
**Formules infantiles et produits
nutritionnels pour adultes —
Détermination de la teneur en
vitamine B₁₂ par chromatographie
liquide haute performance en phase
inverse (CLHP-PI)**

iTeh STANDARD PREVIEW

*Infant formula and adult nutritionals — Determination of vitamin B₁₂
by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)*
(standards.iteh.ai)

[ISO 20634:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b761c0c4-854f-424b-9d3f-aa088aeaf181/iso-20634-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b761c0c4-854f-424b-9d3f-aa088aeaf181/iso-20634-2015>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20634:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b761c0c4-854f-424b-9d3f-aa088aeaf181/iso-20634-2015>



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	4
6 Mode opératoire	5
6.1 Généralités.....	5
6.2 Préparation de l'échantillon.....	5
6.2.1 Généralités.....	5
6.2.2 Extraction.....	6
6.2.3 Concentration de l'échantillon.....	6
6.3 Analyse par CLHP.....	7
6.3.1 Réglage et configuration du système.....	7
6.3.2 Conditions de fonctionnement de l'instrument.....	8
7 Calculs	9
7.1 Généralités.....	9
7.2 Calcul des concentrations de la solution étalon.....	9
7.3 Préparation des courbes d'étalonnage.....	10
7.4 Calcul des concentrations de vitamine B ₁₂ dans les solutions d'échantillon.....	10
Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes	11
Annexe B (informative) Données de fidélité	12
Annexe C (informative) Exemple de procédure de qualification de cartouche SPE	15
Bibliographie	16

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/b76f0c4-854f-424b-9d5f-aa088aeaf181/iso-20634-2015).

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 2011.10: *Vitamine B₁₂ dans les formules infantiles et pédiatriques et les produits nutritionnels pour adultes*.

Formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en vitamine B₁₂ par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (CLHP-PI)

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 de la vitamine B₁₂ présente dans les formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes (poudres, liquides prêts à servir et liquides concentrés) par chromatographie liquide haute performance en phase inverse.

2 Termes et définitions

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

2.1

vitamine B₁₂

cyanocobalamine et autres corrinoides contenant du cobalt possédant l'activité biologique de la vitamine B₁₂, comme l'aquocobalamine, l'hydroxycobalamine, la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine, convertis en cyanocobalamine

2.2

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

2.3

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 la cyanocobalamine et autres corrinoides contenant du cobalt de l'échantillon au moyen d'un tampon d'acétate de sodium (pH = 4,5) et conversion des derniers en cyanocobalamine au moyen de cyanure de potassium à 105 °C. Purification et concentration des extraits avec des cartouches d'extraction en phase solide (SPE) C8 ou C18 et analyse par chromatographie en exclusion de taille et en phase inverse. Dosage de la vitamine B₁₂ par chromatographie liquide avec détection dans le visible à 550 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 **Acide acétique glacial.**

4.2 **Acétonitrile**, qualité CLHP.

4.3 **Driérite**, dessiccatif, sulfate de calcium anhydre, 8 mesh.

4.4 **Éthanol**, dénaturé.

4.5 **Acide formique**, 88 %.

4.6 **Cyanure de potassium**, 97 %.

4.7 **Riboflavine**, pureté de 98 % à 102 %.

4.8 **Acétate de sodium anhydre ou acétate de sodium trihydraté**, ACS.

4.9 **Taka-Diastase**, Accurate Chemical Co.¹⁾ ou l'équivalent.

4.10 **Triéthylamine**, qualité CLHP.

4.11 **Étalon de référence primaire de vitamine B₁₂ (cyanocobalamine)**, par exemple USP Référence 1152009 (environ 10 µg/mg, lot officiel¹⁾). Conserver dans un dessiccateur à l'abri de la lumière blanche.

4.12 Préparation des solutions et des solutions étalons

4.12.1 Généralités

Le volume de toutes les solutions peut être augmenté ou diminué selon les besoins, à condition de respecter les bonnes pratiques de laboratoire. Les solutions peuvent être conservées au réfrigérateur ou à température ambiante dans des récipients inertes étanches, sauf indication contraire.

