

---

---

**Formules infantiles et produits  
nutritionnels pour adultes —  
Détermination de la teneur en vitamine  
D par chromatographie liquide couplée  
à la spectrométrie de masse**

*Infant formula and adult nutritionals — Determination of vitamin D  
by liquid chromatography-mass spectrometry*  
**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 20636:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ebc1455-d6e0-4eaf-bb5e-100f4c417bbb/iso-20636-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ebc1455-d6e0-4eaf-bb5e-100f4c417bbb/iso-20636-2018>



## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 20636:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ebc1455-d6e0-4eaf-bb5e-100f4c417bbb/iso-20636-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ebc1455-d6e0-4eaf-bb5e-100f4c417bbb/iso-20636-2018>



### 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](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
<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 et matériaux</b> .....	<b>2</b>
5.1    Généralités.....	2
5.2    Préparation du réactif.....	2
5.3    Préparation de l'étalon.....	3
5.4    Solutions d'étalonnage.....	4
<b>6</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>5</b>
<b>7</b> <b>Préparation des échantillons</b> .....	<b>6</b>
7.1    Préparation des échantillons de poudre.....	6
7.2    Préparation des échantillons de suspension.....	6
7.3    Préparation des échantillons de liquide.....	6
<b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>6</b>
8.1    Extraction et dérivatisation.....	6
8.2    Chromatographie.....	7
8.3    Spectrométrie de masse.....	7
<b>9</b> <b>Calculs</b> .....	<b>9</b>
<b>10</b> <b>Résultats</b> .....	<b>13</b>
<b>11</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>13</b>
11.1    Généralités.....	13
11.2    Répétabilité.....	13
11.3    Reproductibilité.....	14
<b>Annex A (informative) Exemples de spectres et chromatogrammes</b> .....	<b>16</b>
<b>Annex B (informative) Données de fidélité</b> .....	<b>19</b>
<b>Annex C (informative) Autres paramètres d'instrument</b> .....	<b>21</b>
<b>Annex D (informative) Comparaison entre l'ISO 20636 et l'EN 12821</b> .....	<b>22</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>24</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.

(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 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 technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, en collaboration avec l'AOAC INTERNATIONAL. Il est publié par l'ISO et séparément par l'AOAC INTERNATIONAL. La méthode décrite dans le présent document est équivalente à la Méthode officielle de l'AOAC 2016.05, *Analysis of Vitamin D<sub>2</sub> and Vitamin D<sub>3</sub> in Fortified Milk Powders, Infant Formulas, and Adult/Pediatric Nutritional Formulas*.

Il convient d'adresser les commentaires ou questions portant sur le présent document à l'organisme national de normalisation de l'utilisateur. Un référencement complet de ces organismes est disponible à l'adresse [www.iso.org/members.html](http://www.iso.org/members.html).

# Formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en vitamine D par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

**AVERTISSEMENT** — L'utilisation de la présente méthode peut impliquer des matériaux, des opérations et des équipements dangereux. La présente méthode n'a pas pour but de traiter les problèmes de sécurité qui peuvent être liés à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de la présente méthode de mettre en place des pratiques appropriées en matière de santé et de sécurité.

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode destinée à la détermination quantitative de la vitamine D<sub>2</sub> et/ou de la vitamine D<sub>3</sub> dans les formules infantiles et les produits nutritionnels pour adultes sous forme solide (à savoir les poudres) ou sous forme liquide (à savoir les liquides prêts à l'emploi et les liquides concentrés) par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. La plage d'application s'étend de 0,15 µg/100 g (limite de quantification) à 59 µg/100 g pour la vitamine D<sub>2</sub>, et de 0,25 µg/100 g à 65 µg/100 g pour la vitamine D<sub>3</sub>.

## 2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ebc1455-d6e0-4eaf-bb5e-100f4c417bbb/iso-20636-2018>

## 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 <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, composé 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, 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]

## 4 Principe

Des échantillons sont saponifiés à haute température, puis les composants lipidiques solubles sont extraits dans de l'isooctane. Une partie de la couche d'isooctane est transférée et lavée, puis une aliquote de 4-phényl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) est ajoutée pour dériver la vitamine D afin de former un adduit facilement ionisable de masse moléculaire élevée. L'adduit de vitamine D est ensuite de nouveau extrait dans un petit volume d'acétonitrile et analysé par chromatographie liquide en phase inverse. La détection est réalisée par spectrométrie de masse en mode MRM (multiple reaction monitoring). Des étalons internes de vitamine D<sub>2</sub>-d<sub>6</sub> et de vitamine D<sub>3</sub>-d<sub>6</sub> marquées par un isotope stable sont utilisés pour la quantification afin de corriger les pertes d'extraction et toute variation d'efficacité dans la dérivation et l'ionisation[2].

