
**Formules infantiles et produits
nutritionnels pour adultes —
Détermination de la teneur en
vitamine E et de la teneur en vitamine
A par chromatographie liquide à haute
performance en phase normale**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Infant formula and adult nutritionals — Determination of
vitamin E and vitamin A by normal phase high performance liquid
chromatography*

[ISO 20633:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe953f3-2d46-44a0-ac83-25a471ca009b/iso-20633-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe953f3-2d46-44a0-ac83-25a471ca009b/iso-20633-2015>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20633:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe953f3-2d46-44a0-ac83-25a471ca009b/iso-20633-2015>



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	2
5 Appareillage	6
6 Mode opératoire	7
6.1 Préparation de l'échantillon.....	7
6.1.1 Généralités.....	7
6.1.2 Échantillons de poudre mélangés à sec.....	7
6.1.3 Échantillons de poudre issus d'un mélange par voie humide.....	7
6.1.4 Échantillons liquides.....	7
6.1.5 Extraction des échantillons.....	8
6.2 Analyse par CLHP.....	8
6.2.1 Généralités.....	8
6.2.2 Paramètres du détecteur.....	8
6.2.3 Cycle d'élution à gradient de la pompe.....	8
7 Adéquation du système	9
8 Calculs	9
Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes	11
Annexe B (informative) Données de fidélité	17
Annexe C (informative) Comparaison entre l'AOAC 2012.10, l'EN 12822 et l'EN 12823-1	21
Bibliographie	25

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.

(standards.iteh.ai)

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/91e95313-2d46-44a0-ac85-25a471ca009b/iso-20633-2015).

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 2012-10: *Formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en vitamine E et de la teneur en vitamine A par chromatographie liquide à haute performance en phase normale*.

Formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en vitamine E et de la teneur en vitamine A par chromatographie liquide à haute performance en phase normale

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 simultané de la vitamine E (α -tocophérol et acétate d' α -tocophéryle) et de la vitamine A (isomères 13-*cis* et tout-*trans* du palmitate de rétinyle et de l'acétate de rétinyle) présentes dans toutes les formes de formules infantiles et pour adultes (poudres, liquides prêts à servir et liquides concentrés).

Le rétinol n'est pas utilisé à des fins d'enrichissement et n'est donc pas abordé dans cette méthode. Sa quantité présente naturellement dans les produits n'est pas significative.

Les stéréoisomères de la vitamine E, α -tocophérol et acétate d' α -tocophéryle, ne sont pas différenciés dans la présente méthode.

[ISO 20633:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe953f3-2d46-44a0-ac83-25a471ca009b/iso-20633-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe953f3-2d46-44a0-ac83-25a471ca009b/iso-20633-2015>

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

Ce mode opératoire utilise l'enzyme protéolytique papaïne pour hydrolyser le revêtement protéique hydrophile des micelles de matière grasse dans le lait ou les formules infantiles à base de soja en solution aqueuse. Le contenu hydrophobe des micelles est ensuite extrait quantitativement dans l'iso-octane, en une seule extraction. L'extrait est analysé par CLHP en phase normale en utilisant une colonne analytique avec élution en gradient. La quantification de l' α -tocophérol et l'acétate d' α -tocophéryle est effectuée en utilisant la détection en fluorescence, avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission

de 280 nm et de 310 nm. Le palmitate de rétinyle (*cis* et *trans*) et l'acétate de rétinyle (*cis* et *trans*) sont quantifiés par détection dans l'UV à 325 nm.

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 Éther de méthyl-*t*-butyle, également désigné par *tert*-butylméthyléther, qualité CLHP.

4.2 *n*-Hexane, qualité CLHP.

4.3 Éthanol, qualité CLHP.

4.4 Méthanol, qualité CLHP.

4.5 Iso-octane (2,2,4-triméthylpentane), qualité CLHP.

4.6 Papaïne (de *Carica papaya*), ≥ 3 U/mg, Sigma 76220¹⁾ ou l'équivalent.

4.7 Hydroquinone, Sigma H9003¹⁾ ou l'équivalent.

4.8 Acide acétique glacial, qualité réactif analytique.

4.9 Acétate de sodium anhydre.

4.10 Solution diluée d'acide chlorhydrique.

ISO 20633:2015
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe953f3-2d46-44a0-ac83-25a471ca009b/iso-20633-2015>

Diluer 100 ml de solution d'acide chlorhydrique de fraction massique 36 % à 200 ml avec de l'eau.

