

---

---

**Fromage, croûte de fromage et  
fromages fondus — Détermination de  
la teneur en natamycine —**

Partie 2:

**Méthode par chromatographie liquide  
à haute performance pour fromage,  
croûte de fromage et fromages fondus**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Cheese, cheese rind and processed cheese — Determination of  
natamycin content —*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/898c1447-e4ba-41c9-919f-f01d64b578c7/iso-9233-2-2018>

*Part 2: High-performance liquid chromatographic method for cheese,  
cheese rind and processed cheese*



## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 9233-2:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/898c1447-e4bc-4dc9-9f9f-f0dd64b575c7/iso-9233-2-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/898c1447-e4bc-4dc9-9f9f-f0dd64b575c7/iso-9233-2-2018>



### DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en oeuvre, 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, Geneva  
Tél.: +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)

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](mailto:info@fil-idf.org)  
Web: [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

Publié en Suisse

# Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>5</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>2</b>
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>3</b>
<b>8</b> <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	<b>3</b>
8.1    Croûte de fromage.....	3
8.2    Intérieur du fromage et fromage fondu.....	4
<b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>4</b>
9.1    Prise d'essai.....	4
9.1.1    Croûte de fromage.....	4
9.1.2    Intérieur du fromage et fromage fondu.....	4
9.2    Préparation de la solution d'essai.....	4
9.2.1    Croûte de fromage.....	4
9.2.2    Intérieur du fromage et fromage fondu.....	5
9.3    Détermination.....	5
9.3.1    Limites de détection et de détermination.....	5
9.3.2    Réglage de la chromatographie liquide (6.14).....	5
9.3.3    Courbe d'étalonnage.....	5
9.3.4    Solution d'essai.....	6
9.3.5    Faible teneur en natamycine.....	6
<b>10</b> <b>Calcul et expression des résultats</b> .....	<b>6</b>
10.1    Calcul de la fraction massique de la natamycine.....	6
10.2    Calcul de la masse, exprimée par rapport à la surface, de natamycine.....	7
10.3    Correction des résultats.....	7
10.4    Expression des résultats.....	7
<b>11</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>8</b>
11.1    Essais interlaboratoires.....	8
11.2    Répétabilité.....	8
11.3    Reproductibilité.....	8
<b>12</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>8</b>
<b>Annexe A (informative) Exemples</b> .....	<b>9</b>
<b>Annexe B (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires</b> .....	<b>11</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>12</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 (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](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 dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://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 le lien suivant: [www.iso.org/iso/avant-propos.html](http://www.iso.org/iso/avant-propos.html).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et par la Fédération internationale du lait (FIL). Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 9233-2 | FIL 140-2:2007), dont elle constitue une révision mineure en vue d'intégrer l'amendement ISO 9233-2:2007/Amd.1:2012.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 9233 | FIL 140 peut être consultée sur le site de l'ISO.

**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](http://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 chargé des *Méthodes d'analyse pour les additifs et les contaminants* de la Fédération internationale du lait (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.

Les travaux ont été confiés à l'Équipe d'Action mixte ISO-FIL, *Additifs et vitamines sélectionnés*, du Comité permanent chargé des *Méthodes d'analyse pour les additifs et les contaminants*, sous la conduite de son chef de projet, Monsieur M. Carl (DE).

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 9233-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/898c1447-e4bc-4dc9-9f9f-f0dd64b575c7/iso-9233-2-2018>

# Fromage, croûte de fromage et fromages fondus — Détermination de la teneur en natamycine —

Partie 2:

## Méthode par chromatographie liquide à haute performance pour fromage, croûte de fromage et fromages fondus

### 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de la teneur en natamycine présente dans le fromage, la croûte de fromage et les fromages fondus supérieure à 0,5 mg/kg et de la masse, exprimée par rapport à la surface, de natamycine de la croûte de fromage supérieure à 0,03 mg/dm<sup>2</sup>.

### 2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

### 3 Termes et définitions

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

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

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>

#### 3.1

##### **teneur en natamycine**

fraction massique de substances déterminée par le mode opératoire spécifié dans le présent document

Note 1 à l'article: La teneur en natamycine est exprimée en milligrammes par kilogramme.

#### 3.2

##### **masse, exprimée par rapport à la surface, de natamycine de la croûte de fromage**

masse, exprimée par rapport à la surface, de substances déterminée par le mode opératoire spécifié dans le présent document

Note 1 à l'article: La masse, exprimée par rapport à la surface, de natamycine est exprimée en milligrammes de natamycine par décimètre carré de croûte de fromage.

#### 3.3

##### **croûte de fromage**

couche extérieure du fromage, à l'exclusion de l'enrobage, si ce dernier est présent

## 4 Principe

Une quantité connue d'échantillon est extraite à l'aide de méthanol. L'extrait est dilué avec de l'eau, puis refroidi entre -15 °C et -20 °C pour précipiter la majeure partie de la matière grasse, et ensuite filtré. La teneur en natamycine ou la masse, exprimée par rapport à la surface, de natamycine est déterminée dans le filtrat (après concentration, si nécessaire) par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

## 5 Réactifs

Sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

**5.1 Méthanol** (CH<sub>3</sub>OH).

**5.2 Méthanol**, solution aqueuse.

Mélanger deux volumes de méthanol (5.1) avec un volume d'eau.

