
**Lait et produits laitiers —
Détermination de la teneur en sucre
— Chromatographie d'échange
d'anions haute performance couplée à
la détection par ampérométrie pulsée
(HPAEC-PAD)**

*Milk and milk products — Determination of the sugar contents —
High performance anion exchange chromatography with pulsed
amperometric detection method (HPAEC-PAD)*

Document Preview

ISO 22184:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2ace7e8f-16d5-470c-a059-7da55e365819/iso-22184-2021>



Numéros de référence
ISO 22184:2021(F)
FIL 244:2021(F)

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

ISO 22184:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2ace7e8f-16d5-470c-a059-7da55e365819/iso-22184-2021>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2021

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11

E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

International Dairy Federation
Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B
B-1030 Brussels
Tél.: + 32 2 325 67 40
Fax: + 32 2 325 67 41
E-mail: info@fil-idf.org
Web: www.fil-idf.org

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	1
5 Réactifs	2
6 Appareillage	4
7 Échantillonnage	6
8 Préparation de l'échantillon pour essai	6
8.1 Généralités	6
8.2 Préparation des échantillons de lait concentré sucré	6
8.2.1 Échantillons de produits fabriqués récemment dans lesquels aucune séparation appréciable des constituants ne peut être attendue	6
8.2.2 Échantillons de produits plus anciens et échantillons dans lesquels une séparation des constituants peut être attendue	7
9 Mode opératoire	7
9.1 Extraction et nettoyage de l'échantillon	7
9.1.1 Généralités	7
9.1.2 Extraction et nettoyage de l'échantillon	7
9.2 Analyse chromatographique	9
10 Calcul et expression des résultats	10
11 Fidélité	12
11.1 Généralités	12
11.2 Répétabilité	12
11.3 Reproductibilité	14
12 Rapport d'essai	17
Annexe A (informative) Données de fidélité	18
Annexe B (informative) Données de précision	23
Bibliographie	25

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 (IEC) 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/IEC, 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/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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 dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 302, *Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne). Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

La FIL (Fédération internationale du lait) est une organisation privée à but non lucratif qui représente les intérêts des divers acteurs de la filière laitière au niveau international. Les membres de la FIL sont organisés en comités nationaux, qui sont des associations nationales composées de représentants de groupes d'intérêt nationaux dans le secteur des produits laitiers, incluant des producteurs laitiers, des acteurs de l'industrie de transformation des produits laitiers, des fournisseurs de produits laitiers, des universitaires et des représentants des gouvernements/autorités chargées du contrôle des aliments.

L'ISO et la FIL collaborent étroitement à toutes les activités de normalisation concernant les méthodes d'analyse et d'échantillonnage du lait et des produits laitiers. Depuis 2001, l'ISO et la FIL publient conjointement leurs Normes internationales en utilisant les logos et les numéros de référence des deux organisations.

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. 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 dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Le présent document a été élaboré par le *Comité permanent des méthodes d'analyse de la composition* de la FIL et le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

Ce travail a été accompli par le groupe de projet mixte FIL/ISO C22 du *Comité permanent des méthodes d'analyse de la composition* sous la conduite de son chef de projet, M. H. Cruijsen (NL).

Document Preview

ISO 22184:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2ace7e8f-16d5-470c-a059-7da55e365819/iso-22184-2021>

Lait et produits laitiers — Détermination de la teneur en sucre — Chromatographie d'échange d'anions haute performance couplée à la détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD)

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie la détermination quantitative par chromatographie en phase liquide de certains sucres (galactose, glucose, fructose, saccharose, lactose et maltose) dans divers laits et produits laitiers, en utilisant l'arabinose comme étalon interne.

Cette méthode s'applique aux matrices laitières suivantes: lait, lait concentré sucré, lait en poudre, fromage, lactosérum en poudre, formule infantile, dessert lacté et yaourt.

Cette méthode ne s'applique pas aux produits laitiers contenant du soja ni à la détermination de la teneur en lactose des produits laitiers à faible teneur en lactose inférieure à 0,1 mg/g.

Cette méthode s'appuie sur la chromatographie d'échange d'anions à haute performance couplée à la détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD)^{[5][3][4]}. Treize monosaccharides, disaccharides et trisaccharides différents peuvent être séparés par cette méthode: fucose, arabinose, galactose, glucose, fructose, saccharose, lactose, lactulose, maltose, mélibiose, tréhalose, isomaltulose et maltotriose.

