
**Formules infantiles et produits
nutritionnels pour adultes —
Détermination de la teneur en acide
pantothénique par chromatographie
liquide à ultra haute performance et
spectrométrie de masse en tandem
(CLUHP-SM/SM)**

iTeh STANDARDS VIEW
(standards.iteh.ai)

*Infant formula and adult nutritionals — Determination of
pantothenic acid by ultra high performance liquid chromatography
and tandem mass spectrometry method (UHPLC-MS/MS)*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/deb66ace-37fb-48a4-a678-a463b0e15ff2/iso-20639-2015>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20639:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/deb66ace-37fb-48a4-a678-a463b0e15ff2/iso-20639-2015>



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 Mode opératoire	3
6.1 Préparation de l'échantillon.....	3
6.1.1 Généralités.....	3
6.1.2 Échantillons de poudre mélangés à sec.....	3
6.1.3 Échantillons de poudre issus d'un mélange par voie humide.....	4
6.1.4 Échantillons liquides.....	4
6.2 Extraction.....	4
6.3 Analyse.....	4
6.3.1 Analyse chromatographique.....	4
6.3.2 Conditions CLUHP.....	4
6.3.3 Conditions SM/SM.....	5
6.3.4 Identification.....	5
7 Calculs	5
Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes	7
Annexe B (informative) Données de fidélité	8
Bibliographie	9

iTeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 20639:2015
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/deb66ace-37fb-48a4-a678-a463b0e15ff2/iso-20639-2015>

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](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de66ace-371b-48a4-ab78-a463b0e15ff2/iso-20639-2015).

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 2012.16: *Acide pantothénique (vitamine B₅) dans les formules infantiles et les produits nutritionnels pour adultes/pédiatriques par chromatographie liquide ultra haute performance et spectrométrie de masse en tandem*.

Formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en acide pantothénique par chromatographie liquide à ultra haute performance et spectrométrie de masse en tandem (CLUHP-SM/SM)

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 détermination de la teneur en acide pantothénique, excluant les formes liées, dans les formules infantiles et les produits nutritionnels pour adultes (poudres) par chromatographie liquide ultra haute performance et spectrométrie de masse en tandem (CLUHP-SM/SM).

2 Termes et définitions

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

2.1 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

2.2 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]

3 Principe

Extraction de l'acide pantothénique au moyen d'une solution tampon d'acétate d'ammonium à 0,4 mol/l. Après filtration, analyse de la solution finale par chromatographie liquide ultra haute performance et spectrométrie de masse en tandem (CLUHP-SM/SM).

4 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.

4.1 Étalons

4.1.1 **D-pantothénate de calcium**, Sigma¹⁾ ou l'équivalent CAS 137-08-6.

4.1.2 **Pantothénate de calcium-[¹³C₆, ¹⁵N₂]**, IsoSciences¹⁾ ou l'équivalent CAS 356786-94-2.

4.2 **α-Amylase**, Sigma A3176¹⁾, issue de pancréas porcin, environ 25 U/mg ou l'équivalent.

4.3 Solvants

4.3.1 **Acétonitrile**, qualité CL ou l'équivalent.

4.4 **Acétate d'ammonium**, qualité ACS, > 98 % (Fluka 9690)¹⁾.

4.5 **Acide acétique**, qualité ACS.

4.6 **Acide formique**, qualité ACS.

4.7 **Acide formique à 1 % dans l'eau**, qualité ACS.

4.8 Préparation des solutions étalons

4.8.1 **Solution mère d'acide pantothénique (AP)**, $\rho = 250 \mu\text{g/ml}$. Peser 54,5 mg de pantothénate de calcium (4.1.1) dans une fiole jaugée de 200 ml (tenir compte de la teneur en humidité indiquée sur le certificat du fournisseur ou sécher jusqu'à masse constante à 105 °C) et compléter au volume avec de l'eau. Conserver des aliquotes à -20 °C.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/deb66ace-37fb-48a4-a678-a463b0d1583/iso-20639-2015>

4.8.2 **Solution intermédiaire d'acide pantothénique**, $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$. Transférer 1 ml de solution mère d'AP (4.8.1) dans une fiole jaugée de 25 ml et compléter au volume avec de l'eau. Conserver des aliquotes à -20 °C.

4.8.3 **Solution mère de pantothénate de calcium-[¹³C₆, ¹⁵N₂] [EI (étalon interne)]**, $\rho = 20 \mu\text{g/ml}$. Peser 5,0 mg de pantothénate de calcium-[¹³C₆, ¹⁵N₂] (4.1.2) dans une fiole jaugée de 250 ml et compléter au volume avec de l'eau. Conserver des aliquotes à -20 °C.

