu'à une élévation maximale de la température, lire et enregistrer la température finale. Ceci peut également être réalisé automatiquement par l'appareil.
 - 6.2.9 Ouvrir le calorimètre, enlever la bombe du réservoir, libérer la pression résiduelle de la bombe et ouvrir.
- 6.3 Détermination de l'acidité (voir remarque 9.2)
 - 6.3.1 Après achèvement de la combustion, retirer la bombe, relâcher la pression et ouvrir. Rincer toutes les surfaces internes de la bombe avec un jet d'eau distillée, collecter tous les résidus du lavage dans un bécher propre et faire un lavage jusqu'à 100 ml.
 - 6.3.2 Filtrer et faire bouillir pour enlever le dioxyde de carbone.

- 6.3.3 Titrer le filtrat chaud à la phénolphthaléine (5.4) jusqu'au point terminal avec de l'hydroxyde de baryum 0,1 N (5.5) (A).
- 6.3.4 Ajouter 20 ml de carbonate de sodium 0,1 N (5.6) (B), filtrer le précipité et laver à l'eau distillée.
- 6.3.5 Refroidir et titrer avec HCl 0,1 N (5.7) (C) en utilisant du méthyl orange (5.8) comme indicateur.

7. Calcul

7.1 La formule pour le calcul de l'équivalent hydrothermique (He) de la bombe est:

$$He = \frac{W \times A - (L \times C) - 14}{T_f - T_i}$$

où,

- He = équivalent hydrothermique (J/°C),
 W = poids de l'échantillon d'acide benzoïque (g),
 A = joules par gramme d'acide benzoïque, i.e. 26442 J/g,
 L = poids de la ficelle de coton (g),
 C = joules par g. coton, i.e. 17500 J/g,
 14 = correction pour formation d'acide (J),
 Tf = température finale, et
 Ti = température initiale.

Pour la ficelle de coton, peuvent être employées, les valeurs fournies par les fournisseurs.

La correction pour la combustion du fil de platine est très petite et peut être négligée.

La valeur pour la formation d'acide est également faible et fixée à 14 J. cette valeur peut aussi être mesurée en suivant la procédure 6.3 avec 1 ml d'eau distillée et calculer la valeur de correction comme décrit en 7.3.

7.2 La formule utilisée pour le calcul du contenu en énergie brute (EB) des échantillons:

$$EB \text{ (kJ/g)} = \frac{(T_f - T_i) \times He}{W}$$

où,

- Tf = température finale (°C),
 Ti = température initiale (°C),
 W = poids échantillon (g), et
 He = équivalent hydrothermique (J/°C)

Exprimer les résultats en kJ/g.

7.3 Calcul du facteur de correction acide

Le calcul de la correction du facteur acide est fourni par:

$$\text{Correction pour acide nitrique (J)} = 6.0 (B - C)$$

$$\text{Correction pour acide sulfurique (J/W)} = \frac{15.1 (A - (B - C))}{W}$$

Les corrections sont 94.6 J pour 0,01 g (1%) du soufre dans le fuel et 6 J/ml d'acide nitrique 0,1 N formé.

Le facteur sera utilisé à la place de la valeur fixe de 14 J.

8. Contrôle de la qualité

L'acide benzoïque et un échantillon de contrôle seront testés avec chaque lot quotidien.

Dans chaque lot, un standard de contrôle sera analysé (échantillon CQ). Les échantillons de laboratoire CQ peuvent provenir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, broyer jusqu'à passage par un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter ± 2 DS pour obtenir une portée acceptable. Les échantillons seront analysés en doublons. Les différences entre les valeurs de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon seront $\leq 0,5\%$ par rapport au résultat le plus élevé.

9. Remarques

- 9.1 Pour les échantillons lipides, 5-10 g seront pesés dans un sachet et séchés dans un four à vide ou séchés sous congélation avant l'analyse.
- 9.2 Une variation dans la formation d'acide n'a qu'un très faible effet sur les valeurs trouvées. Dès lors, la plupart des laboratoires utilisent une valeur fixe (i.e. 14 J) pour la correction acide.

10. Références bibliographiques

Hill, W.H., Seals, J. & Montiegel, E. 1958. Destruction of animal and vegetable tissue by combustion in a Parr oxygen bomb. *Am. Ind. Hyg. J.* 19: 378-81.

ISO 9831. 1998. *Animal feeding stuffs, animal products, and faeces or urine – Determination of gross calorific value – Bomb calorimeter method.* Geneva, Switzerland.

Parr Manual 120. 1948. *Oxygen bomb calorimetry and oxygen bomb combustion methods.* Parr Instrument Company, Moline, IL, USA.

ACIDES GRAS VOLATILES (AGV) DANS L'ENSILAGE – CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)

1. Principe

Un extrait aqueux de l'ensilage est acidifié et centrifugé. Les alcools et acides gras volatils (AGV) sont séparés dans la colonne de chromatographie en relation avec leurs poids moléculaire et alors détectés, identifiés, amplifiés, et intégrés au sein de leurs zones.

2. Portée

La procédure pour la détermination des alcools et des acides gras volatils s'applique uniquement aux ensilages.

3. Responsabilité

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Chromatographe liquide gazeux fourni avec un détecteur à ionisation par flamme.
- 4.2 Colonne capillaire EC-1000 (L = 30 m, ID = 0,53 mm) avec une phase stationnaire de polyéthylène glycol modifié par l'acide (épaisseur = 1,20 μm) (voir remarque 9.1).
- 4.3 Intégrateur (logiciel ou enregistreur de charte).
- 4.4 Centrifugeuse.
- 4.5 Mixer vortex.
- 4.6 Balance précise à 0,1 g.

5. Réactifs

- 5.1 Acide oxalique déshydraté (solvant); faire des solutions de 0,12 M et 0,03 M.
- 5.2 so-butanol 99,9% (standard interne pour alcool); faire une solution de 10 $\mu\text{mol/ml}$.
- 5.3 Acide Iso-caproïque 9,0% (standard interne pour VFA); faire une solution de 10 $\mu\text{mol/ml}$.
- 5.4 Mélange standard: pipeter 12,5 ml de solution d'acide oxalique (0,12 M) dans un flacon gradué de 50 ml et ajouter 65,40 μl d'acide acétique, 10,60 μl d'acide propionique, 5,02 μl d'acide iso butyrique, 13,00 μl d'acide butyrique, 2,48 μl d'acide iso valérique, 2,98 μl d'acide valérique, 4,00 μl de méthanol, 72,40 μl éthanol, 5,74 μl de propanol, 1,98 μl de butanol et porter à volume avec de l'eau distillée.
- 5.5 Faire un solvant à blanc (Bs): 5 ml de solution d'acide oxalique (0,03 M).
- 5.6 Faire un standard interne à blanc (Bis): 4 ml de solution d'acide oxalique (0,03 M) + 0,5 ml de solution d'iso butanol 0,5 ml de solution d'iso caproïque.
- 5.7 Préparer des standards de calibration: 3,5-3,0-2,5-2,0-1,5 ml du mélange standard (0,03 M) + 0,5 ml de solution d'iso butanol 0,5 ml de solution d'iso caproïque + 0,5 -1,0-1,5-2,0-2,5 ml du mélange standard (5.4).
- 5.8 Préparer un contrôle positif en ajoutant 0,2 ml de solution d'iso butanol (5.2) et 0,2 ml de solution iso caproïque (5.3) à 1,6 ml du mélange standard (5.4).

6. Procédure

- 6.1 Peser 100 g d'ensilage dans un flacon volumétrique d'1-L et ajouter de l'eau distillée jusqu'à la marque.
Laisser l'ensilage s'imprégner pendant 16 heures (une nuit) dans un réfrigérateur (2-8 °C). Filtrer à travers un papier filtre.
- 6.2 Analyser immédiatement ou mettre l'extrait dans le congélateur. Dans ce dernier cas, retirer l'extrait d'ensilage du congélateur et transférer dans un réfrigérateur (2-8 °C) un jour avant l'analyse.
- 6.3 Pipeter successivement 2,0 ml de la solution d'acide oxalique 0,3 M (5.1), 0,5 ml de solution d'iso butanol (5.2), 0,5 ml de solution d'iso caproïque (5.3) et 2 ml de l'extrait d'ensilage dans un tube de 10 ml. Mélanger au vortex (4.5). Centrifuger (4.4) à 2600 g pendant 5 minutes. Remplir une fiole avec 1,25 ml et asperger avec de l'azote.

- 6.4. Installer le chromatographe en phase gazeuse (4.1) en suivant des instructions du fabricant; entre autres: flux de gaz hélium à 7.2 ml/minute, Port injection à 220 °C, colonne à 200 °C et détecteur à 220 °C.
- 6.5. Une série démarre avec 2 solvants à blanc (5.5), puis un standard interne à blanc (5.6), ensuite un contrôle positif (5.8) et finalement un standard interne à blanc (5.6). Après 10 échantillons un contrôle successif entre un standard interne à blanc (5.6), un contrôle positif (5.8) et finalement un standard interne à blanc (5.6) sont analysés. La série s'achève avec l'analyse successive du standard interne à blanc (5.6), un contrôle positif (5.8) et finalement un standard interne à blanc (5.6).
- 6.6. Injecter 1 µl de l'échantillon préparé sur la grande colonne capillaire calibrée avec un injecteur à fente (fente 1/10) (4.2). Les composants volatiles sont séparés au moyen de l'hélium, gaz transporteur, et la phase polaire médiane stationnaire (polyéthylène glycol modifié à l'acide), en utilisant un gradient de température (80 °C pour 5 minutes, 10 °C/minute jusqu'à 200 °C et 200 °C pendant 8 minutes), et sont détectés par le détecteur à ionisateur à flamme.

NOTE: Entre deux injections, rincer la colonne par la solution d'acide oxalique (0,03 M).

7. Calcul

L'identification et la quantification des composants est basé sur la calibration du standard interne à plusieurs niveaux. Pour chaque composant le temps relatif de rétention et la surface sous le pic mesurés

Pour chaque composant, une courbe de calibration est établie. À partir de celle-ci est dérivée la concentration du composant (µmol/ml) dans l'échantillon, en prenant en compte le facteur de dilution. La concentration % dans l'ensilage, est calculée en multipliant par le poids moléculaire.

8. Contrôle de la qualité

Une inclusion fréquente des standards à blanc est requise entre les échantillons pour prévenir les effets de rétention sur l'analyse des échantillons suivants.

Une analyse fréquente du standard interne à blanc est requise pour évaluer les conditions chromatographiques.

Une analyse fréquente de l'échantillon de contrôle est requise pour vérifier l'identification et la quantification des composants.

Les échantillons seront analysés par doublons. La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon devra être < 5% de la valeur moyenne.

9. Remarques

- 9.1 D'autres types de colonnes de CQ capables de séparer alcool et acides gras volatils peuvent être utilisés.

10. Références bibliographiques

Block, H.-J. & Weissbach, F. 1982. Zur gaschromatografischen Bestimmung flüchtiger Fettsäuren in Silagen mit innerem Standard. *Arch. Tierernährung* 32 (9): 693-702.

- Fussell, R.J. & Mccalley, D.V.** 1987. Determination of volatile fatty acids (C₂ - C₅) and lactic acid in silage by gas chromatography. *Analyst* 112: 1213-1216.
- Jouany, J.P.** 1981. Dosage des acides gras volatils et des alcools dans les ensilages par chromatographie en phase gazeuse. *Bull. Techn. C.R.Z.V. Theix, I.N.R.A.* 46: 63-66.
- Jouany, J.P.** 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sciences des aliments* 2: 131-144.
- Ottenstein, D.M. & Bartley, D.A.** 1971. Improved gas chromatography separation of free acids C₂ - C₅ in dilute solution. *Anal. Chem.* 43 (7): 952-955.

ACIDE LACTIQUE DANS LES ENSILAGES – MÉTHODE ENZYMATIQUE

1. Principe

Dans un extrait aqueux de l'ensilage, l'acide lactique (D- et L-lactate) est oxydé par le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) en pyruvate en présence de lactate déshydrogénase (LDH). Une seconde réaction est catalysée par le glutamate pyruvate transaminase (GPT) afin de former de la NADH. Ceci est mesuré au spectrophotomètre à 340 nm, qui est stoechiométriquement équivalent à l'acide lactique présent.

2. Portée

La procédure pour déterminer l'acide lactique ne s'applique qu'aux ensilages.

3. Responsabilité

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Centrifugeuse.
- 4.2 Spectrophotomètre.
- 4.3 Balance précise à 0,1 g près

5. Réactifs

- 5.1 Kit d'enzymes pour détermination de l'acide lactique D- et L-.
- 5.2 Standard de lactate (D+L).

6. Procédure

- 6.1 Introduire 100 g d'ensilage dans un flacon volumétrique de 1-L et ajouter de l'eau distillée jusqu'à la marque. Laisser l'ensilage s'imprégner pendant 16 heures (une nuit) dans un réfrigérateur (2-8 °C). Filtrer à travers un papier filtre.
- 6.2 Analyser immédiatement ou mettre l'extrait dans le congélateur. Dans ce dernier cas, retirer l'extrait d'ensilage du congélateur et transférer dans un réfrigérateur (2-8 °C) un jour avant l'analyse.
- 6.3 Pipeter 5 ml de l'échantillon dans un tube plastique de 10 ml et centrifuger (4.1) à 3000 g pendant 5 minutes.

- 6.4 Toutes les solutions du kit d'enzymes (5.1) sont prêtes à l'emploi, à l'exception de la solution NAD-.
- 6.5 Transférer dans des cuvettes de quartz de 2 ml, la solution tampon, NAD, GPT, l'eau distillée, et l'échantillon selon les quantités spécifiées dans le kit. Inclure également un blanc et une solution standard (5.2).
- 6.6 Placer les cuvettes dans le spectrophotomètre (4.2) et lire l'absorbance après exactement 5 minutes (A1).
- 6.7 Ajouter la solution D-LDH dans les cuvettes, placer au spectrophotomètre et lire l'absorbance après exactement 40 minutes (A2).
- 6.8 Ajouter la solution L-LDH dans les cuvettes, placer au spectrophotomètre et lire l'absorbance après exactement 40 minutes (A3).
- 6.9 Si A3 est > 1, l'extrait doit être re-dilué.

7. Calcul

Acide lactique D- en g/l = $(A2 - A1) \times FD \times 0.3204$

Acide lactique L- en g/l = $(A3 - A2) \times FD \times 0.3232$

Corriger les résultats pour la matière sèche (MS) de l'échantillon:

Acide lactique D-/L- $\times (1000 - MS)/1000$

où,

A1 = absorbance après 5 minutes,

A2 = absorbance après addition de D-LDH,

A3 = absorbance après addition de L-LDH,

DF = facteur de dilution, et

MS = matière sèche en %.

Comme l'extrait est obtenu par dilution de 100 g d'échantillon dans 1 litre, le résultat est exprimé en % de l'ensilage.

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque série, la solution standard de lactate D- et L- sera analysée pour contrôler la précision.

Les échantillons seront analysés par doublons et les différences entre ceux-ci ne seront pas plus élevées que 2,8 fois la reproductibilité intra laboratoire. Cette dernière est calculée comme le coefficient de variation (déviation standard relative = DS en % moyenne) des résultats de 1 ou 2 échantillons d'ensilage analysés des jours différents et éventuellement par des techniciens de laboratoire différents.

9. Interférences et dépannage

- 9.1 Voir instructions dans le kit à enzymes.

10. Références bibliographiques

- Gawehn, K.** 1984. D-Lactic acid/L-Lactic acid. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 588-592. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.
- Noll, F.** 1966. Methode zur quantitativen Bestimmung van L(+)-Lactat mittels Lactat-Dehydrogenase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase, *Biochem. Z.* 346: 41-49.

Commission Regulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Annex III, K, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009 – Determination of Lactose using Titration.

URÉE – MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE

1. Principe

L'échantillon (ingrédient ou aliment pour animaux) est mis en suspension dans de l'eau distillée avec un agent clarifiant. Le contenu en urée est déterminé au spectrophotomètre après addition de 4-diméthyl- aminobenzaldehyde (4-DMAB).

2. Portée

La méthode est valable pour les aliments pour animaux et fourrages. Certains aliments pour animaux ont été additionnés d'urée comme source complémentaire d'azote. Cette méthode décrit la détermination d'urée, le contenu ammoniacal n'est pas concerné (voir remarque 9.4).

3. Responsabilité

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Mixer (tumbler), environ 35 à 40 tours/minutes.
- 4.2 Tubes de test, 160 mm × 16 mm avec des bouchons en verre dépoli.
- 4.3 Spectrophotomètre.

5. Réactifs

- 5.1 Solution de 4-diméthylaminobenzaldehyde (4-DMAB)
Dissoudre 1,6 g de 4-DMAB dans 100 ml d'éthanol aqueux à 96% et ajouter 10 ml de HCl (37% HCl ou $\rho_{20} = 1,19$ g/ml). Ce réactif peut être conservé au maximum pendant 2 semaines.
- 5.2 Solution Carrez I
Dissoudre 21,9 g d'acide de zinc, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O$ et 3 g d'acide acétique glacial dans de l'eau distillée. Porter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- 5.3 Solution Carrez II
Dissoudre 10,6 g de ferrocyanure de potassium, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ dans l'eau distillée. Porter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- 5.4 Charbon actif qui n'absorbe pas l'urée (vérifier avant utilisation).
- 5.5 Urée, solution 0,1% (w/v).

6. Procédure

- 6.1 Analyse échantillon
 - 6.1.1 Peser 2 g de l'échantillon à 1 mg près et introduire dans un flacon volumétrique de 500 ml avec 1 g de charbon actif (5.4).

- 6.1.2 Ajouter 400 ml d'eau distillée et 5 ml de solution Carrez I (5.2), mélanger pendant environ 30 secondes et ajouter 5 ml de solution Carrez II (5.3).
- 6.1.3 Mélanger pendant 30 minutes et porter à la marque avec de l'eau distillée, mélanger et filtrer.
- 6.1.4 Transférer 5 ml de filtrat transparent incolore dans un tube à test avec bouchon de verre dépoli, ajouter 5 ml de solution 4-DMAB (5.1) et mélanger.
- 6.1.5 Placer les tubes au bain-marie à 20 ± 4 °C.
- 6.1.6 Après 15 minutes, mesurer l'absorbance de la solution de l'échantillon au spectrophotomètre à 420 nm. Comparer avec la solution à blanc correspondante (contenant 5 ml de 4-DMAB et 5 ml d'eau distillée exempte d'urée).
- 6.2 Courbe de calibration
- 6.2.1 Transférer 1, 2, 4, 5 et 10 ml de la solution d'urée (5.5) dans un flacon volumétrique de 100 ml et porter à la marque avec de l'eau distillée.
- 6.2.2 Prendre une aliquote de 5 ml à partir de chaque solution, ajouter 5 ml de la solution 4-DMAB (5.1), bien mélanger et mesurer l'absorbance par comparaison à un blanc contenant 5 ml de 4-DMAB et 5 ml d'eau distillée exempte d'urée.
- 6.2.3 Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 420 nm et dresser la courbe de calibration.

7. Calcul

La concentration d'urée dans la solution de l'échantillon est déterminée à partir de la régression linéaire de la courbe de calibration (6.2.3).

$$c_s = \frac{A_s - b}{m}$$

où,

- c_s = concentration en urée de la solution de l'échantillon en mg/100 ml,
 A_s = valeur d'absorbance de la solution de l'échantillon,
 B = y-Intersection de la ligne de régression
 m = pente de la ligne de régression.

Considérant les conditions mentionnées en 6.1 (poids de 2 g dans 500 ml de solvant) calculé comme:

$$\text{urée [\%]} = c_s \cdot 0.25$$

Le contenu en urée de l'échantillon en général est calculé comme:

$$\text{urée [\%]} = \frac{c_s \cdot V \cdot F}{w \cdot 1000}$$

où,

- V = volume de la solution de l'échantillon en ml,
 F = facteur de dilution, et
 w = le poids de l'échantillon en g.

8. Contrôle de la qualité

Un échantillon de contrôle contenant 2% d'urée sera conduit avec chaque lot. Cet échantillon peut être préparé en mélangeant 2 g d'urée dans 98 g d'un aliment pour bétail sec exempté d'urée, similaire à l'échantillon à analyser. La récupération sera de 90 à 110%, autrement les séries devront être répétées.

NOTE: L'échantillon de contrôle d'aliments pour animaux contenant l'urée sera gardé au dessiccateur. Un échantillon ancien (>1 mois) ne sera pas utilisé.

La différence entre doublons devra être <5%, par rapport à la valeur la plus haute.

9. Remarques

- 9.1 Si la concentration d'urée >3%, réduire l'échantillon à 1 g ou diluer la solution originale de sorte qu'il n'y ait pas plus de 50 mg d'urée dans 500 ml.
- 9.2 Si la concentration d'urée est basse, augmenter la quantité d'échantillon (aussi longtemps que le filtrat demeure transparent et incolore).
- 9.3 L'absorbance dépend fortement de la température. Dès lors, il est recommandé d'effectuer les mesures pour l'établissement de la courbe de calibration, et pour les échantillons à tester simultanément.
- 9.4 Les ruminants peuvent hydrolyser l'urée en ammoniacque, et utiliser ce dernier comme source de protéines. Cependant, si l'urée est rajoutée en excès, elle peut se révéler toxique pour les animaux.

10. Dépannage

- 10.1 Comme de nombreux acides aminés expriment une absorbance maximale à environ 415 nm dans les conditions décrites ci-dessus, la détermination d'urée à 420 nm est considérablement compromise. À 435 nm, l'absorbance produite par les acides aminés est substantiellement plus faible et celle produite par l'urée est seulement légèrement inférieure à 420 nm. Comme la plupart des échantillons d'aliments pour animaux contient des composés azotés simples comme les aminoacides, il est généralement recommandé d'effectuer les mesures pour les échantillons à tester et la courbe de calibration à 435 nm.

11. Références bibliographiques

Commission Regulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Annex III, D, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009.

