

---

---

**Formules infantiles et produits  
nutritionnels pour adultes —  
Détermination de la teneur en  
vitamine E et de la teneur en vitamine  
A par chromatographie liquide à haute  
performance en phase normale**

*Infant formula and adult nutritionals — Determination of  
vitamin E and vitamin A by normal phase high performance liquid  
chromatography*

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)



# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)



## DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2015, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401  
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland  
Tel. +41 22 749 01 11  
Fax +41 22 749 09 47  
[copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
[www.iso.org](http://www.iso.org)

# Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Réactifs et matériaux</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>6</b>
<b>6</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>7</b>
6.1    Préparation de l'échantillon.....	7
6.1.1    Généralités.....	7
6.1.2    Échantillons de poudre mélangés à sec.....	7
6.1.3    Échantillons de poudre issus d'un mélange par voie humide.....	7
6.1.4    Échantillons liquides.....	7
6.1.5    Extraction des échantillons.....	8
6.2    Analyse par CLHP.....	8
6.2.1    Généralités.....	8
6.2.2    Paramètres du détecteur.....	8
6.2.3    Cycle d'élution à gradient de la pompe.....	8
<b>7</b> <b>Adéquation du système</b> .....	<b>9</b>
<b>8</b> <b>Calculs</b> .....	<b>9</b>
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Exemples de chromatogrammes</b> .....	<b>11</b>
<b>Annexe B</b> (informative) <b>Données de fidélité</b> .....	<b>17</b>
<b>Annexe C</b> (informative) <b>Comparaison entre l'AOAC 2012.10, l'EN 12822 et l'EN 12823-1</b> .....	<b>21</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>25</b>

## 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 appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](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 signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](#).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, en collaboration avec l'AOAC INTERNATIONAL. Le document est publié par l'ISO et séparément par l'AOAC INTERNATIONAL. La méthode décrite dans la présente Norme internationale est équivalente à la Méthode officielle de l'AOAC 2012-10: *Formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en vitamine E et de la teneur en vitamine A par chromatographie liquide à haute performance en phase normale*.

# Formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en vitamine E et de la teneur en vitamine A par chromatographie liquide à haute performance en phase normale

**AVERTISSEMENT** — L'utilisation de la présente Norme internationale peut impliquer des matériaux, des opérations et des équipements dangereux. La présente Norme internationale n'a pas pour but d'aborder tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Avant d'utiliser la présente Norme internationale, il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées de sécurité et de protection de la santé et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de dosage simultané de la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol et acétate d' $\alpha$ -tocophéryle) et de la vitamine A (isomères 13-*cis* et tout-*trans* du palmitate de rétinyle et de l'acétate de rétinyle) présentes dans toutes les formes de formules infantiles et pour adultes (poudres, liquides prêts à servir et liquides concentrés).

Le rétinol n'est pas utilisé à des fins d'enrichissement et n'est donc pas abordé dans cette méthode. Sa quantité présente naturellement dans les produits n'est pas significative.

Les stéréoisomères de la vitamine E,  $\alpha$ -tocophérol et acétate d' $\alpha$ -tocophéryle, ne sont pas différenciés dans la présente méthode.

## 2 Termes et définitions

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

### 2.1

#### **produit nutritionnel pour adultes**

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

### 2.2

#### **formule infantile**

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

[SOURCE: Norme Codex 72-1981]

## 3 Principe

Ce mode opératoire utilise l'enzyme protéolytique papaïne pour hydrolyser le revêtement protéique hydrophile des micelles de matière grasse dans le lait ou les formules infantiles à base de soja en solution aqueuse. Le contenu hydrophobe des micelles est ensuite extrait quantitativement dans l'iso-octane, en une seule extraction. L'extrait est analysé par CLHP en phase normale en utilisant une colonne analytique avec élution en gradient. La quantification de l' $\alpha$ -tocophérol et l'acétate d' $\alpha$ -tocophéryle est effectuée en utilisant la détection en fluorescence, avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission

de 280 nm et de 310 nm. Le palmitate de rétinyle (*cis* et *trans*) et l'acétate de rétinyle (*cis* et *trans*) sont quantifiés par détection dans l'UV à 325 nm.

