

**ISO/TC 34/SC 5**

~~Date: 2022~~

**ISO 4214:2022(F)**  
**FIL 254:2022(F)**

Date: 2022-12

ISO/TC 34/SC 5

Secrétariat: NEN

## **Lait et produits laitiers — Détermination des acides aminés dans les formules infantiles, les produits nutritionnels pour adultes/enfants et autres produits laitiers**

*Milk and milk products — Determination of amino acids in infant and adult/paediatric nutritional formulas and dairy products*

(standards.iteh.ai)

~~ICS: 67.100.10~~

ISO 4214:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0ae8176-6973-494a-82df-036b2b83e8d1/iso-4214-2022>

Type du document : Norme internationale  
Sous-type du document :  
Stade du document : (60) Publication  
Langue du document : F



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO et FIL 2022

~~Droits de reproduction~~ Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en ~~œuvre~~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~~l'internet ou ~~sur~~ un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à ~~l'ISO~~ISO à ~~l'adresse~~l'adresse ci-après ou au comité membre de ~~l'ISO~~ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office

International Dairy Federation

Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8

Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B

CH-1214 Vernier, Genève

B-1030 Brussels

Tél. +41 22 749 01 11

Tél. +32 2 325 67 40

E-mail :

E-mail :

Web :

Web :

Fax: + 32 2 325 67 41

E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)

E-mail: [info@fil-idf.org](mailto:info@fil-idf.org)

Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Web: [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

Publié en Suisse

ISO 4214:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0ae8176-6973-494a-82df-036b2b83e8d1/iso-4214-2022>

<b>Sommaire</b>	<b>Page</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Préparation des réactifs et des étalons</b> .....	<b>4</b>
<b>6.1</b> <b>Généralités</b> .....	<b>4</b>
<b>6.2</b> <b>Étalons internes de norvaline (Nva)</b> .....	<b>5</b>
<b>6.3</b> <b>Solutions d'étalonnage de cystine</b> .....	<b>5</b>
<b>6.4</b> <b>Solutions d'étalonnage d'acides aminés (AA) (à l'exception de la cystine)</b> .....	<b>5</b>
<b>6.5</b> <b>Solvants de chromatographie (phases mobiles)</b> .....	<b>6</b>
<b>7</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>7</b>
<b>8</b> <b>Analyse d'échantillon</b> .....	<b>7</b>
<b>8.1</b> <b>Préparation des échantillons</b> .....	<b>7</b>
<b>8.2</b> <b>Préparation des solutions d'étalonnage de cystine</b> .....	<b>8</b>
<b>8.3</b> <b>Hydrolyse (des échantillons et des étalons de cystine)</b> .....	<b>9</b>
<b>8.4</b> <b>Neutralisation et dilution (d'échantillons et d'étalons de cystine)</b> .....	<b>9</b>
<b>8.5</b> <b>Préparation des solutions d'étalonnage d'acides aminés (non nécessaire pour une hydrolyse acide)</b> .....	<b>9</b>
<b>8.6</b> <b>Dérivatisation (d'échantillons, d'étalons de cystine et d'acides aminés)</b> .....	<b>10</b>
<b>8.7</b> <b>Séparation CLUHP</b> .....	<b>10</b>
<b>8.8</b> <b>Identification et intégration des pics</b> .....	<b>11</b>
<b>9</b> <b>Calcul et expression des résultats</b> .....	<b>12</b>
<b>9.1</b> <b>Droite d'étalonnage</b> .....	<b>12</b>
<b>9.2</b> <b>Calcul des acides aminés</b> .....	<b>12</b>
<b>10</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>14</b>
<b>10.1</b> <b>Généralités</b> .....	<b>14</b>
<b>10.2</b> <b>Répétabilité</b> .....	<b>14</b>
<b>10.3</b> <b>Reproductibilité</b> .....	<b>14</b>
<b>11</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>20</b>
<b>Annexe A (informative) Données de fidélité</b> .....	<b>21</b>
<b>Annexe B (informative) Exemples de chromatogramme</b> .....	<b>56</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>57</b>

## 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](http://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](http://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 ~~le lien suivant~~ : [www.iso.org/iso/fr/avant-propos](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le ~~Comité~~comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, ~~ainsi que par et~~ la Fédération internationale ~~de laiterie~~du lait (FIL), en collaboration avec l'AOAC ~~INTERNATIOAL~~INTERNATIONAL et l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 4, *Céréales et légumineuses*. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL et séparément par l'AOAC INTERNATIONAL.