## 5 Réactifs et matériaux

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.

### 5.1 Généralités

5.1.1 **Étalons**, de pureté ≥ 99 %.

5.1.2 **Vitamine D<sub>2</sub>**, ergocalciférol.

5.1.3 **Vitamine D<sub>3</sub>**, cholécalciférol.

5.1.4 **Vitamine D<sub>2</sub>-d<sub>6</sub>**, ergocalciférol 26,26,26,27,27,27-d<sub>6</sub>.

5.1.5 **Vitamine D<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>**, cholécalciférol 26,26,26,27,27,27-d<sub>6</sub>.

5.1.6 **PTAD** (4-phényl-1,2,4-triazoline-3,5-dione).

5.1.7 **Acide formique** (HCO<sub>2</sub>H), de qualité CL-SM.

5.1.8 **Hydroxyde de potassium** (KOH).

5.1.9 **Pyrogallol** (C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(OH)<sub>3</sub>).

5.1.10 **Éthanol** (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH).

5.1.11 **Méthanol** (CH<sub>3</sub>OH), de qualité CL-SM.

5.1.12 **Isooctane** ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

5.1.13 **Acétone** (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>).

5.1.14 **Acétonitrile** (CH<sub>3</sub>CN), de qualité CL-SM.

### 5.2 Préparation du réactif

5.2.1 **Solution de PTAD**, c(4-phényl-1,2,4-triazoline-3,5-dione) = 10 mg/ml. Dissoudre 50 mg de PTAD (5.1.6) dans 5,0 ml d'acétone (5.1.13).

**5.2.2 Solution d'hydroxyde de potassium**,  $c(\text{KOH}) = 8,9 \text{ mol/l}$ . Dissoudre 100 g d'hydroxyde de potassium (5.1.8) dans 200 ml d'eau.

**5.2.3 Solution éthanolique de pyrogallol**,  $c(\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3) = 0,079 \text{ mol/l}$ . Dissoudre 5 g de pyrogallol (5.1.9) dans 500 ml d'éthanol (5.1.10).

**5.2.4 Phase mobile A**,  $c(\text{HCO}_2\text{H}) = 0,0265 \text{ mol/l}$ . Ajouter 0,5 ml d'acide formique (5.1.7) à 500 ml d'eau.

**5.2.5 Phase mobile B**, méthanol, 500 ml (5.1.11).

### 5.3 Préparation de l'étalon

**5.3.1** La vitamine D est sensible à la lumière. Réaliser toutes les étapes sous éclairage incandescent de faible intensité. Si seule la vitamine D<sub>3</sub> est exigée pour l'analyse, il n'est alors pas nécessaire d'utiliser les étalons correspondant à la vitamine D<sub>2</sub>, et inversement. Il convient de regrouper les solutions d'étalonnage au début et à la fin d'un cycle d'analyse.

**5.3.2 Solution étalon mère de vitamine D<sub>2</sub> marquée par un isotope stable**,  $\rho \approx 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Répartir le contenu d'un flacon de 1 mg de vitamine D<sub>2</sub>-d<sub>6</sub> (5.1.4) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans 90 ml d'éthanol (5.1.10). Pour favoriser la dissolution, passer au bain à ultrasons, le cas échéant. Mélanger soigneusement, compléter au volume avec de l'éthanol (5.1.10). Mesurer l'absorbance d'une aliquote à 265 nm. Il convient de régler le zéro du spectrophotomètre à l'aide d'un blanc d'éthanol (5.1.10). Calculer et consigner la teneur. Répartir immédiatement les aliquotes (~1,3 ml) dans des flacons cryogéniques et les congeler à  $< -15 \text{ } ^\circ\text{C}$  pendant une durée maximale de 6 mois.

