
**Aliments des animaux — Dosage
de la furazolidone — Méthode par
chromatographie liquide à haute
performance**

*Animal feeding stuffs — Determination of furazolidone content —
Method using high-performance liquid chromatography*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14797:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/92cbec80-3291-4fdb-8b89-5d798d0527c5/iso-14797-1999>



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 en général 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. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 14797 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

Les annexes A, B et C de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 14797:1999](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/92c8ec80-3291-4fdb-8b89-5d798d0527c5/iso-14797-1999)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/92c8ec80-3291-4fdb-8b89-5d798d0527c5/iso-14797-1999>

© ISO 1999

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse
Internet iso@iso.ch

Imprimé en Suisse

Aliments des animaux — Dosage de la furazolidone — Méthode par chromatographie liquide à haute performance

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) pour la détermination de la teneur en furazolidone dans les prémix et dans les aliments des animaux.

La méthode est applicable aux aliments pour animaux dont la teneur en furazolidone va de 25 mg/kg à 5 000 mg/kg, ainsi qu'aux prémix dont la teneur en furazolidone peut aller jusqu'à une fraction massique de 20 % [auparavant écrit comme 20 % (*m/m*)].

NOTE 1 Pour les aliments des animaux, la teneur en furazolidone est exprimée en milligrammes par kilogramme, et pour les prémix comme fraction massique en pour cent [% (*m/m*)].

NOTE 2 La furazolidone est une substance chimiothérapique de la famille des nitrofuranes. Les nitrofuranes sont bactériostatiques et bactéricides, actifs contre les micro-organismes Gram positifs et Gram négatifs, et contre certaines moisissures et certains protozoaires.

(standards.iteh.ai)

2 Référence normative

ISO 14797:1999

La norme suivante contient des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, l'édition indiquée était en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente de la norme indiquée ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 6498:1998, *Aliments des animaux — Préparation des échantillons pour essai*.

3 Principe

Extraction de la furazolidone d'un échantillon à l'aide d'un mélange d'acétonitrile et de méthanol. Humidification préalable des aliments pour animaux dans de l'eau. Purification de l'extrait d'aliments pour animaux sur une colonne d'oxyde d'aluminium courte puis dilution dans de l'eau. Dilution de l'extrait de prémix avec un mélange d'eau, d'acétonitrile et de méthanol. Analyse de l'extrait final par chromatographie à polarité de phases inversée avec détection UV à 365 nm (voir références [1] à [3]).

4 Réactifs

Sauf indication différente, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

4.1 Eau, déminéralisée ou déionisée, d'une résistivité au moins égale à 10 M Ω -cm ou de l'eau d'une pureté au moins équivalente.

4.2 Solvant d'extraction: mélange d'acétonitrile et de méthanol (1:1 par volume).

Mélanger des volumes égaux d'acétonitrile et de méthanol. Bien mélanger et laisser le mélange atteindre la température ambiante avant de l'utiliser.

4.3 Solvant pour dilution: mélange de solvant d'extraction (4.2) et d'eau (4.1) (35:65 par volume).

Mélanger 350 ml de solvant d'extraction (4.2) et 650 ml d'eau (4.1).

4.4 Acide acétique ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), fraction volumique de 10 % [10 % (V/V)].

Diluer 10 ml d'acide acétique glacial à 100 ml avec de l'eau (4.1).

4.5 Solution tampon d'acétate de sodium, $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}) = 0,01 \text{ mol/l}$, pH = 6,0.

Peser 0,82 g d'acétate de sodium dans une fiole jaugée de 1 000 ml. Dissoudre dans 700 ml d'eau. Ajuster le pH à 6,0 à l'aide d'acide acétique (4.4). Compléter au volume avec de l'eau et mélanger.

4.6 Phase mobile pour CLHP.

Réunir 800 ml de la solution tampon d'acétate de sodium (4.5) et 200 ml d'acétonitrile puis mélanger. Filtrer l'éluant sur un filtre de porosité égale à $0,22 \mu\text{m}$ en utilisant un système de filtration de solvant (5.2), puis dégazer pendant 10 min dans le bain à ultrasons (5.3) avant l'emploi.

4.7 Étalon de furazolidone: *N*-(5-nitro-2-furfurylidène)-3-amino-2-oxazolidone); numéro CAS 67-45-8 selon le catalogue Chemical Abstracts.

