
Norme internationale



5510

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

Aliments des animaux — Dosage de la lysine disponible

Animal feeding stuffs — Determination of available lysine

Première édition — 1984-11-15

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 5510:1984](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b3adeaa-1f1c-4bea-828e-a9003003b7c6/iso-5510-1984>

CDU 636.087.1 : 543.544 : 547.466.46

Réf. n° : ISO 5510-1984 (F)

Descripteurs : produit d'alimentation animale, essai, dosage, lysine.

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 5510 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

[ISO 5510:1984](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b3adeaa-1f1c-4bea-828e-a9003003b7c6/iso-5510-1984)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b3adeaa-1f1c-4bea-828e-a9003003b7c6/iso-5510-1984>

Aliments des animaux — Dosage de la lysine disponible

0 Introduction

La lysine des produits alimentaires est généralement considérée comme assimilable lorsque ses groupes aminés terminaux (ε aminés) ne sont pas engagés dans des liaisons. Cette fraction de lysine peut être déterminée parce que ces groupes se combinent avec le dinitro-2,4 fluorobenzène.

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de dosage de la lysine disponible dans les aliments des animaux contenant des protéines d'origine animale ou végétale.

Cependant, cette méthode comparée à une détermination biologique surestime souvent la quantité de lysine disponible et il est nécessaire d'en tenir compte dans l'interprétation des résultats.

2 Références

ISO 5983, *Aliments des animaux — Détermination de la teneur en azote en vue du calcul de la teneur en protéines brutes.*

ISO 6497, *Aliments des animaux — Échantillonnage.*¹⁾

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

3 Définition

lysine disponible: Quantité de lysine obtenue par différence entre la lysine totale et la lysine indisponible, déterminées dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale.

Elle est exprimée en pourcentage en masse du produit tel quel.

4 Principe

Hydrolyse chlorhydrique d'une prise d'essai broyée, puis séparation de la lysine totale par chromatographie sur colonne et détermination par spectrométrie à 570 nm.

Réaction d'une deuxième prise d'essai broyée avec une solution éthanolique de dinitro-2,4 fluorobenzène en milieu alcalin, puri-

fication puis hydrolyse chlorhydrique, séparation de la lysine indisponible par chromatographie sur colonne et détermination par spectrométrie à 570 nm.

5 Réactifs

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

5.1 Oxyde diéthylique, exempt de peroxydes.

5.2 Hydrogénocarbonate de sodium, solution à 80 g/l.

5.3 Dinitro-2,4 fluorobenzène (DNFB), solution éthanolique.

Dissoudre 0,15 ml de DNFB dans 12 ml d'éthanol à 95 % (V/V).

Préparer cette solution au moment de l'emploi.

5.4 Acide chlorhydrique, à environ 6 mol/l.

Mélanger 1 volume d'acide chlorhydrique ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml) et 1 volume d'eau.

5.5 Citrate de sodium, solution tampon de pH 2,2 environ.

Dissoudre successivement dans de l'eau

21 g d'acide citrique monohydraté;

8 g d'hydroxyde de sodium;

16 ml d'acide chlorhydrique ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml);

0,1 ml d'acide octanoïque (acide caprylique);

20 ml de thiodiglycol;

3 ml d'une solution aqueuse à 30 % (V/V) de dodécyléther polyéthoxylé à environ 23 molécules d'oxyéthylène.²⁾

1) Actuellement au stade de projet.

2) Un produit commercialisé sous le nom de BRIJ 35 convient. Cette information est donnée pour aider les utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie pas que l'ISO approuve ce produit.

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

5.6 Citrate de sodium, solution tampon de pH 5,28.

Dissoudre successivement dans de l'eau

- 24,5 g d'acide citrique monohydraté;
- 14 g d'hydroxyde de sodium;
- 6,8 ml d'acide chlorhydrique ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml);
- 0,1 ml d'acide octanoïque (acide caprylique);
- 3 ml d'une solution aqueuse à 30 % (V/V) de dodécyléther polyéthoxylé à environ 23 molécules d'oxyéthylène.¹⁾

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Ajuster le pH à $5,28 \pm 0,02$ à l'aide d'acide chlorhydrique ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml) ou d'une solution d'hydroxyde de sodium à 50 % (m/m).

