
**Lait traité thermiquement — Détermination
de la teneur en lactulose — Méthode par
chromatographie liquide à haute
performance**

*Heat-treated milk — Determination of lactulose content — Method using
high-performance liquid chromatography*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11868:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53daac68-e9a-48e4-9a13-792943a7c844/iso-11868-1997>



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 11868 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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53daac68-e9a-48e4-9a13-792943a7c844/iso-11868-1997>

Les annexes A, B et C de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

© 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 traité thermiquement — Détermination de la teneur en lactulose — Méthode par chromatographie liquide à haute performance

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode par chromatographie liquide à haute performance pour la détermination de la teneur en lactulose du lait traité thermiquement (lait écrémé, demi-écrémé ou entier) afin de distinguer le lait stérilisé à ultra haute température (UHT) du lait stérilisé en bouteilles.

La méthode décrite a été testée pour des teneurs en lactulose situées dans une plage allant de 200 mg/l à 1 500 mg/l et est applicable à tous les laits traités thermiquement.

La méthode décrite dans la présente Norme internationale doit être utilisée en cas de litige.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

2 Définitions

ISO 11868:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53daac68-e9a-48e4-9a13->

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante s'applique.

2.1

teneur en lactulose du lait écrémé, demi-écrémé ou entier

masse des substances déterminées par la méthode décrite dans la présente Norme internationale

NOTE — La teneur en lactulose est exprimée en milligrammes par litre d'échantillon.

3 Principe

Élimination des matières grasses et des protéines suivie d'une filtration. Détermination de la teneur en lactulose dans le filtrat, par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Évaluation du résultat obtenu pour l'échantillon par comparaison avec des échantillons étalons de lait écrémé sans lactulose auxquels ont été ajoutées des quantités connues de lactulose.

4 Réactifs

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

4.1 Lactose, monohydraté

4.2 Lactulose, ayant une pureté minimale de 99 %.

4.3 Solution de prétraitement de l'échantillon

Dissoudre dans de l'eau 91,0 g d'acétate de zinc dihydraté, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, 54,6 g d'acide phosphotungstique hydraté, $H_3[P(W_3O_{10})_4] \cdot 24H_2O$, et 58,1 ml d'acide acétique cristallisable, dans une fiole jaugée de 1 000 ml et compléter au trait repère avec de l'eau.

4.4 Eluant

Filtrer l'eau, de qualité CLHP, à travers un filtre sur membrane d'un diamètre de pore de 0,45 μm , et avant l'emploi, la porter à ébullition pour éliminer l'air dissous.

NOTE — Au lieu de porter l'eau à ébullition, il est possible d'utiliser d'autres méthodes d'élimination de l'air dissous qui conduisent au même résultat (par exemple, barbotage à l'hélium). Cependant, la plupart de ces variantes sont plus onéreuses.

4.5 Échantillons étalons

4.5.1 Solution étalon de lactulose

Peser, à 0,1 mg près, environ 75 mg de lactulose (4.2) dans une fiole jaugée de 100 ml (5.6). Dissoudre dans de l'eau et compléter à 100 ml avec de l'eau.

4.5.2 Lait écrémé pasteurisé, sans lactulose, reconnu comme tel en utilisant la méthode décrite ci-dessous.

Utiliser des échantillons identiques de lait écrémé pasteurisé contenant environ 250 mg, 500 mg, 750 g et 1 000 mg de lactulose par litre obtenus en leur ajoutant, respectivement, 5 ml, 10 ml, 15 ml et 20 ml de solution étalon de lactulose (comme décrit en 8.2).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53daac68-e9a-48e4-9a13-43a7c844/iso-11868-1997>

5.1 Balance analytique, précise à 0,1 mg près

5.2 Entonnoirs en verre, d'environ 7 cm de diamètre.

5.3 Filtres

5.3.1 Papiers filtres, à filtration moyenne, d'environ 12,5 cm de diamètre.

5.3.2 Membranes en acétate de cellulose, d'un diamètre de pore de 0,45 μm .

5.4 Eprouvette graduée, de 25 ml de capacité.

5.5 Pipette graduée, de 10 ml de capacité, avec graduations de 0,1 ml.

5.6 Fioles jaugées, de 50 ml, 100 ml et 1 000 ml de capacité.

5.7 Pipettes à un trait, de 5 ml, 10 ml, 15 ml et 20 ml de capacité.

5.8 Appareil de filtration en verre, avec filtre d'un diamètre de pore de 0,45 μm .

5.9 Flacons en verre, de 20 ml de capacité, munis d'un robinet d'arrêt.

5.10 Bain d'eau à ultrasons.

5.11 Pompe à vide hydraulique.

5.12 Matériel de CLHP, comme suit.

5.12.1 Agitateur magnétique et réchauffeur, pour conserver l'éluant à la température de $90\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

5.12.2 Pompe, capable de délivrer un débit de 0,3 ml/min à 0,6 ml/min avec une pulsation inférieure à 1 % de la perte de charge sur la colonne (1,5 MPa à 4 MPa).

