

---

---

---

**Préparations pour nourrissons et  
produits nutritionnels pour adultes —  
Détermination simultanée de la  
teneur en vitamines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>6</sub> —  
Digestion enzymatique et CL-SM/SM**

iT *Infant formula and adult nutritionals — Simultaneous  
determination of total vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> and B<sub>6</sub> — Enzymatic  
digestion and LC-MS/MS*  
[\(<https://standards.iteh.ai>\)](https://standards.iteh.ai)  
**Document Preview**

[ISO 21470:2020](#)  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/7caa868a-24bf-4ab3-a209-3b0aa24ae8ed/iso-21470-2020>



Numéro de référence  
ISO 21470:2020(F)

© ISO 2020

**iTeh Standards**  
**(<https://standards.iteh.ai>)**  
**Document Preview**

[ISO 21470:2020](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/7caa868a-24bf-4ab3-a209-3b0aa24ae8ed/iso-21470-2020>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2020

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  
E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

# Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b>	iv	
<b>1</b>	<b>Domaine d'application</b>	1
<b>2</b>	<b>Références normatives</b>	1
<b>3</b>	<b>Termes et définitions</b>	1
<b>4</b>	<b>Principe</b>	1
<b>5</b>	<b>Réactifs et matériaux</b>	2
<b>6</b>	<b>Préparation des étalons et des solutions</b>	3
6.1	Phases mobiles et solutions préparées	3
6.2	Composés marqués aux isotopes stables et solutions mères individuelles d'étalons internes	4
6.3	Solutions mères d'étalons de composés natifs	6
6.4	Préparation de la solution d'étalons de travail	7
6.5	Résumé de la préparation des étalons et des solutions	8
<b>7</b>	<b>Appareillage</b>	8
<b>8</b>	<b>Mode opératoire</b>	9
8.1	Préparation de l'échantillon	9
8.1.1	Produits en poudre	9
8.1.2	Poudres reconstituées et produits liquides	10
8.2	Digestion enzymatique	10
8.3	Analyse CLHP-SM/SM	10
8.3.1	Conditions de CLUHP	10
8.3.2	Conditions de réglage du SM	11
8.3.3	Transitions des masses	11
8.3.4	Équilibrage du CL-SM/SM	12
8.4	Contrôle qualité	12
8.4.1	Généralités	12
8.4.2	Courbe d'étalonnage	12
<b>9</b>	<b>Calculs</b>	13
<b>10</b>	<b>Données de fidélité</b>	14
10.1	Généralités	14
10.2	Répétabilité	14
10.3	Reproductibilité	14
<b>11</b>	<b>Rapport d'essai</b>	17
<b>Annexe A (informatif) Données de fidélité</b>		19
<b>Annexe B (informatif) Comparaison entre le présent document et l'EN 14122</b>		28
<b>Annexe C (informatif) Comparaison entre le présent document et l'EN 14152</b>		31
<b>Annexe D (informatif) Comparaison entre le présent document et l'EN 14164</b>		33
<b>Bibliographie</b>		35

## 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.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir [www.iso.org/avant-propos](http://www.iso.org/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 l'équivalent de la méthode officielle de l'AOAC 2015.14: *Simultaneous Determination of Total Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, and B<sub>6</sub> in Infant Formula and Related Nutritionals by Enzymatic Digestion and LC-MS/MS*.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/members.html](http://www.iso.org/members.html).

# Préparations pour nourrissons et produits nutritionnels pour adultes — Détermination simultanée de la teneur en vitamines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>6</sub> — Digestion enzymatique et CL-SM/SM

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination quantitative simultanée de la teneur en quatre vitamines hydrosolubles dans les préparations pour nourrissons et les produits nutritionnels associés, notamment les formes pertinentes de vitamines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> et B<sub>6</sub> par digestion enzymatique et CLUHP-SM/SM. Le présent document n'est pas destiné à être utilisé pour des produits dans lesquels aucune vitamine n'a été ajoutée.

