
**Formules infantiles et produits
nutritionnels pour adultes —
Détermination de la teneur en
vitamine C par chromatographie
liquide à (ultra) haute performance
avec détection dans l'ultraviolet
(CL(U)HP-UV)**

iTeh STANDARDS PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Infant formula and adult nutritionals — Determination of vitamin C
by (ultra) high performance liquid chromatography with ultraviolet
detection ((U)HPLC-UV)*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7d711d1a-458f-4dfa-9049-2bc3dc17c3ff/iso-20635-2018>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 20635:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7d711d1a-458f-4dfa-9049-2bc3dc17c3ff/iso-20635-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7d711d1a-458f-4dfa-9049-2bc3dc17c3ff/iso-20635-2018>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

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
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	1
5 Réactifs et matériel	2
5.1 Réactifs et étalons.....	2
5.2 Préparation des solutions.....	2
6 Appareillage	3
7 Mode opératoire	4
7.1 Préparation des échantillons.....	4
7.1.1 Généralités.....	4
7.1.2 Échantillons de poudre.....	4
7.1.3 Échantillons liquides.....	4
7.2 Extraction.....	4
7.3 Analyse.....	5
7.3.1 Conditions chromatographiques pour CLUHP.....	5
7.3.2 Conditions chromatographiques de CLHP.....	5
7.3.3 Test d'adéquation du système analytique.....	5
7.3.4 Étalonnage.....	5
7.3.5 Analyse.....	6
7.3.6 Identification.....	6
8 Calculs	6
9 Fidélité	6
9.1 Généralités.....	6
9.2 Répétabilité.....	7
9.3 Reproductibilité.....	8
Annex A (informative) Chromatogrammes types	9
Annex B (informative) Données de fidélité	12
Bibliographie	13

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.

(standards.iteh.ai)

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*, en collaboration avec AOAC INTERNATIONAL. Il est publié par l'ISO et séparément par AOAC INTERNATIONAL. La méthode décrite dans le présent document est équivalente à la Méthode officielle AOAC 2012.22: *Vitamin C in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula, Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) with Ultraviolet Detection*.

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.

Formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en vitamine C par chromatographie liquide à (ultra) haute performance avec détection dans l'ultraviolet ((CL(U)HP-UV)

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de la teneur en vitamine C (acide L-ascorbique) dans toutes les formes de formules infantiles et pour adultes (poudres, liquides prêts à consommer et concentrés liquides), par chromatographie en phase liquide à (ultra) haute performance avec détection dans l'ultraviolet CL(U)HP-UV. Le domaine d'application de la méthode est compris entre 2,5 mg/100 g (limite de quantification) et 50 mg/100 g dans le produit tel qu'il est consommé. La méthode fait la distinction entre l'acide D-ascorbique (acide isoascorbique ou acide érythorbique) et l'acide L-ascorbique.

2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

3 Termes et définitions (standards.iteh.ai)

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

3.1

produit nutritionnel pour adultes

aliment complet sur le plan nutritionnel, spécialement formulé, consommé sous forme liquide, pouvant constituer la seule source d'alimentation, constitué de n'importe quelle combinaison de lait, soja, riz, lactosérum, protéine hydrolysée, amidon et acides aminés, avec et sans protéine intacte

3.2

formule infantile

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

[SOURCE: CODEX STAN 72-1981, modifié – Le terme de la source est devenu “formule infantile”.]

4 Principe

Extraction de l'acide ascorbique contenu dans l'échantillon au moyen d'acide trichloroacétique (TCA) en présence de tris [2-carboxyéthyl]phosphine (TCEP) comme agent réducteur et pour protéger l'acide D-ascorbique de l'oxydation. L'acide ascorbique est ensuite dosé par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (CLUHP) ou par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection dans l'ultraviolet à 265 nm. La séparation se produit sur une colonne C₁₈ en

utilisant de la décylamine comme agent d'appariement d'ions, dans une solution tampon d'acétate de sodium (pH = 5,4) contenant du TCEP.

5 Réactifs et matériel

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

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ — Se référer aux fiches techniques de sécurité relatives aux matériaux avant de faire usage des produits chimiques. Utiliser les équipements de protection individuelle appropriés lors des essais.

5.1 Réactifs et étalons

5.1.1 Acétonitrile, de qualité CLHP.

5.1.2 Acide ascorbique, de pureté > 99 %.

5.1.3 Décylamine.

5.1.4 Acide phosphorique, à 85 %.

5.1.5 Eau ultra-pure, ayant une résistivité > 18 M Ω /cm.

5.1.6 Acétate de sodium trihydraté.

5.1.7 Acide trichloroacétique (TCA).

5.1.8 Tris [2-carboxyéthyl]phosphine (TCEP).

5.1.9 Acide isoascorbique.

5.1.10 Acide orotique.

5.2 Préparation des solutions

IMPORTANT — La vitamine C est sensible à la lumière et à l'oxygène. Effectuer les différentes opérations sous éclairage atténué ou utiliser de la verrerie ambrée. Tenir toutes les solutions à l'abri de la lumière directe.

