



Norme
internationale

ISO 20631

**Préparations pour nourrissons
et produits nutritionnels pour
adultes — Détermination de
la teneur en folates totaux par
extraction trienzymatique et
chromatographie liquide à ultra
performance (CLUHP) couplée à une
spectrométrie de masse en tandem
(SM/SM)**

[ISO 20631:2024](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b0650c23-91b4-48f4-bd6f-70607d07f24c/iso-20631-2024>

*Infant formula and adult nutritionals — Determination of
total folate content by trienzyme extraction and ultra high
performance liquid chromatography tandem mass spectrometry
(UHPLC-MS/MS)*

Première édition
2023-12

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

ISO 20631:2024

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b0650c23-91b4-48f4-bd6f-70607d07f24c/iso-20631-2024>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2023

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

Publié en Suisse

Sommaire	Page
Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	1
5 Réactifs et matériaux	2
5.1 Liste de réactifs	2
5.2 Préparation du solvant pour solutions étalons	3
5.3 Préparation des solutions étalons de folates	4
5.4 Préparation des solutions mères d'étalons internes de folates	5
5.5 Préparation des solutions d'étalonnage	7
5.6 Préparation de la solution de substrat pour évaluer l'activité conjugase de plasma	8
5.7 Réactif pour l'analyse des folates	8
6 Appareillage	10
7 Mode opératoire	11
7.1 Préparation des échantillons	11
7.1.1 Traitement des échantillons pour les rendre homogènes	11
7.1.2 Reconstitution de l'échantillon en poudre en liquide	11
7.2 Extraction	11
7.3 Purification des échantillons	12
7.4 Analyse instrumentale	12
7.4.1 Analyse du blanc d'instrument, des solutions d'étalonnage, du blanc de méthode et des échantillons	12
7.4.2 Conditions de CLUHP et paramètres de SM pour différents systèmes	12
8 Calculs	14
8.1 Calcul des rapports des aires de pics des vitamères de folates aux aires de pics des étalons internes	14
8.2 Courbe d'étalonnage	14
8.3 Calcul de la concentration des vitamères de folates dans le blanc de méthode	14
8.4 Calcul de la concentration des vitamères de folates dans les échantillons	14
8.5 Calcul de la concentration des vitamères de folates et des folates totaux dans des échantillons reconstitués ou RTF ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	15
8.6 Calcul de la concentration de folates totaux dans les échantillons en poudre ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) en l'état	16
8.7 Calcul de la concentration d'acide folique (en nanogrammes) libéré lors du test de la conjugase	16
8.8 Calcul du pourcentage de conversion du Pte-Glu3 en acide folique lors du test de la conjugase	16
9 Fidélité	17
9.1 Généralités	17
9.2 Répétabilité	17
9.3 Reproductibilité	17
Annexe A (informative) Données de fidélité	19
Bibliographie	20

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'ISO attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de propriété revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse www.iso.org/brevets. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié tout ou partie de tels droits de propriété.

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 2011.06, Total Folate in Infant Formula and Adult Nutritional by Trienzyme Extraction and LC-MS/MS Quantitation.

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.

Préparations pour nourrissons et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en folates totaux par extraction trienzymatique et chromatographie liquide à ultra performance (CLUHP) couplée à une spectrométrie de masse en tandem (SM/SM)

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de la teneur en folates totaux dans les préparations pour nourrissons et produits nutritionnels pour adultes par extraction trienzymatique et chromatographie liquide à ultra haute performance (CLUHP) couplée à une spectrométrie de masse en tandem (SM/SM).

