

NORME INTERNATIONALE

ISO
9233

Première édition
1991-09-01

**Fromage et croûtes de fromage —
Détermination de la teneur en natamycine —
Méthode par spectrométrie d'absorption
moléculaire et par chromatographie liquide à
haute performance**

ISO 9233:1991
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7107e3d-c10-4082-8dda-bb1637959e/iso-9233-1991
*Cheese and cheese rind — Determination of natamycin content —
Method by molecular absorption spectrometry and by high-performance
liquid chromatography*

NUMÉRIQUE

ISO



Numéro de référence
ISO 9233:1991(F)

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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 9233 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, en collaboration avec la Fédération internationale de laiterie (FIL) et l'Association des chimistes analytiques officiels (AOAC) et sera également publiée par ces organismes.

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1991

Droits de reproduction réservés. 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 et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Fromage et croûtes de fromage — Détermination de la teneur en natamycine — Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire et par chromatographie liquide à haute performance

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode de détermination de la teneur en natamycine de la croûte de fromage et du fromage situé à proximité de la croûte.

La limite de détection est de 0,5 mg/kg.

Cette méthode est adaptée à la vérification d'une tolérance maximale en natamycine dans la croûte de fromage, à une teneur de 1 mg/dm² ¹⁾.

Cette méthode convient également à la détection de la migration de la natamycine vers l'intérieur du fromage.

2 Référence normative

La norme suivante contient des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, l'édition indiquée était en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente de la norme indiquée ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 707:1985, *Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage*.

3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent.

3.1 teneur en natamycine des fromages ou de la croûte des fromages: Teneur en natamycine déterminée par la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. La teneur en natamycine du fromage est exprimée en milligrammes par kilogramme. La teneur en natamycine de la croûte de fromage est exprimée en milligrammes par décimètre carré.

3.2 croûte de fromage: Couche externe du fromage d'une épaisseur de 5 mm comprenant, le cas échéant, la pellicule de protection.

4 Principe

Extraction d'une quantité connue d'échantillon à l'aide de méthanol. Dilution de l'extrait dans de l'eau, suivie d'un refroidissement entre -15 °C et -20 °C, pour précipiter la majeure partie des graisses, puis filtration.

Détermination de la teneur en natamycine du filtrat (après concentration, si nécessaire) par spectrométrie ou chromatographie liquide à haute performance.

5 Réactifs et substances de référence

Tous les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déionisée.

5.1 Méthanol.

5.2 Méthanol, solution préparée en mélangeant 2 volumes de méthanol avec 1 volume d'eau.

1) Cette teneur correspond à un projet CEE de teneur limite en natamycine de la croûte de fromage.

5.3 Natamycine, solution étalon correspondant à 5 mg de natamycine par litre.

Immédiatement avant emploi, dissoudre dans une fiole jaugée de 100 ml, une quantité d'une préparation à teneur connue en natamycine, correspondant à 50 mg de natamycine pure dans du méthanol (5.1) et compléter au trait repère.

Dans une fiole jaugée de 50 ml, diluer 5,0 ml de cette solution à 50 ml avec la solution de méthanol (5.2).

Dans une autre fiole jaugée de 50 ml, diluer 5,0 ml de cette solution diluée à 50 ml avec la solution de méthanol (5.2).

1 ml de cette solution étalon contient 5 µg de natamycine.

Il est nécessaire que la concentration de cette solution étalon finale soit proche de celle de la solution d'essai mesurée en 9.3.1.2. Ajuster la dilution finale, si nécessaire.

5.4 Acide acétique, cristallisable.

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment

6.1 Appareil à trancher, ou appareil similaire pour découper des portions de croûte de fromage de 5 mm d'épaisseur et d'environ 3 cm de large (voir figure 1, à titre d'exemple).

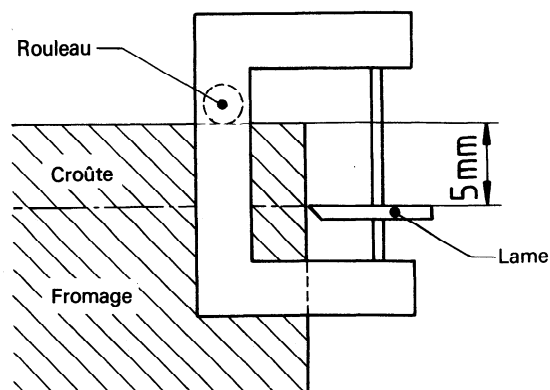


Figure 1 — Exemple d'appareil à trancher, permettant de découper des portions de croûte d'une épaisseur de 5 mm

6.2 Appareil à trancher fin, pour découper de fines tranches de fromage, d'une épaisseur maximale de 1 mm (voir figure 2, à titre d'exemple).

