

---

---

**Formules infantiles et produits  
nutritionnels pour adultes —  
Détermination de la teneur en  
vitamine B<sub>12</sub> par chromatographie  
liquide haute performance en phase  
inverse (CLHP-PI)**

*Infant formula and adult nutritionals — Determination of vitamin B<sub>12</sub>  
by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)*

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

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Avant-propos</b> .....   | <b>iv</b> |
| <b>1 Domaine d'application</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2 Termes et définitions</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>3 Principe</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>4 Réactifs et matériaux</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>5 Appareillage</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>6 Mode opératoire</b> .....  | <b>5</b>  |
| 6.1 Généralités.....  | 5         |
| 6.2 Préparation de l'échantillon.....   | 5         |
| 6.2.1 Généralités.....  | 5         |
| 6.2.2 Extraction.....   | 6         |
| 6.2.3 Concentration de l'échantillon.....   | 6         |
| 6.3 Analyse par CLHP.....   | 7         |
| 6.3.1 Réglage et configuration du système.....  | 7         |
| 6.3.2 Conditions de fonctionnement de l'instrument.....   | 8         |
| <b>7 Calculs</b> .....  | <b>9</b>  |
| 7.1 Généralités.....  | 9         |
| 7.2 Calcul des concentrations de la solution étalon.....  | 9         |
| 7.3 Préparation des courbes d'étalonnage.....   | 10        |
| 7.4 Calcul des concentrations de vitamine B <sub>12</sub> dans les solutions d'échantillon..... | 10        |
| <b>Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes</b> .....                                 | <b>11</b> |
| <b>Annexe B (informative) Données de fidélité</b> .....   | <b>12</b> |
| <b>Annexe C (informative) Exemple de procédure de qualification de cartouche SPE</b> .....      | <b>15</b> |
| <b>Bibliographie</b> .....  | <b>16</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 2011.10: *Vitamine B<sub>12</sub> dans les formules infantiles et pédiatriques et les produits nutritionnels pour adultes*.

# Formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes — Détermination de la teneur en vitamine B<sub>12</sub> par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (CLHP-PI)

**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 de la vitamine B<sub>12</sub> présente dans les formules infantiles et produits nutritionnels pour adultes (poudres, liquides prêts à servir et liquides concentrés) par chromatographie liquide haute performance en phase inverse.

## 2 Termes et définitions

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

### 2.1

#### **vitamine B<sub>12</sub>**

cyanocobalamine et autres corrinoïdes contenant du cobalt possédant l'activité biologique de la vitamine B<sub>12</sub>, comme l'aquocobalamine, l'hydroxycobalamine, la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine, convertis en cyanocobalamine

### 2.2

#### **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

### 2.3

#### **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

Extraction de la cyanocobalamine et autres corrinoïdes contenant du cobalt de l'échantillon au moyen d'un tampon d'acétate de sodium (pH = 4,5) et conversion des derniers en cyanocobalamine au moyen de cyanure de potassium à 105 °C. Purification et concentration des extraits avec des cartouches d'extraction en phase solide (SPE) C8 ou C18 et analyse par chromatographie en exclusion de taille et en phase inverse. Dosage de la vitamine B<sub>12</sub> par chromatographie liquide avec détection dans le visible à 550 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 **Acide acétique glacial.**

4.2 **Acétonitrile**, qualité CLHP.

4.3 **Driérite**, dessiccatif, sulfate de calcium anhydre, 8 mesh.

4.4 **Éthanol**, dénaturé.

4.5 **Acide formique**, 88 %.

4.6 **Cyanure de potassium**, 97 %.

4.7 **Riboflavine**, pureté de 98 % à 102 %.

4.8 **Acétate de sodium anhydre ou acétate de sodium trihydraté**, ACS.

4.9 **Taka-Diastase**, Accurate Chemical Co.<sup>1)</sup> ou l'équivalent.

4.10 **Triéthylamine**, qualité CLHP.

4.11 **Étalon de référence primaire de vitamine B<sub>12</sub> (cyanocobalamine)**, par exemple USP Référence 1152009 (environ 10 µg/mg), lot officiel<sup>1)</sup>. Conserver dans un dessiccateur à l'abri de la lumière blanche.

### 4.12 Préparation des solutions et des solutions étalons

#### 4.12.1 Généralités

Le volume de toutes les solutions peut être augmenté ou diminué selon les besoins, à condition de respecter les bonnes pratiques de laboratoire. Les solutions peuvent être conservées au réfrigérateur ou à température ambiante dans des récipients inertes étanches, sauf indication contraire.

#### 4.12.2 Préparation des solutions

**4.12.2.1 Phase mobile de CLHP A.** Diluer 4,0 ml de triéthylamine avec 1 000 ml d'eau. Ajuster le pH à une valeur comprise entre 5 et 7 avec environ 1,25 ml d'acide formique concentré (4.5). Délai d'expiration: 1 semaine.

