
**Préparations pour nourrissons
et produits nutritionnels pour
adultes — Dosage des fructanes
— Chromatographie échangeuse
d'anions haute performance couplée
à la détection par ampérométrie
pulsée (CEAHP-DAP) après traitement
enzymatique**

*Infant formula and adult nutritionals — Determination of fructans
— High performance anion exchange chromatography with pulsed
amperometric detection (HPAEC-PAD) after enzymatic treatment*



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 22579:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8841b15-0f68-4813-a8bb-2acb680436c8/iso-22579-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8841b15-0f68-4813-a8bb-2acb680436c8/iso-22579-2020>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 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
Web: www.iso.org

International Dairy Federation
Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B
B-1030 Brussels
Tél.: + 32 2 325 67 40
Fax: + 32 2 325 67 41
E-mail: info@fil-idf.org
Web: www.fil-idf.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Produits chimiques et réactifs	2
5.1 Liste des produits chimiques et réactifs.....	2
5.2 Préparation des réactifs.....	3
5.3 Préparation des phases mobiles à l'aide de la colonne A (6.13.1) ou d'une colonne équivalente.....	5
5.4 Préparation des phases mobiles à l'aide des colonnes B (6.13.2) ou de colonnes équivalentes.....	6
5.5 Préparation des solutions étalons.....	7
6 Appareillage	7
7 Mode opératoire	8
7.1 Préparation de l'échantillon.....	8
7.1.1 Produits en poudre ou concentrés prêts à l'emploi (RTF) et produits en poudre non homogènes au niveau du sous-gramme.....	8
7.1.2 Produits reconstitués préparés comme en 7.1.1 ou produits commercialisés sous une forme RTF.....	8
7.1.3 Produits en poudre homogènes sans reconstitution préalable.....	9
7.1.4 Dilution.....	9
7.1.5 Hydrolyse du saccharose et des α -glucanes.....	9
7.1.6 Clarification de Carrez (en option utiliser en cas de difficultés à faire passer l'échantillon à travers la SPE).....	9
7.1.7 Élimination des monosaccharides.....	9
7.1.8 Hydrolyse des fructanes.....	10
7.2 Conditions chromatographiques en cas d'utilisation de la colonne A (6.13.1).....	10
7.3 Conditions chromatographiques en cas d'utilisation de colonnes B (6.13.2).....	11
7.4 Essai d'applicabilité du système.....	11
7.5 Étalonnage.....	12
8 Calcul	12
9 Compte-rendu	13
10 Données de fidélité	14
10.1 Généralités.....	14
10.2 Répétabilité.....	14
10.3 Reproductibilité.....	14
11 Rapport d'essai	15
Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes et de courbes d'étalonnage	16
Annexe B (informative) Données de fidélité	19
Annexe C (informative) Essai de contrôle du mélange d'enzymes sucrase, β-amylase, pullulanase et maltase	20
Bibliographie	23

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 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).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

(standards.iteh.ai)

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produit laitiers*, et par la Fédération internationale du lait (FIL), en collaboration avec l'AOAC INTERNATIONAL, et en collaboration avec le comité technique CEN/TC 302, *Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne). Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément, par l'AOAC INTERNATIONAL. La méthode décrite dans le présent document est l'équivalent de la méthode officielle de l'AOAC 2016.14: *Fructanes dans les préparations pour nourrissons et les produits nutritionnels pour adultes*.

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/fr/members.html.

La **FIL (Fédération internationale du lait)** est une organisation privée à but non lucratif qui représente les intérêts des divers acteurs de la filière laitière au niveau international. Les membres de la FIL sont organisés en comités nationaux, qui sont des associations nationales composées de représentants de groupes d'intérêt nationaux dans le secteur des produits laitiers, des fournisseurs de produits laitiers, des universitaires et des représentants des gouvernements/autorités chargées du contrôle des aliments.

