
**Lait et produits laitiers — Détermination
de la teneur en nitrates — Méthode par
réduction enzymatique et spectrométrie
d'absorption moléculaire après réaction
de Griess**

*Milk and milk products — Determination of nitrate content — Method by
enzymatic reduction and molecular-absorption spectrometry after
Griess reaction*
(standards.iteh.ai)

[ISO 20541:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>



Numéros de référence
ISO 20541:2008(F)
FIL 197:2008(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 20541:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2008

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 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Réactifs	2
6 Appareillage	4
7 Échantillonnage	5
8 Préparation de l'échantillon pour essai	5
8.1 Lait en poudre, lactosérum en poudre, concentrés de protéines de lait	5
8.2 Caséines et caséinates	5
8.3 Fromage	6
8.4 Fromage de lactosérum	6
9 Mode opératoire	6
9.1 Préparation de la prise d'essai	6
9.2 Élimination des matières grasses et des protéines	6
9.3 Essai à blanc du réactif	7
9.4 Détermination	7
9.5 Étalonnage	9
10 Calcul et expression des résultats	9
10.1 Teneur en nitrite (blanc de la matrice) (voir Article 4, Note 3)	9
10.2 Teneur totale en nitrite/nitrate	9
10.3 Teneur en nitrate	10
11 Fidélité	10
11.1 Essai interlaboratoires	10
11.2 Répétabilité	10
11.3 Reproductibilité	11
12 Rapport d'essai	11
Annexe A (informative) Essais interlaboratoires	12
Bibliographie	15

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 20541|FIL 197 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). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

ISO 20541:2008
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>

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.

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 20541|FIL 197 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 l'ISO et la FIL.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO/FIL *Composants mineurs* du Comité permanent chargé des *Composants mineurs et caractérisation des propriétés physiques*, sous la conduite de ses chefs de projet, Mr M. Carl (DE) et Mme C. Bäckman (FL).

[ISO 20541:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20541:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>

Lait et produits laitiers — Détermination de la teneur en nitrates — Méthode par réduction enzymatique et spectrométrie d'absorption moléculaire après réaction de Griess

AVERTISSEMENT — La présente Norme internationale peut impliquer l'utilisation de produits et la mise en œuvre de modes opératoires et d'appareillages à caractère dangereux. La présente Norme internationale n'a pas pour but d'aborder tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente Norme internationale d'établir, avant de l'utiliser, des pratiques d'hygiène et de sécurité et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination de la teneur en nitrates du lait et des produits laitiers par spectrométrie d'absorption moléculaire après une réaction de Griess (précédée d'une réduction enzymatique).

Cette méthode s'applique notamment au lait entier, demi-écrémé, écrémé et au lait en poudre; aux fromages à pâte dure, demi-dure et molle; au fromage fondu, au fromage de lactosérum, aux caséines, aux caséinates, au lactosérum en poudre et aux concentrés de protéine de lait.

La méthode peut s'appliquer aux teneurs en nitrates équivalentes à une concentration mesurée de la solution échantillon (après soustraction correspondant au blanc) supérieure à 0,2 mg/l.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 565, *Tamis de contrôle — Tissus métalliques, tôles métalliques perforées et feuilles électroformées — Dimensions nominales des ouvertures*

ISO 648, *Verrerie de laboratoire — Pipettes à un volume*

ISO 835, *Verrerie de laboratoire — Pipettes graduées*

ISO 1042, *Verrerie de laboratoire — Fioles jaugées à un trait*

ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

3 Termes et définitions

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

3.1

teneur en nitrite

fraction massique des composés de nitrite déterminée selon le mode opératoire spécifié dans la présente Norme internationale

3.2 teneur en nitrate
fraction massique des composés de nitrate déterminée selon le mode opératoire spécifié dans la présente Norme internationale

NOTE La teneur en nitrate est exprimée en fraction massique, en milligrammes d'ion nitrate (NO_3^-) par kilogramme de produit.

