
**Lait, produits laitiers et formule
infantile — Détermination de la
teneur en mélamine et en acide
cyanurique par chromatographie
en phase liquide couplée à la
spectrométrie de masse en tandem
(CL-SM/SM)**

*Milk, milk products and infant formula — Determination of melamine
and cyanuric acid by liquid chromatography and tandem mass
spectrometry (LC-MS/MS)*

ISO 23970:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9cbdec64-e8bc-4a0c-ac2b-e97fabbad568/iso-23970-2021>



Numéros de référence
ISO 23970:2021(F)
FIL 252:2021(F)

© ISO et FIL 2021

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

ISO 23970:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9cbdec64-e8bc-4a0c-ac2b-e97fabbad568/iso-23970-2021>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2021

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée 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 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11

E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

International Dairy Federation
Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B
B-1030 Brussels
Tél.: + 32 2 325 67 40
Fax: + 32 2 325 67 41
E-mail: info@fil-idf.org
Web: www.fil-idf.org

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	1
5 Réactifs	2
5.1 Liste de réactifs	2
5.2 Préparation des solutions mères	2
5.3 Préparation des solutions étalons	3
5.4 Préparation des solutions d'étalonnage	4
6 Appareillage	5
7 Mode opératoire	6
7.1 Préparation des échantillons	6
7.2 Extraction	6
7.2.1 Généralités	6
7.2.2 Mode opératoire d'extraction	7
7.3 Détermination	7
8 Paramètres du système	7
8.1 Paramètres de CLHP	7
8.2 Paramètres de CLHP-SM/SM	8
8.3 Paramètres de CLUHP	9
8.4 Paramètres de CLUHP-SM/SM	10
8.5 Préparation du système CL-SM/SM et des échantillons	11
8.5.1 Réglage du système CL-SM/SM	11
8.5.2 Vérification des réglages de l'appareil	11
8.5.3 Contrôle de la sensibilité du système	11
8.5.4 Liste d'échantillons	11
9 Calcul et expression des résultats	12
9.1 Généralités	12
9.2 Critères d'étalonnage	12
9.3 Critères d'identification	12
9.4 Taux de récupération	13
9.5 Calcul des résultats	14
10 Données de fidélité	15
10.1 Généralités	15
10.2 Répétabilité	15
10.3 Reproductibilité	15
11 Rapport d'essai	16
Annexe A (informative) Données de fidélité	17
Bibliographie	19

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 attirée 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 nature volontaire des normes, 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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers* et la Fédération internationale du lait (FIL). Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

La FIL (Fédération internationale du lait) est une organisation privée à but non lucratif qui représente les intérêts des divers acteurs de la filière laitière au niveau international. Les membres de la FIL sont organisés en comités nationaux, qui sont des associations nationales composées de représentants de groupes d'intérêt nationaux dans le secteur des produits laitiers, incluant des producteurs laitiers, des acteurs de l'industrie de transformation des produits laitiers, des fournisseurs de produits laitiers, des universitaires et des représentants des gouvernements/autorités chargées du contrôle des aliments.

L'ISO et la FIL collaborent étroitement sur toutes les activités de normalisation concernant les méthodes d'analyse et d'échantillonnage du lait et des produits laitiers. Depuis 2001, l'ISO et la FIL publient conjointement leurs Normes internationales en utilisant les logos et les numéros de référence des deux organisations.

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. 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.

Le présent document a été élaboré par le Comité permanent de la FIL chargé des [titre] de la Fédération internationale du lait (FIL) et le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

L'ensemble des travaux a été confié au groupe de projet mixte ISO/FIL A05 du Comité permanent chargé des *Méthodes d'analyse des additifs et contaminants*, sous la conduite de son chef de projet, Dr S. Holroyd.

