
**Formules infantiles — Détermination
de la teneur en nucléotides par
chromatographie liquide**

*Infant formula — Determination of nucleotides by liquid
chromatography*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 20638:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2a9d12b-27c4-4e6b-a313-c67672dd518b/iso-20638-2015)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2a9d12b-27c4-4e6b-a313-
c67672dd518b/iso-20638-2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2a9d12b-27c4-4e6b-a313-c67672dd518b/iso-20638-2015)



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20638:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2a9d12b-27c4-4e6b-a313-c67672dd518b/iso-20638-2015>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2015, Publié en Suisse

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
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

	Page
Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Termes et définitions	1
3 Principe	1
4 Réactifs et matériaux	1
5 Appareillage	3
6 Préparation des échantillons	4
7 Mode opératoire	5
7.1 Extraction.....	5
7.2 Chromatographie.....	5
8 Calculs	6
9 Résultats	8
Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes	9
Annexe B (informative) Données de fidélité	10
Bibliographie	14

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 20638:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2a9d12b-27c4-4e6b-a313-c67672dd518b/iso-20638-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2a9d12b-27c4-4e6b-a313-c67672dd518b/iso-20638-2015>

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c2a9d12b-27c4-4e0b-a513-c67672dd518b/iso-20638-2015).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, en collaboration avec l'AOAC INTERNATIONAL. Le document est publié par l'ISO et séparément par l'AOAC INTERNATIONAL. La méthode décrite dans la présente Norme internationale est équivalente à la Méthode officielle de l'AOAC 2011.20: *Nucléotides dans les formules infantiles*.

Formules infantiles — Détermination de la teneur en nucléotides par chromatographie liquide

AVERTISSEMENT — L'utilisation de la présente Norme internationale peut impliquer des matériaux, des opérations et des équipements dangereux. La présente Norme internationale n'a pas pour but d'aborder tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Avant d'utiliser la présente Norme internationale, il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées de sécurité et de protection de la santé et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de dosage des 5'-mononucléotides dans les formules infantiles sous forme solide (c'est-à-dire les poudres) ou liquide (c'est-à-dire les liquides prêts à servir et les liquides concentrés) par chromatographie liquide.

2 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

2.1

formule infantile

substitut du lait maternel spécialement fabriqué pour satisfaire, par lui-même, les besoins nutritionnels des nourrissons pendant les premiers mois de la vie jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée

[SOURCE: Norme Codex 72-1981]

3 Principe

Dissolution de l'échantillon dans une solution à forte teneur en sels afin d'inhiber les interactions entre protéines et matières grasses. Séparation des 5'-mononucléotides — uridine 5'-monophosphate (UMP), inosine 5'-monophosphate (IMP), adénosine 5'-monophosphate (AMP), guanosine 5'-monophosphate (GMP) et cytidine 5'-monophosphate (CMP) — de la matrice d'échantillon par extraction en phase solide (SPE) par échange d'anions fort, suivie d'une analyse chromatographique utilisant une phase stationnaire C18 avec élution à gradient, détection UV et quantification par étalonnage interne utilisant de la thymidine 5'-monophosphate (TMP)^[1].

4 Réactifs et matériaux

Au cours de l'analyse, sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnus et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

4.1 Étalons, purs à ≥ 99 % (Sigma¹) ou l'équivalent). Les sels sodiques ou sels sodiques hydratés de nucléotides peuvent être substitués aux formes acides libres si celles-ci ne sont pas facilement disponibles.

4.1.1 TMP, thymidine 5'-monophosphate, n° CAS 365-07-1.

1) Ceci est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

4.1.2 **AMP**, adénosine 5'-monophosphate, n° CAS 61-19-8.

4.1.3 **CMP**, cytidine 5'-monophosphate, n° CAS 63-37-6.

4.1.4 **GMP**, guanosine 5'-monophosphate, n° CAS 85-32-5.

4.1.5 **IMP**, inosine 5'-monophosphate, n° CAS 131-99-7.

