
**Aliments des animaux — Détermination
des teneurs en monensine, narasine et
salinomycine — Méthode par
chromatographie liquide utilisant la
dérivatisation post-colonne**

*Animal feeding stuffs — Determination of monensin, narasin and
salinomycin contents — Liquid chromatographic method using post-
column derivatization*
iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14183:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15492469-214d-4ea4-b9e9-be3437e092f5/iso-14183-2005>



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 14183:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15492469-214d-4ea4-b9e9-be3437e092f5/iso-14183-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15492469-214d-4ea4-b9e9-be3437e092f5/iso-14183-2005>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2005

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 du 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.org
Web www.iso.org

Version française parue en 2008

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
1 Domaine d'application.....	1
2 Références normatives	1
3 Principe.....	1
4 Réactifs	1
5 Appareillage	5
6 Échantillonnage	6
7 Préparation de l'échantillon pour essai	6
8 Mode opératoire	6
8.1 Préparation de l'échantillon de contrôle qualité	6
8.2 Extraction	6
8.3 Analyse CLHP	7
8.4 Détermination.....	9
9 Confirmation CLHP.....	10
9.1 Généralités	10
9.2 Dérivation post-colonne à l'aide de DMAB.....	10
9.3 Extraction à l'hexane.....	10
10 Calculs des résultats.....	10
10.1 Généralités.....	10
10.2 Monensine.....	11
10.3 Salinomycine.....	12
10.4 Narasine.....	12
10.5 Interprétation des données de confirmation	14
11 Fidélité	14
11.1 Essai interlaboratoires	14
11.2 Répétabilité.....	15
11.3 Reproductibilité.....	15
11.4 Limite de quantification	16
12 Rapport d'essai.....	16
Annexe A (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires	17
Bibliographie	22

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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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 du présent document 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.

L'ISO 14183 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 14183:2005
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15492469-214d-4ea4-b9e9-be3437e092f5/iso-14183-2005>

Aliments des animaux — Détermination des teneurs en monensine, narasine et salinomycine — Méthode par chromatographie liquide utilisant la dérivation post-colonne

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination des teneurs en monensine, en narasine et en salinomycine dans les aliments pour animaux, les compléments (secs et liquides) et les prémélanges de minéraux, par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). La méthode ne s'applique pas aux prémélanges médicamenteux (produits pharmaceutiques) et ne permet pas de déterminer le lasalocide et la semduramicine.

La limite de quantification est respectivement d'environ 1 mg/kg, 2 mg/kg et 2 mg/kg pour la monensine, la salinomycine et la narasine. Une limite de quantification inférieure peut être atteinte mais cela est sujet à validation par l'utilisateur.

iTeh STANDARD PREVIEW

2 Références normatives (standards.iteh.ai)

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

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

3 Principe

Les ionophores monensine, narasine et salinomycine sont extraits à l'aide d'un mélange méthanol/eau (90 + 10) par agitation mécanique pendant 1 h, puis les extraits sont filtrés. Les ionophores sont déterminés par CLHP en phase inverse utilisant la dérivation post-colonne à l'aide de vanilline et détection à 520 nm. Les échantillons supérieurs à la limite de détection ainsi que les échantillons d'aliments médicamenteux contenant des ionophores inattendus suspects sont confirmés par une extraction à l'hexane ou par une dérivation post-colonne avec du diméthylaminobenzaldéhyde (DMAB).

4 Réactifs

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

4.1 Eau, qualité CLHP ou équivalente (par exemple eau purifiée Milli-Q).

4.2 Méthanol (CH₃OH), qualité CLHP.

4.3 Acide sulfurique (H₂SO₄), de 97 % à 98 %.

4.4 Acide acétique (CH₂CH₃CO₂H), glacial, de 97 % à 98 %.

- 4.5 **Hydrogénocarbonate de sodium** (NaHCO_3), pureté d'au moins 99 %.
- 4.6 **Vanilline** (4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde), pureté d'au moins 99 %.
- 4.7 **Diméthylaminobenzaldéhyde** (DMAB), pureté d'au moins 99 %.
- 4.8 **Hexane** [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$], distillé sur verre.
- 4.9 **Solvant d'extraction**, méthanol/eau (90 + 10).

