
**Lait et produits laitiers — Détermination de
l'activité de la phosphatase alcaline à l'aide
de la méthode fluorimétrique —**

Partie 1:

Lait et boissons à base de lait

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Milk and milk products — Determination of alkaline phosphatase activity
using a fluorimetric method —*

Part 1: Milk and milk-based drinks

ISO 11816-1:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c1594b1d-8b0a-461d-8b54-b01e7a79954b/iso-11816-1-1997>



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 11816-1 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'AOAC INTERNATIONAL, et sera également publiée par ces organismes.

L'ISO 11816 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline à l'aide de la méthode fluorimétrique*:

— *Partie 1: Lait et boissons à base de lait*

— *Partie 2: Fromages*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

L'annexe A de la présente partie de l'ISO 11816 est donnée uniquement à titre d'information.

ISO 11816-1:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c1594b1d-8b0a-461d-8b54-b01e7a79954b/iso-11816-1-1997>

© ISO 1997

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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
Internet central@iso.ch
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline à l'aide de la méthode fluorimétrique —

Partie 1:

Lait et boissons à base de lait

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11816 prescrit une méthode fluorimétrique pour la détermination de l'activité de la phosphatase alcaline dans les laits pasteurisés entiers, demi-écrémés, écrémés et aromatisés.

La méthode convient également pour la détermination de l'activité élevée de la phosphatase alcaline dans le lait cru et le lait traité thermiquement, ayant des activités de plus de 7 000 milliunités par litre.

2 Définitions

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 11816, les définitions suivantes s'appliquent.

2.1 activité de la phosphatase alcaline (ALP): Activité de la phosphatase alcaline présente dans un produit, déterminée suivant le mode opératoire prescrit dans la présente partie de l'ISO 11816. Elle est exprimée en milliunités par litre.

NOTE 1 Voir référence [1] dans l'annexe A.

2.2 unité d'activité de la phosphatase alcaline: Quantité d'enzyme phosphatase alcaline qui catalyse la transformation de 1 μmol de substrat par minute et par litre d'échantillon.

3 Principe

L'activité de la phosphatase alcaline de l'échantillon se mesure en effectuant un essai cinétique direct fluorimétrique continu. Un substrat d'ester monophosphorique aromatique non fluorescent, en présence de toute phosphatase alcaline dérivée de l'échantillon, subit une hydrolyse de son radical phosphate et se convertit en un produit hautement fluorescent. Le mesurage fluorimétrique de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) est effectué à 38 °C sur une période de 3 min.

NOTE 2 Bien que l'essai dure 3 min, la première minute est une période d'équilibration afin de s'assurer que l'échantillon est à 38 °C. Les mesurages d'activité sont actuellement effectués du début de la deuxième minute à la fin de la troisième minute (c'est-à-dire sur une période de 2 min).

4 Réactifs

Sauf indication différente, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de pureté équivalente.

4.1 Substrat, par exemple le substrat «Fluorophos»¹⁾, cristallisé.

NOTE 3 Le substrat «Fluorophos» est un ester monophosphorique aromatique non fluorescent soluble dans l'eau, qui reste stable pendant 1 an quand il est cristallisé et conservé dans des ampoules en verre à 4 °C.

4.2 Diluant de substrat¹⁾: tampon de diéthanolamine (DEA), à pH 10,0, solution à 2,4 mol/l.

NOTE 4 La solution tampon est stable pendant 1 an à 4 °C.

4.3 Substrat actif¹⁾.

Ajouter un volume du diluant de substrat (4.2) au substrat (4.1) afin d'obtenir une concentration de 1,044 mmol/l et bien mélanger en retournant le récipient. Utiliser un verre ambré pour protéger de la lumière.

Si le «Fluorophos Test System» est utilisé, ajouter le contenu d'une ampoule de diluant de substrat (4.2) à une ampoule de substrat (4.1) et bien mélanger en retournant le récipient.

NOTE 5 Cette solution reste stable lorsqu'elle est conservée dans l'obscurité pendant 8 semaines à 4 °C et pendant 8 h à 38 °C. Elle est suffisante pour effectuer 115 essais.