5.12.3 Colonne HPX-87 P (Bio-Rad, 30 cm x 0,78 cm)¹⁾ ou colonne équivalente garnie d'un échangeur d'ions sulfoniques sous forme plomb, greffée sur un polymère réticulé à 8 % de divinylbenzène de polystyrène. La précolonne est constituée du système de déminéralisation Bio-Rad¹⁾ (cartouche de 3 cm x 0,46 cm, garnie d'une résine échangeuse de cations sous forme hydrogène et cartouche de 3 cm x 0,46 cm, garnie d'une résine échangeuse d'anions sous forme carbonate) ou système offrant une efficacité similaire.

NOTE — Les précolonnes augmentent à la fois la durée de vie et la longueur de la colonne analytique, en diminuant les problèmes de séparation et en réduisant de manière importante les erreurs de dosage quantitatif. Quand le système CLHP commence à perdre de sa résolution, remplacer la précolonne usagée avant qu'elle ne contamine la colonne principale.

5.12.4 Four thermostatique de la colonne, pouvant être réglée à $75\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

NOTE — Il convient de placer les précolonnes à l'extérieur du four. Il convient que le tube d'entrée de la colonne principale entre sur une longueur de 10 cm à 15 cm dans le four pour équilibrer la température de l'éluant à 75 °C , sinon, il pourrait y avoir risque de distorsion des pics.

5.12.5 Détecteur d'indice de réfraction, très sensible, avec un bruit de fond inférieur à 5×10^{-9} RIU, mesuré dans l'eau. La température interne du thermostat doit être réglée à une température supérieure à la température ambiante et être suffisante pour obtenir une ligne de base stable. On recommande dans la plupart des cas une température de 35 °C à 40 °C .

NOTE — Une dérive de la ligne de base due à des changements de température entravant la mesure à haute sensibilité de l'indice de réfraction, il convient de maintenir une température constante en plaçant le matériel CLHP dans une pièce climatisée.

5.12.6 Intégrateur, capable de mesurer la hauteur des pics.

Les paramètres de contrôle doivent être choisis soigneusement (par exemple la largeur de pic, la dérive de la ligne de base, le seuil de détection, etc.). L'intégrateur devrait être amené à tracer une perpendiculaire entre les pics du lactose et du lactulose. (La logique d'intégration tangentielle entraîne des inexactitudes en raison de la présence de quantités variables de glucose dans le lait). Il ne faut pas que l'intégrateur détecte une ligne de base entre les pics du lactose et du lactulose, sauf si la vallée atteint la ligne de base pour toutes les concentrations de lactulose.

De nombreux intégrateurs font varier automatiquement les paramètres d'intégration des pics pendant l'analyse. Il faut, si possible, déconnecter cette fonction afin d'obtenir des résultats plus répétables.

6 Échantillonnage

6.1 L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707 [1].

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

6.2 Conserver l'échantillon dans des conditions empêchant toute détérioration ou toute modification de la composition.

¹⁾ La colonne HPX-87P (Bio-Rad, 30 cm x 0,78 cm) et le système de déminéralisation Bio-Rad sont des exemples convenables 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 du produit ainsi désigné.

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Porter l'échantillon à $25\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ et mélanger soigneusement. Si la matière grasse n'est pas dispersée de façon homogène, chauffer lentement l'échantillon à 40 °C , mélanger doucement par retournements répétés et modérés puis refroidir rapidement à $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

8 Mode opératoire

8.1 Prise d'essai

8.1.1 Prélever à la pipette, 15 ml de l'échantillon pour essai (article 7) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.6). Ajouter 20 ml d'eau à l'aide d'une éprouvette graduée (5.4) et agiter. Pipetter 5,5 ml de solution pour le prétraitement de l'échantillon (4.3) avec une pipette graduée (5.5) et remuer. Compléter au trait repère avec de l'eau et mélanger.

8.1.2 Après avoir laissé reposer pendant 1 h à $25\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$, filtrer dans un entonnoir en verre (5.2) au travers d'un papier filtre (5.3); éliminer les premiers 5 ml du filtrat. Recueillir le reste du filtrat dans l'entonnoir en verre.