4.12.2 Préparation des solutions

4.12.2.1 Phase mobile de CLHP A. Diluer 4,0 ml de triéthylamine avec 1 000 ml d'eau. Ajuster le pH à une valeur comprise entre 5 et 7 avec environ 1,25 ml d'acide formique concentré (4.5). Délai d'expiration: 1 semaine.

4.12.2.2 Phase mobile de CLHP B. Mélanger 4,0 ml de triéthylamine et 250 ml d'acétonitrile avec 750 ml d'eau. Ajuster le pH à une valeur comprise entre 5 et 7 avec environ 1,25 ml d'acide formique concentré. Délai d'expiration: 1 semaine dans un récipient hermétiquement bouché.

4.12.2.3 Phase mobile de CLHP C. Mélanger 4,0 ml de triéthylamine et 750 ml d'acétonitrile avec 250 ml d'eau. Ajuster le pH à une valeur comprise entre 5 et 7 avec environ 1,25 ml d'acide formique concentré. Délai d'expiration: 1 semaine dans un récipient hermétiquement bouché.

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.

4.12.2.4 Phase mobile de CLHP D. Diluer 50 ml d'acétonitrile à 2 000 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 1 semaine dans un récipient hermétiquement bouché.

4.12.2.5 Mélange d'acétonitrile et d'eau, fraction volumique 10 %. Diluer 150 ml d'acétonitrile à 1 500 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 1 mois dans un récipient hermétiquement bouché.

4.12.2.6 Mélange d'acétonitrile et d'eau, solvant d'élution pour SPE, fraction volumique 30 %. Diluer 30 ml d'acétonitrile à 100 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 1 mois dans un récipient hermétiquement bouché.

4.12.2.7 Mélange d'acétonitrile et d'eau, solution de nettoyage et de conservation de colonne, fraction volumique 50 %. Diluer 500 ml d'acétonitrile à 1 000 ml avec de l'eau dans une fiole jaugée. Délai d'expiration: 6 mois.

4.12.2.8 Mélange d'éthanol et d'eau, fraction volumique 25 %. Diluer 50 ml d'éthanol à 200 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 1 an dans un récipient hermétiquement bouché.

4.12.2.9 Solution de cyanure de potassium, concentration massique $\rho = 4$ g/l. Dissoudre 0,02 g de cyanure de potassium dans le tampon d'acétate de sodium (4.12.2.11) et compléter à 5 ml (concentration de la substance $c = 0,25$ mol/l). Préparer une solution fraîche immédiatement avant utilisation.

4.12.2.10 Solution de cyanure de potassium, $\rho = 10$ g/l. Dissoudre 0,25 g de cyanure de potassium dans de l'eau et compléter à 25 ml. Préparer une solution fraîche immédiatement avant utilisation.

4.12.2.11 Tampon d'acétate de sodium, $c = 0,25$ mol/l Dissoudre 41,0 g d'acétate de sodium anhydre ou 68,0 g d'acétate de sodium trihydraté dans environ 1 800 ml d'eau. Ajuster le pH à 4,5 avec de l'acide acétique concentré (environ 40 ml). Diluer à 2 000 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 3 mois.

4.12.2.12 Solution pour essai de résolution. Peser environ 0,005 g de riboflavine sur un papier à pesée. Transférer dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter au volume avec une solution d'acétonitrile à 10 %. Agiter pour dissoudre. Mélanger à volumes égaux avec la solution étalon de travail de vitamine B₁₂ présentant la concentration la plus élevée. Délai d'expiration: 1 semaine.

4.12.2.13 Solution Taka-Diastase, $\rho = 60$ g/l. Dissoudre 0,6 g de Taka-Diastase dans 10 ml d'eau. Préparer une solution fraîche quotidiennement avant utilisation.

4.12.3 Préparation des solutions étalons

4.12.3.1 Généralités. Préparer toutes les solutions étalons sous un éclairage doté d'un écran anti-UV et les conserver à une température comprise entre 2 °C et 8 °C dans des fioles jaugées hermétiquement bouchées.

