

---

---

**Fromage, croûte de fromage et fromages  
fondus — Détermination de la teneur  
en natamycine —**

Partie 2:

**Méthode par chromatographie liquide  
à haute performance pour fromage,  
croûte de fromage et fromages fondus**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Cheese, cheese rind and processed cheese — Determination of  
natamycin content —*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9233-2/2007>  
*Part 2: High-performance liquid chromatography method for cheese,  
cheese rind and processed cheese*



**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 9233-2:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a78c1f4-4d4c-453b-bc7b-1c7a2704498a/iso-9233-2-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a78c1f4-4d4c-453b-bc7b-1c7a2704498a/iso-9233-2-2007>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO et FIL 2007

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'une ou l'autre des adresses 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
Avant-propos.....	v
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Termes et définitions</b> .....	1
3 <b>Principe</b> .....	1
4 <b>Réactifs et substances de référence</b> .....	2
5 <b>Appareillage</b> .....	2
6 <b>Échantillonnage</b> .....	3
7 <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	3
7.1 <b>Croûte de fromage</b> .....	3
7.2 <b>Intérieur du fromage et fromage fondu</b> .....	4
8 <b>Mode opératoire</b> .....	4
8.1 <b>Prise d'essai</b> .....	4
8.2 <b>Préparation de la solution d'essai</b> .....	4
8.3 <b>Détermination</b> .....	5
9 <b>Calcul et expression des résultats</b> .....	7
9.1 <b>Calcul de la fraction massique de la natamycine</b> .....	7
9.2 <b>Calcul de la masse, exprimée par rapport à la surface, de natamycine</b> .....	7
9.3 <b>Correction des résultats</b> .....	7
9.4 <b>Expression des résultats</b> .....	8
10 <b>Fidélité</b> .....	8
10.1 <b>Essais interlaboratoires</b> .....	8
10.2 <b>Répétabilité</b> .....	8
10.3 <b>Reproductibilité</b> .....	8
11 <b>Rapport d'essai</b> .....	8
<b>Annexe A (informative) Exemples</b> .....	9
<b>Annexe B (informative) Résultats des essais interlaboratoires</b> .....	11
<b>Bibliographie</b> .....	12

## 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 9233-2|FIL 140-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de laiterie (FIL) et est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

[ISO 9233-2:2007](#)

Cette première édition de l'ISO 9233-2|FIL 140-2, ainsi que l'ISO 9233-1|FIL 140-1, annulent et remplacent la première édition de l'ISO 9233:1991, qui a fait l'objet d'une révision technique.

L'ISO 9233|FIL 140 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Fromage, croûte de fromage et fromages fondus — Détermination de la teneur en natamycine*:

- *Partie 1: Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire pour croûte de fromage*
- *Partie 2: Méthode par chromatographie liquide à haute performance pour fromage, croûte de fromage et fromages fondus*

## 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 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 9233-2|FIL 140-2 a été élaborée par la Fédération internationale de laiterie (FIL) et le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et est publiée conjointement par la FIL et l'ISO.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO-FIL, *Additifs et vitamines sélectionnés*, du Comité permanent chargé des *Méthodes analytiques pour additifs et contaminants*, sous la conduite de son chef de projet, Monsieur M. Carl (DE).

Cette première édition de l'ISO 9233-2|FIL 140-2, ainsi que l'ISO 9233-1|FIL 140-1, annulent et remplacent la première édition de la FIL 140A:1992, qui a fait l'objet d'une révision technique.

L'ISO 9233|FIL 140 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Fromage, croûte de fromage et fromages fondus — Détermination de la teneur en natamycine*:

- *Partie 1: Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire pour croûte de fromage*
- *Partie 2: Méthode par chromatographie liquide à haute performance pour fromage, croûte de fromage et fromages fondus*

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

ISO 9233-2:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a78c1f-4d4c-453b-bc7b-1c7a2704498a/iso-9233-2-2007>

# Fromage, croûte de fromage et fromages fondus — Détermination de la teneur en natamycine —

Partie 2:

## Méthode par chromatographie liquide à haute performance pour fromage, croûte de fromage et fromages fondus

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 9233|FIL 140 spécifie une méthode de détermination de la teneur en natamycine présente dans le fromage, la croûte de fromage et les fromages fondus supérieure à 0,5 mg/kg et de la masse, exprimée par rapport à la surface, de natamycine de la croûte de fromage supérieure à 0,03 mg/dm<sup>2</sup>.

