
**Aliments des animaux —
Détermination de la teneur en lysine,
méthionine et thréonine dans les acides
aminés industriels et les pré-mélanges**

*Animal feeding stuffs — Determination of lysine, methionine and
threonine in commercial amino acid products and premixtures*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 17180:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de5da04a-8361-4649-b392-97696df330ba/iso-17180-2013>



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 17180:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de5da04a-8361-4649-b392-97696df330ba/iso-17180-2013>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2013

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au 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

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Principe	1
3 Réactifs et matériaux	1
4 Appareillage	3
5 Mode opératoire	4
5.1 Préparation des échantillons.....	4
5.2 Nombre d'extraits préparés.....	4
5.3 Extraction utilisant une dilution par pesée.....	4
5.4 Extraction par dilution volumétrique.....	5
5.5 Chromatographie.....	5
6 Calcul des résultats	5
6.1 Principe de la méthode et contrôle de l'étalonnage.....	5
6.2 Calcul en cas de dilution par pesée.....	6
6.3 Calcul en cas de dilution volumétrique.....	7
7 Fidélité	7
7.1 Essai interlaboratoires.....	7
7.2 Répétabilité.....	7
7.3 Reproductibilité.....	8
8 Rapport d'essai	8
Annexe A (informative) Résultats d'une étude interlaboratoires	9
Bibliographie	11

ISO 17180:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de5da04a-8361-4649-b392-97696df330ba/iso-17180-2013>

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 17180 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 17180:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de5da04a-8361-4649-b392-97696df330ba/iso-17180-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de5da04a-8361-4649-b392-97696df330ba/iso-17180-2013>

Aliments des animaux — Détermination de la teneur en lysine, méthionine et thréonine dans les acides aminés industriels et les pré-mélanges

AVERTISSEMENT — Le présent document peut impliquer l'emploi de produits et la mise en œuvre de modes opératoires et d'appareillages à caractère dangereux. Le présent document n'a pas pour but d'aborder tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur du présent document d'établir, avant de l'utiliser, des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination quantitative de la lysine, la méthionine et la thréonine libres (non liées aux protéines) dans les produits industriels et les pré-mélanges contenant plus de 10 % (fraction massique) environ de l'acide aminé considéré. Elle ne fait pas de distinction entre les formes D et L.

NOTE Pour les besoins de la présente Norme internationale, le terme «acides aminés» utilisé à partir de l'[Article 2](#) désigne la lysine, la méthionine et la thréonine.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

2 Principe

Les échantillons sont traités dans de l'acide chlorhydrique dilué, puis dilués dans du tampon citrate de sodium. La norleucine, étalon interne, est ajoutée et les acides aminés sont séparés par un analyseur d'acides aminés ou un équipement de chromatographie liquide haute performance (CLHP), par élution avec des solutions tampons de citrate de sodium sur une résine échangeuse de cations. Les acides aminés sont dosés par détection photométrique après réaction post-colonne avec la ninhydrine ou par détection fluorimétrique après réaction post-colonne avec de l'*ortho*-phtaldialdéhyde (OPA).

3 Réactifs et matériaux

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

3.1 Eau, eau bidistillée ou de pureté équivalente (conductivité <10 µS/cm).

3.2 Substances-étalons.

3.2.1 Cristaux de lysine·HCl, de pureté supérieure à 99 % (fraction massique) séchés en dessiccateur sous vide pendant 2 jours sur P₂O₅ avant utilisation.

3.2.2 Cristaux de thréonine, de pureté supérieure à 99 % (fraction massique) séchés en dessiccateur sous vide pendant 2 jours sur P₂O₅ avant utilisation.

3.2.3 Cristaux de méthionine, de pureté supérieure à 99 % (fraction massique) séchés en dessiccateur sous vide pendant 2 jours sur P₂O₅ avant utilisation.

3.3 Cristaux de norleucine, pour utilisation comme substance étalon interne, de pureté supérieure à 99 % (fraction massique) séchés en dessiccateur sous vide pendant 2 jours sur P₂O₅ avant utilisation.

3.4 Solution d'hydroxyde de sodium, $c(\text{NaOH}) = 7,5 \text{ mol/l}$ pour l'ajustement du pH du tampon citrate de sodium.