4.4 Solutions étalons¹⁾, par exemple «Fluoroyellow» dans le tampon à la diéthanolamine (DEA).

4.4.1 Solution étalon A, contenant 0 µmol/l de «Fluoroyellow».

4.4.2 Solution étalon B, contenant $17,24 \times 10^{-3}$ µmol/l de «Fluoroyellow».

4.4.3 Solution étalon C, contenant $34,48 \times 10^{-3}$ µmol/l de «Fluoroyellow».

NOTES

6 Les solutions étalons sont stables pendant 1 an lorsqu'elles sont conservées à 4 °C.

7 Les volumes de réactifs fournis par le «Fluorophos Test System» peuvent être modifiés par le fabricant. Il convient que l'utilisateur se réfère aux instructions du fabricant pour la préparation des réactifs si les volumes fournis sont différents de ceux spécifiés en 4.1 à 4.4.

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

5.1 Fluorimètre à filtre¹⁾, avec support de cuvette à contrôle thermostatique maintenu à $38 \text{ °C} \pm 0,1 \text{ °C}$ et avec optique à angle droit, permettant une excitation à une longueur d'onde de 440 nm et une émission à 560 nm.

5.2 Cuvettes, jetables, en verre non fluorescent, de 12 mm de diamètre et de 75 mm de longueur.

5.3 Pipette à écoulement, à volume fixe, permettant de délivrer 2,0 ml.

5.4 Pipette à déplacement positif, de 0,075 ml de capacité.

¹⁾ Les réactifs spécifiés en 4.1 à 4.4 et les appareils spécifiés en 5.1 à 5.6 (sauf 5.5) sont disponibles sous l'appellation «Fluorophos Test System» et commercialisés par la firme Advanced Instruments Inc., Two Technology Way, Norwood, MA 02062, États-Unis. «Fluorophos» et «Fluoroyellow» sont des marques déposées de la firme Advanced Instruments Inc. et sont des exemples de produits convenables disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 11816 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits et appareils ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.5 Pipettes, de 1 ml et 2 ml de capacité.

5.6 Bloc d'incubation, pouvant supporter les cuvettes et pouvant être maintenu à une température de $38\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

5.7 Parafilm ou autre film approprié de qualité pour laboratoire.

5.8 Agitateur à mouvement tourbillonnaire.

5.9 Bain d'eau, réglable à $95\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

5.10 Fiole jaugée à un trait, de 100 ml de capacité.

6 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode prescrite dans la présente partie de l'ISO 11816. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707 [2].

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Mélange soigneusement l'échantillon pour laboratoire. Il n'est généralement pas nécessaire de préchauffer l'échantillon pour essai.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11816-1:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c1594b1d-8b0a-461d-8b54-b01e7a79954b/iso-11816-1-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c1594b1d-8b0a-461d-8b54-b01e7a79954b/iso-11816-1-1997>

8 Mode opératoire

8.1 Prise d'essai

8.1.1 Échantillons pasteurisés

Utiliser des échantillons pour essai pasteurisés en quantités requises.

8.1.2 Lait cru et lait traité thermiquement

Prélever, à la pipette (5.5), 1 ml de l'échantillon pour essai de lait cru dans une fiole jaugée (5.10). Compléter à 100 ml avec du lait exempt de phosphatase (8.4.1). Mélanger soigneusement. Diluer les échantillons pour essai de lait traité thermiquement avec du lait exempt de phosphatase (8.4.1) de manière à obtenir une activité de la phosphatase alcaline dans la prise d'essai de moins de 7 000 milliunités par litre (mU/L).

8.2 Étalonnage

Tracer une courbe d'étalonnage pour chaque type de produit à soumettre à l'essai. Les courbes d'étalonnage sont généralement stables mais l'appareillage doit être réétalonné tous les 2 à 3 mois. Contrôler l'appareillage s'il apparaît des modifications dans la courbe d'étalonnage.

À l'aide de la pipette (5.5), transférer 2,0 ml des solutions étalons A, B et C (4.4.1, 4.4.2 et 4.4.3 respectivement), et ceci en double, dans des cuvettes étiquetées (5.2). Placer les cuvettes dans le bloc d'incubation (5.6) et préchauffer à 38 °C pendant 5 min. À l'aide de la pipette à déplacement positif (5.4), ajouter dans chacune des six cuvettes, 0,075 ml de la prise d'essai préparée (8.1). Couvrir les cuvettes avec le parafilm (5.7).