4.12.3.2 Solution étalon mère de vitamine B₁₂, $\rho = 10\ 000$ µg/l. Peser avec précision la quantité appropriée d'étalon de vitamine B₁₂ (4.11) pour obtenir une concentration de la solution étalon mère de 10 000 µg/l. Dissoudre dans de l'éthanol à 25 % et compléter à 100 ml (4.12.2.8). Délai d'expiration: 6 mois.

Calculer la quantité d'étalon de vitamine B₁₂ devant être pesée, m_w , en milligrammes, en utilisant la Formule (1):

$$m_w = 10\ 000 \times 0,1 \times \frac{1}{P} \quad (1)$$

où

10 000 est la concentration de la solution étalon mère souhaitée, en µg/l;

0,1 est le volume de dilution, en l;

P est la pureté de l'étalon de vitamine B₁₂ (4.11) en µg de cyanocobalamine par mg d'étalon.

4.12.3.3 Solution étalon intermédiaire de vitamine B₁₂, $\rho = 1\ 000\ \mu\text{g/l}$. Diluer 10 ml de la solution étalon mère (4.12.3.2) à 100 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 1 semaine.

4.12.3.4 Solutions d'étalonnage de vitamine B₁₂, $\rho = 2,5\ \mu\text{g/l}$ à $25\ \mu\text{g/l}$. Dans des fioles jaugées séparées, diluer 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml et 5 ml de solution étalon intermédiaire (4.12.3.3) à 200 ml avec de l'acétonitrile à 10 % (4.12.2.5). Délai d'expiration: 1 mois.

5 Appareillage

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

5.1 Système de CLHP, composé d'une pompe à gradient, d'une vanne de commutation de colonne et d'une pompe isocratique, d'un détecteur UV-VIS équipé d'une lampe au tungstène permettant une lecture à 550 nm et d'un injecteur automatique pouvant injecter entre 900 µl et 2 000 µl d'échantillon.

5.2 Colonne de CLHP, colonne analytique à exclusion de taille:

- taille de particules 4 µm, 250 mm × 9,4 mm (par exemple, Zorbax GF-250²⁾ référence 884973-901);
- 5 µm, 300 mm × 8 mm (Shodex Proteom® KW-802.5²⁾, référence F6989000) ou l'équivalent.

5.3 Colonne de CLHP, colonne analytique C18:

- taille de particules 3 µm, 100 mm × 4,6 mm (par exemple, Thermo Scientific Aquasil™²⁾ référence 77503-104630) avec cartouches de garde enfichables C18 de 3 µm, 10 mm × 4,6 mm (par exemple, Thermo Scientific Aquasil™²⁾ référence 77503-014001);
- Epic Phenyl Hexyl, 3 µm, 120 Å, 100 mm × 4,6 mm, (ES Industries 125191-EPHX)²⁾ avec cartouche de garde appropriée, ou colonne en phase inverse équivalente compatible avec une phase mobile 100 % aqueuse).

5.4 Four, capable de maintenir des températures de 95 °C ± 5 °C et de 105 °C ± 5 °C.

5.5 pH-mètre, avec tampon d'étalonnage.

5.6 Balance analytique, avec une précision de 0,000 01 g.

5.7 Bêchers, verre, tailles assorties.

5.8 Distributeur à piston, pouvant distribuer 30 ml ou l'équivalent.

5.9 Éprouvettes, graduées, verre, tailles assorties.

5.10 Dessiccateur.

5.11 Fioles coniques (Erlenmeyer), capacité 125 ml ou verrerie équivalente.

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.