4.11 Solution de papaïne, concentration massique $\rho = 20$ g/l.

Dissoudre 100 mg d'hydroquinone et 4 g d'acétate de sodium anhydre dans environ 80 ml d'eau dans une fiole jaugée de 100 ml à un trait (5.11). Ajuster le pH à 5,0 avec une solution diluée d'acide chlorhydrique (4.10). Ajouter 2 g de papaïne et compléter au volume. Préparer une solution fraîche avant utilisation.

4.12 Solution de méthanol acidifiée.

Ajouter 20 ml d'acide acétique glacial à 1 l de méthanol et mélanger. Préparer une solution fraîche le jour de l'utilisation.

4.13 Phase mobile de CLHP A.

n-Hexane, filtré et dégazé pendant 15 min dans un bain à ultrasons.

4.14 Phase mobile de CLHP B.

Mélanger 750 ml de *n*-hexane avec 250 ml d'éther méthyl-*t*-butylique. Ajouter 3 ml de méthanol, filtrer et dégazer pendant 15 min dans un bain à ultrasons.

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.

4.15 Substances étalons

4.15.1 Étalon de référence de palmitate de rétinyle, étalon de référence primaire. L'étalon doit contenir un antioxydant. CAS 78-81-2.

4.15.2 Étalon de référence d'acétate de rétinyle, étalon de référence primaire. CAS 127-47-9.

4.15.3 Étalon de référence d'acétate d' α -tocophéryle, étalon de référence primaire. CAS 7695-91-2.

4.15.4 Étalon de référence d' α -tocophérol, étalon de référence primaire. CAS 10191-41-0.

4.16 Solutions étalons

4.16.1 Solution étalon mère de palmitate de rétinyle.

Peser, à 0,01 mg près, environ 70 mg de palmitate de rétinyle (4.15.1) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.11). Dissoudre et diluer au volume avec de l'iso-octane (4.5).

4.16.2 Solution étalon mère d'acétate de rétinyle.

Peser, à 0,01 mg près, environ 35 mg d'acétate de rétinyle (4.15.2) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.11). Dissoudre et diluer au volume avec de l'éthanol (4.3).

4.16.3 Solution étalon mère d'acétate d' α -tocophéryle.

Peser, à 0,01 mg près, environ 180 mg d'acétate d' α -tocophéryle (4.15.3) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.11). Dissoudre et diluer au volume avec de l'iso-octane.

4.16.4 Solution étalon mère d' α -tocophérol.

Peser, à 0,01 mg près, environ 100 mg d' α -tocophérol (4.15.4) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.11). Dissoudre et diluer au volume avec de l'iso-octane.

NOTE Les solutions étalons mères ci-dessus sont stables au réfrigérateur à une température comprise entre 4 °C et 8 °C pendant 7 jours.

4.16.5 Solution étalon de travail combinée 1.

Transférer à l'aide d'une pipette 4 ml de solution étalon mère de palmitate de rétinyle (4.16.1), 4 ml de solution étalon mère d'acétate de rétinyle (4.16.2), 7 ml de solution étalon mère d'acétate d' α tocophéryle (4.16.3) et 20 ml de solution étalon mère d' α -tocophérol (4.16.4), dans une fiole jaugée de 50 ml (5.11) et diluer au volume avec de l'iso-octane. Préparer une solution fraîche avant utilisation.

4.16.6 Solution étalon de travail combinée 2.

Transférer à l'aide d'une pipette 8 ml de solution étalon de travail combinée 1 (4.16.5) dans une fiole jaugée de 100 ml (5.11) et diluer au volume avec de l'iso-octane. Préparer une solution fraîche avant utilisation.

4.16.7 Solutions d'étalonnage

Dans des fioles jaugées de 50 ml séparées (5.11), transférer à l'aide d'une pipette 0,5 ml, 2 ml, 4 ml, 8 ml, 16 ml et 32 ml de solution étalon de travail combinée 2 (4.16.6) et diluer au volume avec de l'iso-octane.

Ces solutions sont utilisées pour construire une courbe d'étalonnage multipoints. Préparer ces solutions quotidiennement avant utilisation.

NOTE Pour les essais de routine, et selon la plage de concentration des analytes dans les échantillons pour essai, une courbe d'étalonnage à 3 ou 4 points peut être utilisée, à condition que les plages soient situées entre les points le plus bas et le plus élevé de la courbe à 6 points indiquée ci-dessus.