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 <https://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 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

Les folates présents dans un échantillon sont extraits dans un tampon (pH = 6,0) contenant des étalons internes, par des traitements à la protéase, à l'amylase et à la conjugase de plasma de rat (digestion trienzymatique). L'extrait est purifié et concentré par extraction en phase solide (SPE) avec échangeur d'anions faibles (WAX). Les formes polyglutamates des folates présents dans l'échantillon sont déconjuguées en monoglutamates pendant l'extraction, puis analysées par CLUHP-SM/SM. L'acide folique, le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-CH₃-THF) et le 5-formyl-tétrahydrofolate (5-CHO-THF) sont quantifiés, et la teneur en

folates totaux est estimée et exprimée sous forme d'acide folique. L'acide folique (^{13}C -acide folique), le 5- CH_3 -THF (^{13}C -5- CH_3 -THF) et le 5-CHO-THF (^{13}C -5-CHO-THF) marqué aux isotopes sont utilisés comme étalons internes (IS).

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.

Sauf spécification contraire, la plupart des produits chimiques utilisés sont de qualité CL-SM. Les références et les fournisseurs des produits, lorsqu'ils sont énumérés, reflètent ceux utilisés lors de la validation. Des produits chimiques équivalents peuvent être utilisés.

Tous les produits chimiques utilisés pendant la préparation des étalons ont été stockés à une température minimale de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ou conformément aux instructions du fabricant. Étant donné que les vitamines de folates sont photosensibles, tous les échantillons et étalons doivent être préparés, manipulés et stockés à l'abri de la lumière ou sous un éclairage anti-lumière jaune ou sous filtre protégeant des UV. Si les étalons et les échantillons doivent être transportés dans une zone, ou en passant par une zone, sans protection contre les UV, ils doivent être totalement emballés dans une feuille d'aluminium.

Stocker les produits chimiques conformément aux lignes directrices du fabricant ou aux conventions établies.

5.1 Liste de réactifs

5.1.1 Acide folique (étalon) (FA), Schircks Laboratories, réf. 16.203¹⁾.

5.1.2 Acide (6R,S)-5-méthyl-5,6,7,8-tétrahydrofolique (5- CH_3 -THF), sel de calcium, Schircks Laboratories, réf. 16.235¹⁾.

5.1.3 Acide (6S)-5-formyl-5,6,7,8-tétrahydrofolique (5-CHO-THF), sel de calcium, Schircks Laboratories, réf. 16.221¹⁾.

5.1.4 Acide ptéroyltri- γ -L-glutamique (Triglutamate d'acide folique) (Pte-Glu3), Schircks Laboratories, réf. 16.253¹⁾.

Ce réactif peut également provenir de Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada, réf. P840220¹⁾.

5.1.5 Acide folique marqué au $^{13}\text{C}_5$ (étalon interne) ($^{13}\text{C}_5$ -FA), IsoSciences, PA, réf. 14139¹⁾.

5.1.6 Acide (6S)-5-méthyltétrahydrofolique marqué au $^{13}\text{C}_5$ ($^{13}\text{C}_5$ - CH_3 -THF), sel de calcium (étalon interne), IsoSciences, PA, réf. 14168Ca¹⁾.

5.1.7 Acide (6S)-5-formyltétrahydrofolique marqué au $^{13}\text{C}_5$ ($^{13}\text{C}_5$ -CHO-THF), sel de calcium (étalon interne), Merck Cie¹⁾.

Ce réactif peut également provenir de asi chemicals, 1837 University Circle, Sci. Bldg, Rm. 308, Cheyney, PA 19319, États-Unis. Web: www.asichemicals.com; e-mail: info@asichemicals.com, Téléphone: 609-440-0020¹⁾. Disponible en conditionnement de 1 mg. Ce fournisseur propose également un kit regroupant les trois étalons internes, en conditionnement de 1 mg chacun.

5.1.8 α -Amylase d'*Aspergillus oryzae*, poudre, ≥ 150 unités/mg protéine, Sigma-Aldrich, réf. A9857¹⁾.

1) Les produits chimiques répertoriés ont été utilisés lors de l'étude de validation. Ces produits sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO recommande l'emploi des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils aboutissent aux mêmes résultats.