## 2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

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

### 3.2

#### préparation pour nourrissons

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

[SOURCE: Codex Standard 72-1981]

## 4 Principe

Des échantillons sont préparés par digestion enzymatique avec de la papaïne et de l'α-amylase pour hydrolyser les protéines, les glucides complexes et la phosphatase acide en des formes de vitamines phosphorylées libres. Des étalons internes marqués aux isotopes stables sont incorporés dans la préparation des échantillons pour corriger la variabilité de préparation des échantillons et de réponse de l'instrument. Une série de six solutions de travail du mélange d'étalons couvrant deux ordres de grandeur en termes de concentration en vitamines est utilisée pour générer des courbes d'étalonnage d'après le facteur de réponse maximale de l'analyte à son étalon interne marqué aux isotopes stables.

Les échantillons préparés et les solutions d'étalons de travail sont injectés dans un chromatographe liquide à ultra-haute pression (CLUHP) couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle (SM/SM) en vue d'être analysés. Le SM/SM est configuré pour suivre pour chaque analyte et étalon interne des paires d'ions précurseur-fragment. Cette réaction constitue la base de la sélectivité de la méthode. Les analytes sont quantifiés à l'aide de la méthode des moindres carrés en utilisant le facteur de réponse de l'analyte à son étalon interne.

## 5 Réactifs et matériaux

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

**5.1 Niacinamide (nicotinamide) (MM = 122,12)**, étalon de référence primaire, par exemple étalon de référence USP, référence 1462006<sup>1)</sup>. Respecter les instructions de conservation et de manipulation données par le fabricant.

**5.2 Niacine (acide nicotinique) (MM = 123,11)**, étalon de référence primaire, par exemple étalon de référence USP, référence 1461003<sup>1)</sup>. Respecter les instructions de conservation et de manipulation données par le fabricant.

**5.3 Chlorhydrate de pyridoxine (MM = 205,64)**, étalon de référence primaire, par exemple étalon de référence USP, référence 1587001<sup>1)</sup>. Respecter les instructions de conservation et de manipulation données par le fabricant.

**5.4 Riboflavine (MM = 376,36)**, étalon de référence primaire, par exemple étalon de référence USP, référence 1603006<sup>1)</sup>. Respecter les instructions de conservation et de manipulation données par le fabricant.

**5.5 Chlorhydrate de thiamine (MM = 337,27)**, étalon de référence primaire, par exemple étalon de référence USP, référence 1656002<sup>1)</sup>. Respecter les instructions de conservation et de manipulation données par le fabricant. Mesurer la teneur en humidité de la poudre avant emploi ou utiliser la valeur d'humidité indiquée dans le certificat d'analyse du fournisseur.

**5.6 Dichlorhydrate de pyridoxamine**, Fluka Analytical Standard, référence P9380<sup>1)</sup>.

**5.7 Chlorhydrate de pyridoxal**, Sigma, référence P9130<sup>1)</sup>.

**5.8  $^2\text{H}_4$ -niacinamide**, CDN Isotopes, référence D-3457<sup>1)</sup>.

**5.9  $^2\text{H}_4$ -acide nicotinique**, CDN Isotopes, référence D-4368<sup>1)</sup>.

**5.10  $^{13}\text{C}_4$ -pyridoxine:pyridoxine:HCl (4,5-bis(hydroxyméthyl)- $^{13}\text{C}_4$ )**, Cambridge Isotope Laboratory, référence CLM-7563<sup>1)</sup>.

**5.11  $^2\text{H}_3$ -pyridoxal**, IsoSciences, référence 7098<sup>1)</sup>.

**5.12  $^2\text{H}_3$ -pyridoxamine**, IsoSciences, référence 7099<sup>1)</sup>.

**5.13  $^{13}\text{C}_4$ -chlorure de thiamine**, IsoSciences, référence 9209<sup>1)</sup>.

1) Exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils aboutissent aux mêmes résultats.

**5.14  $^{13}\text{C}_4,^{15}\text{N}_2$ -riboflavine**, IsoSciences, référence 7072<sup>1)</sup>.

**5.15 Phosphatase acide**, type II de pomme de terre, 0,5 U/mg à 3,0 U/mg, Sigma, référence P3752<sup>1)</sup>.

**5.16 Papaïne de *Carica papaya***,  $\geq 3$  U/mg, Sigma, référence 76220<sup>1)</sup>.

**5.17  $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae***, 150 U/mg, Sigma, référence A9857<sup>1)</sup>.

**5.18 Acide chlorhydrique concentré** (concentration  $c = 12$  mol/l), qualité ACS, ou équivalent.

**5.19 Formiate d'ammonium**, pour la spectrométrie de masse (pureté  $\geq 99,0\%$ ), Fluka 70221 ou équivalent<sup>1)</sup>.