Heckman, M. 1967. Colorimetric determination of urea in feeds (Report of AOAC Committee). *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists* 50: 56-58 (1967), Ralston Purina Co., St. Louis, Mo. (USA).

Augustin, T. & Eckstein, M. 2010. Report for ring test urea Nr. 387Q. *Landesbetrieb Hessisches Landeslabor*. Kassel, Am Versuchsfeld 13, 34128 Kassel.

MINÉRAUX – SPÉCTROPHOTOMÈTRE À ABSORPTION ATOMIQUE (SAA)

1. Principe

Les matériaux des aliments pour animaux sont incinérés dans un four à moufle et les cendres rémanentes sont dissoutes dans l'acide chlorhydrique. Après filtration et dilution

appropriée, les oligo-éléments sont déterminés par spectrophotomètre à absorption atomique.

2. Portée

La procédure décrite s'applique pour la détermination du calcium (Ca), cuivre (Cu), fer (Fe), magnésium (Mg), manganèse (Mn), potassium (K), sodium (Na) et zinc (Zn) dans tous les ingrédients pour animaux.

3. Responsabilités

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance d'analyse précise à 0,1 mg près.
- 4.2 Four à moufle électrique, capable d'être maintenu à 550 ± 20 °C.
- 4.3 Plaque chauffante.
- 4.4 Spectrophotomètre à absorption atomique (SAA).
- 4.5 La verrerie devra être de type borosilicate résistant et il est recommandé d'utiliser un appareillage exclusivement réservé aux déterminations d'oligo-éléments.

5. Réactifs

Utiliser des produits chimiques réactifs normaux et de l'eau désionisée à moins que ce ne soit spécifié différemment.

- 5.1 Acide chlorhydrique, $c = 12$ M.
- 5.2 Acide chlorhydrique, $c = 6$ M.
- 5.3 Acide chlorhydrique, $c = 0.6$ M.
- 5.4 Solution de nitrate de lanthanum
Dissoudre 133 g de $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ dans 1 litre d'eau désionisée
- 5.5 Solution de chlorure de Césium
Dissoudre 100 g de CsCl dans 1 litre d'eau désionisée
- 5.6 Solution de stockage de Cu, Fe, Mn et Zn
Mélanger 100 ml d'eau désionisée et 125 ml d'acide chlorhydrique (12 M) dans un flacon volumétrique de 1 litre. Peser les sels suivants:
392,9 mg de pentahydrate de sulfate de cuivre (II), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
702,2 mg d'hexahydrate de sulfate de fer (II), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
307,7 mg de monohydrate de sulfate de manganèse, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
439,8 mg d'heptahydrate de sulfate de zinc, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
Transférer les sels pesés dans le flacon volumétrique et dissoudre. Diluer jusqu'à la marque avec de l'eau désionisée.
- 5.7 Solution standard de Cu, Fe, Mn et Zn
Diluer 20 ml de la solution de stockage avec l'eau désionisée dans un flacon volumétrique de 1 litre et diluer jusqu'à la marque avec de l'eau désionisée.

5.8 Solution standard de Ca, K, Mg and Na

Diluer 25 ml de la solution de stockage (5.8) avec de l'acide chlorhydrique (5.3) jusqu'à 250 ml dans un flacon volumétrique. Les contenus de Ca, K et Na sont chacun de 100 µg/ml, le contenu de Mn est de 20 µg/ml. Préparer une solution fraîche par semaine d'usage et stocker dans une bouteille en polyéthylène.

5.9 Solution à blanc de Lanthanum-césium

Ajouter 5 ml de solution de nitrate de lanthanum (5.4), 5 ml de solution de chlorure de césium (5.5) et 5 ml d'acide chlorhydrique (5.3) dans un flacon volumétrique de 100 ml. Diluer jusqu'à la marque avec de l'eau désionisée.

6. Procédure

6.1 Préparation de l'échantillon

6.1.1 Placer 5-10 g d'échantillon pesés à 0,2 mg près dans un creuset de quartz ou de platine, sécher dans un four à 105 ± 2 °C et introduire le creuset dans le four à moufle froid (4.2).

6.1.2 Fermer le four et augmenter progressivement sa température à 550 ± 20 °C en 90 minutes environ. Maintenir cette température pendant 4 à 16 heures (c'est à dire une nuit) afin de déplacer le matériel carboné, ouvrir ensuite le four et laisser refroidir.

6.1.3 Humidifier les cendres avec de l'eau désionisée et transférer dans un bécher de 250 ml. Laver le creuset avec 5 ml d'acide chlorhydrique environ (5.1). *NOTE:* ajouter lentement et prudemment l'acide dans le bécher (il peut y avoir une réaction vigoureuse due à la formation de CO₂).

6.1.4 Ajouter l'acide chlorhydrique (5.1) goutte à goutte en agitant jusqu'à ce que cesse l'effervescence.

6.1.5 Évaporer jusqu'à siccité, en agitant occasionnellement avec une tige de verre.

6.1.6 Ajouter 15 ml d'acide chlorhydrique 6 M (5.2) au résidu, suivis de 120 ml d'eau désionisée.

6.1.7 Porter tranquillement à ébullition et maintenir celle-ci jusqu'à ce que n'apparaisse plus de cendre en dissolution.

6.1.8 Filtrer sur papier exempt de cendres et collecter le filtrat dans un flacon volumétrique de 250 ml.

6.1.9 Laver le bécher et filtrer avec 5 ml d'acide chlorhydrique 6 M chaud (5.2), puis deux fois avec de l'eau bouillante.

6.1.10 Porter jusqu'à la marque avec de l'eau désionisée (concentration HCl d'environ 0,5 M)

6.1.11 Si le résidu du filtre apparaît noir (carbone) remettez-le au four et incinérez de nouveau à 450-475 °C. Cette incinération requiert 3-5 heures et est complète si les cendres apparaissent (presque) blanches.

6.1.12 Dissoudre le résidu avec environ 2 ml d'acide chlorhydrique (5.1), évaporer jusqu'à siccité et ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique 6 M (5.2).

6.1.13 Chauffer, filtrer la solution dans le flacon volumétrique et porter à la marque avec de l'eau désionisée (concentration HCl environ 0,5 ml).

NOTE: D'autres méthodes de digestion peuvent être appliquées, pourvu qu'elles aient démontré des résultats similaires (p. ex. digestion par micro-ondes). Si l'échantillon ne

contient pas de matière organique (ex. aliment minéral), une incinération préliminaire n'est pas nécessaire. Procéder alors comme décrit à partir du 6.1.3.

6.2 Détermination spectrophotométrique de Fe, Cu, Mn and Zn

6.2.1 Conditions de mesures

Ajouter le SAA (4.4) en accord avec les instructions du fabricant et optimiser la réponse de l'instrument en utilisant une flamme oxydante air-acétylène aux longueurs d'ondes suivantes:

Fe : 248,3 nm

Cu : 324,8 nm

Mn : 279,5 nm

Zn : 213,8 nm

6.2.2 Préparation des courbes de calibration

1. Préparer une série de solutions de calibration en diluant la solution standard (5.7) avec de l'acide chlorhydrique (5.3) dilué.
2. Mesurer l'absorbance de l'acide chlorhydrique (5.3) et l'absorbance des solutions de calibration et soustraire l'absorbance mesurée pour l'acide chlorhydrique.
3. Dessiner une courbe de calibration en plaçant les absorbances corrigées vis-à-vis des contenus respectifs en Cu, Fe, Mn and Zn.

6.2.3 Mesure de la solution test

1. Mesurer parallèlement aux solutions de calibration, en conditions identiques, l'absorbance de la solution test et de la solution à blanc. Soustraire cette dernière de la première.
2. Si nécessaire, diluer une aliquote de la solution test et de la solution à blanc, avec de l'acide chlorhydrique dilué (5.3) afin d'obtenir une absorbance dans la partie linéaire de la courbe.

6.3 Détermination spectrophotométrique de Ca, Mg, K et Na

6.3.1 Conditions de mesure

Ajuster le SAA (4.4) en accord avec les instructions du fabricant et optimiser la réponse de l'instrument en utilisant une flamme oxydante air-acétylène aux longueurs d'ondes suivantes:

Ca : 422,6 nm

Mg : 285,2 nm

K : 766,5 nm

Na : 589,6 nm

6.3.2 Préparation des courbes

1. Diluer la solution standard (5.2) avec de l'eau désionisée. Ajouter 5 ml de solution de nitrate de lanthanum (5.5), 5 ml de solution de chlore de césium (5.5) et 5 ml d'acide chlorhydrique (5.2) à 100 ml de la solution standard diluée. Sélectionner la dilution afin d'obtenir des solutions de calibration appropriées.
2. Mesurer l'absorbance de la solution à blanc lanthanum-césium (5.9).
3. Mesurer l'absorbance des solutions de calibration et soustraire l'absorbance mesurée par la solution à blanc lanthanum/césium (5.9).
4. Dessiner une courbe de calibration en plaçant les absorbances corrigées vis à vis des contenus respectifs de Ca, Mg, K et Na.

6.3.3 Mesure de la solution test

1. Diluer une aliquote de la solution test et de la solution à blanc avec de l'eau désionisée. Ajouter 5 ml de solution de nitrate de lanthanum (5.4), 5 ml de solution de chlorure de césium, et 5 ml d'acide chlorhydrique (5.2).
2. Mesurer parallèlement aux courbes de calibration, dans les mêmes conditions, l'absorbance de la solution test diluée et de la solution à blanc diluée. Soustraire cette dernière de la première.
3. Si nécessaire, diluer une aliquote de la solution test et de la solution à blanc avec la solution à blanc lanthanum/césium (5.9) afin d'obtenir une absorbance dans la partie linéaire de la courbe.

7. Calcul

En utilisant une courbe de calibration (6.2.2 et 6.3.2), calculer la concentration en oligo-éléments dans la solution:

$$c_s = \frac{A_s - b}{m}$$

où,

c_s = concentration de l'O-E dans la solution de l'échantillon [$\mu\text{g/ml}$],

A_s = Valeur de l'absorbance de la solution de l'échantillon,

b = y-Intersection de la ligne de régression, et

m = pente de la ligne en régression.

Le contenu en O-E de l'échantillon en mg/kg en considérant les stades de dilution, est calculé comme:

$$\text{élément [mg/kg]} = \frac{c_s \cdot v \cdot F}{w}$$

où,

v = volume de la solution de l'échantillon [ml],

F = facteur de dilution, et

w = poids de l'échantillon [g].

Exprimer le résultat en milligrammes d'oligo-éléments par kg d'échantillon (ppm) et pour les macroéléments en grammes par kg (g/kg).

8. Contrôle de la qualité

- Des doublons du contrôle de travail seront menés sur chaque ensemble et comparés aux limites établies sur la charte de contrôle. Un blanc pointé au niveau de la concentration médiane de la courbe de calibration doit avoir un taux de récupération entre 50% et 120%.
- Un blanc sera pratiqué avec chaque ensemble. Une aliquote de 10 ml sera prélevée et traitée comme un échantillon. La concentration calculée devra être <0,5 ppm.

- Suite immédiatement à la création de la courbe de calibration, un standard de référence de 0 ppm sera lu comme échantillon. La concentration calculée de cette lecture doit être < 0.1 ppm.
- Suite immédiatement à la lecture du standard de référence 0 ppm, le standard de référence 10 ppm sera lu comme échantillon. La lecture doit être située dans les 2,5% de 10 ppm (9,75-10,25 ppm).
- Si le blanc et/ou le standard à 10 ppm s'avèrent déficients, alors l'instrument doit être re-calibré en utilisant tous les standards de référence. Suite immédiatement à la nouvelle re-calibration, les standards 0 ppm et 10 ppm doivent être testés à nouveau, et satisfaire les critères d'acceptance énoncés ci-dessus.
- Les standards 0 et 10 ppm seront menés au début et à la fin de chaque session et après chaque série de 10 échantillons.

9. Interférences, dépannage et sécurité

- 9.1. Le tampon d'ionisation du lanthanum doit être ajusté à chaque échantillon. Sa présence peut être détectée par une flamme verte, pendant l'analyse. En cas d'omission de ce tampon, les résultats peuvent s'avérer faibles.
- 9.2. Durant le stade d'acide chlorhydrique fumant, certains digestats peuvent changer subitement d'apparence (couleur, taille des particules), et former des composants moins solubles. Il peut être nécessaire d'opérer une nouvelle digestion sur un nouvel échantillon jusqu'au moment où l'acide chlorhydrique commence à fumer.

10. Références bibliographiques

AOAC 968.08. 2000. *Minerals in animal feed and pet food, atomic absorption spectrophotometric method.* Gaithersburg, MD, USA.

AOAC 965.09. 2000. *Nutrients (minor) in fertilizers, atomic absorption spectrophotometric method.* Gaithersburg, MD, USA.

Commission Regulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Annex IV, C, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009.

ISO 6869. 2000. *Animal feeding stuffs – Determination of the contents of calcium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium and zinc – Method using atomic absorption spectrometry.* Geneva, Switzerland.

CALCIUM – MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE

1. Principe

L'échantillon est enflammé à 550 °C afin de brûler tout le matériel organique. Les minéraux rémanents sont digérés dans l'acide chlorhydrique 6 M afin de libérer le calcium qui sera alors déterminé en utilisant une évaluation spectrophotométrique basée sur la réaction du calcium avec la complexone à l'o-cresolphtaléine en solution alcaline. Le magnésium est masqué par la 8- hydroxyquinoline.

2. Portée

Cette méthode s'applique pour les aliments pour animaux, les aliments, les digesta et les fèces, mais non pour les mélanges minéraux.

3. Responsabilités

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance d'analyse, précise à 0,1 mg.
- 4.2 Bécher à l'épreuve du four à moufle, p. ex. en pyrex.
- 4.3 Four à moufle, pouvant être maintenu à 550 ± 20 °C.
- 4.4 Plaque chauffante.
- 4.5 Spectrophotomètre.

5. Réactifs

- 5.1 Acide chlorhydrique, 6 M.
- 5.2 Solution standard de calcium.
- 5.3 Kit de testage pour calcium, p. ex. Réf No.11489216 216 de Roche.
Les kits d'autres fabricants, basés sur la méthode CDP peuvent également être utilisés.

6. Procédure

- 6.1 Préparation de l'échantillon
 - 6.1.1 Peser environ 1 g à 0,2 mg près (W) dans un bécher (4.2) et placer dans le four à moufle froid (4.3).
 - 6.1.2 Fermer le four et monter progressivement la température à 550 °C en un peu plus de 90 minutes. Maintenir cette température pendant 16 heures (une nuit) afin de retirer le matériel carboné; ouvrir ensuite le four et laisser refroidir (voir remarque 9.1).
 - 6.1.3 Ajouter 10 ml d'acide chlorhydrique 6 M à chaque bécher et placer sur une plaque chauffante préchauffée (environ 250 °C) couvrir les béchers avec une plaque de verre, laisser digérer pendant 20 minutes.
 - 6.1.4 Laisser refroidir les béchers et enlever ceux-ci de la plaque chauffante.
 - 6.1.5 Transférer quantitativement le contenu des béchers dans un flacon volumétrique de 25 ml, porter jusqu'à la marque avec de l'eau distillée et bien mélanger.
 - 6.1.6 Mesurer le calcium dans les solutions (6.1.5) et les standards (5.2) par la méthode CPC en suivant les instructions du fabricant du kit de testage (5.3), mesurer l'absorbance à 578 nm (voir remarque 9.2).

7. Calcul

Calculer le contenu en calcium de la solution à mesurer par régression linéaire. Le pourcentage de calcium est calculé comme:

$$\% \text{ Calcium} = (C \times V \times DF) / (W \times 10)$$

où,

C = concentration en calcium de la solution mesurée (mg/litre),

V = volume solution (en litres, i.e. 0,025 (L)),

FD = facteur de dilution (normalement, i.e. 1),

W = poids échantillon (g), et

10 = facteur pour convertir g/kg en %.

8. Contrôle de la qualité

Du calcium hautement purifié contenant du sel peut être utilisé comme standard de contrôle, faire la moyenne de 15-20 répétitions et ajouter ± 2 DS pour une portée acceptable.

Dans chaque lot, un standard de contrôle (échantillon CQ) sera analysé. L'échantillon CQ du laboratoire peut provenir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, broyer jusqu'à passage par un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter ± 2 DS pour obtenir une portée acceptable. Les échantillons seront analysés en doublons. La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles pratiquées sur le même échantillon devra être $<5\%$ par rapport à la valeur moyenne.

9. Remarques

- 9.1 D'autres méthodes de digestion peuvent être utilisées, pourvu qu'elles aient été validées pour donner des résultats similaires (p.ex. digestion par micro-ondes).
- 9.2 La détermination peut être effectuée automatiquement par un auto-analyseur. Celui-ci améliorera la précision et l'efficacité de la méthode.

10. Références bibliographiques

AOAC 968.08d. 2000. *Acid digestion*. Gaithersburg, MD, USA.

Tietz, N.W. 1995. Calcium determination. *Clinical Guide to laboratory Tests, 3 Auflage*. Philadelphia, Pa: WB Saunders Company.

Gosling, P. 1986. Analytical reviews in clinical biochemistry: Calcium measurement. *Ann Clin Biochem* 23: 146-156.

PHOSPHORE – MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE

1. Principe

Les matériaux des aliments pour animaux sont incinérés après une digestion dans l'acide chlorhydrique. Le réactif molybdovanadate est ajusté ce qui se traduit par une couleur jaune caractéristique après réaction avec le phosphore, mesurée par spectrophotométrie.

2. Portée

La méthode s'applique aux ingrédients des aliments pour animaux dont le contenu en phosphore <50 g/kg. Pour les échantillons à contenu de phosphore plus élevé, une méthode gravimétrique est recommandée, à savoir le phosphomolybdate de quinoline.

3. Responsabilités

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Balance d'analyse, précise à 0,1 mg.
- 4.2 Bécher à l'épreuve du four à moufle, p. ex. en pyrex.
- 4.3 Four à moufle, pouvant être maintenu à 550 ± 20 °C.
- 4.4 Plaque chauffante.
- 4.5 Spectrophotomètre UV-VIS.

5. Réactifs

- 5.1 Acide chlorhydrique 6 M.
- 5.2 Acide nitrique 14 M.
- 5.3 Solution d'heptamolybdate d'ammonium
Dissoudre 100 g d'heptamolybdate d'ammonium $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ d'eau distillée chaude. Ajouter 10 ml d'ammoniaque (NH_4OH : 14 M; $\rho(\text{NH}_4\text{OH}) = 0,91$ g/ml) et diluer jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée.
- 5.4 Solution de monovanadate d'ammonium
Dissoudre 2,35 g de monovanadate d'ammonium (NH_4VO_3) dans 400 ml dans de l'eau distillée chaude. En agitant constamment, verser lentement 7 ml d'acide nitrique (5.2) et diluer jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée.
- 5.5 Réactif au Molybdovanadate
Dans un flacon volumétrique de 1 L, mélanger 200 ml de la solution d'heptamolybdate d'ammonium (5.3), 200 ml de solution de monovanadate d'ammonium (5.4) et 135 ml d'acide nitrique (5.2). Diluer jusqu'à la marque avec de l'eau distillée. Filtrer si sont présentes des particules insolubles.
- 5.6 Solution standard de phosphore (1 mg/ml)
Dans un flacon volumétrique de 1 L, dissoudre 4,394 g de phosphate de potassium dihydrogéné (KH_2PO_4) séché antérieurement à 103 ± 2 °C pendant 1 heure. Diluer jusqu'à la marque avec de l'eau distillée.
- 5.7 Courbe de calibration.
Diluer la solution standard de phosphore aux concentrations de 5, 10, 20 et 40 µg/ml. Utiliser de l'eau distillée comme blanc.

6. Procédure

- 6.1 Préparation de l'échantillon
 - 6.1.1 Peser environ 1 g à 0,2 mg près (W) dans un bécher (4.2) et placer dans un four à moufle froid (4.3).
 - 6.1.2 Fermer le four et monter progressivement la température à 550 °C en 90 minutes environ. Maintenir cette température pendant 16 heures (une nuit) pour retirer le matériel carboné; ensuite, ouvrir le four et laisser refroidir (voir remarque 9.1).
 - 6.1.3 Ajouter 10 ml 6 M d'acide chlorhydrique (5.1) dans chaque bécher et placer sur une plaque chauffante préchauffée (à environ 250 °C), couvrir les béchers avec un plateau de verre, et laisser digérer pendant 20 minutes.
 - 6.1.4 Laisser refroidir les béchers et retirer de la plaque chauffante.
 - 6.1.5 Transférer quantitativement les contenus des béchers dans des flacons volumétriques de 25 ml, ajuster à la marque avec de l'eau distillée, et bien mélanger.
 - 6.1.6 Laisser les solutions reposer pendant la nuit.
- 6.2 Mesure du contenu en phosphore
 - 6.2.1 Diluer une aliquote de la solution (6.1.6) avec de l'eau distillée afin d'obtenir un contenu en phosphore ne dépassant pas 40 µg/ml.
 - 6.2.2 Transférer 10 ml de la solution diluée (6.2.1) et de la solution standard (5.7) pour séparer les tubes de testage. Prendre un tube de testage avec 10 ml d'eau (blanc). Ajouter 10 ml de réactif de molybdovanadate à chaque tube (5.5). Mélanger et laisser reposer pendant 10 minutes à 20 °C.
 - 6.2.3 Mesurer l'absorbance de la solution (6.2.2) à 430 nm pendant 45 minutes, en utilisant un spectrophotomètre vis-à-vis au blanc.

7. Calcul

Calculer le contenu en phosphore de la solution mesurée par régression linéaire.

Le pourcentage de phosphore est calculé comme:

$$\% \text{ Phosphore} = (C \times V \times FD) / (W \times 10)$$

où,

C = concentration en phosphore dans la solution mesurée (mg/litre),

V = volume de la solution (en litres, c-à-d 0,025 L),

FD = facteur de dilution (normalement 1),

W = poids échantillon (g), et

10 = facteur pour convertir g/kg to %.

