
**Aliments des animaux — Détermination de
la teneur en vitamine A — Méthode par
chromatographie liquide à haute
performance**

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 14565:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9-cde53050174e/iso-14565-2000)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9-
cde53050174e/iso-14565-2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9-cde53050174e/iso-14565-2000)



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 14565:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9-cde53050174e/iso-14565-2000)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9-cde53050174e/iso-14565-2000>

© ISO 2000

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.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 14565 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

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

[ISO 14565:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9-cde53050174e/iso-14565-2000)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9-cde53050174e/iso-14565-2000>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14565:2000

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9-cde53050174e/iso-14565-2000>

Aliments des animaux — Détermination de la teneur en vitamine A — Méthode par chromatographie liquide à haute performance

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination de la teneur en vitamine A totale (rétinol) des aliments pour animaux d'élevage et animaux de compagnie par chromatographie liquide à haute performance. La teneur en vitamine A est la teneur en alcool de rétinyle tout-*trans* et *cis*-isomères déterminée par la méthode décrite dans la présente Norme internationale, exprimée en Unités internationales par kilogramme (UI/kg).

2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

[ISO 14565:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9-)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9->

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*.

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

3 Terme et définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, le terme et la définition suivants s'appliquent.

3.1

teneur en vitamine A

teneur en alcool de rétinyle tout-*trans* et *cis*-isomères, déterminée selon la présente Norme internationale

NOTE La teneur en vitamine A est exprimée en Unités internationales par kilogramme (UI/kg); 1 UI de vitamine A est égale à 0,300 µg de rétinol tout-*trans*.

4 Principe

L'échantillon est saponifié avec une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique et la vitamine A est extraite dans de l'éther de pétrole. L'éther de pétrole est éliminé par évaporation et le résidu dissous dans du propane-2-ol. La concentration en vitamine A de l'extrait de propane-2-ol est déterminée par chromatographie liquide en phase inverse dans des conditions donnant un seul pic pour tous les isomères de la vitamine A.

5 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

5.1 Eau, conforme au moins à la qualité 3, selon l'ISO 3696.

5.2 Solution d'hydroxyde de potassium (KOH).

Dissoudre 500 g d'hydroxyde de potassium dans de l'eau (5.1) et diluer à 1 litre.

5.3 Éthanol, $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 95 \%$ (en volume), ou alcool dénaturé industriel équivalent.

5.4 Propane-2-ol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$).

5.5 Éther de pétrole, ayant un point d'ébullition compris entre 40 °C et 60 °C.

Le résidu d'évaporation doit être inférieur à 20 mg/l.

5.6 Substances étalons de vitamine A

5.6.1 Acétate de rétinyle tout-*trans*, acétate de vitamine A ($\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$), 328,5 g/mol, ayant une pureté d'au moins 90 %.

5.6.2 Rétinol tout-*trans*, alcool de vitamine A ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$), 286,5 g/mol, ayant une pureté d'au moins 90 %.

5.7 Méthanol, qualité CLHP.

5.8 Éluant pour chromatographie liquide.

Mélanger le méthanol (5.7) et l'eau (5.1) en proportion 770+30 (en volume).

Si nécessaire, filtrer à travers une membrane de filtration (6.6).

5.9 Sulfate de sodium (Na_2SO_4), anhydre.

5.10 Solution d'ascorbate de sodium, $\rho = 100$ g/l.

5.11 Gaz inerte, par exemple de l'azote.

6 Appareillage

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

6.1 Chromatographe liquide à haute performance, se composant des éléments suivants.

6.1.1 Pompe, réglée pour fournir un débit constant de 1 ml/min.

6.1.2 Système d'injection CLHP.

6.1.3 Colonne, de 250 mm de longueur, 4,6 mm de diamètre interne, garnie d'une phase stationnaire se composant de groupes octadécyles (C_{18}) greffés à la silice.

Une colonne avec au moins 4 000 plateaux théoriques et une valeur de k' de 0,6, tous deux par rapport au rétinol tout-*trans*, a été jugée satisfaisante. Les dimensions des particules doivent être comprises entre 5 μm et 10 μm . D'autres systèmes peuvent être utilisés à condition de permettre une séparation satisfaisante de la vitamine A des autres coextraits.

6.1.4 Détecteur, permettant de mesurer le rayonnement ultraviolet à 325 nm et équipé d'un intégrateur/système de traitement des données.

6.2 Spectromètre UV (ou dans le visible), capable de mesurer l'absorbance aux longueurs d'ondes définies en 9.6, équipé de cellules en quartz ayant un parcours optique de 10 mm.

