
**Poudres de lait fortifié, formules
infantiles et produits nutritionnels
pour adultes — Détermination
de la teneur en biotine totale par
chromatographie liquide après
une purification sur colonne
d'immunoaffinité**

*Fortified milk powders, infant formula and adult nutritionals —
Determination of total biotin by liquid chromatography coupled with
immunoaffinity column clean-up extraction*

ISO 23305:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/ac858f22-b081-497a-a6fa-6eac7f403b3d/iso-23305-2020>



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

ISO 23305:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/ac858f22-b081-497a-a6fa-6eac7f403b3d/iso-23305-2020>



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
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.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 Réactifs et matériaux	2
5.1 Généralités	2
5.2 Préparation des réactifs	3
5.3 Préparation des solutions étalons	3
5.4 Calcul de la concentration	4
6 Appareillage	4
7 Mode opératoire	5
7.1 Préparation de l'échantillon	5
7.2 Chromatographie	7
7.3 Contrôle qualité	7
8 Calculs	8
9 Fidélité	9
9.1 Généralités	9
9.2 Répétabilité	9
9.3 Reproductibilité	9
10 Incertitude de mesure	9
11 Limites de quantification	9
Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes	10
Annexe B (informative) Données de fidélité	12
Annexe C (informative) Comparaison entre le présent document et l'EN 15607	14
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 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.

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*, 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 2016.02: *Determination of Total Biotin by Liquid Chromatography Coupled with Immunoaffinity Column Cleanup Extraction: Multilaboratory Testing, Final Action 2016.02*.

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.

Poudres de lait fortifié, formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en biotine totale par chromatographie liquide après une purification sur colonne d'immunoaffinité

AVERTISSEMENT — La présente méthode peut impliquer l'utilisation de produits dangereux et la mise en œuvre de modes opératoires et d'appareillage à caractère dangereux. La présente méthode n'est pas destinée à traiter de tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente méthode d'établir, avant de l'utiliser, des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination quantitative de la teneur en biotine et/ou biocytine dans les poudres de lait fortifié, les formules infantiles et les produits nutritionnels pour adultes sous formes solides (c'est-à-dire, poudres) ou liquides (c'est-à-dire, liquides et concentrés liquides prêts à l'emploi) par chromatographie liquide après purification sur colonne d'immunoaffinité.

Les données de fidélité extraites d'un essai interlaboratoires sont indiquées à l'[Annexe B](#). Une comparaison des données obtenues avec la méthode du présent document et l'EN 15607 est indiquée à l'[Annexe C](#).

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

formule infantile

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

Dispersion de l'échantillon dans un tampon phosphate de sodium et passage à l'autoclave à $121\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant 25 min. Refroidissement de l'échantillon à température ambiante puis dilution à 100 ml dans une fiole jaugée. Centrifugation et filtration de l'extrait à l'aide d'un filtre en microfibres de verre. Collecte du filtrat limpide en vue de sa purification et de son extraction. Montage d'une colonne d'immunoaffinité pour la biotine sur un collecteur d'extraction en phase solide (SPE). Raccordement d'un corps de seringue jetable à la colonne d'immunoaffinité en tant que réservoir. Élimination du tampon présent dans la colonne d'affinité, dépôt du filtrat d'échantillon à travers le réservoir et écoulement par gravité. Lavage de la colonne avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) puis avec de l'eau. Introduction d'air dans la colonne pour éliminer le liquide résiduel.

Élution de la biotine et/ou biocytine de la colonne avec du méthanol et collecte dans un flacon. Évaporation à sec de l'éluat à l'aide d'un bloc chauffant réglé à $85\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ sous un léger flux d'azote et reconstitution de l'échantillon dans 1 ml d'eau. Analyse simultanée par CLHP de la biotine et de la biocytine dans l'échantillon reconstitué à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes (PDA) réglé à 200 nm. Identification des pics d'après le temps de rétention absolu. Quantification par étalonnage externe multipoint à l'aide des réponses des aires de pic des analytes. Possibilité d'utiliser un spectre (200 nm à 350 nm) pour confirmer la pureté et l'identité selon les exigences.

