

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 85 (1994)

**Heft:** 4

**Artikel:** Détermination du cristal violet dans le poulet par chromatographie liquide à haute performance = Quantification of gentian violet in chicken tissue using high performance liquid chromatography

**Autor:** Dafflon, Oscar / Gobet, Hansjörg / Koch, Herbert

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-982768>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 08.02.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

## Détermination du cristal violet dans le poulet par chromatographie liquide à haute performance

Quantification of Gentian Violet in Chicken Tissue Using High Performance Liquid Chromatography

*Key words:* Gentiane violet, Oxydation, HPLC, VIS detection

Oscar Dafflon, Hansjörg Gobet et Herbert Koch  
Office vétérinaire fédéral, Liebefeld-Berne

### Introduction

Le Cristal violet (CV) est un colorant qui fait partie de la classe des triphénylméthanés (fig. 1). Le chlorure d'hexaméthyle pararosaline à cause de ses propriétés fongicides et antiparasitaires, est utilisé pour l'élevage de volaille. Chez le poulet, le CV est absorbé et métabolisé en grande partie sous forme de leuco cristal violet (LCV) dans le foie. Ce métabolite (LCV) est formé par la microflore intestinale, responsable de la réduction du CV en LCV (1).

Concernant la toxicité du CV, selon le «National Center for Toxicology Research», certains dérivés du triphénylméthane ont été reconnus cancérogènes (1).

En Suisse, le CV n'est à ce jour pas enregistré comme médicament vétérinaire pour les animaux de rente et par conséquent, les résidus de CV dans les produits carnés ne sont pas tolérés.

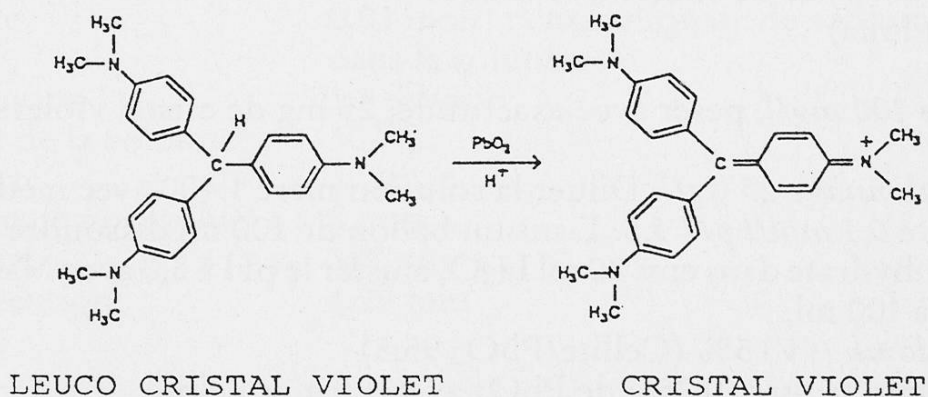


Fig. 1. Cristal violet

Dans le cadre de notre office, nous avons effectué des contrôles de qualité chez la volaille d'élevage, dans le tissu musculaire, nous n'avons que rarement mis en évidence des résidus de CV (tableau 2). Les méthodes actuelles proposées à l'analyste pour la détermination du CV dans les matrices biologiques sont la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec détecteurs électrochimique (1) ou spectrophotométrique (2, 3). Les techniques citées dans la littérature nécessitent un «Clean up» poussé et par conséquent nous compliquaient la méthode. L'objectif de ce travail est de proposer une méthode simple et fiable pour le dosage en routine. La méthode proposée nécessite une extraction du CV avec acétonitrile en milieu acide, un dégraissage avec hexane et finalement une oxydation de la LCV en CV avec le dioxyde de plomb. La séparation du CV s'effectue à l'aide d'une chromatographie à paire d'ions et d'une élution isocratique. La détection se fait dans le domaine du VIS à 588 nm. La limite de détection par rapport à la matrice est de 1,0 µg/kg.