Dissoudre avec précaution 300 g d'hydroxyde de sodium dans de l'eau (3.1) et ajuster à 1 l.

3.5 Acide chlorhydrique, $\gamma(\text{HCl}) = 370 \text{ g/kg}$.

3.6 Citrate de sodium dihydraté.

3.7 2,2' -Thiodiéthanol (thiodiglycol).

3.8 Cristaux de phénol, de pureté supérieure à 98,5 % (fraction massique).

3.9 Solution tampon citrate de sodium, $\text{pH} = 2,20$.

Dissoudre 19,61 g de citrate de sodium dihydraté (3.6), 5 ml de thiodiglycol (3.7), 1 g de phénol (3.8) et 16,5 ml d'HCl (3.5) dans 800 ml d'eau. Ajuster le pH à 2,2 avec quelques gouttes d'HCl (3.5) ou de solution de NaOH (3.4). Le phénol permet la conservation de la solution tampon.

La solution tampon de citrate de sodium peut aussi être préparée à partir d'acide citrique et de chlorure de sodium.

3.10 Solution d'acide chlorhydrique, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Diluer 8,2 ml d'HCl (3.5) dans environ 900 ml d'eau (3.1). Bien mélanger et ajuster à 1 l avec de l'eau.

3.11 Solution étalon mère des acides aminés.

3.11.1 Solution mère de norleucine substance étalon interne, $c(\text{Nle}) = 2,5 \text{ mmol/l}$.

Dissoudre 0,328 g de norleucine (3.3) et transférer quantitativement avec de l'HCl à 0,1 mol/l (3.10) dans une fiole jaugée de 1 l.

Conserver à une température inférieure à 5 °C pendant au maximum 6 mois.

3.11.2 Solutions mères d'acides aminés, $c = 2,5 \text{ mmol/l}$.

Préparer une solution mère étalon pour chaque molécule.

Les solutions étalons ne doivent contenir que l'acide aminé à analyser, c'est-à-dire la lysine, la thréonine ou la méthionine. Les solutions étalons vendues dans le commerce, contenant par exemple 18 acides aminés, ne donnent pas de résultats optimaux.

Transférer 0,456 g de lysine·HCl (3.2.1), 0,297 g de thréonine (3.2.2) et 0,373 g de méthionine (3.2.3) dans une fiole jaugée de 1 l et ajuster au trait avec de l'HCl à 0,1 mol/l (3.10).

Conserver à une température inférieure à 5 °C pendant au maximum 6 mois.

3.11.3 Solution d'étalonnage d'acides aminés.

3.11.3.1 Dilution par pesée. Peser 2,5 ml de chaque solution étalon mère d'acides aminés m_{aa} (3.11.2) et 2,5 ml de solution mère de norleucine m_{Nle} (3.11.1) et transférer dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajuster au volume avec le tampon citrate de sodium (3.9).

Conserver la solution à une température inférieure à 5 °C pendant au maximum une semaine.

3.11.3.2 Dilution volumétrique. Au moyen d'une pipette (4.4) ou d'un diluteur (4.7), diluer des volumes égaux de solution étalon mère d'acides aminés (3.11.2) et de solution de norleucine (3.11.1) avec du tampon citrate de sodium (3.9), par exemple 50 µl de solution de norleucine et 50 µl de solution mère d'acides aminés sont dilués par le diluteur à 1 000 µl avec la solution tampon de citrate de sodium (3.9).

3.12 Tampons d'éluion pour colonne échangeuse de cations. Utiliser des tampons disponibles dans le commerce ou les préparer conformément aux spécifications du fabricant de l'analyseur. En principe, on utilise 3 à 5 solutions tampons contenant du citrate ou du carbonate de sodium et une faible quantité d'additifs et de conservateurs.

3.13 Ninhydrine ou réactif OPA. Utiliser des réactifs disponibles dans le commerce ou les préparer conformément aux spécifications du fabricant de l'analyseur.

4 Appareillage

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

4.1 Bêchers en verre, d'une capacité de 1 000 ml.

4.2 Fioles jaugées, de 50 ml, 100 ml, 500 ml et 1 000 ml.

4.3 Éprouvettes graduées, de 100 ml et 1000 ml.