5.7 Réactif à la ninhydrine.

5.7.1 Propionate de sodium, solution tampon, de pH 5,5 \pm 0,1.

Dissoudre 168 g d'hydroxyde de sodium dans environ 400 ml d'eau. Refroidir, puis ajouter, sous agitation, 498 ml d'acide propionique. Compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

5.7.2 Préparation du réactif.

Préparer le réactif à la ninhydrine sous atmosphère d'azote et à l'abri de la lumière. Dans un flacon de 2 l, introduire 1 litre d'éther monométhyle de l'éthylène glycol exempt de peroxydes, 1 litre de la solution tampon de propionate de sodium (5.7.1) et 40 g de ninhydrine. Agiter jusqu'à dissolution complète, puis ajouter 1,33 g de chlorure d'étain(II) dihydraté ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Agiter jusqu'à dissolution complète. (Voir la note.)

Conservé à 4 °C sous une légère pression en atmosphère d'azote et à l'abri de la lumière, ce réactif est stable durant 1 mois.

NOTE — S'il se forme un précipité de SnCl_2 , remplacer le chlorure d'étain(II) par 7,5 ml d'une solution de chlorure de titane(III) à 150 g/l, ou par de l'hydrindantine, à raison de 1,5 g pour 1 litre de réactif.

5.8 Lysine, solution étalon correspondant à 1 mmol de lysine base par litre.

Dissoudre 182,5 mg de monochlorhydrate de lysine dans 100 ml d'acide chlorhydrique à 0,1 mol/l. Prélever exactement 10 ml de cette solution et diluer à 100 ml avec la solution tampon de citrate de sodium de pH 2,2 (5.5).

1 ml de cette solution contient 1 μmol de lysine de base.

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

6.1 Broyeur, ayant les caractéristiques suivantes:

- a) construit en matériau n'absorbant pas l'humidité;
- b) facile à nettoyer et présentant un espace mort minimal;
- c) permettant un broyage rapide et uniforme, sans provoquer d'échauffement sensible et en évitant au maximum le contact avec l'air extérieur;
- d) pouvant être réglé de façon à obtenir des dimensions de particules correspondant aux indications fixées en 7.1.

6.2 Ballons, de 250 et 1 000 ml de capacités, à fond plat, col court muni d'un joint conique rodé, et réfrigérants à reflux adaptables.

6.3 Creuset, muni d'une plaque en verre fritté de série P 16 (dimensions des pores 10 à 16 μm).

6.4 Bain d'huile, réglable à une température permettant de maintenir une ébullition à reflux (120 à 130 °C).

6.5 Évaporateur rotatif.

6.6 Appareil pour analyse automatique des acides aminés, ou à défaut, système analytique manuel de chromatographie comprenant les éléments suivants:

- a) une colonne à chromatographie, d'environ 250 mm de hauteur et de 6 mm de diamètre intérieur, chemisée, thermostatée à 55 °C à l'aide d'un bain à circulation d'eau, et remplie jusqu'à 200 mm de résine échangeuse d'ions, cationique, fortement acide (groupement sulfonique) avec un taux de réticulation de 8 %, de granulométrie $13 \pm 2 \mu\text{m}$;²⁾
- b) une minipompe à piston permettant d'obtenir un débit de 50 ml/h;
- c) un collecteur de fractions;
- d) un bain d'eau bouillante;
- e) un spectromètre réglé à 570 nm, équipé de cuves de 10 mm d'épaisseur.

6.7 Pipettes graduées, de capacités 1; 5 et 10 ml.

6.8 Fioles jaugées, de capacités 10; 20 et 100 ml.

6.9 Balance analytique.

1) Un produit commercialisé sous le nom de BRIJ 35 convient. Cette information est donnée pour aider les utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie pas que l'ISO approuve ce produit.