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un standard de contrôle (échantillon CQ) sera analysé. L'échantillon CQ du laboratoire peut provenir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, broyer jusqu'à passage par un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter ± 2 DS pour obtenir une portée acceptable.

Les échantillons seront analysés en doublons. La différence entre deux déterminations parallèles effectués sur le même échantillon seront <5% de la valeur moyenne.

9. Remarques

9.1 D'autres méthodes de digestion peuvent être utilisées pourvu qu'elles aient démontré avoir fourni des résultats similaires (p.ex. emploi acides différents ou digestion par micro-ondes).

10 Références bibliographiques

Commission Régulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Annex III, P, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009.

ISO 6491. 1998. *Animal feeding stuffs – Determination of phosphorus content – Spectrometric method.* Geneva, Switzerland.

CHLORE – MÉTHODE PAR TITRATION

1. Résumé

Les chlorures sont dissous dans l'eau distillée. Si le produit contient de la matière organique, il est clarifié. La solution est légèrement acidifiée avec de l'acide nitrique et les chlorures sont précipités sous forme de chlorure d'argent au moyen d'une solution de nitrate d'argent. Le nitrate d'argent en excès est titré avec une solution de thiocyanate d'ammonium. La concentration de chlorure est exprimée en chlorure de sodium.

2. Portée

La méthode s'applique aux aliments pour animaux.

3. Responsabilités

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Equipement

- 4.1 Balance d'analyse, précise à 0,1 mg près.
- 4.2 Mixer.
- 4.3 Equipement de Titration.

5. Réactifs

- 5.1 Solution de thiocyanate d'ammonium, 0,1 M.
- 5.2 Solution de nitrate d'argent, 0,1 M.
- 5.3 Sulfate ammonium ferrique saturé $(\text{NH}_4)_2 \text{Fe} (\text{SO}_4)_2$.
- 5.4 Acide nitrique, $\rho = 1,38 \text{ g/ml}$.
- 5.5 Diethyl éther.
- 5.6 Acétone.
- 5.7 Solution Carrez I
Dissoudre 21,9 g d'acétate de zinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ et 3 g d'acide acétique glacial dans de l'eau distillée. Porter à 100 ml avec de l'eau distillée.

- 5.8 Solution Carrez II
Dissoudre 10,6 g de ferrocyanure de potassium $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ dans l'eau distillée.
Porter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- 5.9 Charbon actif.

6. Procédure

- 6.1 Préparation de la solution
Compte tenu de la nature de l'échantillon, préparer une solution comme indiqué en 6.1.1, 6.1.2 ou 6.1.3.
Simultanément, effectuer un test à blanc sans l'échantillon à analyser.
- 6.1.1 Peser au maximum 10 g d'échantillon à 1 mg (W) dans un flacon volumétrique de 500 ml (voir remarque 9.1). Ajouter 400 ml d'eau distillée et mélanger pendant 30 minutes. Porter à 500 ml avec de l'eau distillée. Mélanger soigneusement et filtrer.
- Échantillons contenant de la matière organique à l'exclusion des produits listés en 6.1.3
- 6.1.2 Peser au maximum 5 g d'échantillon à 1 mg près (W) et 1 g de charbon actif (5.9) dans un flacon volumétrique de 500 ml. Ajouter 400 ml d'eau distillée et 5 ml de solution Carrez I (5.7) et mélanger pendant 30 minutes. Ajouter 5 ml de solution Carrez II (5.8) et mélanger pendant 30 minutes. Porter à 500 ml avec de l'eau distillée, homogénéiser et filtrer.
- Pour des aliments pour animaux torréfiés, des tourteaux de lin, des produits farineux riches en lin, et d'autres produits riches en mucilage ou en substances colloïdales;
- 6.1.3 Préparer la solution comme indiqué en 6.1.2 mais ne pas filtrer. Retirer 100 ml du liquide surnageant et transférer dans un flacon volumétrique de 200 ml. Porter à 200 ml avec de l'acétone (5.6), mélanger soigneusement et filtrer.
- 6.2 Titration
- 6.2.1 A l'aide d'une pipette, transférer 25 à 100 ml du filtrat obtenu (6.1) dans un Erlenmeyer (voir remarque 9.2).
- 6.2.2 Diluer si nécessaire à 50 ml au moins avec de l'eau distillée, ajouter 5 ml d'acide nitrique (5.4), 20 ml de solution saturée de sulfate ferreux d'ammonium (5.3) et deux gouttes de solution de thiocyanate d'ammonium (5.1)
- 6.2.3 Avec une burette, transférer la solution de nitrate d'argent (5.2) dans l'Erlenmeyer (ceci correspond à 5 mmol d'ions argent en relation avec les ions de chlorure 4,23 M lorsqu'est supposé un contenu maximum de 150 mg de chlore, voir Remarque 9.3) de telle façon que s'obtienne un excédent de 5 ml (voir remarque 9.5). Ajouter 5 ml d'éthyle éther (5.5) et remuer fortement afin de coaguler le précipité.
- 6.2.4 Titrer le nitrate d'argent en excès avec la solution de thiocyanate d'ammonium (5.1) jusqu'à ce que la teinte rouge brun tienne pendant 1 minute.

7. Calcul

La quantité de chlore (X), exprimée en % de chlorure de sodium est calculée suivant la formule suivante:

$$X = 5,845 (V_1 - V_2) / W$$

où,

V_1 = volume de 0,1 M solution ajoutée de nitrate d'argent (en ml),

V_2 = volume de 0,1 M solution ajoutée de thiocyanate d'ammonium (en ml), et

W = Poids de l'échantillon en g.

Si le test à blanc indique que le nitrate d'argent a été consommé, déduire cette valeur du volume ($V_1 - V_2$).

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque lot, un standard de contrôle (échantillon CQ) sera analysé. L'échantillon CQ du laboratoire peut provenir d'un échantillon d'aliments pour animaux/fourrage similaire par nature aux échantillons à analyser. Prendre 3-4 kg de l'échantillon CQ sélectionné, broyer jusqu'à passage par un tamis à mailles de 1 mm et stocker dans un endroit froid et sec. Analyser l'échantillon CQ 15 à 20 fois, prendre la moyenne et y ajouter ± 2 DS pour obtenir une portée acceptable.

Les échantillons seront analysés en doublons. La différence entre les valeurs de deux déterminations parallèles conduite sur le même échantillon devront être $<5\%$ sur la valeur moyenne.

9. Remarques

- 9.1 L'échantillon ne devra pas contenir plus de 3 g de chlore sous forme de chlorures.
- 9.2 La portion d'aliquote ne doit pas contenir plus de 150 mg de chlore.
- 9.3 Suivant le contenu en chlore, le volume de la solution de nitrate d'argent doit être ajusté afin de titrer un volume significatif de la solution de thiosulfate.
- 9.4 La titration peut également être effectuée au potentiomètre.
- 9.5 L'information disponible ou l'expérience concernant le contenu en chlore sera utilisé pour obtenir cet excédent. Ce dernier peut être contrôlé par le volume de thiocyanate d'ammonium nécessaire pendant la titration (6.2.4), qui devra être de 4,5 ml au moins.

10. Référence bibliographique

Commission Regulation (EC) No 152/2009. 27 Jan 2009. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Annex III, Q, *Official Journal of the European Union* L54/1 from 26/02/2009.

AAFLATOXINES – CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SOUS HAUTE PRESSION (HPLC)

1. Principe

Les aflatoxines B_1 , B_2 , G_1 et G_2 (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2) sont extraites de l'échantillon des aliments pour animaux avec de l'acétone aqueuse. L'extrait purifié par chromatographie d'immuno-affinité et les analytes sont quantifiés par chromatographie liquide de haute performance en phase inverse (CLHPP) avec dérivation post-colonne (DPC) comprenant une bromination. La DPC est conduite soit par du brome généré électro-chimiquement ou avec du perbromure hydrobromure de pyridinium (PHP), suivi d'une détection par fluorescence.

2. Portée

Cette méthode détermine les aflatoxines dans les aliments pour animaux. Elle s'applique aux aliments pour animaux contenant une teneur en lipides inférieures à 50%.

La limite de quantification sera au moins de 1 µg/kg pour l'aflatoxine B₁ (ratio signal-bruit). En fait, cette méthode a démontré pouvoir quantifier une limite de moins de 0,5 µg/kg pour l'aflatoxine B₁.

3. Responsabilités

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

Équipement usuel de laboratoire, et en particulier:

- 4.1 Shaker (ajustable) vertical ou horizontal.
 - 4.2 Papier filtre, ø 24 cm, préplié (p.ex. Whatman 2V).
 - 4.3 Erlenmeyer avec bouchon à vis en verre rodé.
 - 4.4 Papier filtre en microfibre de verre, ø 5 cm (p.ex. Whatman GF/A).
 - 4.5 Réservoir, 75 ml avec connecteur à embout lié pour colonne d'immuno-affinité.
 - 4.6 Pompe à main, seringue 20 ml à embout luer ou bouchon de caoutchouc pour colonne à immuno-affinité.
 - 4.7 Verrerie volumétrique de capacité 5, 10 et 20 ml, avec précision d'au moins 0,5%.
 - 4.8 Pompe CLHPPI, convenant pour un taux de flux de 1,000 ± 0,005 ml/min.
 - 4.9 Système d'injection capable d'injection totale en boucle (Une valve avec une boucle d'au moins 100 µl est recommandée).
 - 4.10 Colonne RP-CLHP, p.ex. SUPELCOSIL LC-18 (Supleco) or Octadecylsilane (ODS)-2 LC (Phenomenex).
Pré-colonne optionnelle mais recommandée.
 - 4.11 Système de dérivation post-colonne avec PBPB (alternative à 4.12)
Deuxième pompe CLHP non pulsée,
Tubage minimum 45 cm x 0,5 mm diamètre interne PTFE (polytetrafluoroéthylène) (le temps de réaction doit être au moins de 4 secondes avant détection).
 - 4.12 Système de dérivation avec brome généré électrochimiquement (p.ex. cellule KOBRA); l'appareil doit être installé conformément aux instructions du fabricant
- NOTE:* Afin de confirmer l'aflatoxine B₁, la colonne CLHP doit être déconnectée de l'appareil à bromination et connectée directement au détecteur à fluorescence (éteindre le courant avec l'appareil à bromination toujours en ligne du fait de la possibilité de rémanence de brome dans la membrane de la cellule de l'appareil).
- 4.13 Détecteur à fluorescence, avec une longueur d'onde $\lambda = 360$ nm, un filtre à excitation et une longueur d'onde de $\lambda > 420$ nm, un filtre de coupure ou équivalent.
Les installations recommandées pour les détecteurs ajustables sont Excitation = 365 nm, Emission = 435 nm, Longueur de bande = 18 nm.
 - 4.14 Unité filtrante jetable (0,45 µm).

NOTE: Avant utilisation, il faut vérifier que des pertes d'aflatoxines ne se produisent pas

TABLEAU 3
Préparation des solutions de calibration de travail

Standard de travail	Option A		Option B	
	Solution stock d'aliqotes [μl]	Concentration [ng AFB1/ml]	Solution stock d'aliqotes [μl]	Concentration [ng AFB1/ml]
1	20	0,050	100	0,250
2	45	0,113	225	0,563
3	70	0,175	350	0,875
4	95	0,238	475	1,188
5	120	0,300	600	1,500
6	145	0,363	725	1,813
7	170	0,425	850	2,125
8	195	0,488	975	2,438
9	220	0,550	1100	2,750

durant la filtration (test de récupération) existe la possibilité que des matériaux de filtres variés retiennent l'aflatoxine B₁.

4.15 Pipettes calibrées de capacité, 1 ml, 2 ml, 5 ml et 10 ml.

4.16 Balance d'analyse, précise à 0,1 mg.

4.17 Balance de laboratoire, précise à 0,01 g.

4.18 Seringues ou pipettes calibrées au microlitre (20-500 μl).

4.19 Évaporateur (optionnel, seulement nécessaire pour option B, section 6.3)

5. Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de degré analytique reconnu, à moins de spécification différente.

Toutes les solutions sont préparées avec des solvants de degré CLHP et des matériaux reconnus pour réactifs, à moins de spécification différente.

5.1 Eau distillée ou désionisée.

5.2 Solution saline tampon au phosphate, PBS, pH 7.4

Elle peut être préparée avec du chlorure de potassium (0,20 g), du phosphate déhydrogéné de potassium (0,20 g), du phosphate disodique hydrogéné anhydre (1,16 g) [ou du phosphate disodique hydrogéné.12 H₂O (2,92 g)] et du chlorure de sodium (8,00 g) ajouté à 900 ml d'eau bidistillée. Après dissolution, le pH doit être ajusté à 7,4 (avec HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M selon besoin) et la solution portée à 1,0 litre avec de l'eau bidistillée.

Alternativement, des tablettes pour solution tampon phosphatée, disponibles dans le commerce, avec des propriétés équivalentes, peuvent être employées.

5.3 Perbromure hydrobromure de pyridinium, PBPB, CAS 39416-48-3.

Ce réactif n'est pas requis au cas où une cellule KOBRA ® est utilisée.

5.4 Bromure de potassium.

Ce réactif n'est pas requis en cas d'emploi du réactif PBPB.

- 5.5 Acétonitrile degré CLHP.
- 5.6 Méthanol degré CLHP.
- 5.7 Acétone, pure.
- 5.8 Eau, degré CLHP (l'eau bidistillée ou désionisée peut également être utilisée).
- 5.9 Solvant pour extraction.
Acétone (5.7): eau bidistillée, (85:15, v/v).
- 5.10 Acide nitrique, $c(\text{HNO}_3) = 4 \text{ M}$
Ce réactif n'est pas requis en cas d'utilisation de réactif PBPB.
- 5.11 Colonne d'immuno-affinité
La colonne d'affinité doit contenir des anticorps développés contre l'aflatoxine B_1 . La colonne aura une capacité d'au moins 40 ng d'aflatoxine B_1 et aura une récupération d'au moins 80% pour l'aflatoxine B_1 lorsqu'elle est appliquée comme solution standard dans l'acétone = eau bidistillée (85:15, v/v) contenant 0,25 ng d'aflatoxine B_1 .
- 5.12 Solvant A pour la phase mobile d'CLHP, à utiliser seulement avec le réactif PBPB post-colonne: eau bidistillée (5.8): acétonitrile (5.5): solution de méthanol (5.6) (6:2:3, v/v/v). Le ratio de solvants peut être ajusté pour obtenir une meilleure séparation.
- 5.13 Solvant B pour la phase mobile CLHP, à utiliser seulement avec le brome généré électrochimiquement: eau bidistillée (5.8): acétonitrile (5.5) solution (6:2:3, v/v/v) de méthanol (5.6) contenant 120 mg de bromure de potassium (5.4) et 350 μl d'acide nitrique (5.10) par litre de phase mobile. Le ratio de solvants peut être ajusté pour obtenir de meilleurs paramètres de séparation.
- NOTE:* Le solvant par phase mobile (5.12/5.13) devra être dégazé.
- 5.14 Réactif post-colonne
À utiliser seulement avec le réactif PBPB post-colonne:
Dissoudre 25 mg de PBPB (5.3) dans 500 ml d'eau bidistillée. La solution peut être utilisée jusqu'à quatre fois si elle est stockée dans un endroit sombre à la température de la pièce. Le réactif post-colonne sera utilisé seulement en combinaison avec le solvant A pour la phase mobile CLHP (5.12) mais non avec le solvant B (5.13).
- 5.15 Toluène: acétonitrile (98: 2, v/v).
- 5.16 Aflatoxine B_1 matériel standard.
Aflatoxine B_1 standards sous forme de cristaux, ou de film sec, à fins d'analyse.
- 5.17 Solutions stock de calibration pour CLHP.
- 5.17.1 Général
Préparer une solution stock d'aflatoxine B_1 (5.16) contenant 50,0 ng/ml dans le toluène: acétonitrile (5.15).
- 5.17.2 Option A (voir description de la méthode 6.3)
Pipeter à partir de la solution (5.16) les volumes listés dans le Tableau 3 (option A) dans un ensemble de flacons volumétriques calibrés de 20 ml. Évaporer la solution de toluène: acétonitrile jusqu'à siccité sous un courant d'azote à température de la pièce. Ajuster 7 ml de méthanol à chaque flacon, laisser les aflatoxines se dissoudre, ensuite porter à la marque avec de l'eau bidistillée et bien remuer.

NOTE: Garder à l'esprit que le méthanol et l'eau bidistillée sont sujet à une contraction de volume lorsqu'ils sont mélangés.

5.17.3 Option B (voir description de la méthode 6.3)

Dans un ensemble de flacons volumétriques calibrés de 20 ml, pipetter les volumes listés dans le Tableau 3 (option B) à partir de la solution (5.16). Évaporer la solution toluène-acétonitrile jusqu'à siccité sous un courant d'azote à la température de la pièce. Ajouter 10 ml de méthanol dans chaque flacon, laisser les aflatoxines se dissoudre, puis ajuster jusqu'à la marque avec du méthanol (non du méthanol aqueux) et bien remuer. 1 ml exactement de cette solution de calibration pour travail va alors être transférée dans une fiole de verre lavée à l'acide, évaporée jusqu'à siccité comme décrit dans l'option B en 6.3, et ensuite re-dissoute dans exactement le même volume qui sera utilisé pour re-dissoudre les échantillons avant l'injection (6.3). Calculer la concentration d'aflatoxine B, dans la solution évaporée et re-dissoute en mg/ml. Utiliser ces valeurs de concentration pour le calcul comme indiqué dans la section 6.6. Dans ce cas, l'éventail de calibration va rester inchangé.

6. Procédure

6.1 Conditionnement des colonnes d'immuno-affinité

Les colonnes d'immuno-affinité (5.11) seront à température de la pièce avant leur conditionnement. Pour celui-ci suivre les instructions du fabricant. Si ce n'est pas mentionné différemment, appliquer 10 ml de PBC (5.2) sur le sommet de la colonne et laisser passer (par gravité) à travers celle-ci à une vitesse de 2-3 ml/min. s'assurer qu'une petite portion (0,5 ml) de PBS demeure sur la colonne jusqu'à application de la solution d'échantillon.

6.2 Extraction

6.2.1 Peser à 0,1 g près, environ 50 g de la portion à tester dans un Erlenmeyer de 500 ml avec un bouchon à vis ou en verre rodé.

6.2.2 Ajouter 250 ml le solvant d'extraction acétone: eau bidistillée (5.9).

6.2.3 Secouer intensément à la main pendant 15 à 30 secondes puis au shaker pendant 30 minutes (4.1).

6.2.4 Filtrer l'extrait avec un papier filtre préplié (4.2).

6.2.5 Pipeter 5 ml du filtrat clair dans un flacon volumétrique de 100 ml et porter à la marque avec du PBS ou de l'eau bidistillée (le solvant de dilution – PBS ou eau bidistillée – sera choisi en fonction des spécifications du fabricant des colonnes à immuno-affinité. A moins qu'il ne soit indiqué que la dilution doit être effectuée avec du PBS).

Si la solution n'est pas claire, filtrer à nouveau à travers un filtre en fibre de verre (4.4) et verser lentement 50 ml du filtrat clair dans un réservoir placé sur une colonne conditionnée d'immuno-affinité (si la solution est claire, elle peut être versée directement sur la colonne d'immuno-affinité).

6.2.6 Appliquer la solution sur la colonne comme décrit dans la section 6.3.

6.3 Nettoyer par immuno-affinité

NOTE: Les méthodes pour conditionner, charger, laver et éluer divergent légèrement entre les fabricants de colonnes d'immuno-affinité et, dès lors, les instructions spécifiques fournies avec ces dernières seront suivies très précisément. En général, la procédure suppose

une extraction de l'échantillon avec du méthanol aqueux, une filtration ou centrifugation, une dilution possible de l'échantillon avec du PBS ou de l'eau bidistillée, un chargement sous pression, dans la colonne (potentiellement prélavée), lavage de la colonne avec de l'eau bidistillée, et une élution de l'aflatoxine B₁ avec du méthanol ou de l'acétonitrile.

- 6.3.1 Passer le filtrat par gravité à travers la colonne à une vitesse de flux d'environ 1 goutte/seconde (± 3 ml/minute). Ne pas dépasser un taux de 5 ml/minute.
- 6.3.2 Laver la colonne avec environ 20 ml d'eau bidistillée (5.8), appliquer en deux portions de 10 ml à une vitesse de flux de 3 ml/minute et sécher en appliquant un léger vide pendant 5-10 secondes ou en passant de l'air à travers la colonne au moyen d'une seringue pendant 10 secondes.
- 6.3.3 Éluer l'aflatoxine B₁, suivant une procédure en deux étapes:
Appliquer 0,50 ml de méthanol sur la colonne et laisser passer par gravité. Collecter l'éluat dans un flacon volumétrique de 5 ml (4.7). Attendre une minute et appliquer une seconde portion de 1,25 ml de méthanol. Récolter la majeure partie du solvant d'élution en traversant avec de l'air, après que la majeure partie de la solution soit passée par gravité.

Option A (recommandée)

NOTE: Cette option recommandée nécessite un détecteur par fluorescence approprié à un système d'injection. L'option B est appliquée si le signal du détecteur est bas pour l'analyse se référant à l'option A.

- 6.3.4 Collecter l'éluat dans un flacon volumétrique de 5 ml (4.7).
- 6.3.5 Remplir le flacon jusqu'à la marque avec de l'eau bidistillée et bien agiter. Si la solution est claire, elle peut être directement utilisée pour l'analyse CLHP. Si elle ne l'est pas, la faire passer à travers une unité filtrante (0,45 μ m) (4.14) avant l'injection CLHP.

NOTE: L'injection par boucle totale garantit une exactitude maximale. Il est recommandé (suivant le système d'injection, p.ex. seringue ou auto-échantillonneur) de prélever un volume d'échantillon de 3 fois la taille de la boucle d'injection et d'injecter au moins 2/3 de ce volume dans la valve, afin d'être sûr que la fraction médiane demeure dans la boucle d'injection. Ainsi, la boucle est rincée avec le solvant d'injection tandis que suffisamment de solvant reste dans la valve.

