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

*Infant formula — Determination of nucleotides by liquid
chromatography*

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



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

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai

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](#).

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**

4.9.1 **Tampon de normalisation** (KH₂PO₄, $c = 0,25$ 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, $c = 1$ mol/l, EDTA $c = 4$ 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, $c = 0,3$ mol/l). Dissoudre 3,6 g de KBr (4.2) dans 100 ml d'eau.

4.9.4 **Solution d'élution** (KH₂PO₄, $c = 0,5$ 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, $c = 10$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 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: AMP, CMP, GMP, IMP, UMP $\mu\text{g}/\text{ml}$	Concentration de TMP $\mu\text{g}/\text{ml}$
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.