Mélanger 1 800 ml de méthanol (4.2) et 200 ml d'eau (4.1) dans une fiole de 2 l. Bien mélanger.

4.10 Phases mobiles

4.10.1 Système de réaction post-colonne

Tout en remuant doucement, ajouter lentement à l'aide d'une pipette 20 ml d'acide sulfurique (4.3) à 950 ml de méthanol (4.2). Laisser refroidir, puis ajouter 30 g de vanilline (4.6) tout en remuant. Mettre à l'abri de la lumière. Renouveler chaque jour.

4.10.2 Colonne CLHP

Utiliser du méthanol (4.2)/de l'eau (4.1)/de l'acide acétique (4.4) (940/60/1). Filtrer sous vide à l'aide de l'équipement indiqué en 5.7.

4.11 Méthanol neutralisé

Ajouter 1,0 g d'hydrogénocarbonate de sodium (4.5) dans 4 l de méthanol (4.2). Bien mélanger et filtrer si nécessaire à l'aide d'un papier filtre de 11 μm (par exemple Whatman N° 1)¹⁾. Voir la Note en 4.13.

4.12 Étalons de référence

Le titre ou la composition est requis pour chaque lot d'étalons de référence.

4.12.1 Monensine sodium²⁾

4.12.2 Narasine²⁾

4.12.3 Sodium salinomycine³⁾

AVERTISSEMENT — Éviter toute inhalation et exposition aux substances étalons toxiques et leurs solutions. Travailler sous une hotte aspirante lors de la manipulation des solvants et des solutions. Porter des lunettes et des vêtements de protection.

4.13 Solutions mères étalons de ionophore, environ 0,50 mg/ml.

Peser exactement, à 0,1 mg près, 25 mg de chaque étalon (4.12.1 à 4.12.3) dans des fioles jaugées séparées de 50 ml. Dissoudre dans du méthanol neutralisé (4.11) et diluer au volume. Les renouveler tous les mois. Stocker au frais.

1) Exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

2) Disponible auprès des laboratoires Lilly Research, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, États-Unis.

3) Disponible auprès de la société AlphaPharma Inc., Animal Health Division, 1 Duggar Drive, Willow Island, WV, États-Unis 26134-97111, et Hoechst Roussel Vet, D-65926 Frankfurt am Main, Gebaude H 790, Allemagne.

Protéger toutes les solutions étalons de la lumière ou les préparer dans des fioles qui arrêtent les rayons actiniques.

NOTE L'exigence relative au méthanol neutralisé n'a pas été vérifiée pour la salinomycine. Elle n'est pas requise s'il s'agit uniquement d'une analyse de monensine mais elle est requise pour l'analyse de narasine.

4.13.1 Solution mère étalon de monensine

Préparer comme décrit en 4.13. Calculer la concentration de la solution mère étalon basée sur le composant principal, monensine A. Le composant secondaire, monensine B, élué juste avant la monensine A^[4] est déterminé dans les échantillons pour essai basés sur la monensine A. Utiliser la composition du composant identifiée sur la feuille de profil de l'étalon de référence:

$$\rho_M = \frac{0,5 S_M}{100}$$

où

0,5 est la concentration de la solution mère étalon (4.13), en milligrammes par millilitre, consignée à trois chiffres significatifs;

ρ_M est la concentration du composant donné de monensine A dans la solution mère étalon, en milligrammes par millilitre;

S_M est la proportion du composant donné de monensine A dans l'étalon de référence conformément à la feuille de profil, en pourcentage.

EXEMPLE Le lot d'étalon de référence RS0234 contient 93,71 % de monensine A sur une base «en l'état».