5.1.9 Protéase de *Bacillus licheniformis*, Subtilisine A, poudre lyophilisée, Sigma-Aldrich, réf. P3910¹).

5.1.10 Conjugase (plasma de rats Sprague Dawley mâles) avec lithium et héparine (non filtrée), BIOIVT, réf. RAT00PLLHMNN¹).

Le réactif à base de plasma de rats peut également provenir d'Odin Bioscience¹, 1621 Central Ave., Cheyenne, WY 82001, usainfo@odinbioscience.com ou de Lampire Biological Laboratories, Pipersville, 18947. PA, États-Unis¹).

5.1.11 Solution d'hydroxyde d'ammonium, (certifiée ACS Plus) 28 % à 30 % (fraction massique), (ammoniaque), Fisher, réf. A669-500¹).

5.1.12 Phosphate de sodium, dibasique anhydre (grains ou poudre/certifiée ACS, ≥ 99 %), Fisher, réf. S-374-500¹).

5.1.13 Méthanol, qualité Optima CL/SM, 99,9 % minimum, Fisher, réf. A456-4¹).

5.1.14 Acide acétique glacial, (certifié ACS), Fisher, réf. A38S-212¹).

5.1.15 Hydroxyde de sodium, (granulés/certifié ACS), ≥ 97 %, Fisher, réf. S318-1¹).

5.1.16 Acétate d'ammonium, (cristallin/certifié ACS), ≥ 97 %, Fisher, réf. A637-500¹).

5.1.17 2-Mercaptoéthanol, (qualité électrophorèse), ≥ 98 %, Fisher, réf. BP176-100; Sigma M6250¹).

5.1.18 Acide ascorbique, (poudre cristalline blanche), ≥ 99 %, Fisher, réf. BP351-500¹).

5.1.19 Tris-(2-carboxyéthyl)phosphine, chlorhydrate (TCEP-HCl), Fisher, réf. AC 363830100¹).

5.1.20 Charbon, (charbon actif Darco G-60), Fisher, réf. D127-500¹).

5.1.21 Acide formique, (qualité réactif), ≥ 95 %, eau ≤ 2,5 %, acide acétique < 1 %, Sigma F0507¹).

5.1.22 Eau, (haute pureté, appropriée pour la phase mobile pour CLHP), résistivité jusqu'à 18 MΩ·cm¹).

5.2 Préparation du solvant pour solutions étalons

5.2.1 Solution stock de solvant, concentration $c = 15,6 \times 10^{-3}$ mol/l de tampon acétate d'ammonium avec 25 % d'acide ascorbique et 1 % de mercaptoéthanol, pH = 5,5.

Peser exactement 0,6 g ± 0,01 g d'acétate d'ammonium et transférer dans un bécher de 500 ml. Sous une hotte aspirante, ajouter lentement environ 300 ml d'eau pour CLHP et 2,4 ml d'acide acétique glacial. Ajouter 125 g d'acide ascorbique et 5 ml de 2-mercaptoéthanol. Agiter pour dissoudre complètement. Ajuster le pH à 5,5 à l'aide d'hydroxyde d'ammonium concentré (28 % à 30 %). Transférer la solution dans une fiole jaugée de 500 ml et compléter au volume (500 ml) avec de l'eau pour CLHP. Mélanger soigneusement.

5.2.2 Solution de solvant intermédiaire, $c = 1,6 \times 10^{-3}$ mol/l de tampon acétate d'ammonium avec 1 % d'acide ascorbique, pH = 5,5.

Peser exactement 0,12 g ± 0,001 g d'acétate d'ammonium et transférer dans un bécher de 1 l. Sous une hotte aspirante, ajouter lentement environ 700 ml d'eau pour CLHP et 480 µl d'acide acétique glacial. Ajouter 10 g d'acide ascorbique et agiter jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 5,5, si nécessaire, à l'aide d'hydroxyde d'ammonium concentré. Transférer la solution dans une fiole jaugée de 1 l et compléter au volume avec de l'eau pour CLHP. Mélanger soigneusement.

