

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
11816-1

FIL  
155-1

Deuxième édition  
2006-04-15

Version corrigée  
2006-09-01

---

---

**Lait et produits laitiers — Détermination  
de l'activité de la phosphatase alcaline —  
Partie 1:  
Méthode fluorimétrique pour le lait et les  
boissons à base de lait**

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
*Milk and milk products — Determination of alkaline phosphatase  
activity —  
(standards.iteh.ai)  
Part 1. Fluorimetric method for milk and milk-based drinks*

ISO 11816-1:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bcaaba58-0ad2-404b-966e-c0bd1918db98/iso-11816-1-2006>



Numéros de référence  
ISO 11816-1:2006(F)  
FIL 155-1:2006(F)

© ISO et FIL 2006

**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO et la FIL déclinent toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO et les comités nationaux de la FIL. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central de l'ISO à l'adresse donnée ci-dessous.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 11816-1:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bcaaba58-0ad2-404b-966e-c0bd1918db98/iso-11816-1-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bcaaba58-0ad2-404b-966e-c0bd1918db98/iso-11816-1-2006>

© ISO et FIL 2006

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 soit de l'ISO soit de la FIL à l'adresse respective ci-après.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Fédération Internationale de Laiterie  
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Bruxelles  
Tel. + 32 2 733 98 88  
Fax + 32 2 733 04 13  
E-mail [info@fil-idf.org](mailto:info@fil-idf.org)  
Web [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

Publié en Suisse

## 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</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>3</b>
<b>6</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Préparations</b> .....	<b>3</b>
<b>7.1</b> <b>Lait exempt de phosphatase alcaline</b> .....	<b>3</b>
<b>7.2</b> <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	<b>4</b>
<b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>4</b>
<b>8.1</b> <b>Vérification des performances de l'appareillage</b> .....	<b>4</b>
<b>8.2</b> <b>Étalonnage</b> .....	<b>4</b>
<b>8.3</b> <b>Détermination</b> .....	<b>5</b>
<b>8.4</b> <b>Essais de contrôle</b> .....	<b>5</b>
<b>9</b> <b>Calcul et expression des résultats</b> .....	<b>7</b>
<b>9.1</b> <b>Ratio d'étalonnage</b> .....	<b>7</b>
<b>9.2</b> <b>Calcul</b> .....	<b>7</b>
<b>9.3</b> <b>Expression des résultats des essais</b> .....	<b>8</b>
<b>10</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>8</b>
<b>10.1</b> <b>Essai interlaboratoires</b> .....	<b>8</b>
<b>10.2</b> <b>Répétabilité</b> .....	<b>8</b>
<b>10.3</b> <b>Reproductibilité</b> .....	<b>8</b>
<b>11</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>9</b>
<b>Annexe A (informative) Essai interlaboratoires</b> .....	<b>10</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>12</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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

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.

L'ISO 11816-1|FIL 155-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de laiterie (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette édition de l'ISO 11816-1|FIL 155-1 annule et remplace l'ISO 11816-1:1997, dont elle constitue une révision technique.

L'ISO 11816|FIL 155 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline*:

- *Partie 1: Méthode fluorimétrique pour le lait et les boissons à base de lait*
- *Partie 2: Méthode fluorimétrique pour le fromage*

La présente version corrigée de l'ISO 11816-1|FIL 155-1 comprend les modifications suivantes:

Page 8, Tableau 1 — Limites de répétabilité, valeurs  $r$   
et  
Tableau 2 — Limites de reproductibilité, valeurs  $R$

Les valeurs données dans ces deux tableaux étaient inexactes et ont été modifiées. Elles sont maintenant identiques aux valeurs correctes de la version anglaise du présent document.

## Avant-propos

La **FIL (Fédération internationale de laiterie)** est une fédération mondiale du secteur laitier avec un Comité National dans chacun de ses pays membres. Chaque Comité National a le droit de faire partie des Comités permanents de la FIL auxquels sont confiés les travaux techniques. La FIL collabore avec l'ISO pour l'élaboration de méthodes normalisées d'analyse et d'échantillonnage pour le lait et les produits laitiers.

Les projets de Normes internationales adoptés par les Équipes d'Action et les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux de la FIL votants.