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](http://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](http://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 ~~en charge~~ chargé des méthodes d'analyse de la composition, ~~ainsi que par~~ Fédération internationale du lait (FIL) et le Comité comité technique ISO/TC 34, Produits alimentaires, sous-comité SC 5, Lait et produits laitiers, en collaboration avec l'AOAC INTERNATIONAL et l'ISO/TC 34, Produits alimentaires, sous-comité SC 4, Céréales et légumineuses. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL et séparément par l'AOAC INTERNATIONAL.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'action FIL/ISO C51, du Comité permanent chargé des Méthodes d'analyse de la composition, sous la conduite de son chef de projet, M. C. Fuerer (CH).



# Lait et produits laitiers — Détermination des acides aminés dans les formules infantiles, les produits nutritionnels pour adultes/enfants et autres produits laitiers

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination quantitative des acides aminés totaux en utilisant la dérivation du 6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate (ACQ) suivie d'une séparation de chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (CLUHP) et d'une détection par ultraviolet (UV). Il spécifie une méthode pour la détermination, en une seule analyse, des acides aminés suivants: alanine, arginine, acide aspartique (combiné à l'asparagine), cystine (dimère de la cystéine, combiné à la cystéine), acide glutamique (combiné à la glutamine), glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine et valine.

Cette méthode ne s'applique pas à la détermination du tryptophane.

Cette méthode s'applique aux formules infantiles, aux produits nutritionnels pour adultes/enfants, aux produits laitiers et à d'autres matrices telles que les céréales. Elle a été validée dans les formules infantiles (à base de lait et de soja, y compris les produits partiellement hydrolysés et les produits élémentaires), les préparations pour nourrissons, les poudres nutritionnelles pour adultes, le lait écrémé UHT, le lactosérum en poudre, le caséinate de sodium, le lait entier en poudre, les aliments pour animaux au son, les aliments secs pour animaux et les céréales pour petit-déjeuner (voir Annexe A pour plus de détails).

## 2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

## 3 Termes et définitions

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

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 <https://www.electropedia.org/>.

### 3.1 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]

### **3.2**

#### **produits nutritionnels pour adultes/enfants**

aliments complets sur le plan nutritionnel, spécialement formulés, consommés sous forme liquide, qui peuvent constituer une source d'alimentation unique, fabriqués à partir de toute combinaison de lait, de soja, de riz, de lactosérum, de protéines hydrolysées, d'amidon et d'acides aminés, avec ou sans protéines intactes

## **4 Principe**

Les protéines sont hydrolysées dans 6 mol/l d'acide chlorhydrique (HCl) pendant 24 h à 110 °C en présence de phénol, d'acide 3-3'-dithiodipropionique (DDP) et de norvaline. Le phénol est ajouté pour prévenir l'halogénéation de la tyrosine. La norvaline est ajoutée comme étalon interne. Le DDP est ajouté pour transformer la cystine et la cystéine en S-2-carboxyéthylthiocystéine (XCys), comme décrit dans la Référence [1], et le dérivé résultant peut être séparé des autres acides aminés pour la quantification.

Après la neutralisation, les acides aminés et la cystéine transformée (XCys) sont dérivés en utilisant l'AQC. Les acides aminés dérivés sont séparés en utilisant une méthode CLUHP en phase inverse avec détection par UV à une longueur d'onde de 260 nm.

NOTE Il est possible d'utiliser une méthode de détection par fluorescence, à condition que l'équivalence ait été démontrée.

Lors de l'hydrolyse acide, la glutamine (Gln) et l'asparagine (ASN) sont transformées respectivement en acide glutamique (Glu) et en acide aspartique (Asp). Ainsi, les valeurs Glu représentent les valeurs combinées de Glu et de Gln, et les valeurs Asp représentent les valeurs combinées de Asp et Asn. Les valeurs Cys2 représentent les valeurs combinées de cystéine et de cystine puisque les deux sont converties en XCys par le DDP.