**5.3.3 Solution étalon mère de vitamine D<sub>3</sub> marquée par un isotope stable**,  $\rho \approx 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Répartir le contenu d'un flacon de 1 mg de vitamine D<sub>3</sub>-d<sub>6</sub> (5.1.5) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans 90 ml d'éthanol (5.1.10). Pour favoriser la dissolution, passer au bain à ultrasons, le cas échéant. Mélanger soigneusement, compléter au volume avec de l'éthanol (5.1.10). Mesurer l'absorbance d'une aliquote à 265 nm. Il convient de régler le zéro du spectrophotomètre à l'aide d'un blanc d'éthanol (5.1.10). Calculer et consigner la teneur. Répartir immédiatement les aliquotes (~1,3 ml) dans des flacons cryogéniques et les congeler à  $< -15 \text{ } ^\circ\text{C}$  pendant une durée maximale de 6 mois.

**5.3.4 Solution étalon interne marquée par un isotope stable**,  $\rho \approx 1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . En fonction du nombre d'échantillons à analyser au cours d'un cycle, il est nécessaire de préparer un volume plus ou moins important de solution étalon interne marquée par un isotope stable. Pour chaque ensemble de 15 échantillons (complet ou partiel) dans un cycle d'analyse, retirer 1 flacon de solution étalon mère de vitamine D<sub>2</sub> marquée par un isotope stable (5.3.2) et/ou 1 flacon de solution étalon mère de vitamine D<sub>3</sub> marquée par un isotope stable (5.3.3) du congélateur et les laisser réchauffer à température ambiante. Prélever à la pipette 1,0 ml de solution étalon mère de vitamine D<sub>2</sub> marquée par un isotope stable (5.3.2) et/ou 1,0 ml de solution étalon mère de vitamine D<sub>3</sub> marquée par un isotope stable (5.3.3) et les déposer respectivement dans une fiole jaugée de 10 ml (utiliser une fiole jaugée de 10 ml séparée pour chaque ensemble de 15 échantillons). Compléter chaque fiole jaugée de 10 ml au volume avec de l'acétonitrile, regrouper les fioles et mélanger soigneusement. Renouveler la préparation chaque jour.

**5.3.5 Solution étalon mère de vitamine D<sub>2</sub> non marquée**,  $\rho \approx 1 \text{ mg/ml}$ . Peser avec précision environ 50 mg de vitamine D<sub>2</sub> (5.1.2) dans une fiole jaugée de 50 ml. Dissoudre dans 40 ml d'éthanol (5.1.10). Pour favoriser la dissolution, passer au bain à ultrasons, le cas échéant. Mélanger soigneusement, compléter au volume avec de l'éthanol (5.1.10). Conserver au congélateur à  $< -15 \text{ } ^\circ\text{C}$  pendant une durée maximale d'un mois.

**5.3.6 Solution étalon mère de vitamine D<sub>3</sub> non marquée**,  $\rho \approx 1 \text{ mg/ml}$ . Peser avec précision environ 50 mg de vitamine D<sub>3</sub> (5.1.3) dans une fiole jaugée de 50 ml. Dissoudre dans 40 ml d'éthanol (5.1.10). Pour favoriser la dissolution, passer au bain à ultrasons, le cas échéant. Mélanger soigneusement,



compléter au volume avec de l'éthanol (5.1.10). Conserver au congélateur à  $< -15$  °C pendant une durée maximale d'un mois.

**5.3.7 Solution étalon de pureté de vitamine D<sub>2</sub> non marquée**,  $\rho \approx 10$  µg/ml. Prélever à la pipette 1,0 ml de solution étalon mère de vitamine D<sub>2</sub> non marquée (5.3.5) et la déposer dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter au volume avec de l'éthanol (5.1.10). Mesurer l'absorbance d'une aliquote à 265 nm. Il convient de régler le zéro du spectrophotomètre à l'aide d'un blanc d'éthanol (5.1.10). Consigner l'absorbance et calculer la teneur. Renouveler la préparation chaque jour.

**5.3.8 Solution étalon de pureté de vitamine D<sub>3</sub> non marquée**,  $\rho \approx 10$  µg/ml. Prélever à la pipette 1,0 ml de solution étalon mère de vitamine D<sub>3</sub> non marquée (5.3.6) et la déposer dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter au volume avec de l'éthanol (5.1.10). Mesurer l'absorbance d'une aliquote à 265 nm. Il convient de régler le zéro du spectrophotomètre à l'aide d'un blanc d'éthanol (5.1.10). Consigner l'absorbance et calculer la teneur. Renouveler la préparation chaque jour.

