
**Lait — Détermination de la teneur en
lactose — Méthode enzymatique par pH-
métrie différentielle**

*Milk — Determination of lactose content — Enzymatic method using
difference in pH*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 26462:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010>



Numéros de référence
ISO 26462:2010(F)
FIL 214:2010(F)

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 26462:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2010

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
Web 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
Web www.fil-idf.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Avant-propos	v
1 Domaine d'application	1
2 Termes et définitions	1
3 Principe	1
4 Réactifs	1
5 Appareillage	3
6 Échantillonnage	3
7 Préparation de l'échantillon pour essai	3
8 Mode opératoire	4
8.1 Généralités	4
8.2 Dosage du blanc	4
8.3 Étalonnage	5
8.4 Contrôle de l'étaonnage	5
8.5 Détermination	5
8.6 Contrôle de la stabilité	6
8.7 Nettoyage	6
9 Entretien des électrodes	6
9.1 Régénération	6
9.2 Régénération forte	6
10 Calcul et expression des résultats	7
10.1 Calcul	7
10.2 Expression des résultats	7
11 Fidélité	7
11.1 Essai interlaboratoires	7
11.2 Répétabilité	7
11.3 Reproductibilité	8
12 Rapport d'essai	8
Annexe A (informative) Schéma de l'appareillage de pH-métrie différentielle	9
Annexe B (informative) Essai interlaboratoires	10
Annexe C (informative) Comparaison des méthodes par CLHP et pH-métrie différentielle	11
Bibliographie	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 26462|FIL 214 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et par la Fédération internationale de laiterie (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010>

Avant-propos

La **FIL (Fédération Internationale de Laiterie)** est une organisation sans but lucratif représentant le secteur laitier mondial. Les membres de la FIL se composent des Comités Nationaux dans chaque pays membre et des associations laitières régionales avec lesquelles la FIL a signé des accords de coopération. Tout membre de la FIL 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.

La tâche principale des Comités permanents est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour approbation avant publication en tant que Norme internationale. La publication comme Norme internationale 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 26462|FIL 214 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*. Elle est publiée conjointement par la FIL et l'ISO.

iTeh STANDARD PREVIEW

L'ensemble des travaux a été confié au groupe de projet mixte ISO-FIL sur la *Détermination enzymatique du lactose* du Comité Permanent chargé des *Méthodes d'analyse de la composition* sous la conduite de son chef de projet, Mr. P. Trossat (FR).

[ISO 26462:2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 26462:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0c8aef6-09c5-4622-96ee-037d6fc243da/iso-26462-2010>

Lait — Détermination de la teneur en lactose — Méthode enzymatique par pH-métrie différentielle

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode enzymatique de détermination de la teneur en lactose du lait et du lait reconstitué, par mesurage de la différence de pH (pH-métrie différentielle).

2 Termes et définitions

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

2.1

teneur en lactose du lait

concentration en quantité de substance déterminée selon le mode opératoire spécifié dans la présente Norme internationale

NOTE La teneur en lactose du lait est exprimée en millimoles par litre. Pour la conversion du résultat en d'autres unités, voir le Tableau 1.

2.2

unité d'activité enzymatique

unité internationale

unité standard

U

quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute dans des conditions normales

3 Principe

Le lactose est coupé en glucose et en galactose par ajout de β -galactosidase. À pH 7,8, le glucose est phosphorylé par la glucokinase, produisant ainsi des protons qui entraînent une variation du pH. Le pH varie en fonction de la teneur en lactose de l'échantillon et la variation est mesurée à l'aide d'un analyseur à pH-métrie différentielle.

4 Réactifs

Au cours de l'analyse, sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

4.1 Solution tampon, pH 7,8

Dissoudre 0,242 g de tris(hydroxyméthyl)méthylamine (Tris), 0,787 g d'adénosine triphosphate sous forme de sel disodique (ATP), 0,304 g de phosphate trisodique ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 0,009 g d'hydroxyde de sodium (NaOH), 0,203 g de chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 2 g d'octylphénoxyéthanol

[par exemple Triton X100¹], 0,820 g de chlorure de potassium (KCl) et 0,010 g de 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol [par exemple Bronopol¹] dans un bécher de 100 ml contenant 50 ml d'eau sous agitation continue. Ajuster le pH final à $7,8 \pm 0,1$, si nécessaire. Transférer dans une fiole jaugée à un trait (5.4) de 100 ml, compléter au trait avec de l'eau et mélanger.

La solution tampon peut être conservée pendant 2 mois si elle est stockée à 4 °C.

4.2 Solutions d'enzymes

4.2.1 Solution de glucokinase

Dissoudre 2,57 mg de glucokinase-1 lyophilisée (GK1; 1 mg = 350 U; EC 2.7.1.2) dans 3 ml de glycérol avec une fraction volumique de 50 %. L'activité de la solution de glucokinase obtenue doit être de 290 U/ml \pm 30 U/ml (voir 2.2).

La solution de glucokinase peut être conservée pendant 6 mois si elle est stockée à 4 °C.