ISO 23970:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9cbdec64-e8bc-4a0c-ac2b-e97fabbad568/iso-23970-2021>

Lait, produits laitiers et formule infantile — Détermination de la teneur en mélamine et en acide cyanurique par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de la teneur en mélamine et en acide cyanurique par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM). La méthode a été validée dans le cadre d'une étude interlaboratoires par l'analyse d'échantillons dopés de formule infantile à base de lait, de formule infantile au soja, de lait en poudre, de lait entier, de boisson au soja et de chocolat au lait de teneur en mélamine comprise entre 0,71 mg/kg et 1,43 mg/kg et de teneur en acide cyanurique comprise entre 0,57 mg/kg et 1,45 mg/kg. La limite de quantification (LQ) de la mélamine et de l'acide cyanurique dans les produits alimentaires est respectivement de 0,05 mg/kg et de 0,25 mg/kg. La limite supérieure de la gamme de travail est au maximum de 10 mg/kg pour la mélamine et de 25 mg/kg pour l'acide cyanurique.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

3 Termes et définitions

Aucun terme n'est défini dans le présent document.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

4 Principe

Une prise d'essai de l'échantillon de produit alimentaire homogène est dopée par des étalons internes (mélamine et acide cyanurique) marqués au ^{13}C . Après incubation pendant au moins 1 h, de l'eau est ajoutée à l'échantillon et après agitation, la suspension obtenue est dissoute dans un mélange d'acétonitrile et d'eau. L'échantillon est homogénéisé par agitation, puis est soumis à une centrifugation. Après séparation du surnageant des dépôts, de la benzoguanamine est ajoutée à titre d'étalon de récupération. Une aliquote du surnageant aqueux est injectée dans un système CL-SM/SM. Le spectromètre de masse à triple quadripôle est couplé soit à une chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), soit à une chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (CLUHP). La chromatographie repose sur la technique de chromatographie en phase liquide à interaction hydrophile (HILIC, de l'anglais «hydrophilic interaction liquid chromatography»). L'ionisation est réalisée par ionisation électrospray (ESI, de l'anglais «electrospray ionization») en mode MRM (de l'anglais, «multiple reaction monitoring»).

5 Réactifs

5.1 Liste de réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau de qualité 1 conformément à l'ISO 3696, sauf indication contraire. Utiliser uniquement des réactifs de pureté adéquate vis-à-vis de l'analyse de mélamine et d'acide cyanurique. Vérifier la pureté des réactifs et des matériaux de référence (par exemple, solutions étalons) en effectuant un essai à blanc dans les mêmes conditions que celles utilisées dans le cadre de la méthode. Le chromatogramme ne doit révéler aucune impureté interférente aux temps de rétention des composés étudiés.

5.1.1 Acide formique, de fraction massique comprise entre 98 % et 100 % (CAS RN®¹⁾ 64-18-6).

5.1.2 Acétonitrile, de qualité pour gradient de CLHP (CAS RN® 75-05-8).

5.1.3 Acétate d'ammonium, d'une fraction massique d'environ 98 % (CAS RN® 631-61-8).

5.1.4 Méthanol, de qualité CLUHP-SM (CAS RN® 67-56-1).

5.1.5 Mélamine, de fraction massique ≥ 99 %, sous forme solide (CAS RN® 108-78-1).

5.1.6 Acide cyanurique, sous forme solide (CAS RN® 108-80-5).

5.1.7 Benzoguanamine, sous forme solide (CAS RN® 91-76-9).

5.1.8 Mélamine marquée au ^{13}C , $^{13}\text{C}_3$ (99 %), amino- $^{15}\text{N}_3$ (98 %), solution d'une concentration massique de $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$. Des solutions de mélamine/d'acide cyanurique marquées avec un autre isotope peuvent être utilisées, si elles conduisent à des résultats similaires, ce point nécessitant d'être validé de manière appropriée.

EXEMPLE 1,3,5-triazine-2,4,6-triamine- $^{13}\text{C}_3$ (mélamine), 1,3,5-triazine-2,4,6-triol- $^{13}\text{C}_3$, 2,4,6-trihydroxy-1,3,5-triazine- ^{13}C (acide cyanurique).

5.1.9 Acide cyanurique marqué au ^{13}C , $^{13}\text{C}_3$ (99 %), $^{15}\text{N}_3$ (98 %), solution à $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

NOTE D'autres solutions peuvent être utilisées conformément à [5.1.8](#).

