

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
11816-1

FIL  
155-1

Troisième édition  
2013-11-01

---

---

**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**

*Milk and milk products — Determination of alkaline phosphatase  
activity —*

*Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks*

ISO 11816-1:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/1e16c555-1c72-4f1c-83bd-2171fd9565e3/iso-11816-1-2013>



Numéros de référence  
ISO 11816-1:2013(F)  
FIL 155-1:2013(F)

© ISO et FIL 2013

**iTeh Standards**  
**(<https://standards.iteh.ai>)**  
**Document Preview**

ISO 11816-1:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/1ef6c555-1c72-4f1c-83bd-2171fd9565e3/iso-11816-1-2013>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO/FIL 2013

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO ou à la FIL, à l'une ou l'autre des adresses ci-après, ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

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 du Lait  
Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B • B-1030 Brussels  
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

<b>Avant-propos</b>	<b>v</b>
<b>1 Domaine d'application</b>	<b>1</b>
<b>2 Termes et définitions</b>	<b>1</b>
<b>3 Principe</b>	<b>1</b>
<b>4 Réactifs</b>	<b>2</b>
<b>5 Appareillage</b>	<b>3</b>
<b>6 Échantillonnage</b>	<b>3</b>
<b>7 Préparations</b>	<b>3</b>
7.1 Lait exempt de phosphatase alcaline	3
7.2 Préparation de l'échantillon pour essai	4
<b>8 Mode opératoire</b>	<b>4</b>
8.1 Vérification des performances de l'appareillage	4
8.2 Contrôles de réactifs pour évaluer l'adéquation du substrat de travail prêt à l'emploi (4.3)	5
8.3 Étalonnage	5
8.4 Détermination	6
8.5 Contrôles relatifs aux échantillons pour essai	7
<b>9 Calcul et expression des résultats</b>	<b>7</b>
9.1 Rapport d'étalonnage	7
9.2 Calcul	8
9.3 Expression des résultats d'essai	8
<b>10 Fidélité</b>	<b>8</b>
10.1 Essai interlaboratoires	8
10.2 Répétabilité	9
10.3 Reproductibilité	9
<b>11 Rapport d'essai</b>	<b>9</b>
<b>Annexe A</b> (informative)	
<b>Essais interlaboratoires</b>	<b>10</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>13</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 procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/CEI, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2, [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou sur la liste ISO des déclarations de brevets reçues, [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets).

Les éventuelles appellations commerciales utilisées dans le présent document sont données pour information à l'intention des utilisateurs et ne constituent pas une approbation ou une recommandation.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers* et la Fédération internationale du Lait (FIL). Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette troisième édition de l'ISO 11816-1|FIL 155-1 annule et remplace la deuxième édition (ISO 11816-1:2006), qui a fait l'objet d'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*

## Avant-propos

La FIL (Fédération Internationale du Lait) 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 et avec 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 ayant reçu l'approbation des Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour entérinement avant publication comme Normes internationales. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux votants.

L'attention est attirée sur le fait que certains éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de brevets. La FIL ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

Les éventuelles appellations commerciales utilisées dans le présent document sont données pour information à l'intention des utilisateurs et ne constituent pas une approbation ou une recommandation.

L'ISO 11816-1|FIL 155-1 a été élaborée par la Fédération Internationale du Lait (FIL) et par 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 réalisé par le Groupe de projet mixte ISO-FIL relatif à la *Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline — méthode fluorimétrique*, du Comité permanent chargé des *Méthodes analytiques pour les aides et indicateurs de procédés industriels*, sous la conduite de son chef de projet, Mme Eileen Garry (États-Unis).

Cette troisième édition de l'ISO 11816-1|FIL 155-1 annule et remplace la FIL 155-1:2006, qui a fait l'objet d'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*



# 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 spécifie une méthode fluorimétrique pour la détermination de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP, EC 3.1.3.1) dans les laits crus et traités thermiquement entiers, demi-écrémés, écrémés et dans les laits aromatisés. La méthode est applicable au lait et aux boissons à base de lait de vache, de brebis et de chèvre. Elle est également applicable au lait en poudre après reconstitution.

L'appareillage peut lire des activités jusqu'à 7 000 milliunités par litre (mU/l). Si l'activité est supérieure à 7 000 mU/l, une dilution avec du lait exempt de phosphatase alcaline (7.1) est effectuée de façon à obtenir un mesurage ne dépassant pas 7 000 mU/l.

### 2 Termes et définitions

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

#### 2.1

##### **activité de la phosphatase alcaline (ALP)**

activité de la phosphatase alcaline présente dans un produit, déterminée suivant le mode opératoire spécifié

Note 1 à l'article: L'activité de la phosphatase alcaline est exprimée en milliunités d'activité enzymatique par litre d'échantillon (mU/l).

#### 2.2

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

quantité d'enzyme phosphatase alcaline qui catalyse la transformation de 1  $\mu$ 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 lorsque l'on utilise le Fluorophos®. 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 spécification contraire, utiliser exclusivement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

**4.1 Substrat Fluorophos®<sup>1)</sup>**, en flacons, contenant chacun 144 mg de poudre de substrat Fluorophos®, masse moléculaire 580 g/mol.

Il s'agit d'un substrat d'ester monophosphorique aromatique non fluorescent, 2'-[2-benzothiazolyl]-6'-hydroxybenzothiazole phosphate (Fluorophos®). Le substrat Fluorophos® reste stable pendant 2 ans après sa date de fabrication lorsqu'il est conservé, dans le flacon non ouvert, entre 2 °C et 8 °C; garder à l'abri de la lumière.