4.17 Détermination de la pureté de chaque solution étalon mère

4.17.1 Pureté spectrométrique de la solution mère de palmitate de rétinyle

Prélever, à l'aide d'une pipette, 1 ml de la solution étalon mère de palmitate de rétinyle (4.16.1), l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml (5.11) et compléter au volume avec de l'éthanol. Déterminer l'absorption à 325 nm, après avoir établi le zéro sur une cellule en quartz de 1 cm contenant de l'éthanol. Répéter la mesure deux autres fois, en rinçant la cuve d'échantillon avec la solution avant chaque mesure. Calculer la mesure d'absorbance moyenne. Calculer la pureté spectrométrique à une décimale, SP_{RP} , du palmitate de rétinyle en utilisant la Formule (1):

$$SP_{RP} = \frac{A}{975} \times \frac{50}{m_{st}} \times \frac{100}{1} \times 10 \quad (1)$$

où

- A est la mesure d'absorbance moyenne;
- 975 est le coefficient d'extinction du palmitate de rétinyle à 325 nm (voir Référence [1]);
- m_{st} est la masse de l'étalon de référence en mg.

4.17.2 Pureté spectrométrique de la solution mère d'acétate de rétinyle

Prélever, à l'aide d'une pipette, 1 ml de la solution étalon mère d'acétate de rétinyle (4.16.2), l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml (5.11) et compléter au volume avec de l'éthanol. Déterminer l'absorption à 325 nm, après avoir établi le zéro sur une cellule en quartz de 1 cm contenant de l'éthanol. Répéter la mesure deux autres fois, en rinçant la cuve d'échantillon avec la solution avant chaque mesure. Calculer la mesure d'absorbance moyenne. Calculer la pureté spectrométrique à une décimale, SP_{RA} , de l'acétate de rétinyle en utilisant la Formule (2):

$$SP_{RA} = \frac{A}{1560} \times \frac{50}{m_{st}} \times \frac{100}{1} \times 10 \quad (2)$$

où

- A est la mesure d'absorbance moyenne;
- 1 560 est le coefficient d'extinction de l'acétate de rétinyle à 325 nm (voir Référence [1]);
- m_{st} est la masse de l'étalon de référence en mg.

4.17.3 Pureté spectrométrique de la solution mère d'acétate d'α-tocophéryle

Prélever, à l'aide d'une pipette, 3 ml de la solution étalon mère d'acétate d'α-tocophéryle (4.16.3), l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml (5.11) et compléter au volume avec de l'éthanol. Déterminer l'absorption à 284 nm, après avoir établi le zéro sur une cellule en quartz de 1 cm contenant de l'éthanol. Répéter la mesure deux autres fois, en rinçant la cuve d'échantillon avec la solution avant chaque

mesure. Calculer la mesure d'absorbance moyenne. Calculer la pureté spectrométrique à une décimale, SP_{TA} , de l'acétate d' α -tocophéryle en utilisant la Formule (3):

$$SP_{TA} = \frac{A}{43,6} \times \frac{50}{m_{st}} \times \frac{100}{3} \times 10 \quad (3)$$

où

- A est la mesure d'absorbance moyenne;
- 43,6 est le coefficient d'extinction de l'acétate d' α -tocophéryle à 284 nm (voir Référence [1]);
- m_{st} est la masse de l'étalon de référence en mg.

4.17.4 Pureté spectrométrique de la solution mère d' α -tocophérol

Prélever, à l'aide d'une pipette, 3 ml de solution étalon mère d' α -tocophérol (4.16.4), les introduire dans une fiole jaugée de 100 ml (5.11) et compléter au volume avec de l'éthanol. Déterminer l'absorption à 292 nm, après avoir établi le zéro sur une cellule en quartz de 1 cm contenant de l'éthanol. Répéter la mesure deux autres fois, en rinçant la cuve d'échantillon avec la solution avant chaque mesure. Calculer la mesure d'absorbance moyenne. Calculer la pureté spectrométrique à une décimale, SP_T , de l' α -tocophérol en utilisant la Formule (4):

$$SP_T = \frac{A}{75,8} \times \frac{50}{m_{st}} \times \frac{100}{3} \times 10 \quad (4)$$

où

- A est la mesure d'absorbance moyenne;
- 75,8 est le coefficient d'extinction de l' α -tocophérol à 292 nm (voir Référence [1]);
- m_{st} est la masse de l'étalon de référence en mg.

4.17.5 Pureté chromatographique des solutions étalons mères

Préparer chaque solution étalon mère séparément de la manière suivante.