Option B (si applicable)

NOTE: Si le signal de détection est trop faible pour garantir le niveau requis pour la déviation standard relative (DSR), une étape d'évaporation additionnable peut être incluse afin de pouvoir le satisfaire (10% d'une injection multiple -n=10- d'une solution standard d'aflatoxine B₁ à une concentration équivalent à un niveau de contamination de 1 mg/g).

- 6.3.6 Collecter dans une fiole de verre lavée à l'acide l'aflatoxine contenant l'éluat de méthanol à partir de la colonne d'immuno-affinité.
- 6.3.7 Évaporer l'éluat jusqu'à siccité sous un courant doux d'azote à 40 °C.
- 6.3.8 Dissoudre à nouveau l'aflatoxine dans une solution aqueuse de méthanol (35%). Employer exactement le même volume pour les résidus évaporés d'échantillon que pour l'utiliser dans la solution évaporée de calibration. Le volume pour cette redissolution (volume final) dépendra de la taille de la boucle d'injection. Utiliser le mode total de boucle pour injection comme décrit dans l'option A.

6.4 Dérivatisation post-colonne

Pendant l'utilisation de PPB, monter la pièce T d'assemblage et le tubage de réaction mentionné sous 4.11, et opérer ensuite en utilisant les paramètres suivants:

Taux de flux: 1 ml/minute (phase mobile 5.12)

0,30 ml/minute (réactif 5.14)

Pendant l'utilisation du brome généré électrochimiquement (cellule KOBRA), suivre les instructions fournies par le fabricant pour l'installation de la cellule, et opérer ensuite avec les paramètres suivants:

Taux de flux: 1 ml/min phase (mobile 4.13)

Courant: 100 μ A

6.5 Courbe de calibration

La courbe de calibration sera préparée en utilisant les solutions de calibration de travail décrites (5.17). Ces solutions couvrent la portée de 0,5-5,5 μ g/kg pour l'aflatoxine B1. Dresser la courbe de calibration avant l'analyse, suivant le Tableau (5.17) et vérifier la situation pour la linéarité. La régression linéaire sera effectuée en employant une calculatrice scientifique ou un programme statistique.

NOTE: Dans le cas où le contenu de l'échantillon en aflatoxine B1 se trouve en dehors de la portée de calibration, une courbe appropriée de calibration doit être préparée. Alternativement, la solution d'injection pour l'analyse CLHP peut être diluée jusqu'à un contenu d'aflatoxine appropriée à la courbe de calibration établie.

6.6 Procédures de blocage pour la détermination de récupération

Pour déterminer la récupération, bloquer la solution standard d'aflatoxine au poids initial d'un matériel exempt d'aflatoxine. Le niveau de blocage sera à l'intérieur de la portée de calibration (préférentiellement dans la partie médiane). Prendre soin de n'ajouter que moins de 2 ml du solvant de blocage (la solution doit présenter une concentration adéquate d'aflatoxine B1) et que l'évaporation subséquente se passe dans l'obscurité et dure 0,5 à 2 heures.

7. Calcul

Situer le signal sur l'axe des X (hauteur ou surface) vis-à-vis de la concentration en aflatoxine B₁ [ng/ml] provenant de la solution de calibration sur l'axe des Y. dessiner la courbe de calibration et calculer la pente (*a*) et l'intersection (*b*) en utilisant la régression linéaire.

$$y = ax + b$$

L'utilisation de la fraction résultante permet de calculer la concentration d'aflatoxine B1 dans la solution mesurée.

Le calcul de la concentration d'aflatoxine B1 des solutions injectées à partir de la courbe de calibration (fraction) obtenue par régression linéaire:

$$\rho_{smp} = a \cdot A_{smp} + b$$

$$\omega_{conta} = \frac{\rho_{smp} \cdot V_S \cdot V_E \cdot V_D}{m \cdot V_{AE} \cdot V_{A/AC}}$$

$$\omega_{conta} = \frac{\rho_{smp} \cdot 100 \cdot V_E}{m}$$

où,

- m = matériel de l'échantillon pris pour analyse [g] - (50 g),
- V_S = solvant pris pour l'extraction [ml] - (250 ml),
- V_{AE} = aliquote prise de l'extrait [ml] - (5 ml),
- V_D = volume obtenu après dilution avec PBS (eau) [ml] - (100 ml),
- $V_{A/AC}$ = aliquote prise pour nettoyage immunoaffinité [ml] - (50 ml),
- V_E = volume final obtenu après élution à partir de la colonne d'immuno-affinité [ml],
- ρ_{smp} = concentration d'aflatoxine calculée par régression linéaire [ng/ml],
- ω_{conta} = contamination du matériel de l'échantillon avec l'aflatoxine B₁ [µg/kg],
- A_{smp} = surface ou hauteur du pic d'aflatoxine obtenu à partir de la solution mesurée [unités].

Garder à l'esprit que pour respecter la formule, le même volume doit être ajouté pour l'échantillon et les solutions standard.

8. Contrôle de la qualité

8.1 Exactitude

La récupération de l'échantillon bloqué doit s'élever de 60 à 120%, autrement les séries doivent être répétées. Le contrôle de travail sera mesuré avec chaque ensemble et comparé aux limites fixées sur la charte de contrôle.

8.2 Précision

Injecter un standard situé à mi-portée comme contrôle après environ cinq échantillons afin d'évaluer les changements dans la surface de pic.

Celle-ci ne doit pas être modifiée plus de 10% par rapport à la surface de pic standard de la courbe de calibration. Vérifier également par AFB₁, AFB₂, AFG₁ et AFG₂ si elles sont également en cours de détermination.

9. Remarques

- 9.1 Pour la capacité de chargement des colonnes d'immuno-affinité, se référer aux spécifications des fabricants.
- 9.2 Avant d'appliquer la confirmation CLHP, il est possible de passer les aflatoxines avec différents kits de testage. Plusieurs tests ELISA sont commercialement disponibles.
- 9.3 Le rapport de test contiendra les données suivantes:
 - information nécessaire à l'identification de l'échantillon (espèce, origine, désignation);
 - référence à la méthode;

- date et type de procédure d'échantillonnage (si connue);
- date de réception;
- date de test;
- résultats de test et unités dans lesquels ils sont exprimés;
- taux de récupération de l'échantillon de contrôle du travail (8);
- déclaration où les résultats sont corrigés pour la récupération, et;
- points particuliers observés au cours du test; opérations non spécifiées dans la méthode ou considérées comme optionnelles, qui peuvent avoir affecté les résultats.

10. Références bibliographiques

AOAC 2005.08. 2008. *Aflatoxins in corn, raw peanuts and peanut butter using liquid chromatography with post-column photochemical derivatization, Section number 49.2.18A.* Gaithersburg, MD, USA

AOCS. 2005. *Analysis of aflatoxin using CLHP post-column photochemical derivatization, recommended practice Aa 11-05.* Champaign, USA

EN 17375. 2006. *Animal feeding stuffs – Determination of aflatoxin B₁, International Organization for Standardization.* Geneva, Switzerland.

FUMONISINES – MÉTHODE CLHP

1. Principe

Les fumonisines B₁ et B₂ (FB₁, FB₂) sont extraites de l'échantillon d'aliments pour animaux avec une solution aqueuse de méthanol. L'extrait est purifié en utilisant des colonnes d'immuno-affinité. Les analytes sont séparés par chromatographie liquide de haute performance en phase inverse (RP-CLHP) et détectées par leur fluorescence après dérivation à l'ophtalaldehyde (OPA) soit pré ou post-colonne.

2. Portée

Cette procédure est surtout appropriée pour les fumonisines dans les maïs entiers et les aliments composés pour bétail. La limite de quantification est au moins de 3 mg/kg pour le total de fumonisines, mais en fonction de l'équipement, il est possible d'effectuer des quantifications de 0,5 mg/kg et moins pour chaque fumonisine.

3. Responsabilités

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Moulin.
- 4.2 Mixer tumble.
- 4.3 Mixer Vortex.
- 4.4 Shaker de laboratoire.

- 4.5 Flacons de 250 ml avec bouchons à vis.
- 4.6 Cylindres gradués de capacité de 5, 50, 1000 et 2000 ml.
- 4.7 Pipettes graduées (Classe A) de 2, 10 et 50 ml de capacité.
- 4.8 Balance d'analyse exacte à 0,1 mg près.
- 4.9 Filtre en microfibre de verre, à mailles de ca 2 μm .
- 4.10 Entonnoir à filtre de taille appropriée.
- 4.11 Fioles d'auto-échantillonnage de taille appropriée avec bouchons.
- 4.12 Réservoirs de taille appropriée pour colonnes d'immuno-affinité, avec adaptateurs pour connexion au sommet des colonnes d'immuno-affinité.
- 4.13 Flacons volumétriques (Classe A) 2, 5, 10 et 20 ml de capacité.
- 4.14 Seringues de précision en verre pour gaz et liquides et/ou pipettes à déplacement positif capables de délivrer précisément des volumes de 5, 50, 125, 160 et 500 μl et 1 ml.
- 4.15 Dispositif de support de taille appropriée pour colonnes d'immuno-affinité.
- 4.16 Instrumentation CLHP, comprenant:
 - 4.16.1 Un dispenseur de solvant capable de générer un quotient binaire avec suffisamment de précision aux pressions requises, p.ex. Agilent Séries 1200 pump.
 - 4.16.2 Auto-échantillonneur capable d'injecter des volumes suffisants de la solution d'injection avec la répétabilité conséquente et, pour la pré-colonne de dérivation, capable de mélanger le réactif et la solution d'échantillon avant injection, p.ex. Agilent Séries 1200 ALS.
 - 4.16.3 Colonne de chromatographie = toute colonne produisant un pic symétrique (facteur d'asymétrie de pic $0,9 < A_s < 1,4$ à 10% de la hauteur totale), rétention ($k > 2$) et résolution ($R_s > 1$) suffisantes pour FB_1 et FB_2 , p.ex. Agilent Zorbax SB-C18 4,6 x 150 mm, 3,5 μm .
 - 4.16.4 Détecteur à fluorescence: capable de procurer l'excitation requises, et les longueurs d'onde d'émission, équipée d'une cellule de flux de taille appropriée, p.ex. Agilent Séries 1200 FLD ou Waters 474.
 - 4.16.5 Système post-colonne de dérivation (pas nécessaire si une dérivation pré-colonne est utilisée): soit une unité commerciale, soit une unité auto-assemblée; dans ce dernier cas, les équipements suivants sont nécessaires:
 - Pompe à réactif capable de délivrer un flux constant exempt de pulsations, de réactif de dérivation vis-à-vis des pressions requises;
 - Un tubage PEEK de diamètre extérieur requis par le système CLHP employé et de différents diamètres intérieurs, p.ex. 1/16" OD (diamètre extérieur), 0,04", 0,02" ID, 0,01" ID ou 0,005" ID; et
 - Raccord en T pour mélange: petit volume interne PEEK (polyetheretherketon), p.ex. VICI JR-9000-0665.
- 4.17 Filtre nylon 0,45 μm .

5. Réactifs

Toutes les solutions sont faites avec des solvants CLHP et de matériaux pour réactifs homologués à moins que précisé autrement. Seule de l'eau bidistillée au moins de classe2, ainsi que défini dans ENISO 3696 sera utilisée:

- 5.1 Eau bidistillée.

- 5.2 Méthanol.
- 5.3 Acétonitrile.
- 5.4 Chlorure de potassium (KCl).
- 5.5 Chlorure de sodium (NaCl).
- 5.6 Dodecahydrate de phosphate d'hydrogène disodé ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).
- 5.7 Decahydrate de tetraborate disodé ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$).
- 5.8 Carbonate de sodium (Na_2CO_3).
- 5.9 Acide de borique (H_3BO_3).
- 5.10 Sulfate de potassium (K_2SO_4).
- 5.11 N-Acetyl-L-Cysteine (NAC).
- 5.12 o-Phtalaldehyde (OPA).
- 5.13 β -Mercaptoethanol (BME).
- 5.14 Acide formique (98-100%).
- 5.15 Concentré salin de tampon phosphate (PBS)
Dissoudre dans 1800 ml d'eau bidistillée (5.1):
4 g KCl (5.4)
160 g NaCl (5.5)
72 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (5.6)
Ajuster à pH 7.4 avec 10 M HCl et porter à volume à 2000 ml avec de l'eau bidistillée.
- 5.16 PBC prêt à l'emploi: diluer 100 ml de concentré PBC prêt à l'emploi (5.15) à 1000 ml avec de l'eau bidistillée (5.1) ou une tablette PBS, p.ex. Sigma P4417 (une tablette dissoute dans 200 ml d'eau bidistillée (5.1) donne 0,01 M de tampon phosphate, 0,0027 M de chlorure de potassium et 0,137 M de chlorure de sodium, pH 7.4 à 25 °C).
- 5.17 Diluant: mélanger méthanol (5.2) et eau bidistillée (5.1) à 1:1 (v/v).
- 5.18 Solvant d'extraction:
Mélanger méthanol (5.2) et PBS (5.16) à 1:1 (v/v).
- 5.19 Tampons de réactions pour post et pré-colonnes
- 5.19.1 Dérivatisation Post-colonne: 0,006 M OPA, 0,006 M NAC, 0,384 M carbonate de sodium, 0,216 M acide borique et 0,108 M sulfate de potassium.
- Dissoudre 40,7 g de carbonate de sodium (5.8), 13,4 g d'acide borique (5.9) et 18,8 g de sulfate de potassium (5.10) dans 1 litre d'eau bidistillée (5.1);
 - Mélanger pendant 10 minutes;
 - Ajouter 800 mg de OPA (5.12) dans 1 litre de la solution ci-dessus;
 - Ajouter 1 g de NAC (5.11) dans 1 litre de la solution ci-dessus;
 - Mélanger pendant 10 minutes;
 - Placer dans un bain-marie à ultrasons pendant 15 minutes.
 - Mélanger pendant 10 minutes; et
 - Placer dans un bain-marie à ultrasons pendant 15 minutes. Filtrer la solution à travers un filtre nylon 0,45 μm (4.17).
- NOTE:*
- Une dissolution correcte de l'OPA est très importante
 - Le tampon de réaction ne sera pas changé pendant une séquence d'opérations CLHP.
 - Préparer une solution fraîche pour chaque séquence d'opérations CLHP.

5.19.2 Pré-colonne de dérivation: 0,1 M OPA, 0,24 M BME, 0,08 M tetraborate disodique, 16,7% méthanol

- Dissoudre 40 mg OPA (5.12) dans 1 ml méthanol (5.2);
- Mélanger jusqu'à dissolution complète;
- Ajouter 5 ml d'une solution 0.1 M de décahydrate de tetraborate disodique (3,8 g/100 ml; 5.7);
- Mélanger soigneusement;
- Ajouter 50 μ l de BME (5.13); et
- Mélanger soigneusement.

Alternativement du réactif phthaldialdéhyde (Sigma-Aldrich P0532) peut être utilisé

5.20 Solution de stockage FB₁ et FB₂: Une solution certifiée de Fumonisine FB₁ et FB₂ de ca 50 μ g/ml chacune dans un solvant approprié. Prendre la concentration exacte à partir du certificat.

5.21 Solution diluée de stockage FB₁ et FB₂: Ajouter 160 μ l de la solution de stockage FB₁ and FB₂ (5.20) dans un flacon volumétrique de 2 ml (4.13). Porter à 2 ml avec le diluant (5.17). Ceci fournira 2,0 ml de dilution à 12,5 de la solution 5.20.

NOTE: Les solutions ci-dessus (5.20, 5.21) peuvent être préparées également par gravimétrie en pesant exactement la substance sèche et le solvant employé pour sa dissolution.

5.22 Solutions de calibration: à partir des solutions stockage diluées (5.21) préparer 5 niveaux de solutions de calibration en ajoutant les volumes de la solution diluée de stockage mentionnés au Tableau 4 dans un flacon volumétrique (4.13) des volumes indiqués et porter à la marque avec le diluant (5.17).

Calculer les concentrations de FB₁ et FB₂ pour les différents niveaux de calibration en divisant les concentrations certifiées ou calculées de la solution de stockage (5.20) par la dilution finale indiquée sur le Tableau 4. S'il est observé une saturation du signal du détecteur au niveau de calibration le plus élevé, diluer 250 μ l de la solution diluée de stockage (5.21) dans 2 ml, pour une dilution finale de 100. Ces niveaux de calibration sont des recommandations et peuvent être ajustés suivant les besoins individuels.

5.23 Colonnes d'immuno-affinité. Les colonnes doivent présenter une phase stationnaire avec des anticorps monoclonaux immobilisés pour, au moins, FB₁ et FB₂. Pour convenir à cette méthode, ils doivent satisfaire aux besoins indiqués ci-dessous: une aliquote d'un extrait représentatif d'aliment pour bétail exempt de fumonisine est pointée avec FB₁ et FB₂, à la fois à 920 (élevé) ou 110 (faible) ng/ml. Diluer ensuite 5 ml de cet extrait pointé pour un volume total de 50 ml (voir 6.2).

Suivant les procédures décrites en 6.3 et 6.4, cela va aboutir en concentrations attendues dans les solutions d'injection attendues dans les solutions d'injection soit à 460 ou 55 ng/ml pour le total de FB₁ et FB₂.

Après la mesure de ces solutions, les concentrations observées de FB₁ et FB₂ peuvent être calculées en utilisant les équations 1 et 2 (données en section 7). La division de la somme des concentrations observées de FB₁ and FB₂ par les concentrations attendues va aboutir au rendement des colonnes d'immuno-affinité. Ces rendements doivent être 99 \pm 18% (U, k = 2) au niveau faible.

Le test de colonne ci-dessus sera effectué pour chaque niveau sur au moins trois

TABLEAU 4
Concentrations standard de Fumonisine

Calibrant No.	Solution stockage diluée(5.21) [μ l]	Flacon Volumétrique (4.13) [ml]	Dilution finale de la solution de stockage (5.20)
1	50	20,0	5000
2	125	10,0	1000
3	125	5,0	500
4	500	2,0	50
5	1000	2,0	25

colonnes choisies au hasard sur chaque nouveau lot de colonnes d'immuno-affinité à utiliser. Si ce lot testé ne satisfait pas aux conditions ci-dessus, soit un nouveau lot sera obtenu, soit les conditions décrites en 6.3 devront être ajustées afin de satisfaire aux préalables (les instructions pour l'utilisateur fournies avec les colonnes représentent un bon point de départ).

Tout changement dans les procédures de nettoyage va nécessiter une revalidation du nettoyage et toutes les étapes suivantes (chromatographie).

6. Procédure

6.1 Extraction de FB₁ et FB₂

6.1.1 Peser 20 g de l'échantillon à tester dans un récipient avec couvercle suffisamment grand, p.ex. un flacon de 250 ml (5.5).

6.1.2 Ajouter 200 ml de solvant d'extraction (4.12), refermer le flacon et agiter vigoureusement à la main, de sorte que le matériel se disperse.

6.1.3 Mettre dans un shaker (5.4) pendant 120 minutes. Sélectionner la vitesse de sorte que le matériel soit bien mélangé sans venir surnager au sommet du flacon.

6.1.4 Laisser l'échantillon extrait se déposer après mélange.

6.1.5 Prélever 5 ml de l'extrait (6.14) et diluer avec PBS (4.16) jusqu'à volume total de 50 ml et mélanger.

6.1.6 Préparer un entonnoir à filtre (5.10) avec un filtre de microfibre de verre (5.9).

6.1.7 Filtrer le diluté surnageant de l'extrait d'échantillon dans un nouveau flacon (5.5).

6.1.8 L'extrait dilué filtré peut être stocké à 4-10 °C pour la nuit.

6.1.9 Dans le cas d'un matériel hautement contaminé au-dessus de 10000 μ g/kg (voir 8) prélever 10 ml de l'extrait dilué filtré et stocké et diluer à nouveau avec PBS (4.16) jusqu'à volume total de 50 ml et mélanger.

6.2 Nettoyage

6.2.1 Prendre une colonne d'immuno-affinité (IAC, 4.23) par extrait.

6.2.2 Attacher un réservoir (5.12), ne pas vider la solution de stockage de la colonne.

6.2.3 Ajouter 25 ml de l'extrait filtré dilué au réservoir (6.1).

6.2.4 Ouvrir l'orifice de sortie de la colonne.

6.2.5 Laisser passer l'ensemble lentement à travers la colonne. Le taux de flux sera de une à deux gouttes/secondes.

TABLEAU 5
Installations des gradients (CLHP) en
utilisant la dérivation pré-colonne

Temps [min]	B [%]
0	69,5
14	79
14,01	100
17,01	100
17,02	69,5
20	69,5

- 6.2.6 Après que l'extrait soit entièrement passé à travers la colonne, laver cette dernière avec 10 ml de PBS (4.16).
- 6.2.7 Passer de l'air à travers la colonne d'immuno-affinité (p.ex. avec une grande seringue correctement appropriée) afin d'expulser l'excédent de PBS.
- 6.2.8 Placer un flacon volumétrique de 5 ml (5.13) ou un cylindre gradué de 5 ml (5.6) en dessous de la colonne d'immuno-affinité et ajouter 5 x 500 µl de méthanol (4.2) à la colonne d'immuno-affinité (ajouter une aliquote supplémentaire seulement après que la précédente ait complètement passé à travers la colonne).
- 6.2.9 Récolter tout l'éluant dans le flacon volumétrique (5.13) ou le cylindre gradué (5.6).
- 6.2.10 Ajouter 2 ml d'eau bidistillée (4.1) à la colonne d'immuno-affinité après que tout le méthanol soit complètement passé à travers la colonne.
- 6.2.11 Continuer à récolter tout l'éluant dans le même flacon volumétrique ou flacon gradué.
- 6.2.12 Faire passer soigneusement de l'air à travers la colonne afin de collecter le maximum de l'eau fournie (4.1).
- 6.3 Solution test
- 6.3.1 Pour dérivation de la pré-colonne. Pour le flacon volumétrique ou le cylindre gradué à volume jusqu'à la marque de 5 ml avec de l'eau bidistillée (4.1).
- 6.3.2 Pour dérivation de la post-colonne: ajouter 5 µl d'acide formique (4.14) et porter à volume le flacon volumétrique ou le cylindre gradué jusqu'à la marque de 5 ml avec de l'eau bidistillée (4.1).
- 6.3.3 Mélanger le contenu du flacon volumétrique ou du cylindre gradué et transférer une aliquote dans une fiole d'auto-échantillonnage (5.11).
- 6.3.4 Cette solution test peut être stockée à 4-10 °C pendant 2 jours.
- 6.4 Procédure de pointage
- Pour déterminer la récupération, arroser un matériau d'aliments pour animaux représentatif exempt de fumonisine avec la solution de stockage FB1 et FB2 (4.20), ou une dilution de celle-ci. Le niveau de pointage devra se trouver au sein de la portée de calibration (préférentiellement vers le milieu). La concentration de la solution utilisée devra être telle qu'il ne faudra pas ajouter plus de 2 ml. Laisser l'échantillon arrosé reposer pour une période de 30 minutes afin d'assurer l'évaporation du solvant.