**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 après sa date de fabrication lorsqu'elle est conservée, dans le flacon non ouvert, entre 2 °C et 8 °C; garder à l'abri de la lumière.

### 4.3 Substrat de travail

Amener le substrat Fluorophos® (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 pour créer une solution d'environ 1,0 millimole (pH 10). 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 A/D (analogique/numérique) donné en 8.2 pour vérifier que le substrat de travail prêt pour utilisation est bon. Ne pas utiliser le substrat de travail en cas d'obtention d'une valeur supérieure à 1200 FLU (unités de fluorescence) (8.2).

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.

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

**4.4 Solutions étalons**, Fluoroyellow® (FY) [2'-(2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazole] dans une solution tampon de substrat (4.2).

Les solutions étalons restent stables pendant 18 mois après leur date de fabrication lorsqu'elles sont conservées dans des flacons non ouverts entre 2 °C et 8 °C. Mélanger doucement avant utilisation pour obtenir des résultats optimaux.

**4.4.1 Solution étalon A**, contenant 0 µmol/l de Fluoroyellow®.

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

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

---

1) Les réactifs spécifiés en 4.1 à 4.5 et les appareils spécifiés en 5.1 à 5.4 (sauf 5.3.3) sont disponibles sous l'appellation commerciale «Fluorophos Test System» et sont fournis par 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 le présent document. Fluorophos et Fluoroyellow sont des marques déposées de Advanced Instruments, Inc. 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 des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.



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

La solution de contrôle quotidien des instruments reste stable pendant 18 mois après sa date de fabrication lorsqu'elle est conservée dans des flacons non ouverts entre 2 °C et 8 °C. Mélanger doucement avant utilisation pour obtenir des résultats optimaux.

## 5 Appareillage

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

**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 entre 520 nm et 560 nm [appareillage Fluorophos®<sup>1</sup>] par exemple].

**5.2 Cuvettes**, jetables, en verre non fluorescent.

### 5.3 Pipettes

**5.3.1 Pipette 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.

Suivre à la lettre les instructions de la technique de pipetage car cette étape est cruciale pour l'obtention de résultats précis. Veiller à bien immobiliser le piston de l'alésage de la pipette avant utilisation.

**5.3.3 Pipettes**, de 2 ml et 3 ml de capacité.

**5.4 Bloc d'incubation**, pouvant maintenir une température de  $38 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  et pouvant contenir des cuvettes.

**5.5 Film de qualité pour laboratoire approprié.** <sup>2013</sup>

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/1e16c555-1c72-4f1c-83bd-2171fd9565e3/iso-11816-1-2013>

**5.6 Agitateur/mélangeur Vortex.**

**5.7 Bain d'eau**, pouvant maintenir 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

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.

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

## 7 Préparations

### 7.1 Lait exempt de phosphatase alcaline

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

Placer le tube ou le récipient contenant le lait dans le bain d'eau (5.7) réglé à 95 °C. Préchauffer le 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 récipient. Dès que la température du lait atteint 95 °C, démarrer la période de chauffage de 5 min. À l'issue de cette période de chauffage, refroidir le lait rapidement.

Soumettre à essai le lait ainsi traité afin de s'assurer que son activité ALP est inférieure à 10 mU/l.

## **7.2 Préparation de l'échantillon pour essai**

### **7.2.1 Généralités**

Mélanger soigneusement tous les échantillons pour essai avant utilisation.

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

### **7.2.2 Échantillons pour essai pasteurisés**

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

### **7.2.3 Dilution d'échantillons pour essai avec des valeurs d'ALP élevées**

Préparer des dilutions des échantillons de lait en utilisant du lait exempt de phosphatase (7.1), de manière que leurs niveaux d'ALP se situent dans la plage analytique de l'essai (<7 000 mU/l). Mélanger soigneusement les solutions diluées.

## **8 Mode opératoire**

### **8.1 Vérification des performances de l'appareillage**

#### **8.1.1 Généralités**

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

Les essais réalisés dans le cadre du contrôle qualité comprennent:

- a) l'essai quotidien A/D utilisé pour vérifier le bon fonctionnement de l'équipement,
- b) l'essai pour le contrôle quotidien de l'appareillage en utilisant la solution de contrôle quotidien de l'instrument (4.5) pour identifier tout écart électronique ou optique du fluorimètre, et
- c) l'utilisation de contrôles externes positifs, négatifs et normaux, décrits en 8.1.3, qui sont recommandés dans le cadre de la surveillance quotidienne des paramètres de fidélité de l'appareillage.

#### **8.1.2 Essais A/D**

**8.1.2.1** Si l'on utilise l'appareillage Fluorophos®, effectuer les essais A/D quotidiennement avant de commencer l'essai proprement dit.

**8.1.2.2 Accéder à l'essai A/D via le menu «SETUP».** Appuyer sur «SETUP», puis sélectionner l'option de menu «A/D Test» en appuyant sur < ou > . Sans rien mettre dans le support de cuvettes, appuyer sur «START». Attendre que les chiffres apparaissant à l'écran se stabilisent. Il convient que l'affichage indique  $302 \pm 4$ . Si le résultat se situe en dehors de cet intervalle, nettoyer les filtres d'excitation et d'émission, puis répéter l'essai A/D.