
**Lait, produits laitiers et formules
infantiles — Lignes directrices pour la
détermination quantitative de la mélamine
et de l'acide cyanurique par CL-SM/SM**

*Milk, milk products and infant formulae — Guidelines for the quantitative
determination of melamine and cyanuric acid by LC-MS/MS*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 15495:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9780e530-f36-4444-80a4-449d025faccf/iso-ts-15495-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9780e530-f36-4444-80a4-449d025faccf/iso-ts-15495-2010>

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 et la FIL déclinent 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 et les comités nationaux de la FIL. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en Informer le Secrétariat central de l'ISO à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 15495:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9780e530-f36-4444-80a4-449d025faccf/iso-ts-15495-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9780e530-f36-4444-80a4-449d025faccf/iso-ts-15495-2010>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2010

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 soit de l'ISO soit de la FIL, à l'une ou l'autre des adresses ci-après.

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

Fédération Internationale de Laiterie
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Bruxelles
Tel. + 32 2 733 98 88
Fax + 32 2 733 04 13
E-mail Info@fil-idf.org
Web www.fil-idf.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Avant-propos	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Échantillonnage	2
6 Préparation de l'échantillon pour essai	2
7 Mode opératoire	3
7.1 Analyse CL-SM/SM — Chromatographie	3
7.2 Analyse CL-SM/SM — Spectrométrie de masse	3
8 Critères de performance	3
8.1 Généralités	3
8.2 Sensibilité minimale requise	3
8.3 Exactitude et recouvrement	4
8.4 Répétabilité	4
8.5 Reproductibilité interlaboratoires	4
9 Rapport d'essai	4
Annexe A (informative) Exemple A — Lait de vache et formule infantile à base de lait — Détermination quantitative simultanée de la teneur en mélamine et en acide cyanurique par chromatographie en phase liquide avec ionisation par électrospray et spectrométrie de masse en tandem	5
Annexe B (informative) Exemple B — Analyse quantitative de la mélamine et de l'acide cyanurique dans une formule infantile à base de lait et dans du lait de vache par chromatographie en phase liquide à l'aide de la spectrométrie de masse à piège ionique linéaire	20
Bibliographie	31

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.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale soit de son annulation.

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/TS 15495|FIL/MR 230 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de Laiterie (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

Avant-propos

La **FIL (Fédération Internationale de Laiterie)** est une organisation sans but lucratif représentant le secteur laitier mondial. Les membres de la FIL se composent des Comités Nationaux dans chaque pays membre et des associations laitières régionales avec lesquelles la FIL a signé des accords de coopération. Tout membre de la FIL a le droit de faire partie des Comités permanents de la FIL auxquels sont confiés les travaux techniques. La FIL collabore avec l'ISO pour l'élaboration de méthodes normalisées d'analyse et d'échantillonnage pour le lait et les produits laitiers.

La tâche principale des Comités permanents est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour approbation avant publication en tant que Norme internationale. La publication comme Norme internationale requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux de la FIL votants.

Dans d'autres circonstances, particulièrement quand une demande urgente du marché survient pour de tels documents, un Comité permanent peut décider de publier un autre type de document à valeur de norme que la FIL appelle *Méthode révisée*. Une telle méthode illustre un consensus entre les membres d'un Comité permanent et est acceptée pour publication si elle est approuvée par au moins 50 % des Comités Nationaux émettant un vote. Une *Méthode révisée* est équivalente à une ISO/PAS ou à une ISO/TS et sera donc aussi publiée conjointement selon les conditions ISO.

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. La FIL ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO/TS 15495|FIL/MR 230 a été élaborée par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL) et le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Elle est publiée conjointement par la FIL et l'ISO.

L'ensemble des travaux a été réalisé par un Groupe de projet mixte sur la *Détermination de la mélamine* du Comité permanent sur les *Méthodes d'analyse pour les additifs et les contaminants* sous la conduite de ses chefs de projet, Dr S.E. Holroyd (NZ) et Dr T. Delatour (CH).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 15495:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9780e530-ff36-4444-80a4-449d025faccf/iso-ts-15495-2010>

Lait, produits laitiers et formules infantiles — Lignes directrices pour la détermination quantitative de la mélamine et de l'acide cyanurique par CL-SM/SM

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique fournit des lignes directrices pour la détermination quantitative de la teneur en mélamine et en acide cyanurique dans le lait, les produits laitiers en poudre et les formules infantiles par chromatographie en phase liquide avec ionisation par électrospray et spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM).