5.2 Préparation des solutions mères

5.2.1 Solution mère de mélamine, $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

Peser, à 0,1 mg près, environ 100 mg de mélamine ([5.1.5](#)) dans un flacon en verre de 100 ml ([6.2](#)) et ajouter une quantité d'eau de masse déterminée par pesée de sorte à obtenir une concentration de $1\,000\ \mu\text{g/ml}$. Conserver la solution au réfrigérateur à $4\ ^\circ\text{C}$ ($\pm 3\ ^\circ\text{C}$). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 an.

5.2.2 Solution mère d'acide cyanurique, $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/ml}$.

Peser, à 0,1 mg près, environ 100 mg d'acide cyanurique ([5.1.6](#)) dans un flacon en verre de 100 ml ([6.2](#)) et ajouter une quantité d'eau de masse déterminée par pesée de sorte à obtenir une concentration

1) CAS Registry Number® (CAS RN®) est la marque déposée d'un produit fourni par la société CAS. Cette information est donnée pour des raisons pratiques aux utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL recommande l'emploi exclusif du produit cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il peut être démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

de 1 000 µg/ml. Conserver la solution au réfrigérateur à 4 °C (±3 °C). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 an.

5.2.3 Solution mère de benzoguanamine, $\rho = 1\,000\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Peser, à 0,1 mg près, environ 100 mg de benzoguanamine (5.1.7) dans un flacon en verre de 100 ml (6.2) et ajouter une quantité de méthanol (5.1.4) de masse déterminée par pesée de sorte à obtenir une concentration de 1 000 µg/ml. Conserver la solution au réfrigérateur à 4 °C (±3 °C). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 an.

5.2.4 Solution mère de mélamine marquée au ^{13}C , $\rho = 20\text{ }\mu\text{g/ml}$.

À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml de mélamine marquée au ^{13}C (5.1.8) dans une fiole jaugée de 50 ml (6.3). Compléter jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger. La concentration finale est de 20 µg/l. Transférer cette solution dans un flacon en verre de 100 ml (6.2). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 an.

5.2.5 Solution mère d'acide cyanurique marqué au ^{13}C , $\rho = 20\text{ }\mu\text{g/ml}$.

À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml d'acide cyanurique marqué au ^{13}C (5.1.9) dans une fiole jaugée de 50 ml (6.3). Compléter jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger. La concentration finale est de 20 µg/l. Transférer cette solution dans un flacon en verre de 100 ml (6.2). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 an.

5.3 Préparation des solutions étalons

5.3.1 Solution étalon de mélamine I, $\rho = 20\text{ }\mu\text{g/ml}$.

À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml de la solution mère de mélamine (5.2.1) dans une fiole jaugée de 50 ml (6.3). Compléter jusqu'au trait avec la solution de dilution (5.4.6) et mélanger. La concentration est de 20 µg/ml. Transférer cette solution dans un flacon en verre de 100 ml (6.2) et la conserver au réfrigérateur à 4 °C (±3 °C). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 mois.

5.3.2 Solution étalon d'acide cyanurique I, $\rho = 20\text{ }\mu\text{g/ml}$.

À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml de la solution mère d'acide cyanurique (5.2.2) dans une fiole jaugée de 50 ml (6.3). Compléter jusqu'au trait avec la solution de dilution (5.4.6) et mélanger. La concentration est de 20 µg/ml. Transférer cette solution dans un flacon en verre de 100 ml (6.2) et la conserver au réfrigérateur à 4 °C (±3 °C). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 mois.

5.3.3 Solution étalon de mélamine II, $\rho = 0,2\text{ }\mu\text{g/ml}$.

À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml de la solution étalon de mélamine I (5.3.1) dans une fiole jaugée de 100 ml (6.3). Compléter jusqu'au trait avec la solution de dilution (5.4.6) et mélanger. La concentration est de 0,2 µg/ml. Transférer cette solution dans un flacon en verre de 100 ml (6.2) et la conserver au réfrigérateur à 4 °C (±3 °C). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 mois.

