
**Aliments des animaux — Dosage de la
teneur en acides aminés**

Animal feeding stuffs — Determination of amino acids content

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 13903:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf232efb-deab-4086-baa9-a7a8a8d4d0ed/iso-13903-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf232efb-deab-4086-baa9-a7a8a8d4d0ed/iso-13903-2005>



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 13903:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf232efb-deab-4086-baa9-a7a8a8d4d0ed/iso-13903-2005>



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 Principe	2
2.1 Acides aminés libres	2
2.2 Acides aminés totaux	2
3 Réactifs et matériaux	2
4 Appareillage	4
5 Mode opératoire	5
5.1 Préparation de l'échantillon d'essai	5
5.2 Dosage des acides aminés libres dans les aliments des animaux et prémélanges	5
5.3 Dosage des acides aminés totaux	5
5.4 Chromatographie	7
6 Expression des résultats	8
7 Fidélité	9
7.1 Essais interlaboratoires	9
7.2 Répétabilité	9
7.3 Reproductibilité	9
8 Utilisation de matériaux de référence	9
9 Observations sur la méthode	9
Annexe A (informative) Résultats des essais interlaboratoires	10
Annexe B (informative) Exemples de chromatogrammes	15
Bibliographie	17

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 13903 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

L'ISO 13903 est fondée sur la directive 98/64/CE de septembre 1998 de la Commission^[1].

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf232efb-deab-4086-baa9-a7a8a8d4d0ed/iso-13903-2005>

Aliments des animaux — Dosage de la teneur en acides aminés

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit le dosage des acides aminés libres (de synthèse et naturels) et totaux (dans des peptides et libres) dans les aliments des animaux, au moyen d'un analyseur d'acides aminés ou d'un équipement de chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Elle s'applique aux acides aminés suivants:

- la somme de la cystine et de la cystéine;
- la méthionine;
- la lysine;
- la thréonine;
- l'alanine;
- l'arginine;
- l'acide aspartique;
- l'acide glutamique;
- la glycine;
- l'histidine;
- l'isoleucine;
- la leucine;
- la phénylalanine;
- la proline;
- la sérine;
- la tyrosine;
- la valine.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 13903:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf232efb-deab-4086-baa9-a7a8a8d4d0ed/iso-13903-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf232efb-deab-4086-baa9-a7a8a8d4d0ed/iso-13903-2005>

Cette méthode ne distingue pas les sels d'acides aminés, pas plus qu'elle ne fait la différence entre les formes D et L des acides aminés. Elle n'est pas valable pour le dosage du tryptophane ou des hydroxy-analogues d'acides aminés.

Les limites de quantification dépendent de l'équipement chromatographique, mais on peut généralement analyser des niveaux aussi bas que 0,3 g/kg pour la lysine totale, 0,25 g/kg pour la méthionine totale, 0,35 g/kg pour la cystine plus la cystéine totales, 0,2 g/kg pour la thréonine totale, 0,035 g/kg pour la lysine libre, 0,035 g/kg pour la méthionine libre et 0,03 g/kg pour la thréonine libre.

NOTE Une limite de quantification ou détection plus basse peut être atteinte, mais cela est à valider par les utilisateurs.

2 Principe

2.1 Acides aminés libres

Les acides aminés libres sont extraits avec de l'acide chlorhydrique dilué. Les macromolécules azotées sont précipitées par de l'acide sulfosalicylique et éliminées par filtration. Le pH de la solution filtrée est ramené à 2,20. Les acides aminés sont séparés par chromatographie par échange d'ions et déterminés par réaction avec de la ninhydrine et détection photométrique à 570 nm.

2.2 Acides aminés totaux

Le mode opératoire choisi dépend des acides aminés recherchés. La cyst(é)ine et la méthionine doivent être oxydées, avant hydrolyse, respectivement en acide cystéique et méthionine sulfone. La tyrosine doit être déterminée dans des hydrolysats d'échantillons non oxydés. Tous les autres acides aminés répertoriés dans l'Article 1 peuvent être déterminés dans un échantillon soit oxydé, soit non oxydé.