## **5 Réactifs**

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

Les références commerciales ne constituent qu'une ligne directrice. Il est possible d'utiliser des matériaux ou produits chimiques équivalents, à condition que l'équivalence ait été démontrée. Avant d'utiliser des produits chimiques, se référer aux fiches techniques de sécurité et s'assurer que les précautions de sécurité sont appliquées.

### **5.1 Kit de dérivation AccQ Tag™ Ultra (Waters 186003836<sup>1</sup>).**

<sup>1</sup> Il s'agit d'un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que la FIL ou l'ISO approuve l'emploi du produit ainsi désigné. Il a été démontré que les réactifs alternatifs énumérés dans le présent document conduisaient aux mêmes résultats.



En variante de tampon de dérivation, il est possible d'utiliser du tétraborate de disodium décahydraté (numéro de registre CAS<sup>2</sup> 1303-96-4).

Le 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (CAS 148757-94-2) peut être utilisé comme réactif de marquage alternatif.

## 5.2 Concentré d'éluant A AccQ Tag™ Ultra (Waters 1860038381).

Il est possible d'utiliser comme réactifs alternatifs l'acétonitrile, le grade de gradient pour la chromatographie liquide (CL) (CAS 75-05-8), et l'acide formique (CAS 64-18-6).

## 5.3 Éluant B Ultra AccQ·Tag™ (Waters 186003839<sup>1</sup>).

Il est possible d'utiliser comme réactifs alternatifs l'acétonitrile, le grade de gradient pour la chromatographie liquide (CL) (CAS 75-05-8), l'acide formique (CAS 64-18-6) et le formiate d'ammonium (CAS 540-69-2).

## 5.4 Phénol (CAS 108-95-2).

## 5.5 3,3'-acide dithiodipropionique (CAS 1119-62-6).

**5.6 Solution étalon d'acides aminés**, contenant les 17 acides aminés suivants à 2,5 µmol/ml chacun (sauf la ~~L~~-cystine à 1,25 µmol/ml) dans 0,1 mol/l d'HCl + ~~L~~-alanine, ~~L~~-arginine, acide ~~L~~-aspartique, ~~L~~-cystine, acide ~~L~~-glutamique, ~~L~~-glycine, ~~L~~-histidine, ~~L~~-isoleucine, ~~L~~-leucine, ~~L~~-lysine, ~~L~~-méthionine, ~~L~~-phénylalanine, ~~L~~-proline, ~~L~~-sérine, ~~L~~-thréonine, ~~L~~-tyrosine et ~~L~~-valine.

## 5.7 ~~L~~-cystine (CAS 56-89-3).

## 5.8 Norvaline (CAS 6600-40-4).

## 5.9 Pastilles d'hydroxyde de sodium, qualité réactif (CAS 1310-73-2).

## 5.10 Solution d'hydroxyde de sodium (CAS 1310-73-2), concentration de la substance $c = 1$ mol/l.

## 5.11 Solution d'hydroxyde de sodium (facultative) (CAS 1310-73-2), $c = 6$ mol/l.

## 5.12 Acide chlorhydrique fumant 37 % (CAS 7647-01-0), $c = 12$ mol/l, qualité GR pour analyse.

## 5.13 Solution d'acide chlorhydrique (CAS 7647-01-0), $c = 1$ mol/l.

## 5.14 Solution d'acide chlorhydrique (CAS 7647-01-0), $c = 0,1$ mol/l.

## 5.15 Eau de laboratoire, avec une résistivité de 18,2 MΩ-cm (eau ultra-pure).

<sup>2</sup> Le numéro de registre CAS® est une marque de la société CAS. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils aboutissent aux mêmes résultats.

## 6 Préparation des réactifs et des étalons

### 6.1 Généralités

#### 6.1.1 Solutions d'hydroxyde de sodium (NaOH), $c = 6$ mol/l, $c = 0,2$ mol/l et $c = 0,05$ mol/l.

Pour la solution  $c = 6$  mol/l, peser 24 g d'hydroxyde de sodium (5.9) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans environ 80 ml d'eau. Laisser refroidir et diluer à la marque avec de l'eau. Facultatif: utiliser un équivalent disponible dans le commerce (5.11).

Pour la solution  $c = 0,2$  mol/l, prélever à la pipette 20 ml de NaOH 1 mol/l (5.10) dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter avec de l'eau jusqu'au trait.

