

ILNAS

Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

ILNAS-EN 17547:2021

Aliments des animaux - Méthodes d'échantillonnage et d'analyse - Détermination de la teneur en vitamines A, E et D - Méthode utilisant

Futtermittel - Probenahme- und
Untersuchungsverfahren - Bestimmung
des Gehalts an Vitamin A, E und D -
Verfahren mittels Reinigung durch

Animal feeding stuffs: Methods of
sampling and analysis - Determination of
vitamin A, E and D content - Method
using solid phase extraction (SPE) clean-

11/2021



Avant-propos national

Cette Norme Européenne EN 17547:2021 a été adoptée comme Norme Luxembourgeoise ILNAS-EN 17547:2021.

Toute personne intéressée, membre d'une organisation basée au Luxembourg, peut participer gratuitement à l'élaboration de normes luxembourgeoises (ILNAS), européennes (CEN, CENELEC) et internationales (ISO, IEC) :

- Influencer et participer à la conception de normes
- Anticiper les développements futurs
- Participer aux réunions des comités techniques

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

CETTE PUBLICATION EST PROTÉGÉE PAR LE DROIT D'AUTEUR

Aucun contenu de la présente publication ne peut être reproduit ou utilisé sous quelque forme ou par quelque procédé que ce soit - électronique, mécanique, photocopie ou par d'autres moyens sans autorisation préalable !

ICS 65.120

Version Française

Aliments des animaux - Méthodes d'échantillonnage et d'analyse - Détermination de la teneur en vitamines A, E et D - Méthode utilisant la purification par extraction en phase solide (SPE) et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Futtermittel - Probenahme- und Untersuchungsverfahren - Bestimmung des Gehalts an Vitamin A, E und D - Verfahren mittels Reinigung durch Festphasenextraktion und Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of vitamin A, E and D content - Method using solid phase extraction (SPE) clean-up and high-performance liquid chromatography (HPLC)

La présente Norme européenne a été adoptée par le CEN le 27 septembre 2021.

Les membres du CEN sont tenus de se soumettre au Règlement Intérieur du CEN/CENELEC, qui définit les conditions dans lesquelles doit être attribué, sans modification, le statut de norme nationale à la Norme européenne. Les listes mises à jour et les références bibliographiques relatives à ces normes nationales peuvent être obtenues auprès du Centre de Gestion du CEN-CENELEC ou auprès des membres du CEN.

La présente Norme européenne existe en trois versions officielles (allemand, anglais, français). Une version dans une autre langue faite par traduction sous la responsabilité d'un membre du CEN dans sa langue nationale et notifiée au Centre de Gestion du CEN-CENELEC, a le même statut que les versions officielles.

Les membres du CEN sont les organismes nationaux de normalisation des pays suivants: Allemagne, Autriche, Belgique, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République de Macédoine du Nord, République de Serbie, République Tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Slovaquie, Slovénie, Suède, Suisse et Turquie.



COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION
EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION

CEN-CENELEC Management Centre: Rue de la Science 23, B-1040 Bruxelles

Sommaire

	Page
Avant-propos européen	3
Introduction	4
1 Domaine d'application	5
2 Références normatives	5
3 Termes et définitions	5
4 Principe	6
5 Réactifs et matériaux	8
6 Appareillage	9
7 Échantillonnage	11
8 Préparation des échantillons	11
9 Mode opératoire	11
10 Expression des résultats	23
11 Observations	26
12 Fidélité	27
13 Rapport d'essai	28
Annexe A (informative) Exemples de combinaisons de masse, d'aliquote et de dilution permettant d'atteindre des concentrations situées sur la courbe d'étalonnage	29
Annexe B (informative) Préparation de la solution mère étalon de vitamine E (α-tocophérol) à partir d'acétate d'α-tocophérol	32
B.1 Généralités	32
B.2 Réactifs	32
B.3 Préparation de la solution mère étalon	32
B.4 Standardisation de la solution mère étalon de vitamine E (α-tocophérol) dans le cyclohexane	32
B.5 Solutions d'étalonnage et traçage de la courbe d'étalonnage des vitamines A (rétinol) et E (α-tocophérol)	33
Annexe C (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires	34
Bibliographie	40

Avant-propos européen

Le présent document (EN 17547:2021) a été élaboré par le comité technique CEN/TC 327 « Aliments des animaux - Méthodes d'échantillonnage et d'analyse », dont le secrétariat est tenu par NEN.

Cette Norme européenne devra recevoir le statut de norme nationale, soit par publication d'un texte identique, soit par entérinement, au plus tard en mai 2022, et toutes les normes nationales en contradiction devront être retirées au plus tard en mai 2022.

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. Le CEN ne saurait être tenu pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

Le présent document a été élaboré en réponse à une demande de normalisation soumise au CEN par la Commission européenne et l'Association européenne de libre-échange.

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 sur le site web du CEN.

Selon le règlement intérieur du CEN/CENELEC, les organismes de normalisation nationaux des pays suivants sont tenus de mettre cette Norme européenne en application : Allemagne, Autriche, Belgique, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République de Macédoine du Nord, République tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Serbie, Slovaquie, Slovénie, Suède, Suisse et Turquie.