## Partie expérimentale

### *Réactifs*

Acétonitrile, Chromasolv (Riedel-de-Haën 34851)  
Acide citrique monohydrate, p.a. (Merck 244)  
Dichlorométhane, Chromasolv (Riedel-de-Haën 34856)  
Dioxyde de plomb (IV), p.a. (Merck 7407)  
n-Hexane, Chromasolv (Riedel-de-Haën 34859)  
Méthanol, Chromasolv (Riedel-de-Haën 34860)  
Pentasulfonate de sodium monohydrate, p.a. (Fluka 76955)  
Acide perchlorique, p.a., 60% (Merck 518)  
Sulfate de sodium, p.a. (Merck 6649)  
Cristal violet (Merck 15940)  
Leuco cristal violet (Aldrich-Chemie 21, 921-5)  
Acide ortho-phosphorique, p.a. (Merck 573)  
Solution d'hydroxyde de sodium, 10 mol/l  
Cellite, p.a. (Fluka)

*Solution mère 100 mg/l*, peser avec exactitude: 25 mg de cristal violet dans 25,0 ml de méthanol.

*Solution d'étalonnage 25 µg/l*: Diluer la solution mère 1:400 avec méthanol.

*Tampon citrate 0,1 mol/l pH 5,0*: Dans un ballon de 100 ml dissoudre 2,1 g d'acide citrique monohydrate dans env. 80 ml H<sub>2</sub>O, ajuster le pH à 5,0 avec NaOH 10 mol/l et compléter à 100 ml.

*Dioxyde de plomb (IV) 5%* (Cellite/PbO<sub>2</sub> 95:5)

Dans un mortier, triturer 0,25 g de PbO<sub>2</sub> avec 5,0 g de cellite.

## *Appareillage*

Appareil HPLC, HP 1050, Hewlett-Packard  
DéTECTEUR, Spectra 100, UV/VIS, Spectra-Physics  
Intégrateur, HP 3396, Series III, Hewlett Packard  
Agitateur mécanique, Vortex-Génie-2-Mixer, Auer Bittmann Soulié  
Centrifuge, Hettich-Rotanta, tête de centrifuge, diam. 12 cm  
Évaporateur rotatif, Büchi  
Polytron, Kinematica

## *Mode opératoire*

### *Traitement de l'échantillon*

Dans un verre à centrifuger de 100 ml, on introduit 10 g de matrice homogénéisée, 40 ml d'acétonitrile acide (0,8 ml d'acide perchlorique 60% par litre d'acétonitrile) et 5 g de sulfate de sodium. Mixer pendant 5 min avec polytron, ajouter 10 ml de dichlorométhane et mixer pendant 1 min. Centrifuger à 4000 tours/min pendant 5 min. L'extrait est évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif sous une pression de 100 mbar, température du bain-marie: 40 °C. L'extrait est repris par 10 ml d'acétonitrile et 5 ml d'hexane, agiter vigoureusement et décanner l'hexane. Répéter une deuxième fois le dégraissage. Évaporer l'extrait à sec (conditions d'évaporation ci-dessus mentionnées), le reprendre avec 4 ml de méthanol.

A 1,0 ml de cette solution, on ajoute 0,1 ml de tampon citrate pH 5 et 10 mg de dioxyde de plomb. A l'aide d'un agitateur mécanique, agiter vigoureusement pendant 30 secondes. Centrifuger à 4000 tours/min et injecter immédiatement l'extrait sur la colonne.

### *Conditions chromatographiques*

Pré-colonne LiChrospher 100 RP-18, 4 x 4 mm (Merck 50957.0001)

Colonne LiChrospher 100 RP-18, 250 x 4 mm (Merck 50833.0001)

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Solution A                | Acétonitrile: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 mol/l<br>(93 + 7) |
| Phase-mobile              | 0,01 mol/l pentasulfonate de sodium<br>dans la solution A           |
| Débit de l'élution        | 1,5 ml/min  |
| Température de la colonne | 30 °C   |
| Volume injecté            | 30 µl   |
| Temps de chromatographie  | 8 min   |
| UV/VIS Signal             | 588 nm  |
| Temps de rétention        | 4,25 min  |