Pour la solution  $c = 0,05$  mol/l, prélever à la pipette 5 ml de NaOH 1 mol/l (5.10) dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter avec de l'eau jusqu'au trait.

#### 6.1.2 Solution d'acide chlorhydrique (HCl), $c = 0,2$ mol/l.

Prélever 20 ml d'HCl 1 mol/l (5.13) à la pipette dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter avec de l'eau jusqu'au trait.

#### 6.1.3 Solution de DDP, concentration massique $\rho = 10$ g/l (dans le NaOH, $c = 0,2$ mol/l).

Peser 500 mg de DDP dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter jusqu'au trait avec du NaOH 0,2 mol/l (6.1.1).

#### 6.1.4 Solution d'HCl/phénol, $\rho = 1$ g/l (dans l'HCl, $c = 12$ mol/l).

Peser 100 mg de phénol dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter jusqu'au trait avec de l'HCl 12 mol/l (5.12).

#### 6.1.5 Kit de dérivation AccQ·Tag™ Ultra.<sup>1)</sup>

Préparer les réactifs inclus dans le kit conformément aux instructions du fabricant.

#### 6.1.6 Tampon AccQ Tag™ Ultra Borate (réactif 1).<sup>1)</sup>

Solution prête à l'emploi. Le tétraborate de sodium dans une solution aqueuse ( $\rho = 50$  g/l) peut être utilisé comme réactif alternatif. Dans une fiole jaugée de 100 ml, ajouter 5 g de tétraborate de sodium décahydraté, le faire dissoudre et compléter jusqu'au repère avec de l'eau.

#### 6.1.7 Réactif AccQ·Tag™ Ultra (flacons 2A et 2B).<sup>1)</sup>

Reconstituer le réactif AccQ·Tag™ Ultra (flacon 2A) conformément aux instructions du fabricant indiquées ci-dessous:

- préchauffer un bloc chauffant à 55 °C;
- tapoter légèrement le flacon 2A avant de l'ouvrir pour s'assurer que toute la poudre de réactif AccQ Tag™ Ultra se trouve au fond du flacon;
- rincer une micropipette propre en prélevant et rejetant 1 ml de diluant de réactif AccQ·Tag™ Ultra provenant du flacon 2B (solution prête à l'emploi). Répéter deux fois;

- d) prélever 1,0 ml du flacon 2B et le transférer dans le flacon 2A contenant la poudre de réactif AccQ Tag™ Ultra. Fermer hermétiquement le flacon;
- e) mélanger avec un agitateur de type vortex pendant environ 10 s;
- f) chauffer le flacon 2A sur le bloc chauffant préchauffé jusqu'à la dissolution de la poudre de réactif AccQ·Tag™ Ultra. Ne pas chauffer le réactif pendant plus de 10 minutes.

Une fois reconstitué, la concentration du réactif AccQ·Tag™ Ultra est d'environ 10 mmol/l. Conserver le réactif AccQ·Tag™ Ultra reconstitué dans un dessiccateur à température ambiante pendant une semaine maximum.

**ATTENTION** — Le réactif AccQ·Tag™ Ultra réagit avec une atmosphère humide. Fermer hermétiquement le récipient lorsqu'il n'est pas utilisé. Ne pas réfrigérer. Ne pas utiliser de réactif décoloré, surtout s'il est jaune ou vert.

Les réactifs alternatifs suivants peuvent être utilisés. Dans un flacon de 4 ml, peser environ 3,0 mg à 4,0 mg de 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Passer à l'étape c) en utilisant de l'acétonitrile de qualité CL au lieu du diluant de réactif AccQ·Tag™ Ultra.

## 6.2 Étalons internes de norvaline (Nva)

### 6.2.1 Solution mère de Nva, $c = 10$ mmol/l.

Peser 117,16 mg de Nva dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter jusqu'au trait avec de l'HCl à 0,1 mol/l (5.14).

### 6.2.2 Solution de Nva, $c = 2,5$ mmol/l.

Prélever à la pipette 2,5 ml de solution mère de Nva (6.2.1) dans une fiole jaugée de 10 ml et compléter jusqu'au trait avec de l'HCl à 0,1 mol/l (5.14).