6.3 Broyeur ou mélangeur.

6.4 Couteau aiguisé, pour découper des tranches de fromage en petits morceaux.

6.5 Agitateur magnétique ou appareil à secouer.

6.6 Fioles coniques, de 100 ml et 200 ml de capacité, en verre teinté, et munies de bouchons en verre rodé.

6.7 Seringues, jetables, de 10 ml de capacité.

6.8 Microfiltres moléculaires, de 0,20 µm et 0,45 µm, de grosseur des pores résistant à l'attaque par des solutions alcooliques.

6.9 Papiers filtres plissés²⁾, à filtration rapide, de 15 cm de diamètre.

6.10 Entonnoir, d'environ 7 cm de diamètre.

6.11 Congélateur, fonctionnant dans une gamme de températures comprise entre - 15 °C et - 20 °C.

6.12 Cartouches d'extraction de type C₁₈³⁾, pour concentrer l'extrait filtré, si nécessaire.

6.13 Spectromètre, permettant d'opérer dans l'ultraviolet entre 300 nm et 340 nm, équipé de cuves de 1 cm d'épaisseur et d'un enregistreur.

6.14 Chromatographe liquide à haute performance, muni d'un détecteur UV pouvant mesurer à 303 nm et équipé d'un enregistreur et/ou d'un intégrateur.

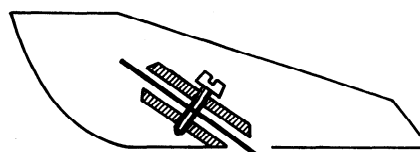


Figure 2 — Exemple d'appareil à trancher fin, permettant de découper des tranches de fromage d'une épaisseur de 1 mm

2) S et S, N° 595 1/2 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

3) Sep-pak C₁₈, Waters N° 51910, sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

6.15 Colonne analytique, de 150 mm de longueur et de 4,6 mm de diamètre interne, de type C₈⁴⁾, de 5 µm de dimension de particules.

6.16 Colonne de garde, de 100 mm de longueur et de 2,1 mm de diamètre interne, de type C₈⁵⁾, de 30 µm à 40 µm de dimension de particules.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage doit avoir été effectué conformément à l'ISO 707.

Un fromage entier, ou une portion représentative de l'ensemble, doit être présenté au laboratoire.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

8.1 Croûte

Si nécessaire, couper l'échantillon pour laboratoire en petites sections ou portions afin que la largeur de la croûte ne soit pas supérieure à 3 cm. Retirer la totalité de la croûte sur une épaisseur de 5 mm de toutes les sections ou portions ainsi obtenues, en utilisant la machine à trancher (6.1).

À partir de la croûte obtenue, découper un morceau rectangulaire (entre 20 cm² et 40 cm²). Déterminer sa surface en centimètres carrés et sa masse, en grammes.

Broyer soigneusement toute la croûte, y compris le morceau pesé et mesuré et bien mélanger. Transférer immédiatement dans un récipient une quantité de l'échantillon ainsi préparé.

Après préparation de chaque échantillon, nettoyer tous les instruments ayant été en contact avec le fromage ou la croûte, tout d'abord à l'eau chaude puis au méthanol, et les sécher soigneusement, dans un flux d'air comprimé, par exemple.

8.2 Intérieur du fromage

Après avoir retiré la croûte comme indiqué en 8.1, prélever une tranche d'une épaisseur maximale de 1 mm sur toute la section externe du fromage en utilisant la machine à trancher fin (6.2).

Découper toutes les tranches de fromage en petits morceaux d'environ 0,5 cm² et mélanger soigneusement. Transférer immédiatement dans un récipient une quantité de l'échantillon ainsi préparé.

4) Lichrosorb RP8 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

5) Perisorb RP8 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

Après préparation de chaque échantillon, nettoyer tous les instruments ayant été en contact avec le fromage, tout d'abord à l'eau chaude puis au méthanol et les sécher soigneusement, dans un flux d'air comprimé, par exemple.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai

Pour la croûte de fromage, peser à 10 mg près, environ 10 g de l'échantillon pour essai (8.1) et les transférer dans une fiole conique de 200 ml (6.6).