NOTE Des exemples de méthodes CL-SM/SM sont donnés dans les Annexes A et B.

2 Références normatives

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 3534 (toutes les parties), *Statistique — Vocabulaire et symboles*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9780e530-f36-4444-80a4-44910359c730/iso-3534-15495-2010>

ISO 5725-1, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 1: Principes généraux et définitions*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 3534 et l'ISO 5725-1, ainsi que les suivants s'appliquent.

3.1

teneur en mélamine

fraction massique de substance déterminée par les modes opératoires spécifiés dans la présente Spécification technique

NOTE La teneur en mélamine est exprimée en milligrammes par kilogramme de produit.

3.2

teneur en acide cyanurique

fraction massique de substance déterminée par les modes opératoires spécifiés dans la présente Spécification technique

NOTE La teneur en acide cyanurique est exprimée en milligrammes par kilogramme de produit.

3.3

limite maximale

LM

teneur maximale en mélamine ou en acide cyanurique autorisée ou acceptable dans le lait, les produits laitiers en poudre ou les formules infantiles

NOTE La LM peut être une limite spécifiée nationalement ou internationalement ou un seuil de danger défini.

4 Principe

L'échantillon est homogénéisé et facultativement reconstitué en cas d'échantillons pulvérulents. Un solvant approprié est ajouté à l'échantillon pour essai pour précipiter les protéines de la matrice et extraire la mélamine et l'acide cyanurique. Après centrifugation, une aliquote du surnageant est analysée par CL-SM/SM.

Pour les besoins de la présente Spécification technique, le terme CL-SM/SM désigne toute méthode combinant soit la chromatographie liquide haute performance (CLHP) soit la chromatographie liquide ultraperformance (CLUP) et la détection spectrométrique de masse triple quadripôle ou à piège ionique. La séparation chromatographique s'appuie sur la chromatographie liquide d'interaction hydrophile (CLIH) pour garantir une bonne séparation de la mélamine et de l'acide cyanurique. L'ionisation de la substance est effectuée par ionisation par électrospray (IES) et la détection est réalisée en mode SRM («selected reaction monitoring»).

NOTE D'autres techniques d'ionisation suffisamment performantes peuvent être utilisées. D'autres analyseurs de masse peuvent être utilisés à condition qu'ils remplissent les critères de performance (points d'identification) de la décision 2002/657/CE (Référence [8]).

La quantification de la mélamine et de l'acide cyanurique repose sur la dilution isotopique utilisant des étalons internes isotopiques stables pour les deux analytes.

[ISO/TS 15495:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9780e530-f36-4444-80a4-449d025faccf/iso-ts-15495-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9780e530-f36-4444-80a4-449d025faccf/iso-ts-15495-2010>

5 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Spécification technique. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707 | FIL 50^[1].

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

6 Préparation de l'échantillon pour essai

Il convient que la masse de l'échantillon pour essai destiné à être analysé ou soumis à la reconstitution facultative soit représentative du produit et appropriée à l'extraction efficace des analytes cibles.

Lors de la première étape d'analyse, il convient de compléter directement les étalons isotopiques marqués dans l'échantillon sec ou humide.

Il convient que la concentration en étalons internes ajoutés soit du même ordre de grandeur que celui étudié pour la mélamine et l'acide cyanurique. L'extraction peut être effectuée avec au moins 5 ml de solvant d'extraction par gramme de matériau échantillon afin de donner une fraction massique finale de solvant organique en pourcentage dans le mélange d'extraction d'au moins 70 %. Il convient que l'extraction dure au moins 5 min en agitant énergiquement ou en combinant passage aux ultrasons et passage au vortex. Il convient ensuite de centrifuger l'échantillon dans des conditions appropriées et de le filtrer à l'aide d'un filtre pour seringue.

Toute autre alternative est acceptable à condition que les critères de performance et de validation soient conformes aux exigences spécifiées dans la présente Spécification technique.

7 Mode opératoire

7.1 Analyse CL-SM/SM — Chromatographie

Effectuer la séparation par chromatographie liquide à l'aide d'une colonne réservée à cet effet.

Le temps de rétention minimal acceptable pour la mélamine et l'acide cyanurique doit être deux fois supérieur au temps de rétention correspondant au volume mort de la colonne. Le temps de rétention dans l'extrait d'échantillon doit correspondre à celui de l'étalon dans une plage de temps de rétention spécifiée.

Le rapport du temps de rétention relatif de l'analyte à celui de l'étalon interne doit correspondre à celui des étalons, avec une tolérance de $\pm 2,5$ %.