L'oxydation est effectuée à 0 °C avec un mélange acide performique/phénol. L'excès de réactif d'oxydation est décomposé par du disulfite de sodium. L'échantillon oxydé ou non est hydrolysé pendant 23 h avec de l'acide chlorhydrique ($c = 6 \text{ mol/l}$). Le pH de l'hydrolysate est ramené à 2,20. Les acides aminés sont séparés par chromatographie par échange d'ions et déterminés par réaction avec de la ninhydrine et détection photométrique à 570 nm (440 nm pour la proline).

3 Réactifs et matériaux

Sauf indication contraire, n'utiliser que des réactifs de qualité analytique reconnue.

3.1 **Eau**, eau bi-distillée ou de qualité équivalente (conductivité $< 10 \mu\text{S}$).

3.2 **Peroxyde d'hydrogène**, $w = 30 \%$.
<http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf232efb-deab-4086-baa9-a7a8a8d4d0ed/iso-13903-2005>

3.3 **Acide formique**, $w = 98 \%$ à 100% .

3.4 **Acide chlorhydrique**, densité d'environ $1,19 \text{ g/ml}$.

3.5 **2,2'-Thiodiéthanol** (thiodiglycol).

3.6 **Éther de pétrole**, intervalle d'ébullition entre 40 °C et 60 °C .

3.7 **Norleucine**, ou tout autre composé adapté à l'emploi comme étalon interne.

3.8 **Azote gazeux** (< 10 parties par million d'oxygène).

3.9 **Acides aminés**.

3.9.1 **Substances étalons** répertoriées dans l'Article 1.

N'utiliser que des composés purs ne contenant pas d'eau de cristallisation. Sécher sous vide sur P_2O_5 ou H_2SO_4 pendant 1 semaine avant utilisation.

3.9.2 **Acide cystéique**.

3.9.3 **Méthionine sulfone**.

3.10 **Solution d'hydroxyde de sodium I**, $c = 7,5 \text{ mol/l}$.

Dissoudre 300 g de NaOH dans de l'eau (3.1) et compléter à 1 l .

3.11 Solution d'hydroxyde de sodium II, $c = 1 \text{ mol/l}$.

Dissoudre 40 g de NaOH dans de l'eau (3.1) et compléter à 1 l.

3.12 Solution de phénol-acide formique.

Mélanger 889 g d'acide formique (3.3) avec 111 g d'eau (3.1), puis ajouter 4,73 g de phénol.

3.13 Solution d'hydrolyse, $c = 6 \text{ mol/l}$ d'HCl contenant 1 g de phénol par litre.

Ajouter 1 g de phénol à 492 ml d'HCl (3.4) et compléter à 1 l avec de l'eau (3.1).

3.14 Mélange d'extraction, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ d'HCl contenant 2 % de thiodiglycol.

Diluer 8,2 ml d'HCl (3.4) dans environ 900 ml d'eau (3.1). Ajouter 20 ml de thiodiglycol (3.5) et compléter à 1 l avec de l'eau. Ne pas mélanger directement 3.4 et 3.5.

3.15 5-Acide sulfosalicylique, $\beta = 6 \%$.

Dissoudre 60 g d'acide 5-sulfosalicylique dihydraté dans de l'eau (3.1) et compléter à 1 l avec de l'eau.

3.16 Mélange d'oxydation (acide performique-phénol).

Mélanger 0,5 ml de peroxyde d'hydrogène (3.2) avec 4,5 ml de solution de phénol-acide formique (3.12) dans un petit bécher. Incuber entre 20 °C et 30 °C pendant 1 h pour former de l'acide performique, puis refroidir dans un bain d'eau glacée (15 min) avant de l'ajouter à l'échantillon.

Éviter tout contact avec la peau et porter des vêtements de protection.