**5.3.9 Solution étalon de travail non marquée**,  $\rho \approx 1$  µg/ml. Prélever à la pipette 1,0 ml de solution étalon de pureté de vitamine D<sub>2</sub> non marquée (5.3.7) et/ou 1,0 ml de solution étalon de pureté de vitamine D<sub>3</sub> non marquée (5.3.8) et les déposer respectivement dans une fiole jaugée de 10 ml. Compléter au volume avec de l'acétonitrile (5.1.14) et mélanger soigneusement. Renouveler la préparation chaque jour.

## 5.4 Solutions d'étalonnage

**5.4.1** Voir [Tableau 1](#) pour connaître les teneurs nominales en vitamine D des solutions d'étalonnage. Renouveler la préparation chaque jour.

**5.4.2 Solution d'étalonnage 1.** Prélever à la pipette 10 µl de solution étalon de travail non marquée (5.3.9) et 250 µl de solution étalon interne marquée par un isotope stable (5.3.4) et les déposer dans une fiole jaugée de 25 ml. Ajouter 5 ml d'acétonitrile (5.1.14) et 75 µl de solution de PTAD (5.2.1), agiter pour mélanger et laisser reposer dans l'obscurité pendant 5 min. Ajouter 6,25 ml d'eau, puis compléter au volume avec de l'acétonitrile (5.1.14), mélanger et transférer dans le flacon pour CLHP prêt pour l'analyse.

**5.4.3 Solution d'étalonnage 2.** Prélever à la pipette 50 µl de solution étalon de travail non marquée (5.3.9) et 250 µl de solution étalon interne marquée par un isotope stable (5.3.4) et les déposer dans une fiole jaugée de 25 ml. Ajouter 5 ml d'acétonitrile (5.1.14) et 75 µl de solution de PTAD (5.2.1), agiter pour mélanger et laisser reposer dans l'obscurité pendant 5 min. Ajouter 6,25 ml d'eau, puis compléter au volume avec de l'acétonitrile (5.1.14), mélanger et transférer dans le flacon pour CLHP prêt pour l'analyse.

**5.4.4 Solution d'étalonnage 3.** Prélever à la pipette 250 µl de solution étalon de travail non marquée (5.3.9) et 250 µl de solution étalon interne marquée par un isotope stable (5.3.4) et les déposer dans une fiole jaugée de 25 ml. Ajouter 5 ml d'acétonitrile (5.1.14) et 75 µl de solution de PTAD (5.2.1), agiter pour mélanger et laisser reposer dans l'obscurité pendant 5 min. Ajouter 6,25 ml d'eau, puis compléter au volume avec de l'acétonitrile (5.1.14), mélanger et transférer dans le flacon pour CLHP prêt pour l'analyse.

**5.4.5 Solution d'étalonnage 4.** Prélever à la pipette 500 µl de solution étalon de travail non marquée (5.3.9) et 250 µl de solution étalon interne marquée par un isotope stable (5.3.4) et les déposer dans une fiole jaugée de 25 ml. Ajouter 5 ml d'acétonitrile (5.1.14) et 75 µl de solution de PTAD (5.2.1), agiter pour mélanger et laisser reposer dans l'obscurité pendant 5 min. Ajouter 6,25 ml d'eau, puis compléter au volume avec de l'acétonitrile (5.1.14), mélanger et transférer dans le flacon pour CLHP prêt pour l'analyse.

**5.4.6 Solution d'étalonnage 5.** Prélever à la pipette 1 250 µl de solution étalon de travail non marquée (5.3.9) et 250 µl de solution étalon interne marquée par un isotope stable (5.3.4) et les déposer dans une



fiolle jaugée de 25 ml. Ajouter 5 ml d'acétonitrile (5.1.15) et 75 µl de solution de PTAD (5.2.1), agiter pour mélanger et laisser reposer dans l'obscurité pendant 5 min. Ajouter 6,25 ml d'eau, puis compléter au volume avec de l'acétonitrile (5.1.15), mélanger et transférer dans le flacon pour CLHP prêt pour l'analyse.

**Tableau 1 — Teneur nominale des solutions d'étalonnage**

Solution d'étalonnage	Teneur en vitamine D ng/ml	Teneur en vitamine D-d6 ng/ml
1	0,4	10
2	2,0	10
3	10	10
4	20	10
5	50	10

## 6 Appareillage

Verrerie et équipement de laboratoire habituels et, en particulier, les éléments suivants.