### 2 Termes et définitions

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

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

#### 2.1

##### teneur en natamycine

fraction massique de substances déterminée par le mode opératoire spécifié dans la présente partie de l'ISO 9233|FIL 140

[ISO 9233-2:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a78cflf-4d4c-453b-bc7b-1c7a2704498a/iso-9233-2-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a78cflf-4d4c-453b-bc7b-1c7a2704498a/iso-9233-2-2007>

NOTE La teneur en natamycine est exprimée en milligrammes par kilogramme.

#### 2.2

##### masse, exprimée par rapport à la surface, de natamycine de la croûte de fromage

masse, exprimée par rapport à la surface, de substances déterminée par le mode opératoire spécifié dans la présente partie de l'ISO 9233|FIL 140

NOTE La masse, exprimé par rapport à la surface, de natamycine est exprimée en milligrammes de natamycine par décimètre carré de croûte de fromage.

#### 2.3

##### croûte de fromage

couche extérieure du fromage, d'une épaisseur de 5 mm, à l'exclusion de l'enrobage, si ce dernier est présent

### 3 Principe

Une quantité connue d'échantillon est extraite à l'aide de méthanol. L'extrait est dilué avec de l'eau, suivie d'un refroidissement entre -15 °C et -20 °C pour précipiter la majeure partie de la matière grasse, puis filtration. La teneur en natamycine ou la masse, exprimée par rapport à la surface, de natamycine est déterminée dans le filtrat (après concentration, si nécessaire) par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

## 4 Réactifs et substances de référence

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

**4.1 Méthanol** (CH<sub>3</sub>OH).

**4.2 Méthanol**, solution aqueuse.

Mélanger 2 volumes de méthanol (4.1) avec 1 volume d'eau.

**4.3 Solutions étalons de natamycine.**

**4.3.1 Solution étalon mère de natamycine**, ayant une concentration de 500 mg/l.

Immédiatement avant l'emploi, dissoudre dans une fiole jaugée à un trait de capacité 100 ml (5.1) une quantité d'une préparation à teneur connue en natamycine, correspondant à 50 mg de natamycine pure (C<sub>33</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>13</sub>) dans du méthanol (4.1). Compléter au trait repère avec de l'eau et mélanger.

**4.3.2 Solution étalon de travail de natamycine**, ayant une concentration de 5 mg/l.

Introduire au moyen d'une pipette dans une fiole jaugée à un trait de capacité 50 ml (5.1) 5,0 ml de la solution étalon mère de natamycine (4.3.1). Diluer au trait avec la solution aqueuse de méthanol (4.2), puis mélanger.

Introduire au moyen d'une pipette dans une autre fiole jaugée à un trait de capacité 50 ml (5.1) 5,0 ml de la solution ainsi diluée. Diluer au trait avec la solution aqueuse de méthanol (4.2), puis mélanger. 1 ml de cette solution étalon de travail contient 5 µg de natamycine.

Il est nécessaire que la concentration de la solution étalon de travail de natamycine soit proche de celle de la solution d'essai mesurée en 8.3.3. Ajuster la dilution étalon de travail en pipettant et diluant une autre quantité, si nécessaire.

**4.4 Acide acétique** (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H), glacial.

## 5 Appareillage

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

**5.1 Fioles jaugées à un trait**, d'une capacité de 50 ml et 100 ml.

**5.2 Appareil à trancher** ou **appareil similaire**, capable de découper des portions de fromage de 5 mm d'épaisseur et d'environ 30 mm de large (voir l'exemple donné à la Figure A.1).

**5.3 Appareil à trancher fin**, capable de découper de fines tranches de fromage d'une épaisseur maximale de 1 mm (voir l'exemple donné à la Figure A.2).