- 5.12 Papier filtre**, Whatman 2V²) ou l'équivalent.
- 5.13 Entonnoirs**, plastique, adaptés à une utilisation avec papier filtre.
- 5.14 Gants**, jetables.
- 5.15 Dispositif de pipetage**, volume variable, 100 µl à 1 000 µl.
- 5.16 Écrans de laboratoire**, écrans jaunes ou transparents ayant un seuil de coupure à 385 nm.
- 5.17 Cartouches d'extraction en phase solide (SPE)**, C8, 900 mg (par exemple, Alltech/Grace Davidson référence 20966²), C18, 900 mg (par exemple, Alltech/Grace Davidson référence 20942²) ou l'équivalent. Un exemple de procédure de qualification des cartouches SPE est donné en [Annexe C](#).
- 5.18 Seringues**, jetables, tailles assorties.
- 5.19 Filtres seringue**, 0,45 µm, nylon.
- 5.20 Extracteur sous vide**, 24 ports avec robinets ou l'équivalent.
- 5.21 Pipettes volumétriques**, tailles assorties.
- 5.22 Fioles jaugées**, tailles assorties.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

6 Mode opératoire

[ISO 20634:2015](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b761c0c4-854f-424b-9d3f-aa088aeaf181/iso-20634-2015>

6.1 Généralités

Préparer tous les échantillons sous un éclairage doté d'un écran anti-UV. Les échantillons de produit préparés peuvent être analysés 14 jours au maximum après leur préparation, en les conservant à une température comprise entre 2 °C et 8 °C dans des fioles jaugées hermétiquement bouchées. Il convient que tous les échantillons de produit soient aussi uniformes et représentatifs que possible. Pour cela, il convient de les mélanger ou les agiter soigneusement avant échantillonnage.

6.2 Préparation de l'échantillon

6.2.1 Généralités

Pour les produits contenant de l'amidon, ajouter 1 ml de solution Taka-Diastase ([4.12.2.13](#)). Laisser la solution Taka-Diastase réagir avec les échantillons pendant au moins 30 min avant de poursuivre l'extraction.

6.2.1.1 Échantillons liquides

Pour les liquides prêts à servir, bien mélanger les échantillons pour assurer l'homogénéité et peser exactement environ 20,0 g pour les produits nutritionnels pour adultes ou 25,0 g pour les formules infantiles dans une fiole jaugée de 100 ml. Poursuivre avec l'extraction.

6.2.1.2 Échantillons de poudre

Si l'homogénéité de l'échantillon de poudre n'est pas connue, supposer qu'il est non homogène et procéder comme pour les échantillons de poudre mélangés à sec/non homogènes ([6.2.1.3](#)).

6.2.1.3 Échantillons de poudre mélangés à sec

Pour les échantillons de poudre mélangés à sec/non homogènes, peser exactement environ 25,0 g. Ajouter 200,0 g d'eau à 40 °C avant de mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Un homogénéisateur peut être utilisé si nécessaire. Peser exactement environ 20,0 g pour les produits nutritionnels pour adultes ou 25,0 g pour les formules infantiles dans une fiole jaugée de 100 ml.

6.2.1.4 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 3,0 g de poudre dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter 25 ml d'eau et mélanger jusqu'à dissolution de toute la poudre.

6.2.1.5 Formules élémentaires

Pour les produits contenant des acides aminés libres et ne contenant pas de protéine intacte, ajouter 0,5 g de caséinate de calcium ou de lait en poudre écrémé à 3,0 g de poudre issue d'un mélange par voie humide diluée avec 25 ml d'eau ou 20 g à 25 g de liquide ou de poudre non homogène mélangée à sec reconstituée. Bien mélanger pour dissoudre la protéine. Ajouter immédiatement 30 ml de tampon d'acétate de sodium (4.12.2.11) et 1 ml de cyanure de potassium à 1 %. Compléter au volume avec de l'eau, filtrer et purifier et concentrer à 60 ml de filtrat sur une cartouche C8 ou C18 de 900 mg préconditionnée. Ne pas chauffer l'échantillon dans le four à 105 °C.

6.2.2 Extraction

Ajouter 30 ml de tampon d'acétate de sodium (4.12.2.11) à chaque extrait d'échantillon et mélanger d'un mouvement rotatif. Sous une hotte aspirante, ajouter 1 ml de cyanure de potassium à 1 % fraîchement préparé (4.12.2.10) à chaque échantillon et mélanger d'un mouvement rotatif. Chauffer les échantillons dans un four à 105 °C pendant au moins 60 min, sans dépasser 120 min. La température du four chutera à l'ouverture de la porte. Commencer à chronométrer lorsque la température du four revient à 105 °C.

