
Norme internationale



6870

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Aliments des animaux — Dosage de la zéaralénone

Animal feeding stuffs — Determination of zearalenone content

Première édition — 1985-11-15

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6870:1985](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9987aa8-da5b-4695-b9ab-383ed5be91d3/iso-6870-1985)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9987aa8-da5b-4695-b9ab-383ed5be91d3/iso-6870-1985>

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 6870 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

ISO 6870:1985

L'attention des utilisateurs est attirée sur le fait que toutes les Normes internationales sont de temps en temps soumises à révision et que toute référence faite à une autre Norme internationale dans le présent document implique qu'il s'agit, sauf indication contraire, de la dernière édition.

Aliments des animaux — Dosage de la zéaralénone

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de dosage de la zéaralénone dans les aliments des animaux et en particulier dans le maïs.

NOTE — Bien que le sorgho présente des taches parasites de fluorescence identiques à celles de la zéaralénone, la méthode est applicable à cet aliment, car les valeurs de R_f sont différentes après le développement du chromatogramme dans la seconde direction. Ces taches ne sont pas révélées par la technique de confirmation spécifiée.

La limite de détermination de la zéaralénone se situe aux environs de 50 µg/kg.

2 Principe

Extraction sur une prise d'essai par un mélange d'acétonitrile et de solution de chlorure de potassium, filtration, prélèvement d'une partie aliquote suivi d'une délipidation à l'iso-octane puis d'une purification dans un mélange d'acétonitrile, d'eau et d'acétate de plomb en présence de terre de diatomées. Après filtration, prélèvement d'une partie aliquote et extraction dans du chloroforme qui est ensuite évaporé.

Dissolution de l'extrait sec dans un mélange de benzène et d'acétonitrile et chromatographie bidimensionnelle sur couche mince d'une partie aliquote de cette solution. Détermination de la teneur en zéaralénone par mesure visuelle ou par mesure, à l'aide d'un fluorodensitomètre, de l'intensité de fluorescence de la tache examinée à la lumière UV, par comparaison avec des quantités connues d'un étalon de zéaralénone placé sur la même plaque.

Confirmation de l'identité de la zéaralénone à l'aide d'un réactif à la benzidine bis-diazotée.

3 Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

3.1 Acétonitrile.

3.2 Iso-octane.

3.3 Chloroforme.

3.4 Mélange de benzène-acétonitrile, 98 + 2, en volume.

AVERTISSEMENT — Le benzène est une substance toxique par inhalation et contact avec la peau, et très inflammable.

3.5 Solvants de développement.

3.5.1 Mélange toluène-acétate d'éthyle-acide formique, 6 + 3 + 1, en volume.

3.5.2 Mélange chloroforme-éthanol, 95 + 5, en volume.

3.6 Chlorure de potassium, solution à 40 g/l.

3.7 Acétate de plomb, solution préparée comme suit.

Peser dans une fiole de 1 000 ml, 200 g d'acétate de plomb, ajouter 3 ml d'acide acétique, compléter au trait repère avec de l'eau et homogénéiser.

3.8 Réactif à la benzidine bis-diazotée, préparé comme suit.

AVERTISSEMENT — La benzidine est une substance cancérogène très toxique par inhalation, contact avec la peau et ingestion.

3.8.1 Préparation d'une solution de benzidine à 5 g/l

Mettre 0,5 g de benzidine dans une fiole de 100 ml contenant 20 ml d'eau et 1,5 ml d'acide chlorhydrique, puis compléter avec de l'eau.

Conserver cette solution à l'abri de la lumière dans un flacon en verre inactif.

3.8.2 Préparation du réactif

Refroidir entre 0 et -5 °C des volumes égaux de la solution de benzidine (3.8.1) et d'une solution de nitrite de sodium à 100 g/l.

Mélanger avec soin les deux solutions. La solution obtenue est trouble et de couleur pourpre foncé. La laisser se réchauffer à la température du laboratoire avant utilisation (solution de couleur jaune).

Préparer ce réactif extemporanément.

3.9 Terre de diatomées (Celite 545), lavée à l'acide chlorhydrique.

3.10 Azote.

3.11 Zéaralénone, solution étalon à 10 µg/ml dans le benzène.

Déterminer le spectre d'absorption de la solution entre 300 et 330 nm, à l'aide d'un spectromètre, dans une cuve en silice de 10 mm d'épaisseur, par rapport au benzène, et relever le maximum d'absorbance (*A*) qui est proche de 317 nm.

Calculer la concentration en zéaralénone, en microgrammes par millilitre, de la solution, à l'aide de la formule

$$\frac{318 \times A \times 1\,000}{6\,060}$$

où

318 est la masse molaire de la zéaralénone;

6 060 est le coefficient d'extinction molaire.