TABLEAU 6
Installations de gradients (CLHP) en
utilisant la dérivation post-colonne

Temps [min]	B [%]
0	34
13	34
13,01	95
16	95
16,01	34
19	34

6.5 Conditions de fonctionnement de l'CLHP

Les conditions de fonctionnement décrites ci-dessous sont correctes avec l'équipement décrit en 4.16. Des ajustements seront nécessaires pour obtenir une résolution et une rétention appropriées en utilisant un équipement différent (4.16.3). Ces ajustements devront être appliqués dans le programme d'injection du volume à injecter, le pourcentage du modificateur organique dans le mode isocratique ou du gradient, le taux de flux, et/ou la température de la colonne.

6.5.1 Dérivation pré-colonne

En utilisant l'équipement décrit en 4.16, les conditions suivantes ont démontré la production de résultats satisfaisants.

Programme de l'injecteur pour auto-échantillonnage:

- Aspirer 20 µl du tampon de réaction de la pré-colonne (5.19.2);
- Aspirer 40 µl de la solution test (6.4);
- Aspirer 20 µl du tampon de réaction de la pré-colonne (5.19.2);
- Mélanger 20 fois
- Injecter le tout.

Ce qui est décrit ci-dessus peut être fait manuellement (ajuster le volume total en maintenant les volumes relatifs si nécessaire) s'il est avéré que la solution soit injectée dans les 3 minutes après mélange. Il est également important que le délai entre mélange d'injection soit le même pour toutes les solutions test et de calibration.

- Volume injection: 80 µl
- Température colonne: 40 °C
- Flux: 1.0 ml/min
- Détecteur à fluorescence. Excitation λ : 335 nm, Émission λ : 440 nm (contrôles en utilisant un spectre de longueurs d'onde pour le détecteur à fluorescence utilisé).
- Phase mobile: A: 0,5% acide formique (5.14) dans eau bidistillée (5.1)
 B: 0,5% acide formique (5.14) dans méthanol (5.2)
- Installations du gradient (volume CLHP 0,8 ml), voir Tableau 5:

Les instruments avec un volume mort différent nécessiteront un ajustement du gradient afin d'effectuer une séparation similaire. L'objectif sera de définir un facteur de capacité apparent (k) à une élution >3 pour FBI.

6.5.2 Dérivatisation post-colonne

Instructions pour système auto-assemblé:

Le chemin de flux à la colonne chromatographique est inchangé par rapport au fonctionnement normal. L'orifice de sortie de la colonne est connecté à l'un des points de sortie d'un T de mélange (4.16-5.3). Le tubage sera aussi court que possible.

Le point de sortie du T de mélange est connecté à l'orifice de sortie d'une pompe (4.16, 5.1) dispensant le flux de réactif. La connexion sera faite au moyen d'une longue pièce de tubage 0,005" ID PEEK (4.16, 5.2) de façon à créer une pression postérieure suffisante permettant à la pompe à réactif de fonctionner correctement. Il est d'importance primordiale que le flux de réactif soit dispensé sans pulsations. Une légère pulsation peut être minimisée en introduisant un volume important tampon entre la pompe et la pression postérieure par création d'un tubage PEEK. Un grand tubage ID PEEK peut servir à cet effet. Le point central restant du T de mélange est connecté par une boule à réactif au détecteur à fluorescence.

La longueur, et par conséquent le volume, de cette boule à réactif équilibre la rétention de la résolution de la colonne chromatographique (courte) et l'exécution de la réaction complète (longue). Le diamètre interne est de moindre importance. S'il est choisi trop petit, une pression postérieure trop élevée va se créer. Des résultats satisfaisants ont été obtenus avec un tubage 0,02" ID PEEK de 2,5 m de long.

En utilisant l'équipement décrit en 4.16, les conditions suivantes ont démontré la production de résultats satisfaisants.

- Volume injection: 50 µl
- Température colonne: 45 °C
- Flux: 1.2 ml/min (phase mobile); 0,45 ml/min (réactif post colonne; 5.19.1).
- Détecteur à fluorescence: Excitation λ : 335 nm; Emission λ : 440 nm (contrôles en utilisant un spectre de longueurs d'onde pour le détecteur à fluorescence utilisé).
- Phase mobile: A: 0,1% acide formique (5.14) dans de l'eau bidistillée (5.1)
B: 0,1% acide formique (5.14) dans acétonitrile (5.3)

La séparation est isocratique mais pour éviter l'accumulation de composants matriciels, une étape B de 95% est intégrée. Le pourcentage de modification organique sera ajusté de sorte que le facteur de capacité (k) soit > 2.

6.6 Détermination de fumonisines dans les solutions test

Injecter des aliquotes des solutions test (6.4) dans les HPLS en utilisant les mêmes conditions que celles utilisées pour les solutions de calibration (5.22).

6.7 Composition (Séquence) du lot

Toujours démarrer une série de mesures avec un réactif à blanc pour contrôler le système. Ensuite, injecter les solutions de calibration. Avant l'injection de la première solution test, le réactif à blanc sera injecté pour prouver qu'il n'existe pas de report des analytes. Les solutions test seront conduites par doublons et des reprises des

solutions de calibration seront intercalées à des intervalles réguliers. La fréquence de ces reprises de calibrations dépend de la stabilité du système de chromatographie.

6.8 Calibration

Positionner les signaux (surface ou hauteur du pic) de toutes les solutions à calibration mesurée vis-à-vis des concentrations correspondantes pour FB1 et, séparément, pour FB2. Ne pas utiliser les moyennes des injections multiples. Au moyen d'une régression linéaire, estimer la pente et l'Intersection des deux fonctions de calibration (FB1 et FB2). Vérifier la signification de l'Intersection et de la linéarité (utiliser p.ex. les valeurs résiduelles vis-à-vis des valeurs adéquates d'emplacement).

6.9 Identification du pic

Identifier les pics de fumonisine B1 et B2 dans la solution test en comparant les temps de rétention avec ceux de la solution de calibration la plus proche dans le lot. Le signal (surface ou hauteur du pic) de FB1 et FB2 de la solution test doit tomber au sein de la portée de calibration. Si le signal de FB1 et/ou FB2 de la solution test dépasse les signaux de la solution avec la calibration la plus haute, la solution test sera re-diluée (5.17) pour la ramener à l'intérieur de la portée de calibration, et ré-analysée. Le facteur de dilution doit être incorporé dans tous les calculs subséquents.

7. Calcul

Avec l'aide des estimations de pentes et d'Intersections (significatifs, autrement utiliser zéro) de la régression linéaire, calculer les concentrations de FB₁ (c_{FB1}) et FB₂ (c_{FB2}) dans les solutions test (6.4) à partir du signal moyen des injections dupliquées comme suit:

$$c_{FB1} = \frac{\overline{\text{signal}}_{FB1} - \text{Intersection}_{FB1}}{\text{pente}_{FB1}} \quad [\text{ng/ml}] \quad (1)$$

$$c_{FB2} = \frac{\overline{\text{signal}}_{FB2} - \text{Intersection}_{FB2}}{\text{pente}_{FB2}} \quad [\text{ng/ml}] \quad (2)$$

Si la solution test a été diluée du fait d'un signal au-dessus de la portée de calibration (6.10), multiplier c_{FB1} et c_{FB2} par le facteur de dilution.

Pour calculer les fractions massales des analystes dans des matériaux originaux, utiliser l'équation suivante:

$$w_{SMP} = \frac{c \cdot V_5 \cdot V_3 \cdot V_1}{V_4 \cdot V_2 \cdot m_{SMP}} \quad [\text{ng/g or } \mu\text{g/kg}] \quad (3)$$

où,

c = concentration calculée de FB₁ (1) ou FB₂ (2), potentiellement corrigée par dilution c_{FB1} et c_{FB2} ,

m_{SMP} = poids du matériel test utilisé pour l'extraction (20 g),

V_1 = volume total du solvant d'extraction (200 ml),

- V_2 = volume de l'aliquote de l'extrait brut filtre utilisé pour dilution (5 ml),
 V_3 = volume total de l'extrait brut filtre dilué (50 ml),
 V_4 = volume de l'aliquote de l'extrait brut dilué filtre utilisé pour IAC (25 ml), et
 V_5 = volume total de la solution test (5 ml).

Si le poids du matériel test et les volumes ci-dessus sont les mêmes, l'équation (3) ci-dessus peut être simplifiée en:

$$w_{SMP} = c \cdot 20 \text{ } [\mu\text{g}/\text{kg}]$$

Si le résultat de l'équation 4 s'avère plus élevé que 10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou s'il est connu antérieurement que le niveau de contamination puisse excéder cette valeur, on nettoiera l'extrait respectif filtré dilué avec une dilution additionnelle (facteur de dilution additionnel $50/10 = 5$). L'équation simplifiée devient alors:

$$w_{SMP} = c \cdot 20 \cdot 5 = c \cdot 100 \text{ } [\mu\text{g}/\text{kg}] \quad (5)$$

Effectuer les calculs ci-dessus pour FB1 et FB2. La somme des deux sera alors calculée comme suit:

$$w_{SMP} = w_{SMP, FB1} + w_{SMP, FB2} \text{ } [\mu\text{g}/\text{kg}] \quad (6)$$

8. Contrôle de la qualité

8.1 Exactitude

La récupération de l'échantillon pointé (6.4) doit s'évaluer entre 60 et 120%, autrement la série doit être répétée. Le contrôle de travail sera mené sur chaque ensemble et comparé avec les limites établies sur la charte de contrôle.

8.2 Précision

Injecter standard de calibration à mi-portée comme contrôle après environ 5 échantillons pour évaluer les changements dans la surface de pic. Celle-ci ne devra pas être modifiée de plus de 10% par rapport à la surface standard de la courbe de calibration. Faire ceci pour toutes les fumonisines FB1 et FB2.

9. Remarques

- 9.1 L'application de cette méthode est également possible pour déterminer la fumonisine B₃ (FB₃).
- 9.2 Pour la capacité de chargement des colonnes d'immuno-affinité, se référer aux spécifications du fabricant.
- 9.3 Avant d'appliquer la procédure CLHP, les échantillons peuvent être passés au crible avec différents kits de testage. Par exemple, des tests ELISA sont disponibles dans le commerce (voir la liste de liaison dans la méthode pour l'aflatoxine). Se référer à la description du produit et à la procédure par le fabricant.
- 9.4 Le rapport de test reprendra les données suivantes:
 - Information nécessaire à l'identification de l'échantillon (type, origine, désignation);
 - référence à cette méthode;

- date et procédure d'échantillonnage (si connu);
- la date de réception;
- la date du test;
- les résultats du test et les unités dans lesquelles ils ont été exprimés;
- la taux de récupération de l'échantillon de contrôle du travail (8);
- une déclaration dans laquelle les résultats sont corrigés pour la récupération;
- les points particuliers relevés durant le cours du test; les opérations non spécifiés dans la méthode ou considérées comme optionnelles, pouvant avoir affecté les résultats.

10. Références bibliographiques

EN 16006. 2011. *Animal feeding stuffs – Determination of the sum of Fumonisin B1 and B2 in compound animal feed with immunoaffinity clean-up and RP-CLHP with fluorescence detection after pre- or postcolumn derivatisation.* Geneva, Switzerland.

Commission Regulation (EC). 2006. No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 2006. 49 (L70), pp. 12-34.

AOAC. 2000. Natural poisons. Fumonisin B1, B2 and B3 in corn. *Official Methods of Analysis. Method 995.15.* Association of Official Analytical Chemists, Inc., Gaithersburg, MD, USA.

ZEARALENONE (ZON) – METHODE CLHP

1. Principe

La Zearalenone est extraite de l'échantillon par du méthanol aqueux. L'extrait est dilué dans une solution saline tamponnée de phosphate et la zéaralenone est isolée sur une colonne d'immunoaffinité contenant des anticorps spécifiques pour cette substance. L'analyte est déterminé quantitativement par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec détecteur par fluorescence.

2. Portée

Ce standard est applicable pour la détermination de zéaralenone dans les aliments pour animaux à des concentrations de 30 à 3000 µg/kg.

3. Responsabilités

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

Équipement usuel de laboratoire et en particulier:

- 4.1 Balance d'analyse, précise à 1,0 mg.
- 4.2 Shaker horizontal ou vertical.
- 4.3 Homogénéiseur, mélangeur à haute vitesse.

- 4.4 Mixer Vortex, ou équivalent.
- 4.5 pH mètre.
- 4.6 Broyeur (différents tamis).
- 4.7 Mixer Tumbler.
- 4.8 Fioles en verre, tailles variées.
- 4.9 Pipettes graduées de 5 et 50 ml.
- 4.10 Cylindre gradués avec ou sans bouchons de 5 ml et 250 ml.
- 4.11 Flacons volumétriques de 3, 5 et 10 ml.
- 4.12 Bécher de 250 ml.
- 4.13 Flacons à bouchons coniques ou à vis de 100, 250 et 500 ml.
- 4.14 Entonnoir en verre de taille appropriée.
- 4.15 Filtres de cellulose pliés (taille des pores ca 30 μm) pour les entonnoirs en verre (4.14).
- 4.16 Disques filtrants, en microfibre de verre (taille des pores < 2 μm) de taille appropriée pour le système de filtration sous-vide de solvant (4.22).
- 4.17 Pipettes automatiques ou seringues hermétiques de 100 μl et 500 μl et 1 ml.
- 4.18 Système à vide à dispositif manuel ou automatique SPE, adaptable aux colonnes à immunoaffinité.
- 4.19 Réservoirs, de volumes appropriés avec attaches pour s'adapter aux colonnes à immunoaffinité.
- 4.20 Seringues en plastiques, 5 ml.
- 4.21 Pompe à vide, capable de générer un vide suffisant pour le système de filtration sous vide du solvant (4.22).
- 4.22 Système de filtration sous vide du solvant adaptable au filtre en microfibre de verre (4.16).
- 4.23 Seringues CLHP pour unité filtrante, en polyamide (nylon) avec pores de 0,45 μm .
- 4.24 Bain ultrasonique
- 4.25 Appareil CLHP, comprenant:
 - 4.25.1 Système d'injection, manuel ou auto-échantillonneur avec une boucle adaptable pour injections de 100 à 300 μl .
 - 4.25.2 Pompe, isocratique, exempte de pulsations, capable de maintenir un taux de flux de 0,15 à 1,5 ml/minute.
 - 4.25.3 Colonne CLHP en phase inversée; généralement toutes les colonnes RP sont capables de permettre une séparation suffisante de la zearalenone des autres composants interférents, par exemple Phenomenex Octadecylsilane (ODS) 3-Prodigy (150 mm x 4.6 mm ID.), 5 μm taille des particules, 250 Å taille des pores, ou Spherisorb Octadecylsilane (ODS) 2-Excel (250 mm x 4.6 mm ID), 5 μm taille des particules, taille des pores 250 Å ont été identifiés comme adéquats.
 - 4.25.4 Pré-colonne (optionnel) appropriées pour la colonne d'analyse utilisée.
 - 4.25.5 Détecteur à fluorescence, adapté à une cellule d'efflux et approprié aux mesures avec une longueur d'onde de 274 nm pour excitation et de 446 nm pour émission.
 - 4.25.6 Système de données, intégrateur de la station de travail du PC.
- 4.26 Spectrophotomètre UV pour contrôle de concentration de la solution de stockage (5.15).

5. Réactifs

Durant l'analyse, et à moins que ce ne soit indiqué autrement, n'utiliser uniquement que des réactifs de classe certifiée pour analyse et de l'eau bidistillée ou de l'eau de grade I comme précisé dans EN ISO 3696 (1995). Les solvants seront de grade CLHP.

- 5.1 Acétonitrile.
- 5.2 Méthanol, grade technique.
- 5.3 Méthanol, grade CLHP.
- 5.4 Chlorure de sodium.
- 5.5 Orthophosphate hydrogéné disodique.
- 5.6 Phosphate déshydrogéné de potassium.
- 5.7 Chlorure de potassium.
- 5.8 Acide chlorhydrique (32%).
- 5.9 Solution saline tampon phosphatée (PBS).

Dissoudre 8g de chlorure de sodium (5.4), 1,2g de phosphate déshydrogéné de potassium (5.6) et 0,2g de chlorure de potassium (5.7) dans 1 litre d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique (5.8).

NOTE: Des tablettes commerciales de PBS avec propriétés équivalentes peuvent être employées.

- 5.10 Solvant d'extractions, méthanol = eau bidistillée (75:25, v/v). Mélanger 75 parts de volume de méthanol (5.2) avec 25 parts de volume d'eau distillée.
- 5.11 Solvant de lavage, méthanol = PBC (15:85, v/v). Mélanger 15 parts de volume de méthanol (5.3) avec 85 parts de volume de PBS (5.9).
- 5.12 Solvant d'injection pour analyse CLHP, méthanol = eau bidistillée (50:50, v/v). Mélanger 50 parts de volume de méthanol (5.3) avec 50 parts de volume d'eau bidistillée.
- 5.13 Phase mobile CLHP, méthanol: eau bidistillée (75:25, v/v). Mélanger 75 parts de volume de méthanol (5.3) avec 25 parts d'eau bidistillée. Bien mélanger et dégazer.
- 5.14 Zearalenone, pureté minimale: 98%.
- 5.15 Zearalenone (ZON) solution de stockage, 10 µg/ml

Ajouter 400 ml d'acétonitrile (5.1) à 5 mg de zearalenone (5.14) pour une solution standard de 1,25 mg/ml. Diluer 800 µl de cette solution standard à 5 ml d'acétonitrile (5.1) pour une solution standard de 200 µg/ml. Diluer 250 µl de cette solution avec 50 ml d'acétonitrile (5.1) pour créer la solution de stockage de 10 µg/ml.

Pour déterminer la concentration exacte enregistrer comme référence d'absorption de cette solution de stockage à 10 µg/ml en utilisant un spectrophotomètre (4.26) dans la portée de 200 nm à 300 nm dans une cellule de quartz de 1 cm avec de l'acétonitrile (5.1). Déterminer l'absorption du second maximum à $\lambda = 274$ nm. Calculer la concentration massale de zearalenone ρ_{ZON} , en microgrammes par ml en utilisant l'équation suivante:

$$\rho_{ZON} = \frac{A_{\max} \cdot M \cdot 100}{\kappa \cdot d}$$

où,

A_{max} = absorption déterminée au second maximum de la courbe d'absorption (274 nm);

M = masse molaire de la zearalenone ($M = 318.4$ g/mol);

κ = coefficient d'absorption molaire de la zearalenone (1262 m²/mol);

d = longueurs en centimètre du chemin optique de la cellule en quartz (1 cm)

Stocker les solutions standard à < -18 °C.

5.16 Solution de pointage de ZON

Solution calibrée de stockage (5.15). Cette solution est stable pendant 2 mois, si stockée à -18 °C.

5.17 Solution de travail de ZON

Transférer une aliquote de la solution calibrée de stockage (5.15), équivalente à 10 µg de ZON, dans un flacon volumétrique (4.11), ajouter de l'acétonitrile (5.1) pour porter le volume total à 5 ml. Ceci représentera une solution de travail de 2 µg/ml. Cette solution est stable si stockée à < -18 °C.

5.18 Solutions de calibration ZON par CLHP

Préparer 5 solutions de calibration CLHP dans des flacons volumétriques de 10 ml séparés (4.11) en pipétant les volumes portés au Tableau 7. Porter chaque standard à 10 ml avec du solvant d'injection CLHP (5.12).

5.19 Nettoyer les colonnes d'immunoaffinité CLHP

La colonne d'immunoaffinité contient des anticorps développés contre la zearalenone. La colonne aura une capacité minimale de 1500ng de zearalenone et une récupération minimale de 70% lorsque 75 ng de zearalenone sont appliqués dans 10 ml de solvant de lavage (5.11).

6. Procédure

6.1 Préparation de l'échantillon

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon vraiment représentatif et non endommagé ou échangé pendant le transport ou le stockage. Les échantillons seront broyés finement au broyeur (4.6) et soigneusement mélangés au mixeur tumbler (4.7), ou par un autre procédé ayant démontré réaliser une homogénéisation complète avant de retirer une portion test pour analyse. En tout cas, si l'échantillon a été

TABLEAU 7
Concentrations de calibration ZON

Solution de calibration	Volume de solution de travail ZON (5.17) [µl]	Concentration ZON [ng/ml]
1	50	10
2	250	50
3	450	90
4	650	130
5	850	170

congelé, le laisser décongeler complètement avant échantillonnage. Mélanger l'échantillon soigneusement avant de retirer la portion test.

