
**Lait — Détermination de la phosphatase
alcaline**

Milk — Determination of alkaline phosphatase

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 3356:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-086c6b6c241b/iso-3356-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-086c6b6c241b/iso-3356-2009>



Numéros de référence
ISO 3356:2009(F)
FIL 63:2009(F)

© ISO et FIL 2009

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 3356:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-086c6b6c241b/iso-3356-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-086c6b6c241b/iso-3356-2009>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2009

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

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 3356|FIL 63 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.

Cette deuxième édition de l'ISO 3356|FIL 63 annule et remplace la première édition de l'ISO 3356:1975, qui a fait l'objet d'une révision technique.

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 3356|FIL 63 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.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO-FIL sur le *Traitement thermique* du Comité permanent chargé des *Composants mineurs et caractérisation des propriétés physiques*, sous la conduite de son chef de projet, Mme M. Nicolas (FR).

Cette édition de l'ISO 3356|FIL 63 annule et remplace la FIL 63:1971, qui a fait l'objet d'une révision technique.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-086c6b6c241b/iso-3356-2009>

Lait — Détermination de la phosphatase alcaline

AVERTISSEMENT — L'utilisation de la présente Norme internationale peut impliquer l'utilisation de produits et la mise en œuvre de modes opératoires et de réactifs à caractère dangereux. Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. 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 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.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode pour la détermination de l'activité phosphatasique alcaline du lait.

La méthode s'applique aux activités phosphatasiques alcalines supérieures ou égales à 1 µg de phénol par millilitre.

La méthode convient également à la détermination de l'activité phosphatasique alcaline du lait en poudre, du babeurre et de la poudre de babeurre, du sérum et de la poudre de sérum.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-086c6b6c241b/iso-3356-2009>

2 Termes et définitions

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

2.1

activité phosphatasique alcaline

APA

(activité phosphatasique alcaline dans le lait) quantité de phénol libéré par l'échantillon, déterminée conformément au mode opératoire spécifié dans la présente Norme internationale

NOTE L'activité phosphatasique alcaline est exprimée en quantité de phénol, en microgrammes, libéré par 1 ml de l'échantillon ou de l'échantillon reconstitué, dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale. D'autres Normes internationales (par exemple l'ISO 11816-1|FIL 155-1^[6], l'ISO 22160|FIL 209^[7]) expriment l'activité phosphatasique alcaline en milliunités par litre. La documentation scientifique fournit des informations sur l'équivalence des différentes unités utilisées pour exprimer l'activité phosphatasique alcaline.

3 Principe

L'échantillon est dilué avec une solution tampon de pH 10,6 et est incubé pendant 1 h à une température de 37 °C. Dans ces conditions, la phosphatase alcaline éventuellement présente dans l'échantillon libère du phénol à partir du phénylphosphate disodique ajouté. Le phénol libéré réagit avec une imidoquinone (dibromo-quinone chlorimide) produisant du dibromo-indophénol (couleur bleue) qui est mesuré par photométrie à une longueur d'onde de 610 nm.

4 Réactifs

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

4.1 Solution tampon de borate-hydroxyde de baryum

Dissoudre dans l'eau 25,0 g d'hydroxyde de baryum [$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$], exempt de carbonate, dans une fiole jaugée à un trait de 500 ml (5.8). Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

Dissoudre 11,0 g d'acide borique (H_3BO_3) dans l'eau dans une autre fiole jaugée à un trait de 500 ml (5.8). Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

Chauffer les deux solutions à 50 °C. Les mélanger ensemble en agitant. Refroidir rapidement la solution obtenue à environ 20 °C. Ajuster le pH, si nécessaire, à $10,6 \pm 0,1$ par addition de solution d'hydroxyde de baryum. Filtrer la solution à travers du papier filtre (5.10).

Conserver la solution tampon filtrée de borate-hydroxyde de baryum dans un récipient bouché hermétiquement. Avant utilisation, diluer la solution tampon avec un volume égal d'eau.

4.2 Solutions tampon pour le développement de la coloration

4.2.1 Solution tampon de couleur I

Dissoudre dans l'eau 6,0 g de métaborate de sodium (NaBO_2) ou 12,6 g de $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, et 20,0 g de chlorure de sodium (NaCl) dans une fiole jaugée à un trait de 1 000 ml (5.8). Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

4.2.2 Solution tampon de couleur II

Transférer 10 ml de la solution tampon I (4.2.1) dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (5.8). Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

4.3 Substrat tamponné

4.3.1 Phénylphosphate disodique dihydraté ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), renfermant un fraction massique de phénol inférieure ou égale à 0,01 %.

4.3.2 Dissoudre 0,1 g de phénylphosphate disodique dihydraté (4.3.1) dans 100 ml de solution tampon de borate-hydroxyde de baryum dilué (4.1).