**5.4 Broyeur** ou **mélangeur**.

**5.5 Couteau aiguisé**, capable de découper des tranches de fromage en petits morceaux.

**5.6 Agitateur magnétique** ou **appareil à secouer**.

**5.7 Fioles coniques**, d'une capacité de 100 ml et 200 ml, en verre teinté et munies de bouchons en verre rodé.

**5.8 Seringues**, jetables, de capacité 10 ml.



- 5.9 Microfiltres à membrane**, de 0,20 µm et 0,45 µm de grosseur de pore, résistants à l'attaque par des solutions alcooliques.
- 5.10 Papiers-filtres plissés**, à filtration rapide, de 150 mm de diamètre [par exemple S et S, No. 595 1/2 <sup>1)</sup>].
- 5.11 Entonnoir**, d'environ 70 mm de diamètre.
- 5.12 Congélateur**, capable de maintenir une température comprise entre -15 °C et -20 °C.
- 5.13 Cartouches d'extraction**, pour concentrer l'extrait filtré, si nécessaire [par exemple Sep-pack C18<sup>1)</sup> ou Waters No. 51910<sup>1)</sup>].
- 5.14 Chromatographe liquide**, équipé d'un détecteur UV, capable d'effectuer des mesures à 303 nm et muni d'un enregistreur et/ou d'un intégrateur.
- 5.15 Colonne analytique**, de 150 mm de long et 4,6 mm de diamètre intérieur, type C8, dimension des particules 5 µm [par exemple Lichrosorb RP8 <sup>1)</sup>].
- 5.16 Colonne de garde**, de 100 mm de long et 2,1 mm de diamètre intérieur, type C8, dimension des particules 30 µm à 40 µm [par exemple Perisorb RP8 <sup>1)</sup>].
- 5.17 Récipient**, d'une capacité appropriée.

## 6 Échantillonnage

ITeH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

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

ISO 9233-2:2007

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 9233|FIL 140. Une méthode d'échantillonnage recommandée est indiquée dans l'ISO 707|FIL 50.

L'échantillon de laboratoire doit être constitué d'un fromage entier, ou d'une portion de fromage représentative de l'ensemble.

## 7 Préparation de l'échantillon pour essai

### 7.1 Croûte de fromage

Si nécessaire, couper l'échantillon pour essai en sections ou en portions de plus faible dimension de telle sorte que la largeur du morceau de croûte n'excède pas 30 mm environ. Retirer la totalité de la croûte sur une épaisseur de 5 mm de toutes les sections ou portions ainsi obtenues, en utilisant l'appareil à trancher (5.2).

À partir de la croûte obtenue, découper un morceau rectangulaire d'une superficie comprise entre 2 dm<sup>2</sup> et 4 dm<sup>2</sup> à l'aide d'un couteau aiguisé (5.5). Déterminer sa surface, en décimètres carrés, et sa masse, en kilogrammes.

Broyer (5.4) soigneusement toute la croûte, y compris le morceau pesé et mesuré, et bien mélanger. Transférer immédiatement dans un récipient (5.17) une quantité de l'échantillon ainsi préparé.

---

1) Ceci est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 9233|FIL 140 et ne signifie nullement que l'ISO et la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

Après préparation de chaque échantillon pour essai, nettoyer tous les instruments ayant été en contact avec le fromage ou la croûte, tout d'abord à l'eau chaude, puis au méthanol (4.1). Les sécher soigneusement, par exemple au moyen d'un jet d'air comprimé.

## 7.2 Intérieur du fromage et fromage fondu

Après avoir retiré la croûte (7.1), découper une tranche d'une épaisseur maximale de 1 mm, prise sur toute la surface extérieure de l'échantillon pour essai, en utilisant pour ce faire l'appareil à trancher fin (5.3).

Débiter toutes les tranches de fromage en petits morceaux d'environ 50 mm<sup>2</sup> et mélanger soigneusement. Transférer immédiatement dans un récipient (5.17) une quantité de l'échantillon ainsi préparé.