Conserver les deux solutions de Nva à -20 °C pendant six mois maximum sous la forme d'aliquotes de 2 ml.

## 6.3 Solutions d'étalonnage de cystine

### 6.3.1 Solution mère de cystine, $c = 10$ mmol/l.

Peser 240 mg de cystine dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter jusqu'au trait avec du NaOH à 0,05 mol/l (6.1.1). Conserver cette solution à -20 °C pendant trois mois maximum sous la forme d'aliquotes de 1 ml.

### 6.3.2 Solution de cystine, $c = 1$ mmol/l.

Ajouter 900 µl de solution de NaOH de concentration 0,05 mol/l (6.1.1) à 100 µl de solution mère de cystine (6.3.1). Préparer cette solution fraîchement avant chaque analyse.

## 6.4 Solutions d'étalonnage d'acides aminés (AA) (à l'exception de la cystine)

### 6.4.1 Solution mère d'AA, $c = 2,5$ mmol/l.

La solution étalon d'acides aminés est prête à l'emploi et contient 2,5 mmol/l de chaque acide aminé (bien que présente dans cette solution, la cystine n'est pas utilisée pour la quantification et est préparée séparément, voir 6.3).

Conserver cette solution mère de solution d'étalonnage à -20 °C pendant six mois maximum sous la forme d'aliquotes de 250 µl.

#### **6.4.2 Solution 1 d'AA, $c = 0,5$ mmol/l.**

Ajouter 600 µl de solution d'HCl de concentration 0,1 mol/l (5.14) à 150 µl de solution mère d'AA (6.4.1). Préparer cette solution fraîchement avant chaque analyse.

#### **6.4.3 Solution 2 d'AA, $c = 0,05$ mmol/l.**

Ajouter 900 µl de solution d'HCl de concentration 0,1 mol/l (5.14) à 100 µl de solution 1 d'AA (6.4.2). Préparer cette solution fraîchement avant chaque analyse.

### **6.5 Solvants de chromatographie (phases mobiles)**

#### **6.5.1 Éluant A (solvant A).**

Préparer l'éluant A du concentré de l'éluant A AccQ·Tag™ Ultra comme indiqué ci-dessous:

- a) mesurer 850 ml d'eau dans un cylindre gradué de 1 l;
- b) dans un cylindre gradué séparé, mesurer 150 ml de concentré d'éluant A AccQ·Tag™ Ultra;
- c) ajouter le concentré à l'eau et mélanger soigneusement.

Le concentré d'éluant A, une fois ouvert, doit être conservé hermétiquement fermé à environ 4 °C. L'éluant A dilué est stable pendant une semaine à température ambiante.

Il est possible d'utiliser la solution suivante comme alternative au concentré d'éluant A. Mélanger 840 ml de solution de formate d'ammonium à une concentration de 200 mmol/l (12,61 g de formiate d'ammonium dans 1 l d'eau), 110 ml d'acétonitrile et 50 ml d'acide formique. Préparer l'éluant A à partir du concentré tel que décrit ci-dessus.

#### **6.5.2 Éluant B (solvant B).**

L'éluant B AccQ·Tag™ est fourni comme solution de travail. Aucune préparation supplémentaire n'est requise. L'éluant B, une fois ouvert, doit être conservé hermétiquement fermé à environ 4 °C pendant un mois au maximum.

Il est possible d'utiliser la solution suivante comme alternative à l'éluant B. Ajouter 13,2 ml d'acide formique dans 1 l d'acétonitrile.

#### **6.5.3 Solvants de lavage.**

- a) Le solvant faible de lavage des aiguilles consiste en 50 ml/l d'acétonitrile dans de l'eau.
- b) Le solvant fort de lavage des aiguilles consiste en 950 ml/l d'acétonitrile dans de l'eau.
- c) Le solvant de lavage des joints consiste en 500 ml/l d'acétonitrile dans de l'eau.

## 7 Appareillage

**7.1 Système CLUHP** qui maintient une pression d'environ 62 MPa et peut réaliser une séparation de base des acides aminés<sup>3</sup>.

**7.2 Colonne de chromatographie**, colonne ACQUITY UPLC™ BEH C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 150 mm (Waters 186002353<sup>1</sup>) ou équivalente, à condition qu'elle permette un retour à la ligne de base entre les pics des acides aminés.