2) Un produit commercialisé sous le nom d'Aminex A5 convient. Cette information est donnée pour aider les utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie pas que l'ISO approuve ce produit.

7 Échantillonnage

Voir ISO 6497.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Broyer 5 à 10 g de l'échantillon pour laboratoire jusqu'à obtention de particules passant complètement à travers un tamis de 315 μm d'ouverture de maille.

NOTE — L'ouverture de maille spécifiée est inférieure à celle préconisée dans l'ISO 6498, afin d'assurer un contact maximal avec le DNFB.

8.2 Prises d'essai

Peser, à 1 mg près, et introduire respectivement dans les deux ballons (6.2) deux prises d'essai correspondant chacune à environ 100 mg de protéines brutes. (Pour la détermination de la teneur en protéines, voir ISO 5983.)

8.3 Lysine totale

8.3.1 Hydrolyse chlorhydrique

Dans le ballon de 1 000 ml (voir 8.2), introduire 500 ml d'acide chlorhydrique à 6 mol/l (5.4). Adapter un réfrigérant à reflux et porter le ballon au bain d'huile (6.4) préalablement chauffé entre 120 et 130 °C.

Après 24 h d'ébullition douce, refroidir le ballon et filtrer le contenu sur le creuset (6.3). Évaporer le filtrat à une température inférieure à 40 °C, à l'aide de l'évaporateur rotatif (6.5). Reprendre à l'eau le résidu ainsi obtenu et évaporer. Répéter cette opération jusqu'à élimination de la majeure partie de l'acide chlorhydrique; en général quatre rinçages avec 30 ml d'eau sont suffisants.

Dissoudre le résidu dans la solution tampon de citrate de sodium de pH 2,2 (5.5) et transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml (6.8). Compléter au trait repère avec la solution tampon de citrate de sodium de pH 2,2 (5.5). Filtrer sur papier filtre plissé.

8.3.2 Préparation finale de la colonne et adsorption de l'hydrolysat

Relier la minipompe de l'appareil (6.6) à un réservoir contenant la solution tampon de citrate de sodium de pH 5,28 (5.6), puis la régler pour obtenir un débit de 50 ml/h. La raccorder à la colonne de résine préalablement chauffée à 55 °C et faire passer la solution tampon de citrate de sodium de pH 5,28 (5.6) à travers la colonne durant 20 min afin d'établir l'équilibre. Déconnecter la pompe. Éliminer la plus grande partie du liquide au-dessus de la résine en évitant que la surface de celle-ci ne se dessèche.

Prélever, à l'aide d'une pipette (6.7), 0,5 ml d'hydrolysat (ou 1 ml si l'on utilise le système manuel), le déposer sur la colonne et le faire à travers la résine à l'aide d'une légère pression d'azote. Rincer les parois de la colonne avec 0,5 ml de la solution tampon de citrate de sodium de pH 5,28 (5.6) et la faire passer dans la résine. Remplir la colonne jusqu'au sommet avec la solution tampon de citrate de sodium de pH 5,28 (5.6) et la relier à la minipompe.

8.3.3 Détermination

8.3.3.1 À l'aide de l'analyseur automatique

Mettre en marche l'analyseur automatique. Étalonner l'appareil avec 0,25 μmol de lysine (0,25 ml de la solution étalon de lysine (5.8)) ou la quantité spécifiée par les instructions du fabricant en procédant comme décrit en 8.3.2.

8.3.3.2 À l'aide du système manuel

8.3.3.2.1 Localisation de la lysine

La zone d'éluée de la lysine doit être vérifiée en utilisant une solution de lysine de concentration connue, par exemple la solution (5.8) à 1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. À cette fin, éliminer 25 à 30 ml d'éluat, puis recueillir des fractions de 1 ml dans des tubes à essais jusqu'à la 50^e fraction comptée à partir du début de l'éluée. Ajouter dans chaque fraction, entre la 30^e et la 50^e, 1 ml de réactif à la ninhydrine (5.7). Homogénéiser, porter les mélanges au bain d'eau bouillante et les y laisser pendant 15 min. Refroidir. Diluer en ajoutant 10 ml de solution tampon de citrate de sodium de pH 5,28 (5.6). Homogénéiser et mesurer l'absorbance à 570 nm, à l'aide du spectromètre, par rapport à la solution tampon de citrate de sodium de pH 5,28 (5.6).