AVERTISSEMENT — La furazolidone étant très sensible à la lumière, les opérations doivent être menées à l'abri de la lumière du jour et de toute source lumineuse artificielle blanche. Éviter d'inhaler la furazolidone et les solutions en contenant et de s'y exposer. Il s'agit en effet d'une substance toxique. Travailler sous une hotte pour manipuler les solvants et les solutions. Porter des lunettes de sécurité et des vêtements de protection.

4.8 Solution mère de furazolidone (environ 250 $\mu\text{g/ml}$).

Peser $25 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$ de furazolidone (4.7) à 0,1 mg près dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans le solvant d'extraction (4.2), et compléter à la marque avec ce même solvant et mélanger. Calculer la concentration en tenant compte de la pureté du matériau. Préparer une nouvelle solution tous les mois. Conserver à l'abri de la lumière entre $0 \text{ }^\circ\text{C}$ et $8 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.9 Solutions de travail de furazolidone (environ 5 $\mu\text{g/ml}$ et 12,5 $\mu\text{g/ml}$).

Pipetter respectivement 2,0 ml et 5,0 ml de la solution mère de furazolidone (4.8) dans deux fioles jaugées de 100 ml. Ajouter 65 ml d'eau, compléter à la marque avec le solvant d'extraction (4.2) et mélanger. Préparer de nouvelles solutions pour chaque série d'échantillons.

4.10 Oxyde d'aluminium neutre, activité 1.

NOTE 0 % à 1 % d'eau est nécessaire pour une désactivation totale.

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

5.1 pH mètre.

5.2 Système de filtration de solvant, appareillage tout en verre pouvant recevoir des filtres d'une porosité de $0,22 \mu\text{m}$.

5.3 Bain à ultrasons.

5.4 Agitateur rotatif, permettant une rotation horizontale et ayant une fréquence de rotation comprise entre 250 min⁻¹ et 300 min⁻¹.

5.5 Filtre en microfibrilles de verre, d'un diamètre égal à 15 cm.

5.6 Laine de verre.

5.7 Colonne de verre pour chromatographie, de 30 cm de longueur et de 10 mm de diamètre intérieur, rétrécissant à une extrémité et raccordée à un tampon en laine de verre (5.6).

5.8 Système de filtration, équipé de filtres en polyvinylidène difluorure (PVDF) ou en polytétrafluoréthylène (PTFE) d'une porosité de 0,45 µm.

5.9 Appareil CLHP.

5.9.1 Pompe, sans pulsations, capable de maintenir un débit compris entre 0,1 ml/min et 2,0 ml/min.

5.9.2 Boucle d'injection, adaptée à des injections de 20 µl à 50 µl.

5.9.3 Détecteur UV, capable de mesurages sur une longueur d'onde de 365 nm.

Si disponible, un détecteur à barrette de diodes peut être utilisé pour confirmation.

5.9.4 Enregistreur.

iTeh STANDARD PREVIEW

5.9.5 Colonne de garde: silice greffée C₁₈, granulométrie comprise entre 37 µm et 100 µm, longueur 20 mm, diamètre intérieur 3,9 mm, ou toute autre colonne de protection de qualité équivalente.

5.9.6 Colonne analytique: silice greffée C₁₈, taille de particules 5 µm, longueur 200 mm, diamètre interne 3,0 mm, ou toute colonne analytique de qualité équivalente.

Pour la furazolidone, un facteur de capacité (K') d'au moins 1,0 doit être obtenu.

NOTE Le facteur de capacité est défini comme:

$$K' = \frac{t_R}{t_0} - 1$$

où

K' est le facteur de capacité;

t_R est le temps de rétention de la furazolidone, en minutes;

t_0 est le temps de rétention du pic de la furazolidone non retenue, en minutes.

5.10 Seringue jetable, de 5 ml de capacité.

6 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 6497 [4].

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 6498.

Broyer l'échantillon de laboratoire (habituellement 500 g) de façon qu'il passe à travers un tamis à mailles de 1 mm. Mélanger soigneusement.

8 Mode opératoire

8.1 Généralités

Parallèlement à l'analyse de l'échantillon pour essai (ou d'une série d'échantillons pour essai), analyser un échantillon à blanc, un échantillon à blanc dopé, et, si possible, un échantillon de référence.