Cette méthode s'applique à l'étiquetage des six principaux sucres qui peuvent être présents naturellement ou ajoutés dans le lait et les produits laitiers. Cette méthode ne s'applique pas aux teneurs en sucre inférieures à 0,1 %.

2 Références normatives

ISO 22184:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2ace7e8f-16d5-470c-a059-7da55e365819/iso-22184-2021>

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

3 Termes et définitions

Aucun terme n'est défini dans le présent document.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

4 Principe

Les sucres présents dans l'échantillon sont extraits à l'aide d'une solution tampon aqueuse contenant de l'éthanol afin d'inhiber d'éventuelles activités probiotiques. L'extrait ainsi obtenu est déprotéiné par clarification de Carrez. Après clarification, la solution est diluée et les sucres présents sont séparés et quantifiés par HPAEC. HPAE permet la séparation des glucides à pH élevé. Afin d'améliorer la sensibilité

et la stabilité, une solution d'hydroxyde de sodium est ajoutée en post-colonne de l'HPAEC. Les GOS (galacto-oligosaccharide) et les fructanes n'interfèrent pas avec l'analyse des sucres^[5]. L'arabinose est utilisé comme étalon interne pour la quantification des sucres.

5 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau conformément à l'ISO 3696, sauf indication contraire.

5.1 Eau, conformément à l'ISO 3696, grade 3 et grade 1.

5.2 Pastilles d'hydroxyde de sodium (NaOH).

5.3 Solution aqueuse d'hydroxyde de sodium, de concentration $c = 1 \text{ mol/l}$.

Introduire $40 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$ de pastilles de NaOH (5.2) dans une fiole jaugée de 1 000 ml, les dissoudre dans environ 500 ml d'eau et, après refroidissement, diluer avec de l'eau jusqu'au repère et homogénéiser.

5.4 Solution d'hydroxyde de sodium, de fraction massique $w(\text{NaOH}) = 33 \%$ dans l'eau.

5.5 Solution d'hydroxyde de sodium, de fraction massique $w(\text{NaOH}) = 50 \%$ dans l'eau.

Il convient que le réactif contienne le moins possible de carbonate et de mercure. Ne pas agiter ou mélanger la solution avant utilisation. Une solution d'hydroxycarbonate de sodium appropriée disponible dans le commerce peut également être utilisée.

5.6 Acide chlorhydrique concentré (HCl), fraction massique de 36 % à 38 % dans l'eau.

5.7 Solution aqueuse d'acide chlorhydrique, $c = 1 \text{ mol/l}$.

Introduire 500 ml d'eau et 83 ml d'HCl concentré (5.6) dans une fiole jaugée de 1 000 ml (6.2) et, après refroidissement, diluer avec de l'eau jusqu'au repère et homogénéiser.

5.8 Acétonitrile (qualité HPLC).

5.9 Acétonitrile dans l'eau, à une fraction volumique de 5 % dans l'eau.

Introduire 50 ml d'acétonitrile (5.8) dans une fiole jaugée de 1 000 ml (6.2), diluer avec de l'eau de grade 3 jusqu'au repère et homogénéiser.

5.10 Acétate de sodium anhydre (CH_3COONa) (qualité HPLC).

5.11 Éluant 1 (E1), solution aqueuse d'acétate de sodium (CH_3COONa), $c = 1,0 \text{ mol/l}$.

Introduire environ 800 ml d'eau dégazée de grade 1 (éluant 3, 5.13) et 82,0 g d'acétate de sodium (5.10) dans une fiole jaugée de 1 000 ml (6.2). Diluer ensuite la solution aqueuse à l'aide d'eau dégazée (éluant 3, 5.13) jusqu'au repère et homogénéiser. Conserver l'éluant sous atmosphère inerte.

5.12 Éluant 2 (E2), solution aqueuse d'hydroxyde de sodium exempte de carbonate (NaOH), $c = 0,2 \text{ mol/l}$.

Introduire environ 800 ml d'eau dégazée de grade 1 (éluant 3, 5.13) dans une fiole jaugée de 1 000 ml (6.2) et purger avec de l'hélium pendant 15 min. Ajouter 16,0 g de solution d'hydroxyde de sodium (5.5). Diluer ensuite rapidement la solution aqueuse à l'aide d'eau dégazée de grade 1 (éluant 3, 5.13) jusqu'au repère, fermer immédiatement la fiole et homogénéiser. Conserver l'éluant sous atmosphère inerte.