NOTE — Dans les conditions décrites, à titre indicatif, la lysine est généralement éluée entre la 39^e et la 45^e fraction.

8.3.3.2.2 Détermination

Si la lysine est éluée entre la 39^e et la 45^e fraction, éliminer les 38 premiers millilitres d'éluat puis recueillir et réunir les fractions qui correspondent au pic de la lysine (nos 39 à 45) et les évaporer à l'aide de l'évaporateur rotatif (6.5).

NOTE — Après avoir récupéré les fractions contenant la lysine, laisser passer environ 200 ml de solution tampon à travers la colonne afin d'éliminer tous les composés indésirables restants.

Reprendre le résidu avec 5 ml de la solution tampon de citrate de sodium de pH 5,28 (5.6) et ajouter 5 ml de réactif à la ninhydrine (5.7). Homogénéiser, porter le mélange au bain d'eau bouillante et l'y laisser séjourner durant 15 min. Refroidir. Diluer le mélange avec la solution tampon de citrate de sodium de pH 5,28 (5.6) de façon que la concentration en lysine de la solution d'essai soit voisine de 0,02 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. (Soit V_1 le volume de la solution d'essai ainsi obtenue.)

Mesurer l'absorbance à l'aide du spectromètre réglé à 570 nm, par rapport à un mélange volume à volume de la solution tampon de citrate de sodium (5.6) et de réactif à la ninhydrine (5.7), ayant séjourné 15 min au bain d'eau bouillante, et porté au volume V_1 après refroidissement.

8.3.3.2.3 Étalonage du spectromètre

Prélever exactement 5 ml de la solution étalon de lysine (5.8). Ajouter 5 ml de réactif à la ninhydrine (5.7). Homogénéiser, porter le mélange au bain d'eau bouillante et l'y laisser séjourner durant 15 min. Refroidir et diluer à 100 ml avec la solution tampon de citrate de sodium de pH 5,28 (5.6).

Mesurer l'absorbance à l'aide du spectromètre dans les mêmes conditions qu'en 8.3.3.2.2.

8.4 Lysine indisponible

8.4.1 Réaction de dinitrophénylation

Dans le ballon de 250 ml (voir 8.2), ajouter, à l'aide d'une pipette (6.7), 8 ml de la solution d'hydrogénocarbonate de sodium (5.2). Laisser en contact environ 10 min, en agitant de temps à autre. Ajouter ensuite la solution de DNFB (5.3), boucher, agiter en évitant que des particules adhèrent à la paroi du ballon, et laisser le mélange durant une nuit à la température ambiante et à l'obscurité.

8.4.2 Purification

Évaporer à sec à une température inférieure à 40 °C, à l'aide de l'évaporateur rotatif (6.5). Ajouter 75 ml d'oxyde diéthylique (5.1) dans le ballon, agiter et laisser décanter. Éliminer la majeure partie de l'oxyde diéthylique en faisant attention de ne pas entraîner de particules solides. Répéter ces opérations deux fois avec, à chaque fois, 50 ml d'oxyde diéthylique. Éliminer par chauffage les traces d'oxyde diéthylique à l'aide de l'évaporateur rotatif.

8.4.3 Hydrolyse chlorhydrique

Introduire dans le ballon 150 ml d'acide chlorhydrique (5.4) et procéder comme décrit en 8.3.1 mais en transvasant quantitativement le résidu dissous dans la solution tampon de citrate de sodium de pH 2,2 (5.5), dans une fiole jaugée de 20 ml (6.8) (ou de 10 ml si l'on utilise le système manuel).

8.4.4 Dépôt de l'hydrolysate et détermination

Procéder ensuite comme décrit en 8.3.2 et 8.3.3.