**5.20 Acide acétique glacial**, Sigma, qualité réactif ACS, ou équivalent<sup>1)</sup>.

**5.21 Acide formique**, Sigma, qualité réactif ACS, ou équivalent<sup>1)</sup>.

**5.22 Eau de laboratoire**,  $18,0\text{ M}\Omega$ ,  $< 10\text{ }\mu\text{g/kg}$  COT, ou équivalente.

**5.23 Méthanol**, Fisher, qualité LC-MS/MS Optima, ou EMD, qualité Omni-Solve LC-MS<sup>1)</sup>.

**5.24 Acide éthylènediaminetétracétique, sel disodique dihydraté (EDTA)**, qualité ACS (99 % à 101 %), ou équivalent.

**5.25 Phosphate de potassium dibasique**, qualité ACS (pureté  $> 98\%$ ), ou équivalent.

**5.26 Acide métaphosphorique**, qualité ACS (33,5 % à 36,5 %), ou équivalent.

**5.27 Solutions tampons pour l'étalonnage du pH-mètre**, pH = 4,0, 7,0 et 10,0.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/7caa868a-24bf-4ab3-a209-3b0aa24ae8ed/iso-21470-2020>

**5.28 Acide phosphorique**, 85 g/100 g, qualité ACS, ou équivalent.

**5.29 Hydroxyde de potassium**, 40 g/100 g, qualité ACS, ou équivalent.

## 6 Préparation des étalons et des solutions

### 6.1 Phases mobiles et solutions préparées

**6.1.1 Phase mobile A**, concentration  $c = 0,020$  mol/l de formiate d'ammonium dans l'eau.

À l'aide d'une éprouvette graduée, transférer 500 ml d'eau de laboratoire dans un réservoir de phase mobile. Ajouter 0,631 g de formiate d'ammonium ([5.19](#)) et bien mélanger. La durée de conservation est de trois jours.

**6.1.2 Phase mobile B**, méthanol.

**6.1.3 Solution de HCl**,  $c = 0,12$  mol/l.

Ajouter environ 300 ml d'eau dans une éprouvette graduée de 500 ml. Ajouter  $5,0\text{ ml} \pm 0,1\text{ ml}$  de solution de HCl concentrée ([5.18](#)) et remuer. Compléter à 500 ml avec de l'eau de laboratoire et bien mélanger.

### 6.1.4 Solution d'acide acétique, 1,0 ml/100 ml.

Ajouter environ 30 ml d'eau dans une éprouvette graduée de 500 ml. Ajouter  $5,0 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$  d'acide acétique glacial (5.20) et remuer. Compléter à 500 ml avec de l'eau de laboratoire et bien mélanger.

### 6.1.5 Liquide doux de rinçage de l'aiguille, 10 ml/100 ml de méthanol dans l'eau, d'une durée de conservation de trois mois. Il est également possible d'utiliser le liquide doux de rinçage de l'aiguille recommandé par le fournisseur.

### 6.1.6 Liquide fort de rinçage de l'aiguille, méthanol ou tel que recommandé par le fournisseur.

### 6.1.7 Solution de formiate d'ammonium, $c = 0,050 \text{ mol/l}$ .

À l'aide d'une éprouvette graduée, transférer 1 400 ml d'eau de laboratoire dans un réservoir approprié. Ajouter 4,41 g de formiate d'ammonium (5.19) et bien mélanger. Un volume de 400 ml convient pour 6 solutions d'étalons de travail et 32 échantillons. Adapter si nécessaire. La durée de conservation est de trois jours.

### 6.1.8 Solution du mélange d'enzymes

À l'aide d'une éprouvette graduée, transférer 200 ml de solution tampon formiate d'ammonium (6.1.7) dans un réservoir approprié. Ajouter  $200 \text{ mg} \pm 10 \text{ mg}$  de phosphatase acide (5.15),  $80 \text{ mg} \pm 5 \text{ mg}$  d'α-amylase (5.17) et  $400 \text{ mg} \pm 10 \text{ mg}$  de papaïne (5.16). Mélanger pendant 10 min avec une plaque d'agitation magnétique et un barreau aimanté. Contrôler le pH et ajuster à  $4,25 \pm 0,25$  avec de l'acide formique (5.21, environ 100 µl). Un volume de 200 ml convient pour 6 solutions d'étalons de travail et 32 échantillons. Adapter si nécessaire. À préparer chaque jour.