5.2.1 Solution d'acétate de sodium, concentration $c = 0,500$ mol/l (pH = 5,4)

Dans une fiole jaugée de 500 ml, peser 34,0 g d'acétate de sodium trihydraté (5.1.6), ajouter environ 400 ml d'eau et homogénéiser. Ajuster le pH à 5,4 avec de l'acide phosphorique à 85 % (5.1.4) et compléter au volume avec de l'eau.

5.2.2 Solution de TCA, à 15 %.

Dans une fiole jaugée de 500 ml, peser 75,0 g de TCA (5.1.7), dissoudre et compléter au volume avec de l'eau.

5.2.3 Solution de TCEP, concentration massique $\rho = 250 \mu\text{g/ml}$.

Dans une fiole jaugée de 500 ml, peser 125 mg de TCEP (5.1.8), dissoudre et compléter au volume avec de l'eau.

5.2.4 Phase mobile pour CLUHP.

Dans un récipient de 250 ml, mélanger 0,4 g de décylamine (5.1.3), 2,5 ml d'acétonitrile (5.1.1), 25 ml de la solution d'acétate de sodium (5.2.1) et 205 ml d'eau. Ne pas compléter au volume. Ajuster le pH à 5,4 avec de l'acide phosphorique à 85 % (5.1.4). Ajouter 10 mg de TCEP (5.1.8).

NOTE Les phases mobiles sont troubles pendant la préparation mais elles deviennent limpides après l'ajustement du pH.

5.2.5 Phase mobile pour CLHP.

Dans un récipient de 1000 ml, mélanger 1,6 g de décylamine (5.1.3), 80 ml d'acétonitrile (5.1.1), 100 ml de la solution d'acétate de sodium (5.2.1) et 820 ml d'eau. Ne pas compléter au volume. Ajuster le pH à 5,4 avec de l'acide phosphorique à 85 % (5.1.4). Ajouter 50 mg de TCEP (5.1.8).

5.2.6 Solution mère d'acide ascorbique, $\rho = 500 \mu\text{g/ml}$.

Dans une fiole jaugée (6.2) en verre ambré de 25 ml, peser 12,5 mg d'acide ascorbique (5.1.2). Dissoudre et compléter au volume avec la solution de TCEP (5.2.3). Cette solution peut être conservée pendant 3 mois si elle est stockée à 4 °C à l'abri de la lumière.

5.2.7 Solution étalon intermédiaire d'acide ascorbique, $\rho = 50 \mu\text{g/ml}$.

Dans une fiole jaugée (6.2) en verre ambré de 10 ml, introduire à la pipette 1 ml de solution mère (5.2.6). Compléter au volume avec la solution de TCEP (5.2.3). Cette solution peut être utilisée pendant 1 mois si elle est stockée à 4 °C à l'abri de la lumière.

5.2.8 Solutions étalons d'acide ascorbique pour étalonnage, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$, $\rho = 1,0 \mu\text{g/ml}$, $\rho = 2,0 \mu\text{g/ml}$, $\rho = 3,0 \mu\text{g/ml}$, $\rho = 5,0 \mu\text{g/ml}$, $\rho = 7,5 \mu\text{g/ml}$ et $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$.

Dans des fioles jaugées (6.2) en verre ambré de 10 ml, introduire à la pipette 0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 1,0 ml, 1,5 ml et 2,0 ml de la solution étalon intermédiaire (5.2.7). Compléter au volume avec la phase mobile pour préparer les différentes concentrations susmentionnées.

6 Appareillage

Verrerie et matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

6.1 Balances, de résolution 0,1 mg et 0,01 g.

6.2 Fioles jaugées, en verre ambré, de 10 ml, 25 ml, de classe A conformément à l'ISO 1042.

6.3 Bécher, en verre ambré, 250 ml.

6.4 pH-mètre.

6.5 Papier-filtre¹⁾.

1) Plissé, de qualité 5971/2 ou Schleicher & Schuell sont des exemples de produits disponibles 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 ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

6.6 Membranes filtrantes, filtres pour seringue, de porosité 0,22 µm ou 0,45 µm.

6.7 Colonne de CLUHP, Waters Acquity UPLC® ethylene bridged hybrid (BEH) colonne C₁₈²⁾, de longueur 100 mm, de diamètre intérieur 2,1 mm et de diamètre de particules de 1,75 µm ou l'équivalent.

6.8 Colonne de CLHP, colonne²⁾ Licrospher® RP-18 de longueur 250 mm, de diamètre intérieur 4,6 mm et de diamètre de particules de 5 µm ou l'équivalent.