## 4 Réactifs et matériaux

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

**4.1 Éther de méthyl-*t*-butyle**, également désigné par *tert*-butylméthyléther, qualité CLHP.

**4.2 *n*-Hexane**, qualité CLHP.

**4.3 Éthanol**, qualité CLHP.

**4.4 Méthanol**, qualité CLHP.

**4.5 Iso-octane (2,2,4-triméthylpentane)**, qualité CLHP.

**4.6 Papaïne (de *Carica papaya*)**,  $\geq 3$  U/mg, Sigma 76220<sup>1)</sup> ou l'équivalent.

**4.7 Hydroquinone**, Sigma H9003<sup>1)</sup> ou l'équivalent.

**4.8 Acide acétique glacial**, qualité réactif analytique.

**4.9 Acétate de sodium anhydre.**

**4.10 Solution diluée d'acide chlorhydrique.**

Diluer 100 ml de solution d'acide chlorhydrique de fraction massique 36 % à 200 ml avec de l'eau.

**4.11 Solution de papaïne**, concentration massique  $\rho = 20$  g/l.

Dissoudre 100 mg d'hydroquinone et 4 g d'acétate de sodium anhydre dans environ 80 ml d'eau dans une fiole jaugée de 100 ml à un trait (5.11). Ajuster le pH à 5,0 avec une solution diluée d'acide chlorhydrique (4.10). Ajouter 2 g de papaïne et compléter au volume. Préparer une solution fraîche avant utilisation.

**4.12 Solution de méthanol acidifiée.**

Ajouter 20 ml d'acide acétique glacial à 1 l de méthanol et mélanger. Préparer une solution fraîche le jour de l'utilisation.

**4.13 Phase mobile de CLHP A.**

*n*-Hexane, filtré et dégazé pendant 15 min dans un bain à ultrasons.

**4.14 Phase mobile de CLHP B.**

Mélanger 750 ml de *n*-hexane avec 250 ml d'éther méthyl-*t*-butylique. Ajouter 3 ml de méthanol, filtrer et dégazer pendant 15 min dans un bain à ultrasons.

---

1) Ceci est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

#### 4.15 Substances étalons

**4.15.1 Étalon de référence de palmitate de rétinyle**, étalon de référence primaire. L'étalon doit contenir un antioxydant. CAS 78-81-2.

**4.15.2 Étalon de référence d'acétate de rétinyle**, étalon de référence primaire. CAS 127-47-9.

**4.15.3 Étalon de référence d'acétate d' $\alpha$ -tocophéryle**, étalon de référence primaire. CAS 7695-91-2.

**4.15.4 Étalon de référence d' $\alpha$ -tocophérol**, étalon de référence primaire. CAS 10191-41-0.

#### 4.16 Solutions étalons

##### 4.16.1 Solution étalon mère de palmitate de rétinyle.

Peser, à 0,01 mg près, environ 70 mg de palmitate de rétinyle (4.15.1) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.11). Dissoudre et diluer au volume avec de l'iso-octane (4.5).

##### 4.16.2 Solution étalon mère d'acétate de rétinyle.

Peser, à 0,01 mg près, environ 35 mg d'acétate de rétinyle (4.15.2) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.11). Dissoudre et diluer au volume avec de l'éthanol (4.3).

##### 4.16.3 Solution étalon mère d'acétate d' $\alpha$ -tocophéryle.

Peser, à 0,01 mg près, environ 180 mg d'acétate d' $\alpha$ -tocophéryle (4.15.3) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.11). Dissoudre et diluer au volume avec de l'iso-octane.

##### 4.16.4 Solution étalon mère d' $\alpha$ -tocophérol.

Peser, à 0,01 mg près, environ 100 mg d' $\alpha$ -tocophérol (4.15.4) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.11). Dissoudre et diluer au volume avec de l'iso-octane.