4.1.6 **UMP**, uridine 5'-monophosphate, n° CAS 58-97-9.

4.2 **Bromure de potassium** (KBr).

4.3 **Dihydrogénophosphate de potassium** (KH₂PO₄).

4.4 **Acide orthophosphorique** (H₃PO₄).

4.5 **Hydroxyde de potassium** (KOH).

4.6 **Acide éthylènediaminetétraacétique, sel disodique dihydraté** (EDTA).

4.7 **Chlorure de sodium** (NaCl).

4.8 **Méthanol** (CH₃OH).

4.9 **Préparation du réactif**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

4.9.1 **Tampon de normalisation** (KH₂PO₄, $c = 0,25 \text{ mol/l}$, pH = 3,5). Dissoudre 34,0 g de KH₂PO₄ (4.3) dans 900 ml d'eau et ajuster le pH à 3,5 à l'aide d'acide orthophosphorique (4.4). Compléter à 1 l.

4.9.2 **Solution d'extraction** (NaCl, $c = 1 \text{ mol/l}$, EDTA $c = 4 \text{ mmol/l}$). Dissoudre 58,5 g de NaCl (4.7) et 1,5 g d'EDTA (4.6). Diluer dans 1 l d'eau.

4.9.3 **Solution de lavage** (KBr, $c = 0,3 \text{ mol/l}$). Dissoudre 3,6 g de KBr (4.2) dans 100 ml d'eau.

4.9.4 **Solution d'élution** (KH₂PO₄, $c = 0,5 \text{ mol/l}$, pH = 3,0). Dissoudre 6,8 g de KH₂PO₄ (4.3) dans 90 ml d'eau et ajuster le pH à 3,0 à l'aide d'acide orthophosphorique (4.4). Compléter à 100 ml.

4.9.5 **Phase mobile A** (KH₂PO₄, $c = 10 \text{ mmol/l}$, pH = 5,6). Dissoudre 1,4 g de KH₂PO₄ (4.3) dans 900 ml d'eau et ajuster le pH à $5,6 \pm 0,1$ à l'aide d'une solution de KOH (10 % m/v). Compléter à 1 l avec de l'eau. Fabriquer la solution quotidiennement, car une croissance microbienne survient souvent à température ambiante dans les tampons phosphate contenant peu ou pas de solvant organique.

4.9.6 **Phase mobile B**, méthanol à 100 % (4.8).

4.10 **Préparation de l'étalon**

4.10.1 **Solutions étalons mères**, ρ environ 1 mg/ml. Peser avec précision environ 50 mg de chaque nucléotide 5'-monophosphate dans des fioles jaugées de 50 ml séparées. Ajouter 40 ml d'eau, mélanger jusqu'à dissolution et compléter au volume avec de l'eau.

4.10.2 **Solutions étalons de pureté**. Transférer à l'aide d'une pipette 1,0 ml de chaque solution étalon mère (4.10.1) dans des fioles jaugées de 50 ml séparées, compléter au volume avec le tampon de

normalisation (4.9.1) et mesurer l'absorbance à la λ_{\max} appropriée afin de déterminer la concentration de chaque solution étalon mère de nucléotide. Voir [Tableau 1](#) et Références [1] et [2].

Tableau 1 — Maxima d'absorbance dans l'UV et coefficients d'extinction des nucléotides 5'-monophosphates

Nucléotide 5'-monophosphate	λ_{\max} nm	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$
Adénosine 5'-monophosphate	257	428,6
Cytidine 5'-monophosphate	280	390,9
Guanosine 5'-monophosphate	254	392,0
Inosine 5'-monophosphate	249	356,5
Uridine 5'-monophosphate	262	312,7
Thymidine 5'-monophosphate	267	288,5

4.10.3 Solution étalon interne, ρ environ 80 $\mu\text{g/ml}$. Diluer 4 ml de solution étalon mère de TMP (4.10.1) dans 50 ml d'eau.