**7.3 Micropipettes réglables**, d'un volume de 10 µl, 20 µl, 200 µl et 1 000 µl et pointes.

**7.4 Agitateur de type vortex.**

**7.5 Balance analytique**, d'une précision de 0,1 mg.

**7.6 Bloc chauffant**, capable de maintenir une température de 55 °C + 2 °C.

**7.7 Four de laboratoire**, capable de maintenir une température de 110 °C ± 2 °C.

**7.8 Disque filtrant pour seringue**, fluorure de polyvinylidène 0,45 µm (PVDF) Millex®-HV (par exemple Millipore SLHV013NL<sup>1</sup>) ou équivalent).

**7.9 Seringues**, d'un volume de 2 ml.

**7.10 Tubes en verre borosilicaté (par exemple Pyrex)**, d'un volume de 10 ml avec bouchon à vis.

**7.11 Microtubes**, d'un volume de 1,5 ml et 2 ml.

**7.12 Flacon avec bouchon à vis**, d'un volume de 4 ml.

**7.12.1 Flacon à récupération totale en verre à col vissé**, 12 mm x 32 mm (Waters 186000384C<sup>1</sup>) ou équivalent).

## 8 Analyse d'échantillon

### 8.1 Préparation des échantillons

Préparer différemment divers types d'échantillons. Les produits nutritionnels pour adultes/enfants en poudre doivent être reconstitués dans de l'eau au préalable. D'autres échantillons sont utilisés sans reconstitution.

Reconstituer les échantillons de produits nutritionnels pour adultes/enfants en poudre en ajoutant 25 g de poudre dans 200 g d'eau. Mélanger soigneusement. Peser 220 mg ± 20 mg de poudres reconstitués dans un tube en verre de 10 ml avec bouchon à vis. Consigner la masse de l'échantillon à 0,1 mg près.

Pour les échantillons de produits nutritionnels prêts à l'emploi pour nourrissons et adultes/enfants et de produits laitiers liquides, peser 220 mg ± 20 mg de liquide dans un tube en verre de 10 ml avec bouchon à vis. Consigner la masse de l'échantillon à 0,1 mg près.

<sup>3</sup> Agilent 1260 Infinity II<sup>1</sup>, Waters Acquity<sup>1</sup>, Waters Acquity-I<sup>1</sup>, Waters Acquity-H<sup>1</sup> et Thermo Fisher Scientific 3000 RS<sup>1</sup> ont été utilisés avec succès au cours de l'étude interlaboratoires.

En ce qui concerne les échantillons de produits laitiers en poudre et de céréales, peser  $50 \text{ mg} \pm 5 \text{ mg}$  d'échantillons de produits laitiers en poudre ou  $100 \text{ mg} \pm 10 \text{ mg}$  d'échantillons de céréales dans un tube en verre de 10 ml avec bouchon à vis. Consigner la masse de l'échantillon à 0,1 mg près.

Dans chaque tube, ajouter de l'eau, du DDP, de l'HCl, de la Nva, et du phénol/de l'HCl selon le Tableau 1.

Ajouter la solution de phénol/HCl sous la hotte. Injecter de l'azote dans le tube pendant environ 5 s afin d'éliminer l'oxygène. Fermer les tubes avec des bouchons vissés et agiter avec un agitateur de type vortex. S'assurer que les bouchons sont propres (c'est-à-dire dépourvus de toute particule) pour garantir l'étanchéité et éviter l'évaporation au cours de l'hydrolyse.

**Tableau 1 — Préparation des tubes de prélèvement**

Solution	Formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes reconstitués, formules et échantillons de produits laitiers liquides prêts à l'emploi	Poudres de produits laitiers	Céréales
Échantillon, mg	220	50	100
Eau, µl	880	750	1 000
Solution DDP (6.1.3), µl	600	600	600
HCl à 0,2 mol/l (6.1.2), µl	600	600	600
Solution mère de Nva (6.2.1), µl	200	500	200
Solution d'HCl/phénol (6.1.4), µl	2 500	2 500	2 500

## 8.2 Préparation des solutions d'étalonnage de cystine

Le Tableau 2 décrit la méthode de préparation des solutions d'étalonnage de cystine transformée à 0 pmol/µl à 10 pmol/l avec la Nva à 10 pmol/µl (toutes sont des concentrations finales après la dérivation).