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. La FIL ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 11816-1|FIL 155-1 a été élaborée par la Fédération internationale de laiterie (FIL) et le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Elle est publiée conjointement par la FIL et l'ISO.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO-FIL, *Caractérisation du traitement thermique* du Comité permanent *Composants mineurs et caractérisation des propriétés physiques*, sous la conduite de son chef de projet, Monsieur F. Harding (Royaume-Uni).

Cette édition de l'ISO 11816-1|FIL 155-1 annule et remplace la FIL 155A:1999, dont elle constitue une révision technique.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bcaaba58-0ad2-404b-966e-c7b19184b98/iso-11816-1-2006>

L'ISO 11816|FIL 155 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline*.

— *Partie 1: Méthode fluorimétrique pour le lait et les boissons à base de lait*

— *Partie 2: Méthode fluorimétrique pour le fromage*

La présente version corrigée de l'ISO 11816-1|FIL 155-1 comprend les modifications suivantes:

Page 8, Tableau 1 — Limites de répétabilité, valeurs  $r$   
et

Tableau 2 — Limites de reproductibilité, valeurs  $R$

Les valeurs données dans ces deux tableaux étaient inexactes et ont été modifiées. Elles sont maintenant identiques aux valeurs correctes de la version anglaise du présent document.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 11816-1:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bcaaba58-0ad2-404b-966e-c0bd1918db98/iso-11816-1-2006>

# Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline —

## Partie 1:

## Méthode fluorimétrique pour le lait et les boissons à base de lait

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11816|FIL 155 décrit une méthode fluorimétrique pour la détermination de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP, EC 3.1.3.1) dans les laits pasteurisés entiers, demi-écrémés, écrémés et aromatisés. La présente méthode est applicable aux laits de vache, de brebis et de chèvre, et aux boissons à base de lait.

La méthode convient également pour la détermination d'activités élevées de la phosphatase alcaline dans le lait cru et le lait traité thermiquement, ayant des activités de plus de 2 000 milliunités par litre (mU/l) après dilution de l'échantillon, comme spécifié.

### 2 Termes et définitions

[ISO 11816-1:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bcaaba58-0ad2-404b-966e-c0bd1918db98/iso-11816-1-2006)

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

#### 2.1

##### activité de la phosphatase alcaline

##### activité ALP

activité de la phosphatase alcaline présente dans un produit, déterminée suivant le mode opératoire spécifié dans la présente partie de l'ISO 11816|FIL 155

NOTE L'activité de la phosphatase alcaline est exprimée en milliunités d'activité enzymatique par litre (mU/l).

#### 2.2

##### unité d'activité de la phosphatase alcaline

quantité d'enzyme phosphatase alcaline qui catalyse la transformation de 1  $\mu\text{mol}$  de substrat par minute

### 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, 2'-[2-benzothiazolyl]-6'-hydroxybenzothiazole phosphate, en présence de phosphatase alcaline issue de l'échantillon, subit une hydrolyse de son radical phosphate et produit un composé hautement fluorescent. Le mesurage fluorimétrique de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) est effectué à 38 °C sur une période de 3 min. Ce mesurage comprend la préincubation du substrat et de l'échantillon, suivie de plusieurs lectures cinétiques de la vitesse de réaction.

NOTE 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 en effet réalisés 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 contraire, utiliser exclusivement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée, de l'eau déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

**4.1 Substrat Fluorophos<sup>®</sup> 1)**, en flacons, contenant chacun 144 mg de poudre de substrat Fluorophos<sup>®</sup>.

Substrat d'ester monophosphorique aromatique non fluorescent, par exemple 2'-[2-benzothiazoly]-6'-hydroxybenzothiazole phosphate (Fluorophos<sup>®</sup>). Le substrat Fluorophos<sup>®</sup>, si le flacon n'a pas été ouvert, reste stable pendant 2 ans lorsqu'il est conservé entre 2 °C et 8 °C.

**4.2 Solution tampon de substrat**

Solution tampon de diéthanolamine (DEA),  $c(\text{DEA}) = 2,4 \text{ mol/l}$ , pH 10,0, en flacons de 240 ml.

La solution tampon de substrat reste stable pendant 2 ans lorsqu'elle est conservée entre 2 °C et 8 °C, si le flacon n'a pas été ouvert.