5 Réactifs et matériaux

5.1 Généralités

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.

5.1.1 Eau de qualité pour laboratoire.

5.1.2 Dihydrogénophosphate de sodium dihydraté (CAS n° 13472-35-0).

5.1.3 Hydrogénophosphate de disodium dihydraté (CAS n° 10028-24-7).

5.1.4 Hydroxyde de sodium (CAS n° 1310-73-2).

5.1.5 Méthanol, de qualité CLHP (CAS n° 67-56-1).

5.1.6 Acétonitrile, de qualité CLHP (CAS n° 75-05-8).

5.1.7 Acide orthophosphorique, fraction massique w (H_3PO_4) = 85 % (CAS n° 7664-38-2).

5.1.8 PBS, pH = 7,4 (Thermo Scientific¹⁾ ou équivalent).

5.1.9 Biotine, pureté $\geq 99\%$ (réf. B4501 Sigma Chemical¹⁾ ou équivalent).

5.1.10 Biocytine, pureté $\geq 98\%$ (réf. B4261 Sigma Chemical¹⁾ ou équivalent).

1) Il s'agit d'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 à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.2 Préparation des réactifs

5.2.1 Hydroxyde de sodium, concentration $c = 2 \text{ mol/l}$.

Peser 80 g d'hydroxyde de sodium dans une fiole jaugée de 1 l, dissoudre et compléter au volume avec de l'eau.

5.2.2 Tampon phosphate de sodium, $c = 0,15 \text{ mol/l}$.

Peser 9,15 g de dihydrogénophosphate de sodium dihydraté et 16,31 g d'hydrogénophosphate de disodium dihydraté dans une fiole jaugée de 1 l, dissoudre et compléter au volume avec de l'eau. Ajuster le pH à 7 avec la solution d'hydroxyde de sodium à 2 mol/l.

5.2.3 Acide phosphorique, $w = 0,1 \%$.

Dans une fiole jaugée de 1 l, transvaser 500 ml d'eau. Ajouter 1,2 ml d'acide orthophosphorique. Mélanger et compléter au volume avec de l'eau.

5.2.4 Phase mobile A, 0,1 % d'acide phosphorique dans l'eau.

5.2.5 Phase mobile B, 100 % d'acétonitrile.

5.2.6 Phase mobile C, 80 % d'acétonitrile.

5.3 Préparation des solutions étalons

5.3.1 Solution mère étalon de biotine, concentration massique $\rho = 100 \text{ µg/ml}$.

Dans une fiole jaugée ambrée de 250 ml, peser 25 mg de l'étalon de biotine. Ajouter 150 ml d'eau et passer au bain à ultrasons à température ambiante pendant 90 min en agitant occasionnellement. Compléter au volume avec de l'eau.

5.3.2 Solution mère étalon de biocytine, $\rho = 100 \text{ µg/ml}$.

Dans une fiole jaugée de 100 ml, peser 10 mg d'étalon de biocytine. Ajouter 60 ml d'eau et passer au bain à ultrasons à température ambiante pendant 90 min en agitant occasionnellement. Compléter au volume avec de l'eau.

5.3.3 Solution étalon intermédiaire mixte, $\rho = 100 \text{ µg/100 ml}$.

Diluer 1 ml de chaque solution mère étalon dans 100 ml d'eau.

5.3.4 Solution d'étalonnage 1, $\rho = 1,0 \text{ µg/100 ml}$.

Diluer 100 µl de solution étalon intermédiaire mixte dans 10 ml d'eau.

5.3.5 Solution d'étalonnage 2, $\rho = 2,5 \text{ µg/100 ml}$.

Diluer 250 µl de solution étalon intermédiaire mixte dans 10 ml d'eau.

5.3.6 Solution d'étalonnage 3, $\rho = 5,0 \text{ µg/100 ml}$.

Diluer 500 µl de solution étalon intermédiaire mixte dans 10 ml d'eau.