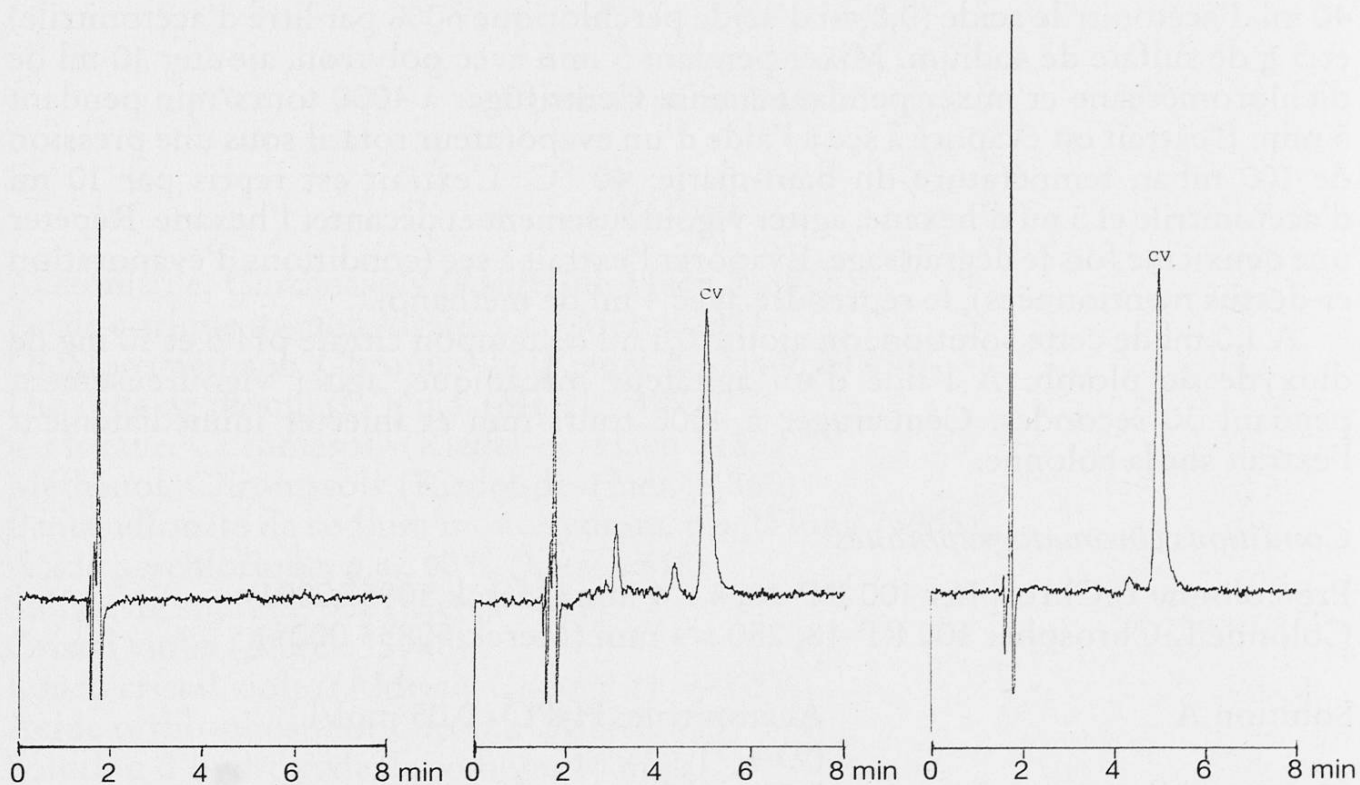


## Résultats et discussion

### *Oxydation du leuco cristal violet*

Dans des conditions très douces, à pH 5, le leuco cristal violet (LCV) (fig. 2a) est oxydé à l'aide du dioxyde de plomb en cristal violet (CV) (fig. 2b). La réaction d'oxydation a été optimisée en fonction de la concentration du  $\text{PbO}_2$  et du pH (fig. 3 et 4). Le rendement de la réaction approche les 100%. Le pH est déterminant lors de l'oxydation du LCV par le  $\text{PbO}_2$ .