Utiliser l'agitateur à mouvement tourbillonnaire (5.8), ou retourner doucement toutes les cuvettes pour mélanger le contenu, puis les replacer dans le bloc d'incubation. En commençant par la solution étalon A (4.4.1), réaliser l'étalonnage comme suit. Régler le fluorimètre (5.1) à la fluorescence de valeur zéro en utilisant la solution étalon A (4.4.1), puis lire et enregistrer la valeur de fluorescence obtenue avec les solutions étalons B et C par rapport à la solution A. Essuyer l'extérieur de chaque cuvette avec un chiffon doux avant de la placer dans le fluorimètre. Une fois l'étalonnage terminé, procéder à l'analyse des échantillons.

8.3 Détermination

À l'aide de la pipette à l'écoulement à volume fixe (5.3), transférer 2,0 ml de substrat actif (4.3) dans une cuvette étiquetée. Placer la cuvette dans le bloc d'incubation (5.6) et préchauffer à 38 °C pendant 5 min.

Ajouter au substrat 0,075 ml de la prise d'essai (8.1). Couvrir et mélanger immédiatement le contenu de la cuvette en utilisant l'agitateur à mouvement tourbillonnaire ou en la retournant doucement. Essuyer l'extérieur de la cuvette avec un chiffon doux et la placer dans le fluorimètre. Laisser la cuvette reposer pendant 1 min pour que la température s'équilibre, puis enregistrer la valeur de la fluorescence au début de la deuxième minute et à la fin de la troisième minute. Diviser par 2 la différence entre la valeur de fluorescence au début de la deuxième minute et celle à la fin de la troisième minute pour obtenir l'accroissement moyen de la fluorescence par minute.

Enregistrer l'accroissement moyen de la fluorescence par minute pour chaque prise d'essai. Utiliser cette valeur pour calculer l'activité de la phosphatase alcaline, en milliunités par litre.

NOTE 8 Les résultats peuvent être calculés automatiquement en utilisant l'ordinateur programmable intégré au fluorimètre, ou être calculés manuellement, conformément à l'article 9.

8.4 Essais de contrôle

8.4.1 Échantillon témoin négatif

Inclure un échantillon témoin négatif avec chaque lot d'échantillons qui est préparé en chauffant 5 ml du produit à soumettre à l'essai à 95 °C dans le bain d'eau (5.9) et en le maintenant à cette température pendant 1 min, le refroidir ensuite rapidement. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c1594b1d-8b0a-461d-8b54-b01e7a79954b/iso-11816-1-1997>

NOTE 9 Une activité de la phosphatase alcaline de moins de 10 mU/L indique qu'aucune activité de fluorescence n'est détectée.

8.4.2 Échantillon témoin positif

Inclure un échantillon témoin positif ayant un niveau d'activité de la phosphatase proche ou égal au niveau de décision avec chaque lot d'échantillons.

NOTE 10 Par exemple, ajouter 0,2 ml de lait cru de troupeau, frais et mélangé, à 100 ml de l'échantillon préalablement chauffé à 95 °C pendant 1 min, puis rapidement refroidi (8.4.1).

8.4.3 Essais de contrôle de l'absence de substance interférente

Effectuer cet essai sur le produit à soumettre à l'essai, en ajoutant 0,075 ml de la prise d'essai (8.1) à 2,0 ml de la solution étalon A (4.4.1) qui aura été préchauffée dans le bloc incubateur (5.6) à 38 °C pendant 5 min. Placer la cuvette contenant ce mélange dans le fluorimètre (5.1). Laisser la température atteindre 38 °C $\pm$ 1 °C dans un laps de temps de 1 min, puis enregistrer toute augmentation de fluorescence entre le début de la deuxième minute et la fin de la troisième minute. Il convient qu'aucune activité de phosphatase alcaline ne soit observée durant les 2 min de la période de mesurage.

8.4.4 Essais de contrôle de la phosphatase alcaline microbienne

Si le mode opératoire prescrit en 8.3 donne un résultat positif, procéder alors comme suit.

Prendre une nouvelle prise d'essai (8.1), la chauffer à une température de 62,8 °C et la maintenir à cette température pendant 30 min, la refroidir ensuite rapidement. Déterminer toute activité résiduelle de la phosphatase conformément à 8.3. Toute activité résiduelle est due à la présence de phosphatase alcaline microbienne.