## 6.2 Composés marqués aux isotopes stables et solutions mères individuelles d'étalons internes

**6.2.1** La durée de conservation des solutions mères d'étalons internes est de six mois. Toutefois, les lignes directrices suivantes peuvent être utilisées pour résoudre les problèmes liés aux normes internes et, lorsqu'elles sont documentées dans le cadre des contrôles de routine d'aptitude du système, pour prolonger indéfiniment les dates limites d'utilisation.

Conformément aux lignes directrices de validation de la méthode bioanalytique de l'USFDA, qui indiquent que le point le plus bas de la gamme d'étalonnage doit correspondre à cinq fois la réponse de l'analyte du blanc<sup>[9]</sup>, le canal de l'analyte d'intérêt non marqué doit être contrôlé pour s'assurer que l'étalon interne marqué aux isotopes stables ne contribue pas à plus de 20 % de l'aire de l'étalon de plus bas niveau. Il convient qu'aucune réponse ne soit générée dans les autres canaux surveillés dans le cadre de la méthode. Dans le cas contraire, cela traduit une contamination, auquel cas il convient de préparer une nouvelle solution ou de commander un nouveau lot de matériau.

Il convient que l'aire de l'étalon interne représente au moins trois fois l'aire de l'analyte de plus bas niveau dans la gamme d'étalonnage et dans l'échantillon contrôle qualité de plus bas niveau.

### 6.2.2 Solution mère de $^{2}\text{H}_4$ -niacinamide, concentration massique $\rho \approx 560 \text{ µg/ml}$ .

Peser  $14,0 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$  dans un récipient de pesée taré. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 25 ml contenant de l'eau de laboratoire et compléter jusqu'au trait avec de l'eau de laboratoire. Bien mélanger et transférer dans un flacon ambré de 50 ml et conserver au réfrigérateur (entre 2 °C et 8 °C). Pour connaître la durée de conservation, voir 6.2.1.

### 6.2.3 Solution mère de $^{2}\text{H}_4$ -acide nicotinique, $\rho \approx 500 \text{ µg/ml}$ .

Peser  $12,5 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$  dans un récipient de pesée taré. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 25 ml contenant de l'eau de laboratoire et compléter jusqu'au trait avec de l'eau de laboratoire.

Bien mélanger et transférer dans un flacon ambré de 50 ml et conserver au réfrigérateur (entre 2 °C et 8 °C). Pour connaître la durée de conservation, voir [6.2.1](#).

#### 6.2.4 Solution mère de $^{13}\text{C}_4$ -pyridoxine, $\rho \approx 70 \mu\text{g/ml}$ .

Peser 7,0 mg  $\pm$  0,1 mg dans un récipient de pesée taré. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml contenant de l'eau de laboratoire et compléter jusqu'au trait avec de l'eau de laboratoire. Bien mélanger et transférer dans un flacon ambré de 100 ml et conserver au réfrigérateur (entre 2 °C et 8 °C). Pour connaître la durée de conservation, voir [6.2.1](#).

#### 6.2.5 Solution mère de $^{2}\text{H}_3$ -pyridoxal, $\rho \approx 40 \mu\text{g/ml}$ .

Peser 4,0 mg  $\pm$  0,1 mg dans un récipient de pesée taré. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml contenant de l'eau de laboratoire et compléter jusqu'au trait avec de l'eau de laboratoire. Bien mélanger et transférer dans un flacon ambré de 100 ml et conserver au réfrigérateur (entre 2 °C et 8 °C). Pour connaître la durée de conservation, voir [6.2.1](#).

#### 6.2.6 Solution mère de $^{2}\text{H}_3$ -pyridoxamine, $\rho \approx 40 \mu\text{g/ml}$ .

Peser 4,0 mg  $\pm$  0,1 mg dans un récipient de pesée taré. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml contenant de l'eau de laboratoire et compléter jusqu'au trait avec de l'eau de laboratoire. Bien mélanger et transférer dans un flacon ambré de 100 ml et conserver au réfrigérateur (entre 2 °C et 8 °C). Pour connaître la durée de conservation, voir [6.2.1](#).