Après préparation de chaque échantillon pour essai, nettoyer tous les instruments ayant été en contact avec l'échantillon pour essai, tout d'abord à l'eau chaude, puis au méthanol (4.1). Les sécher soigneusement, par exemple au moyen d'un jet d'air comprimé.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Prise d'essai

#### 8.1.1 Croûte de fromage

Peser, à 10 mg près, environ 10 g de l'échantillon pour essai (7.1) et les transférer dans une fiole conique de capacité 200 ml (5.7).

#### 8.1.2 Intérieur du fromage et fromage fondu

Peser, à 10 mg près, environ 5 g de l'échantillon pour essai (7.2) et les transférer dans une fiole conique de capacité 100 ml (5.7).

### 8.2 Préparation de la solution d'essai

#### 8.2.1 Croûte de fromage

##### 8.2.1.1 Préparation

Ajouter 100 ml de méthanol (4.1) à la prise d'essai dans la fiole conique (8.1.1). Mélanger le contenu de la fiole pendant 90 min au moyen d'un agitateur magnétique (5.6) ou secouer pendant 90 min dans l'appareil à secouer (5.6)

Ajouter 50 ml d'eau. Placer immédiatement la fiole conique au congélateur (5.12) pendant environ 60 min.

##### 8.2.1.2 Filtration

Filtrer l'extrait froid au travers d'un papier-filtre plissé (5.10), en éliminant les premiers 5 ml de filtrat. Il convient d'effectuer la filtration pendant que la suspension est encore froide afin d'éviter la dissolution de la matière grasse et par là même l'obtention de filtrats troubles.

Amener le filtrat à température ambiante. Prélever une quantité du filtrat dans une seringue (5.8). Filtrer au travers d'un premier microfiltre de grosseur de pore 0,45 µm (5.9), puis au travers d'un second microfiltre de grosseur de pore 0,20 µm (5.9).

La quantité minimale de solution d'essai (filtrat) requise est de 20 µl par injection pour une mesure chromatographique directe (8.3.4) et de 25 ml et 50 ml respectivement pour des concentrations de 5 fois et de 10 fois dans le cas de faibles teneurs en natamycine (8.3.5).

## 8.2.2 Intérieur du fromage et fromage fondu

### 8.2.2.1 Préparation

Ajouter, en utilisant une éprouvette graduée, 50 ml de méthanol (4.1) à la prise d'essai dans la fiole conique (8.1.2). Mélanger le contenu de la fiole pendant 90 min au moyen d'un agitateur magnétique (5.6) ou secouer pendant 90 min dans l'appareil à secouer (5.6).

Ajouter, en utilisant une éprouvette graduée, 25 ml d'eau. Placer immédiatement la fiole conique au congélateur (5.12) pendant environ 60 min.

### 8.2.2.2 Filtration

Filtrer la solution de la manière décrite en 8.2.1.2.

## 8.3 Détermination

### 8.3.1 Limites de détection et de détermination

Le laboratoire mettant en œuvre la méthode doit établir les limites de détection et de détermination selon ses propres conditions instrumentales en utilisant des méthodes de calcul reconnues pour vérifier que la teneur en natamycine peut être déterminée à des limites inférieures de 0,5 mg/kg et 0,03 mg/dm<sup>2</sup>.

### 8.3.2 Réglage de la chromatographie liquide (5.14)

ISO 9233-2:2007  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a78c1f-f4d4c-453b-bc7b-1e7a3704498a/iso-9233-2-2007>

Les conditions de chromatographie suivantes sont recommandées:

Phase mobile:	Méthanol (4.1):eau:acide acétique (4.4), avec un rapport 12:8:1 (fraction volumique)
Débit:	1 ml/min
Détecteur:	303 nm, 0,005 unités d'absorbance, pleine échelle
Enregistreur:	10 mV
Nombre de plateaux théoriques (types):	1 500 minimum

Lorsqu'une colonne autre que celle donnée en exemple (5.15) est utilisée, ajuster le rapport méthanol:eau. Toutefois, la quantité relative d'acide acétique (4.4) spécifiée par rapport au méthanol est essentielle pour maintenir l'absorbance 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 (8.3.3).

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