3.17 Tampon citrate, $c = 0,2 \text{ mol/l}$ de Na^+ , pH 2,20.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf232efb-deab-4086-baa9-7e983d449e41/iso-13903-2005>

Dissoudre 19,61 g de citrate de sodium dihydraté, 5 ml de thiodiglycol (3.5), 1 g de phénol et 16,50 ml d'HCl (3.4) dans environ 800 ml d'eau (3.1). Ramener le pH à 2,20. Compléter à 1 l avec de l'eau.

3.18 Tampons d'élution, préparés conformément aux exigences prévues pour l'analyseur utilisé (4.9).**3.19 Réactif à la ninhydrine**, préparé conformément aux exigences prévues pour l'analyseur utilisé (4.9).**3.20 Solutions étalons d'acides aminés**

Ces solutions doivent être conservées à une température inférieure à 5 °C.

3.20.1 Solution étalon mère d'acides aminés (3.9.1), $c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$ de chaque acide aminé dans de l'acide chlorhydrique.

Celles-ci sont disponibles dans le commerce.

3.20.2 Solution étalon mère d'acide cystéique et de méthionine sulfone, $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$.

Dissoudre 0,211 5 g d'acide cystéique (3.9.2) et 0,226 5 g de méthionine sulfone (3.9.3) dans le tampon citrate (3.17) dans une fiole jaugée de 1 l et compléter jusqu'à la marque avec le tampon citrate. Conserver à une température inférieure à 5 °C pour une durée maximale de 12 mois. Cette solution ne doit pas être utilisée si la solution mère (3.20.1) contient de l'acide cystéique et de la méthionine sulfone.

3.20.3 Solution étalon mère de l'étalon interne par exemple la norleucine, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$.

Dissoudre 0,656 0 g de norleucine (3.7) dans le tampon au citrate (3.17) dans une fiole jaugée et compléter jusqu'à 250 ml avec le tampon au citrate. Conserver à une température inférieure à 5°C pour une durée maximale de 6 mois.

3.20.4 Solution d'étalonnage des acides aminés étalons, à utiliser avec les hydrolysats, $c = 0,1 \mu\text{mol/ml}$ d'acide cystéique et de méthionine sulfone et $c = 0,2 \mu\text{mol/ml}$ des autres acides aminés.

Dissoudre 2,2 g de chlorure de sodium dans un bécher de 100 ml avec 30 ml de tampon au citrate (3.17). Ajouter 4,00 ml de solution étalon mère des acides aminés (3.20.1), 4,00 ml de solution étalon mère d'acide cystéique et de méthionine sulfone (3.20.2), et 0,50 ml de solution étalon mère d'étalon interne (3.20.3) s'il est utilisé. Ramener le pH à 2,20 avec de l'hydroxyde de sodium (3.11). Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter jusqu'à la marque avec du tampon citrate (3.17) et mélanger. Conserver à une température inférieure à 5°C pour une durée maximale de trois mois. Voir aussi 9.1.

3.20.5 Solution d'étalonnage des acides aminés étalons, à utiliser pour l'analyse des hydrolysats préparés selon 5.3.3.2 et des extraits (5.2).

Préparer la solution d'étalonnage conformément à 3.20.4 mais sans le chlorure de sodium. Conserver à une température inférieure à 5°C pour une durée maximale de trois mois.

4 Appareillage

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

4.1 Ballon à fond rond, d'une capacité de 100 ml ou 250 ml, pourvu d'un condenseur à reflux.

4.2 Flacon en verre borosilicaté, d'une capacité de 100 ml, avec bouchon à vis à revêtement de caoutchouc/teflon (par exemple Duran, Schott) pour être utilisé dans l'étuve.

4.3 Étuve, avec ventilation forcée et régulateur de température, d'une exactitude de moins de $\pm 2^\circ\text{C}$.

4.4 pH-mètre, à graduation à trois décimales.

4.5 Membrane filtrante, $0,2 \mu\text{m}$.

4.6 Centrifugeuse.

4.7 Évaporateur rotatif à vide.