#### 6.2.7 Solution mère de $^{13}\text{C}_4$ -chlorure de thiamine, $\rho \approx 100 \mu\text{g/ml}$ .

Peser 5,0 mg  $\pm$  0,1 mg de  $^{13}\text{C}_4$ -thiamine dans un récipient de pesée taré. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml contenant une solution de HCl ([6.1.2](#)) et compléter jusqu'au trait avec la solution de HCl ([6.1.2](#)). Bien mélanger et transférer dans un flacon ambré de 100 ml et conserver au réfrigérateur (entre 2 °C et 8 °C). Pour connaître la durée de conservation, voir [6.2.1](#).

#### 6.2.8 Solution mère de $^{13}\text{C}_4,^{15}\text{N}_2$ -riboflavine, $\rho \approx 73 \mu\text{g/ml}$ .

Peser 7,3 mg  $\pm$  0,1 mg de  $^{13}\text{C}_4,^{15}\text{N}_2$ -riboflavine dans un récipient de pesée taré. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml contenant une solution d'acide acétique ([6.1.3](#)) et compléter jusqu'au trait avec la solution d'acide acétique ([6.1.3](#)). Bien mélanger et transférer dans un flacon ambré de 100 ml et conserver au réfrigérateur (entre 2 °C et 8 °C). Pour connaître la durée de conservation, voir [6.2.1](#).

#### 6.2.9 Solution mère d'étalons internes (ISSM)

Mélanger 2 500  $\mu\text{l}$  de solution de formiate d'ammonium ([6.1.7](#)) avec 250  $\mu\text{l}$  de solution mère de  $^{2}\text{H}_4$ -niacinamide ([6.2.2](#)), 250  $\mu\text{l}$  de solution mère de  $^{2}\text{H}_4$ -acide nicotinique ([6.2.3](#)), 250  $\mu\text{l}$  de solution mère de  $^{13}\text{C}_4$ -pyridoxine ([6.2.4](#)), 200  $\mu\text{l}$  de solution mère de  $^{2}\text{H}_3$ -pyridoxal ([6.2.5](#)), 50  $\mu\text{l}$  de solution mère de  $^{2}\text{H}_3$ -pyridoxamine ([6.2.6](#)), 250  $\mu\text{l}$  de solution mère de  $^{13}\text{C}_4$ -thiamine ([6.2.7](#)) et 250  $\mu\text{l}$  de solution mère de  $^{13}\text{C}_4,^{15}\text{N}_2$ -riboflavine ([6.2.8](#)). Un volume suffisant d'ISSM convient pour 6 solutions d'étalons de travail et 32 échantillons. Adapter si nécessaire. À préparer chaque jour.

#### 6.2.10 Solution tampon phosphate, $\text{pH} = 5,0$ (0,010 mol/l de phosphate de potassium dibasique, 1 g/100 g d'EDTA, 2 g/100 g d'acide métaphosphorique).

Peser 20,0 g  $\pm$  0,2 g d'EDTA dans un récipient de pesée taré, transférer quantitativement dans un bécher de 2 000 ml contenant environ 1 800 ml d'eau de laboratoire et ajouter un barreau aimanté.

Peser 34,8 g  $\pm$  0,1 g de phosphate de potassium dibasique dans un récipient de pesée taré et transférer quantitativement dans le bécher de 2 000 ml contenant déjà environ 1 800 ml d'eau de laboratoire et d'EDTA. Mélanger en agitant sur une plaque d'agitation magnétique jusqu'à ce que l'EDTA et le phosphate de potassium dibasique soient complètement dissous.

Peser 40,0 g  $\pm$  0,2 g d'acide métaphosphorique dans un récipient de pesée taré et transférer quantitativement dans le bécher de 2 000 ml contenant environ 1 800 ml d'eau de laboratoire, d'EDTA et de phosphate de potassium dibasique. Mélanger en agitant sur une plaque d'agitation magnétique jusqu'à ce que l'acide métaphosphorique soit complètement dissous.

Ajuster le pH de la solution à pH = 5,00  $\pm$  0,02 en utilisant 40 g/100 g d'hydroxyde de potassium ou 85 g/100 g d'acide phosphorique. Transférer quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 2 000 ml et diluer au volume avec de l'eau de laboratoire. Durée de conservation: 48 h.