6.2 Extraction

6.2.1 Peser 20 g (enregistré avec 2 décimales) de la portion test dans un flacon à bouchon à vis de 250 à 500 ml (4.13).

6.2.2 Ajouter 150 ml de solvant d'extraction (5.10).

6.2.3 Mélanger brièvement à la main pour obtenir une suspension homogène. Ensuite, soit agiter pendant 1 heure au shaker (4.2), ou placer dans le bain à ultrasons pendant 15 minutes (4.24).

6.2.4 Agiter au shaker (4.2) pendant 15 minutes supplémentaires.

6.2.5 Filtrer l'extrait à travers le papier filtre plié (4.15) et collecter le filtrat dans un flacon à bouchon à vis de 100 ml (4.13).

6.2.6 Transférer exactement 30 ml (ou 3 ml au cas où les résultats dépassent 500 µg/kg) du filtrat dans un cylindre gradué avec bouchon de 250 ml (4.10). Diluer l'extrait dans le cylindre avec PBS (5.9) jusqu'à la marque de 150 ml.

6.2.7 Mélanger et filtrer environ 20 ml de l'extrait dilué à travers le filtre de microfibrilles de verre (4.16) dans un bécher en verre en appliquant un léger vide (4.22). Ne pas employer le vide trop fort en début de filtration, car cela peut conduire à des filtrats troubles.

6.2.8 Éliminer les premiers 20 ml et filtrer encore environ 70 ml pour analyse.

NOTE: Entamer immédiatement la procédure de nettoyage de la colonne d'immunoaffinité (6.3).

6.3 Nettoyage de la colonne d'immunoaffinité

6.3.1 Connecter la colonne d'immunoaffinité (5.19) au dispositif de vide (4.18) et fixer un réservoir (4.19) au sommet de la colonne.

6.3.2 Pré-conditionner la colonne (5.19) avec 20 ml de PBS (5.9) à un taux de flux de 3-5 ml/minute.

6.3.3 Pipeter 50 ml de l'extrait d'échantillon filtré et dilué (6.2) dans le réservoir.

6.3.4 Laisser l'extrait s'écouler par gravité à travers la colonne à un taux de flux stable jusqu'à ce que la dernière portion de solvant atteigne la portion frittée de la colonne. Le taux de flux sera de 1-2 gouttes/seconde.

6.3.5 Après que l'extrait soit passé par la colonne, laver celle-ci avec 5 ml de solvant de lavage (5.11) puis avec 15 ml d'eau bidistillée à un taux de flux de 1-2 gouttes/seconde.

6.3.6 Retirer l'eau résiduelle de la colonne en faisant passer 3 ml d'air ou d'azote à travers la colonne (1-2 secondes). Éliminer tout l'éluant à ce moment de la procédure de nettoyage.

6.4 Préparation de la solution test pour l'analyse CLHP

6.4.1 Placer un cylindre gradué de 5 ml (4.10) ou un flacon volumétrique de 3 ml (4.11) en dessous de la colonne et faire passer 0,75 ml de méthanol (5.3) à travers celle-ci, en collectant l'éluant.

6.4.2 Après que les dernières gouttes de méthanol soient passées à travers les colonnes, laisser celui-ci sur la colonne pendant 1 minute environ.

6.4.3 Ajouter à nouveau 0,75 ml de méthanol (5.3) et continuer à collecter l'éluant.

- 6.4.4 Passer prudemment de l'air à travers la colonne afin de récolter tout méthanol résiduel.
- 6.4.5 Remplir le cylindre gradué/flacon volumétrique jusqu'à la marque de 3 ml avec de l'eau bidistillée et mélanger. Après mélange, contrôler à nouveau le volume et ajuster si nécessaire.
- 6.4.6 En cas d'échantillons troubles, filtrer la solution test à travers une unité filtrante CLHP (4.23) avec une seringue plastique (4.20) avant injection.

NOTE: Alternativement, les procédures décrites pour le nettoyage d'immunoaffinité (6.3) et l'éluion (6.4) peuvent être effectuées avec une unité automatique de préparation d'échantillon sous condition que volumes et flux demeurent inchangés.

6.5 Calibration

Préparer un graphe de calibration en début de chaque journée d'analyse en utilisant les solutions de calibration ZON (5.18). Etablir la courbe de calibration avant l'analyse des échantillons à tester en positionnant la concentration de ZON (ng/ml) (axe des X), déterminer la pente de l'Intersection possible par régression linéaire, et vérifier la linéarité par les diagnostics appropriés.

6.6 Détermination et identification de la zearalenone dans la solution test

- 6.6.1 Injecter des aliquotes des solutions test (6.4) dans la CLHP sous des conditions identiques à celles de la préparation du graphe de calibration.
- 6.6.2 Identifier le pic de zearalenone dans la solution test en comprenant le temps de rétention avec la solution CLHP de calibration la plus proche (5.18). Injectée au cours du lot d'analyses CLHP.
- 6.6.3 La concentration de zearalenone de la solution test doit tomber à l'intérieur de la portée de calibration. Si le niveau de zearalenone de la solution dépasse la concentration de la solution de calibration la plus élevée, la solution test sera diluée avec du diluant CLHP afin de l'amener au sein de la portée des calibrations et analysée à nouveau. Le facteur de dilution sera incorporé dans tous les calculs subséquents.

6.7 Conditions de fonctionnement CLHP

Lorsque la colonne spécifiée en 5.25.3 et la phase mobile spécifiée en 5.13 ont été utilisées les réglages suivants ont été trouvés adéquats:

- Taux de flux, phase mobile (colonne): 0,7-1,0 ml/minute
- Détection de fluorescence, longueurs d'ondes émission: 446-450 nm
- Détection de fluorescence, longueurs d'ondes excitation: 274-275 nm
- Volume d'injection: 100-300 µl

7. Calcul

A partir du graphe de calibration, déterminer la concentration massale en ng/ml de zearalenone dans l'aliquote de solution test injectée dans la colonne CLHP. Calculer la fonction massale de zearalenone, ω_{ZON} , en ng/g ou µg/kg avec une décimale avec l'équation suivante:

$$\omega_{ZON} = C_{ZON} \cdot \frac{V_5}{V_4} \cdot \frac{V_3}{V_2} \cdot \frac{V_I}{m_s}$$

où,

C_{ZON} = Concentration massale de ZON, déterminée par calibration (6.5);

V_5 = volume de la solution test (3,0 ml; 6.4.5);

V_4 = volume de l’aliquote de l’extrait dilué injecté dans la colonne d’immunoaffinité (50 ml; 6.3.3);

V_3 = volume total de l’extrait dilué filtré (150 ml; 6.2.6);

V_2 = volume de l’aliquote de l’extrait utilisée pour dilution (30 ml or 3 ml; 6.2.6);

V_1 = volume total du solvant d’extraction (150 ml; 6.2.2); et

m_s = masse de l’extrait d’échantillon (20,00 g, 6.2.1).

L’équation ci-dessus peut être simplifiée si les masses et volumes décrits ont été utilisés:

$$\omega_{ZON} = C_{ZON} \cdot 2.25 \quad (30 \text{ ml d'extraits ont été dilués})$$

Si le calcul ci-dessus donne une valeur supérieure à 500 µg/kg, une nouvelle dilution de 3 ml de l’extrait d’échantillon sera alors préparée (voir section 6.2). L’équation simplifiée devient alors:

$$\omega_{ZON} = C_{ZON} \cdot 22.5 \quad (3 \text{ ml d'extraits ont été dilués})$$

8. Contrôle de la qualité

8.1 Exactitude

Pour déterminer la récupération, pointer un matériau représentatif exempt de zearalenone avec la solution ZON de pointage (5.16). Le niveau de pointage sera à l’intérieur de la portée de calibration (préalablement à mi-portée). La concentration de la solution utilisée sera telle qu’il ne faudra pas ajouter plus de 2 ml. Laisser l’échantillon pointé reposer pendant 30 minutes au moins afin d’assurer l’évaporation du solvant. La récupération doit se situer entre 60 et 120%, autrement les séries doivent être répétées. Ce contrôle de travail sera conduit sur chaque ensemble et comparé aux limites établies sur la charte de contrôle.

8.2 Précision

Injecter un standard de calibration à mi-portée comme contrôle après environ cinq échantillons pour évaluer le changement dans la surface de pic. Cette solution ne doit pas différer de plus de 10% par rapport à la surface de pic standard dans la courbe de calibration.

9. Remarques

9.1 Concernant la capacité de chargement des colonnes d’immunoaffinité, se référer aux spécifications du fabricant.

9.2 Avant d’appliquer la procédure CLHP les échantillons pourront être passés au crible pour ZON avec différents kits de testage. Par exemple, plusieurs tests ELISA sont disponibles dans le commerce (voir la liste de liaison dans la méthode pour l’aflatoxine). Se référer aux descriptions du produit et de la procédure par le fabricant.

9.3 Le rapport de test contiendra les données suivantes:

- information nécessaire à l’identification de l’échantillon (type, origine, désignation);

- référence à cette méthode;
- date et type de la procédure d'échantillonnage (si connues);
- date de réception;
- date de test;
- résultats de test et unités dans laquelle elles sont exprimées;
- taux de récupération de l'échantillon pour contrôle de travail (8);
- déclaration si les résultats ont été corrigés pour la récupération;
- points particuliers observés pendant le cours du test, et
- opérations non spécifiées dans la méthode ou regardées comme optionnelles, pouvant avoir affecté les résultats.

10. Références bibliographiques

Arranz, I., Mischke, C., Stroka, J., Sizoo, E., Van Egmond, H. & Neugebauer, M. 2007. Liquid chromatographic method for the quantification of zearalenone in baby food and animal feed: Interlaboratory Study; *J. AOAC Int.* 90 (6): 1598-1609.

Commission Regulation (EC) No 401/2006. 23 February 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, *AbI. L 70 of 9.3.2006*, pp. 12-34.

EN 15792:2009. 2009. *Animal feeding stuffs – Determination of zearalenone in animal feed – High performance liquid chromatographic method with fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up.* Brussels, Belgium.

DEOXYNIVALENOL (DON) – METHODE CLHP

1. Principe

Le Deoxynivalenol (DON) est extrait à partir du produit par de l'eau bidistillée. L'extrait aqueux est nettoyé par une colonne à immunoaffinité afin de déplacer les impuretés de l'échantillon. Ensuite, le DON est déterminé quantitativement par CLHP avec une détection UV.

2. Portée

La méthode est applicable pour la détermination de DON dans les aliments composés du bétail à des concentrations de 150 µg/kg à 4000 µg/kg au moins.

3. Responsabilités

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

Équipement de laboratoire usuel et en particulier:

- 4.1 Balance d'analyse, précise à 0,001 g pour pesée des échantillons, précise à 0,01 mg pour préparation gravimétrique de la solution DON de stockage.
- 4.2 Homogénéiseur, Mélangeur à grande vitesse.

- 4.3 Shaker de laboratoire.
- 4.4 Mixer Vortex ou équivalent.
- 4.5 Moulin (différents tamis).
- 4.6 Mixer tumbler.
- 4.7 Flacons à bouchons à vis de 250 et 500 ml.
- 4.8 Entonnoirs de tailles appropriées.
- 4.9 Filtres cellulose avec pores de ca 30 μm .
- 4.10 Filtre en microfibre de verres, sans anneaux, avec pores de ca 2 μm .
- 4.11 Flacons volumétriques de 2 ml, 5 ml et 10 ml.
- 4.12 Pipettes graduées de 1 ml et 5 ml.
- 4.13 Pipettes ajustables ou seringues hermétiques de verre de 100 μl et 1 ml.
- 4.14 Système CLHP consistant en:
 - 4.14.1 Pompe, capable de générer au moins des gradients binaires, exempte de pulsations, avec flux appropriés pour la colonne analytique.
 - 4.14.2 Colonne analytique. Toute colonne permettant une séparation suffisante du deoxynivalenol des autres composants interférents est adéquate. Exemple: Phenomenex Octadecylsilane (ODS) 3-Prodigy (15 cm x 4.6 mm i.d.), 5 μm taille particule, 100 Å pore size, Octadecylsilane (ODS) 250 mm x 4.6 mm I.D., 3 μm taille particule, 80 Å taille pore, Octadecyl (C18) 250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm taille particule, 180 Å taille pore.
 - 4.14.3 Pré-colonne (optionnel), appropriée pour la colonne analytique utilisée.
 - 4.14.4 Auto-échantillonneur capable d'injection des volumes appropriés avec une répétabilité suffisante.
 - 4.14.5 Détecteur UV capable de mesurer à 220 nm
 - 4.14.6 Système de collecte des données.
- 4.15 Spectrophotomètre UV pour contrôle de la concentration de la solution de stockage de DON.
- 4.16 Réservoirs de tailles appropriées avec adaptateurs pour colonnes d'immunoaffinité.
- 4.17 Fioles de verre, de taille appropriée pour auto-échantillonneur (4.14.4), mais avec un volume minimum de 2,0 ml.
- 4.18 Unité de filtre seringue, polyamide (nylon), avec taille de pore de 0,45 μm .
- 4.19 Évaporateur, capable de maintenir 50 °C avec un courant stable d'air ou d'azote.

5. Réactifs

Pendant l'analyse, à moins que ce ne soit spécifié autrement, n'employer que des réactifs certifiés de grade analytique et de l'eau bidistillée, ou de l'eau de grade 1 défini dans EN ISO 3696. Les solvants seront de grade CLHP.

- 5.1 Acetonitrile.
- 5.2 Deoxynivalenol (DON) de pureté minimum 97%.
- 5.3 Méthanol.
- 5.4 Acide acétique glacial.
- 5.5 Phase mobile CLHP

Mélanger 15 parts de volume de méthanol (5.3) à 84.9 parts de volume d'eau bidistillée et 0,1 part de volume d'acide acétique glacial (5.4). La quantité exacte de méthano-

nol utilisée et la présence ou non d'acide acétique glacial dépend de la colonne CLHP utilisée pour l'analyse et sera ajustée si nécessaire. Dégazer la solution avant usage.

5.6 Solvant de lavage

Mélanger méthanol (5.3) et eau bidistillée (1:1, v/v).

5.7 Solution DON de stockage: 250 µg deoxynivalenol par ml d'acétonitrile

Ajouter 4.0 ml d'acétonitrile (5.1) à 5 mg de DON (5.2) pour une solution de 1,25mg/ml. Diluer 1 ml de cette solution dans 5.0 ml d'acétonitrile pour une solution de stockage de 250 µg/ml. Diluer 200 µl de cette solution dans un flacon volumétrique de 2 ml (4.11) avec de l'acétonitrile pour obtenir une solution diluée de stockage de 25 µg/ml.

Pour déterminer la concentration exacte, enregistrer comme référence la courbe d'absorption de cette solution stock diluée de 25 µg/ml avec un spectrophotomètre (4.15) dans la portée de 200 à 270 nm dans une cellule de quartz avec de l'acétonitrile. Déterminer l'absorption à 220 nm. Calculer la concentration massale du deoxynivalenol, ρ_{DON} , en microgrammes par millilitre au moyen de l'équation suivante:

$$\rho_{DON} (\approx 25 \mu\text{g/ml}) = \frac{A_{\max} \cdot M \cdot 100}{\kappa \cdot d}$$

où,

A_{\max} = Absorption déterminée au point maximum de la courbe d'absorption (220nm),

M = Masse molaire de deoxynivalenol ($M = 296.3 \text{ g/mol}$),

κ = Coefficient d'absorption molaire de deoxynivalenol dans l'acétonitrile ($681 \text{ m}^2/\text{mol}$), et

d = Longueur en centimètres du chemin optique de la cellule de quartz (1 cm).

Calculer la concentration exacte de la solution stock 250 µg/ml au moyen de l'équation suivante:

$$\rho_{DON} (\approx 250 \mu\text{g/ml}) = \rho_{DON} (\approx 25 \mu\text{g/ml}) \cdot 10$$

La solution stock peut être entreposée dans l'obscurité jusqu'à 3 mois de 44 à 8 °C ou au moins 6 mois à -18 °C.

5.8 Solution DON de pointage

Pipeter une aliquote de la solution DON de stockage calibrée (5.7), équivalent à 500 µg DON, dans un flacon volumétrique de 5 ml (4.11). Porter à la marque avec de l'acétonitrile (5.1) ceci produira la solution de pointage de 100 µg/ml.

5.9 Solution DON de travail

Pipeter une aliquote de la solution DON de stockage calibrée (5.7), équivalent à 50 µg DON, dans un flacon volumétrique de 5 ml (4.11). Porter à la marque avec de l'acétonitrile (5.1) ceci produira la solution de travail de 10 µg/ml.

5.10 Solutions DON de calibration

Les solutions de calibration sont préparées à partir de la solution DON de travail à 10 µg/ml (5.9). Par exemple, ajuster les volumes de la solution de travail montrés au Tableau 8 ci-dessous dans des flacons volumétriques de 10 ml. Remplir les flacons jusqu'à la marque avec la phase mobile (5.5). Des déviations sont acceptables tant

TABLEAU 8
Concentrations DON de calibration

Solution calibration	Volume DON de solution de travail (5.9) [µl]	concentration DON [ng/ml]
1	450	450
2	375	375
3	300	300
4	225	225
5	150	150
6	75	75

que le niveau le plus bas se trouve au-dessus de la limite de détection, que le niveau le plus haut ne conduise pas à la saturation du signal de détecteur, et qu'il existe au moins deux niveaux supplémentaires équidistants entre les deux.

5.11 Nettoyage des colonnes d'immunoaffinité DON

La colonne d'immunoaffinité contient des anticorps développés contre DON. La colonne aura une capacité minimale de 2500 ng de DON et fournira une récupération minimale de 70% lorsque 25 ng de DON seront appliqués dans 1 à 2 ml d'eau bidistillée (suivant les instructions du fabricant).

6. Procédure

6.1 Préparation de l'échantillon

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon vraiment représentatif qui n'ait pas été endommagé ou échangé pendant le transport ou l'entreposage. Les échantillons seront finement moulus et soigneusement mélangés en utilisant un moulin (4.5) et un mixer tumbler (4.6) ou un autre procédé ayant démontré fournir une homogénéisation complète afin de retirer une portion test pour analyse.

Si l'échantillon a été congelé, laisser dégeler complètement avant l'échantillonnage. Mélanger soigneusement l'échantillon avant de retirer une portion test pour analyse.

6.2 Extraction

6.2.1 Peser une portion test de 25 g dans un flacon à bouchon vissé de 250 ml ou 500 ml (4.7).

6.2.2 ajouter 200 ml d'eau bidistillée ou désionisée, fermer et mélanger au shaker (4.3) pendant une heure.

6.2.3 Préparer un entonnoir (4.8) avec papier filtre (4.9) et filtrer l'extrait d'échantillon dans un flacon à bouchon vissé propre de 250 ml ou 500 ml (4.7).

6.3 Nettoyage de la colonne d'immunoaffinité

6.3.1 Attacher un réservoir (4.16) à une colonne d'immunoaffinité et ajouter 8 ml d'eau bidistillée ou désionisée.

6.3.2 Transférer 2 ml de l'extrait filtre (voir ci-dessus: 0,5 ml dans le cas de résultats d'analyse supérieure à 4000 µg/kg) dans le réservoir (4.16). Laisser la solution passer lentement par gravité à travers la colonne à un flux de 1-2 gouttes/seconde.

- 6.3.3 Lorsque l'extrait a entièrement passé à travers la colonne d'immunoaffinité, passer 5 ml d'eau désionisée.
- 6.3.4 Retirer le liquide résiduel en passant de l'air ou de l'azote pendant 5 secondes environ. Éliminer tout l'éluent à ce moment de la procédure de nettoyage.
- 6.3.5 Placer une fiole CLHP d'auto-échantillonnage (4.17) en dessous de la colonne et passer 0,5 ml de méthanol (5.3) par gravité à travers la colonne et récolter l'éluent.
Après que les dernières gouttes de méthanol soient passées à travers la colonne, laisser le méthanol reposer sur la colonne pendant environ 1 minute.
- 6.3.6 Ajouter un autre ml de méthanol (5.3) et continuer à récolter l'éluent. Passer prudemment de l'azote ou de l'air à travers la colonne afin de récolter tout l'éluent résiduel.

NOTE: Alternativement, les procédures du manuel décrites pour le nettoyage et l'élution de l'immunoaffinité (6.4) peuvent être effectuées avec une unité automatique de préparation de l'échantillon sous condition que les volumes et les taux de flux demeurent inchangés.

6.4 Préparation de la solution test pour analyse CLHP

- 6.4.1 Placer la fiole avec l'éluent dans l'évaporateur (4.19) et laisser évaporer prudemment jusqu'à siccité sous air ou azote à ca 50 °C.
- 6.4.2 Immédiatement après, refroidir la fiole CLHP à température ambiante et reconstituer le résidu avec 0,50 ml de phase mobile (5.5).
- 6.4.3 Mélanger bien au mixer Vortex (4.4) pendant 30 secondes au moins pour s'assurer que le résidu est complètement re-dissous. En cas de trouble, filtrer la solution test à travers une unité de filtration par seringue (4.18).

6.5 Calibration

Préparer un graphe de calibration au début de chaque journée d'analyse en injectant les solutions de calibration (5.10) à différentes concentrations adéquates dans le chromatographe. Établir la courbe de calibration antérieurement à l'analyse des échantillons à tester en positionnant la concentration de DON [ng/ml] (axe des X) vis-à-vis de la surface ou de la hauteur (axe des Y) du signal du pic, déterminer la perte et l'intersection par régression linéaire, et contrôler la position en employant les diagnostics appropriés.

6.6 Détermination et identification du deoxynivalenol dans la solution test

- 6.6.1 Injecter des aliquotes des solutions test dans le chromatographe dans les mêmes conditions que pour la préparation du graphe de calibration.
- 6.6.2 Identifier le pic de DON dans la solution test en comparant le temps de rétention avec celui de la solution CLHP de calibration la plus proche (5.10) injectée dans l'analyse CLHP.
- 6.6.3 La concentration de DON dans la solution test doit se situer à l'intérieur de la portée de calibration. Si le niveau de DON dans la solution test dépasse la concentration de la solution CLHP la plus haute, la solution test sera diluée avec la phase mobile CLHP afin de la ramener dans la portée de calibration et re-analysée. Le facteur de dilution doit être introduit dans tous les calculs subséquents.