4.8 Agitateur mécanique ou magnétique.

4.9 Analyseur d'acides aminés ou équipement de CLHP avec colonne d'échange d'ions, dispositif pour ninhydrine, dérivation post-colonne et détecteur photométrique.

La colonne est remplie de résines de polystyrène sulfoné capables de séparer les acides aminés les uns des autres ainsi que des autres produits réagissant à la ninhydrine. Le flux du tampon et de la ninhydrine est assuré par des pompes ayant une stabilité de flux de $\pm 0,5\%$ sur la période couvrant à la fois l'analyse de la solution d'étalonnage et l'analyse des échantillons.

Avec certains analyseurs d'acides aminés, on peut utiliser des modes opératoires d'hydrolyse dans lesquels l'hydrolysate possède une concentration en sodium de $c = 0,8 \text{ mol/l}$ et contient tout l'acide formique résiduel de l'étape d'oxydation. D'autres appareils ne donnent pas une séparation satisfaisante de certains acides aminés si l'hydrolysate contient de trop fortes concentrations en acide formique et/ou ions sodium. Dans ce cas, le volume d'acide est réduit par évaporation à environ 5 ml après l'hydrolyse et avant l'ajustement du pH. L'évaporation doit être effectuée sous vide à 40 °C maximum.

5 Mode opératoire

5.1 Préparation de l'échantillon d'essai

Broyer l'échantillon pour le réduire à une granulométrie de 0,5 mm. Avant broyage, les échantillons à fort taux d'humidité doivent être soit séchés à l'air à une température maximale de 50 °C, soit séchés par lyophilisation. Les échantillons à forte teneur en matières grasses doivent subir une extraction par de l'éther de pétrole (3.6) avant broyage.

5.2 Dosage des acides aminés libres dans les aliments des animaux et prémélanges

Peser, à 0,2 mg près, une quantité adaptée (de 1 g à 5 g) de l'échantillon d'essai préparé (voir 5.1) dans un erlenmeyer et ajouter 100,0 ml de mélange d'extraction (3.14). Agiter le mélange pendant 60 min à l'aide d'un agitateur mécanique ou magnétique (4.8). Laisser décanter 10,0 ml du surnageant dans un bécher de 100 ml.

Ajouter 5,0 ml de solution d'acide sulfosalicylique (3.15), tout en agitant, et poursuivre l'agitation avec l'agitateur magnétique pendant 5 min. Filtrer ou centrifuger le surnageant afin d'éliminer tout précipité éventuel. Placer 10,0 ml de la solution obtenue dans un bécher de 100 ml et ajuster le pH à 2,20 avec la solution d'hydroxyde de sodium (3.11). Transférer dans une fiole jaugée d'un volume approprié au moyen du tampon citrate (3.17), et compléter avec la solution tampon jusqu'à la marque.

Si un étalon interne est utilisé, ajouter 1,00 ml d'étalon interne (3.20.3) par fractions de 100 ml de solution finale et compléter à la marque avec la solution tampon (3.17).

Procéder à la chromatographie conformément à 5.4.

Si les extraits ne sont pas chromatographiés le jour même, les stocker à une température inférieure à 5 °C.

5.3 Dosage des acides aminés totaux

5.3.1 Oxydation

Peser, à 0,2 mg près, de 0,1 g à 1 g de l'échantillon d'essai préparé (voir 5.1) dans

- un ballon à fond rond de 100 ml (4.1) pour hydrolyse ouverte (5.3.2.3), ou
- un ballon à fond rond de 250 ml (4.1) si une faible concentration en sodium est nécessaire (5.3.3.2), ou
- un flacon de 100 ml, muni d'un bouchon à vis (4.2), pour hydrolyse fermée (5.3.2.4).

La prise d'essai pesée doit avoir une teneur en azote d'environ 10 mg et une teneur en humidité de 100 mg au plus.