### 6.3 Solutions mères d'étalons de composés natifs

#### 6.3.1 Solution mère d'étalons de vitamines (VSSM)

Peser exactement les quantités indiquées pour les étalons suivants en utilisant des entonnoirs de pesée séparés ou d'autres récipients de pesée appropriés et transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml en utilisant le tampon phosphate (pH = 5).

- a) Niacinamide (5.1): 70,5 mg  $\pm$  0,5 mg.
- b) Chlorhydrate de thiamine (5.5): 10,5 mg  $\pm$  0,2 mg.

Déterminer la teneur en humidité de l'étalon de référence chlorhydrate de thiamine (5.5) comme indiqué sur le conditionnement juste avant de peser, ou utiliser la teneur en humidité notée dans le certificat d'analyse du fournisseur. Le pourcentage d'humidité déterminé pour l'étalon de référence sert à calculer la concentration en thiamine de la VSSM.

- c) Riboflavine (5.4): 7,0 mg  $\pm$  0,2 mg.
- d) Chlorhydrate de pyridoxine (5.3): 10,8 mg  $\pm$  0,2 mg.

Compléter au volume avec la solution tampon phosphate (pH = 5). Chauffer et agiter lentement jusqu'à ce que les étalons soient complètement dissous (la riboflavine se dissout plus lentement) et que la solution soit claire. Ne pas chauffer la solution pendant plus de 40 min et ne pas dépasser 90 °C. Conserver au réfrigérateur (entre 2 °C et 8 °C). Durée de conservation: trois mois.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/7caa868a-24bf-4ab3-a209-3b0aa24ae8ed/iso-21470-2020>

#### 6.3.2 Solution mère d'acide nicotinique, $\rho = 550$ mg/ml.

Peser exactement 13,7 mg  $\pm$  0,1 mg d'étalon primaire de référence niacine (5.2). Transférer quantitativement l'acide nicotinique dans une fiole jaugée de 25 ml. Ajouter de l'eau de laboratoire jusqu'à atteindre un volume total d'environ 20 ml et remuer jusqu'à dissolution complète. Compléter au volume avec de l'eau de laboratoire. Bien mélanger. Durée de conservation: trois mois.

#### 6.3.3 Solution mère de pyridoxal, $\rho = 140$ mg/ml.

Peser exactement 17,0 mg  $\pm$  0,5 mg d'étalon dichlorhydrate de pyridoxal (5.7). Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter de l'eau de laboratoire jusqu'à atteindre un volume total d'environ 70 ml et remuer jusqu'à dissolution complète. Compléter au volume avec de l'eau de laboratoire. Bien mélanger. Durée de conservation: trois mois.

#### 6.3.4 Solution mère de pyridoxamine, $\rho = 160$ mg/ml.

Peser exactement 23,0 mg  $\pm$  0,5 mg d'étalon chlorhydrate de pyridoxamine (5.6). Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter de l'eau de laboratoire jusqu'à atteindre un volume total d'environ 70 ml et remuer jusqu'à dissolution complète. Compléter au volume avec de l'eau de laboratoire. Bien mélanger. Durée de conservation: trois mois.

### 6.3.5 Solution de travail du mélange d'étalons (MWS)

Mélanger 500 µl de VSSM (6.3.1), 25 µl de solution mère de pyridoxamine (6.3.4), 25 µl de solution mère de pyridoxal (6.3.3) et 65 µl de solution mère d'acide nicotinique (6.3.2) dans une fiole jaugée de 10 ml contenant environ 5 ml de solution de formiate d'ammonium (6.1.7). Compléter au volume avec la solution de formiate d'ammonium (6.1.7) et bien mélanger. À préparer chaque jour.

## 6.4 Préparation de la solution d'étalons de travail

### 6.4.1 Solution de travail (WS) 1

Ajouter 20 µl de MWS (6.3.5) et 980 µl de formiate d'ammonium (6.1.7) dans un tube à centrifuger de 50 ml. Ajouter 100 µl d'ISSM (6.2.9) et mélanger au vortex. À préparer chaque jour.

### 6.4.2 Solution de travail (WS) 2

Ajouter 50 µl de MWS (6.3.5) et 950 µl de formiate d'ammonium (6.1.7) dans un tube à centrifuger de 50 ml. Ajouter 100 µl d'ISSM (6.2.9) et mélanger au vortex. À préparer chaque jour.