L'ISO et la FIL collaborent étroitement à toutes les activités de normalisation concernant les méthodes d'analyse et d'échantillonnage du lait et des produits laitiers. Depuis 2001, l'ISO et la FIL publient conjointement leurs Normes internationales en utilisant les logos et les numéros de référence des deux organismes.

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).

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.

Le présent document a été élaboré par le *comité permanent de la FIL chargé des méthodes d'analyse de la composition* et par le comité technique de l'ISO, l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

L'ensemble des travaux a été confié à l'équipe d'action mixte ISO/FIL C41 du comité permanent chargé des Méthodes d'analyse de la composition, sous la conduite de son chef de projet, M. S. Austin (CH).

ISO 22579:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8841b15-0f68-4813-a8bb-2acb680436c8/iso-22579-2020>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 22579:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8841b15-0f68-4813-a8bb-2acb680436c8/iso-22579-2020>

Préparations pour nourrissons et produits nutritionnels pour adultes — Dosage des fructanes — Chromatographie échangeuse d'anions haute performance couplée à la détection par ampérométrie pulsée (CEAHP-DAP) après traitement enzymatique

AVERTISSEMENT — La méthode décrite dans le présent document utilise des produits chimiques corrosifs (hydroxyde de sodium, acide acétique) et toxiques (azoture de sodium). Consulter les fiches de données de sécurité et prendre les mesures de sécurité supplémentaires applicables à la manipulation et la mise au rebut des déchets.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de dosage des fructanes de type inuline (tels que l'oligofructose, les fructo-oligosaccharides) dans les formules pour nourrissons et les produits nutritionnels pour adultes (en poudre ou liquides) contenant 0,03 g/100 g à 5,0 g/100 g de fructanes dans le produit préparé sous une forme prête à la consommation.

La méthode a été validée lors d'une étude interlaboratoire^[1] avec un matériau de référence standard (SRM) reconstitué de type préparation nutritionnelle pour nourrissons/adultes à une concentration de 0,204 g/100 g, produits nutritionnels prêts à l'emploi (RTF) pour adultes à des concentrations de 1,28 g/100 g et 2,67 g/100 g, préparation RTF pour nourrissons à une concentration de 0,300 g/100 g, préparation de suite reconstituée à des concentrations de 0,209 g/100 g à 0,275 g/100 g, préparation reconstituée pour nourrissons à des concentrations de 8 g/100 g à 0,264 g/100 g. Pendant l'étude de validation intralaboratoire^[2], des essais de recouvrement ont été menés jusqu'à 5 g/100 g dans les préparations en poudre reconstituées pour nourrissons (à base de lait, de lait partiellement hydrolysé et de soja), le produit nutritionnel RTF et les produits nutritionnels reconstitués pour adultes.

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, fabriqué à partir d'un mélange de lait, de soja, de riz, de lactosérum, de protéine hydrolysée, d'amidon et d'acides aminés, avec ou 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]

3.3

préparation de suite

aliment destiné à constituer la partie liquide d'un régime de sevrage pour nourrissons dès six mois et pour enfants en bas âge jusqu'à trois ans

Note 1 à l'article: à l'article La préparation de suite comprend la préparation pour enfants et enfants en bas âge.

[SOURCE: Codex Standard 156-1987]

4 Principe

Les échantillons sont reconstitués dans de l'eau (si nécessaire) puis dilués jusqu'à ce que la concentration en fructanes dans la solution soit telle qu'après hydrolyse, la concentration en fructose et en glucose se situe dans la plage couverte par la courbe d'étalonnage. L'échantillon dilué est traité avec un mélange de sucrase et d' α -glucanases hautement spécifique pour hydrolyser le saccharose et les α -glucosaccharides en leurs monosaccharides constitutifs. L'échantillon est passé au travers d'une colonne d'extraction en phase solide (SPE) garnie de carbone graphité. Les sels et les monosaccharides passent à travers et sont emportés, tandis que les fructanes sont retenus. Les fructanes sont détachés de la colonne à l'aide d'une solution d'acétonitrile. Les fructanes détachés sont hydrolysés avec un mélange de fructanase, et le glucose et le fructose détachés sont analysés par chromatographie échangeuse d'anions haute performance couplée à la détection par ampérométrie pulsée (CEAHP-DAP). La teneur en fructane est calculée en additionnant la teneur en glucose et 0,9 fois la teneur en fructose mesurées. Dans certaines matrices, une correction du blanc peut être nécessaire et peut être appliquée.