A pH 2,5, à différents niveaux de concentration de  $\text{PbO}_2$ , on constate une décomposition du LCV et la formation de produits secondaires, pics 1 et 2 (fig. 4). Le mélange du  $\text{PbO}_2$  avec la cellite permet un dosage précis de l'oxydant et facilite le contrôle de la réaction d'oxydation.



*Fig. 2a)* Chromatogramme d'une solution standard de leuco cristal violet (25  $\mu\text{g/l}$ ), sans ajout de  $\text{PbO}_2$  (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

*Fig. 2b)* Chromatogramme d'une solution standard de leuco cristal violet (25  $\mu\text{g/l}$ ) à pH 5 et 10 mg du mélange cellite/ $\text{PbO}_2$  95:5 (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

*Fig. 2c)* Chromatogramme d'une solution standard de cristal violet (25  $\mu\text{g/l}$ ), sans ajout de  $\text{PbO}_2$  (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

Pour des raisons de sécurité des résultats et de commodités pour l'analyse de routine, l'oxydation s'effectue à pH 5, avec 10 mg du mélange Cellite/PbO<sub>2</sub> (95:5). Le temps de réaction a été fixé à 30 secondes avec une agitation mécanique (fig. 2b). La figure 5 présente le chromatogramme d'un échantillon négatif, avec et sans ajout de LCV.

Dans les conditions chromatographiques utilisées on observe avec un ajout de 25 µg/kg de LCV dans la matrice, le CV pic principal: Temps de rétention (Tr) = 5,20 min.

### *Choix de la chromatographie*

Le CV en milieu acide existe sous forme de cation immonium. La chromatographie à paire d'ions constitue donc une méthode de choix pour la séparation des résidus de CV.