Placer le flacon/ballon dans un bain d'eau glacée et à 0 °C. Ajouter 5 ml de mélange à oxyder (3.16) et mélanger avec une spatule en verre à bout courbé. Fermer hermétiquement le flacon/ballon contenant la spatule avec un film imperméable à l'air, placer le bain d'eau glacée avec le récipient fermé dans un réfrigérateur à 0 °C et l'y laisser séjourner pendant 16 h. Après 16 h, retirer le produit du réfrigérateur et décomposer l'excès de réactif d'oxydation en ajoutant 0,84 g de disulfite de sodium.

Passer à 5.3.2.1.

5.3.2 Hydrolyse

5.3.2.1 Hydrolyse des échantillons oxydés

Ajouter 25 ml de mélange d'hydrolyse (3.13) à l'échantillon oxydé préparé conformément à 5.3.1, en prenant soin de rincer tout résidu d'échantillon adhérent aux bords du récipient et de la spatule. Selon le mode opératoire d'hydrolyse employé, poursuivre conformément à 5.3.2.3 ou à 5.3.2.4.

5.3.2.2 Hydrolyse des échantillons non oxydés

Peser, à 0,2 mg près, de 0,1 g à 1 g de l'échantillon préparé dans un ballon à fond rond de 100 ml ou 250 ml (4.1) ou dans un flacon de 100 ml pourvu d'un bouchon à vis (4.2). La prise d'essai pesée doit avoir une teneur en azote d'environ 10 mg. Ajouter avec précaution 25 ml de mélange à hydrolyser (3.13) et mélanger à l'échantillon. Continuer conformément à 5.3.2.3 ou à 5.3.2.4.

5.3.2.3 Hydrolyse ouverte

Ajouter trois billes de verre au mélange dans le ballon (préparé selon 5.3.2.1 ou 5.3.2.2) et faire bouillir en bouillonnement constant sous reflux pendant 23 h. À la fin de l'hydrolyse, rincer le condenseur avec 5 ml de tampon citrate (3.17) Retirer le ballon et le faire refroidir dans un bain glacé. Poursuivre conformément à 5.3.3.

5.3.2.4 Hydrolyse fermée

Placer le flacon contenant le mélange préparé selon 5.3.2.1 ou 5.3.2.2 dans une étuve (4.3) réglée sur 110 °C. Au cours de la première heure, afin de prévenir l'accumulation de pression (due à l'évolution des substances gazeuses) et d'éviter une explosion, placer le bouchon à vis sur le récipient. Ne pas fermer le récipient avec le bouchon. Après 1 h, fermer le récipient avec le bouchon et le laisser dans l'étuve (4.3) pour 23 h. À la fin de l'hydrolyse, retirer le flacon de l'étuve, ouvrir avec précaution le bouchon et mettre le flacon dans un bain d'eau glacée. Laisser refroidir.

ISO 13903:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bf232efb-deab-4086-baa9->

Selon le mode opératoire de l'ajustement du pH (5.3.3), transférer quantitativement le contenu du flacon dans un bécher ou ballon à fond rond de 250 ml, à l'aide du tampon citrate (3.17).

Poursuivre conformément à 5.3.3.

5.3.3 Ajustement du pH

5.3.3.1 En fonction de la tolérance au sodium de l'analyseur d'acides aminés (4.9), procéder conformément à 5.3.3.2 ou à 5.3.3.3 pour l'ajustement du pH.

5.3.3.2 Pour des systèmes chromatographiques exigeant une faible concentration en sodium (lorsque le volume d'acide doit être réduit), il est conseillé d'employer une solution étalon mère à étalon interne (3.20.3).

Dans ce cas, ajouter 2,00 ml de solution mère d'étalon interne (3.20.3) à l'hydrolysate avant évaporation.

Ajouter deux gouttes de 1-octanol à l'hydrolysate obtenu, conformément à 5.3.2.3 ou à 5.3.2.4.

En utilisant un évaporateur rotatif (4.7), réduire le volume à 5 ml ou 10 ml sous vide à 40 °C. Si, par accident, le volume est réduit à moins de 5 ml, l'hydrolysate doit être jeté et l'analyse recommencée.