4.4 Pipettes graduées, de 5 ml et 10 ml.

4.5 Agitateur mécanique ou magnétique.

4.6 Filtres à membrane de 0,2 µm en acétate de cellulose ou en PVDF.

4.7 Diluteur, facultatif (utilisé pour la dilution volumétrique).

En cas d'utilisation de ninhydrine pour la dérivation, utiliser un rapport de dilution volumétrique de 1→20. Utiliser un rapport plus élevé pour la dérivation avec OPA. Vérifier régulièrement à l'aide d'une balance le coefficient de variation (CV) de la dilution; ce coefficient de variation doit être inférieur à 1 %.

4.8 pH-mètre.

4.9 Balance analytique, ayant une précision de lecture de 0,1 mg.

4.10 Analyseur d'acides aminés ou équipement équivalent de **chromatographie liquide haute performance (CLHP).**

4.10.1 Colonne à résine échangeuse de cations placée dans un four.

4.10.2 Pré-colonne.

4.10.3 Système d'injection automatique ou manuel, permettant d'injecter des volumes compris entre 10 µl et 100 µl.

4.10.4 Pompes CLHP pour solutions tampons.

4.10.5 Pompe pour les réactifs de dérivation post-colonne, ninhydrine ou OPA.

4.10.6 Détecteur UV réglé à 440 nm et 570 nm pour la réaction post-colonne en présence de ninhydrine ou **détecteur à fluorescence** réglé à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm et à une longueur d'onde d'émission de 460 nm pour la réaction post-colonne en présence d'OPA.

4.10.7 Système de collecte et de traitement de données pour l'intégration des pics.

5 Mode opératoire

5.1 Préparation des échantillons

Broyer l'échantillon (au moyen d'un broyeur ou d'un mortier) de sorte qu'il passe à travers un tamis ayant des ouvertures de 0,25 mm. Homogénéiser soigneusement.

5.2 Nombre d'extraits préparés

Préparer deux extraits différents de chaque échantillon.

5.3 Extraction utilisant une dilution par pesée

5.3.1 Acides aminés purs industriels

Peser 0,45 g à 0,47 g de lysine·HCl (3.2.1), 0,29 g à 0,31 g de thréonine (3.2.2) et 0,36 g à 0,38 g de méthionine (3.2.3), et transférer dans des flacons pesés de 500 ml. Ajouter environ 400 ml d'HCl à 0,1 mol/l (3.10). Dissoudre l'acide aminé en agitant le mélange à l'aide d'un agitateur magnétique (4.5) pendant 30 min. Déterminer la masse totale du volume d'extraction (m_{ex}) et peser une aliquote de 1 ml en utilisant une pipette graduée (4.4), puis l'introduire dans une fiole jaugée de 50 ml (m_{ali}). Peser également 2,5 ml de solution de norleucine (3.11.1) (m_{Nle}), l'ajouter dans la fiole, ajuster au trait avec le tampon citrate (3.9) et bien mélanger.

Si les extraits des échantillons ne sont pas examinés le jour-même, ils doivent être conservés à une température inférieure à 5 °C, pendant une semaine au maximum.

5.3.2 Pré-mélanges ou acides aminés non purs industriels

Calculer la masse approximative de la prise d'essai, $m_{tp\text{ premix}}$, en grammes, sur la base de l'acide aminé ayant les valeurs attendues les plus faibles, à l'aide de la Formule (1):

$$m_{tp\text{ premix}} = \frac{m_{tp\text{ pure aa}}}{w_{exp}} \times 100 \quad (1)$$

où

$m_{tp\text{ pure aa}}$	est la masse de la prise d'essai utilisée pour l'acide aminé pur, en grammes;
w_{exp}	est la fraction massique attendue pour l'acide aminé ayant la plus faible teneur, en grammes par 100 g.

Par exemple, pour un pré-mélange contenant 20 % (fraction massique) de DL-méthionine, une prise d'essai de 1,8 g à 1,9 g est nécessaire.