4.10.4 Solution étalon de travail, ρ environ 40 $\mu\text{g/ml}$. Transférer 2 ml de chaque solution étalon mère (4.10.1) (AMP, CMP, GMP, IMP et UMP) à l'aide d'une pipette dans une seule fiole jaugée de 50 ml et compléter au volume avec de l'eau.

4.10.5 Solutions d'étalonnage. Se reporter au [Tableau 2](#) pour connaître les concentrations nominales de nucléotide des solutions d'étalonnage.

4.10.5.1 Solution d'étalonnage 1. Transférer 0,25 ml d'étalon de travail (4.10.4) et 1 ml d'étalon interne (4.10.3) à l'aide d'une pipette dans une fiole jaugée de 25 ml et compléter au volume avec de l'eau.

4.10.5.2 Solution d'étalonnage 2. Transférer 0,5 ml d'étalon de travail (4.10.4) et 1 ml d'étalon interne (4.10.3) à l'aide d'une pipette dans une fiole jaugée de 25 ml et compléter au volume avec de l'eau.

4.10.5.3 Solution d'étalonnage 3. Transférer 2 ml d'étalon de travail (4.10.4) et 1 ml d'étalon interne (4.10.3) à l'aide d'une pipette dans une fiole jaugée de 25 ml et compléter au volume avec de l'eau.

4.10.5.4 Solution d'étalonnage 4. Transférer 5 ml d'étalon de travail (4.10.4) et 1 ml d'étalon interne (4.10.3) à l'aide d'une pipette dans une fiole jaugée de 25 ml et compléter au volume avec de l'eau.

Tableau 2 — Concentration nominale des solutions d'étalonnage

Solution d'étalonnage	Concentration de chaque nucléotide:	Concentration de TMP $\mu\text{g/ml}$
	AMP, CMP, GMP, IMP, UMP $\mu\text{g/ml}$	
1	0,4	3,2
2	0,8	3,2
3	3,2	3,2
4	8,0	3,2

5 Appareillage

Verrerie et équipement de laboratoire habituels et, en particulier, les éléments suivants.

- 5.1 **Système de CLHP**, composé d'une pompe, d'une unité d'injection d'échantillons avec boucle d'injection de 50 µl, d'une unité de dégazage, d'un four pour colonne et d'un détecteur à réseau de photodiodes.
- 5.2 **Colonne C18**, Gemini²⁾ C18, 5 µm, 4,6 mm × 250 mm (Phenomenex²⁾).
- 5.3 **Spectrophotomètre**, capable d'une lecture numérique à 3 décimales.
- 5.4 **pH-mètre**.
- 5.5 **Centrifugeuse**.
- 5.6 **Tubes de centrifugation**, Amicon Ultra MWC0 3k, 4 ml (Millipore²⁾).
- 5.7 **Tubes de centrifugation en polypropylène**, capacité 50 ml.
- 5.8 **Seringues jetables**, capacité 3 ml.
- 5.9 **Filtres seringue**, 0,2 µm avec membranes en acétate de cellulose.

5.10 **Extracteur sous vide pour SPE**.

5.11 **Cartouches de SPE par échange d'anions fort en polypropylène**, 6 ml × 1 000 mg, Chromabond SB²⁾.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.12 **Membranes filtres**, 0,45 µm nylon. [ISO 20638:2015
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2a9d12b-27c4-4e6b-a313-c67672dd518b/iso-20638-2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2a9d12b-27c4-4e6b-a313-c67672dd518b/iso-20638-2015)