4.4 Défécant zinc-cuivre

Dissoudre dans l'eau 3,0 g de sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et 0,6 g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (5.8). Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

4.5 Solution de 2,6-dibromoquinone chlorimide (BQC), réactif de Gibb.

Dissoudre $40 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$ de BQC ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}$) dans 10 ml d'éthanol à 96 % en fraction volumique.

Conserver la solution dans un flacon de couleur foncée à $4 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. Rejeter la solution si elle est décolorée ou si elle a plus d'un mois.

4.6 Solution de sulfate de cuivre

Dissoudre dans l'eau 0,05 g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (5.8). Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

4.7 Solution d'hydroxyde de sodium, $c(\text{NaOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$.

4.8 Solutions étalons de phénol

4.8.1 Solution étalon mère de phénol

Peser $200 \text{ mg} \pm 2 \text{ mg}$ de phénol anhydre de pureté supérieure à 99,5 % en fraction massique, et transférer dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (5.8). Dissoudre le phénol dans l'eau. Diluer au trait avec de l'eau et mélanger.

La solution étalon mère de phénol reste stable pendant six semaines à $4 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

4.8.2 Solutions étalons de travail de phénol

À l'aide d'une pipette, introduire 10 ml de solution étalon mère de phénol (4.8.1) dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (5.8). Diluer au trait avec de l'eau et mélanger (1 ml contient $200 \text{ }\mu\text{g}$ de phénol).

Utiliser la solution étalon diluée pour préparer les solutions étalons de travail de phénol appropriées, contenant respectivement $2 \text{ }\mu\text{g}$, $5 \text{ }\mu\text{g}$, $10 \text{ }\mu\text{g}$ et $20 \text{ }\mu\text{g}$ de phénol par millilitre.

5 Appareillage

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

5.1 Balance analytique, d'une capacité de pesée à 1 mg près, avec une résolution de 0,1 mg.

5.2 Photomètre, permettant d'effectuer des mesurages à une longueur d'onde de 610 nm.

5.3 Bain-marie, pouvant être maintenu à $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, avec thermostat.

5.4 Bain-marie à ébullition. [ISO 3356:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-086c6b6c241b/iso-3356-2009)
[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-086c6b6c241b/iso-3356-2009)

5.5 Agitateur vortex. [086c6b6c241b/iso-3356-2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-086c6b6c241b/iso-3356-2009)

5.6 Pipettes, de capacités 0,1 ml, 1 ml, 5 ml et 10 ml, ISO 648^[1], classe A.

5.7 Tubes à essai en verre, de volumes appropriés, munis de fermetures dont les joints ou les revêtements intérieurs sont exempts de matériaux phénoliques.

5.8 Fioles jaugées à un trait, de capacités 100 ml, 500 ml et 1 000 ml, ISO 1042^[3], classe A.

5.9 Entonnoirs en verre, de diamètres 60 mm et 100 mm environ.

5.10 Papier filtre, qualité pour filtration rapide, de diamètres 110 mm et 185 mm environ.

6 Échantillonnage

Il convient qu'un échantillon représentatif ait été envoyé au laboratoire. Il convient qu'il n'ait été ni endommagé, ni modifié au cours du transport ou du stockage.

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^[2].

Conserver l'échantillon pour essai de façon à éviter toute détérioration et modification de sa composition.

7 Préparation de l'échantillon pour essai

7.1 Préparation

Mélanger l'échantillon pour essai avec soin avant utilisation. Généralement, il n'est pas nécessaire de préchauffer l'échantillon pour essai en vue d'une homogénéisation correcte. Toutefois, s'il est nécessaire de procéder à un préchauffage, la température ne doit en aucun cas dépasser 35 °C.

7.2 Poudre de lait, poudre de babeurre et poudre de sérum

Dissoudre 10 g de l'échantillon pour essai dans 90 ml d'eau, en chauffant si nécessaire. Toutefois, la température utilisée pour la dilution complète de l'échantillon ne doit, en aucun cas, dépasser 35 °C.

7.3 Neutralisation des échantillons pour essai acides

Si l'échantillon pour essai est acide ($\text{pH} < 7,0$), ajuster à un pH neutre avec la solution d'hydroxyde de sodium (4.7).

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de la courbe d'étalonnage

8.1.1 Préparer une série de solutions étalons dans 5 tubes à essai en verre (5.7) en pipettant 1 ml d'eau pour la solution témoin ou la solution à blanc et 1 ml des 4 solutions étalons de travail de phénol (4.8.2) dans chacun des 4 tubes à essai restants. Les tubes à essai des étalons contiennent respectivement 0 µg (témoin ou essai à blanc), 2 µg, 5 µg, 10 µg et 20 µg de phénol.