Pour le fromage, peser, à 10 mg près, environ 5 g de l'échantillon pour essai (8.2) et les transférer dans une fiole conique de 100 ml (6.6).

9.2 Préparation de la solution d'essai

Pour la croûte de fromage, ajouter 100 ml de méthanol (5.1) et pour le fromage, ajouter 50 ml de méthanol (5.1), à l'aide d'une éprouvette.

Mélanger le contenu de la fiole conique pendant 90 min à l'aide de l'agitateur magnétique (6.5) ou secouer pendant 90 min dans l'appareil à secouer (6.5).

Pour la croûte, ajouter 50 ml d'eau et pour le fromage, ajouter 25 ml d'eau, à l'aide d'une éprouvette.

Placer immédiatement la fiole conique au congélateur (6.11) et la laisser reposer pendant environ 60 min.

Filter l'extrait froid à travers un papier-filtre plissé (6.9), en éliminant les 5 premiers millilitres de filtrat.

NOTE 1 Il est nécessaire d'effectuer la filtration lorsque la suspension est encore froide pour éviter la dissolution des matières grasses et éviter ainsi d'avoir des filtrats troubles.

Amener le filtrat à température ambiante.

Prélever une partie du filtrat dans une seringue (6.7) et filtrer sur un microfiltre de 0,45 µm de dimension des pores, puis sur un microfiltre de 0,20 µm de grosseur de pore (6.8).

La quantité minimale de filtrat requise est 3 ml pour une mesure spectrométrique directe (9.3.1), 20 µl par injection pour une mesure directe (9.3.2) et

25 ml et 50 ml, respectivement, pour des concentrations de 5 fois et de 10 fois (9.3.3).

Procéder ensuite, conformément à 9.3.1, 9.3.2 ou 9.3.3, suivant le cas.

9.3 Détermination

9.3.1 Mesure spectrométrique

9.3.1.1 Solution étalon de natamycine

Enregistrer le spectre de la solution étalon de natamycine (5.3) de 300 nm à 340 nm. Mesurer l'absorbance au maximum à environ 317 nm, au minimum à environ 311 nm et à 329 nm exactement. Utiliser la solution de méthanol (5.2) comme blanc.

Un exemple de spectre d'une solution étalon est donné en figure 3.

La natamycine étant instable dans la solution de méthanol, effectuer la mesure aussi rapidement que possible.

Les emplacements exacts du maximum à 317 nm et du minimum à 311 nm peuvent être légèrement modifiés en raison des variations intervenant lors de l'étalonnage de l'appareil. Utiliser toujours les valeurs minimale et maximale réelles.

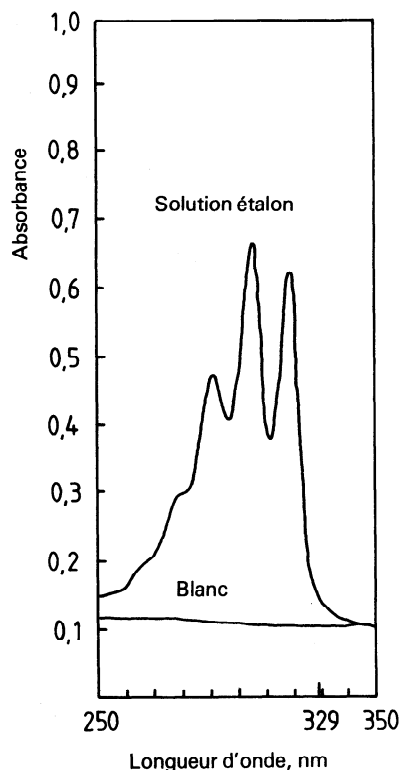
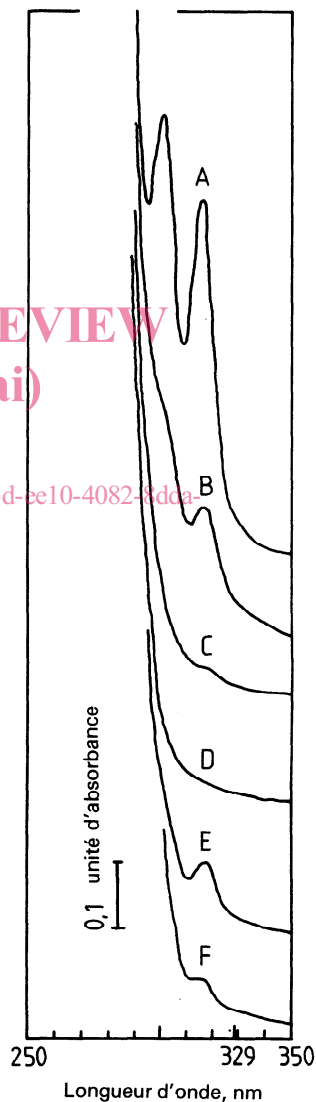