**6.1 Système de chromatographie liquide à ultra haute performance (CLUHP)**, composé d'un système à double pompe, d'une unité d'injection d'échantillons, d'une unité de dégazage et d'un four pour colonne.

**6.2 Spectromètre de masse triple quadripôle**, avec une sensibilité suffisante pour détecter et quantifier la vitamine D dans l'adduit de PTAD à 0,4 ng/ml.

**6.3 Colonne de silice à noyau solide**, par exemple, colonnes Phenomenex Kinetex<sup>1)</sup> C<sub>18</sub> 2,6 µm, 2,1 mm × 50 mm ou équivalent.

**6.4 Spectrophotomètre**, capable d'une lecture numérique à trois décimales.

**6.5 Tubes à centrifuger**, polypropylène, 15 ml.

**6.6 Tubes à essai pour ébullition**, verre, 60 ml.

**6.7 Bain-marie**, 20 °C à 70 °C.

**6.8 Seringues jetables**, capacité 1 ml.

**6.9 Filtres seringue**, PTFE, 0,2 µm, 13 mm.

**6.10 Centrifugeuses**, adaptées pour des tubes à essai pour ébullition de 60 ml et des tubes à centrifuger de 15 ml.

**6.11 Pipettes Pasteur**, verre, ~140 mm.

**6.12 Agitateur horizontal**

**6.13 Tubes de microcentrifugeuse**, 2 ml.

1) Il s'agit d'un exemple de produit adapté et 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 ce produit.

6.14 Membranes filtres, 0,45 µm polyamide.

6.15 Flacons cryogéniques, 2 ml.

6.16 Flacons, septums et bouchons pour chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

## 7 Préparation des échantillons

### 7.1 Préparation des échantillons de poudre

Peser avec précision 1,8 g à 2,2 g d'échantillon de poudre dans un tube à essai pour ébullition. Consigner la masse.

### 7.2 Préparation des échantillons de suspension

Peser avec précision 19,0 g à 21,0 g de poudre dans un récipient pour suspension à usage unique. Consigner la masse.

Peser avec précision ~80 ml d'eau dans le récipient. Consigner la masse.

Agiter soigneusement pour mélanger. Placer le récipient dans l'obscurité à température ambiante pendant 15 min et agiter pour mélanger toutes les 5 min.

Peser avec précision 9,5 g à 10,5 g de poudre reconstituée dans un tube à essai pour ébullition. Consigner la masse.

### 7.3 Préparation des échantillons de liquide

Peser avec précision 10,0 ml de lait liquide dans un tube à essai pour ébullition. Consigner la masse.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Extraction et dérivation

Dans un tube à essai pour ébullition, ajouter 10 ml de solution éthanolique de pyrogallol (5.2.3) et 0,5 ml de solution étalon interne marquée par un isotope stable (5.3.4) à l'échantillon de poudre, de suspension ou de liquide; boucher et mélanger avec un agitateur de type vortex.

Ajouter 2 ml de solution d'hydroxyde de potassium (5.2.2) au tube à essai pour ébullition; boucher et mélanger avec un agitateur de type vortex.

Placer le tube à essai pour ébullition dans le bain-marie à 70 °C pendant 1 h, mélanger avec un agitateur de type vortex toutes les 15 min.

Placer le tube à essai pour ébullition dans le bain-marie à température ambiante jusqu'à ce qu'il ait refroidi.

Ajouter 10 ml d'isooctane (5.1.12) au tube à essai pour ébullition; boucher le tube à essai pour ébullition et le placer dans l'agitateur horizontal pendant 10 min.

Ajouter 20 ml d'eau au tube à essai pour ébullition et retourner le tube 10 fois; le placer dans la centrifugeuse à  $\geq 250 g$  pendant 15 min.

Transférer une aliquote de 5 ml de la couche supérieure d'isooctane dans un tube à centrifuger de 15 ml à l'aide d'une pipette Pasteur en veillant à ne transférer aucun élément de la couche inférieure (jeter le tube à essai pour ébullition avec la couche inférieure).

Ajouter 5 ml d'eau au tube à centrifuger, boucher et mélanger avec un agitateur de type vortex, puis placer dans la centrifugeuse à 2 000 *g* pendant 5 min.