Dans quatre fioles jaugées de 100 ml séparées (5.11), transférer à l'aide d'une pipette 1 ml de chacune des solutions étalons mères, palmitate de rétinyle (4.16.1), acétate de rétinyle (4.16.2), acétate d' α -tocophéryle (4.16.3) et α -tocophérol (4.16.4). Étiqueter chaque fiole avec les noms des analytes individuels. Mélanger et diluer chaque analyte au volume avec de l'iso-octane.

Dans quatre flacons pour échantillonneur automatique de 2 ml étiquetés séparés, transférer à l'aide d'un dispositif de pipetage automatique, 60 μ l de solution de palmitate de rétinyle, 30 μ l de solution d'acétate de rétinyle, 100 μ l de solution d'acétate d' α -tocophéryle et 400 μ l d' α -tocophérol. Remplir le flacon d'iso-octane jusqu'à environ 2 ml.

Mélanger brièvement au vortex et injecter dans le système de chromatographie liquide selon les paramètres de la méthode décrits en 6.2. Analyser le palmitate de rétinyle et l'acétate de rétinyle dans l'UV à 325 nm. Pour l'acétate d' α -tocophérol, analyser dans l'UV à 284 nm et pour l' α -tocophéryle, analyser à 292 nm.

Calculer la pureté chromatographique (*CP*) sous la forme d'une valeur décimale pour chaque pic d'intérêt après intégration de tous les pics apparaissant sur chaque chromatogramme, en utilisant la Formule (5):

$$CP = \frac{\text{Surface du pic d'intérêt}}{\text{Surface totale des pics en excluant le solvant}} \quad (5)$$

Quantifier l'étalon de référence palmitate/acétate de rétinyle par rapport au pic *trans* du chromatogramme uniquement.

4.17.6 Calcul des concentrations des solutions d'étalonnage

Calculer la concentration, ρ_w , de chaque vitamine dans les solutions étalons de travail à partir de la concentration de la solution mère, en utilisant le facteur de dilution approprié comme indiqué dans la Formule (6) à la Formule (9) en $\mu\text{g/ml}$ pour le palmitate de rétinyle (RP) et l'acétate de rétinyle (RA) et en mg/ml pour l' α -tocophérol (T) et l'acétate d' α -tocophéryle (TA).

$$\rho_{WRP} = SP_{RP} \times CP_{RP} \times \frac{m_{st}}{50} \times \frac{4}{50} \times \frac{8}{100} \times \frac{V_a}{50} \times 1\,000 \quad (6)$$

$$\rho_{WRA} = SP_{RA} \times CP_{RA} \times \frac{m_{st}}{50} \times \frac{4}{50} \times \frac{8}{100} \times \frac{V_a}{50} \times 1\,000 \quad (7)$$

$$\rho_{WTA} = SP_{TA} \times CP_{TA} \times \frac{m_{st}}{50} \times \frac{7}{50} \times \frac{8}{100} \times \frac{V_a}{50} \quad (8)$$

$$\rho_{WT} = SP_T \times CP_T \times \frac{m_{st}}{50} \times \frac{20}{50} \times \frac{8}{100} \times \frac{V_a}{50} \quad (9)$$

- où
- V_a est respectivement de 0,5 ml, 2 ml, 4 ml, 8 ml, 16 ml et 32 ml pour les niveaux d'étalonnage;
 - m_{st} est la masse de l'étalon de référence en mg;
 - SP est la pureté spectrométrique UV;
 - CP est la pureté chromatographique sous la forme d'une valeur décimale;
 - 1 000 est le facteur de conversion des mg/ml en $\mu\text{g/ml}$.

5 Appareillage

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

5.1 Système de CLHP, composé d'une pompe, d'un échantillonneur automatique, d'un détecteur UV programmable fonctionnant à 325 nm pour la vitamine A et d'un détecteur fluorimétrique à une longueur d'onde d'excitation de 280 nm et une longueur d'onde d'émission de 310 nm pour la vitamine E.

5.2 Colonne de CLHP, colonne analytique en phase normale, par exemple Agilent Zorbax® NH₂² (5 μm , 150 mm x 4,6 mm) ou l'équivalent.

5.3 Bain-marie, réglé à 37 °C \pm 2 °C.

2) 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.