4 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1 Broyeur, permettant d'obtenir un produit qui passe en totalité au travers d'un tamis de 1 mm d'ouverture de maille.

4.2 Agitateur, permettant d'obtenir environ 100 oscillations par minute.

4.3 Papier filtre, à filtration moyenne (un papier à filtration rapide donne une solution trouble, et un papier à filtration lente entraîne des colmatages).

4.4 Appareil rotatif à évaporation sous pression réduite avec ballon à fond rond.

4.5 Appareillage pour chromatographie sur couche mince, à savoir matériel nécessaire à la préparation des plaques (4.6) et au dépôt des taches (pipettes capillaires ou microseringues), cuve de développement et appareil pour pulvériser le réactif (3.8) sur les plaques.

4.6 Plaques de verre pour chromatographie sur couche mince, de dimensions 200 mm × 200 mm, préparées comme suit (les quantités indiquées conviennent pour la préparation de cinq plaques).

Introduire 30 g de gel de silice G-HR dans une fiole conique, ajouter 60 ml d'eau, boucher et agiter pendant 1 min. Étendre la suspension sur les plaques de manière à obtenir une couche uniforme de 0,25 mm d'épaisseur. Laisser sécher à l'air et conserver ensuite les plaques dans un dessiccateur. Au moment de l'emploi, activer les plaques en les maintenant durant 1 h dans l'étuve réglée à 110 °C.

Les plaques prêtes à l'emploi conviennent dans la mesure où elles donnent des résultats semblables à ceux obtenus avec des plaques préparées comme indiqué ci-dessus.

4.7 Lampe UV à ondes courtes (longueur d'onde 253 nm).

L'intensité d'irradiation doit permettre de distinguer encore nettement une tache de 25 ng de zéaralénone sur une plaque pour chromatographie sur couche mince, à une distance de 100 mm de la lampe.

AVERTISSEMENT — La lumière UV étant dangereuse pour les yeux, il y a lieu de porter des lunettes protectrices.

4.8 Tube à essais, de 10 ml de capacité avec bouchon de polyéthylène.

4.9 Fluorodensitomètre (éventuellement, mais de préférence).

4.10 Bain d'eau, réglable à 60 °C.

4.11 Fiole conique, de 500 ml de capacité, à joint rodé.

4.12 Ampoules à décanter, de 250 ml de capacité.

4.13 Éprouvettes graduées, de 100 et 250 ml de capacité.

4.14 Pipettes, de 50 et 100 ml de capacité.

4.15 Microseringues.

5 Échantillonnage

Prélever l'échantillon pour laboratoire sur le produit à échantillonner, en se conformant à la Norme internationale relative au produit concerné, sauf si l'échantillonnage en vue de la détermination de la zéaralénone est exclu de son domaine d'application. S'il n'existe pas de Norme internationale appropriée, les parties concernées doivent se mettre d'accord sur ce sujet, en tenant compte des caractéristiques du produit à échantillonner.

6 Mode opératoire

6.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Broyer l'échantillon de façon qu'il passe en totalité au travers d'un tamis de 1 mm d'ouverture de maille. Bien homogénéiser.

6.2 Prise d'essai

Peser, à 0,01 g près, 50 g de l'échantillon pour essai dans une fiole conique de 500 ml (4.11).

6.3 Extraction

Ajouter 180 ml d'acétonitrile (3.1) et 20 ml de la solution de chlorure de potassium (3.6), mesurés avec précision à l'aide d'une éprouvette graduée (4.13). Boucher la fiole, agiter et mélanger pendant 30 min à l'aide de l'agitateur (4.2). Filtrer sur papier filtre (4.3).

Transvaser, à l'aide d'une pipette (4.14), 100 ml du filtrat dans une ampoule à décanter (4.12), puis procéder à une délipidation en effectuant deux extractions successives à l'aide, à chaque fois, de 50 ml d'iso-octane (3.2).

Recueillir la phase à l'acétonitrile dans le ballon de l'évaporateur rotatif (4.4) et évaporer à sec sous pression réduite.

6.4 Purification

Ajouter 20 ml d'acétonitrile (3.1) au résidu obtenu, 60 ml d'eau et 20 ml de la solution d'acétate de plomb (3.7), mesurés avec précision à l'aide d'une éprouvette graduée (4.13). Mélanger et laisser décanter pendant 10 min dans le bain d'eau (4.10) réglé à 60 °C. Il se forme un précipité. Ajouter 5 g de terre de diamontées (3.9) et filtrer sur papier filtre (4.3).