4 Principe

Une prise d'essai est dispersée dans l'eau chaude. Les matières grasses et les protéines sont éliminées soit par précipitation de Carrez et filtration, soit par ultrafiltration en utilisant des membranes coniques pour la centrifugation (voir Notes 1 et 2). Dans une prise du filtrat, le nitrate est réduit en nitrite par une solution de nitrate réductase. Dans les prises du filtrat non réduit (pour le nitrite) et de la solution réduite (pour le nitrate), un colorant azoïque rouge-violet est développé en ajoutant de la sulfanilamide et du *N*-naphtyl-1 éthylènediamine dichlorhydrate, et l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 540 nm (ou Hg 546 nm). La teneur en nitrite de l'échantillon et la teneur totale en nitrites après réduction du nitrate sont calculées en comparant les absorbances mesurées avec celles d'un jeu de solutions d'étalonnage de nitrite de sodium. La teneur en nitrates est calculée par la différence entre ces deux teneurs.

NOTE 1 Les deux modes opératoires relatifs à l'élimination des matières grasses et des protéines sont décrits en 9.2.1 et en 9.2.2.

NOTE 2 Pour le lactosérum en poudre, le lactosérum concentré en protéines et les produits similaires, l'ultrafiltration est préférée à la précipitation de Carrez, car celle-ci entraîne souvent des problèmes de turbidité et, en conséquence, une faible fidélité.

NOTE 3 La faible teneur endogène en nitrite n'est pas consignée, mais prise en compte dans la solution à blanc de la matrice.

ISO 20541:2008
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-066b54e6323e/iso-20541-2008>

5 Réactifs

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, ne contenant ni nitrate ni nitrite, et de l'eau au moins de qualité 3, conformément à l'ISO 3696, sans nitrate ni nitrite. L'eau utilisée lors de la préparation des solutions d'enzymes ou de coenzymes doit être fraîchement bidistillée, ou de pureté équivalente.

5.1 Solution d'hydroxyde de sodium, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.

5.2 Solution de chlorure de sodium, $c(\text{NaCl}) = 0,9 \text{ g/100 ml}$.

5.3 Acide chlorhydrique $\rho_{20}(\text{HCl}) = 1,19 \text{ g/ml}$.

5.4 Solution d'acide chlorhydrique, $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/l}$.

Ajouter avec précaution 160 ml d'acide chlorhydrique (5.3) à environ 700 ml d'eau dans une fiole jaugée de 1 000 ml (6.4), tout en agitant régulièrement le contenu. Refroidir le contenu à température ambiante. Diluer au trait avec de l'eau et mélanger avec précaution.

5.5 Réactifs de Carrez, comme suit:

5.5.1 Réactif de Carrez I: Solution d'hexacyanoferrate(II) de potassium, $c(\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 150 \text{ g/l}$.

Dissoudre 15,0 g d'hexacyanoferrate(II) de potassium trihydraté dans de l'eau, dans une fiole jaugée de 100 ml (6.4). Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

5.5.2 Réactif de Carrez II: Solution de sulfate de zinc, $c(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 300\text{g/l}$.

Dissoudre 30,0 g de sulfate de zinc heptahydraté dans de l'eau, dans une fiole jaugée de 100 ml (6.4). Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

5.6 Solutions étalons, comme suit:

5.6.1 Solution mère de nitrite de sodium (NaNO_2).

Peser précisément ($75,0 \pm 0,1$) mg de nitrite de sodium préséché (à 102°C pendant 2 h), dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans une quantité d'eau suffisante. Diluer au trait avec de l'eau et mélanger. La solution mère de nitrite obtenue contient 500 mg de nitrite par litre.

Préparer des solutions d'étalonnage en diluant la solution mère avec de l'eau pour obtenir des concentrations en nitrite comprises entre 0,05 mg/l et 5,0 mg/l.

À température ambiante, la solution mère de nitrite de sodium reste stable pendant une journée.

5.6.2 Solution mère de nitrate de potassium (KNO_3).

Peser précisément ($81,5 \pm 0,1$) mg de nitrate de potassium préséché (à 102°C pendant 2 h) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans une quantité d'eau suffisante. Diluer au trait avec de l'eau et mélanger. La solution mère de nitrate obtenue contient 500 mg de nitrate par litre.