4.13.2 Solution mère étalon de salinomycine

Préparer comme décrit en 4.13. Déterminer la concentration à l'aide de la valeur de concentration de l'étalon de référence donnée par le fournisseur.

$$\rho_S = \frac{0,5 w}{1000}$$

où

ρ_S est la concentration de salinomycine dans la solution mère étalon, en milligrammes par millilitre;

w est la concentration de l'étalon de salinomycine donnée par le fournisseur, en microgrammes par milligramme.

EXEMPLE Pour le lot WS-19B, la concentration de l'étalon est égale à 986 µg/mg.

4.13.3 Solution mère étalon de narasine

Préparer comme décrit en 4.13. Calculer la concentration de la solution mère étalon basée sur le composant principal, narasine A. Les composants secondaires (narasine D et I) élués après la narasine A^[5] sont déterminés dans les échantillons pour essai basés sur la narasine A. Utiliser la composition du composant identifiée sur la feuille de profil de l'étalon de référence:

$$\rho_N = \frac{0,5 S_N}{100}$$

où

ρ_N est la concentration du composant de narasine A dans la solution mère étalon, en milligrammes par millilitre;

S_N est la proportion du composant donné de narasine A dans l'étalon de référence conformément à la feuille de profil, en pourcentage.

EXEMPLE Pour le lot d'étalon de référence RS0302, le pourcentage de chaque composant sur une base «en l'état» est:
 narasine A = 85,4 %,
 narasine D = 1,9 %,
 narasine I = 0,7 %.

4.14 Solution étalon intermédiaire mélangée, environ respectivement 20 µg/ml, 40 µg/ml et 40 µg/ml de monensine, salinomycine et narasine.

Transférer, à l'aide d'une pipette, respectivement 10,0 ml, 20,0 ml et 20,0 ml des solutions mères étalons de monensine, salinomycine et narasine (4.13) dans une fiole jaugée de 250 ml. Diluer au volume à l'aide de solvant d'extraction (4.9). Bien mélanger. Renouveler tous les mois.

4.15 Étalons mélangés pour CLHP

Préparer cinq solutions étalons mélangées pour CLHP en pipettant une partie aliquote de l'étalon intermédiaire mélangé (4.14) dans des fioles jaugées de 100 ml qui arrêtent les rayons actiniques et diluer au volume à l'aide du solvant d'extraction (4.9), tel que spécifié dans le Tableau 1. Bien mélanger. Renouveler tous les mois.

Tableau 1

Identification de l'étalon mélangé pour CLHP	Quantité d'étalon intermédiaire (4.14) ml	Concentration approximative d'étalon pour CLHP µg/ml		
		Monensine	Salinomycine	Narasine
A	1	0,4	0,4	0,4
B	5	2	2	2
C	10	4	4	4
D	25	10	10	10
E	50	20	20	20

4.16 Étalons uniques pour CLHP

4.16.1 Monensine, environ 5 µg/ml.

Pipetter exactement 1,0 ml de solution mère étalon de monensine (4.13.1) dans une fiole jaugée de 100 ml qui arrêtent les rayons actiniques. Diluer au volume à l'aide de solvant d'extraction (4.9). Bien mélanger. Renouveler tous les mois. Stocker au frais.

4.16.2 Salinomycine, environ 10 µg/ml.

Pipetter exactement 2,0 ml de solution mère étalon de salinomycine (4.13.2) dans une fiole jaugée de 100 ml qui arrêtent les rayons actiniques. Diluer au volume à l'aide de solvant d'extraction (4.9). Bien mélanger. Renouveler tous les mois. Stocker au frais.

4.16.3 Narasine, environ 10 µg/ml.

Pipetter exactement 2,0 ml de solution mère étalon de narasine (4.13.3) dans une fiole jaugée de 100 ml qui arrêtent les rayons actiniques. Diluer au volume à l'aide de solvant d'extraction (4.9). Bien mélanger. Renouveler tous les mois. Stocker au frais.