5.13 Éluant 3 (E3), eau dégazée de grade 1, conservée sous atmosphère inerte.

5.14 Éluant 4 (E4), solution aqueuse d'acétate de sodium (CH_3COONa), $c = 0,025 \text{ mol/l}$.

Introduire environ 800 ml d'eau dégazée de grade 1 (éluant 3, [5.13](#)) et 2,05 g d'acétate de sodium ([5.10](#)) dans une fiole jaugée de 1 000 ml ([6.2](#)). Diluer ensuite la solution aqueuse à l'aide d'eau dégazée (éluant 3, [5.13](#)) jusqu'au repère et homogénéiser. Conserver l'éluant sous atmosphère inerte.

5.15 Réactif post-colonne, solution aqueuse d'hydroxyde de sodium, $c = 0,3 \text{ mol/l}$.

Introduire environ 800 ml d'eau dégazée de grade 1 (éluant 3, [5.13](#)) dans une fiole jaugée de 1 000 ml ([6.2](#)). Purger avec de l'hélium pendant 15 min. Ajouter 24,0 g de solution d'hydroxyde de sodium ([5.5](#)) et compléter rapidement jusqu'au repère avec de l'eau dégazée de grade 1 (éluant 3, [5.13](#)). Fermer immédiatement la fiole et homogénéiser. Conserver le réactif post-colonne sous atmosphère inerte.

IMPORTANT — Il est extrêmement important d'éliminer le dioxyde de carbone dissous dans les éluants et le réactif post-colonne avant et en cours d'utilisation pour éviter une réduction rapide de la sensibilité du détecteur. Les éluants et le réactif post-colonne sont maintenus dans un environnement de gaz inerte en cours d'utilisation.

5.16 Mélange d'une fraction volumique de 95 % d'éthanol (avec une fraction volumique de 96 % d'éthanol et de 4 % d'eau) et d'une fraction volumique de 5 % de méthanol.

5.17 Hexacyanoferrate (II) de potassium trihydraté, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

5.18 Acétate de zinc dihydraté, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

5.19 Acide acétique glacial.

5.20 Réactif de Carrez I.

Introduire 106 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ([5.17](#)) dans une fiole jaugée de 1 000 ml ([6.2](#)), dissoudre à l'aide de 800 ml d'eau ([5.1](#)) et diluer à l'eau de grade 3 jusqu'au repère. Conserver le réactif de Carrez I au réfrigérateur.

5.21 Réactif de Carrez II.

Introduire 220 g de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ([5.18](#)) dans une fiole jaugée de 1 000 ml ([6.2](#)), dissoudre à l'aide de 800 ml d'eau, ajouter 30 ml d'acide acétique glacial ([5.19](#)), et diluer à l'eau de grade 3 jusqu'au repère. Conserver le réactif de Carrez II au réfrigérateur.

IMPORTANT — Ne pas utiliser le réactif de Carrez II en présence de sulfate de zinc.

5.22 Solution tampon d'acide pipérazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique) (PIPES) ($c = 1,5 \text{ mol/l}$ et $\text{pH} = 6,9$).

Introduire 22,5 g de solution tampon de PIPES dans une fiole conique de 100 ml et ajouter 20 ml de solution d'hydroxyde de sodium ([5.3](#)). Ajuster le pH à $\text{pH} = 6,9$ à l'aide de NaOH à 33 % ([5.4](#)) dans l'eau. Transférer quantitativement la solution tampon de PIPES dans un tube étalonné de 50 ml et compléter avec de l'eau de grade 3 jusqu'à atteindre 50 ml. Le pH de la solution tampon ainsi obtenue doit être compris entre 6,8 et 7,0.

5.23 Arabinose.

5.24 Galactose.

5.25 Glucose.

5.26 Fructose.

5.25 Saccharose.

5.28 Lactose.

5.29 Maltose.

5.30 Solution mère d'étalon interne d'arabinose.

Peser, au mg près, environ 7 g d'arabinose (5.23) dans une fiole jaugée de 50 ml (6.2). Ajouter environ 30 ml d'eau de grade 3 et dissoudre l'arabinose. Ajouter 2,5 ml d'acétonitrile (5.8), compléter jusqu'au repère avec de l'eau et homogénéiser la solution.