6.3 Bain-marie bouillant.

6.4 Évaporateur rotatif sous vide, avec bain d'eau à 40 °C.

6.5 Appareil d'extraction (voir Figure 1) se composant des éléments suivants:

- éprouvette d'une capacité de 1 litre à col en verre rodé avec bouchon;
- joint en verre rodé, adapté à l'éprouvette et équipé d'un tube réglable passant par le centre;
- branche latérale.

Il convient que l'extrémité inférieure du tube réglable soit en forme de U et que l'autre extrémité comporte un gicleur pour permettre de transférer la phase liquide supérieure de l'éprouvette dans une ampoule à décanter de 1 litre.

L'appareillage présenté à la Figure 1 peut être remplacé par tout autre appareil d'extraction, tel que des fioles coniques et des ampoules à décanter, à condition que la récupération de la vitamine A soit satisfaisante.

6.6 Membrane de filtration, de 0,45 µm d'ouverture de pores, pour la filtration de la phase mobile (5.8) et des solutions d'échantillons pour essai.

iTech STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

7 Échantillonnage

ISO 14565:2000

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8cc4b48f-3d3c-458c-9ec9-7d4f2050174e/iso-14565-2000>

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

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif et n'ayant pas été endommagé ou modifié pendant le transport ou le stockage.

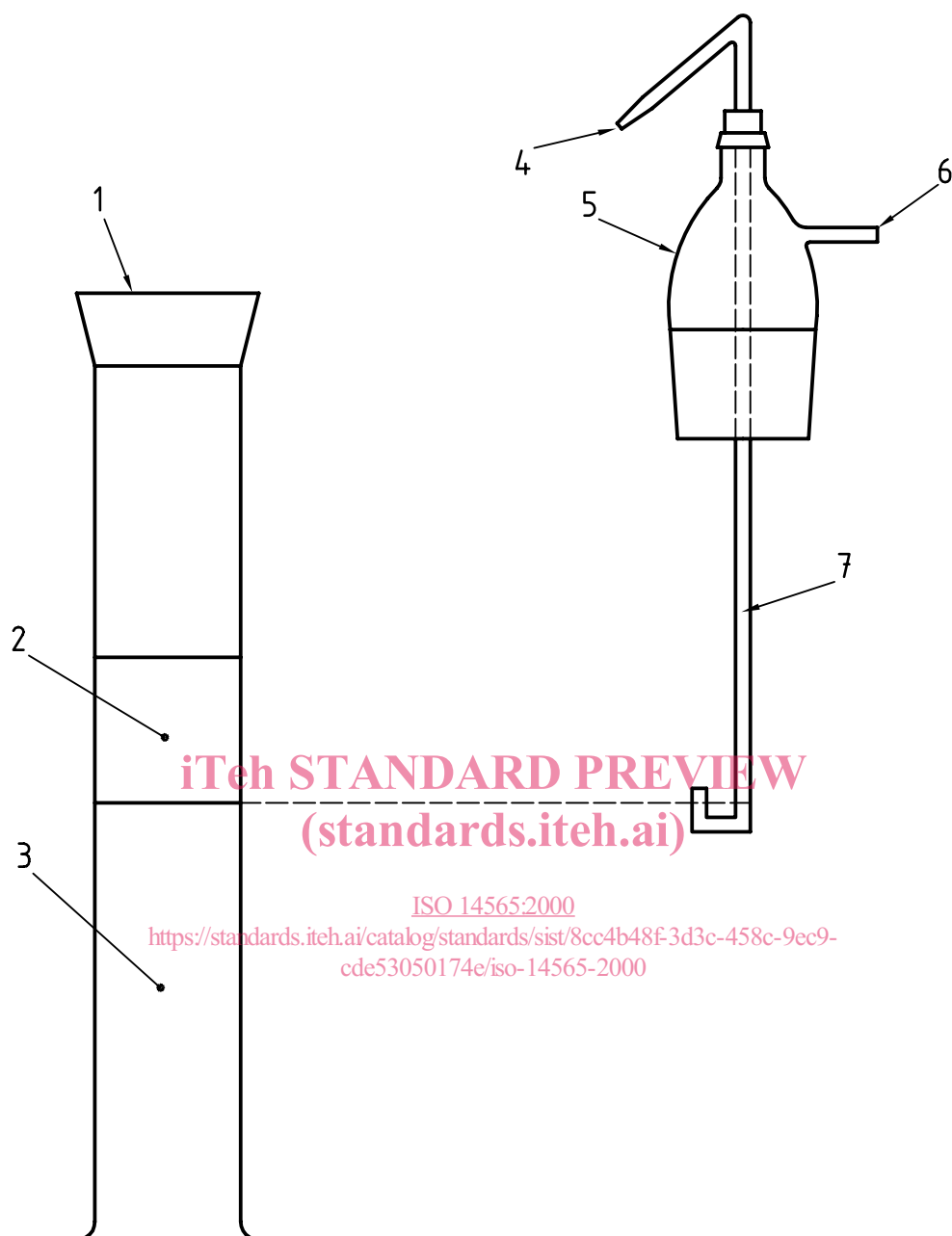
Stocker l'échantillon de façon à empêcher toute détérioration ou modification de sa composition.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