NOTE Les solutions étalons mères ci-dessus sont stables au réfrigérateur à une température comprise entre 4 °C et 8 °C pendant 7 jours.

##### 4.16.5 Solution étalon de travail combinée 1.

Transférer à l'aide d'une pipette 4 ml de solution étalon mère de palmitate de rétinyle (4.16.1), 4 ml de solution étalon mère d'acétate de rétinyle (4.16.2), 7 ml de solution étalon mère d'acétate d' $\alpha$  tocophéryle (4.16.3) et 20 ml de solution étalon mère d' $\alpha$ -tocophérol (4.16.4), dans une fiole jaugée de 50 ml (5.11) et diluer au volume avec de l'iso-octane. Préparer une solution fraîche avant utilisation.

##### 4.16.6 Solution étalon de travail combinée 2.

Transférer à l'aide d'une pipette 8 ml de solution étalon de travail combinée 1 (4.16.5) dans une fiole jaugée de 100 ml (5.11) et diluer au volume avec de l'iso-octane. Préparer une solution fraîche avant utilisation.

##### 4.16.7 Solutions d'étalonnage

Dans des fioles jaugées de 50 ml séparées (5.11), transférer à l'aide d'une pipette 0,5 ml, 2 ml, 4 ml, 8 ml, 16 ml et 32 ml de solution étalon de travail combinée 2 (4.16.6) et diluer au volume avec de l'iso-octane.

Ces solutions sont utilisées pour construire une courbe d'étalonnage multipoints. Préparer ces solutions quotidiennement avant utilisation.

NOTE Pour les essais de routine, et selon la plage de concentration des analytes dans les échantillons pour essai, une courbe d'étalonnage à 3 ou 4 points peut être utilisée, à condition que les plages soient situées entre les points le plus bas et le plus élevé de la courbe à 6 points indiquée ci-dessus.

#### 4.17 Détermination de la pureté de chaque solution étalon mère

##### 4.17.1 Pureté spectrométrique de la solution mère de palmitate de rétinyle

Prélever, à l'aide d'une pipette, 1 ml de la solution étalon mère de palmitate de rétinyle (4.16.1), l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml (5.11) et compléter au volume avec de l'éthanol. Déterminer l'absorption à 325 nm, après avoir établi le zéro sur une cellule en quartz de 1 cm contenant de l'éthanol. Répéter la mesure deux autres fois, en rinçant la cuve d'échantillon avec la solution avant chaque mesure. Calculer la mesure d'absorbance moyenne. Calculer la pureté spectrométrique à une décimale,  $SP_{RP}$ , du palmitate de rétinyle en utilisant la Formule (1):

$$SP_{RP} = \frac{A}{975} \times \frac{50}{m_{st}} \times \frac{100}{1} \times 10 \quad (1)$$

où

$A$  est la mesure d'absorbance moyenne;

975 est le coefficient d'extinction du palmitate de rétinyle à 325 nm (voir Référence [1]);

$m_{st}$  est la masse de l'étalon de référence en mg.

##### 4.17.2 Pureté spectrométrique de la solution mère d'acétate de rétinyle

Prélever, à l'aide d'une pipette, 1 ml de la solution étalon mère d'acétate de rétinyle (4.16.2), l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml (5.11) et compléter au volume avec de l'éthanol. Déterminer l'absorption à 325 nm, après avoir établi le zéro sur une cellule en quartz de 1 cm contenant de l'éthanol. Répéter la mesure deux autres fois, en rinçant la cuve d'échantillon avec la solution avant chaque mesure. Calculer la mesure d'absorbance moyenne. Calculer la pureté spectrométrique à une décimale,  $SP_{RA}$ , de l'acétate de rétinyle en utilisant la Formule (2):

$$SP_{RA} = \frac{A}{1560} \times \frac{50}{m_{st}} \times \frac{100}{1} \times 10 \quad (2)$$

où

$A$  est la mesure d'absorbance moyenne;

1 560 est le coefficient d'extinction de l'acétate de rétinyle à 325 nm (voir Référence [1]);

$m_{st}$  est la masse de l'étalon de référence en mg.