4.2.2 Solution de β -galactosidase

Diluer un extrait concentré de β -galactosidase (EC 3.2.1.23), purifié des enzymes contaminants avec du glycérol, avec une fraction volumique de 50 %. L'activité de la solution de β -galactosidase obtenue doit être de 1 500 U/ml \pm 200 U/ml.

La solution de β -galactosidase peut être conservée pendant 6 mois si elle est stockée à 4 °C.

4.3 Solution étalon de lactose (150 mmol/l)

Avant de l'utiliser, déterminer la teneur en eau de la poudre de lactose monohydraté par la méthode de titrage Karl Fischer afin de corriger la quantité de lactose monohydraté utilisée pour la solution étalon de lactose. Il convient d'apporter la correction en fonction du pourcentage de la teneur en eau déterminée, afin de préparer une solution étalon de lactose contenant 5,404 g de lactose monohydraté par 100 ml.

Dissoudre 5,404 g de lactose monohydraté en poudre, 0,745 g de chlorure de potassium (KCl) et 0,01 g de 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol [par exemple Bronopol¹] dans la solution tampon de pH 7,8 (4.1) contenue dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (5.4). Compléter au trait avec de l'eau et mélanger.

La solution étalon de lactose peut être conservée pendant 6 mois si elle est stockée à 4 °C.

4.4 Solution de nettoyage

Dissoudre 1,742 g de monohydrogénophosphate dipotassique (K_2HPO_4), 1,361 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), 7,455 g de chlorure de potassium (KCl), 1,00 g d'azide de sodium (NaN_3), 2 g d'octylphénoxy polyéthoxyéthanol, 2 g de polyoxyéthylène glycol dodécyléther [par exemple Brij 35¹] et 3 g de lauryl maltoside [par exemple LM¹] dans une fiole jaugée à un trait de 1 000 ml (5.4). Compléter au trait avec de l'eau et mélanger.

La solution de nettoyage peut être conservée pendant une année si elle est stockée à température ambiante.

4.5 Solution de régénération

Utiliser une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,1 mol/l comme solution de régénération.

La solution de régénération peut être conservée pendant une année si elle est stockée à température ambiante.

1) Exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

4.6 Solution de régénération forte

DANGER — L'utilisation du fluorure de sodium (NaF) seul et en combinaison avec de l'acide chlorhydrique peut entraîner des problèmes de santé par inhalation et/ou par absorption par la peau. La présente Norme internationale n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente Norme internationale d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

Dissoudre 30 g d'acide nitrique (HNO₃) avec une fraction massique, $w(\text{HNO}_3) \approx 69\%$, 30 g d'acide chlorhydrique (HCl) avec une fraction massique, $w(\text{HCl}) \approx 37\%$, 30 g de fluorure de sodium (NaF), et 1 g d'octylphénoxyéthoxyéthanol dans une fiole jaugée à un trait de 1 000 ml (5.6). Compléter au trait avec de l'eau et mélanger.

La solution de régénération forte peut être conservée pendant une année si elle est stockée dans un récipient constitué d'un matériau résistant à la corrosion à température ambiante.

5 Appareillage

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

5.1 Balance analytique, permettant de peser à 1 mg près.

5.2 Micropipettes, d'une capacité de 20 µl, ISO 7550^[5], à déplacement positif.

5.3 Bain-marie, pouvant être maintenu à une température de 38 °C ± 1 °C.

5.4 Fioles jaugées à un trait, d'une capacité de 100 ml et de 1 000 ml, ISO 1042^[2], classe A.

5.5 Appareillage de pH-métrie différentielle, représenté schématiquement à la Figure A.1.

L'appareillage de pH-métrie différentielle se compose de pompes péristaltiques pour la circulation des liquides, d'une chambre de mélange, de deux électrodes capillaires à circulation en verre (E1 et E2), et d'un système électronique de mesure.

5.6 Fioles jaugées à un trait, d'une capacité de 1 000 ml et constituées d'un matériau permettant de stocker la solution de régénération forte (4.6) qui est extrêmement corrosive.

6 Échantillonnage

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 | FIL 50^[1].

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

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Chauffer l'échantillon à 38 °C au bain-marie (5.3) tout en agitant. Laisser refroidir l'échantillon à 20 °C avant de préparer la prise d'essai.

8 Mode opératoire

8.1 Généralités

Du fait qu'il existe divers modèles d'appareillage de pH-métrie différentielle (5.5) et que ceux-ci s'utilisent de manière différente, l'opérateur doit suivre scrupuleusement les instructions du fabricant pour régler, étalonner et faire fonctionner l'appareillage. Mettre l'appareillage en marche et le laisser se stabiliser.

Si deux mesurages consécutifs sont effectués à 5 min d'intervalle ou plus, renouveler la solution tampon (4.1) dans la chambre de mélange de l'appareillage.

8.2 Dosage du blanc

À l'aide d'une micropipette (5.2), ajouter 20 µl de la solution de glucokinase (4.2.1) dans la chambre de mélange de l'appareillage de pH-métrie différentielle (5.5).

Diluer cette solution avec la solution tampon (4.1) jusqu'à un volume total de 1 200 µl et mélanger.