4.8.4 **Solutions pour la courbe d'étalonnage à cinq points**. Transférer des volumes appropriés de solution intermédiaire d'AP (10 $\mu\text{g/ml}$) (4.8.2) dans des fioles jaugées de 10 ml pour obtenir cinq concentrations différentes d'AP (0,08 $\mu\text{g/ml}$, 0,16 $\mu\text{g/ml}$, 0,32 $\mu\text{g/ml}$, 0,64 $\mu\text{g/ml}$ et 1,2 $\mu\text{g/ml}$). Ajouter 500 μl de solution mère d'EI (20 $\mu\text{g/ml}$) (4.8.3) et compléter au volume avec de l'eau. La concentration de l'EI dans chaque solution étalon est de 1 $\mu\text{g/ml}$. Conserver des aliquotes de ces solutions à -20 °C pendant un mois au maximum avant utilisation.

4.8.5 **Solution d'acétate d'ammonium**, $c = 400 \text{ mmol/l}$, pH = 3,8 (utilisée pour l'extraction de l'échantillon). Dans un bécher de 500 ml, ajouter (30,8 ± 0,10) g d'acétate d'ammonium. Ajouter environ 300 ml d'eau et agiter pour dissoudre à l'aide d'un agitateur magnétique. Ajuster à pH = 3,8 ± 0,1, en ajoutant délicatement de l'acide acétique glacial (environ 150 ml sont nécessaires). Transférer dans une fiole jaugée de 1 000 ml et compléter au volume avec de l'eau. Cette solution est stable pendant un mois à 4 °C.

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 ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5 Appareillage

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

- 5.1 Balances**, avec lisibilité de 0,1 mg, capacité de 210 g; avec lisibilité de 0,1 g, capacité de 4 100 g.
- 5.2 pH-mètre**, avec lisibilité de 0,01 unité de pH.
- 5.3 Homogénéisateur**²⁾.
- 5.4 Agitateur magnétique avec barreaux aimantés.**
- 5.5 Filtres.** Filtres seringue, porosité 0,22 µm, diamètre interne 33 mm, Millex-GV³⁾ PVDF (Millipore)³⁾. Filtres disques à membrane, porosité 0,45 µm (Millipore)³⁾ ou l'équivalent.
- 5.6 Système de CLUHP-SM/SM**, colonne de CLUHP, par exemple ACQUITY UPLC[®] ³⁾ couplée avec un détecteur de type triple quadripôle équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) et colonne T3 (1,8 µm, 100 mm × diamètre interne 2,1 mm; Waters Corp.)³⁾ ou l'équivalent.

6 Mode opératoire

6.1 Préparation de l'échantillon

6.1.1 Généralités

Si le produit contient de l'amidon, ajouter 50 mg d' α -amylase aux suspensions et mettre en incubation pendant 15 min à 40 °C pour réduire la viscosité et faciliter la manipulation. Bien mélanger les échantillons liquides pour garantir leur homogénéité et passer directement à l'extraction. Si l'homogénéité de l'échantillon de poudre n'est pas connue, supposer qu'il est non homogène et procéder selon [6.1.2](#).

6.1.2 Échantillons de poudre mélangés à sec

Pour les échantillons de poudre mélangés à sec/non homogènes, peser exactement environ 25,0 g (m_1). Ajouter 200,0 g (m_2) d'eau à 40 °C avant de mélanger jusqu'à ce qu'une suspension homogène soit obtenue. Un homogénéisateur ([5.3](#)) peut être utilisé si nécessaire. Peser exactement une aliquote d'environ 15,0 g (m_3) de suspension d'échantillon homogénéisée dans une fiole jaugée de 50 ml. Calculer la masse de l'échantillon (m_s est l'équivalent poudre) en utilisant la Formule (1):

$$m_s = \frac{m_1 \times m_3}{m_2} \quad (1)$$

où

m_1 est la masse d'échantillon pesée, en g;

m_2 est la masse d'eau ajoutée avant de mélanger, en g;

2) Polytron PT3000 (élément moteur), Aggregate PT-DA 3012 (Kinematics, Lucerne, Suisse) sont des exemples de produits appropriés 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 ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

3) 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 ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

m_3 est la masse de suspension d'échantillon homogénéisée, en g.

6.1.3 Échantillons de poudre issus d'un mélange par voie humide

Pour les échantillons de poudre homogènes issus d'un mélange par voie humide, peser exactement environ 2,0 g d'échantillon (m_s) dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 14 g d'eau à 40 °C. Mélanger jusqu'à ce qu'une suspension homogène soit obtenue.