5 Produits chimiques et réactifs

5.1 Liste des produits chimiques et réactifs

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue. Sauf indication contraire, les solvants doivent être de qualité CLHP.

5.1.1 **Eau déionisée**, purifiée, ayant une résistivité $\geq 18 \text{ M}\Omega$.

5.1.2 **Acide maléique**, pureté $\geq 99,0 \%$.

5.1.3 **Acétonitrile**.

5.1.4 **Acide acétique**, glacial, 100 %, anhydre.

5.1.5 **Hexacyanoferrate(II) de potassium trihydraté**, en option.

5.1.6 **Acétate de zinc**, en option.

5.1.7 **Acide trifluoroacétique (TFA)**.

5.1.8 **Acide chlorhydrique**, concentration $c = 1 \text{ mol/l}$.

5.1.9 Acétate de sodium anhydre, pureté $\geq 99,0$ %, uniquement en cas d'utilisation de colonnes B (6.13.2) pour la CEAHP-DAP.

5.1.10 Solution d'hydroxyde de sodium, 50 % (fraction massique).

5.1.11 Granulés d'hydroxyde de sodium.

5.1.12 Chlorure de sodium.

5.1.13 Azoture de sodium, en option.

5.1.14 D-(-)-fructose, pureté $\geq 99,0$ % (masse sèche).

5.1.15 D-(+)-glucose, pureté $\geq 99,5$ % (masse sèche).

5.1.16 N,N'-diacétylchitobiose, pureté > 90 %.

5.1.17 Mélange de sucrase, β -amylase, pullulanase et maltase hautement purifiées, issu du kit de dosage du fuctane K-FRUC¹⁾ (Megazyme International Ireland Ltd ou équivalent). Il convient que 200 μ l de solution travail à base de mélange d'enzymes (5.2.10) permettent d'hydrolyser 2 mg de saccharose dans les conditions décrites dans la méthode (90 min à 40 °C) sans hydrolyser les fructanes.

5.1.18 Mélange d'exo- et endo-inulinases hautement purifiées et d'endo-lévanase recombinante, issu du kit de dosage du fuctane K-FRUC¹⁾ (Megazyme International Ireland Ltd ou équivalent). Il convient que 100 μ l de solution travail à base de mélange d'enzymes (5.2.11) permettent d'hydrolyser 70 μ g de fructanes dans les conditions décrites dans la méthode (40 min à 40 °C).

5.2 Préparation des réactifs <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8841b15-0f68-4813-a8bb-2acb680436c8/iso-22579-2020>

5.2.1 Solution d'hydroxyde de sodium, $c = 2$ mol/l.

Dans une fiole jaugée de 500 ml, dissoudre 40 g \pm 1 g de granulés d'hydroxyde de sodium dans 250 ml d'eau déionisée. Après refroidissement à température ambiante, compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée et bien mélanger. Cette solution est stable pendant six mois à température ambiante.

5.2.2 Solution tampon de maléate de sodium, $c = 0,100$ mol/l, pH = 6,5.

Dans un grand bécher (> 500 ml), peser 5,8 g d'acide maléique et dissoudre dans 450 ml d'eau déionisée à l'aide d'un agitateur magnétique. Ajuster à pH = 6,5 avec la solution d'hydroxyde de sodium (5.2.1). Transférer la solution dans une fiole jaugée de 500 ml et compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée. Cette solution est stable pendant trois mois à 4 °C.