5.31 Solution mère d'étalon de sucre.

Peser, à 0,1 mg près, environ 260 mg des monosaccharides galactose (5.24), glucose (5.25) et fructose (5.26) et environ 400 mg des disaccharides saccharose (5.27), lactose (5.28) et maltose (5.29) dans une fiole jaugée de 500 ml (6.2). Ajouter environ 200 ml d'eau de grade 3 et dissoudre les sucres. Ajouter 25 ml d'acétonitrile (5.8), compléter jusqu'au repère avec de l'eau de grade 3, et homogénéiser la solution.

5.32 Solutions étalons de sucre pour l'étalonnage.

Préparer les différentes dilutions des solutions d'étalonnage de sucre indiquées dans le Tableau 1. Mélanger les volumes indiqués de solution mère d'étalon interne d'arabinose (5.30) et de solution mère d'étalon de sucre (5.31) dans une fiole jaugée de 200 ml, ajouter environ 50 ml d'eau de grade 3 et homogénéiser. Ajouter 10 ml d'acétonitrile (5.8), compléter jusqu'au repère avec de l'eau et homogénéiser.

ISO 22184:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2ace7e8f-16d5-470c-a059-7da55e365819/iso-22184-2021>

Tableau 1 — Préparation des solutions étalons de sucre en vue de l'étalonnage

Solution étalon de sucre	Volume de solution mère d'étalon de sucre (5.31) ml	Volume de solution mère d'étalon interne d'arabinose (5.30) ml
1	0,2	0,050
2	1,0	0,050
3	6,0	0,050
4	10,0	0,050
5	20,0	0,050
6	40,0	0,050
7	80,0	0,050
8	100,0	0,050

6 Appareillage

6.1 Balance analytique, d'une précision de $\pm 0,1$ mg.

6.2 Fioles jaugées, de 50 ml, 500 ml et 1 000 ml.

6.3 pH-mètre.

6.4 Papier filtre à bande noire.

6.5 Tubes de centrifugation.

6.6 Homogénéisateur¹⁾.

6.7 Agitateur vortex.

6.8 Tubes gradués fermés par un bouchon à vis, d'un volume de 50 ml.

6.9 Multipipette à déplacement positif.

6.10 Distributeurs, résistants aux solvants organiques et réglés sur 2,5 ml et 25 ml.

6.11 Flacons HPLC.

6.12 Système chromatographique ne contenant aucun composant métallique, par exemple, un ICS 3000 de Thermo Dionex²⁾, pouvant être utilisé pour une élution avec un gradient quaternaire.

6.13 Four pour colonne, avec une stabilité de température de ± 1 °C et une température de fonctionnement de 20 °C à 35 °C.

6.14 Colonne analytique d'échange d'anions à haute performance³⁾, garnie d'une résine de polystyrène-divinylbenzène pelliculaire ou garnie d'une résine d'échange d'anions permettant la séparation requise.

6.15 Colonne de garde d'échange d'anions à haute performance⁴⁾, garnie d'une résine de polystyrène-divinylbenzène pelliculaire ou garnie d'une résine d'échange d'anions permettant la séparation requise.

6.16 Détecteur par ampérométrie pulsée (PAD)⁵⁾ avec une stabilité de ± 1 °C et une plage de température de fonctionnement de 20 °C à 35 °C.

Utiliser la détection par ampérométrie pulsée et les réglages de potentiel ainsi que les formes d'onde recommandés par le fournisseur de l'instrument. Des exemples de réglages de potentiel du détecteur (par rapport à la référence Ag/AgCl) sont présentés dans le [Tableau 2](#).

1) Un Ultraturrax équipé d'une sonde adaptée est un exemple d'homogénéisateur approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ce produit.

2) Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ce produit.

3) Une colonne analytique Carbowac PA1 (2 mm × 250 mm) de Thermo-Dionex est un exemple de colonne d'échange d'anions à haute performance adaptée disponible sur le marché. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ce produit.

4) Une colonne de garde Carbowac PA1 de Dionex (2 mm × 50 mm) est un exemple de colonne d'échange d'anions à haute performance adaptée disponible sur le marché. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ce produit.

5) Un modèle de PAD de Thermo-Dionex est un exemple de PAD adapté disponible sur le marché. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ce produit.