Figure 3 — Exemple d'un spectre d'une solution étalon de natamycine et d'un blanc

9.3.1.2 Solution d'essai

Enregistrer le spectre de la solution d'essai (9.2) de 300 nm à 340 nm. Mesurer l'absorbance au maximum à environ 317 nm, au minimum à environ 311 nm et à 329 nm exactement. Utiliser la solution de méthanol (5.2) comme blanc.

Si la teneur en natamycine de l'échantillon est faible au point de rendre la détection impossible ou pratiquement impossible (rapport signal sur bruit inférieur à 3), mais s'il est néanmoins nécessaire d'effectuer la détermination, opérer conformément à 9.3.3.



- A Croûte de fromage, à 61 mg/kg de teneur en natamycine
- B Croûte de fromage, à 15 mg/kg de teneur en natamycine
- C Fromage, à 1,7 mg/kg de teneur en natamycine
- D Fromage, à 0,3 mg/kg de teneur en natamycine
- E Fromage, comme en C, après concentration $\times 5$
- F Fromage, comme en D, après concentration $\times 10$

Figure 4 — Exemples de spectres de différentes solutions d'essai

Des exemples de spectres de solutions d'essai sont donnés en figure 4.

NOTE 2 La présence d'épices, en particulier de poivre, dans le fromage peut interférer sur les résultats, ce qui se traduit par une déformation du graphe d'absorbance, comme illustré en figure 4.

9.3.2 Mesure par chromatographie liquide à haute performance

9.3.2.1 Réglage du chromatographe (6.14, 6.15, 6.16)

Les conditions de chromatographie suivantes sont recommandées.

Phase mobile: méthanol-eau-acide acétique, 60 + 40 + 5 (V/V/V)

Débit: 1 ml/min

Détecteur: 303 nm, 0,005 unité d'absorbance, pleine échelle

Enregistreur: 10 mV

Nombre de plateaux théoriques: 1500 minimum

NOTE 3 Lorsqu'une colonne autre que celle donnée en exemple (6.15) est utilisée, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la proportion méthanol/eau. Toutefois, la quantité relative d'acide acétique (5.4) doit être conservée pour maintenir l'absorption maximale à 303 nm.

Avant chaque série d'échantillons, un étalon à teneur connue en natamycine doit être injecté pour déterminer le temps de rétention et pour vérifier la courbe d'étalonnage (9.3.2.2).

9.3.2.2 Courbe d'étalonnage

Transférer, à l'aide d'une pipette, 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml et 8 ml de la solution étalon de natamycine dans une série de fioles jaugées de 50 ml et compléter au trait repère avec la solution de méthanol (5.2).

Ces solutions contiennent respectivement 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,6 µg/ml et 0,8 µg/ml de natamycine. Injecter, l'une après l'autre, 20 µl de chacune des solutions étalons et déterminer la surface ou la hauteur du pic obtenu.

Reporter les valeurs des surfaces ou des hauteurs des pics pour chaque solution étalon en ordonnée et la concentration en natamycine, en microgrammes par millilitre, en abscisse.

Un exemple de chromatogramme d'une solution étalon est donnée en figure 5.

NOTE 4 La présence d'épices, en particulier de poivre, dans le fromage peut interférer sur la détermination dans

la mesure où le chromatogramme peut donner un pic ayant le même temps de rétention que celui correspondant à la natamycine.

La séparation peut être réalisée à l'aide d'un gradient d'éluion ou par l'emploi isocratique d'une autre phase mobile.

9.3.2.3 Solution d'essai

Injecter 20 µl de la solution d'essai (9.2). Mesurer la surface ou la hauteur du pic ayant le même temps de rétention que les solutions étalons de natamycine.

Effectuer la mesure aussi rapidement que possible.

Si la surface ou la hauteur du pic de la solution d'essai est trop petite au point de rendre impossible ou pratiquement impossible l'interpolation sur la courbe d'étalonnage, mais si la détermination est néanmoins requise, procéder conformément à 9.3.3.

Des exemples de chromatogrammes de solutions d'essai sont donnés en figure 6.