NOTE Les échantillons à blanc sont des mélanges homogènes d'aliments comparables ayant une teneur en furazolidone inférieure à 10 mg/kg. Les échantillons à blancs dopés sont des échantillons d'aliments à blanc dans lesquels de la furazolidone a été ajoutée. Les échantillons à blanc et les échantillons de référence peuvent être conservés pendant 1 an s'ils sont entreposés à une température comprise entre 0 °C et 8 °C.

Il y a lieu de procéder à une nouvelle analyse lorsque le taux de récupération est inférieur à 94 % ou supérieur à 106 %.

8.2 Préparation d'un échantillon dopé

Il convient que la teneur en furazolidone de l'échantillon dopé soit pratiquement égale à la teneur prévue en furazolidone de l'échantillon. Pour un échantillon dopé dont la teneur en furazolidone est égale à 250 mg/kg, suivre la procédure suivante.

Pipetter 5,0 ml de la solution mère (4.8) dans une fiole conique de 250 ml. Évaporer sous flux d'azote jusqu'à obtention d'un volume égal à 0,5 ml environ et ajouter 5 g d'aliment témoin. Mélanger soigneusement et laisser reposer pendant 10 min au moins avant de procéder à l'extraction (8.3).

8.3 Extraction

8.3.1 Aliments ayant une teneur en furazolidone allant de 25 mg/kg à 2 500 mg/kg

Peser 5,0 g de l'échantillon pour essai préparé à 0,05 g près dans une fiole conique de 250 ml. Ajouter 15,0 ml d'eau, mélanger et laisser reposer pendant 5 min. Ajouter 35,0 ml de solvant d'extraction (4.2), boucher et agiter vigoureusement pendant 30 min sur l'agitateur rotatif (5.4). Filtrer la solution sur un filtre en microfibres de verre (5.5) et utiliser le filtrat pour une analyse chromatographique sur colonne conformément à 8.4.

8.3.2 Aliments ayant une teneur en furazolidone allant de 2 500 mg/kg à 5 000 mg/kg

Peser 5,0 g de l'échantillon pour essai préparé à 0,1 mg près dans une fiole conique de 250 ml. Ajouter 30,0 ml d'eau, mélanger et laisser reposer pendant 5 min. Ajouter 70,0 ml de solvant d'extraction (4.2), boucher et agiter vigoureusement pendant 30 min sur l'agitateur rotatif (5.4). Filtrer la solution sur un filtre en microfibres de verre (5.5) et utiliser le filtrat pour une analyse chromatographique sur colonne conformément à 8.4.

8.3.3 Prémix ayant une fraction massique de furazolidone allant de 0,5 % à 7 % [0,5 % (m/m) à 7 % (m/m)]

Peser 1,0 g de l'échantillon pour essai préparé à 0,01 g près dans une fiole conique de 250 ml. Ajouter 100,0 ml de solvant d'extraction (4.2), boucher et agiter vigoureusement pendant 30 min sur l'agitateur rotatif (5.4). Filtrer la solution sur un filtre en microfibres de verre (5.5).

Diluer le filtrat avec du solvant pour dilution (4.3), de façon que la solution finale obtenue ait une teneur en furazolidone comprise entre 5 µg/ml à 10 µg/ml. Le facteur de dilution est *f*.

Mélanger soigneusement et filtrer la solution sur le système de filtration (5.8). Utiliser le filtrat pour une analyse HPLC conformément à 8.5.

NOTE Le facteur de dilution requis (f) peut être estimé en utilisant l'équation suivante:

$$f_e = \frac{m \cdot w_{\text{exp}}}{V \cdot \rho_r}$$

où

f_e est le facteur de dilution requis estimé de l'extrait d'échantillon;

m est la masse de la prise d'essai, en grammes;

w_{exp} est la teneur prévue en furazolidone de l'échantillon, en milligrammes par kilogramme;

ρ_r est la teneur requise en furazolidone de la solution finale, en microgrammes par millilitre;

V est le volume total de solvant d'extraction, en millilitres, ajouté à la prise d'essai (voir aussi la note en 8.5.2).

8.3.4 Prémix ayant une fraction massique de furazolidone allant de 7 % à 10 % [7 % (m/m) à 10 % (m/m)]

Peser 1,0 g de l'échantillon pour essai préparé à 0,01 g près dans une fiole conique de 500 ml. Ajouter 200,0 ml de solvant d'extraction (4.2), boucher et agiter vigoureusement pendant 30 min sur l'agitateur rotatif (5.4). Filtrer la solution sur un filtre en microfibrilles de verre (5.5).