6 Préparation des échantillons

- a) Agiter ou mélanger le récipient d'échantillon avant ouverture.
- b) Peser avec précision environ 1 g de poudre ou 10 ml de formule infantile, à base de lait, prête à servir/liquide, dans un tube de centrifugation de 50 ml.
- c) Ajouter 30 ml de solution d'extraction ([4.9.2](#)).
- d) Ajouter 1,0 ml d'étalon interne de TMP ([4.10.3](#)).
- e) Boucher le tube et le mélanger au vortex jusqu'à ce que la poudre soit dissoute.
- f) Laisser l'échantillon reposer 10 min pour garantir son hydratation complète.
- g) Compléter à un volume final d'environ 50 ml avec de l'eau.
- h) Boucher le tube et mélanger au vortex.
- i) Pour les produits à base d'amidon, transférer 2 × 4 ml d'échantillon préparé dans deux tubes d'ultracentrifugation séparés et centrifuger à 3 500 g pendant 60 min, puis regrouper le filtrat des deux tubes.

2) Ceci est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

7 Mode opératoire

7.1 Extraction

Tout au long de l'extraction, ne pas laisser la cartouche sécher, mais drainer jusqu'au sommet du lit de la cartouche uniquement.

Lors du drainage de la cartouche, il convient que le débit soit < 2 ml/min.

- a) Pour chaque échantillon, placer une seule cartouche de SPE sur un extracteur sous vide.
- b) Conditionner les colonnes en ajoutant 4 ml de méthanol et en drainant jusqu'au sommet du lit de la cartouche; puis ajouter 2 fractions d'eau (de 5 ml chacune) et drainer jusqu'au sommet du lit de la cartouche.
- c) Charger la cartouche avec 4 ml de solution d'échantillon et drainer jusqu'au sommet du lit de la cartouche.
- d) Laver la cartouche pour éliminer les interférences avec 4 ml de solution de lavage (4.9.3) et drainer jusqu'au sommet du lit de la cartouche.
- e) Placer un tube de recueil d'échantillon sous l'extracteur pour SPE.
- f) Éluer les nucléotides avec 4 ml de solution d'élution (4.9.4) dans un tube de recueil d'échantillon et drainer complètement la cartouche.
- g) Filtrer une aliquote d'environ 2 ml de l'éluant à travers un filtre de 0,2 µm à l'aide d'une seringue dans un flacon pour injecteur automatique.

7.2 Chromatographie

- a) Former les gradients en mélangeant les deux phases mobiles, A et B, à basse pression, la séparation des nucléotides étant obtenue par le mode opératoire fourni dans le [Tableau 3](#).

Tableau 3 — Mode opératoire du gradient pour la séparation chromatographique

Temps min	Débit ml/min	Phase mobile A %	Phase mobile B %
0	0,6	100	0
25	0,6	80	20
26	0,6	100	0
40	0,6	100	0

- b) Acquérir les données spectrales entre 210 nm et 300 nm au moyen du détecteur à réseau de photodiodes, les chromatogrammes étant exploités aux longueurs d'onde spécifiées suivantes pour la quantification.
 - 1) IMP: longueur d'onde à 250 nm.
 - 2) AMP, GMP et TMP: longueur d'onde à 260 nm.
 - 3) CMP et UMP: longueur d'onde à 270 nm.
- c) Régler le four pour colonne à 40 °C.

Des exemples de chromatogrammes sont donnés dans l'[Annexe A](#).

8 Calculs

8.1 Calculer la pureté en pourcentage de chaque nucléotide (sous forme d'acide libre) dans la solution étalon de pureté (4.10.2) (PS), en utilisant la Formule (1):

$$\text{Pureté, \%} = \frac{\text{Abs}_{\lambda_{\text{max}}}}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \times \frac{50}{m\text{SS}} \times \frac{50}{1} \times 1\ 000 \quad (1)$$

où

$\text{Abs}_{\lambda_{\text{max}}}$ est l'absorbance dans l'UV à la longueur d'onde maximale;

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ est le coefficient d'extinction du nucléotide;

$m\text{SS}$ est la masse du nucléotide dans la solution étalon mère (mg);

50 est le volume total de la solution étalon mère (ml);

50 est le volume total de la solution étalon de pureté (ml);

1 est le volume de solution étalon mère ajouté à la solution étalon de pureté (ml);

1 000 est la conversion de masse des mg en g.