5.2.3 Solution tampon d'acétate de sodium, $c = 0,100$ mol/l, pH = 4,5.

Dans un grand bécher (> 500 ml) contenant 450 ml d'eau déionisée, introduire à la pipette 2,9 ml d'acide acétique glacial. Ajuster à pH = 4,5 avec la solution d'hydroxyde de sodium (5.2.1). Transférer la solution dans une fiole jaugée de 500 ml et compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée. Cette solution est stable pendant trois mois à 4 °C.

1) Ceci est un exemple d'un 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 ou de la FIL à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.2.4 Solution étalon interne de N,N'diacétylchitobiose, concentration $\rho = 600 \mu\text{g/ml}$.

Dans une fiole jaugée de 25 ml, peser 15 mg de N,N'diacétylchitobiose et compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée. Cette solution est stable pendant un an à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.2.5 Solution mère de glucose, $\rho = 5 \text{ mg/ml}$.

Dans une fiole jaugée de 25 ml, peser 125 mg de glucose et compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée. Cette solution est stable pendant un an à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.2.6 Solution mère de fructose, $\rho = 10 \text{ mg/ml}$.

Dans une fiole jaugée de 25 ml, peser 250 mg de fructose et compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée. Cette solution est stable pendant un an à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.2.7 Solution de Carrez I

Dissoudre 10,6 g d'hexacyanoferrate(II) de potassium trihydraté dans 100 ml d'eau déionisée et conserver dans un flacon ambré. Cette solution est stable pendant six mois à température ambiante (réactif en option).

5.2.8 Solution de Carrez II

Dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre 22,0 g d'acétate de zinc dans 90 ml d'eau déionisée et ajouter 2,9 ml d'acide acétique glacial. Compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée et homogénéiser. Cette solution est stable pendant six mois à température ambiante (réactif en option).

5.2.9 Solution d'azoture de sodium, $\rho = 5 \text{ g/l}$.

Dissoudre 1 g d'azoture de sodium dans 200 ml d'eau déionisée (réactif en option).

5.2.10 Mélange de solution de sucrase, β -amylase, pullulanase et maltase

Dissoudre le contenu du flacon contenant le mélange en poudre lyophilisé de sucrase, β -amylase, pullulanase et maltase dans 22,0 ml de solution tampon de maléate de sodium (5.2.2). Bien mélanger et diviser en aliquotes de 2 ml chacune. Conserver au congélateur à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ dans des tubes en polypropylène jusqu'à utilisation. Cette solution est stable pendant cinq ans à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

IMPORTANT — Pour la mise au point et la validation de cette méthode, un mélange d'enzymes prêt à l'emploi disponible dans le commerce auprès de Megazyme²⁾ (5.1.17) a été utilisé. Lorsque des enzymes d'une autre provenance sont utilisées, il peut être nécessaire d'adapter la composition du tampon (type, concentration et pH) en fonction des recommandations du fournisseur. Il est également impératif de s'assurer que le mélange d'enzymes utilisé hydrolysera complètement le saccharose présent dans le produit sans hydrolyser le fructane. Pour le vérifier, effectuer une analyse en utilisant le saccharose comme analyte et un fructane pur comme analyte. Il convient que le fructane ne soit pas détecté lorsque le saccharose est analysé, et qu'un taux de récupération supérieur à 90 % soit obtenu lorsqu'un fructane de pureté connue est analysé (recommandation de vérifier avec de l'inuline à longue chaîne et des fructo-oligosaccharides à courte chaîne). Un autre essai de contrôle de l'applicabilité et de la performance du mélange d'enzymes est décrit à l'Annexe C.

2) Ceci est un exemple d'un 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 ou de la FIL à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.2.11 Solution de fructanase (exo-/endo-inulinases et endo-lévanase).