5.2.3 Solvant pour élution SPE et étalons de folates, méthanol avec 10 % d'acide formique et 1 % d'acide ascorbique.

Transférer 1 g d'acide ascorbique et 10 ml d'acide formique concentré dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter environ 50 ml de méthanol. Passer aux ultrasons, dans un bain-marie (à température ambiante), jusqu'à dissolution complète (nécessite généralement 2 min environ). Porter à un volume de 100 ml avec du méthanol. Mélanger soigneusement.

Utiliser cette solution pour éluer les folates de la cartouche SPE après purification, ainsi que pour réaliser les étalons analytiques et également le blanc lors de l'analyse par CL-SM/SM. Préparer une nouvelle solution le jour de l'utilisation.

5.3 Préparation des solutions étalons de folates

5.3.1 Solutions étalons mères de folates, concentration massique $\rho = 500 \mu\text{g/ml}$.

Peser exactement, pour chacune des molécules suivantes, environ 25 mg d'acide folique, de 5-CH₃-THF, de 5-CHO-THF et de Pte-Glu3 dans des fioles jaugées inactives de 50 ml, spécifiques à chaque molécule. Ajouter environ 35 ml de la solution stock de solvant dans chaque fiole et passer aux ultrasons, dans un bain-marie, pendant environ 1 min jusqu'à dissolution complète des folates. Ajouter la quantité minimale de solution d'hydroxyde d'ammonium (28 % à 30 %) afin de faciliter la dissolution de l'acide folique. Cela peut représenter environ 30 gouttes à 48 gouttes (1,5 ml à 2,4 ml). Compléter à 50 ml avec la solution stock de solvant dans chacune des fioles et mélanger le contenu.

Transférer les solutions dans des flacons en verre capables de préserver leur intégrité à la faible température fixée. L'utilisation de flacons en plastique ne présente pas d'avantages concrets lors du stockage. Stocker à -20 °C ou moins (c'est-à-dire -70 °C pour une meilleure stabilité). Les solutions étalons mères de folates (acide folique, 5-CHO-THF et Pte-Glu3) stockées à -70 °C sont stables pendant six mois, et la solution de 5-CH₃-THF pendant trois mois. Les solutions stockées à -20 °C sont stables pendant 30 jours.

Calculer la concentration exacte de chaque solution mère des molécules de folates après ajustement de la teneur en humidité de la molécule et de la pureté (par CLHP) présente sur le certificat correspondant du fournisseur. L'acide folique peut avoir une teneur en humidité capable d'atteindre 7,9 %, tandis que celle du 5-formyl-THF peut atteindre 14,9 %. La pureté (par CLHP) des molécules de folates est habituellement comprise entre 98 % et 99 %. Les molécules 5-CH₃-THF et 5-CHO-THF utilisées sont souvent sous forme de sels de calcium.

Calculer la concentration des solutions étalons mères, ρ_{ss} , en microgrammes par millilitre, sous forme non saline, d'après les différences de leurs masses moléculaires respectives, à l'aide de la [Formule \(1\)](#):

$$\rho_{ss} = \frac{(m_s \times P) \times (10^6)}{V} \times \frac{M_{rsff}}{M_{rf}} \quad (1)$$

où

m_s est la masse de l'étalon, en grammes, par exemple $m_s = 0,025 \text{ g}$;

P est la pureté de l'analyte et la teneur en humidité, par exemple $P = 90 \%$ ou $P = 0,9 \text{ g/g}$;

V est le volume final, en millilitres, par exemple $V = 50 \text{ ml}$;

M_{rsff} est la masse moléculaire du folate sous forme non saline;

M_{rf} est la masse moléculaire du sel de folate utilisé.