**4.3 Substrat de travail**

Amener le substrat Fluorophos<sup>®</sup> (4.1) et la solution tampon de substrat (4.2) à température ambiante. Ajouter le contenu d'un flacon de solution tampon de substrat (240 ml) (4.2) à un flacon de substrat Fluorophos (144 mg) (4.1), puis mélanger avec soin en retournant le récipient pendant 3 min. Utiliser un verre ambré pour protéger de la lumière.

Laisser la solution ainsi obtenue reposer à température ambiante pendant au moins 30 min avant utilisation.

Utiliser l'essai analogique/numérique (A/D) donné en 8.4.1.1 pour vérifier que le substrat de travail prêt pour utilisation convient.

Le substrat de travail reste stable pendant 60 jours lorsqu'il est conservé à l'abri de la lumière entre 2 °C et 8 °C, ou pendant 8 h lorsqu'il est conservé à 38 °C. Ne pas utiliser le substrat actif en cas d'obtention d'une lecture supérieure à 1 200 (voir 8.4.1.1.5).

NOTE Le volume de substrat de travail obtenu (240 ml) suffit pour mener environ 115 essais.

**4.4 Solutions étalons de travail, Fluoroyellow<sup>®</sup> (FY) [2'-(2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazole]** dans une solution tampon DEA (4.2).

Les solutions étalons restent stables pendant 18 mois lorsqu'elles sont conservées entre 2 °C et 8 °C.

**4.4.1 Solution étalon A**, contenant 0  $\mu\text{mol/l}$  de Fluoroyellow<sup>®</sup>.

**4.4.2 Solution étalon B**, contenant  $17,24 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$  de Fluoroyellow<sup>®</sup>.

**4.4.3 Solution étalon C**, contenant  $34,48 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$  de Fluoroyellow<sup>®</sup>.

**4.5 Solution quotidienne de contrôle des instruments**, contenant  $34,48 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$  de Fluoroyellow<sup>®</sup>.

---

1) Les réactifs spécifiés de 4.1 à 4.5 et les appareils spécifiés de 5.1 à 5.4 (sauf 5.3.3) sont disponibles sous l'appellation «Fluorophos Test System» et commercialisés par la firme Advanced Instruments, Inc., Two Technology Way, Norwood, Massachusetts 02062, États-Unis. La configuration des emballages fournis avec le Fluorophos Test System peut être modifiée par le fabricant. Il convient que l'utilisateur se réfère aux instructions du fabricant pour la préparation des réactifs s'ils se révèlent différents de ceux spécifiés dans la présente norme. Fluorophos et Fluoroyellow sont des marques déposées de la firme Advanced Instruments, Inc. et sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché.

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 ou de la FIL à l'égard de ce(s) produit(s).



## 5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, notamment, l'appareillage suivant:

**5.1 Fluorimètre à filtre**, avec un support de cuvettes à contrôle thermostatique, capable de fonctionner à  $38\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  et avec une optique à angle droit, permettant une excitation à une longueur d'onde de 440 nm et une émission située entre 520 nm et 560 nm [Fluorophos<sup>1)</sup>, par exemple]. Il convient d'optimiser les mesurages conformément aux instructions du fabricant.

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

**5.3 Pipettes.**

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

**5.3.2 Pipette à déplacement positif** ou **pipette à piston**, de 0,075 ml de capacité.

**5.3.3 Pipette**, de 2 ml de capacité.

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

**5.5 Parafilm**<sup>2)</sup> ou autre film approprié de qualité pour laboratoire.

**5.6 Agitateur/mélangeur Vortex.**

**5.7 Bain d'eau**, pouvant être maintenu à une température de  $63\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  et  $95\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**5.8 Fioles jaugées à un trait**, de 100 ml de capacité.

## 6 Échantillonnage

ISO 11816-1:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bcaaba58-0ad2-404b-966e->

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

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 11816|FIL 155. Une méthode d'échantillonnage recommandée est fournie dans l'ISO 707|FIL 50.

## 7 Préparations

### 7.1 Lait exempt de phosphatase alcaline

Préparer du lait sans phosphatase du même type que l'échantillon à analyser, en versant avec soin la prise de lait voulue dans un tube à essai ou un conteneur adapté, en veillant à ce que le lait ne touche pas le bord et les côtés du conteneur.