Dissoudre le contenu du flacon contenant le mélange en poudre lyophilisé d'exo- et endo-inulinases et d'endo-lévanase dans 22,0 ml de solution tampon d'acétate de sodium (5.2.3). Bien mélanger et diviser en aliquotes de 2 ml chacune. Conserver au congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans des tubes en polypropylène jusqu'à utilisation. Cette solution est stable pendant cinq ans à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IMPORTANT — Pour la mise au point et la validation de cette méthode, un mélange d'enzymes prêt à l'emploi disponible dans le commerce auprès de Megazyme² (5.1.18) a été utilisé. Lorsque des enzymes d'une autre provenance sont utilisées, il peut être nécessaire d'adapter la composition du tampon (type, concentration et pH) en fonction des recommandations du fournisseur. Il est également impératif de s'assurer que le mélange d'enzymes utilisé hydrolysera complètement le fructane sans hydrolyser l'oligosaccharide ou le polysaccharide contenant du glucose ou du fructose potentiellement présent après traitement avec le mélange de sucrase ci-dessus. Pour le vérifier, effectuer une analyse en utilisant un fructane pur comme analyte. Il convient d'obtenir un taux de récupération supérieur à 90 % lorsqu'un fructane de pureté connue est analysé.

5.2.12 Solution de lavage pour colonne d'extraction en phase solide (SPE) garnie de carbone graphité, TFA 0,1 % dans l'acétonitrile 80 % (fraction volumique).

Dans une fiole jaugée de 100 ml, ajouter 80 ml d'acétonitrile et 100 μl de TFA. Compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée. Cette solution est stable pendant six mois à température ambiante.

5.2.13 Solution de chlorure de sodium, $c = 1\text{ mol/l}$, pour colonne SPE garnie de carbone graphité.

Dans une fiole jaugée de 100 ml, peser 5,8 g de chlorure de sodium et dissoudre dans 90 ml d'eau déionisée. Compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée. Cette solution est stable pendant six mois à température ambiante.

5.2.14 Solution d'éluant pour colonne SPE garnie de carbone graphité, TFA 0,05 % dans l'acétonitrile 25 % (fraction volumique).

Dans une fiole jaugée de 100 ml, ajouter 25 ml d'acétonitrile et 50 μl de TFA. Compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée. Cette solution est stable pendant six mois à température ambiante.

5.3 Préparation des phases mobiles à l'aide de la colonne A (6.13.1) ou d'une colonne équivalente

En cas d'utilisation de colonnes B (6.13.2), passer ce paragraphe et aller directement au [paragraphe 5.4](#).

5.3.1 Éluant A pour colonne A (6.13.1), solution d'hydroxyde de sodium, $c = 0,600\text{ mol/l}$.

Dans un flacon d'éluant, introduire 970 ml d'eau déionisée et dégazer avec de l'hélium pendant 20 min. Ajouter 31,2 ml de solution d'hydroxyde de sodium (5.1.10) (à l'aide d'une pipette à usage unique en plastique). Dégazer avec de l'hélium pendant 20 min et protéger l'éluant de toute exposition au dioxyde de carbone jusqu'à et pendant l'utilisation, par un moyen approprié (par exemple, en le conservant sous une couche d'hélium). Cette solution est stable pendant une semaine à température ambiante.

5.3.2 Éluant B pour colonne A (6.13.1), eau déionisée ayant une résistivité $\geq 18\text{ M}\Omega$.

Dans un flacon d'éluant, introduire 2 000 ml d'eau déionisée (5.1.1) et dégazer avec de l'hélium pendant 20 min. Protéger l'éluant de toute exposition au dioxyde de carbone jusqu'à et pendant l'utilisation, par un moyen approprié (par exemple, en le conservant sous une couche d'hélium). Cette solution est stable pendant quatre jours à température ambiante.

5.3.3 Éluant C pour colonne A (6.13.1), solution d'hydroxyde de sodium, $c = 0,030$ mol/l.