7.2 Analyse CL-SM/SM — Spectrométrie de masse

La détection spectrométrique de masse de la mélamine et de l'acide cyanurique doit être effectuée en utilisant de préférence un instrument CL-SM/SM triple quadripôle.

La détermination quantitative et l'identification doivent être réalisées en mode SRM. Lorsqu'un instrument triple quadripôle est utilisé pour chaque composé, au moins deux transitions de masse doivent être employées pour la détection de l'analyte, alors qu'au moins une seule doit être utilisée pour l'étalon interne. Toutefois, il est également recommandé d'enregistrer deux transitions de masse pour l'étalon interne.

La transition la plus appropriée (la plus intense) doit être utilisée pour la quantification (quantificateur) et la deuxième pour la confirmation (qualificateur). Le rapport intensité du qualificateur sur intensité du quantificateur (Rq/Q) doit être contrôlé et des critères de tolérance doivent être appliqués en fonction de la valeur de Rq/Q (Tableau 1).

ISO/TS 15495:2010
Tableau 1 — Tolérance relative autorisée maximale pour le rapport intensité du qualificateur sur intensité du quantificateur (Rq/Q)

Rq/Q (% de quantificateur)	Tolérance (relative, en %)
> 50	± 20
> 20 à 50	± 25
> 10 à 20	± 30
≤ 10	± 50

8 Critères de performance

8.1 Généralités

Il convient que chaque laboratoire valide la méthode mise en place afin de démontrer son adéquation avec les objectifs. Le mode opératoire de validation spécifié dans la décision 2002/657/CE (Référence [8]) de la Commission européenne est recommandé. Les limites maximale et minimale pour les caractéristiques de performance adoptées de ce mode opératoire sont définies de 8.2 à 8.5.

8.2 Sensibilité minimale requise

Il convient que la limite de quantification (LQ) requise soit au moins 10 fois inférieure à la limite maximale (LM) de façon à garantir une quantification fiable au niveau de la LM.

8.3 Exactitude et recouvrement

D'après cette ligne directrice, l'exactitude et le recouvrement seront en général compris entre 95 % et 105 %. Pour que les méthodes d'analyse soient acceptées, l'exactitude et le recouvrement doivent être compris entre 80 % et 110 %.

8.4 Répétabilité

Le coefficient de variation de la répétabilité est en général de 3 % à 6 %, avec une limite <15 %.

8.5 Reproductibilité interlaboratoires

Le coefficient de variation de la reproductibilité interlaboratoires est en général de 5 % à 10 %, avec une limite <15 %.

9 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

- a) toutes les informations nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;
- b) la méthode d'échantillonnage utilisée, si elle est connue;
- c) la méthode d'essai utilisée, ainsi qu'une référence à la présente Spécification technique (ISO/TS 15495|FIL/MR 230:2010);
- d) tous les détails opératoires non spécifiés dans la présente Spécification technique, ou considérés comme facultatifs, ainsi que les incidents susceptibles d'avoir influencé le(s) résultat(s) d'essai;
- e) le(s) résultat(s) d'essai obtenu(s);
- f) si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.

Annexe A (informative)

Exemple A — Lait de vache et formule infantile à base de lait — Détermination quantitative simultanée de la teneur en mélamine et en acide cyanurique par chromatographie en phase liquide avec ionisation par électrospray et spectrométrie de masse en tandem

A.1 Domaine d'application

La présente annexe spécifie une méthode validée en interne pour la détermination quantitative des teneurs en mélamine et en acide cyanurique dans le lait de vache (LV) et les formules infantiles en poudre (FIP) à base de lait par chromatographie en phase liquide avec ionisation par électrospray et spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) en utilisant le mode SRM («selected reaction monitoring»).

L'identification positive de la mélamine et de l'acide cyanurique dans l'échantillon est effectuée d'après les critères de confirmation définis dans la décision 2002/657/CE (Référence [8]) de la Commission européenne.

La quantification est effectuée à l'aide d'une approche de dilution isotopique utilisant de la mélamine marquée au ($^{13}\text{C}_3$, $^{15}\text{N}_3$) et de l'acide cyanurique marqué au ($^{13}\text{C}_3$, $^{15}\text{N}_3$) comme étalons internes (EI). Pour obtenir des informations techniques, des données de validation ainsi que des résultats de l'essai d'aptitude, voir la Référence [10].