Préparer des solutions d'étalonnage en diluant la solution mère avec de l'eau pour obtenir des concentrations en nitrate comprises entre 0,05 mg/l et 5,0 mg/l.

À une température de 4°C , la solution mère de nitrate de potassium reste stable pendant une semaine.

5.7 Solution tampon de phosphate de potassium, pH = 7,5.

Peser précisément ($57,6 \pm 0,1$) mg d'hydrogénophosphate de dipotassium ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans une quantité d'eau suffisante. Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

Peser précisément ($17,0 \pm 0,1$) mg de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) dans une fiole jaugée de 50 ml. Dissoudre dans une quantité d'eau suffisante. Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

Utiliser un pH-mètre (6.18) pour ajuster le pH de la solution d'hydrogénophosphate de dipotassium à un pH = 7,5, par addition de solution de dihydrogénophosphate de potassium.

À une température de 4°C , la solution reste stable pendant deux semaines.

5.8 Solution NADPH/FAD.

Dans une fiole jaugée de 25 ml, peser précisément ($5,6 \pm 0,1$) mg de sel de tétrasodium 3-nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate réduit ($\beta\text{-NADPH-Na}_4$, fraction massique d'au moins 98 %) et ($80,0 \pm 0,1$) mg de sel de disodium flavine-adénine dinucléotide (FAD-Na_2 , fraction massique d'au moins 88 %).

Dissoudre dans une quantité appropriée de solution tampon de phosphate de potassium (5.7). Diluer au trait avec la solution tampon (5.7) et mélanger.

Préparer la solution NADPH/FAD extemporanément.

5.9 Solution de nitrate réductase (NR).

Peser 65 mg de nitrate réductase (NR) d'*Aspergillus niger* (CE 1.6.6.2, lyophilisat contenant environ 0,4 U/mg) dans un tube jaugeur de 10 ml. Ajouter 5 ml d'eau et mélanger.

À une température de 4°C , la solution de nitrate réductase reste stable pendant deux semaines.

5.10 Réactifs de couleur, comme suit:

5.10.1 Solution I du réactif de couleur: Sulfanilamide ($\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$).

Peser 400 mg de sulfanilamide dans une fiole jaugée de 50 ml (6.4). Dissoudre dans la solution d'acide chlorhydrique (5.4), en chauffant dans un bain d'eau si nécessaire.

Refroidir la solution à température ambiante. Diluer au trait avec la solution d'acide chlorhydrique (5.4) et mélanger. Si nécessaire, filtrer la solution obtenue.

À une température de 4 °C, la solution I du réactif de couleur reste stable pendant quatre semaines.

5.10.2 Solution II du réactif de couleur: *N*-naphtyl-1 éthyldiamine dichlorhydrate ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2, 2\text{HCl}$).

Peser 50 mg de *N*-naphtyl-1 éthyldiamine dichlorhydrate dans une fiole jaugée de 50 ml (6.4). Dissoudre dans une quantité d'eau suffisante.

Diluer au trait avec de l'eau et mélanger. Si nécessaire, filtrer la solution obtenue.

À une température de 4 °C, la solution II du réactif de couleur reste stable pendant quatre semaines.

5.11 Des kits de réactifs sont également disponibles dans le commerce. Suivre soigneusement les instructions de la présente Norme internationale lors de l'utilisation de ces kits (en particulier dans le cas de 5.8).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

6 Appareillage

Nettoyer soigneusement toute la verrerie et rincer avec de l'eau de manière qu'il ne reste ni nitrate ni nitrite.