Par exemple, avec les valeurs ci-dessus et une masse moléculaire du 5-CHO-THF, sous forme non saline, de 473,4 et une masse moléculaire de 5-CHO-THF, sous forme de sel de calcium, de 511,5, le calcul selon la [Formule \(1\)](#) pour ρ_{ss} (sous forme non saline) est:

$$\rho_{ss} = \frac{(0,025 \times 0,9) \times (10^6)}{50} \times \frac{473,4}{511,5} = 416,5$$

5.3.2 Solution étalon intermédiaire de folates, $\rho = 20 \mu\text{g/ml}$.

Ajouter environ 5 ml de solution de solvant intermédiaire dans une fiole jaugée inactinique de 10 ml. Ajouter exactement 0,4 ml de chacune des solutions étalons mères ([5.3.1](#)) de FA, de 5-CH₃-THF et de 5-CHO-THF dans cette même fiole. Compléter jusqu'à un volume de 10 ml avec la solution de solvant intermédiaire et mélanger le contenu.

Calculer la concentration de chaque vitamère de folates dans la solution étalon intermédiaire, ρ_{is} , en microgrammes par millilitre, à l'aide de la [Formule \(2\)](#):

$$\rho_{is} = \frac{(\rho_{ss} \times V_1)}{V_2} \quad (2)$$

où

V_1 est égal à 0,4 ml;

V_2 est égal à 10 ml.

La solution étalon intermédiaire de folates peut être stockée à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 jours et peut être stable pendant trois mois à $-70 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.4 Préparation des solutions mères d'étalons internes de folates

5.4.1 Solution mère d'étalon interne d'acide folique marqué au $^{13}\text{C}_5$, $\rho = 1 \text{ mg/ml}$.

La molécule est souvent fournie dans une quantité de 1 mg. Dissoudre la totalité (1 mg) d'acide folique marqué dans 1 ml de solution stock de solvant. L'acide folique est difficile à dissoudre. L'ajout de 10 μl de solution d'hydroxyde d'ammonium (28 % à 30 %) facilite la dissolution. Le cas échéant, une quantité supérieure peut être utilisée pour produire une solution mère d'une concentration finale d'environ 1 mg/ml. Le passage aux ultrasons et au vortex pendant 1 min à 2 min peut faciliter la dissolution complète.

5.4.2 Solution mère d'étalon interne de (6S)-5-méthyl-5,6,7,8-tétrahydrofolate marqué au $^{13}\text{C}_5$, $\rho = 1 \text{ mg/ml}$.

Le méthyl-THF marqué peut être fourni dans une quantité de 1 mg. Dissoudre la totalité (1 mg) de méthyl-THF marqué dans 1 ml de solution stock de solvant. Le cas échéant, une quantité supérieure peut être utilisée pour produire une solution mère d'une concentration finale d'environ 1 mg/ml. Dissoudre entièrement le produit chimique avec l'aide du vortex et d'un bref passage aux ultrasons (30 s).

5.4.3 Solution mère d'étalon interne de (6S)-5-formyl-5,6,7,8-tétrahydrofolate marqué au $^{13}\text{C}_5$, $\rho = 1 \text{ mg/ml}$.

Peser environ 10 mg de formyl-THF marqué dans une fiole jaugée de 10 ml. Ajouter environ 7 ml de solution stock de solvant. Dissoudre entièrement le produit chimique avec l'aide du vortex et d'un bref passage aux ultrasons (30 s). Compléter jusqu'au volume de 10 ml avec la solution stock de solvant et mélanger la solution.

Les solutions mères d'étalons internes de folates mentionnées en [5.4.1](#), [5.4.2](#) et [5.4.3](#) si elles sont stockées à $-70 \text{ }^\circ\text{C}$, l'acide folique et le 5-CHO-THF peuvent être stables pendant six mois et le 5-CH₃-THF pendant trois mois. Les solutions peuvent être stables moins longtemps si elles sont stockées à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Il convient de calculer la concentration de chaque solution mère d'étalons internes après ajustement de leur pureté respective (d'après le certificat du fabricant).