TABLEAU 9
Gradient CLHP

Temps [min]	Canal A [%]	Canal B [%]
0 à 15	100	0
15 à 25	0	100
25 à 35	100	0

6.7 Conditions CLHP de fonctionnement

En utilisant l'équipement décrit au 4.14, les conditions suivantes ont démontré effectuer une séparation adéquate:

Volume d'injection: 100 - 300 µl

Longueur d'onde détecteur UV: 220 nm

Taux de flux de la phase mobile (colonne): 1,0 ml/minute

Si la pompe CLHP a libéré la phase mobile (5.5) à travers le canal A et solvant d'élévage (5.6) à travers le canal B, le profil du gradient apparaît comme suit:

NOTE: Les phases mobiles préparées avec l'acétonitrile et l'eau bidistillée ou désionisée ont démontré être également des alternatives pertinentes. De telles phases mobiles peuvent être employées pourvu qu'une séparation suffisante soit réalisée.

7. Calcul

Déterminer à partir du graphe de calibration la concentration massale du deoxynivalenol en ng/ml dans la solution test injectée dans la colonne CLHP. Calculer la fraction massale du DON, ω_{DON} , en ng/g ou µg/kg à une décimale au moyen de l'équation:

$$\omega_{DON} = c_{DON} \cdot \frac{V_3}{V_2} \cdot \frac{V_1}{m_s}$$

c_{DON} = concentration massale de DON, déterminé suivant la calibration (6.5)

V_3 = volume total de la solution test (0,5 ml; 6.4.2);

V_2 = volume de l'aliquote de l'extrait utilisé pour nettoyage (2,0 ml ou 0,5 ml; 6.3.2);

V_1 = volume total du solvant d'extraction (200 ml; 6.2.2); et

m_s = masse de la portion test de l'extrait (25 g; 6.2.1).

L'équation ci-dessus peut être simplifiée si ont été utilisées masses et volumes décrits:

$$\omega_{DON} = c_{DON} \cdot 2 \quad (2 \text{ ml des extraits ont été nettoyés})$$

Si le calcul ci-dessus fournit une valeur supérieure à 500, un nouveau nettoyage sera alors préparé avec 0,5 ml de l'extrait d'échantillon (voir section 6.3). L'équation simplifiée devient alors:

$$\omega_{DON} = c_{DON} \cdot 8 \quad (0,5 \text{ ml des extraits ont été nettoyés})$$

8. Contrôle de la qualité

8.1 Exactitude

Pour déterminer la récupération, pointer un matériau exempt de DON avec la solution de pointage (5.8). Le niveau de pointage de l'échantillon de contrôle de travail devra se trouver à l'intérieur de la portée de calibration (de préférence à mi-portée). La concentration de la solution utilisée devra être telle qu'il ne faille pas ajouter plus de 2 ml. Laisser l'échantillon pointé reposer pendant 30 minutes au minimum pour assurer l'évaporation du solvant. La récupération doit s'élever de 60 à 120%, autrement les séries doivent être répétées. Ce contrôle de travail sera mené avec chaque ensemble et comparé aux limites établies par la charte de contrôle.

8.2 Précision

Injecter un standard de calibration de mi-portée comme contrôle après environ 5 échantillons pour évaluer le changement dans la surface de pic. Cette surface ne doit pas être modifiée de plus de 10% par rapport à la surface de pic standard de la courbe de calibration.

9. Remarques

- 9.1 Pour la capacité de chargement des colonnes d'immunoaffinité se référer aux spécifications du fabricant.
- 9.2 Avant d'utiliser la procédure, les échantillons peuvent être passés au crible pour DON avec différents kits de testage. Par exemple, plusieurs kits ELISA sont disponibles dans le commerce (voir liste de liaison dans la méthode à l'aflatoxine). Se référer aux descriptions de produit et de procédure du fabricant.
- 9.3 Le rapport de test contiendra les données suivantes:
 - information nécessaire à l'identification de l'échantillon (type, origine, désignation);
 - référence à cette méthode;
 - date et type de la procédure d'échantillonnage (si connues);
 - date de réception;
 - date de test;
 - résultats de test et unités dans laquelle elles sont exprimées;
 - taux de récupération de l'échantillon pour contrôle de travail;
 - déclaration si les résultats ont été corrigés pour la récupération;
 - points particuliers observés pendant le cours du test, et
 - opérations non spécifiées dans la méthode ou regardées comme optionnelles, pouvant avoir affecté les résultats.

10. Références bibliographiques

Commission Regulation (EC) No 401/2006. 23 February 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, *ABl. L70 of 9.3.2006*, pp. 12-34.

EN 15791. 2009. *Animal feeding stuffs - Determination of deoxynivalenol in animal feed – CLHP method with immunoaffinity column clean-up.* Brussels, Belgium.

Stroka, J., Derbyshire, M., Mischke, C., Ambrosio, M., Kroeger, K., Arranz, I., Sizoo, E. & Van Egmond, H. 2006. Liquid chromatographic determination of deoxynivalenol in baby food and animal feed: Interlaboratory Study. *J. AOAC Int.* 89 (4): 1012-1020.

DIGESTIBILITÉ DE LA MATIÈRE SÈCHE – UTILISATION *IN VITRO* DU LIQUIDE DE RUMEN

1. Principe

La digestion des aliments pour animaux par le ruminant est simulée *in vitro* en deux étapes. D'abord, un échantillon pesé dans un tube de testage est incubé avec du fluide de rumen tamponné pendant 48 heures afin de déplacer les hydrates de carbone digestibles. Après centrifugation et filtration, le résidu de l'aliment pour animal est alors incubé avec de la pepsine avec de l'acide chlorhydrique pour 48 heures de plus afin de dissoudre les protéines digestibles. Après filtration, le résidu est séché, incinéré et pesé. La digestibilité *in vitro* est finalement convertie au niveau de digestibilité *in vivo* au moyen d'échantillons standard à digestibilité *in vivo* connue, même dans chaque série d'échantillons. La procédure est basée sur Tilley et Terry (1963) (voir remarque 9.3).

2. Portée

La procédure pour la détermination de la digestibilité *in vitro* avec du fluide de rumen n'est applicable que pour les aliments pour ruminants.

3. Responsabilités

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Équipement

- 4.1 Bouteille Thermos.
- 4.2 Balance précise, à 0,1 g.
- 4.3 Balance d'analyse, précise à 0,1 mg.
- 4.4 Tubes à centrifugation (plastique) d'une capacité de 75 ml fournis avec un bouchon de caoutchouc, une valve de relâchement de gaz, et une marque graduée à 50 ml.
- 4.5 Centrifugeuse.
- 4.6 Bain-marie avec thermostat à 39 ± 1 °C.
- 4.7 Appareil de mélange.
- 4.8 Collecteur pour tubes à centrifugation.
- 4.9 Creusets filtrants ou papier filtre.
- 4.10 Four de séchage, pouvant être maintenu à 103 ± 2 °C.
- 4.11 Four à moufle, pouvant être maintenu à 550 ± 20 °C.
- 4.12 Dessiccateur.
- 4.13 pH mètre.

5. Réactifs

- 5.1 Sulfate d'ammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- 5.2 Chlorure de calcium bihydraté, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.
- 5.3 Dioxyde de carbone CO_2 .

- 5.4 Phosphate hydrogène disodique dodécahydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$.
- 5.5 Acide chlorhydrique 1 N.
- 5.6 Chlorure de magnésium hexahydraté, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.
- 5.7 Pepsine (estomac de porc, 766 U/mg).
- 5.8 Chlorure de potassium, KCl.
- 5.9 Carbonate de sodium anhydre, Na_2CO_3 .
- 5.10 Chlorure de sodium, NaCl.
- 5.11 Carbonate de soude, NaHCO_3 .

6. Procédure

Cette procédure est effectuée, suivant un emploi du temps précis, par exemple:

Vendredi

- 6.1 Peser dans un tube de centrifugation (4.4) environ 0,5 g d'échantillon à 0,1 mg près (W1). Avec chaque lot, conduire 4 blancs (tubes de centrifugation sans échantillon) et des échantillons standards.
- 6.2 Préparer les solutions minérales:
Solution A: Dissoudre 46,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (5.4), 49,0 g NaHCO_3 (5.11), 2,35g NaCl (5.10) et 2,85 g KCl (5.8) dans de l'eau distillée et porter à 1 litre avec de l'eau distillée.
Solution B: dissoudre 12,81 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (5.6) dans 100 ml d'eau distillée.
Solution C: dissoudre 5,30 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (5.2) dans 100 ml d'eau distillée.

Lundi démarrage aux alentours de 08:00 heures

- 6.3 Préparer la solution tampon: pour 80-90 échantillons: mélanger 800 ml de Solution A, 8 ml de Solution B, 8 ml de Solution C et 12,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5.1) et porter à 4 litres avec de l'eau distillée. Saturer la solution en CO_2 (5.3) jusqu'à un pH à 6.9 (contrôler pendant environ 15 minutes avec un pH mètre (4.13) tout en mélangeant et chauffant la solution au bain-marie à $39 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (4.6).
- 6.4 Aux environs de 08:00 heures, prélever par succion au moins 1,5 L de liquide de rumen à partir d'une vache ou de deux brebis fistulisées, et récolter dans une bouteille thermos (4.1) (préchauffée avec de l'eau et gazéifiée avec du CO_2). Transférer immédiatement au laboratoire et filtrer à travers une double couche d'étamine (voir remarque 9.3).
- 6.5 Ajouter 1 litre de liquide de rumen filtré à la solution tampon (6.3) tout en mélangeant et en gazéifiant avec du CO_2 (environ 5 minutes) l'ensemble du mélange.
- 6.6 Ajouter 50 ml de liquide de rumen tampon dans chaque tube à centrifugation, gazéifier au CO_2 , fermer les tubes avec un bouchon de caoutchouc, fermer la valve et incuber au bain-marie à $39 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 48 heures.
- 6.7 Agiter les tubes à la main aux environs de 13:00 et 17:00 heures.

Mardi

- 6.8 Agiter les tubes aux environs de 08:00, 13:00 et 17:00 heures.
Mercredi démarrage aux alentours de 08:00 heures.

- 6.9 Préparer une solution de pepsine: dissoudre 10 g de pepsine (5.7) dans 5 litres d'eau, ajouter 250 ml 1M HCl (5.5) et chauffer au bain-marie à 39 ± 1 °C (contrôler au thermomètre).
- 6.10 Ajouter 5 ml de la solution de Na_2CO_3 à 10% (5.9) à chaque tube et centrifuger (4.5) à 5000 g pendant 3 minutes (en gardant la même séquence de tubes qu'au démarrage des incubations). **S'assurer que l'ordre des tubes reste le même pour toutes les procédures.**
- 6.11 Filtrer sous succion le liquide surnageant à travers une gaze de nylon et ramener le reste dans le tube en l'arrosant avec la solution de pepsine. Ajouter la solution de pepsine pour porter le volume total à 50 ml dans les tubes.
- 6.12 Fermer les tubes avec un bouchon de caoutchouc, fermer la valve et porter au bain-marie à 39 ± 1 °C pour incubation complémentaire de 48 heures.
- 6.13 Agiter les tubes à la main aux alentours de 13:00 et 17:00 heures.

Jeudi

- 6.14 Agiter les tubes aux alentours de 0:800, 13:00 et 17:00 heures.
- 6.15 Placer les creusets filtrants (4.9) dans le four à moufle à 550 ± 20 °C (4.11) pendant 2 heures, laisser refroidir dans un dessiccateur (4.12) pendant 2 heures environ, peser à 0,1 mg près (W2) et ramener dans le dessiccateur.

Vendredi

- 6.16 Transférer quantitativement sous succion les contenus des tubes dans les creusets filtrants.
- 6.17 Faire sécher les creusets dans le four à 103 ± 2 °C (pendant 12:00 heures) jusqu'à minuit, régler la minuterie de façon à redémarrer le four le lundi matin à 02:00 heures.

Lundi démarrage aux alentours de 08:00 heures.

- 6.18 Placer les creusets dans un dessiccateur pendant 2 heures, peser le creuset contenant le résidu à 0,1 mg près (W3). Répéter pour les blancs.
- 6.19 Placer les creusets dans le four à moufle à 550 ± 20 °C pendant 3 heures, laisser refroidir dans un dessiccateur pendant 2 heures environ, peser à 0,1 mg près (W4). Répéter pour les blancs.

7. Calcul

Calculer le pourcentage de digestibilité de matière sèche (% MSD) suivant:

$$\text{MSD (\%)} = [(W1 \times \text{MS\%}) - (W3 - W2) - B_{\text{DM}}] / (W1 \times \text{MS\%})$$

où,

MSD = matière sèche digestible,

W1 = poids échantillon en g,

MS = contenu MS de l'échantillon,

W3 = poids du creuset plus résidu après séchage en g,

W2 = poids du creuset sec en g, et

B_{DM} = moyenne poids MS des blancs.

$$\text{MOD (\%)} = [(W1 \times \text{OM (\%)} - (W4 - W2) - B_{\text{OM}}] / (W1 \times \text{OM (\%)})$$

où,

MOD = matière organique digestible,

W1 = poids échantillon (g),

OM = contenu matière organique échantillon,

W4 = poids du creuset plus résidu après incinération (g),

W2 = poids du creuset sec (g), et

B_{OM} = poids moyen matière organique des blancs.

Finalement, les valeurs obtenues de digestibilité des échantillons sont converties au niveau de digestibilité *in vivo* en utilisant une équation de régression linéaire: $CD_{COR} = CD \times b + a$.

Cette équation s'obtient par régression des valeurs de conduite (CD_{RUN}) des échantillons standard avec leurs valeurs de référence (CD_{REF}): $CD_{REF} = a + b CD_{RUN}$.

8. Contrôle de la qualité

Dans chaque opération, trois échantillons de référence au moins, dont la digestibilité *in vivo* est connue, sont analysés en triple. Ces échantillons de référence sont préférentiellement de même nature que les échantillons test et couvriront la portée de digestibilité des échantillons test d'aussi près que possible. La valeur moyenne des échantillons standards ne diffèrera pas plus de 2% de la valeur de référence.

Les échantillons seront analysés au moins par doublons. Les différences entre les doublons seront inférieures à 2,5%-unités pour les valeurs de digestibilité de moins de 60%, inférieures à 2%-unités pour les valeurs entre 60% et 80% et inférieures à 1,5%-unités pour les valeurs de plus de 80%.

9. Remarques

- 9.1 La ration des animaux donneurs sera standardisée. Elle sera principalement constituée de foin *ad libitum*. Prélever le liquide du rumen avant le repas du matin.
- 9.2 La procédure décrite donne une mesure de la digestibilité apparente. Une variante de cette méthode où le résidu d'aliments pour animaux après la première étape est traitée pendant une heure avec une solution de détergeant neutre, donne la digestibilité véritable (Van Soest and Robertson, 1985).
- 9.3 Plutôt que du liquide de rumen, qui implique la disponibilité et l'entretien d'animaux avec fistule du rumen, des préparations commerciales d'enzymes secs congelés peuvent être employées. Ces préparations peuvent être de pure cellulose ou d'un mélange de polysaccharoses. Plusieurs procédures sont décrites. (Jones et Hayward, 1975; Dowman and Collins, 1982; De Boever *et al.*, 1986). Chaque fois que cela est possible, la digestion simulée par rumen sera utilisée.

10. Interférences et dépannage

- 10.1 Il est essentiel de maintenir des conditions anaérobiques pendant la première phase; attention soigneuse à la gazéification au CO₂ des solutions et des tubes, et aussi porter attention à la marche correcte des valves délivrant le gaz.
- 10.2 Le pH sera contrôlé avec soin et l'inoculum converti aussi près que possible à la température de 39 °C.

11. Références bibliographiques

- De Boever, J.L., Cottyn, B.G., Buysse, F.X., Wainman, F.W. & Vanacker, J.M.** 1986. The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 14: 203-214.
- Dowman, M.G. & Collins, F.C.** 1982. The use of enzymes to predict the digestibility of animal feeds. *J. Sci. Food Agric.* 33: 689-696.
- Jones, D.I.H. & Hayward, M.V.** 1975. The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. *J. Sci. Food Agric.* 26: 711-718.
- Tilley, J.M.A. & Terry, R.A.** 1963. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* 18: 104-111.
- Van Soest, P.J. & Robertson, J.B.** 1985. Analysis of forages and fibrous foods. In *A Laboratory Manual for Animal Science 613*, Cornell University Ithaca, New York, USA, 202 pp.

ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE PROCHE DE L'INFRA ROUGE (SPIR)

1. Principe

L'échantillon représentant la composition chimique du matériel est mesuré par spectrophotométrie proche de l'infrarouge. Les données spectrales sont collectées et transformées afin de constituer ou paramétrer les concentrations par des modèles de calibration développés sur des échantillons représentatifs.

2. Portée

La procédure décrite est applicable aux aliments pour animaux et leurs ingrédients.

3. Responsabilités

Le technicien du laboratoire effectuera l'analyse selon cette méthode. Il est de sa responsabilité de s'assurer que toutes les conditions exposées soient satisfaites et strictement respectées. Toute déviation par rapport à la méthode préconisée sera enregistrée et notifiée au superviseur.

4. Instruments pour SPIR

Les instruments SPIR sont basés sur la mesure de réflectance diffuse ou de la transmission dans la région des longueurs d'ondes près de l'infrarouge de 700 à 2500 nm (14300-4000 cm^{-1}) ou des segments de celle-ci ou à des longueurs d'onde sélectionnées ou à des ondes numérisées. Le principe optique peut être dispersif (p.ex. des monochromateurs grattants), interférométriques ou non thermiques (p.ex. diodes à faible émission, diode à laser, ou laser). L'instrument sera fourni avec un système de diagnostic pour tester les interférences photométriques et la reproductibilité, l'exactitude de la longueur d'onde/de numéro de la bande de la précision de la longueur d'onde/ du numéro de la bande (pour les spectrophotomètres à balayage). L'instrument mesurera une surface ou un volume suffisamment large pour éliminer toute influence significative d'un manque d'homogénéité provenant de la composition chimique ou des propriétés physique de l'échantillon à tester. La longueur du chemin de l'échantillon (épaisseur de l'échantillon) pour les mesures de transmission sera

optimisée, en accord avec la recommandation du fabricant respectivement à l'intensité du signal d'obtention de la linéarité et à un ratio maximal signal/interférence. Pour les mesures de réflectance, une fenêtre à quartz ou autre matériel approprié pour éliminer les effets d'assèchement couvriront préférentiellement la surface de la couche interactive de l'échantillon.

5. Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon véritablement représentatif qui n'a pas été endommagé ou échangé pendant le transport ou l'entreposage.

Tous les échantillons de laboratoire seront gardés dans des conditions qui ne pourront changer la composition de l'échantillon jusqu'au moment du début de la procédure.

6. Procédure

6.1 Préparation de l'échantillon à tester

La préparation des échantillons se fera de la même façon que les échantillons de validation. Il est important d'appliquer des conditions standard.

Durant l'analyse, l'échantillon sera traité de manière à obtenir un produit représentatif du matériel à analyser.

Pour des procédures spécifiques, voir standards spécifiques.

6.2 Mesure

Suivre les instructions pour l'instrument SPIR spécifique et les calibrations associées.

L'échantillon préparé devra atteindre une température à l'intérieur de la portée comprise dans la validation.

6.3 Evaluation du résultat

Pour que les résultats de validation soient acceptables, ils doivent se trouver dans la portée de calibration du modèle utilisé.

Les résultats obtenus sur des échantillons détectés comme des valeurs aberrantes spectrales ne peuvent être considérés comme fiables.

7. Contrôle de la stabilité de l'instrument

7.1 Échantillon de contrôle

Un échantillon de contrôle sera mesuré au moins une fois par jour afin de contrôler la stabilité matérielle de l'instrument et de détecter tout dysfonctionnement. La connaissance de la concentration réelle de l'analyte dans l'échantillon de contrôle n'est pas nécessaire. Le matériau de l'échantillon doit être stable et, autant que possible, ressembler aux échantillons à analyser. Le(s) paramètre(s) mesuré(s) sera stable, et, autant que possible, identique à ou, au moins, proche biochimiquement de l'analyte de l'échantillon. Ces échantillons sont normalement stables pendant de longues périodes mais la stabilité devra être vérifiée en temps réel. Des changements entre les échantillons de contrôle pourront se chevaucher afin d'assurer un contrôle ininterrompu.

La variation enregistrée au jour le jour sera positionnée sur les chartes de contrôle et analysée pour les modèles et tendances significatifs.

7.2 Diagnostics des appareils

Pour les spectromètres, exactitude et précision de la longueur/numéro d'onde seront

contrôlées au moins une fois par semaine, ou plus fréquemment, si cela est recommandé par le fabricant de l'appareil, et les résultats seront comparés aux spécifications et besoins. Un contrôle similaire des interférences de l'appareil sera également effectué hebdomadairement ou à intervalles recommandés par le fabricant.

8. Contrôle de la calibration de la performance opérationnelle

Les méthodes SPIR seront validées en continu vis-à-vis de méthodes de références afin d'assurer la stabilité optimale de la performance des calibrations et l'observation de l'exactitude. La fréquence de contrôle de la méthode SPIR sera suffisante pour assurer que celle-ci fonctionne sur contrôle solide en respectant les déviations systématiques ou dues au hasard par rapport à la méthode de référence.

La fréquence dépend du nombre d'échantillons analysés quotidiennement et le taux de changements au sein de la population d'échantillons.

La validation opérationnelle sera effectuée sur des échantillons choisis au hasard à partir du pool d'échantillons analysés. Il peut être nécessaire de recourir à une stratégie d'échantillonnage afin d'assurer une distribution équilibrée d'échantillons au sein de la portée entière de calibration, p.ex. segmentation de la portée de concentration et sélection au hasard d'échantillons test au sein de chaque segment ou s'assurer que les échantillons d'une portée commerciale importante soient représentés.