9.3.3 Concentration de l'extrait filtré pour la détermination de faibles teneurs en natamycine

9.3.3.1 Concentration

Décider de la concentration à retenir: environ 5 fois ou environ 10 fois. Cette décision doit s'appuyer sur les données obtenues conformément à 9.3.1.2 ou 9.3.2.3 et sur la limite de détection requise.

Transférer, à l'aide d'une pipette, 25 ml ou 50 ml (pour des concentrations de 5 fois ou 10 fois, respectivement) de la solution d'essai (9.2) dans un bécher. Ajouter respectivement 50 ml ou 100 ml d'eau et mélanger.

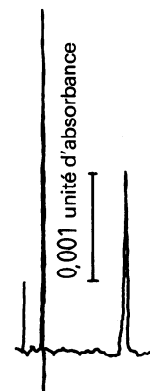
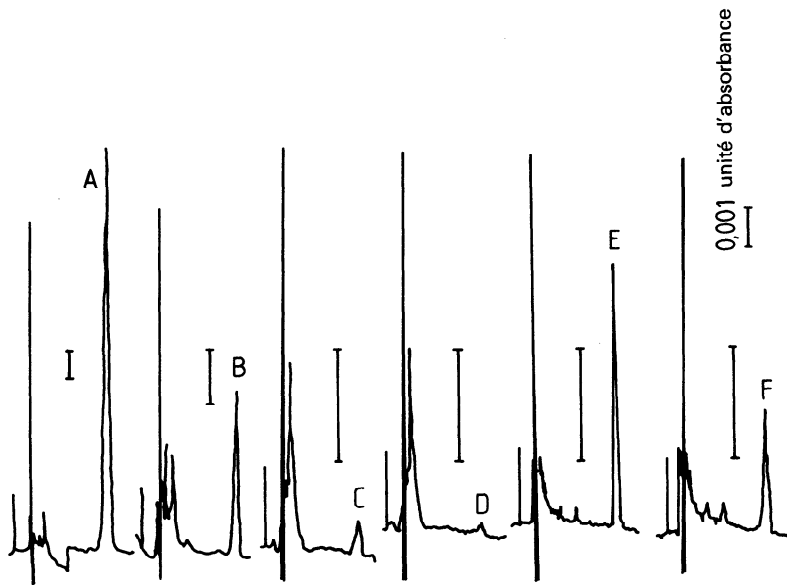


Figure 5 — Exemple de chromatogramme liquide à haute performance d'une solution étalon à 0,5 µg/ml de natamycine



- A Croûte de fromage, à 61 mg/kg de teneur en natamycine
- B Croûte de fromage, à 15 mg/kg de teneur en natamycine
- C Fromage, à 1,7 mg/kg de teneur en natamycine
- D Fromage, à 0,3 mg/kg de teneur en natamycine
- E Fromage, comme en C, après concentration $\times 5$
- F Fromage, comme en D, après concentration $\times 10$

Figure 6 — Exemples de chromatogrammes obtenus par CLHP de différentes solutions d'essai
 ISO 9233:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f7107e3d-ee10-4082-8dda-d41637969c7c-iso-9233-1991>

Activer une cartouche Sep-pak C18 (6.12) en utilisant 3 ml à 5 ml de méthanol (5.1), puis rincer avec 10 ml d'eau.

Procéder comme indiqué en 9.3.2.3.

Faire passer, à l'aide d'une seringue (6.7), la solution d'essai diluée dans la cartouche à un débit d'environ 25 ml/min.

Rincer la cartouche avec 10 ml d'eau à l'aide d'une seringue (6.7).

Éluer la natamycine avec 3 ml de méthanol (5.1) à l'aide d'une seringue (6.7).

9.3.3.2 Mesure spectrométrique

Ajouter 1,5 ml d'eau à l'éluat (9.3.3.1) et mélanger.

Prélever la solution dans une seringue (6.7) et filtrer dans une cuve à travers un microfiltre de 0,45 μm de grosseur des pores, puis à travers un microfiltre de 0,20 μm de grosseur des pores (6.8).

Procéder ensuite comme indiqué en 9.3.1.2.

9.3.3.3 Mesure par chromatographie liquide à haute performance

Diluer l'éluat (9.3.3.1) à 5 ml dans du méthanol (5.1).