Dans le cas du système manuel, la lecture spectrométrique finale peut être effectuée en amenant le volume du mélange lysine + réactif à 20 ml avec la solution tampon de citrate de sodium de pH 5,28 (5.6). (Soit V_2 le volume de la solution d'essai ainsi obtenue.)

8.5 Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour l'essai à partir de deux paires de prises d'essai différentes.

9 Expression des résultats

9.1 Mode de calcul et formules

9.1.1 Lysine totale

9.1.1.1 Détermination à l'aide de l'analyseur automatique

La lysine totale, w_1 , exprimée en pourcentage en masse, est égale à

$$\frac{0,365}{m_1 \times V_0} \times \frac{S_1}{S_0}$$

où

S_0 est l'aire du pic correspondant à 0,25 μ mol de lysine;

S_1 est l'aire du pic correspondant à la lysine totale, déterminée en 8.3.3.1;

m_1 est la masse, en grammes, de la prise d'essai introduite dans le premier ballon;

V_0 est le volume, en millilitres, d'hydrolysate déposé sur la colonne (généralement, $V_0 = 0,5$ ml).

9.1.1.2 Détermination à l'aide du système manuel

La lysine totale, w_1 , exprimée en pourcentage en masse, est égale à

$$\frac{V_1 \times 0,073}{m_1 \times V_0} \times \frac{A_1}{A_0}$$

où

A_0 est l'absorbance de la solution étalon de lysine déterminée en 8.3.3.2.3;

A_1 est l'absorbance déterminée en 8.3.3.2.2;

V_0 est le volume, en millilitres, d'hydrolysate déposé sur la colonne (généralement, $V_0 = 1$ ml);

V_1 est le volume, en millilitres, de la solution d'essai;

m_1 est la masse, en grammes, de la prise d'essai introduite dans le premier ballon.

9.1.2 Lysine indisponible

9.1.2.1 Détermination à l'aide de l'analyseur automatique

La lysine indisponible, w_2 , exprimée en pourcentage en masse, est égale à

$$\frac{0,073}{m_2 \times V_0} \times \frac{S_2}{S_0}$$

où

S_0 est l'aire du pic correspondant à 0,25 μ mol de lysine;

S_2 est l'aire du pic correspondant à la lysine indisponible, déterminée en 8.4.4;

m_2 est la masse, en grammes, de la prise d'essai introduite dans le deuxième ballon;

V_0 est le volume, en millilitres, d'hydrolysate déposé sur la colonne (généralement, $V_0 = 0,5$ ml).

9.1.2.2 Détermination à l'aide du système manuel

La lysine indisponible, w_2 , exprimée en pourcentage en masse, est égale à

$$\frac{V_2 \times 0,0073}{m_2 \times V_0} \times \frac{A_2}{A_0}$$

où

A_0 est l'absorbance de la solution étalon de lysine déterminée en 8.3.3.2.3;

A_2 est l'absorbance déterminée en 8.4.4;

V_0 est le volume, en millilitres, d'hydrolysate déposé sur la colonne (généralement, $V_0 = 1$ ml);

V_2 est le volume, en millilitres, de la solution d'essai (généralement, $V_2 = 20$ ml);

m_2 est la masse, en grammes, de la prise d'essai introduite dans le deuxième ballon.

9.1.3 Lysine disponible

La lysine disponible, w_3 , exprimée en pourcentage en masse par rapport au produit tel quel, est égale à

$$w_1 - w_2$$

où

w_1 est la lysine totale (voir 9.1.1);

w_2 est la lysine indisponible (voir 9.1.2).

NOTE — La lysine disponible peut être exprimée en pourcentage de la lysine totale, selon la formule

$$\frac{(w_1 - w_2)}{w_1} \times 100$$

9.2 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations, effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas dépasser 10 % de la valeur moyenne des résultats obtenus.

10 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.

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 5510:1984

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b3adeaa-1f1c-4bea-828e-a9003003b7c6/iso-5510-1984>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 5510:1984

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b3adeaa-1f1c-4bea-828e-a9003003b7c6/iso-5510-1984>