**4.12.2.2 Phase mobile de CLHP B.** Mélanger 4,0 ml de triéthylamine et 250 ml d'acétonitrile avec 750 ml d'eau. Ajuster le pH à une valeur comprise entre 5 et 7 avec environ 1,25 ml d'acide formique concentré. Délai d'expiration: 1 semaine dans un récipient hermétiquement bouché.

**4.12.2.3 Phase mobile de CLHP C.** Mélanger 4,0 ml de triéthylamine et 750 ml d'acétonitrile avec 250 ml d'eau. Ajuster le pH à une valeur comprise entre 5 et 7 avec environ 1,25 ml d'acide formique concentré. Délai d'expiration: 1 semaine dans un récipient hermétiquement bouché.

---

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.

**4.12.2.4 Phase mobile de CLHP D.** Diluer 50 ml d'acétonitrile à 2 000 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 1 semaine dans un récipient hermétiquement bouché.

**4.12.2.5 Mélange d'acétonitrile et d'eau,** fraction volumique 10 %. Diluer 150 ml d'acétonitrile à 1 500 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 1 mois dans un récipient hermétiquement bouché.

**4.12.2.6 Mélange d'acétonitrile et d'eau,** solvant d'élution pour SPE, fraction volumique 30 %. Diluer 30 ml d'acétonitrile à 100 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 1 mois dans un récipient hermétiquement bouché.

**4.12.2.7 Mélange d'acétonitrile et d'eau,** solution de nettoyage et de conservation de colonne, fraction volumique 50 %. Diluer 500 ml d'acétonitrile à 1 000 ml avec de l'eau dans une fiole jaugée. Délai d'expiration: 6 mois.

**4.12.2.8 Mélange d'éthanol et d'eau,** fraction volumique 25 %. Diluer 50 ml d'éthanol à 200 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 1 an dans un récipient hermétiquement bouché.

**4.12.2.9 Solution de cyanure de potassium,** concentration massique  $\rho = 4$  g/l. Dissoudre 0,02 g de cyanure de potassium dans le tampon d'acétate de sodium (4.12.2.11) et compléter à 5 ml (concentration de la substance  $c = 0,25$  mol/l). Préparer une solution fraîche immédiatement avant utilisation.

**4.12.2.10 Solution de cyanure de potassium,**  $\rho = 10$  g/l. Dissoudre 0,25 g de cyanure de potassium dans de l'eau et compléter à 25 ml. Préparer une solution fraîche immédiatement avant utilisation.

**4.12.2.11 Tampon d'acétate de sodium,**  $c = 0,25$  mol/l. Dissoudre 41,0 g d'acétate de sodium anhydre ou 68,0 g d'acétate de sodium trihydraté dans environ 1 800 ml d'eau. Ajuster le pH à 4,5 avec de l'acide acétique concentré (environ 40 ml). Diluer à 2 000 ml avec de l'eau. Délai d'expiration: 3 mois.

**4.12.2.12 Solution pour essai de résolution.** Peser environ 0,005 g de riboflavine sur un papier à pesée. Transférer dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter au volume avec une solution d'acétonitrile à 10 %. Agiter pour dissoudre. Mélanger à volumes égaux avec la solution étalon de travail de vitamine B<sub>12</sub> présentant la concentration la plus élevée. Délai d'expiration: 1 semaine.

**4.12.2.13 Solution Taka-Diastase,**  $\rho = 60$  g/l. Dissoudre 0,6 g de Taka-Diastase dans 10 ml d'eau. Préparer une solution fraîche quotidiennement avant utilisation.

### 4.12.3 Préparation des solutions étalons

**4.12.3.1 Généralités.** Préparer toutes les solutions étalons sous un éclairage doté d'un écran anti-UV et les conserver à une température comprise entre 2 °C et 8 °C dans des fioles jaugées hermétiquement bouchées.

**4.12.3.2 Solution étalon mère de vitamine B<sub>12</sub>,**  $\rho = 10\ 000$  µg/l. Peser avec précision la quantité appropriée d'étalon de vitamine B<sub>12</sub> (4.11) pour obtenir une concentration de la solution étalon mère de 10 000 µg/l. Dissoudre dans de l'éthanol à 25 % et compléter à 100 ml (4.12.2.8). Délai d'expiration: 6 mois.

Calculer la quantité d'étalon de vitamine B<sub>12</sub> devant être pesée,  $m_w$ , en milligrammes, en utilisant la Formule (1):

$$m_w = 10\ 000 \times 0,1 \times \frac{1}{P} \quad (1)$$

où

10 000 est la concentration de la solution étalon mère souhaitée, en µg/l;