Dans un flacon d'éluant, introduire 1 000 ml d'eau déionisée et dégazer avec de l'hélium pendant 20 min. Ajouter 1,6 ml de solution d'hydroxyde de sodium (5.1.10) (à l'aide d'une pipette à usage unique en plastique). Dégazer avec de l'hélium pendant 20 min et protéger l'éluant de toute exposition au dioxyde de carbone jusqu'à et pendant l'utilisation, par un moyen approprié (par exemple, en le conservant sous une couche d'hélium). Cette solution est stable pendant une semaine à température ambiante.

5.3.4 Réactif d'addition en post-colonne, hydroxyde de sodium, $c = 0,300$ mol/l.

Dans un flacon d'éluant, introduire 985 ml d'eau déionisée et ajouter 15,6 ml de solution d'hydroxyde de sodium (5.1.10) (à l'aide d'une pipette à usage unique en plastique). Agiter doucement la solution en tournant. Dégazer avec de l'hélium pendant 20 min. Cette solution est stable pendant un mois à température ambiante. Dégazer le jour de l'utilisation.

5.4 Préparation des phases mobiles à l'aide des colonnes B (6.13.2) ou de colonnes équivalentes

En cas d'utilisation de la colonne A (6.13.1), passer ce paragraphe.

5.4.1 Éluant A pour colonnes B (6.13.2), solution d'hydroxyde de sodium, $c = 0,200$ mol/l.

Dans un flacon d'éluant, introduire $1\,923\text{ g} \pm 2\text{ g}$ d'eau déionisée et dégazer avec de l'hélium pendant 20 min. Ajouter 20 ml de solution d'hydroxyde de sodium (5.1.10) (à l'aide d'une pipette à usage unique en plastique). Dégazer avec de l'hélium pendant 20 min et protéger l'éluant de toute exposition au dioxyde de carbone jusqu'à et pendant l'utilisation, par un moyen approprié (par exemple, en le conservant sous une couche d'hélium). Cette solution est stable pendant une semaine à température ambiante.

5.4.2 Éluant B pour colonnes B (6.13.2), eau déionisée ayant une résistivité $\geq 18\text{ M}\Omega$.

Remplir un flacon d'éluant de 2 l avec 2 000 ml d'eau déionisée. Dégazer avec de l'hélium pendant 20 min et protéger l'éluant de toute exposition au dioxyde de carbone jusqu'à et pendant l'utilisation, par un moyen approprié (par exemple, en le conservant sous une couche d'hélium). Cette solution est stable pendant quatre jours.

En option, il est possible d'ajouter 5 g/l de solution d'azoture de sodium (5.2.9) à la phase mobile B jusqu'à obtenir une concentration finale de 0,125 g/l. Cela allonge la durée de conservation de l'éluant à environ deux semaines et peut améliorer la résolution chromatographique autour du chitobiose en cas de problèmes.

5.4.3 Éluant C pour colonnes B (6.13.2), solution d'acétate de sodium, $c = 1$ mol/l.

Dans une fiole jaugée de 1 000 ml, peser 82,0 g d'acétate de sodium anhydre (5.1.9) et dissoudre dans 800 ml d'eau déionisée en mélangeant. Compléter jusqu'au trait avec de l'eau déionisée et filtrer sur une membrane filtrante en nylon de 0,20 μm dans un flacon d'éluant. Dégazer avec de l'hélium pendant 20 min et protéger l'éluant de toute exposition au dioxyde de carbone jusqu'à et pendant l'utilisation, par un moyen approprié (par exemple, en le conservant sous une couche d'hélium). Cette solution est stable pendant une semaine à température ambiante.

5.4.4 Réactif d'addition en post-colonne, solution d'hydroxyde de sodium, $c = 0,300$ mol/l).

Dans un flacon d'éluant, introduire 985 ml d'eau déionisée et ajouter 15,6 ml de solution d'hydroxyde de sodium (5.1.10) (à l'aide d'une pipette à usage unique en plastique). Agiter doucement la solution en tournant. Dégazer avec de l'hélium pendant 20 min. Cette solution est stable pendant un mois à température ambiante. Dégazer le jour de l'utilisation.