
**Aliments des animaux — Dosage qualitatif
de la zéaralénone**

Animal feeding stuffs — Qualitative determination of zearalenone

**iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)**

ISO 6870:2002

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f1ad149-85e0-49e7-8831-90f21f95275/iso-6870-2002>



Numéro de référence
ISO 6870:2002(F)

PDF — Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6870:2002](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f1ad149-85e0-49e7-8831-90f21f95275/iso-6870-2002)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f1ad149-85e0-49e7-8831-90f21f95275/iso-6870-2002>

© ISO 2002

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'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.ch
Web www.iso.ch

Imprimé en Suisse

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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente Norme internationale peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

La Norme internationale ISO 6870 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 6870:1985), dont elle constitue une révision mineure. Le titre a été modifié pour souligner le fait que la méthode n'est que qualitative, et dans le domaine d'application il est maintenant spécifié que la méthode ne sert qu'à des fins de détection. La plage des températures indiquée en 3.8.2 a été rectifiée pour lire 0 °C à 5 °C.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f1ad149-85e0-49e7-8831->

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

Aliments des animaux — Dosage qualitatif de la zéaralénone

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode qualitative de dosage de la zéaralénone dans les aliments des animaux et en particulier dans le maïs. Cette méthode ne sert qu'à des fins de détection.

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

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.

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

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

3.1 Acétonitrile.

3.2 Iso-octane.

3.3 Chloroforme.

AVERTISSEMENT — Le chloroforme est une substance toxique. Éviter l'inhalation de chloroforme et l'exposition au chloroforme. Travailler sous hotte ventilée lors de la manipulation du solvant ou de ses solutions.

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

3.5.2 Mélange de 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 cancérigène 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 inactinique.

3.8.2 Préparation du réactif

Refroidir à une température comprise entre 0 °C 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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f1ad149-85e0-49e7-8831->

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 nm 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 suivante:

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

où

318 est la masse molaire de la zéaralénone;

6 060 est le coefficient d'extinction molaire.

4 Appareillage

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

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 $110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f1ad149-85e0-49e7-8831->

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 $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 ml et 250 ml de capacité.

4.14 Pipettes, de 50 ml 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).

À l'aide d'une pipette (4.14), transvaser 100 ml du filtrat dans une ampoule à décanter (4.12), puis procéder à une délipidation en effectuant deux extractions successives à l'aide, 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 diatomées (3.9) et filtrer sur papier-filtre (4.3).

À l'aide d'une pipette (4.14), transvaser 50 ml du filtrat dans une ampoule à décanter (4.12) et effectuer trois extractions successives à l'aide, 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 Figure 1)

Tracer sur une plaque (4.6) deux droites parallèles à deux côtés contigus (à 50 mm 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 μ l de la solution étalon (3.11);
- au point E, 15 μ l de la solution étalon (3.11).

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

Dimensions en millimètres

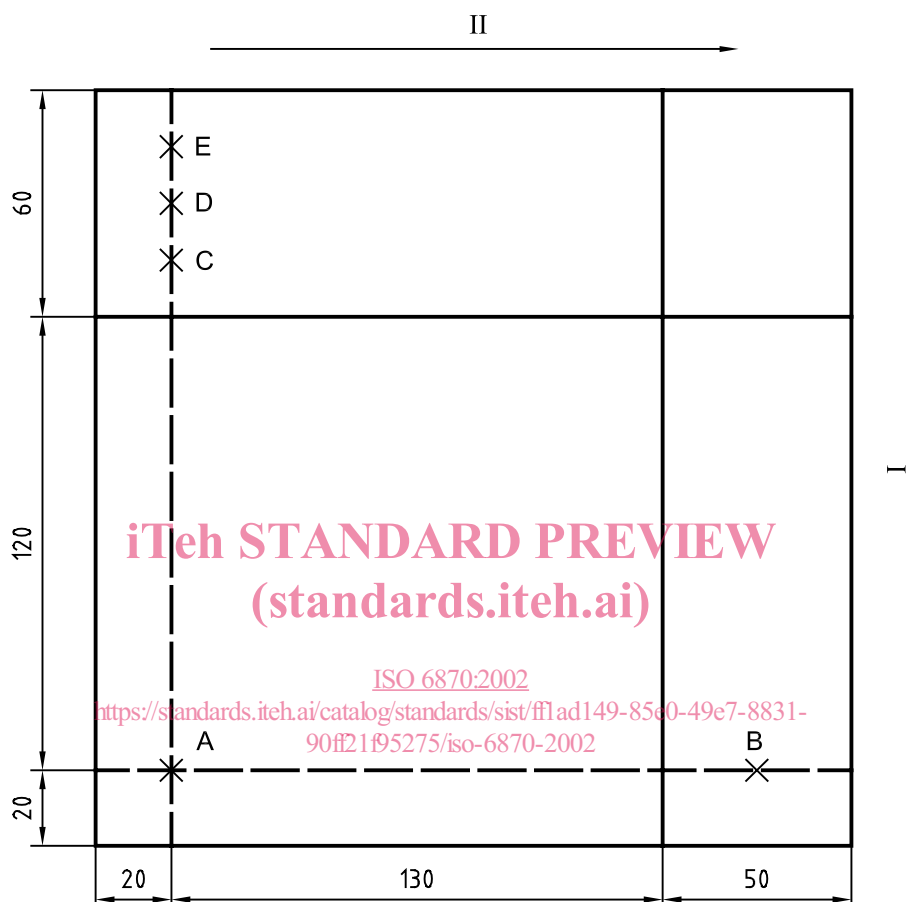


Figure 1 — Application des solutions et développement des chromatogrammes

6.5.2 Développement (voir Figure 1)

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.

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

6.6.1 Généralités

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.

6.6.2 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 de benzène-acétonitrile (3.4) et répéter la chromatographie sur couche mince (6.5).

6.6.3 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.