10 Expression des résultats

10.1 Méthode spectrométrique

Calculer la teneur en natamycine, w_s , de l'échantillon, à l'aide de l'équation (1):

$$w_s = \frac{V \times A_s}{m_t \times A_N} \times c_N \quad \dots (1)$$

où

w_s est la teneur en natamycine de l'échantillon, en milligrammes par kilogramme;

c_N est la concentration de la solution étalon de natamycine, en microgrammes par millilitre;

A_N est l'absorbance nette de la solution étalon de natamycine à environ 317 nm;

A_s est l'absorbance nette de la solution d'essai à environ 317 nm;

m_t est la masse de la prise d'essai (9.1), en grammes;

V est le volume total de la solution d'essai (9.2), en millilitres.

A_N peut être lue sur le spectre UV de la solution étalon (figure 3) en utilisant la ligne droite tracée entre l'absorbance à environ 311 nm et l'absorbance à 329 nm comme ligne de base, ou peut être calculée à partir de l'équation (2):

$$A_N = (A_1)_N - \frac{2}{3} (A_2)_N - \frac{1}{3} (A_{329})_N \quad \dots (2)$$

où

$(A_1)_N$ est l'absorbance maximale à environ 317 nm;

$(A_2)_N$ est l'absorbance minimale à environ 311 nm;

$(A_{329})_N$ est l'absorbance à 329 nm.

A_s peut être lue sur le spectre UV de la solution d'essai (figure 7) en utilisant la ligne droite tracée entre l'absorbance à environ 311 nm et l'absorbance à 329 nm comme ligne de base, ou peut être calculée à partir de l'équation (3):

$$A_s = (A_1)_s - \frac{2}{3} (A_2)_s - \frac{1}{3} (A_{329})_s \quad \dots (3)$$

où

$(A_1)_s$ est l'absorbance maximale à environ 317 nm;

$(A_2)_s$ est l'absorbance minimale à environ 311 nm;

$(A_{329})_s$ est l'absorbance à 329 nm.

Dans le cas de la solution d'essai représentant le fromage échantillonné sous la croûte, la valeur w_s donne la teneur en natamycine résultant de la migration de la natamycine vers l'intérieur du fromage.

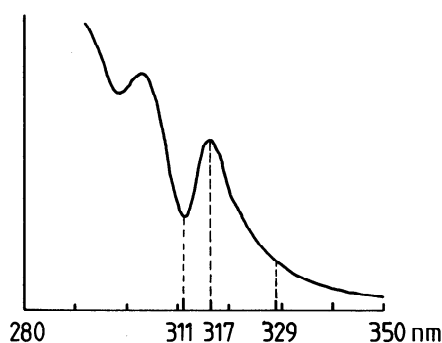


Figure 7 — Spectre UV d'un échantillon contenant de la natamycine

Dans le cas de la solution d'essai représentant la croûte de fromage, calculer, à partir de w_s , la teneur en natamycine de la surface de la croûte, w'_s , exprimée en milligrammes par décimètre carré, à l'aide de l'équation (4):

$$w'_s = \frac{w_s \times m_r}{A} \quad \dots (4)$$

où

w_s est la teneur en natamycine de l'échantillon, en milligrammes par kilogramme;

A est la surface, en décimètres carrés, du morceau de croûte pesé (8.1);

m_r est la masse, en kilogrammes, du morceau de croûte pesé (8.1).

Si l'extrait filtré a été concentré comme indiqué en 9.3.3, corriger les valeurs de w_s et de w'_s calculées comme indiqué ci-dessus, en les divisant par

5,6 dans le cas d'une concentration de 5 fois (environ), et par

11,1 dans le cas d'une concentration de 10 fois (environ).

10.2 Méthode par chromatographie liquide à haute performance

La concentration en natamycine de la partie aliquote injectée dans la solution d'essai peut être obtenue par interpolation sur la courbe d'étalonnage (9.3.2.2).

Calculer la teneur en natamycine de l'échantillon, w_s , en milligrammes par kilogrammes, à partir de l'équation (5):

$$w_s = \frac{V \times c_m}{m_t} \quad \dots (5)$$

où

c_m est la concentration en microgrammes par millilitre, en natamycine de la solution d'essai;

m_t est la masse, en grammes, de la prise d'essai (9.1);

V est le volume total, en millilitres, de la solution d'essai (9.2).

Dans le cas de la solution d'essai représentant le fromage échantillonné sous la croûte, la valeur de w_s donne la teneur en natamycine résultant de la migration de la natamycine vers l'intérieur du fromage.

Dans le cas de la solution d'essai représentant la croûte de fromage, calculer, à partir de w_s , la teneur