6.9 Système de CL, CLHP ou CLUHP équipé d'une pompe quaternaire ou binaire, d'un injecteur d'échantillon, d'un détecteur UV-VIS (ou facultativement d'un détecteur à barrette de diodes), d'un système de dégazage et d'un logiciel de traitement des données.

7 Mode opératoire

7.1 Préparation des échantillons

7.1.1 Généralités

Si le produit contient de l'amidon, ajouter 50 mg d'α-amylase aux suspensions (7.1.2) et incubé pendant 15 min à 40 °C pour diminuer la viscosité et faciliter la manipulation. Bien mélanger les échantillons liquides pour garantir leur homogénéité et passer directement à l'extraction.

7.1.2 Échantillons de poudre

Peser 25,0 g (m_1) de poudre dans un bécher (6.3) en verre brun de 250 ml et ajouter 10 mg de TCEP (5.1.8). Ajouter 200,0 g (m_2) d'eau chaude (40 °C). Bien mélanger jusqu'à dissolution complète. Peser avec exactitude 2,0 g (m_3) de la suspension d'échantillon homogénéisée dans une fiole jaugée (6.2) en verre ambré de 10 ml. Calculer la masse de l'échantillon (m_s) à l'aide de la Formule (1):

$$m_s = m_1 \times m_3 / (m_1 + m_2) \quad (1)$$

Procéder à l'extraction (7.2) dès que possible car la vitamine C peut se dégrader rapidement. Ne pas laisser les échantillons reconstitués reposer plus de 30 min.

7.1.3 Échantillons liquides

Peser 2,0 g (m_s) d'échantillon liquide dans une fiole jaugée (6.2) en verre ambré de 10 ml.

Procéder à l'extraction (7.2) dès que possible car la vitamine C peut se dégrader rapidement. Ne pas laisser reposer plus de 15 min.

7.2 Extraction

Ajouter 4 ml de la solution de TCEP (5.1.8) et 2 ml de la solution de TCA (5.2.2) à l'échantillon préparé (7.1). Compléter au volume avec de l'eau. Filtrer la solution sur papier filtre (6.5). Transférer 1 ml de filtrat dans une fiole jaugée (6.2) en verre ambré de 10 ml contenant 1 ml de la solution d'acétate (5.2.1) et compléter au volume avec la phase mobile (5.2.4) ou (5.2.5). Filtrer environ 2 ml sur une membrane filtrante (6.6) dans un flacon pour CLHP.

2) Ceci est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. 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 ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

7.3 Analyse

7.3.1 Conditions chromatographiques pour CLUHP

Volume d'injection:	5 µl.
Température de l'injecteur d'échantillon automatique:	10 °C.
Température de la colonne:	25 °C.
Débit:	0,35 ml/min.
Durée de fonctionnement:	4,0 min.
Phase mobile:	Acétate de sodium (50 mmol/l, pH = 5,4), décylamine (1,6 g/l), acétonitrile (1 %), TCEP (40 mg/l).
Détection:	UV à 265 nm

À la fin de chaque série analytique, rincer la colonne avec un mélange d'une partie par volume d'acétonitrile et d'une partie par volume d'eau pendant 10 min à un débit de 0,4 ml/min.

7.3.2 Conditions chromatographiques de CLHP

Volume d'injection:	25 µl.
Température de l'injecteur d'échantillon automatique:	10 °C.
Température de la colonne:	25 °C.
Débit:	1,0 ml/min.
Durée de fonctionnement:	20 min.
Phase mobile:	Acétate de sodium (50 mmol/l, pH = 5,4), décylamine (1,6 g/l), acétonitrile (10 %), TCEP (40 mg/l).
Détection:	UV à 265 nm.

À la fin de chaque série analytique, rincer la colonne avec un mélange d'une partie par volume d'acétonitrile et d'une partie par volume d'eau pendant 60 min à un débit de 1,0 ml/min.

7.3.3 Test d'adéquation du système analytique

Équilibrer le système chromatographique pendant une durée $\geq 0,5$ h. Injecter l'une des solutions étalons d'acide L-ascorbique (5.2.8) au moins six fois et vérifier les temps de rétention et la réponse du pic (hauteur ou surface). Calculer la réponse moyenne (hauteur du pic ou surface du pic) et l'écart type. Il convient que le coefficient de variation n'excède pas 2 %. Injecter les solutions étalons (5.2.8) sur une base régulière pendant une série analytique. Veiller à ce que l'acide orotique et l'acide isoascorbique soient complètement résolus par rapport à l'acide L-ascorbique en injectant les solutions étalons des deux composés (préparées comme pour l'acide L-ascorbique). Si la résolution n'est pas correcte, il est possible de diminuer le pH de la phase mobile jusqu'à pH = 5,0, ou d'augmenter la quantité d'acétonitrile.

7.3.4 Étalonnage

Procéder à l'injection de toutes les solutions étalons (5.2.8) au moins au début et à la fin de chaque série analytique. Établir la courbe d'étalonnage (sept points) en représentant la réponse du pic (hauteur ou