La méthode permet d'effectuer une quantification précise aux limites de rapport suivantes et supérieures:

- teneurs en mélamine et en acide cyanurique dans le LV à des taux de 0,05 mg/kg et 0,10 mg/kg, respectivement;
- teneurs en mélamine et en acide cyanurique dans la FIP à des taux de 0,05 mg/kg et 0,10 mg/kg, respectivement;
- teneurs en mélamine et en acide cyanurique dans la FIP à un taux de 1,00 mg/kg.

A.2 Termes et définitions

Voir l'Article 3.

A.3 Principe

Le mode opératoire d'analyse inclut une dilution de l'échantillon dans une solution d'acétonitrile et d'eau, laquelle provoque la précipitation des protéines et l'extraction simultanée de la mélamine et de l'acide cyanurique. Après centrifugation, le surnageant est analysé par CL-SM/SM en mode SRM, avec ionisation positive et négative. La commutation de polarité est effectuée simultanément.

A.4 Réactifs

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

NOTE Des numéros CAS sont donnés pour chaque réactif.

Avant d'utiliser des produits chimiques, se reporter aux manuels appropriés ou aux fiches de données de sécurité approuvées par vos autorités locales.

A.4.1 Eau, pour chromatographie (n° CAS: 7732-18-5).

A.4.2 Acétonitrile (CH₃CN), qualité gradient pour chromatographie en phase liquide (n° CAS: 75-05-8).

A.4.3 Acétate d'ammonium (CH₃COONH₄), GR pour analyse (n° CAS: 631-61-8).

A.4.4 Acide cyanurique [(CNOH)₃], fraction massique >98 % (n° CAS: 108-80-5).

A.4.4.1 Solution mère étalon d'acide cyanurique, correspondant à 0,25 mg d'acide cyanurique par millilitre.

Peser, à 0,1 mg près, 63,8 mg d'acide cyanurique (A.4.4) dans une fiole jaugé à un trait de 250 ml (A.5.12) en effectuant une correction appropriée des impuretés, conformément au certificat d'analyse. Dissoudre et compléter au volume avec de l'eau (A.4.1). Passer aux ultrasons pendant au moins 15 min jusqu'à dissolution complète.

Conserver la solution mère étalon d'acide cyanurique à température ambiante et à l'abri de la lumière. Préparer une nouvelle solution mère étalon chaque semaine.

A.4.4.2 Solution de travail d'acide cyanurique I, correspondant à 20 µg d'acide cyanurique par millilitre.

Transférer à la pipette 4 ml de la solution mère étalon d'acide cyanurique (A.4.4.1) dans une fiole jaugée à un trait de 50 ml (A.5.12). Compléter au volume avec de l'eau (A.4.1) et mélanger. Conserver la solution de travail d'acide cyanurique I à température ambiante et à l'abri de la lumière. Préparer une nouvelle solution de travail I chaque semaine.

A.4.4.3 Solution de travail d'acide cyanurique II, correspondant à 2 µg d'acide cyanurique par millilitre.

Transférer à la pipette 1 ml de la solution de travail d'acide cyanurique I (A.4.4.2) dans une fiole jaugée de 10 ml à un trait (A.5.12). Compléter au volume avec de l'eau (A.4.1) et mélanger. Conserver la solution de travail d'acide cyanurique II à température ambiante et à l'abri de la lumière. Préparer une nouvelle solution de travail II chaque semaine.

A.4.4.4 Solution de travail d'acide cyanurique III, correspondant à 200 ng d'acide cyanurique par millilitre.

Transférer à la pipette 0,5 ml de la solution de travail d'acide cyanurique I (A.4.4.2) dans une fiole jaugée à un trait de 50 ml (A.5.12). Compléter au volume avec de l'eau (A.4.1) et mélanger. Conserver la solution de travail d'acide cyanurique III à température ambiante et à l'abri de la lumière. Préparer une nouvelle solution de travail III chaque semaine.

A.4.5 Acide cyanurique marqué (¹³C₃H₃¹⁵N₃O₃), pureté isotopique: ¹³C₃ = 99 %; cycle ¹⁵N₃ > 98 %; pureté chimique = 90 % en fraction massique, 100 µg/ml dans l'eau -1,2 ml.

A.4.5.1 Solution mère étalon d'acide cyanurique marqué, correspondant à 100 µg d'acide cyanurique marqué par millilitre.

Une solution mère étalon d'acide cyanurique marquée prête à l'emploi est disponible dans le commerce. Conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Utiliser le même lot d'étalons isotopiques pour préparer les solutions d'étalonnage en A.6.2 et pour supplémenter les extraits comme décrit dans le mode opératoire d'extraction (A.9.1).