Transférer 4 ml à 5 ml de la couche supérieure d'isooctane dans un nouveau tube à centrifuger jetable de 15 ml à l'aide d'une pipette jetable en veillant à ne transférer aucun élément de la couche inférieure (jeter le tube à centrifuger avec la couche inférieure).

Ajouter 75 µl de solution de PTAD (5.2.1) au tube à centrifuger, boucher et mélanger immédiatement avec un agitateur de type vortex.

Laisser reposer dans l'obscurité pendant 5 min pour permettre une réaction complète de dérivation.

Ajouter 1 ml d'acétonitrile au tube à centrifuger, boucher et mélanger avec un agitateur de type vortex, puis placer dans la centrifugeuse à 2 000 *g* pendant 5 min.

À l'aide d'une pipette à volume variable, transférer 500 µl de la couche inférieure dans un tube de micro-centrifugeuse (6.13) en veillant à ne transférer aucun élément de la couche supérieure.

Ajouter 167 µl d'eau au tube de micro-centrifugeuse (6.13), boucher et mélanger avec un agitateur de type vortex.

À l'aide d'un filtre seringue, transférer une aliquote du tube de micro-centrifugeuse (6.13) dans un flacon ambre pour CLHP avec bouchon, prêt pour l'analyse.

## 8.2 Chromatographie

Former des gradients de haute pression en mélangeant les deux phases mobiles, A et B, selon le mode opératoire fourni dans le [Tableau 2](#). Des informations sur les temps de rétention prévus et les spectres des ions produits sont données dans l'[Annexe A](#).

**Tableau 2 — Mode opératoire du gradient pour la séparation chromatographique**

Temps min	Débit ml/min	Phase mobile A %	Phase mobile B %
0 DÉMARRAGE	0,6	25	75
3,3 POMPE	0,6	0	100
3,7 POMPE	1,0	0	100
4,8 POMPE	1,0	0	100
4,9 POMPE	0,6	25	75
5,5 ARRÊT	0,6	25	75

## 8.3 Spectrométrie de masse

Configurer le spectromètre de masse avec le paramétrage d'instrument correspondant indiqué dans le [Tableau 3](#). Ces valeurs sont fournies à titre indicatif; il est donc nécessaire de les optimiser pour chaque instrument utilisé. Des exemples d'autres paramètres d'instrument sont donnés dans l'[Annexe C](#).

**Tableau 3 — Paramètres du spectromètre de masse**

Paramètre d'instrument	Valeur
mode ionisation	ESI <sup>+</sup>
gaz rideau	207 kPa (30 psi)
gaz de nébulisation	277 kPa (40 psi)

Ces paramètres sont applicables à un spectromètre de masse Sciex 6500. Le spectromètre de masse Sciex 6500 est un exemple de produit adapté et 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 ce produit.

Tableau 3 (suite)

Paramètre d'instrument	Valeur
gaz de chauffage	277 kPa (40 psi)
gaz de collision	N <sub>2</sub>
température de la source	300 °C
tension de pulvérisation ionique	5 500 V

Ces paramètres sont applicables à un spectromètre de masse Sciex 6500. Le spectromètre de masse Sciex 6500 est un exemple de produit adapté et 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 ce produit.

Les paramètres spécifiques aux composés à utiliser sont indiqués dans les [Tableaux 4](#) et [5](#).

**Tableau 4 — Paramètres de composés (méthode instrumentale pour la vitamine D<sub>2</sub> uniquement)**

Ion de vitamine D <sub>2</sub> <sup>a</sup>	Ion précurseur <i>m/z</i>	Ion produit <i>m/z</i>	PD V	PE V	EC V	PSC V	Temps d'acquisition ms
transition de quantification pour l'analyte	572,2	298,0	81	10	23	22	120
transition de qualification pour l'analyte	572,2	280,0			39	16	80
transition de quantification pour l'étalon interne	578,2	298,0			23	22	120
transition de qualification pour l'étalon interne	578,2	280,0			39	16	80

**Légende**

PD: potentiel de dissociation <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ebc1455-d6e0-4eaf-bb5e-100f4c417bbb/iso-20636-2018>

PE: potentiel d'entrée

EC: énergie de collision

PSC: potentiel de sortie de la cellule de collision

<sup>a</sup> Analyte = adduit de PTAD-vitamine D<sub>2</sub>, ion d'étalon interne = adduit de PTAD-vitamine D<sub>2</sub>-d<sub>6</sub>