Sortir les échantillons du four et les refroidir immédiatement dans un bain de glace. Diluer les échantillons au volume avec de l'eau. Bien mélanger. Filtrer les échantillons sur un papier filtre (5.12) dans des fioles coniques de 125 ml ou des récipients en verre équivalents. Si nécessaire, changer le papier filtre s'il est obstrué. Si les échantillons préparés sont opaques et contiennent de très petites particules insolubles, centrifuger les échantillons et transférer la couche liquide dans des entonnoirs revêtus de papier filtre. Ne jamais chauffer d'échantillons auxquels du caséinate de calcium a été ajouté, voir 6.2.1.5.

6.2.3 Concentration de l'échantillon

Afin de nettoyer et de concentrer l'échantillon, insérer une cartouche de SPE de 900 mg (5.17) sur le robinet de l'extracteur sous vide et fixer un cylindre de seringue jetable de 30 ml au sommet du chaque cartouche. Conditionner chaque cartouche avec au moins 20 ml d'acétonitrile (éluer par gravité) et rincer chaque cartouche avec au moins 10 ml d'eau. À l'aide de pipettes volumétriques, transférer les filtrats d'échantillon dans les cartouches en utilisant les lignes directrices figurant dans le [Tableau 1](#). Si la concentration de vitamine B₁₂ n'est pas connue, utiliser les lignes directrices pour les produits prêts à servir contenant de 1 µg/l à 10 µg/l. Si nécessaire, appliquer un vide suffisant pour que les échantillons s'écoulent en goutte à goutte régulier à travers les cartouches. Il convient que les filtrats d'échantillon traversent la cartouche à un débit d'au plus 120 gouttes/min. Jeter l'éluant.

Tableau 1 — Lignes directrices pour le chargement des filtrats d'échantillon sur les cartouches de SPE

Vitamine B ₁₂ dans les produits RTF µg/l	Volume de filtrat chargé sur la cartouche de SPE ml	Volume de dilution final ml
< 1	80	5
1 - 10	70 - 80	10
11 - 20	50 - 60	10
21 - 50	20 - 40	10

NOTE Ne pas charger plus de 60 ml de produits nutritionnels pour adultes sur une cartouche C8 ou C18 Alltech.

Après que tout le filtrat d'échantillon soit passé à travers la cartouche, rincer chaque cartouche avec 5 ml d'eau et jeter l'éluant. Sécher chaque cartouche à l'air en générant un vide jusqu'à ce que l'éluant ne soit plus visible. Fermer chaque robinet.

En utilisant les lignes directrices fournies dans le [Tableau 1](#), placer une fiole jaugée de 5 ml ou de 10 ml sous chaque cartouche. Ajouter 4,4 ml du mélange à 30 % d'acétonitrile et d'eau ([4.12.2.6](#)) à toutes les cartouches de SPE de 900 mg. Ouvrir chaque robinet et éluier la vitamine B₁₂ dans les fioles jaugées sous vide. Il convient que l'éluant traverse la cartouche à un débit d'au plus 120 gouttes/min.

Lors de la préparation de la dilution finale, pour les échantillons recueillis dans les fioles jaugées de 10 ml, compléter au volume avec de l'eau.

Pour les échantillons recueillis dans les fioles jaugées de 5 ml, sous une hotte, ajouter 0,1 ml de solution de cyanure de potassium à 0,4 % fraîchement préparée ([4.12.2.9](#)) dans chaque fiole jaugée. Placer les échantillons préparés dans un four à 95 °C pendant au moins 1,5 h, sans dépasser 4 h. Sortir les échantillons du four et les laisser refroidir à température ambiante. Compléter au volume avec de l'eau.

Filter une aliquote de chaque solution étalon et solution d'échantillon préparée à travers un filtre seringue ([5.19](#)) dans un flacon pour injecteur automatique.

6.3 Analyse par CLHP

6.3.1 Réglage et configuration du système

Le réglage et la configuration du système sont décrits sur la [Figure 1](#).