6.1.4 Échantillons liquides

Pour les échantillons liquides, peser exactement environ 20,0 g (m_s) dans une fiole jaugée de 50 ml.

6.2 Extraction

En utilisant l'échantillon préparé (6.1), ajouter un volume de 25 ml d'une solution d'acétate d'ammonium à 0,4 mol/l, pH = 3,8. Diluer l'extrait d'échantillon au volume avec de l'eau. Ajouter un barreau aimanté et agiter pendant 10 min. Filtrer une prise de 20 ml sur filtre plissé (grade 597½). Procéder à l'analyse chromatographique.

6.3 Analyse

6.3.1 Analyse chromatographique

Transférer une aliquote de 1,0 ml du filtrat obtenu en 6.2 dans un tube en polypropylène de 15 ml contenant 500 µl de solution mère d'EI (4.8.3). Il est fondamental d'utiliser la même solution d'EI que celle utilisée pour la préparation de la courbe d'étalonnage (4.8.4). Diluer la solution à 10 ml avec de l'eau, boucher et mélanger. Filtrer sur un filtre seringue de 0,22 µm (5.5). Injecter dans le système de CLUHP-SM/SM.

Des exemples de chromatogrammes sont donnés dans l'Annexe A.
ISO 20639:2015
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c606ace-37fb-48a4-a678-a463b0e15f2/iso-20639-2015>

6.3.2 Conditions CLUHP

Volume d'injection:	2 µl
Température de la colonne:	30 °C
Débit:	0,45 ml/min
Phase mobile A:	Acide formique à 0,1 % (v/v) dans l'eau
Phase mobile B:	Acétonitrile

Le programme du gradient pour la colonne est fourni dans le [Tableau 1](#).

Tableau 1 — Gradient pour colonne

Temps min	Phase mobile A %	Phase mobile B %
0	92	8
2,2	80	20
2,4	50	50
4,0	50	50
4,1	92	8
7,0	92	8

Diriger le flux de la chromatographie liquide dans le détecteur SM entre 0 min et 2 min uniquement, afin d'empêcher autant que possible l'encrassement de la source.

6.3.3 Conditions SM/SM

- ESI positive
- Tension du capillaire, 2,2 kV
- Tension du cône, 25 V
- Tension de l'extracteur, 3,0 V
- Température de la source, 140 °C
- Température de désolvatation, 350 °C
- Débit gazeux du cône, 40 l/h
- Débit gazeux de désolvatation, 700 l/h

Régler l'énergie de collision à 14 V avec un temps d'acquisition pour chaque transition analysée de 0,1 s. Ces valeurs sont fournies à titre indicatif et il est nécessaire de les optimiser pour chaque instrument utilisé. Surveiller entre 0 min et 2,1 min les transitions m/z 220,2 → 90,1 pour l'AP et m/z 224,2 → 94,1 pour l'EI marqué par un isotope radioactif.

6.3.4 Identification

La détection par SM en mode de surveillance à réaction unique inclut la détection simultanée des ions moléculaires correspondant à l'AP et à l'AP marqué par un isotope radioactif. Les transitions de masse sélectionnées sont respectivement m/z 220,2 → 90,1 et m/z 224,2 → 94,1.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/deb66ace-37fb-48a4-a678-a463b0e15f2/iso-20639-2015>

7 Calculs

Calculer pour chaque étalon le rapport de surface de pic entre AP et EI. Établir une courbe d'étalonnage à 5 points (allant de 0,16 ng à 2,4 ng sur la colonne) en représentant le rapport de surface de pic (axe des y) en fonction de la concentration d'AP (axe des x). Calculer la régression linéaire. Il est recommandé d'utiliser une courbe de régression pondérée (1/x).

Calculer la pente (S) et l'ordonnée à l'origine (I) de la courbe d'étalonnage.

Calculer la fraction massique de l'AP, w , en mg/100 g, en utilisant la Formule (2):

$$w = \frac{(A - I) \times V_1 \times V_3 \times 100}{S \times m \times V_2 \times 1000} \quad (2)$$

où

A est le rapport de surface de pic AP/EI dans la solution pour essai;

I est l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage;

S est la pente de la courbe d'étalonnage;

V_1 est le volume de l'extrait d'échantillon, en ml (= 50);

V_2 est le volume du filtrat pipeté, en ml (= 1);

V_3 est le volume final de la solution pour essai, en ml (= 10);