8.2 Calculer la concentration du nucléotide dans la solution étalon mère (SS) (4.10.1), en utilisant la Formule (2):

$$\text{SS } (\mu\text{g/ml}) = \frac{m\text{SS}}{50} \times \frac{\text{PS}\%}{100} \times 10^3 \quad (2)$$

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2a9d12b-27c4-4e6b-a313-c67672dd518b/iso-20638-2015>

où

$m\text{SS}$ est la masse du nucléotide dans la solution étalon mère (mg);

50 est le volume total de SS (ml);

10^3 est la conversion de la concentration (des mg/ml en $\mu\text{g/ml}$);

$\text{PS}\%$ est la pureté en pourcentage;

100 est la conversion de masse (% en décimale).

8.3 Calculer la concentration du TMP dans la solution d'étalon interne (IS) (4.10.3), en utilisant la Formule (3):

$$\text{IS } (\mu\text{g/ml}) = \text{SS} \times \frac{4}{50} \quad (3)$$

où

SS est la concentration du TMP dans la solution étalon mère ($\mu\text{g/ml}$);

4 est le volume de solution étalon mère de TMP dans la solution étalon interne (ml);

50 est le volume total de la solution étalon interne (ml).

8.4 Calculer la concentration des nucléotides dans la solution étalon de travail (WS) (4.10.4), en utilisant la Formule (4):

$$WS (\mu\text{g/ml}) = SS \times \frac{2}{50} \quad (4)$$

où

SS est la concentration du nucléotide dans la solution étalon mère ($\mu\text{g/ml}$);

2 est le volume de solution étalon mère de nucléotide dans la solution étalon de travail (ml);

50 est le volume total de la solution étalon de travail (ml).

8.5 Calculer la concentration du TMP dans les solutions d'étalonnage (CS) (4.10.5), en utilisant la Formule (5):

$$CS (\mu\text{g/ml}) = IS \times \frac{1}{25} \quad (5)$$

où

IS est la concentration du nucléotide dans la solution étalon interne ($\mu\text{g/ml}$);

1 est le volume d'IS dans la solution d'étalonnage (ml);

25 est le volume total de la solution d'étalonnage (ml).

8.6 Calculer la concentration des nucléotides dans les solutions d'étalonnage (CS) (4.10.5), en utilisant la Formule (6):

$$CS (\mu\text{g/ml}) = WS \times \frac{V_{WS}}{25} \quad (6)$$

ISO 20638:2015
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2a9d12b-27c4-4e6b-a313-c67672dd518b/iso-20638-2015>

où

WS est la concentration du nucléotide dans la solution étalon de travail ($\mu\text{g/ml}$);

V_{WS} est le volume de la solution étalon de travail dans la solution d'étalonnage (ml);

25 est le volume total de la solution d'étalonnage (ml).

8.7 Déterminer la courbe de régression linéaire pour le rapport des surfaces de pic (nucléotide/TMP; axe des y) en fonction du rapport des concentrations (nucléotide/TMP; axe des x) pour les solutions d'étalonnage et calculer la pente avec l'ordonnée à l'origine forcée jusqu'à 0.

8.8 Interpoler la teneur en nucléotides des échantillons inconnus à partir de cette courbe d'étalonnage.

a) Pour les poudres:

$$\text{Nucléotide, mg/100 g} = \frac{A_{NT}}{A_{IS}} \times \frac{1}{L} \times \frac{(C_{IS} \times V_{IS})}{m_s} \times \frac{100}{1000} \quad (7)$$

b) Pour les liquides prêts à servir:

$$\text{Nucléotide, mg/100 ml} = \frac{A_{NT}}{A_{IS}} \times \frac{1}{L} \times \frac{(C_{IS} \times V_{IS})}{V_s} \times \frac{100}{1000} \quad (8)$$

où

A_{NT} est la surface de pic du nucléotide dans l'échantillon;