8.2 Préparation des échantillons étalons

8.2.1 Prélever à la pipette, 15 ml de lait écrémé sans lactulose (4.5.2) dans chacune des quatre fioles jaugées de 50 ml.

8.2.2 Etalon A

8.2.2.1 Pipetter 5 ml de la solution étalon de lactulose (4.5.1) dans la première fiole jaugée de 50 ml contenant le lait écrémé sans lactulose (8.2.1) et agiter.

8.2.2.2 Ajouter 15 ml d'eau à l'aide d'une éprouvette graduée (5.4) et mélanger.

8.2.2.3 Prélever 5,5 ml de la solution pour le prétraitement de l'échantillon (4.3) avec une pipette graduée (5.5) et agiter. Compléter au trait repère avec de l'eau et mélanger. Après avoir laissé reposer pendant 1 h à $25\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$, filtrer dans un entonnoir en verre (5.2) au travers d'un papier filtre (5.3); éliminer les premiers 5 ml du filtrat. Recueillir le reste du filtrat dans l'entonnoir en verre.

8.2.3 Etalon B

8.2.3.1 Pipetter 10 ml de la solution étalon de lactulose (4.5.1) dans la deuxième fiole jaugée de 50 ml contenant le lait écrémé sans lactulose (8.2.1) et agiter.

8.2.3.2 Ajouter 10 ml d'eau à l'aide d'une éprouvette graduée (5.4) et mélanger.

8.2.3.3 Procéder comme au point 8.2.2.3.

8.2.4 Etalon C

8.2.4.1 Pipetter 15 ml de la solution étalon de lactulose (4.5.1) dans la troisième fiole jaugée de 50 ml contenant le lait écrémé sans lactulose (8.2.1) et agiter.

8.2.4.2 Ajouter 5 ml d'eau à l'aide d'une éprouvette graduée (5.4) et mélanger.

8.2.4.3 Procéder comme au point 8.2.2.3.

8.2.5 Etalon D

8.2.5.1 Pipetter 20 ml de la solution étalon de lactulose (4.5.1) dans la quatrième fiole jaugée de 50 ml contenant le lait écrémé sans lactulose (8.2.1) et agiter.

8.2.5.2 Procéder comme au point 8.2.23.

8.3 Détermination chromatographique

8.3.1 Dégazage de l'échantillon

Pipetter environ 3 ml de filtrat de la prise d'essai (8.1.2) et des échantillons étalons (8.2.2.3) dans des flacons en verre (5.9). Éliminer l'air dissous du filtrat en fixant le robinet d'arrêt du flacon à la pompe à vide (5.11) et en lui faisant subir un traitement aux ultrasons (5.10) pendant environ 30 s à température ambiante. Éviter si possible toute formation de mousse.

NOTE — La présence d'air dans l'échantillon pourrait entraîner l'apparition d'un pic négatif après le temps de rétention du lactulose.

8.3.2 Injecter un volume fixe mesuré avec précision compris entre 10 µl à 30 µl du filtrat dans l'appareil de CLHP (5.12), réglé à un débit de 0,3 ml/min.

Quand la teneur en lactulose est inférieure à 200 mg/kg de lait, il convient de procéder à l'analyse en utilisant deux colonnes en série, en augmentant le débit à 0,6 ml/min.

NOTE — Le chromatogramme (voir annexe A) présente un grand pic hors échelle avec un temps de rétention d'environ 19 min et, dans le cas des échantillons étalons (8.2.2, 8.2.3, 8.2.4 et 8.2.5) et avec le lait traité thermiquement, un pic de lactulose relativement petit avec un temps de rétention de 24 min.

Choisir des réglages d'enregistreur qui donnent une hauteur minimale de 5 mm pour le pic de lactulose de l'étalon A (8.2.2). Selon la qualité de la colonne et de la précolonne utilisées (5.1.2.3), on obtient un pic de lactulose plus ou moins bien séparé (voir 5.12.6). Afin de déterminer la résolution minimale nécessaire entre le lactose et le lactulose préparer une solution étalon contenant 0,69 g de lactose (4.1) et 3,75 mg de lactulose dans 50 ml.

Le paramètre de séparation, R_s , ne doit pas être inférieur à 5:

$$R_s = \frac{h_2}{h_v}$$

ISO 11868:1997
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53daae68-e9a-48e4-9a13-792943a7c844/iso-11868-1997>

où

h_2 est la hauteur du pic du lactulose ;

h_v est la hauteur de la vallée entre les pics du lactose et du lactulose.

Il est recommandé d'attendre 60 min entre l'injection d'échantillons consécutifs.

8.3.3 L'intégrateur donne la hauteur de chaque pic, h_1 et h_2 , où h_1 est la hauteur du pic du lactose et h_2 est la hauteur du pic du lactulose.