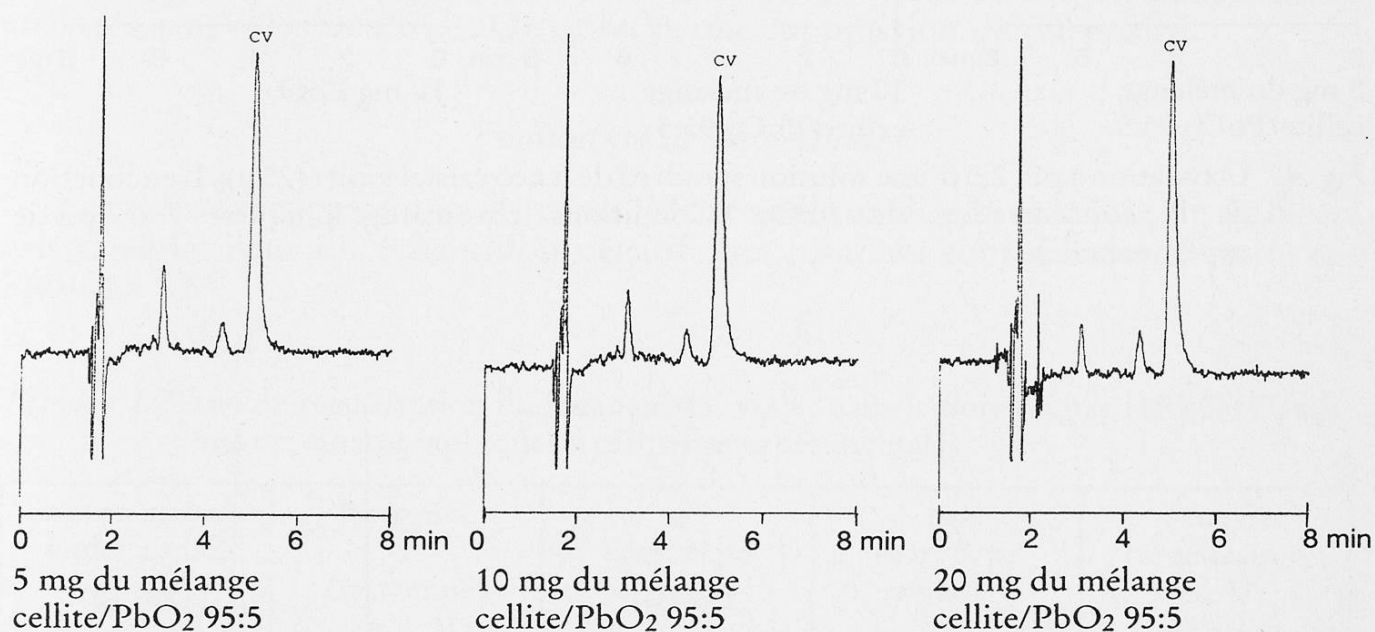


Fig. 3. Oxydation à pH 5,0 d'une solution standard de leuco cristal violet (25 µg/l) en fonction de la concentration du PbO<sub>2</sub> (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

### *Domaine de détection*

La détection dans le domaine du VIS à 588 nm augmente la spécificité de la méthode et supprime la grande partie des interférences provenant de la matrice.

### *Clean up*

La technique du «Clean up» de la matrice a l'avantage d'être simple et rapide. Elle facilite la mise en œuvre sans endommager la colonne.