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

Juste avant de commencer l'analyse, broyer une prise d'essai de l'échantillon pour laboratoire bien mélangé de manière qu'elle passe au travers d'un tamis de 1 mm d'ouverture de mailles. Mélanger soigneusement.

Homogénéiser les aliments en boîte pour animaux de compagnie. Hacher les aliments semi-humides au moyen d'un hachoir ayant une grille munie d'ouvertures de 4 mm.



Légende

- 1 Éprouvette de capacité de 1 litre à col en verre rodé
- 2 Couche d'éther de pétrole
- 3 Couche aqueuse + aliment saponifié
- 4 Gicleur
- 5 Flacon, de capacité de 1 litre, avec joint en verre rodé
- 6 Branche latérale
- 7 Tube réglable

Figure 1 — Exemple d'appareil d'extraction

9 Mode opératoire

9.1 Généralités

Du fait de la sensibilité de la vitamine A aux rayons ultraviolets et à l'air, effectuer toutes les opérations à l'abri de la lumière du jour ou d'une forte lumière artificielle et aussi rapidement que possible sans toutefois compromettre l'exactitude des opérations. Utiliser de la verrerie ambrée chaque fois que possible. Terminer chaque essai dans la journée. Effectuer simultanément la saponification et l'extraction de l'étalon d'acétate de rétinyle tout-*trans* et des échantillons d'aliments.

9.2 Saponification

Peser, à 0,1 g près, 50 g environ d'échantillon pour essai préparé (voir article 8) et le transvaser dans une fiole conique de 1 litre.

Ajouter 200 ml d'éthanol (5.3). Agiter le contenu de la fiole en tournant afin de disperser l'échantillon.

Ajouter 2 ml d'ascorbate de sodium (5.10) et 50 ml de solution d'hydroxyde de potassium (5.2) et mélanger en tournant.

Adapter un réfrigérant à reflux sur la fiole et immerger cette dernière dans le bain-marie bouillant (6.3).

Laisser bouillir à reflux le contenu de la fiole pendant 60 min en tournant de temps en temps.

Refroidir la fiole à température ambiante aussi rapidement que possible sous un courant d'eau froide.

9.3 Extraction de la vitamine A (rétinol)

Transvaser le contenu de la fiole dans l'éprouvette d'extraction (voir 6.5).

Rincer la fiole avec deux fractions de 25 ml d'éthanol ou d'alcool dénaturé industriel (5.3) et transvaser les rinçages dans l'éprouvette.

Répéter le rinçage de la fiole avec deux fractions de 125 ml d'éther de pétrole (5.5) et une fraction de 250 ml d'eau (5.1), en transvasant chaque fois les rinçages dans l'éprouvette.

Boucher l'éprouvette et bien l'agiter pendant 1 min, tout en libérant la pression de temps en temps.

Refroidir l'éprouvette sous un courant d'eau froide tout en attendant la séparation des deux phases liquides avant de retirer le bouchon.

Une fois les phases séparées, retirer le bouchon, laver ses parois avec quelques millilitres d'éther de pétrole (5.5) et insérer le tube réglable (voir 6.5), en positionnant l'extrémité inférieure ouverte de façon à la placer juste au-dessus du niveau de l'interface.

Appliquer une légère pression de gaz inerte (5.11) à la tubulure latérale et transvaser la phase supérieure d'éther de pétrole dans une ampoule à décanter de 1 litre (voir 6.5).

Ajouter 125 ml d'éther de pétrole (5.5) dans l'éprouvette, la boucher puis bien l'agiter pendant 1 min.

Laisser décanter et, au moyen du tube réglable (voir 6.5), transvaser la phase supérieure dans l'ampoule à décanter comme précédemment.

Ajouter de nouveau 125 ml d'éther de pétrole (5.5) dans l'éprouvette, la boucher puis bien l'agiter pendant 1 min.

Laisser décanter de nouveau et transvaser la phase supérieure dans l'ampoule à décanter en utilisant le tube réglable comme précédemment.