Transvaser à l'aide d'une pipette (4.14), 50 ml du filtrat dans une ampoule à décanter (4.12) et effectuer trois extractions successives à l'aide, à chaque fois, de 50 ml de chloroforme (3.3) en séchant les fractions chloroformiques par passage sur du sulfate de sodium. Récupérer les fractions chloroformiques dans le ballon de l'évaporateur rotatif (4.4) et évaporer sous vide jusqu'à obtention d'un résidu presque sec.

Transvaser ce résidu quantitativement, en rinçant avec du chloroforme, dans le tube à essais (4.8) puis évaporer à sec sous azote (3.10) au bain d'eau (4.10).

Ajouter, avec précaution, à l'aide d'une microseringue, 0,5 ml du mélange benzène-acétonitrile (3.4) et boucher soigneusement le tube.

6.5 Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince

6.5.1 Application des solutions (voir la figure)

Tracer sur une plaque (4.6) deux droites parallèles à deux côtés contigus (à 50 et 60 mm, respectivement, de ces côtés), destinées à délimiter la migration des fronts de solvants. Déposer sur la plaque, à l'aide de microseringues, les solutions indiquées ci-après:

- au point A, 25 µl de l'extrait purifié de l'échantillon (6.4);
- au point B, 10 µl de la solution étalon (3.11);
- au point C, 5 µl de la solution étalon (3.11);
- au point D, 10 µl de la solution étalon (3.11);
- au point E, 15 µl de la solution étalon (3.11).

Sécher à l'aide d'un léger courant d'air ou d'azote (3.10). Les taches obtenues doivent avoir au plus un diamètre de 5 mm environ.

6.5.2 Développement (voir la figure)

Développer le chromatogramme dans la direction I à l'aide du solvant de développement (3.5.1) (couche de 10 mm dans une cuve saturée), à l'abri de la lumière, jusqu'à ce que le front de solvant atteigne la ligne de délimitation. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher durant 15 min au moins à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

NOTE — Il peut être utile, après le développement dans la direction I, d'observer rapidement le chromatogramme à la lumière UV à 253 nm et d'entourer au crayon les taches possibles de zéaralénone (la tache au point B indiquant la position de la zéaralénone).

Développer ensuite le chromatogramme dans la direction II à l'aide du solvant de développement (3.5.2) (couche de 10 mm dans une cuve non saturée), à l'abri de la lumière, jusqu'à ce que le front de solvant atteigne la ligne de délimitation. Retirer la plaque de la cuve et laisser sécher à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

6.6 Détermination

Deux techniques de détermination peuvent être utilisées, soit par mesures visuelles, soit par fluorodensitométrie, cette dernière technique étant préférable dans la mesure où l'on dispose d'un tel appareil.

6.6.1 Mesures visuelles

Déterminer la quantité de zéaralénone dans l'extrait en comparant l'intensité de fluorescence de la tache de l'extrait à l'intensité des taches C, D et E de la solution étalon, en observant, à la lumière UV, la plaque placée à 10 cm de la lampe (4.7). Interpoler si nécessaire.

Si l'intensité de fluorescence donnée par les 25 µl d'extrait est plus forte que celle des 15 µl de la solution étalon, déposer un plus petit volume au point A ou diluer l'extrait avec le mélange benzène-acétonitrile (3.4) et répéter la chromatographie sur couche mince (6.5).

6.6.2 Mesures par fluorodensitométrie

Mesurer l'intensité de fluorescence des taches de zéaralénone au fluorodensitomètre (4.9) en utilisant par exemple une longueur d'onde d'excitation de 313 nm et une longueur d'onde d'émission de 443 nm (émission maximale à 470 nm).

Déterminer la quantité de zéaralénone du dépôt de l'extrait en comparant les intensités de fluorescence de la tache de l'extrait à celles des taches C, D et E de la solution étalon.

6.7 Confirmation de l'identité de la zéaralénone

Pulvériser le réactif à la benzidine bis-diazotée (3.8) sur la plaque obtenue en 6.5. La zéaralénone donne, à la température du laboratoire, une tache rouge brique brillant dont l'intensité faiblit après une exposition à l'air durant 15 min au moins.

7 Expression des résultats

7.1 Mesures visuelles

La teneur en zéaralénone, exprimée en microgrammes par kilogramme de produit, est égale à

$$\frac{c V_1 V_3}{m V_2}$$

où

c est la concentration de zéaralénone, en microgrammes par millilitre, de la solution étalon (3.11);

m est la masse, en grammes, de la prise d'essai correspondant au volume d'extrait soumis à la purification (12,5 g);

V_1 est le volume final, en microlitres, de l'extrait, compte tenu des dilutions éventuelles;

V_2 et V_3 sont respectivement les volumes, en microlitres, de l'extrait et de la solution étalon de zéaralénone (3.11) déposés sur la plaque et ayant une intensité de fluorescence semblable.