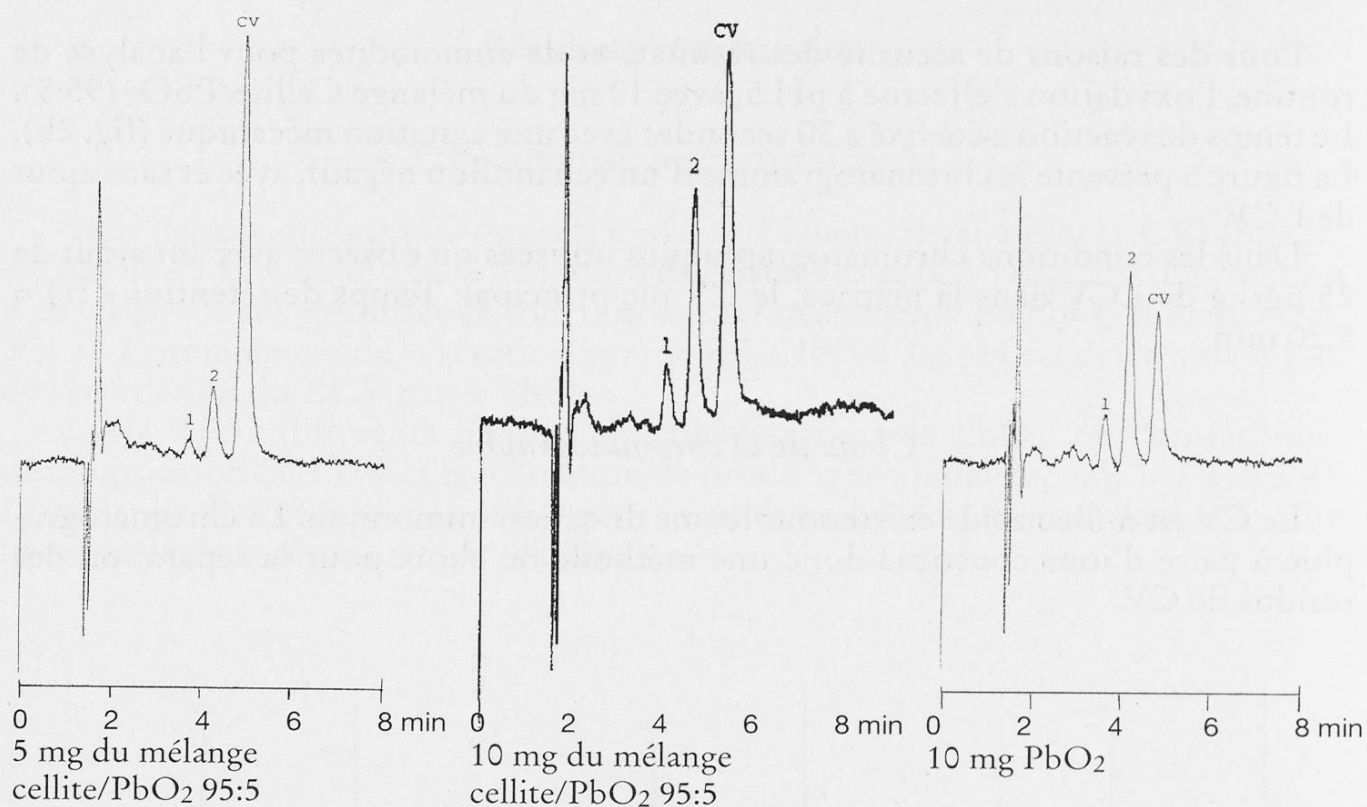


Fig. 4. Oxydation à pH 2,5 d'une solution standard de leuco cristal violet (25 µg/l) en fonction de la concentration du PbO<sub>2</sub> (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

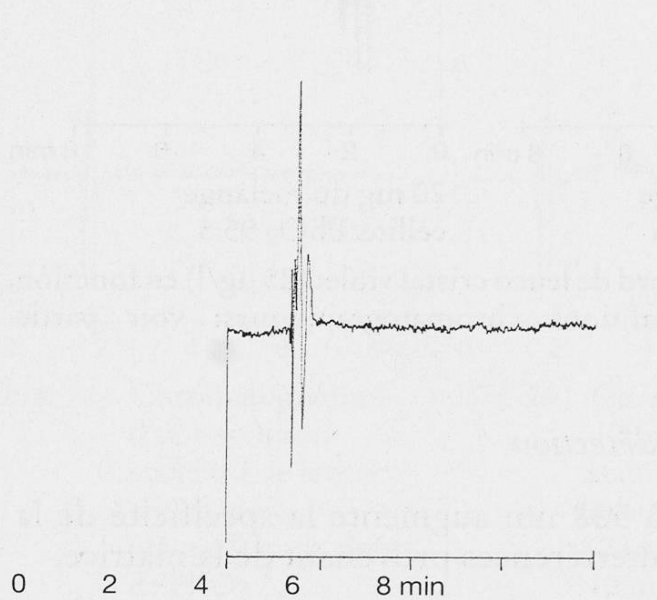


Fig. 5a) Chromatogramme d'un échantillon négatif sans ajout de leuco cristal violet (25 µg/kg) (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

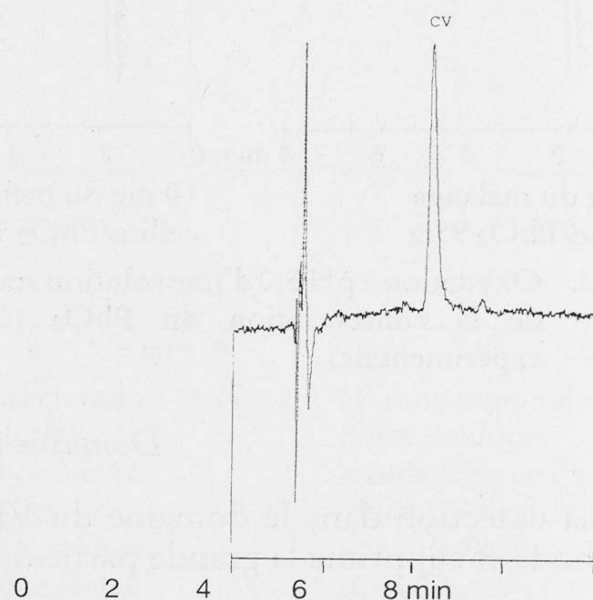


Fig. 5b) Chromatogramme d'un échantillon négatif avec un ajout de 25 µg/kg de leuco cristal violet (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)



## Calibrage

La calibration de l'intégrateur s'effectue au moyen d'une seule solution d'étalonnage (25 µg/l) après avoir contrôlé la linéarité de la réponse du détecteur pour les concentrations habituelles de travail, de 2,5 à 50 µg/l. Les échantillons contenant des concentrations élevées sont dilués dans le domaine de la courbe d'étalonnage.

### Quantification des résidus de cristal violet

La quantification des résidus de cristal violet se fait à partir d'une solution standard de CV (à conserver à l'abri de la lumière) (Fig. 2c).