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d65d714b-2836-4647-beaa-05f0146333/iso-20541-2008>

- 6.1 Balance analytique**, capable de peser à 0,1 mg près.
- 6.2 Récipient pour échantillon**, fourni avec un couvercle hermétique.
- 6.3 Fioles coniques**, de capacité 100 ml, 500 ml et 1 000 ml, munis de bouchons en verre rodé.
- 6.4 Fioles jaugées**, de capacité nominale 25 ml, 50 ml, 100 ml et 1 000 ml conformes aux exigences de l'ISO 1042, classe A.
- 6.5 Pipettes**, de capacité 1 ml, 2 ml, 5 ml et 10 ml, conformes aux exigences de l'ISO 648, classe A, ou de l'ISO 835. Le cas échéant, il est possible de remplacer les pipettes par des burettes.
- 6.6 Pipettes graduées**, de type à écoulement partiel, pour essais avec enzymes.
- 6.7 Éprouvettes graduées**, de capacité 20 ml et 50 ml.
- 6.8 Béchers**, de capacité 20 ml et 50 ml.
- 6.9 Centrifugeuse**, munie d'un dispositif de refroidissement, produisant une accélération des godets de la centrifugeuse (6.10) et des membranes coniques (6.21) de 3 000g.
- 6.10 Godets pour centrifugeuse**, de diamètre 15 mm.
- 6.11 Filtre à membrane**, ayant une porosité de 0,45 µm, à utiliser avec une seringue.
- 6.12 Entonnoir en verre**, de diamètre approprié.
- 6.13 Spectromètre**, permettant de mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 540 nm, ou **photomètre à raie spectrale** muni d'une lampe à mercure et d'un filtre, permettant de mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 546 nm.

6.14 Cuves optiques, de type semi-micro (récipients jetables ou en verre) et dont le parcours optique est égal à 1 cm.

6.15 Broyeur, pour broyer l'échantillon pour essai si nécessaire. Pour éviter toute perte d'humidité, le broyeur ne doit pas entraîner une production excessive de chaleur.

6.16 Tamis de contrôle, en tissu métallique, de diamètre 200 mm et de dimension nominale d'ouverture 500 µm; muni d'un récepteur conforme aux exigences de l'ISO 565.

6.17 Agitateur magnétique.

6.18 Appareil de mesure du pH, composé d'un pH-mètre et d'électrodes de verre/de référence, permettant de mesurer à une température de 20 °C.

6.19 Bain d'eau, muni d'un agitateur, réglable à $(70 \pm 0,5)$ °C.

6.20 Plaque chauffante.

6.21 Membrane conique, 5 000 MWCO, de capacité 4 ml, pour l'ultrafiltration et la centrifugation de la solution échantillon.

7 Échantillonnage

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

Il convient que le laboratoire reçoive un échantillon parfaitement représentatif, n'ayant pas été endommagé ou modifié lors du transport ou du stockage.

Conserver les échantillons pour essai de façon à éviter toute détérioration et modification de la composition.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

8.1 Lait en poudre, lactosérum en poudre, concentrés de protéines de lait

Transférer l'échantillon pour essai dans un récipient (6.2) dont la capacité est d'environ deux fois supérieure au volume de l'échantillon pour essai. Fermer immédiatement le récipient. Mélanger soigneusement l'échantillon pour essai en agitant de manière répétée et en retournant le récipient.

8.2 Caséines et caséinates

8.2.1 Mélanger soigneusement l'échantillon pour essai, si nécessaire, après avoir transféré tout l'échantillon dans un récipient (6.2) d'une capacité appropriée, en agitant de manière répétée et en retournant le récipient.

8.2.2 Transférer 50 g de l'échantillon pour essai sur le tamis de contrôle (6.16). Si la prise de 50 g passe complètement, ou bien si elle passe à travers le tamis dans sa quasi-totalité, passer la totalité de l'échantillon pour essai mélangé (8.2.1), à travers le tamis. Si l'échantillon pour essai ne passe pas complètement à travers le tamis, utiliser le broyeur (6.15) afin de s'assurer qu'il passe.

Transférer immédiatement la totalité de l'échantillon pour essai tamisé dans un récipient (6.2). Mélanger soigneusement dans le récipient fermé. Au cours de ces différentes étapes, veiller à éviter toute variation de la teneur en eau du produit.

Après avoir préparé l'échantillon pour essai, commencer dès que possible la préparation de la prise d'essai (voir 9.1)