- 5.4 **Centrifugeuse**, avec adaptateurs pour tubes de centrifugation de 50 ml, pouvant tourner à 4 000 rpm.
- 5.5 **Spectromètre UV-VIS**, avec cellules en quartz de 1 cm.
- 5.6 **Balance analytique**, ayant une précision de 4 décimales.
- 5.7 **Flacons de CLHP ambres**, capacité 2 ml, avec capuchons en plastique et joints en polytétrafluoroéthylène (PTFE).
- 5.8 **Tubes de centrifugation jetables**, capacité 50 ml.
- 5.9 **Agitateur mécanique de laboratoire pour tubes à essai**.
- 5.10 **Bain sonicateur (bain à ultrasons)**.
- 5.11 **Fioles jaugées à un trait**, capacité 50 ml et 100 ml.
- 5.12 **Appareil de filtration sous vide**, avec membrane en nylon de 0,45 µm.
- 5.13 **Bouteilles de laboratoire en verre**, capacité 250 ml, 1 l et 2 l.
- 5.14 **Dispositifs de pipetage et embouts**.

6 Mode opératoire

6.1 Préparation de l'échantillon

ISO 20633:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe953f3-2d46-44a0-ac83-25a471ca009b/iso-20633-2015>

6.1.1 Généralités

Si la matrice des échantillons de poudre n'est pas connue, supposer qu'elle 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), dans une bouteille de 250 ml ([5.13](#)). Dissoudre en utilisant de l'eau chaude (environ 40 °C à 45 °C), refroidir et ajouter 200 g d'eau. Noter la masse finale (m_2). Peser exactement environ 5,0 g (m_3) d'échantillon reconstitué dans un tube de centrifugation à bouchon à vis. Calculer la masse de l'échantillon (équivalent poudre), m_s , en utilisant la Formule (10):

$$m_s = \frac{(m_1 \times m_3)}{m_2} \quad (10)$$

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 0,525 g dans un tube de centrifugation de 50 ml avec bouchon à vis. Ajouter 5 ml d'eau chaude à environ 40 °C et agiter pour dissoudre.

6.1.4 Échantillons liquides

Pour les échantillons prêts à servir ou les produits liquides concentrés, peser exactement environ 5,0 g (m_3) d'échantillon homogénéisé dans un tube de centrifugation de 50 ml avec bouchon à vis.

6.1.5 Extraction des échantillons

Aux solutions pesées ci-dessus, ajouter 5 ml de solution de papaine (4.11). Mélanger chaque échantillon afin de le disperser, boucher et placer les tubes au bain-marie à $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant 20 min à 25 min. Sortir les échantillons du bain-marie et refroidir. Placer au congélateur pendant environ 5 min ou réfrigérer pendant environ 20 min. Ajouter 20 ml de méthanol acidifié (4.12) à chaque tube d'échantillon et agiter les tubes pendant 10 min, de préférence avec un agitateur mécanique.

Pipeter avec précision 10 ml d'iso-octane dans chaque tube d'échantillon. Fermer hermétiquement pour éviter les fuites et agiter les tubes pendant 10 min, de préférence en utilisant un agitateur mécanique. Centrifuger pendant 10 min à 4 000 rpm pour obtenir une couche claire d'iso-octane. Transférer une aliquote de la couche claire d'iso-octane dans des flacons ambrés pour analyse par CLHP.

6.2 Analyse par CLHP

6.2.1 Généralités

La séparation et la quantification se sont révélées satisfaisantes avec l'utilisation des conditions expérimentales suivantes:

Colonne: Agilent Zorbax® NH₂³) (5 µm, 150 mm × 4,6 mm);

Phase mobile A: *n*-hexane;

Phase mobile B: mélange de 750 ml de *n*-hexane, 250 ml d'éther méthyl-*t*-butylique et 3 ml de méthanol;

Débit: 1,5 ml/min;

Volume d'injection: 50 µl;

Four pour colonne: $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;

Durée d'analyse: 20 min.

ISO 20633:2015
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe953f3-2d46-44a0-ac83-25a471ca009b/iso-20633-2015>

Des exemples de chromatogrammes typiques sont donnés dans l'Annexe A.

6.2.2 Paramètres du détecteur

Régler le détecteur à réseau de photodiodes (PDA)/UV sur 325 nm pour le palmitate de rétinyle et l'acétate de rétinyle. Régler le détecteur fluorimétrique sur une longueur d'onde d'excitation de 280 nm et des longueurs d'onde d'émission de 310 nm pour l'acétate d' α -tocophéryle et l' α -tocophérol.

6.2.3 Cycle d'élution à gradient de la pompe

Le cycle d'élution à gradient de la pompe est fourni dans le [Tableau 1](#).

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