5.4.4 Solution intermédiaire d'étalons internes en mélange, $\rho = 20 \mu\text{g/ml}$ de chaque folate.

Transférer environ 5 ml de solution de solvant intermédiaire dans une fiole jaugée inactinique de 10 ml. Transférer exactement 0,2 ml de chaque solution mère d'étalons internes, c'est-à-dire $^{13}\text{C}_5\text{-FA}$ (5.4.1), $^{13}\text{C}_5\text{-CH}_3\text{-THF}$ (5.4.2) et $^{13}\text{C}_5\text{-CHO-THF}$ (5.4.3) dans cette même fiole jaugée de 10 ml. Compléter à 10 ml avec la solution de solvant intermédiaire. Mélanger soigneusement la solution.

Calculer les concentrations réelles de chaque étalon interne ρ_{iis} , en microgrammes par millilitre, à l'aide de la [Formule \(3\)](#):

$$\rho_{\text{iis}} = \frac{(\rho_{\text{ss}} \times V_1)}{V_2} \quad (3)$$

où

ρ_{iis} est la concentration de la solution intermédiaire d'étalons internes après ajustement de la pureté;

V_1 est égal à 0,2 ml;

V_2 est égal à 10 ml.

La solution intermédiaire d'étalons de folates peut être stockée à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 jours et peut être stable pendant trois mois à $-70 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.4.5 Solution d'étalons internes pour l'étalonnage 1, $\rho = 2 \mu\text{g/ml}$ de chaque étalon interne de folate.

Transférer 20 ml de solvant pour élution SPE (5.2.3) dans un tube à centrifuger de 50 ml. Ajouter 1 ml d'hydroxyde d'ammonium (28 % à 30 %) et mélanger (solvant neutralisé pour élution SPE). À préparer immédiatement avant utilisation.

À l'aide d'une pipette, transférer 100 μl de la solution intermédiaire d'étalons internes en mélange (ρ d'environ 20 $\mu\text{g/ml}$) (5.4.4) dans un tube de microcentrifugation. Ajouter exactement 900 μl du solvant neutralisé fraîchement préparé pour élution SPE.

Mélanger soigneusement en créant un bref vortex pendant environ 30 s. Préparer la solution immédiatement avant utilisation. Stocker à $4 \text{ }^\circ\text{C}$, si nécessaire mais pendant pas plus de 6 h. Calculer la concentration de chaque vitamère de folates, ρ_{is1} en microgrammes par millilitre, à l'aide de la [Formule \(4\)](#):

$$\rho_{\text{is1}} = \rho_{\text{is}} \frac{V_1}{V_2} \quad (4)$$

où

V_1 est égal à 0,1 ml;

V_2 est égal à 1 ml.

5.4.6 Solution d'étalons internes pour l'étalonnage 2, $\rho = 40,0 \text{ ng/ml}$ de chaque folate.

Transférer 12 ml de solvant pour élution SPE dans un flacon à scintillation ou dans un tube à centrifuger en plastique de 50 ml. Ajouter 600 μl d'hydroxyde d'ammonium (28 % à 30 %) (solvant neutralisé pour élution SPE). Mélanger. À préparer immédiatement avant utilisation.

Pour préparer une solution d'étalons internes pour l'étalonnage 2, à l'aide d'une pipette, transférer environ 5 ml de solvant neutralisé pour élution SPE dans une fiole jaugée inactinique de 10 ml. À l'aide d'une pipette, transférer 20,0 μl (ρ d'environ 20 $\mu\text{g/ml}$ de chaque folate) de la solution intermédiaire d'étalons internes, dans cette même fiole jaugée de 10 ml. Compléter jusqu'au volume de 10 ml avec le solvant neutralisé pour