Il convient de réinjecter l'échantillon si la dérive de la ligne de base dépasse 10 % de la pleine échelle.

Il est primordial d'examiner l'aspect du chromatogramme avant le dosage quantitatif, afin de déceler toute anomalie due soit à un mauvais fonctionnement du matériel, soit à la nature de l'échantillon analysé.

En cas de doute, recommencer l'analyse. La hauteur du pic de lactose dans l'échantillon pour essai ne devrait pas différer de plus de 10 % de celle des étalons. Si cela était le cas, préparer d'autres échantillons étalons.

Introduire toujours des échantillons étalons dans chaque série d'échantillons. Calibrer à nouveau tous les 10 ou 15 échantillons.

8.4 Rendement

Si nécessaire, tester le rendement par la méthode par addition. S'il est inférieur à 99 % dans les échantillons ayant une teneur en lactulose égale ou supérieure à 200 mg/l, refaire l'analyse.

9 Calcul et expression des résultats

9.1 Etalonnage

Après injection de chaque solution étalon et séparation par l'appareil de CLHP, l'intégrateur enregistreur enregistre la hauteur des pics suivants :

h_{2a} est la valeur numérique de la hauteur du pic du lactulose dans l'étalon A ;

h_{2b} est la valeur numérique de la hauteur du pic du lactulose dans l'étalon B ;

h_{2c} est la valeur numérique de la hauteur du pic du lactulose dans l'étalon C ;

h_{2d} est la valeur numérique de la hauteur du pic du lactulose dans l'étalon D.

Calculer la concentration c_{a-d} en lactulose dans les étalons A, B, C, et D (8.2) en milligrammes par 50 ml comme suit :

$$c_a = m_l \times 5/100$$

$$c_b = m_l \times 10/100$$

$$c_c = m_l \times 15/100$$

$$c_d = m_l \times 20/100$$

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11868:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53daac68-e9a-48e4-9a13-)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53daac68-e9a-48e4-9a13->

où m_l est la valeur numérique de la masse de lactulose dans la solution étalon (4.5.1).

L'analyse de régression linéaire par la méthode des moindres carrés pour les paires $h_{2a} - c_a$, $h_{2b} - c_b$, $h_{2c} - c_c$ et $h_{2d} - c_d$, avec c_a , c_b , c_c et c_d comme variables indépendantes, donne les coefficients de régression, a et b , de l'équation suivante :

$$h_2 = a + b \cdot c_L$$

où

h_2 est la valeur numérique de la hauteur de pic du lactulose, assignée à la variable dépendante dans la régression ;

c_L est la valeur numérique de la concentration en lactulose, en milligrammes par 50 ml, assignée à la variable dépendante dans la régression.

9.2 Calcul de la teneur en lactulose

Calculer la teneur en lactulose, w_l , exprimée en milligrammes par litre d'échantillon pour essai, en utilisant l'équation suivante :

$$w_l = \frac{(h_{2s} - a)}{b \cdot V_s} \cdot d$$

où

h_{2s} est la valeur numérique de la hauteur du pic du lactulose de l'échantillon ;

V_s est la valeur numérique du volume de l'échantillon pour essai en millilitres (8.1.1);

d est la valeur numérique du facteur de dilution pour obtenir une expression en milligrammes par litre ($d = 10^3$).

10 Fidélité

Les valeurs données pour la répétabilité et la reproductibilité résultent d'une étude interlaboratoire. Le détail de ces essais sur la fidélité figurent en annexe B et sont donnés dans la référence [4].

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 dans un court intervalle de temps, ne dépassera 6,0 % (en valeur relative) de la moyenne arithmétique des deux résultats, que dans 5 % au plus des cas.

L'écart-type relatif de répétabilité qui traduit la variabilité de résultats analytiques indépendants obtenus dans les conditions de répétabilité ne doit pas être supérieur à 2 %.

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 dépassera 20 % (en valeur relative) de la moyenne arithmétique des deux résultats, que dans 5 % au plus des cas.

L'écart-type relatif de reproductibilité qui traduit la variabilité de résultats analytiques indépendants obtenus dans les conditions de reproductibilité ne doit pas être supérieur à 7 %.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53daac68-e9a-48e4-9a13-792943a7c844/iso-11868-1997>

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer

- tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon ;
- la méthode d'échantillonnage, si elle est connue ;
- la méthode d'essai utilisée, avec la référence à la présente Norme internationale ;
- tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le(les) résultat(s) d'essai ;
- le(les) résultat(s) d'essai obtenu(s) ;
- si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.