Le nombre d'échantillons pour la validation opérationnelle sera suffisant pour l'usage statistique de contrôle de performance. Pour une validation solide, 20 échantillons au moins sont nécessaires (pour espérer une distribution normale de variance). Il est possible de se servir des résultats de l'ensemble de validations indépendantes pour démarrer la validation opérationnelle. Ensuite, 5 à 10 échantillons par semaine seront suffisants pour surveiller correctement la performance. Si l'on utilise moins d'échantillons, il devient difficile de prendre la bonne décision au cas où l'un des résultats tombe en dehors des limites de contrôle.

Essayer de forcer les résultats à l'intérieur des limites par de fréquents ajustements de la calibration ne peut pas, en pratique, améliorer la situation. Les erreurs standard de prédiction (ESP) devront plutôt être réévaluées sur base des derniers résultats.

Si, après une période stable, les équations de calibration, commencent à se déplacer hors de contrôle, la calibration devra être actualisée. Avant cela, une évaluation sera faite pour voir si les changements ne peuvent être dus à des modifications dans les analyses de référence, des changements involontaires dans les conditions de mesure (p.ex. causés par un nouvel opérateur) une dérive ou un dysfonctionnement de l'appareil, etc.

Dans certains cas, un simple ajustement du terme constant (biais) dans l'équation de calibration sera suffisant. Dans d'autres cas, il peut s'avérer nécessaire d'effectuer une procédure complète de re-calibration, dans laquelle la calibration basique complète ou une partie de celle-ci sera élargie afin d'y inclure des échantillons de la procédure en cours, et peut-être des échantillons additionnels choisis à cet effet. Si l'on considère que les analyses de référence sont sous contrôle statistique et que les conditions de mesure et la performance de l'appareil sont inchangées, des biais importants ou des valeurs accrues des ESP peuvent être dues à des changements dans les propriétés chimiques, biologiques ou physiques des échantillons, par rapport au set sous-jacent de calibration.

9. Rapport de test

Celui-ci spécifiera:

- a) Oute l'information nécessaire à l'identification complète de l'échantillon;
- b) La méthode de testage utilisée avec référence au standard international concerné;
- c) Toutes les conditions de fonctionnement, non spécifiées dans un standard international, ou considérées comme optionnelles;
- d) Toutes circonstances ayant pu influencer les résultats;
- e) Les résultats obtenus, et,
- f) Les ESP et biais présents (si statistiquement significatifs), estimés à partir de l'exécution d'un test de performance sur au moins 20 échantillons.

10. Glossaire

Général

Méthode de référence. ISO, EN ou méthode reconnue et validée ailleurs sur le plan international, qui fournit une valeur «véritable» ou «assignée» au paramètre à mesurer, comprenant l'incertitude de la mesure.

Méthode indirecte. Méthode pour mesurer les propriétés reliées fonctionnellement au(x) paramètre(s) à déterminer. Le signal obtenu est relié à la valeur «véritable» telle que déterminée par la méthode de référence.

SPIR. Spectroscopie proche de l'infrarouge. La spectroscopie PIR est la mesure de l'intensité de l'absorption pour un échantillon de la lumière proche de l'infrarouge, dans la portée 700-2500 nm ($14300-4000\text{ cm}^{-1}$). Les appareils PIR utilisent soit une partie, soit l'entièreté des portées qui comprennent cette région (p.ex. 400-2500 nm).

Les techniques de calibration multivariante sont alors utilisées pour relier une combinaison de valeurs d'absorption soit à la composition soit à une quelconque propriété des échantillons.

SPIR. Spectroscopie par réflectance proche de l'infrarouge dans laquelle les mesures basiques sont l'absorption de la lumière près de l'infrarouge réfléchi de manière diffuse à partir d'un échantillon pour être collectée par un détecteur en face de l'échantillon.

TPIR. Spectroscopie par transmission près de l'infrarouge dans laquelle les mesures basiques sont l'absorption de la lumière près de l'infrarouge qui a traversé un échantillon liquide ou solide (p.ex. viande) et qui est alors collectée par un détecteur derrière l'échantillon.

Réseau(x) PIR. Un ensemble d'appareils près de l'infrarouge fonctionnant suivant les mêmes modèles de calibration. Les appareils d'un réseau sont ordinairement standardisés de sorte que la différence dans les valeurs prédites pour un ensemble d'échantillons standard est minimisée.

Standardisation (des appareils). Un procédé par lequel un groupe d'instruments PIR sont ajustés de sorte qu'ils prédisent des valeurs similaires lorsqu'ils fonctionnent suivant le même modèle de calibration. De nombreuses techniques peuvent être utilisées mais, en gros, elles se définissent d'une part en méthodes de «pré-prédiction» où les spectres des échantillons sont ajustés afin de minimiser les différences entre un appareil «majeur» et chaque appareil du groupe, et d'autre part, les méthodes de «post-prédiction» où la régression linéaire est employée pour ajuster les valeurs produites par chaque appareil pour les rendre aussi similaires que possible à celles d'un appareil «majeur».

Score-Z. Critère de performance calculé en divisant la différence entre le résultat PIR prédit et la valeur de référence par une valeur ciblée pour la déviation standard, p.ex. la racine carrée moyenne de l'erreur de prédiction (RCMEP) (voir dernière section de ce chapitre «Expressions statistiques»).

Techniques de calibration

Analyse en composante principale: c'est une forme de compression de données. Pour un ensemble d'échantillons, cela fonctionne seulement sur les données X (spectrales) et découvre les composantes (facteurs) principales suivant la règle qui précise que chaque CP exprime la variation maximale dans les données, quelque soit le moment, et n'est pas corrélée avec toute autre CP. La première CP exprime le plus possible la variabilité des données originelles. Son effet est alors soustrait des données X et une nouvelle CP est à nouveau dérivée qui exprime le plus possible la variabilité des données restantes. Il est possible de dériver autant de CP qu'il existe des points de données dans le spectre ou d'échantillons dans l'ensemble de données. Toutefois, les effets majeurs dans les spectres peuvent se trouver concentrés dans les premières CP, et, ainsi, le nombre de données devant être considérées est considérablement réduit. L'ACP produit des nouveaux ensembles de données à chaque étape: les scores de CP représentent la réponse de chaque échantillon pour chaque CP: les changements de CP représentent l'importance relative de chaque point de données dans les spectres originaux pour chaque type de CP. L'ACP a de nombreux usages, p.ex. dans l'interprétation spectrale, mais est le plus largement employée dans l'identification de valeurs aberrantes spectrales.

Régression de la composante principale (RCP) utilise les scores de chaque CP comme variable de prédiction dans une régression linéaire multiple vis-à-vis des valeurs Y représentant les compositions des échantillons. Comme chaque CP est orthogonal par rapport à toute autre CP, les scores forment un ensemble de données sans corrélation avec de meilleures propriétés que les spectres d'origine. Comme il est possible de sélectionner une combinaison de CP pour une régression basée sur la performance de CP à se corréler au constituant d'intérêt, la plupart des logiciels commerciaux forcent la régression à employer toutes les CP sur les plus hautes d'entre elles choisies pour le modèle (approche sommet-base). Lorsqu'elles sont appliquées dans les SPIR, les coefficients de régression dans l'espace de CP sont habituellement reconvertis vers un modèle de prédiction, utilisant tous les points de données dans un espace de longueur d'ondes.

Régression des Moindres Carrés Partiels (MCP) c'est une technique d'analyse qui, comme ACP représente une forme de compression de données. Avec MCP, la règle utilisée pour dériver les facteurs est que chacun de ceux-ci maximise à son tour la covariance entre les données Y et toutes les combinaisons linéaires des données X. MCP est ainsi un équilibre entre la variance et la corrélation susceptible d'être influencé par les deux effets. Les facteurs MCP sont, dès lors, plus directement reliés à la variabilité des valeurs Y que ne le sont les composantes principales. Les MCP produisent trois nouvelles variables, les poids de chargement (qui ne sont pas orthogonaux les uns par rapport aux autres), les chargements, et les scores qui, tous deux, sont orthogonaux. Les modèles MCP sont produits en régressant les scores vis-à-vis des valeurs Y. comme pour les RCP utilisés en SPIR, les coefficients de régression dans l'espace MCP sont habituellement reconvertis en un modèle de prédiction utilisant tous les points de données dans un espace de longueur d'ondes.

Régression linéaire multiple (RLM) utilise une combinaison de plusieurs variables X pour prédire une variable Y simple. Dans SPIR, les valeurs X sont soit des valeurs d'absorption à des longueurs d'onde sélectionnées dans le spectre proche de l'infrarouge, ou des variables dérivées comme les scores ACP ou MCP.

Réseau Neuronal Artificiel (RNA) décrit une technique de modélisation non linéaire basée approximativement sur l'architecture des systèmes neuronaux biologiques. Le réseau est «formé» initialement par la fourniture d'un ensemble de données comprenant plusieurs valeurs X (spectrales ou variables dérivées telles que scores ACP) et les valeurs de référence Y. Pendant le processus de formation, l'architecture du réseau peut être modifiée et les neurones pourvus de coefficient de pondération à la fois pour les intrants et les produits afin de fournir les prédictions les meilleures possibles de valeurs de paramètres. Les réseaux neuronaux nécessitent beaucoup de données pour leur formation.

Modèle multivarié. Tout modèle où une quantité de valeurs X sont utilisées pour prédire une ou plusieurs variables Y.

Valeurs aberrantes représentent des points dans un ensemble de données qui, statistiquement peuvent être démontrés avoir des valeurs qui se situent bien en dehors de la distribution attendue pour les données SPIR. Les valeurs aberrantes sont normalement classifiées comme X (spectrales) ou Y (données de référence).

Valeurs aberrantes X sont reliées au spectre PIR. Une valeur aberrante Y peut être un spectre avec des erreurs d'appareillage ou d'un type d'échantillons radicalement différent des autres échantillons non compris dans le set de calibration.

Valeurs aberrantes Y sont reliées aux erreurs dans les données de référence, p.ex. erreur de transcription, ou dans la valeur obtenue par le laboratoire de référence.

Avantage. Une mesure pour calculer la distance à laquelle se situe un échantillon par rapport au centre de l'espace de population défini par un modèle. Les échantillons avec un avantage élevé possèdent une grande influence sur le modèle. L'avantage est calculé en mesurant la distance entre un point projeté et le centre du modèle.

Distance de Mahalanobis. Distance dans l'espace CP entre un point de données et le centre de l'espace de CP (voir valeur-h ci-dessous). Ceci est une mesure non linéaire. Dans l'espace CP, un ensemble d'échantillons forme ordinairement une distribution sous forme de courbe. L'ellipsoïde qui représente le mieux la probabilité et distribution de l'ensemble peut être estimée par construction de la matrice de covariance des échantillons. La distance de Mahalanobis est simplement la distance du point de testage du centre massal divisé par la largeur de l'ellipsoïde en direction de ce point.

Valeur-h. dans certains logiciels, la distance Mahalanobis est désignée comme la Valeur-h globale et la détection des valeurs aberrantes dépend du nombre de déviations standard de h, à partir du centre. Une seconde mesure «voisinage h», représente, dans l'espace CP, la distance entre un point de donnée et ses «h» voisins les plus proches; elle indique si un échantillon est isolé ou dans une partie très peuplée de la distribution.

Résidu(s). Différence entre une valeur de référence et celle produite par un modèle de régression. Utilisée dans le calcul des statistiques de régression.

Set de testage. Lors de testage d'un modèle de régression, tout ensemble d'échantillons qui exclut ceux employés pour développer la calibration.

Set de testage indépendant. Un set de testage composé d'échantillons d'une région géographique différente, une nouvelle usine (en termes industriels) ou qui ont été récoltés plus tard (p.ex. lors d'une moisson différente), que ceux utilisés pour créer et valider un modèle de régression. Ces échantillons forment un test «véritable» d'un modèle de prédiction.

Set de validation. Échantillons servant à valider ou «prouver» une calibration. Ordinairement des échantillons présentant les mêmes caractéristiques que ceux sélectionnés pour la calibration. Souvent des échantillons alternatifs ou «nth» (rangés dans l'ordre où ils présentent de l'intérêt) sont affectés à la calibration et les sets de données de validation à partir du même groupe d'échantillons.

Échantillons de validation. Voir ci-dessus.

Validation croisée. Méthode pour générer des statistiques de prédiction dans laquelle, de manière répétée, un sous-ensemble d'échantillons sont écartés d'une population de calibration, un modèle étant calculé sur les échantillons restants et les résidus calculés sur le sous-ensemble de validation. Après que ce processus ait été conduit un certain nombre de fois, les statistiques de prédiction sont calculées sur tous les résidus.

Validation par croisement complet écarte un échantillon à la fois et est conduit n fois (lorsqu'il y a n échantillons de calibration). Après qu'un large sous-ensemble ait été écarté, le cycle de validation croisée est conduit au moins huit fois avant que soient calculées les statistiques. Finalement, un modèle est calculé en employant tous les échantillons de calibration. La validation croisée sera employée avec prudence. D'abord, les statistiques par validation croisée tendent à se montrer optimistes par comparaison avec celles d'un set indépendant de testage. Ensuite, des précautions seront prises s'il existe une quelconque duplication de données de calibration (p.ex. le même échantillon scanné sur différents appareils ou à des moments différents) afin d'affecter toutes les copies du même échantillon au même segment de validation croisée, sous peine de produire des statistiques très optimistes.

Surajustement. Addition de trop de termes de régression dans une régression linéaire multiple avec comme résultat, lorsque des échantillons sont prédits, alors qu'ils ne figurent pas dans le set de calibration. Des statistiques comme RMSP et PES sont beaucoup plus pauvres qu'attendues.

Facteurs MCP. Voir RCP ci-dessus.

Scores/Emplacements de scores. Endroit où sont situés les scores sur un facteur de CP ou vis-à-vis de ceux d'un autre facteur de CP ou SLP. Très utilisé lorsque l'ID de l'échantillon ou sa valeur de concentration sont employées pour identifier chaque point sur l'emplacement. Des modèles peuvent alors être identifiés à partir des données, ce qui n'est pas évident à partir des données brutes.

Expressions statistiques

Biais. Différence entre les valeurs de moyenne de référence et la valeur moyenne produite par le modèle PIR.

Erreur Standard de Calibration (ESC). Exprime la différence moyenne entre les valeurs prédites et calculées pour des échantillons destinés à dériver le modèle. Ici et dans les statistiques subséquentes, cette expression de la différence moyenne se réfère

à la racine carrée de la somme des carrés des valeurs résiduelles, divisée par le nombre de valeurs corrigées pour les degrés de liberté, c'est-à-dire la limite qui couvre 68% des erreurs. Ceci s'avère nécessaire, lorsque certains résidus sont négatifs et d'autres positifs.

Erreur Standard de Validation Croisée (ESVC). Pour un modèle de calibration, exprime la différence moyenne corrigée de biais entre les valeurs prédites et de référence pour le sous-ensemble d'échantillons choisis comme échantillons de prédiction pendant le processus de validation croisée (voir Validation Croisée ci-dessus).

Erreur Standard de Prédiction (ESP). Exprime la différence moyenne corrigée du biais entre les valeurs prédites et de référence, prédites par un modèle de régression, lorsqu'il est appliqué à un ensemble d'échantillons non inclus dans la dérivation du modèle.

Racine Carrée Moyenne de l'Erreur de Prédiction (RCMEP). Exprime la différence moyenne entre les valeurs de référence et celles prédites par un modèle de régression lorsqu'il est appliquée à un ensemble d'échantillons non inclus dans la dérivation du modèle. NOTE: La RCEMP comprend tout biais dans la prédiction

Racine Carrée Moyenne de Validation Croisée (RCMVC). Exprime la différence moyenne entre les valeurs prédites et de référence pour le sous-ensemble d'échantillons choisis comme échantillons de validation croisée (voir «Validation Croisée» ci-dessus). NOTE: Le RCMVC inclut tout biais dans la prédiction.

MANUELS FAO: PRODUCTION ET SANTÉ ANIMALES

1. Production en aviculture familiale, 2004 (A, F, Ar)
2. Bonnes pratiques pour l'industrie de la viande, 2006 (A, F, E, Ar)
3. Se préparer à l'influenza aviaire hautement pathogène, 2007 (A, Ar, E^e, F^e, Mk^e)
3. Revised version, 2009 (A)
4. Surveillance de la grippe aviaire hautement pathogène chez les oiseaux sauvages, 2007 (A, F, R, Id, Ar, Ba, Mn, E^e, C^e)
5. Oiseaux sauvages et influenza aviaire – Une introduction à la recherche appliquée sur le terrain et les techniques d'échantillonnage épidémiologique, 2007 (A, Ar, F, R, Id, Ba, E^{**})
6. Compensation programs for the sanitary emergence of HPAI-H5N1 in Latin American and the Caribbean, 2008 (A^e, E^e)
7. The AVE systems of geographic information for the assistance in the epidemiological surveillance of the avian influenza, based on risk, 2009 (A^e, E^e)
8. Préparation des plans d'intervention contre la peste porcine africaine, 2011 (A, F, R, Hy, Ka, E^e)
9. Bonnes pratiques pour l'industrie de l'alimentation animale – Mise en oeuvre du Code d'usages pour une bonne alimentation animale du Codex Alimentarius, 2013 (A, C, Ar, F, S, P^{**})
10. Epidemiología Participativa – Métodos para la recolección de acciones y datos orientados a la inteligencia epidemiológica, 2011 (E^e)
11. Méthode de bonne gestion des urgences: les fondamentaux – GEMP: un guide pour se préparer aux urgences en santé animale, 2013 (A, F, E, Ar, R, C)
12. Investigating the role of bats in emerging zoonoses – Balancing ecology, conservation and public health interests, 2011 (A)
13. Rearing young ruminants on milk replacers and starter feeds, 2011 (A)
14. Assurance qualité pour les laboratoires d'analyse d'aliments pour animaux, 2016 (A, F^e, R^e)
15. La conduite d'évaluations nationales des aliments pour animaux, 2014 (A, F)
16. Quality assurance for microbiology in feed analysis laboratories, 2013 (A)
17. Risk-based disease surveillance – A manual for veterinarians on the design and analysis of surveillance for demonstration of freedom from disease, 2014 (A)
18. Livestock-related Interventions during Emergencies – A How-To-Do-It Manual, 2016 (A^{**})

Disponibilité: mai 2016

A – Anglais	Multil. – Multilingue
Ar – Arabe	* – Épuisé
C – Chinois	** – En préparation
E – Espagnol	^e – Publication électronique
F – Français	
P – Portugais	Mk – Macédonien
R – Russe	Ba – Bengali
Mn – Mongol	Hy – Arménien
Id – Bahasa	Ka – Géorgien

On peut se procurer les *Manuels FAO: production et santé animales* auprès des points de vente des publications de la FAO, ou en s'adressant directement au Groupe des ventes et de la commercialisation, FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italie.

MANUELS FAO DE SANTÉ ANIMALE

1. Manual on the diagnosis of rinderpest, 1996 (A)
2. Manual on bovine spongiform encephalopathy, 1998 (A)
3. Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine, 1998
4. Epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites, 1998
5. Reconnaître la peste des petits ruminants – Manuel de terrain (F, A)
6. Manual on the preparation of national animal disease emergency preparedness plans, 1999 (A, C)
7. Manual on the preparation of rinderpest contingency plans, 1999 (A)
8. Manual on livestock disease surveillance and information systems, 1999 (A)
9. Reconnaître la peste porcine africaine – Manuel de terrain, 2000 (F, A)
10. Manual on participatory epidemiology – method for the collection of action-oriented epidemiological intelligence, 2000 (A)
11. Manual on the preparation of African swine fever contingency plans, 2001 (A)
12. Manual on procedures for disease eradication by stamping out, 2001 (A)
13. Reconnaître la péripneumonie contagieuse bovine, 2001 (F, A)
14. Préparation des plans d'intervention contre la péripneumonie contagieuse bovine, 2002 (F, A)
15. Préparation des plans d'intervention contre la fièvre de la vallée du rift, 2002 (F, A)
16. Preparation of foot-and-mouth disease contingency plans, 2002 (A)
17. Recognizing Rift Valley fever, 2003 (A)



Consulter davantage de publications sur:
<http://www.fao.org/ag/againfo/resources/fr/publications.html>

Chaque secteur de l'industrie animale, les services qui y sont associés, et le bien-être animal et humain sont influencés par l'alimentation animale. La disponibilité de données analytiques précises, fiables et reproductibles représente un impératif pour une formulation correcte d'aliments pour animaux. Seule une analyse fiable peut conduire à la génération de données scientifiques saines.

Ce manuel fournit un relevé exhaustif de bonnes pratiques de laboratoire, de procédures d'assurance qualité et des exemples de procédure standard de fonctionnement telles qu'elles sont pratiquées dans des laboratoires individuels spécialisés. L'adoption de leurs pratiques et procédures vont aider les laboratoires à acquérir la reconnaissance de la compétence requise à la certification et l'accréditation et améliorer la qualité des données supportées par les laboratoires d'analyse pour l'alimentation animale. De plus, assurer de bonnes pratiques de laboratoire, telles que présentées dans le document va augmenter la sécurité du personnel. Le document sera utilisé pour les techniciens et les enseignants chercheurs et il est à espérer qu'il permettra aux travailleurs de l'industrie animale, y compris ceux de l'aquaculture, à apprécier l'importance des données de fiabilité reconnue et des approches d'apprécier de l'assurance qualité associées. Un effet additionnel de la mise en œuvre et de l'adoption de ces approches sera le renforcement des capacités de la recherche et de la formation pour les étudiants diplômés des institutions R&D et la promotion d'un meilleur environnement commercial entre les économies développées et en développement. Ceci produira des bénéfices à long terme et contribuera à promouvoir les investissements à la fois dans les industries de l'alimentation animale et les institutions R&D.