Placer le tube ou le conteneur renfermant la prise de lait dans le bain d'eau (5.7) chauffé à 95 °C. Préchauffer la prise de lait à 95 °C avant de démarrer la période de chauffage de 5 min à cette température. Contrôler la température à l'aide d'un thermomètre ou d'une sonde à thermistance, placée au centre du tube ou du conteneur. Dès que la température de la prise de lait a atteint 95 °C, démarrer la période de chauffage de 5 min. À l'issue de cette période de chauffage, refroidir rapidement le tout.

Soumettre à essai la prise de lait ainsi traitée en vue de s'assurer que son activité ALP est inférieure à 10 mU/l.

---

2) Le parafilm est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente norme et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ce produit.

## 7.2 Préparation de l'échantillon pour essai

### 7.2.1 Généralités

Mélanger soigneusement l'ensemble des échantillons pour essai avant utilisation.

NOTE Il est généralement inutile de préchauffer les échantillons pour essai.

### 7.2.2 Échantillons pasteurisés

Utiliser les échantillons pasteurisés tels que livrés, dans les quantités requises.

### 7.2.3 Dilution d'échantillons avec des valeurs ALP élevées

Préparer des dilutions de lait en utilisant du lait exempt de phosphatase (7.1), de manière que leurs niveaux d'ALP se situent dans la plage analytique d'essai (< 2 000 mU/l). Mélanger soigneusement les solutions diluées.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Vérification des performances de l'appareillage

Il est important de vérifier les performances de l'appareillage en matière d'écarts, de lumières parasites et de stabilité avant de procéder à l'analyse des échantillons pour essai. Veillez à utiliser le fluorimètre à filtre (5.1) conformément aux normes sur les bonnes pratiques de laboratoire.

Les essais réalisés dans le cadre du contrôle de la qualité comprennent

- a) l'essai quotidien A/D (analogique/numérique) employé pour vérifier le bon fonctionnement de l'équipement, en mesurant la précision du canal de conversion A/D et en contrôlant les écarts de durée ou de température du canal A/D;
- b) le contrôle quotidien de l'appareillage à l'aide de la solution quotidienne de contrôle des instruments (4.5), utilisée pour identifier tout écart électronique ou optique du fluorimètre.

L'utilisation de contrôles externes positifs, négatifs et normaux, décrits en 8.4, est vivement recommandée dans le cadre de la surveillance quotidienne des paramètres de fidélité de l'appareillage.

### 8.2 Étalonnage

Les courbes d'étalonnage sont généralement stables. Toutefois, réétalonner l'appareillage, qui a été étalonné lors de l'installation du fluorimètre, chaque fois que des opérations de réglage sont susceptibles d'influer sur l'étalonnage stocké, lorsque les valeurs de contrôle donnent des résultats inacceptables ou tous les 3 mois.

Lorsque des changements se sont produits au niveau de la courbe d'étalonnage, réétalonner l'appareillage à l'aide d'un nouveau lot de solutions étalons A, B et C (4.4.1, 4.4.2 et 4.4.3). Établir une courbe d'étalonnage pour chaque type de produit à soumettre à essai.

Mélanger les solutions étalons A, B et C en retournant doucement le récipient avant utilisation. À l'aide de la pipette (5.3.3), transférer 2,0 ml des solutions étalons A, B et C (respectivement 4.4.1, 4.4.2 et 4.4.3), et cela en double, dans six cuvettes étiquetées (5.2). Placer les cuvettes dans le bloc d'incubation (5.4) et préchauffer à 38 °C pendant 10 min.

À l'aide de la pipette à déplacement positif ou de la pipette à piston (5.3.2), ajouter dans chacune des six cuvettes 0,075 ml de lait sans phosphatase alcaline (7.1). Couvrir les cuvettes avec le parafilm (5.5). Utiliser l'agitateur/mélangeur Vortex (5.6) pendant 5 s ou retourner doucement les cuvettes pour mélanger le contenu,

puis replacer ces dernières dans le bloc d'incubation (5.4). L'étalonnage doit être complété dans les 10 min suivant l'ajout de l'échantillon pour essai à l'étalon.