Diluer le filtrat avec du solvant pour dilution (4.3), de façon que la solution finale obtenue aie une teneur en furazolidone comprise entre 5 µg/ml à 10 µg/ml. Le facteur de dilution est f .

Mélanger soigneusement et filtrer la solution sur le système de filtration (5.8). Utiliser le filtrat pour une analyse CLHP conformément à 8.5.

NOTE Voir la note en 8.3.3 pour le calcul du facteur de dilution.

8.3.5 Prémix ayant une fraction massique de furazolidone allant de 10 % à 20 % [10 % (m/m) à 20 % (m/m)]

Peser 0,5 g de l'échantillon pour essai préparé à 5 mg près dans une fiole conique de 500 ml. Ajouter 200,0 ml de solvant d'extraction (4.2), boucher et agiter vigoureusement pendant 30 min sur l'agitateur rotatif (5.4). Filtrer la solution sur un filtre en microfibrilles de verre (5.5).

Diluer le filtrat avec du solvant pour dilution (4.3), de façon que la solution finale obtenue aie une teneur en furazolidone comprise entre 5 µg/ml à 10 µg/ml. Le facteur de dilution est f .

Mélanger soigneusement et filtrer la solution sur le système de filtration (5.8). Utiliser le filtrat pour une analyse CLHP conformément à 8.5.

NOTE Voir la note en 8.3.3 pour le calcul du facteur de dilution.

8.4 Chromatographie sur colonne

Pour chaque extrait d'échantillon, conditionner à sec une colonne en verre (5.7), bouchée à l'extrémité inférieure par un tampon de laine de verre (5.6), avec 4 g d'oxyde d'aluminium (4.10). Appliquer 20 ml de l'extrait, préparé conformément à 8.3.1 ou 8.3.2, à la colonne et jeter les premiers 4 ml de l'éluat. Recueillir les 8 ml suivants dans un petit récipient rond gradué.

Pipetter 5,0 ml d'éluat dans une fiole jaugée de 5 ml et compléter au volume avec de l'eau. Bien mélanger.

Si nécessaire, diluer la solution avec le solvant de dilution (4.3) de manière que la solution finale obtenue ait une teneur en furazolidone comprise entre 5 µg/ml et 10 µg/ml. Le facteur de dilution est f .

Filtrer les solutions diluées à l'aide du système de filtration (5.8) et utiliser le filtrat pour une analyse CLHP conformément à 8.5.

8.5 Analyse CLHP

8.5.1 Paramètres de l'analyse CLHP

Utiliser les paramètres suivants:

- débit de la phase mobile (4.6): 0,6 ml/min;
- volume d'injection: 20 µl;
- longueur d'onde: 365 nm;
- enregistreur: 10 mV;
- vitesse d'entraînement du support de diagramme: 0,5 cm/min.

8.5.2 Mode opératoire

8.5.2.1 Injecter les solutions de travail de furazolidone (4.9) jusqu'à obtention de hauteurs ou de surfaces de pics reproductibles et d'une ligne de base du diagramme stable. Pour les hauteurs ou les aires de pics, la différence entre le résultat le plus élevé et celui le plus faible doit être inférieure à 5 % de la moyenne des résultats de trois injections consécutives.

Le pic correspondant à la furazolidone doit être symétrique ($f_{as} < 2$).

NOTE f_{as} est le rapport de la largeur entre le tracé du pic du côté descendant et la perpendiculaire à la ligne de base passant par le sommet du pic et celle entre le tracé du pic côté ascendant et cette perpendiculaire, ces deux largeurs étant mesurées à 10 % de la hauteur du pic.

À 5 % près, la concentration et la hauteur des pics correspondant aux deux solutions de travail doivent être proportionnelles. Si l'écart dépasse les 5 %, de nouvelles solutions de travail doivent être préparées.

Injecter les extraits de l'échantillon à blanc et de l'échantillon à blanc dopé. Si le pic correspondant à la furazolidone n'est pas symétrique ou non complètement distinct des pics de la matrice, il est nécessaire d'utiliser une autre colonne CLHP ou de modifier les paramètres en augmentant ou en diminuant la teneur en eau de la phase mobile (4.6).