##### 4.17.3 Pureté spectrométrique de la solution mère d'acétate d' $\alpha$ -tocophéryle

Prélever, à l'aide d'une pipette, 3 ml de la solution étalon mère d'acétate d' $\alpha$ -tocophéryle (4.16.3), l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml (5.11) et compléter au volume avec de l'éthanol. Déterminer l'absorption à 284 nm, après avoir établi le zéro sur une cellule en quartz de 1 cm contenant de l'éthanol. Répéter la mesure deux autres fois, en rinçant la cuve d'échantillon avec la solution avant chaque

mesure. Calculer la mesure d'absorbance moyenne. Calculer la pureté spectrométrique à une décimale,  $SP_{TA}$ , de l'acétate d' $\alpha$ -tocophéryle en utilisant la Formule (3):

$$SP_{TA} = \frac{A}{43,6} \times \frac{50}{m_{st}} \times \frac{100}{3} \times 10 \quad (3)$$

où

- $A$  est la mesure d'absorbance moyenne;
- 43,6 est le coefficient d'extinction de l'acétate d' $\alpha$ -tocophéryle à 284 nm (voir Référence [1]);
- $m_{st}$  est la masse de l'étalon de référence en mg.

#### 4.17.4 Pureté spectrométrique de la solution mère d' $\alpha$ -tocophérol

Prélever, à l'aide d'une pipette, 3 ml de solution étalon mère d' $\alpha$ -tocophérol (4.16.4), les introduire dans une fiole jaugée de 100 ml (5.11) et compléter au volume avec de l'éthanol. Déterminer l'absorption à 292 nm, après avoir établi le zéro sur une cellule en quartz de 1 cm contenant de l'éthanol. Répéter la mesure deux autres fois, en rinçant la cuve d'échantillon avec la solution avant chaque mesure. Calculer la mesure d'absorbance moyenne. Calculer la pureté spectrométrique à une décimale,  $SP_T$ , de l' $\alpha$ -tocophérol en utilisant la Formule (4):

$$SP_T = \frac{A}{75,8} \times \frac{50}{m_{st}} \times \frac{100}{3} \times 10 \quad (4)$$

où

- $A$  est la mesure d'absorbance moyenne;
- 75,8 est le coefficient d'extinction de l' $\alpha$ -tocophérol à 292 nm (voir Référence [1]);
- $m_{st}$  est la masse de l'étalon de référence en mg.

#### 4.17.5 Pureté chromatographique des solutions étalons mères

Préparer chaque solution étalon mère séparément de la manière suivante.

Dans quatre fioles jaugées de 100 ml séparées (5.11), transférer à l'aide d'une pipette 1 ml de chacune des solutions étalons mères, palmitate de rétinyle (4.16.1), acétate de rétinyle (4.16.2), acétate d' $\alpha$ -tocophéryle (4.16.3) et  $\alpha$ -tocophérol (4.16.4). Étiqueter chaque fiole avec les noms des analytes individuels. Mélanger et diluer chaque analyte au volume avec de l'iso-octane.

Dans quatre flacons pour échantillonneur automatique de 2 ml étiquetés séparés, transférer à l'aide d'un dispositif de pipetage automatique, 60  $\mu$ l de solution de palmitate de rétinyle, 30  $\mu$ l de solution d'acétate de rétinyle, 100  $\mu$ l de solution d'acétate d' $\alpha$ -tocophéryle et 400  $\mu$ l d' $\alpha$ -tocophérol. Remplir le flacon d'iso-octane jusqu'à environ 2 ml.

Mélanger brièvement au vortex et injecter dans le système de chromatographie liquide selon les paramètres de la méthode décrits en 6.2. Analyser le palmitate de rétinyle et l'acétate de rétinyle dans l'UV à 325 nm. Pour l'acétate d' $\alpha$ -tocophérol, analyser dans l'UV à 284 nm et pour l' $\alpha$ -tocophéryle, analyser à 292 nm.