5.3.7 Solution d'étalonnage 4, $\rho = 7,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

Diluer 750 μl de solution étalon intermédiaire mixte dans 10 ml d'eau.

5.3.8 Solution d'étalonnage 5, $\rho = 10 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

Diluer 1 ml de solution étalon intermédiaire mixte dans 10 ml d'eau.

5.3.9 Solution d'étalonnage 6, $\rho = 20 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

Diluer 2 ml de solution étalon intermédiaire mixte dans 10 ml d'eau.

5.4 Calcul de la concentration

Les concentrations données en 5.3 sont purement indicatives. Calculer les concentrations réelles en biotine et en biocytine dans chaque solution d'étalonnage, en $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$, d'après la [Formule \(1\)](#). Il convient d'injecter les solutions d'étalonnage au début et en fin de cycle d'analyse.

$$\rho_{(\text{biotine/biocytine})} = \frac{(m_1 \times P \times 10 \times V_{\text{is}})}{(V \times 10)} \quad (1)$$

où

m_1 est la masse de biotine ou de biocytine, en mg;

P est le pourcentage de pureté indiqué par le certificat d'analyse ou vérifié par les monographies de l'USP/BP/Ph Eur;

V_{is} est le volume de solution étalon intermédiaire mixte pour la solution d'étalonnage, en ml;

V est le volume de solution mère étalon, $V = 250 \text{ ml}$ pour la biotine et $V = 100 \text{ ml}$ pour la biocytine.

ISO 23305:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/ac858f22-b081-497a-a6fa-6eac7f403b3d/iso-23305-2020>

6 Appareillage

Appareillage et verrerie de laboratoire habituels et, en particulier, les éléments suivants.

6.1 Système CLHP, constitué d'un détecteur PDA, d'un système de pompe à gradient basse pression, d'une unité d'injection d'échantillons, d'une unité de dégazage et d'un four à colonne.

6.2 Colonne, Kinetex Phenyl-Hexyl (réf. 00F-4495-E0, Phenomenex²⁾), 150 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 2,6 μm $\times$ 10 nm.

6.3 Filtres en microfibres de verre (réf. 1820-125, Whatman^{®2)}).

6.4 Colonne d'immunoaffinité (R-Biopharm Rhone EASI-EXTRACT[®] BIOTIN P82/P82B²⁾ ou équivalente).

6.5 Collecteur SPE, avec accessoires.

6.6 Autoclave, réglé à 121 °C.

2) Il s'agit d'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 à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

- 6.7 **Centrifugeuse**, vitesse variable.
- 6.8 **Balance analytique**, quatre décimales.
- 6.9 **Flacon en verre ambré avec bouchon à vis**, 100 ml.
- 6.10 **Agitateur horizontal**.
- 6.11 **Fioles jaugées**, de 1 l, 250 ml, 100 ml et 10 ml.
- 6.12 **Pipettes**, étalonnées, 10,0 ml, 5,0 ml, 1,0 ml, 200 µl, 100 µl et 50 µl.
- 6.13 **Éprouvette graduée**, 1 000 ml, 100 ml et 50 ml.
- 6.14 **Flacon de réaction**, Reacti-Vials (réf. 13223, Thermo Scientific²).
- 6.15 **Bloc chauffant**, Reacti-therm, avec jet d'azote (Thermo Scientific²).
- 6.16 **Bain à ultrasons**, réglé à 50 °C et à température ambiante.
- 6.17 **Tubes à centrifuger**, 50 ml.
- 6.18 **Vortex**
- 6.19 **Filtre pour seringue**, polytétrafluoroéthylène (PTFE), 0,45 µm.
- 6.20 **Seringues jetables**, 10 ml et 1 ml.
- 6.21 **Flacons CLHP**, 2 ml, avec inserts en verre de 200 µl.

7 Mode opératoire

7.1 Préparation de l'échantillon

7.1.1 Pour connaître la masse et les volumes de dépôt des différents types de produits, voir le [Tableau 1](#). Une suspension peut être utilisée si l'homogénéité du produit est suspectée ou inconnue.