Ajouter la solution de phénol/HCl sous la hotte. Injecter de l'azote dans le tube pendant environ 5 s afin d'éliminer l'oxygène. Fermer les tubes avec des bouchons vissés et agiter avec un agitateur de type vortex. S'assurer que les bouchons sont propres (c'est-à-dire dépourvus de toute particule) pour garantir l'étanchéité et éviter l'évaporation au cours de l'hydrolyse.

**Tableau 2 — Concentration finale de cystine après dérivation**

Solution	10 pmol/µl	5 pmol/µl	2,5 pmol/µl	1 pmol/µl	0,5 pmol/µl	0 pmol/µl
Solution de cystine, µl	200 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	200 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	0
Eau, µl	900	1 000	1 050	900	1 000	1 100
Solution DDP (6.1.3), µl	600	600	600	600	600	600
HCl à 0,2 mol/l (6.1.2), µl	600	600	600	600	600	600
Solution mère de Nva (6.2.1), µl	200	200	200	200	200	200
Solution d'HCl/phénol (6.1.4), µl	2 500	2 500	2 500	2 500	2 500	2 500

<sup>a</sup> Solution mère de cystine à 10 mmol/l (6.3.1).

Solution	10 pmol/μl	5 pmol/μl	2,5 pmol/μl	1 pmol/μl	0,5 pmol/μl	0 pmol/μl
b Solution de cystine à 1 mmol/l (6.3.2).						

### 8.3 Hydrolyse (des échantillons et des étalons de cystine)

Placer les tubes dans un four à 110 °C ± 2 °C pendant 24 h ± 0,5 h.

### 8.4 Neutralisation et dilution (d'échantillons et d'étalons de cystine)

Sortir les tubes du four. Laisser les hydrolysats refroidir et les particules se déposer avant de prélever une aliquote. Lors du transfert des aliquotes, prélever à la pipette environ 1 cm en dessous de la surface du liquide. Effectuer la neutralisation sous la hotte.

Pour les formules infantiles, les échantillons de produits laitiers liquides et de céréales, ainsi que les étalons de cystine convertis, transférer 0,2 ml de chaque hydrolysate (échantillons et étalons de cystine convertis) dans un microtube de 1,5 ml, ajouter 0,2 ml de NaOH à 6 mol/l (6.1.1) et ensuite 0,4 ml d'HCl à 0,1 mol/l (5.14). Bien mélanger et transvaser dans un autre microtube de 1,5 ml en les faisant passer à travers une membrane filtrante de 0,45 μm.

Pour les échantillons de produits laitiers en poudre, transférer 0,2 ml de la solution d'échantillon d'hydrolysate dans un microtube de 2 ml, ajouter 0,2 ml de NaOH à 6 mol/l (6.1.1), puis 1,6 ml d'HCl à 0,1 mol/l (5.14). Bien mélanger et transvaser dans un autre microtube de 2 ml en les faisant passer à travers une membrane filtrante de 0,45 μm.

### 8.5 Préparation des solutions d'étalonnage d'acides aminés (non nécessaire pour une hydrolyse acide)

Le Tableau 3 décrit la méthode de préparation des solutions d'étalonnage de 0,5 ml à 0 pmol/μl jusqu'à 25 pmol/μl avec la Nva à 10 pmol/μl (toutes sont des concentrations finales après la dérivation).

Les solutions d'acides aminés sont stables pendant une semaine lorsqu'elles sont conservées à 4 °C ± 2 °C.

**Tableau 3 — Concentrations en acides aminés (individuelle, finale, après dérivation)**

Solution	25 pmol/μl	10 pmol/μl	5 pmol/μl	1 pmol/μl	0,5 pmol/μl	0 pmol/μl
Solution d'acides aminés, μl	50 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	50 <sup>c</sup>	0
Eau, μl	50	100	50	100	50	0
Solution de Nva (6.2.2), μl	20	20	20	20	20	20
HCl à 0,1 mol/l (5.14), μl	380	280	380	280	380	480
a Solution mère d'AA à 2,5 mmol/l (6.4.1).						
b Solution 1 d'AA à 0,5 mmol/l (6.4.2).						
c Solution 2 d'AA à 0,05 mmol/l (6.4.3).						