9 Calculs et expression des résultats

Les résultats peuvent être calculés automatiquement à l'aide de l'ordinateur programmable intégré au fluorimètre (5.1).

Si les résultats doivent être calculés manuellement, procéder comme suit.

Enregistrer les valeurs de fluorescence des solutions étalons B et C (4.4.2 et 4.4.3) lues par rapport à la solution étalon A (4.4.1) définie comme étant de fluorescence zéro sur le fluorimètre (5.1).

Calculer le rapport d'étalonnage, R , de la courbe d'étalonnage établie, à l'aide de l'équation suivante:

$$R = \frac{C_A + 2B_A}{4}$$

où

B_A est la valeur numérique de la fluorescence de la solution étalon B lue par rapport à la solution étalon A définie comme étant de fluorescence zéro;

C_A est la valeur numérique de la fluorescence de la solution étalon C lue par rapport à la solution étalon A définie comme étant de fluorescence zéro.

Enregistrer la valeur moyenne de fluorescence par minute (8.3) de la prise d'essai.

Calculer l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), exprimée en milliunités par litre, à l'aide de l'équation suivante :

$$ALP = \frac{F}{R} \times \frac{c}{V} \times f$$

où

F est la valeur moyenne de fluorescence par minute de la prise d'essai (8.3), mesurée par rapport à la solution étalon A entre le début de la deuxième minute et la fin de la troisième minute;

c est la concentration de «Fluoroyellow» dans la solution étalon B (4.4.2), en micromoles pour 2 ml d'étalon;

f est le taux de dilution (1×10^6) dans le cas d'échantillons de lait pasteurisé (8.1.1); dans le cas d'échantillons de lait cru (8.1.2), f est égal à 1×10^8 ; dans le cas d'échantillons de lait traité thermiquement (8.1.2), multiplier $f = 1 \times 10^6$ par le taux de dilution f_t de l'échantillon pour essai ($f = f_t \times 10^6$);

V est le volume de la prise d'essai (8.3), en millilitres.

Arrondir le résultat au nombre entier de milliunités le plus proche.

10 Fidélité

Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité figurant en 10.1 et 10.2 s'appliquent à un niveau d'activité de la phosphatase d'environ 500 mU/L, ce qui correspond à une activité de phosphatase de 0,1 % de lait cru ajouté dans le produit convenablement pasteurisé.

Ces valeurs sont exprimées au seuil de probabilité de 95 % et ont été obtenues à partir des résultats d'un essai interlaboratoire réalisé conformément à l'ISO 5725 [3].

10.1 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage et dans un court intervalle de temps, ne doit pas être supérieure aux valeurs suivantes:

- pour le lait entier 62 mU/L
- pour le lait écrémé 55 mU/L
- pour le lait aromatisé (chocolat) 79 mU/L

10.2 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, ne doit pas être supérieure aux valeurs suivantes:

- pour le lait entier 98 mU/L
- pour le lait écrémé 89 mU/L
- pour le lait aromatisé (chocolat) 130 mU/L

11 Rapport d'essai

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Le rapport d'essai doit indiquer

- la méthode selon laquelle l'échantillonnage a été effectué, si elle est connue, [ISO 11816-1:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c1594b1d-8b0a-461d-8b54-b01e7a79954b/iso-11816-1-1997)
- la méthode utilisée, <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c1594b1d-8b0a-461d-8b54-b01e7a79954b/iso-11816-1-1997>
- le(s) résultat(s) d'essai obtenu(s), et
- si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.

Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente partie de l'ISO 11816, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le(s) résultat(s) d'essai.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Annexe A

(informative)

Bibliographie

- [1] International Union of Biochemistry Nomenclature. *J. Am. Med. Assoc.*, **260**, 1988, p. 73.
- [2] ISO 707:—²⁾, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices pour l'échantillonnage*.
- [3] L'ISO 5725:1986, *Fidélité des méthodes d'essai — Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais interlaboratoires* (annulée à l'heure actuelle), a été utilisée pour l'obtention des données de fidélité.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11816-1:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c1594b1d-8b0a-461d-8b54-b01e7a79954b/iso-11816-1-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c1594b1d-8b0a-461d-8b54-b01e7a79954b/iso-11816-1-1997>

2) À publier. (Révision de l'ISO 707:1985)