Injecter les uns à la suite des autres les solutions de travail (4.9), cinq extraits d'échantillon et les solutions de travail (4.9). Répéter cette séquence, le cas échéant, pour d'autres extraits d'échantillon dans la série.

Il convient que les hauteurs ou les aires des pics observées pour les solutions de travail de furazolidone soient égales, à 5 % près, à celles correspondantes aux solutions de travail de furazolidone injectées auparavant.

Un exemple de chromatogramme est donnée à l'annexe A. À partir du chromatogramme pour la furazolidone, une valeur K' de 2,1 peut être calculée (voir aussi la note en 5.9.6).

8.5.2.2 Lorsque la teneur en furazolidone déterminée pour un prémix est manifestement inférieure à la teneur prévue (tolérance prise en compte), il est recommandé de répéter l'analyse appliquée aux étapes décrites en 8.3.3, 8.3.4 ou 8.3.5 avec une quantité supplémentaire de 50 ml de solvant d'extraction (4.2).

Si le nouveau résultat est supérieur de plus de 15 % (m/m) à la valeur d'origine, il convient de procéder à une nouvelle analyse en ajoutant à nouveau 50 ml de solvant d'extraction (4.2). Il convient de continuer à ajouter cette quantité de solvant jusqu'à ce que l'écart entre les résultats de deux déterminations consécutives soit inférieur à 15 % (m/m).

9 Confirmation

9.1 Généralités

Si l'identité de la substance à l'origine du pic dans le chromatogramme n'est pas certaine, eu égard à la forme du pic ou à la teneur obtenue, l'identité de l'analyte déterminé peut être confirmée soit par co-chromatographie ou à l'aide d'un détecteur à barrette de diode. Dans la première hypothèse, procéder conformément à 9.2, dans la deuxième hypothèse, passer directement à 9.3.

9.2 Co-chromatographie

Préparer un extrait d'échantillon dopé en ajoutant une quantité appropriée de la solution de travail (4.9) à l'extrait d'échantillon. La quantité de furazolidone ajoutée doit être approximativement égale à celle présumée dans l'extrait d'échantillon.

Injecter l'extrait d'échantillon, la solution de travail (4.9) et l'extrait d'échantillon dopé. Il convient que seul le pic du chromatogramme supposé correspondre à l'analyte s'intensifie, qu'il augmente en hauteur proportionnellement au niveau de dopage, et que sa largeur à mi-hauteur soit égale, à 10 % près, à la largeur d'origine.

Poursuivre conformément à l'article 10.

9.3 Détecteur à barrette de diodes

9.3.1 Paramètres

Les paramètres sont tels que décrits en 8.5.1, mais à la place du détecteur UV utiliser un détecteur à barrette de diodes ayant les caractéristiques suivantes:

- longueur d'onde pour l'échantillon: 365 nm;
- largeur de la bande pour l'échantillon: 4 nm (soit une longueur d'onde de $365 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$);
- longueur d'onde pour la référence: 450 nm;
- largeur de bande pour la référence: 100 nm;
- plage du spectre: de 225 nm à 400 nm;
- spectre: zéro, sommet, points d'inflexion des pentes ascendante et descendante.

9.3.2 Mode opératoire

Laisser le système se stabiliser. Injecter la solution de travail de furazolidone à 5 µg/ml (4.9), les extraits d'échantillons douteux, puis à nouveau la solution de travail à 5 µg/ml (4.9). Enregistrer les spectres au zéro du diagramme, aux points d'inflexion des pentes ascendante et descendante et au sommet du pic. Conserver toutes les données.

9.3.3 Évaluation

Tracer dans une première figure les spectres retraités normalisés (échantillon – zéro du diagramme) du pic de l'échantillon, enregistrés au sommet et aux points d'inflexion des pentes ascendante et descendante. Tracer dans une deuxième figure les spectres du pic de l'échantillon et de celui de la solution de travail, enregistrés au sommet.

9.3.4 Critères de confirmation

L'identité de l'analyte est considérée confirmée si les critères suivants sont satisfaits.

- a) Le temps de rétention du pic de l'échantillon doit être égal ($\pm 5\%$) à celui du pic de l'étalon. En cas d'incertitude, effectuer un ajout dosé (matériau étalon ajouté à l'échantillon).