En commençant par la solution étalon A, appliquer la procédure d'étalonnage suivante. Essuyer l'extérieur de chaque cuvette avec un chiffon doux, puis la placer dans le fluorimètre à filtre (5.1). Avec le Fluorophos<sup>®</sup>, appuyer sur «CALIB», puis sélectionner le menu «ALP Dairy». Dérouler le menu, puis appuyer sur «ENTER» lorsque le produit à étalonner apparaît. En commençant par la solution étalon A (4.4.1), insérer la solution A dans le fluorimètre, puis appuyer sur «START». Une fois la mesure terminée, mesurer la seconde solution étalon A.

Suivre le même mode opératoire pour les solutions étalons B (4.4.2) et C (4.4.3). Le Fluorophos<sup>®</sup> calcule automatiquement la quantité de fluorescence obtenue avec les solutions étalons B et C par rapport à la solution étalon A, afin de définir le rapport d'étalonnage au sein de l'appareillage.

Une fois l'étalonnage terminé, procéder à l'analyse des échantillons pour essai.

### 8.3 Détermination

À l'aide de la pipette à écoulement à volume fixe (5.3.1), transférer 2,0 ml de substrat actif (4.3) dans une cuvette étiquetée. Placer la cuvette dans le bloc d'incubation (5.4) et préchauffer à 38 °C pendant 15 min.

À l'aide de la pipette (5.3.2), ajouter au substrat 0,075 ml de la prise d'essai soigneusement mélangée (7.2.2 ou 7.2.3). Couvrir la cuvette avec le parafilm (5.5). Mélanger immédiatement le contenu en utilisant le l'agitateur/mélangeur Vortex (5.6) pendant 5 s ou en retournant doucement la cuvette. Essuyer l'extérieur de la cuvette avec un chiffon doux, puis la placer dans le fluorimètre à filtre (5.1).

Appuyer sur la touche «TEST». Lorsque l'indication «ALP Dairy» apparaît, appuyer sur «ENTER». Dérouler le menu, puis appuyer sur «ENTER» lorsque le produit à analyser apparaît. Appuyer sur «START» pour lancer l'essai. L'affichage décompte 60 s pendant que le substrat et l'échantillon sont chauffés à une température de 38 °C. Une fois les 60 s (1 min.) écoulées, le fluorimètre commence à procéder au mesurage et une fluorescence de l'échantillon s'affiche, exprimée en unités de fluorescence (FLU). L'affichage commence à environ 200 FLU, puis augmente progressivement au cours des deux minutes qui suivent. Une fois les trois minutes écoulées, le Fluorophos<sup>®</sup> procède automatiquement aux calculs nécessaires et affiche le numéro d'identification de l'échantillon, l'activité de la phosphatase alcaline en milliunités par litre et l'augmentation moyenne en fluorescence, si cette option a été précédemment sélectionnée. Ces informations sont ensuite imprimées.

Diviser la différence entre les deux valeurs de fluorescence par la durée de l'intervalle (enregistrée en minutes) afin d'obtenir l'augmentation moyenne de fluorescence produite par minute (F/min). Utiliser cette valeur pour calculer l'activité de la phosphatase alcaline de l'échantillon pour essai.

Si l'appareillage affiche et imprime le message «Error: Unstable Reading, Repeat Test» alors que les résultats sont très élevés, diluer l'échantillon pour essai avec du lait exempt de phosphatase traité thermiquement (7.1), puis procéder à une autre détermination.

Dans le cas de résultats très bas (normalement inférieurs à 6 FLU/min), cas associés plus fréquemment à des lectures instables, laisser la cuvette échantillon dans la chambre du Fluorophos<sup>®</sup>, puis procéder à une autre détermination. En général, on obtient alors un résultat valable. Toutefois, si une erreur de lecture instable est de nouveau obtenue, répéter l'intégralité de la détermination avec un nouvel échantillon pour essai.

### 8.4 Essais de contrôle

#### 8.4.1 Contrôle du système et des réactifs

##### 8.4.1.1 Essai A/D (analogique/numérique)

8.4.1.1.1 Si l'on utilise le Fluorophos<sup>®</sup>, effectuer l'essai A/D quotidiennement avant de commencer l'essai proprement dit.