5 Appareillage

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

5.1 Système de CLHP constitué des éléments suivants:

5.1.1 Pompe, sans impulsions, avec un débit de 0,1 ml/min à 2,0 ml/min.

5.1.2 Système d'injection, manuel ou par échantillonneur automatique, muni d'une boucle permettant des injections de 100 µl.

5.1.3 Détecteur UV/VIS, avec longueur d'ondes variable, adapté aux mesurages à 520 nm et 592 nm.

5.1.4 Intégrateur ou système de données informatiques.

5.1.5 Réacteur post-colonne, avec une bobine de réaction de 1,5 ml à 2,0 ml, pour une utilisation à 98 °C.

La bobine peut être une bobine disponible dans le commerce ou une bobine fabriquée à l'aide de 7,5 m à 10 m de tube en acier inoxydable 316, de diamètre intérieur de 0,5 mm, enroulé dans un format compatible avec l'étuve du réacteur. Par exemple, enrouler la bobine dans une feuille d'aluminium de taille suffisante pour qu'elle s'adapte à l'étuve et fournisse un transfert de chaleur approprié à la bobine. Une bobine tricotée est préférable. Pour assurer un mélange efficace du réactif et de l'effluent de colonne, utiliser un té de mélange statique ou té vortex (et non un té normal) avant la bobine de réaction.

5.1.6 Pompe à réactif post-colonne, sans impulsions, avec un débit de 0,5 ml/min à 2,0 ml/min.

5.1.7 Colonne analytique.

NOTE Une colonne C₁₈, 5 µm, 25 × 0,46 cm, Nucleosil 120A, Partisil 5 ODS-3 ou Waters Nova Pak (4 µm) ou équivalent est considéré comme appropriée.⁴⁾

5.1.8 Précolonne C₁₈.

5.2 Évaporateur à azote, pour l'évaporation des solvants sous un courant d'azote.

5.3 Agitateur, rotatif ou manuel.

5.4 Balances: balance analytique d'une capacité d'au moins 10 g d'une précision de 0,1 mg et une autre balance d'une capacité d'au moins 100 g d'une précision de 0,01 g.

5.5 Fioles Erlenmeyer, de 125 ml, 250 ml et 500 ml de capacités, munies de bouchons en verre.

5.6 Papiers filtres, Whatman N° 41 (15 cm), Whatman N° 42 (15 cm) et Whatman N° 1 (15 cm) ou équivalent.⁴⁾

5.7 Système de filtration des solvants, tout appareil de filtration en verre, adapté aux filtres de 47 mm et aux filtres en nylon de 47 mm de diamètre, de taille de pores de 0,45 µm.

5.8 Système de filtration des échantillons, muni de filtre en nylon ou en PTFE de taille de pores de 0,45 µm.

5.9 Tamis, de dimension nominale d'ouvertures de 1 mm.

4) Ces produits sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

6 Échantillonnage

Il convient qu'un échantillon représentatif ait été envoyé au laboratoire. Il convient qu'il n'ait été ni endommagé ni modifié lors du transport ou de l'entreposage.

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

7 Préparation de l'échantillon pour essai

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

Broyer l'échantillon pour laboratoire (> 200 g) de façon qu'il passe à travers un tamis de dimension nominale d'ouvertures de 1 mm. Pour les échantillons de détection, broyer entièrement l'échantillon de laboratoire. Mélanger soigneusement.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon de contrôle qualité

L'utilisation d'échantillons de contrôle qualité et de graphiques de contrôle qualité est recommandée.

Dans chaque lot, inclure un échantillon dopé à environ 100 mg/kg, 50 mg/kg, 50 mg/kg (pour les niveaux de médicaments) ou à 4 mg/kg, 6 mg/kg et 6 mg/kg (pour les limites de détection) pour la monensine, la salinomycine et la narasine, respectivement.