Pour la suspension, reconstituer 25 g de poudre (m_1) avec de l'eau tiède (~50 °C) jusqu'à obtenir une masse totale de 200 g (m_2). Bien mélanger sur un agitateur horizontal pendant 20 min puis passer au bain à ultrasons à 50 °C pendant 10 min. Refroidir à température ambiante. Pour les échantillons liquides, bien mélanger pour homogénéiser la prise d'essai et peser la quantité spécifiée.

7.1.2 Peser l'échantillon/la suspension (m_3) dans un flacon en verre ambré avec bouchon à vis de 100 ml. Voir le [Tableau 1](#).

7.1.3 Ajouter le tampon phosphate de sodium 0,15 mol/l jusqu'à obtenir un volume approximatif de 50 ml.

7.1.4 Agiter doucement le mélange.

7.1.5 Passer la préparation d'échantillon à l'autoclave à 121 °C pendant 25 min.

7.1.6 Refroidir l'échantillon à température ambiante. Transvaser quantitativement l'extrait dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter au volume avec le tampon phosphate de sodium 0,15 mol/l. Bien mélanger.

7.1.7 Transvaser l'extrait dans un tube à centrifuger et centrifuger l'échantillon à 4 000 r/min pendant 15 min.

7.1.8 Filtrer l'échantillon à l'aide d'un papier filtre en microfibre de verre (6.3) et collecter le filtrat.

7.1.9 Installer le collecteur SPE (6.5). Fixer la colonne d'immunoaffinité (IAC) raccordée à un réservoir de 10 ml. Laisser le tampon s'écouler juste au-dessus du gel.

7.1.10 Charger le filtrat d'échantillon sur la colonne conformément au [Tableau 1](#) et démarrer l'écoulement à l'aide d'une pompe à vide.

7.1.11 Arrêter le vide et laisser la solution traverser la colonne par gravité à un débit d'une goutte par seconde.

7.1.12 Laver la colonne en faisant passer 10 ml de PBS (5.1.8) à travers la colonne, puis 10 ml d'eau. Démarrer l'écoulement en appliquant un vide à chaque étape puis laisser l'écoulement s'opérer par gravité.

7.1.13 Éliminer le liquide résiduel de la colonne en introduisant un léger vide.

7.1.14 Introduire un flacon de réaction (6.14) et éluer l'analyte sous gravité avec 2 ml de méthanol. Continuer d'éluer avec 1 ml supplémentaire de méthanol. Lors de l'élution, procéder à un backflush au moins trois fois; pour cela, effectuer un doux mouvement de haut en bas du piston de la seringue, pour optimiser l'élution.

7.1.15 Évaporer à sec l'éluat en utilisant un bloc chauffant (6.15) réglé à 85 °C ± 5 °C sous un léger courant d'azote.

7.1.16 Retirer du bloc chauffant et refroidir à température ambiante (environ 15 min).

7.1.17 Reprendre le résidu avec 1 ml d'eau puis boucher le flacon de réaction (6.14) et mélanger au vortex pendant 30 s. Filtrer à l'aide d'un filtre pour seringue dans un insert en verre propre et transvaser dans un flacon CLHP en vue de l'analyse CLHP.

Tableau 1 — Masse, volume de dilution et volume de dépôt de l'échantillon

Biotine µg/100 g		Préparation de l'échantillon				Conc µg/100 ml	
Min.	Max.	Masse (g)	Volume (ml)	Dépôt (ml)	Final	Min.	Max.
0,1	0,5	20	100	50	1 ml	1	5
0,5	1,0	10	100	20	1 ml	1	2
1,0	5,0	10	100	10	1 ml	1	5
5,0	50,0	2,0 (16 g de suspension)	100	10	1 ml	1	10
50,0	100,0	1,0 (8 g de suspension)	100	10	1 ml	5	10
100,0	400,0	0,5 (4 g de suspension)	100	5	1 ml	2,5	10