Remplir les électrodes à circulation E1 et E2 (voir Figure A.1) de l'appareillage de pH-métrie différentielle (5.5) avec le mélange tampon et glucokinase obtenu. Mesurer la différence de pH, D_1 , entre les deux électrodes. La différence entre les électrodes doit être comprise dans la plage 0 mpH \pm 150 mpH, où mpH est une milliunité de pH.

À l'aide d'une autre micropipette, ajouter 20 µl de la solution de β -galactosidase (4.2.2) au mélange tampon et glucokinase obtenu dans la chambre de mélange, puis mélanger. Remplir uniquement l'électrode E2 avec le mélange tampon, glucokinase et β -galactosidase. De nouveau, mesurer la différence de pH, D_2 , entre les deux électrodes.

Calculer la valeur numérique de la différence de pH pour le blanc, ΔD_0 , à l'aide de l'Équation (1):

$$\Delta D_0 = D_2 - D_1 \tag{1}$$

où

D_1 est la valeur numérique de la différence de pH entre les électrodes toutes deux remplies avec le mélange tampon et glucokinase;

D_2 est la valeur numérique de la différence de pH entre l'électrode E1 remplie avec le mélange tampon et glucokinase et l'électrode E2 remplie avec le mélange tampon, glucokinase et β -galactosidase.

La différence, ΔD_0 , doit être comprise dans la plage allant de -20 unités mpH à 4 unités mpH, alors que la différence entre deux mesurages consécutifs doit être \leq 1,0 unité mpH.

Si ces résultats ne sont pas obtenus, contrôler la solution tampon et répéter le mode opératoire ci-dessus. Si les résultats ne satisfont toujours pas à l'exigence (ou aux exigences), nettoyer les électrodes (voir 8.7) et recommencer la détermination du blanc spécifiée dans les quatre premiers alinéas du présent paragraphe.

8.3 Étalonnage

8.3.1 Différence de pH pour la solution d'étalonnage

Ajouter, à l'aide d'une micropipette (5.2), 20 µl de la solution étalon de lactose (4.3) et, avec une autre micropipette, 20 µl de la solution de glucokinase (4.2.1) dans la chambre de mélange de l'appareillage de pH-métrie différentielle (5.5). Diluer avec la solution tampon (4.1) jusqu'à un volume total de 1 200 µl. Remplir les deux électrodes E1 et E2 avec le mélange tampon, étalon de lactose et glucokinase obtenu. Mesurer la différence de pH, D_3 , entre les deux électrodes.

À l'aide d'une micropipette, ajouter 20 µl de la solution de β-galactosidase (4.2.2) au mélange tampon, étalon de lactose et glucokinase obtenu dans la chambre de mélange, puis mélanger. Remplir l'électrode E2 avec le mélange tampon, étalon de lactose, glucokinase et β-galactosidase. À la fin de la réaction enzymatique, mesurer la différence de pH, D_4 , entre les deux électrodes.

Calculer la différence de pH pour la solution d'étalonnage, ΔD_c , à l'aide de l'Équation (2):

$$\Delta D_c = (D_4 - D_3) - \Delta D_0 \quad (2)$$

où

D_3 est la valeur numérique de la différence de pH entre les deux électrodes lorsqu'elles sont toutes deux remplies avec le mélange tampon, étalon de lactose et glucokinase (8.3.1);

D_4 est la valeur numérique de la différence de pH entre les électrodes lorsque l'une est remplie avec le mélange tampon, étalon de lactose et glucokinase, et l'autre avec le mélange tampon, étalon de lactose, glucokinase et β-galactosidase (8.3.1).

8.3.2 Pente de la courbe d'étalonnage

Calculer la pente, s_c , exprimée en millimoles par litre/unité mpH, de la courbe d'étalonnage à l'aide de l'Équation (3):

$$s_c = \frac{c_L}{\Delta D_c} \quad (3)$$

où c_L est la concentration, en millimoles par litre, de la solution étalon de lactose (4.3).

8.4 Contrôle de l'étalonnage

Contrôler l'étalonnage en analysant 20 µl de la solution étalon de lactose (4.3) conformément au mode opératoire indiqué en 8.5. Les résultats obtenus doivent être compris entre 148,5 mmol/l et 151,5 mmol/l pour la détermination de la teneur en lactose. Si ces valeurs ne sont pas respectées, répéter l'étalonnage.

8.5 Détermination

Faire fonctionner l'appareillage et y introduire la prise d'essai conformément aux instructions du fabricant.

À l'aide d'une micropipette (5.2), ajouter 20 µl de l'échantillon pour essai (Article 7) et, à l'aide d'une autre micropipette, 20 µl de la solution de glucokinase (4.2.1) dans la chambre de mélange de l'appareillage de pH-métrie différentielle (5.5). Diluer avec la solution tampon (4.1) jusqu'à un volume total de 1 200 µl. Remplir les électrodes E1 et E2 avec le mélange tampon, prise d'essai et glucokinase obtenu. Mesurer la différence de pH, D_5 , entre les deux électrodes.