Introduction

AVERTISSEMENT — La méthode décrite dans le présent document implique l'utilisation de réactifs dangereux pour la santé. La norme n'a pas pour but d'aborder tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur du présent document de prendre, avant de l'utiliser, des mesures appropriées de protection de la santé et de la sécurité du personnel et de s'assurer que les exigences réglementaires et légales sont satisfaites.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de la teneur totale en vitamine A (rétinol), vitamine E (α -tocophérol) et vitamine D₃ (cholécalférol) dans les aliments pour animaux à l'aide d'une purification par extraction en phase solide (SPE) et d'une chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

NOTE Le mode opératoire permet également de déterminer la teneur en vitamine D₂ mais en utilisant un autre étalon interne. La méthode est intégralement validée pour la vitamine D₃ uniquement.

La méthode a été soumise à essai avec succès lors d'un essai interlaboratoires effectué sur un aliment complet pour poulets, porcs et dindes, sur un prémélange pour poulets et porcelets, sur un aliment complémentaire pour vaches ainsi que sur un aliment minéral dans les gammes suivantes :

- vitamine A : 4 365 UI/kg – 4 118 352 UI/kg ;
- vitamine E : 22 mg/kg – 13 800 mg/kg ;
- vitamine D₃ : 1 668 UI/kg – 1 638 150 UI/kg.

Les limites de quantification n'ont pas été déterminées lors de l'étude de validation. Il convient normalement d'atteindre des limites de quantification de 1 100 UI/kg pour la vitamine A (par détection UV), 4 mg/kg pour la vitamine E (par détection UV), 2 mg/kg pour la vitamine E (par détection fluorimétrique) et 2 000 UI/kg pour la vitamine D (par détection UV). Des limites inférieures sont envisageables, à condition qu'elles soient validées par l'utilisateur.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte 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).

EN ISO 3696:1995, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai (ISO 3696:1987)*

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 :

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

3.1

teneur en vitamine A

rétinol

teneur en isomères tout-trans- et cis- du rétinol, déterminée conformément au présent document

Note 1 à l'article : La teneur en vitamine A (rétinol) est exprimée en Unités Internationales par kilogramme (UI/kg).

Note 2 à l'article : 1 UI de vitamine A (rétinol) équivaut à 0,300 μ g de tout-trans-rétinol ou à 0,344 μ g d'acétate de tout-trans-rétinol ou à 0,546 μ g de palmitate de tout-trans-rétinol ou à 0,359 μ g de propionate de tout-trans-rétinol.

3.2

teneur en vitamine E α -tocophérol

teneur en α -tocophérol, déterminée conformément au présent document

Note 1 à l'article : La teneur en vitamine E (α -tocophérol) peut également être exprimée en milligramme d'acétate d' α -tocophérol par kilogramme.

Note 2 à l'article : 1 mg de vitamine E (acétate d' α -tocophérol) correspond à 0,91 mg de vitamine E (α -tocophérol).

Note 3 à l'article : Du β -tocophérol, du γ -tocophérol, du δ -tocophérol ainsi que de l' α -tocotriénol, du β -tocotriénol, du γ -tocotriénol ou du δ -tocotriénol peuvent également être présents dans les échantillons. Cette méthode utilise la séparation en phase inverse qui ne sépare pas les formes individuelles du tocophérol. Par conséquent, la teneur en vitamine E, exprimée en α -tocophérol ou en acétate d' α -tocophérol, comprend toutes les formes sans tenir compte des différences d'activités des vitamines et des proportions respectives de chaque forme. Il est possible de séparer l' α -tocophérol, le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol à l'aide d'une colonne en phase normale (voir l'observation en 11.6).

3.3

teneur en vitamine D₃ cholécalférol

teneur en cholécalférol, déterminée conformément au présent document

Note 1 à l'article : La teneur en vitamine D₃ est exprimée en Unités Internationales par kilogramme (UI/kg). 1 UI correspond à une activité de 0,025 μ g de vitamine D₃ (cholécalférol).

Note 2 à l'article : Pour les denrées alimentaires, seule la vitamine D₃ est autorisée comme additif alimentaire, conformément au Règlement (CE) n° 1831/2003 [1]. L'ajout de vitamine D₂ n'est pas autorisé. Par conséquent, la vitamine D₂ peut être utilisée comme étalon interne.

Note 3 à l'article : Pour un calcul précis des résultats, il est important que l'échantillon ne contienne pas une vitamine D₂ autre que celle ajoutée comme étalon interne.

4 Principe

L'échantillon est saponifié avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium. Dans le cas où la teneur en vitamine D₃ (cholécalférol) doit être déterminée, l'étalon interne est ajouté avant la saponification. Les vitamines sont extraites et purifiées par une colonne SPE éluée au cyclohexane. Le cyclohexane est éliminé par évaporation et le résidu est dissous dans du méthanol [pour la détermination de la teneur en vitamine A (rétinol) et en vitamine E (α -tocophérol)] ou dans du *n*-hexane [pour la détermination de la teneur en vitamine D₃ (cholécalférol)].

Les concentrations en vitamine A (rétinol) et en vitamine E (α -tocophérol) dans l'extrait méthanolique sont déterminées par chromatographie liquide en phase inverse en utilisant l'étalonnage externe et des conditions de CLHP qui donnent un seul pic pour tous les isomères de rétinol ainsi que pour tous les tocophérols.

L'extrait de *n*-hexane pour la détermination de la teneur en vitamine D₃ est purifié par CLHP en phase normale semi-préparative sur gel de silice. L'extrait purifié est séparé par CLHP en phase inverse en utilisant des conditions qui donnent une séparation à la ligne de base entre la vitamine D₂ et la vitamine D₃. La quantification de la vitamine D₃ est effectuée par étalonnage externe en tenant compte du taux de récupération de l'étalon externe.

NOTE La Figure 1 est un logigramme illustrant la détermination des teneurs en vitamines A, D et E.