### 6.4.3 Solution de travail (WS) 3

Ajouter 100 µl de MWS (6.3.5) et 900 µl de formiate d'ammonium (6.1.7) dans un tube à centrifuger de 50 ml. Ajouter 100 µl d'ISSM (6.2.9) et mélanger au vortex. À préparer chaque jour.

### 6.4.4 Solution de travail (WS) 4

Ajouter 200 µl de MWS (6.3.5) et 800 µl de formiate d'ammonium (6.1.7) dans un tube à centrifuger de 50 ml. Ajouter 100 µl d'ISSM (6.2.9) et mélanger au vortex. À préparer chaque jour.

### 6.4.5 Solution de travail (WS) 5

Ajouter 500 µl de MWS (6.3.5) et 500 µl de formiate d'ammonium (6.1.7) dans un tube à centrifuger de 50 ml. Ajouter 100 µl d'ISSM (6.2.9) et mélanger au vortex. À préparer chaque jour.

### 6.4.6 Solution de travail (WS) 6

Ajouter 1 000 µl de MWS (6.3.5). Ajouter 100 µl d'ISSM (6.2.9) et mélanger au vortex. À préparer chaque jour.

## 6.5 Résumé de la préparation des étalons et des solutions

Voir le [Tableau 1](#).

**Tableau 1 — Résumé de la préparation des étalons et des solutions**

Composé	Masse	Pureté	Correc-tion de l'humidité	Volume de solution mère	Ali- quote de solution mère	Volume de MWS	Aliquote de MWS (6.3.5)	Aliquote d'ISSM (6.2.9)	Volume final
	mg			ml	µl	ml	µl	µl	ml
Niacinamide (5.1)	70,5 ± 0,5	0,999 <sup>a</sup>	1,000	100	500	10	voir 6.4	100	30
Chlorhydrate de thiamine (5.5)	10,5 ± 0,2	0,997 <sup>a</sup>	0,961 <sup>b</sup>	100	500	10	voir 6.4	100	30
Riboflavine (5.4)	7,0 ± 0,2	0,986 <sup>a</sup>	1,000	100	500	10	voir 6.4	100	30
Pyridoxine (5.3)	10,8 ± 0,2	0,999 <sup>a</sup>	1,000	100	500	10	voir 6.4	100	30
Pyridoxal (5.7)	17,0 ± 0,5	0,990 <sup>a</sup>	1,000	100	25	10	voir 6.4	100	30
Pyridoxamine (5.6)	23,0 ± 0,5	0,980 <sup>a</sup>	1,000	100	25	10	voir 6.4	100	30
Niacine (acide nicotinique) (5.2)	13,7 ± 0,1	0,998 <sup>a</sup>	1,000	25	65	10	voir 6.4	100	30

<sup>a</sup> Pureté de l'étalon telle que définie par le fabricant.

<sup>b</sup> Correction de l'humidité (1 – teneur en humidité, après mesurage ou d'après le certificat d'analyse fourni par le fabricant).

## 7 Appareillage

[ISO 21470:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/7caa868a-24bf-4ab3-a209-3b0aa24ae8ed/iso-21470-2020)

**7.1 Colonne Waters® Acquity BEH C18<sup>2)</sup>** ou équivalente, 2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm.

**7.2 Système CLUHP, Waters Acquity Classic<sup>2)</sup>**, ou équivalent.

**7.3 Spectromètre de masse en tandem quadripôle avec sonde ESI**, Waters Xevo TQ-S<sup>2)</sup>, ou équivalent.

### 7.4 Balances analytiques.

Balance capable de peser exactement 5,00 mg (pour les étalons), balance à six décimales, balance analytique à cinq décimales pour les échantillons et balance à deux décimales, avec chargement par le haut, capable de peser jusqu'à plusieurs centaines de grammes.

**7.5 Purificateur d'eau**, système de purification d'eau Millipore Milli-Q<sup>2)</sup>, ou équivalent.

**7.6 Agitateur bain-marie**, capable de maintenir une température de 37 °C, Lab-Line Orbit<sup>2)</sup>, ou équivalent.

2) Exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils aboutissent aux mêmes résultats.