5.3.4 Solution étalon d'acide cyanurique II, $\rho = 0,2\text{ }\mu\text{g/ml}$.

À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml de la solution étalon d'acide cyanurique I (5.3.2) dans une fiole jaugée de 100 ml (6.3). Compléter jusqu'au trait avec la solution de dilution (5.4.6) et mélanger. La concentration est de 0,2 µg/ml. Transférer cette solution dans un flacon en verre de 100 ml (6.2) et la conserver au réfrigérateur à 4 °C (±3 °C). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 mois.

5.3.5 Solution étalon de benzoguanamine I, $\rho = 20 \mu\text{g/ml}$.

À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml de la solution mère de benzoguanamine (5.2.3) dans une fiole jaugée de 50 ml (6.3). Compléter jusqu'au trait avec la solution de dilution (5.4.6) et mélanger. La concentration est de $20 \mu\text{g/ml}$. Transférer cette solution dans un flacon en verre de 100 ml (6.2) et la conserver au réfrigérateur à 4°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 mois.

5.3.6 Solution étalon de benzoguanamine II, $\rho = 2 \mu\text{g/ml}$.

À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml de la solution étalon de benzoguanamine I (5.3.5) dans une fiole jaugée de 10 ml (6.3). Compléter jusqu'au trait avec la solution de dilution (5.4.6) et mélanger. La concentration est de $2 \mu\text{g/ml}$. Transférer cette solution dans un flacon en verre de 20 ml (6.2) et la conserver au réfrigérateur à 4°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 mois.

5.3.7 Solution étalon de mélamine marquée au ^{13}C et d'acide cyanurique marqué au ^{13}C , $\rho = 2 \mu\text{g/ml}$.

À l'aide d'une pipette, introduire 0,5 ml de la solution mère de mélamine marquée au ^{13}C (5.2.4) et 0,5 ml de la solution mère d'acide cyanurique marqué au ^{13}C (5.2.5) dans une fiole jaugée de 5 ml (6.3). Compléter jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger. La concentration des deux composés est de $2 \mu\text{g/ml}$. Transférer cette solution dans un flacon en verre de 20 ml (6.2) et la conserver au réfrigérateur à 4°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). La solution est stable sous ces conditions pendant au moins 1 mois si la masse est soigneusement contrôlée.

5.4 Préparation des solutions d'étalonnage

5.4.1 À l'aide d'une pipette, introduire les volumes indiqués dans le Tableau 1 dans une fiole jaugée de 10 ml (6.3) et compléter jusqu'au trait avec la solution de dilution (5.4.6).

Tableau 1 — Préparation des solutions d'étalonnage

Solution d'étalonnage	Solution d'étalonnage numéro						
	1	2	3	4	5	6	7
Solution étalon de mélamine I (5.3.1), en ml	0	0	0	0	0	0,05	0,25
Solution étalon d'acide cyanurique I (5.3.2), en ml	0	0	0	0	0	0,05	0,25
Solution étalon de mélamine II (5.3.3), en ml	0	0,05	0,25	1,25	2,5	0	0
Solution étalon d'acide cyanurique II (5.3.4), en ml	0	0,05	0,25	1,25	2,5	0	0
Solution étalon de benzoguanamine II (5.3.6), en ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution étalon de mélamine marquée au ^{13}C et d'acide cyanurique marqué au ^{13}C (5.3.7), en ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Concentration en mélamine marquée au ^{13}C – en acide cyanurique marqué au ^{13}C , en $\mu\text{g/ml}$	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Concentration en mélamine native – en acide cyanurique natif, en $\mu\text{g/ml}$	0	0,001	0,005	0,025	0,05	0,1	0,5

5.4.2 Phase mobile A pour CLHP, concentration en substance de c (acétate d'ammonium) = 10 mmol/l.

Dissoudre 0,77 g d'acétate d'ammonium (5.1.3) dans 1 000 ml d'eau.

5.4.3 Phase mobile B pour CLHP

Acétonitrile (5.1.2).