EXEMPLE 1 4,0 ml de solution mère étalon de monensine ajoutés à 20 g d'échantillon donnent 100 mg/kg, et 2,0 ml de solution mère étalon de salinomycine et de solution mère étalon de narasine donnent 50 mg/kg. Tous les solutions mères étalons ont des concentrations à peu près équivalentes (0,50 mg/ml, voir 4.13).

EXEMPLE 2 3,0 ml de solution étalon intermédiaire mélangée (4.14) ajoutés à 20 g d'échantillon donnent 3 mg/kg de monensine et 6 mg/kg de salinomycine et de narasine.

La récupération acceptable pour les échantillons de niveau de médicaments (> 10 mg/kg) est comprise entre 95 % et 108 %. La récupération acceptable pour les échantillons de détection (< 10 mg/kg) est comprise entre 90 % et 110 %.

8.2 Extraction

8.2.1 Aliments et prémélanges secs contenant moins de 5 000 mg/kg

Peser exactement une prise d'essai de 20 g dans une fiole Erlenmeyer de 250 ml. Pour les prémélanges de minéraux, ajouter 5 g d'hydrogénocarbonate de sodium. Ajouter 100 ml de solvant d'extraction (4.9). Boucher la fiole et agiter énergiquement pendant 1 h sur l'agitateur (5.3).

8.2.2 Aliments et prémélanges secs contenant plus de 5 000 mg/kg

Peser exactement une prise d'essai de 5 g dans une fiole Erlenmeyer de 500 ml. Pour les prémélanges de minéraux, ajouter 2 g d'hydrogénocarbonate de sodium. Ajouter 200 ml de solvant d'extraction (4.9). Boucher la fiole et agiter énergiquement pendant 1 h sur l'agitateur (5.3).

8.2.3 Échantillons liquides

Homogénéiser l'échantillon liquide à l'aide d'un agitateur magnétique ou à hélices. Mesurer un échantillon liquide de 20 ml dans une éprouvette graduée de 25 ml tarée. Peser et transférer l'échantillon dans une fiole Erlenmeyer de 500 ml. Ajouter 180 ml de méthanol (4.2) (en utiliser une partie pour rincer l'éprouvette graduée). Boucher la fiole et agiter énergiquement pendant 1 h sur l'agitateur (5.3).

8.2.4 Extrait filtré

Filtrer les extraits à travers un papier filtre N°41 Whatman (5.6) dans une fiole Erlenmeyer de 125 ml.

Pour les extraits contenant un niveau élevé d'ionophores, diluer jusqu'à la concentration approximative de l'étalon D pour CLHP (4.15). La dilution requise, D , peut être calculée à l'aide de la formule suivante:

$$D = \frac{w_s}{\rho_{\text{std}}} \times \frac{m_t}{V_e}$$

où

w_s est le niveau cible d'échantillon, en milligrammes par kilogramme;

ρ_{std} est la concentration de l'étalon pour CLHP, en microgrammes par millilitre;

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

V_e est le volume du solvant d'extraction, en millilitres.

Filtrer l'extrait ci-dessus ou éluer à travers un filtre de 0,45 µm avant de procéder à l'analyse CLHP.

8.3 Analyse CLHP

ISO 14183:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15492469-214d-4ea4-b9e9-be3437e092f5/iso-14183-2005>

8.3.1 Conditions de la CLHP

a) Paramètres de séparation CLHP:

— colonne:	comme décrit en 5.1.7
— phase mobile:	comme décrit en 4.10.2
— débit:	0,7 ml/min
— longueur d'onde:	520 nm
— vitesse de déroulement du diagramme:	0,5 cm/min
— volume injecté:	100 µl
— précolonne:	comme défini en 5.1.8 (modifier ou reconditionner la précolonne fréquemment, notamment lors de l'analyse des échantillons de limite de détection)
— atténuation:	ajuster pour donner entre 50 % et 60 % de déviation maximale pour l'étalon B pour CLHP (4.15) pour un échantillon de niveau faible, et pour l'étalon D pour CLHP pour les échantillons contenant des niveaux de médicaments.