### Cas d'échantillons positifs

Pour éviter de «faux positifs», les échantillons positifs sont systématiquement analysés sans ajout de PbO<sub>2</sub>. On observe une suppression du pic positif.

### Evaluation de la méthode

Le taux de récupération a été contrôlé par addition directe de 25 µg/kg de leuco cristal violet dans un échantillon négatif. Les résultats sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1. Taux de récupération du leuco cristal violet dans le poisson par HPLC (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

| Leuco cristal violet ajouté (µg/kg) | Retrouvé $\bar{x}$ (moyenne) ( $n = 5$ ) (µg/kg) | $s_r$ écart type (µg/kg) | $cv_r$ écart type relatif <sup>1</sup> | Taux de récupération en % de l'ajout |
|-------------------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------------------|
| 25                                  | 21,30  | 1,15                     | 5,40                                   | 85,2                                 |

<sup>1</sup>  $cv_r$  écart type relatif en pourcent de la moyenne

### Rapport d'examen 1992

Le tableau 2 résume les résultats d'analyse du cristal violet dans le poulet. 2,5% des échantillons analysés contiennent des résidus de CV.



Tableau 2. Rapport d'examen 1992 des résidus de cristal violet dans 159 échantillons de chair de poulet importé

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| Echantillons analysés            | 159             |
| Limite de détection <sup>1</sup> | 1,0 µg/kg       |
| Echantillons positifs            | 4 (> 1,0 µg/kg) |
| Valeur maximale trouvée          | 2,5 µg/kg       |

<sup>1</sup> par rapport à la matrice

### Résumé

Une méthode par HPLC est décrite pour le dosage des résidus de cristal violet dans la chair de poulet, avec détection spectrophotométrique dans le domaine du VIS à 588 nm. Le mode opératoire proposé est simple et rapide, il peut être utilisé pour l'analyse de routine. Les ajouts de leuco cristal violet (LCV) donnent un taux de récupération relativement élevé. La limite de détection (1 µg/kg) est excellente; par conséquent, cette méthode peut être utilisée pour l'analyse de traces de résidus de CV dans le poulet.

### Zusammenfassung

Diese HPLC-Methode beschreibt die Rückstandsbestimmung von Kristallviolett in Poulet. Die Messungen werden im visuellen Bereich bei 588 nm durchgeführt. Es handelt sich um ein unkompliziertes, schnelles Verfahren, welches in der Routineanalytik angewendet werden kann. Die mit 25 µg/kg Leuko-Kristallviolett versetzten Proben ergeben eine recht gute Wiederfindung und auch die Empfindlichkeit ist gut. Die Nachweisgrenze beträgt 1 µg/kg Poulet. Deshalb kann diese Methode auch in der Spurenanalytik angewendet werden.

### Summary

A HPLC method is described for the residue analysis of crystal violet in chicken. The detection is performed using visible spectroscopy at 588 nm. The proposed procedure is very simple, rapid and can be used for routine purposes. The results of spiked samples give recoveries with good precision at different levels of concentration of leuco cristal violet. The detection limit (1 µg/kg) is very low. Therefore, this method may be used for the analysis of trace residues of crystal violet in chicken.

### Bibliographie

1. Roybal, J. E., Munns, R. K., Hurlut, J. A. and Shimoda, W.: Determination of gentian violet, its demethylated metabolites, and leucogentian violet in chicken tissue by liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**, 940-946 (1990).

2. *Allen, J.L. and Meinertz, J.R.*: Post-column reaction for simultaneous analysis of chromatic and leuco forms of malachite green and crystal violet by high-performance liquid chromatography with photometric detection. *J. Chromatogr.* **536**, 217–222 (1991).
3. *Martinez, Elizabeth E. and Shimoda, W.*: Modified liquid chromatography method for determination of gentian violet in animal feed. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**, 742–745 (1989).

Oscar Dafflon  
Section chimie  
Office vétérinaire fédéral  
Schwarzenburgstrasse 161  
CH-3097 Liebefeld-Berne