7.2 Mesures fluorodensitométriques

La teneur en zéaralénone, exprimée en microgrammes par kilogramme de produit, est égale à

$$\frac{m_1 V_1}{m V_2}$$

où

m est la masse, en grammes, de la prise d'essai correspondant au volume d'extrait soumis à la purification (12,5 g);

m_1 est la masse, en nanogrammes, de zéaralénone du dépôt de l'extrait (compte tenu du volume V_2), déduite des déterminations;

V_1 est le volume final, en microlitres, de l'extrait, compte tenu des dilutions éventuelles;

V_2 est le volume, en microlitres, de l'extrait déposé sur la plaque (25 μ l).

8 Fidélité

Un essai interlaboratoire organisé sur le plan international avec la participation de 20 laboratoires (mais seulement 16 laboratoires ont fourni des résultats exploitables avec le maïs B), chacun d'eux ayant effectué trois déterminations, a donné les résultats statistiques [évalués conformément à l'ISO 5725¹⁾] indiqués dans le tableau.

9 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

ISO 6870:1985
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9987aa8-da5b-4695-b9ab-382-1516914375-iso-6870-1985>
Tableau — Résultats exprimés en microgrammes par kilogramme

Échantillon	Maïs A	Maïs B (maïs A dilué au 1/3)
Nombre de laboratoires retenus après élimination des aberrants	20	15
Moyenne	734	219
Écart-type de répétabilité, S_r	78	34
Coefficient de variation de répétabilité	11 %	15 %
Répétabilité, 2,83 S_r	221	96
Écart-type de reproductibilité, S_R	282	125
Coefficient de variation de reproductibilité	38 %	57 %
Reproductibilité, 2,83 S_R	798	354

1) ISO 5725, *Fidélité des méthodes d'essais — Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité par essais interlaboratoires.*

Dimensions en millimètres

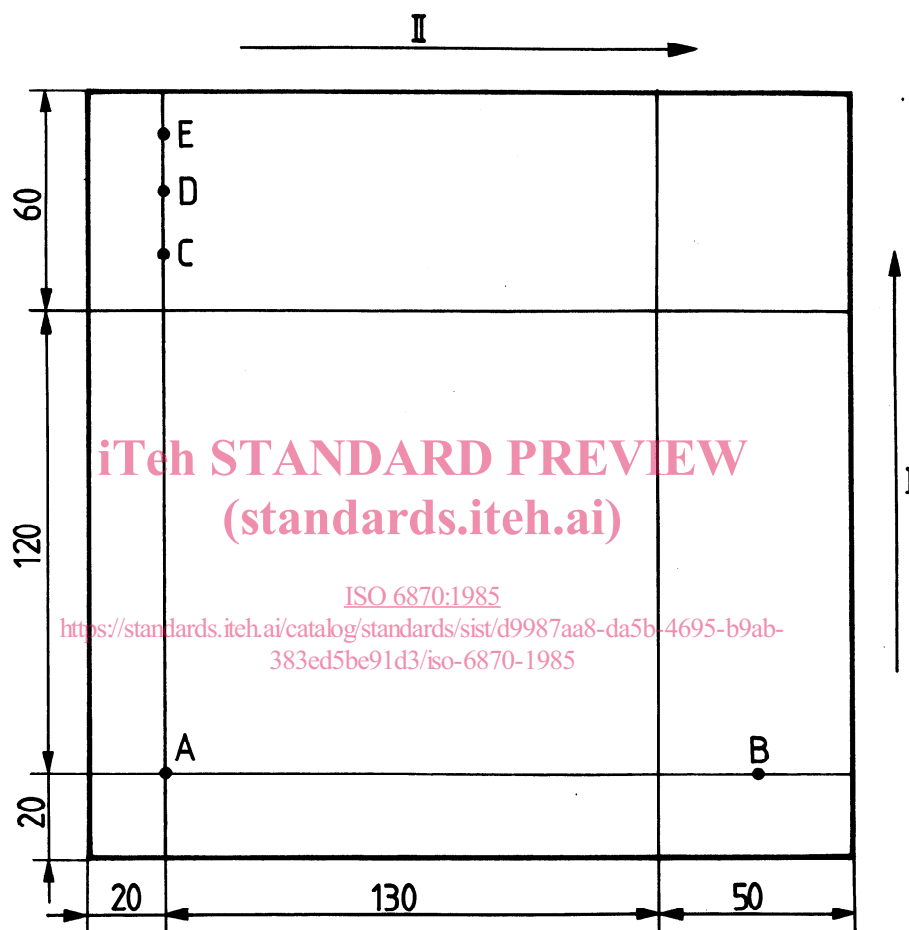


Figure – Application des solutions et développement des chromatogrammes

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6870:1985

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9987aa8-da5b-4695-b9ab-383ed5be91d3/iso-6870-1985>