8.1.2 Ajouter à chaque tube à essai étalon (8.1.1) 1 ml de la solution de sulfate de cuivre (4.6), 5 ml de la solution tampon de couleur II (4.2.2), 3 ml d'eau et 0,1 ml de la solution BQC (4.5) et mélanger. Laisser la coloration se développer pendant 30 min à température ambiante.

8.1.3 Mesurer la densité optique des solutions étalons par rapport à celle de la solution témoin ou de la solution à blanc à une longueur d'onde de 610 nm.

8.1.4 Tracer la courbe d'étalonnage, en portant sur un graphique la densité optique en fonction des quantités de phénol en microgrammes (8.1.1). Calculer l'équation de la courbe d'étalonnage.

8.2 Détermination

8.2.1 Éviter toute exposition à la lumière solaire directe au cours de la détermination. Une contamination par des traces de salive ou de transpiration peut donner de faux résultats positifs et il convient de l'éviter.

8.2.2 Pipetter dans deux tubes à essai (5.7) séparés 1 ml d'échantillon pour essai ou d'échantillon pour essai reconstitué. Utiliser l'un des tubes comme témoin ou comme essai à blanc.

8.2.3 Boucher le tube à essai à blanc. Placer le tube à essai dans un bécher avec de l'eau bouillante. Recouvrir le bécher avec une feuille d'aluminium. Chauffer le tube à essai pendant 2 min dans l'eau bouillante tout en maintenant le tube et le bécher recouverts par la feuille d'aluminium afin de s'assurer que tout le tube est chauffé. Ensuite, refroidir le tube à température ambiante dans de l'eau froide.

À partir de ce moment, traiter l'essai à blanc et le tube contenant l'échantillon pour essai de la même manière.

8.2.4 Ajouter 10 ml de substrat tamponné (4.3) au tube contenant l'échantillon pour essai (8.2.2) et au tube à essai à blanc (8.2.2) et mélanger.

8.2.5 Incuber immédiatement les deux tubes dans le bain-marie (5.3) à 37 °C pendant 60 min, en mélangeant de temps en temps le contenu des tubes.

8.2.6 Placer les deux tubes à essai dans un bécher avec de l'eau bouillante. Recouvrir le bécher avec une feuille d'aluminium. Chauffer les deux tubes dans l'eau bouillante pendant 2 min, puis les refroidir à température ambiante dans de l'eau froide.

8.2.7 Ajouter 1 ml du défécant zinc-cuivre (4.4) dans chacun des tubes et mélanger soigneusement.

8.2.8 Filtrer le contenu de chaque tube sur du papier filtre (5.10), en jetant les premiers millilitres. Pipetter 5 ml de chaque filtrat dans un autre tube à essai en verre (5.7).

8.2.9 Ajouter dans chaque tube à essai (8.2.8) 5 ml de solution tampon de couleur I (4.2.1) et mélanger.

8.2.10 Ajouter 0,1 ml de la solution BQC (4.5) dans chaque tube et mélanger. Laisser la coloration des deux solutions se développer pendant 30 min à température ambiante.

8.2.11 Mesurer la densité optique de la solution de prise d'essai par rapport à celle de la solution de l'essai à blanc à une longueur d'onde de 610 nm.

8.2.12 Si la densité optique de l'échantillon pour essai, mesurée en 8.2.11, est supérieure à celle de la solution étalon de travail de phénol contenant 20 µg de phénol par millilitre, mesurée en 8.1.3, recommencer la détermination avec une dilution appropriée de l'échantillon pour essai ou de l'échantillon pour essai reconstitué de la manière suivante.

Mélanger 1 volume de l'échantillon pour essai ou de l'échantillon pour essai reconstitué avec un volume approprié du même échantillon pour essai ou du même échantillon pour essai reconstitué, porté soigneusement à ébullition afin d'inactiver la phosphatase. Poursuivre comme en 8.2.2.

iTeh STANDARD PREVIEW
 (standards.ittekh.com)

<https://standards.ittekh.com/catalogue/standards/sist/4b3ce81f-a56-4dfe-9402-086c6b6c241b/iso-3356-2009>

9 Calcul et expression des résultats

9.1 Calcul

9.1.1 Convertir la densité optique déterminée en 8.2.11 en microgrammes de phénol en se référant à la courbe d'étalonnage (8.1.4).

9.1.2 Calculer l'activité phosphatasique, a_p , exprimée en microgrammes de phénol par millilitre de lait, à l'aide de l'équation:

$$a_p = 2,4 \times m \times f_d$$

où

m est la masse de phénol, en microgrammes, obtenue en 9.1.1;

f_d est le facteur de dilution de l'échantillon pour essai ou de l'échantillon pour essai reconstitué (8.2.12), le cas échéant (s'il n'y a pas eu de dilution $f_d = 1$).

9.2 Expression des résultats d'essai

Exprimer les résultats d'essai à une décimale.