Peser la quantité calculée de prise d'essai et transférer dans des flacons pesés de 500 ml. Ajouter environ 400 ml d'HCl à 0,1 mol/l. Dissoudre en agitant le pré-mélange à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 min. Déterminer la masse totale du volume d'extraction (m_{ex}) et peser une aliquote de 1 ml à l'aide d'une pipette graduée (4.4), puis l'introduire dans une fiole jaugée de 50 ml (m_{ali}). Peser également 2,5 ml de solution mère de norleucine (3.11.1) (m_{Nle}) et l'ajouter dans la fiole. Ajuster au trait avec le tampon citrate (3.9) et homogénéiser.

Si le pré-mélange contient des acides aminés avec des teneurs attendues élevées, il est possible de préparer des dilutions utilisant moins de 1 ml d'aliquote d'extrait plus 2,5 ml de norleucine (3.11.1) (m_{Nle}).

Si les extraits des échantillons ne sont pas examinés le jour-même, ils doivent être conservés à une température inférieure à 5 °C, pendant au maximum 3 jours.

5.4 Extraction par dilution volumétrique

5.4.1 Acides aminés purs industriels

Peser 0,45 g à 0,47 g de lysine·HCl, 0,29 g à 0,31 g de thréonine et 0,36 g à 0,38 g de méthionine. Transférer quantitativement avec de l'HCl à 0,1 mol/l (3.10) dans une fiole jaugée de 1 l. Dissoudre dans environ 900 ml d'HCl à 0,1 mol/l, en agitant le mélange à l'aide d'un agitateur magnétique (4.5) pendant 30 min. Ajuster à 1 l avec de l'HCl à 0,1 mol/l et bien mélanger.

Diluer et ajouter la solution de norleucine (3.11.1) en suivant le mode opératoire spécifié en 3.11.3.2 pour la préparation de la solution d'étalonnage.

Si les extraits des échantillons ne sont pas examinés le jour-même, ils doivent être conservés à une température inférieure à 5 °C, pendant au maximum 3 jours.

5.4.2 Pré-mélanges ou acides aminés non purs industriels

Calculer la masse approximative de la prise d'essai ($m_{p\text{premix}}$), en grammes, sur la base de l'acide aminé ayant les valeurs attendues les plus faibles (w_{exp}), comme décrit en 5.3.2. Pour l'extraction, utiliser une quantité de prise d'essai telle que toutes les surfaces de pic des acides aminés se situent dans la gamme linéaire de l'étalonnage. Peser cette quantité, transférer quantitativement avec de l'HCl à 0,1 mol/l (3.10) dans une fiole jaugée de 1 l et dissoudre dans environ 900 ml d'HCl à 0,1 mol/l, en agitant le mélange à l'aide d'un agitateur magnétique (4.5) pendant 30 min. Ajuster à 1 l avec de l'HCl à 0,1 mol/l et bien mélanger. Diluer et ajouter la solution de norleucine (3.11.1) en suivant le mode opératoire spécifié en 3.11.3.2 pour la préparation de la solution d'étalonnage.

Si le pré-mélange contient d'autres acides aminés avec des teneurs attendues plus élevées, il est possible de préparer des dilutions utilisant moins de 1 ml d'aliquote d'extrait plus 2,5 ml de norleucine.

Si les extraits des échantillons ne sont pas examinés le jour-même, ils doivent être conservés à une température inférieure à 5 °C, pendant au maximum 3 jours.

5.5 Chromatographie

Filtrer une quantité appropriée de la solution d'essai à travers un filtre à membrane (4.6), l'introduire dans le flacon de l'échantillonneur automatique et l'injecter dans l'analyseur ou dans le système de CLHP (4.10). Le volume d'injection est normalement de 20 µl à 50 µl.

Le système de chromatographie doit séparer les acides aminés les uns des autres et de tous les autres composants (ammoniac, amines, peptides ou aminosucres, par exemple).

Les acides aminés de l'analyte doivent être séparés de tous les autres pics élués afin d'éviter que les résultats ne soient faussés par chevauchement des pics. Le système de chromatographie doit fournir une réponse linéaire dans toute la plage de concentrations de la courbe étalon.

6 Calcul des résultats

6.1 Principe de la méthode et contrôle de l'étalonnage

Les teneurs dans les échantillons sont calculées à l'aide du résultat de la solution d'étalonnage initiale (3.11.3). Afin de vérifier l'absence de dérive, injecter la solution d'étalonnage comme contrôle qualité