Ajuster le pH à 2,20 avec la solution d'hydroxyde de sodium II (3.11) et passer à l'étape 5.3.4.

5.3.3.3 Pour les systèmes chromatographiques (4.9) ne nécessitant pas une concentration faible en sodium, recueillir les hydrolysats obtenus selon 5.3.2.3 ou 5.3.2.4 et les neutraliser partiellement en ajoutant, tout en mélangeant, 17 ml de solution d'hydroxyde de sodium I (3.10), en veillant que la température reste inférieure à 40 °C.

Ajuster le pH à 2,20 à température ambiante avec la solution d'hydroxyde de sodium I (3.10), puis avec la solution d'hydroxyde de sodium II (3.11). Procéder à l'étape 5.3.4.

5.3.4 Solution d'échantillon pour chromatographie

Transférer quantitativement l'hydrolysate à pH ajusté (5.3.3.2 ou 5.3.3.3) avec du tampon citrate (3.17) dans une fiole jaugée de 200 ml, et remplir jusqu'au trait avec le tampon.

Si un étalon interne n'a pas encore été utilisé, ajouter 2,00 ml d'étalon interne (3.20.3) et compléter à la marque avec la solution tampon au citrate (3.17). Mélanger soigneusement.

Poursuivre la chromatographie décrite en 5.4.

Si les solutions des échantillons ne sont pas chromatographiées le jour même, elles doivent être stockées à une température inférieure à 5 °C.

5.4 Chromatographie

Avant la chromatographie, porter l'extrait (5.2) ou l'hydrolysate (5.3.4) à la température ambiante. Agiter le mélange et filtrer une quantité appropriée à travers une membrane filtrante de 0,2 µm (4.5). La solution filtrée est soumise à la chromatographie par échange d'ions, en utilisant un analyseur d'acides aminés ou un équipement CLHP (4.9).

L'injection peut être effectuée manuellement ou automatiquement. Il est important que la même quantité ($\pm 0,5$ %) de solution soit ajoutée à la colonne pour l'analyse des étalons et des échantillons, sauf lorsqu'un étalon interne est utilisé et que les rapports sodium/acide aminé dans les solutions étalon et d'échantillon sont aussi similaires que possible.

En général, la fréquence des injections d'étalonnage dépend de la stabilité du réactif ninhydrine et du système analytique. Diluer l'étalon ou l'échantillon avec le tampon au citrate (3.17) pour obtenir une surface de pic de la solution étalon de 30 % à 200 % de la surface de pic de l'acide aminé dans l'échantillon.

Le chromatogramme des acides aminés variera légèrement en fonction du type d'analyseur et de la résine utilisés. Le système choisi doit être capable de séparer les acides aminés les uns des autres ainsi que des autres substances réagissant à la ninhydrine. Au cours de l'opération le système chromatographique doit fournir une réponse linéaire à des variations des quantités d'acides aminés ajoutés dans la colonne.

Au cours de l'étape de chromatographie, les rapports des hauteurs entre creux et sommets des pics mentionnés ci-dessous s'appliquent, lorsqu'une solution équimolaire (des acides aminés déterminés) est analysée. Cette solution équimolaire doit contenir au moins 30 % de la charge maximale en chaque acide aminé qui peut être mesurée précisément avec le système d'analyse d'acides aminés (4.9).

Pour la séparation thréonine-sérine, le rapport de hauteur entre la vallée et le sommet du plus bas des deux acides aminés chevauchants sur le chromatogramme ne doit pas dépasser 2/10 (si seules les cyst(é)ine, méthionine, thréonine et lysine sont déterminées, une séparation insuffisante des pics voisins aura une influence défavorable sur le dosage). Pour tous les autres acides aminés, la séparation doit être supérieure à 1/10.

Le système doit assurer que la lysine est séparée des «artéfacts de lysine» et de l'ornithine.