**5.3 Solution étalon mère de natamycine**, ayant une concentration de 500 mg/l.

Immédiatement avant emploi, dissoudre dans une fiole jaugée à un trait de capacité 100 ml (6.1) une quantité d'une préparation à teneur connue en natamycine, correspondant à 50 mg de natamycine pure (C<sub>33</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>13</sub>) dans du méthanol (5.1). Compléter au trait repère avec de l'eau et mélanger.

**5.4 Solution étalon de travail de natamycine**, ayant une concentration de 5 mg/l.

Introduire au moyen d'une pipette dans une fiole jaugée à un trait de capacité 50 ml (6.1) 5,0 ml de la solution étalon mère de natamycine (5.3). Diluer au trait avec la solution aqueuse de méthanol (5.2), puis mélanger.

Introduire au moyen d'une pipette dans une autre fiole jaugée à un trait de capacité 50 ml (6.1) 5,0 ml de la solution ainsi diluée. Diluer au trait avec la solution aqueuse de méthanol (5.2), puis mélanger. 1 ml de cette solution étalon de travail contient 5 µg/ml de natamycine.

La concentration de la solution étalon de travail de natamycine doit être proche de celle de la solution d'essai mesurée en 9.3.3. Ajuster la dilution étalon de travail en pipettant et diluant une autre quantité, si nécessaire.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/898c1447-e4bc-4dc9-9f9f-f0dd64b575c7/iso-9233-2-2018>

**5.5 Acide acétique** (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H), glacial.

## 6 Appareillage

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

**6.1 Fioles jaugées à un trait**, d'une capacité de 50 ml et 100 ml.

**6.2 Appareil à trancher ou appareil similaire**, capable de découper des portions de fromage de 5 mm d'épaisseur et d'environ 30 mm de large (voir l'exemple donné à la Figure A.1).

**6.3 Appareil à trancher fin**, capable de découper de fines tranches de fromage d'une épaisseur maximale de 1 mm (voir l'exemple donné à la Figure A.2).

**6.4 Broyeur ou mélangeur**.

**6.5 Couteau aiguisé**, capable de découper des tranches de fromage en petits morceaux.

**6.6 Agitateur magnétique ou appareil à secouer**.

**6.7 Fioles coniques**, d'une capacité de 100 ml et 200 ml, en verre teinté et munies de bouchons en verre rodé.

**6.8 Seringues, jetables**, de capacité 10 ml.

**6.9 Microfiltres à membrane**, de 0,20  $\mu\text{m}$  et 0,45  $\mu\text{m}$  de grosseur de pore, résistants à l'attaque par des solutions alcooliques.

**6.10 Papiers filtres plissés, à filtration rapide**, de 150 mm de diamètre. (par exemple, S & S n° 595 1/2<sup>1</sup>).

**6.11 Entonnoir**, d'environ 70 mm de diamètre.

**6.12 Congélateur**, capable de maintenir une température comprise entre -15 °C et -20 °C.

**6.13 Cartouches d'extraction**, pour concentrer l'extrait filtré, si nécessaire (par exemple, Sep-pack C18<sup>1</sup>) ou Waters No. 51910<sup>1</sup>)

**6.14 Chromatographe liquide**, équipé d'un détecteur UV, capable d'effectuer des mesures à 303 nm et muni d'un enregistreur et/ou d'un intégrateur.

**6.15 Colonne analytique**, de 150 mm de long et 4,6 mm de diamètre intérieur, type C8, dimension des particules 5  $\mu\text{m}$  (par exemple Lichrosorb RP8<sup>1</sup>).

**6.16 Colonne de garde**, de 100 mm de long et 2,1 mm de diamètre intérieur, type C8, dimension des particules 30  $\mu\text{m}$  à 40  $\mu\text{m}$  (par exemple Perisorb RP8<sup>1</sup>).

**6.17 Récipient**, d'une capacité appropriée.

ITeH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

## 7 Échantillonnage

Il convient que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié pendant le transport ou l'entreposage.

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

L'échantillon de laboratoire doit être constitué d'un fromage entier ou d'une portion de fromage représentative de l'ensemble.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

### 8.1 Croûte de fromage

Si nécessaire, couper l'échantillon pour essai en sections ou en portions de plus faible dimension de telle sorte que la largeur du morceau de croûte n'excède pas 30 mm environ. Retirer la totalité de la croûte sur une épaisseur de 5 mm de toutes les sections ou portions ainsi obtenues, à l'exclusion de l'enrobage, si ce dernier est présent, en utilisant l'appareil à trancher (6.2).

NOTE Le présent document peut également être utilisé pour l'analyse de la croûte de fromage, y compris l'enrobage.

À partir de la croûte obtenue, découper un morceau rectangulaire d'une superficie comprise entre 2 dm<sup>2</sup> et 4 dm<sup>2</sup> à l'aide d'un couteau aiguisé (6.5). Déterminer sa surface, en décimètres carrés, et sa masse, en kilogrammes.

---

1) Ceci est un 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 et la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

Broyer (6.4) soigneusement toute la croûte, y compris le morceau pesé et mesuré, et bien mélanger. Transférer immédiatement une quantité de l'échantillon ainsi préparé dans un récipient (6.17).

Après préparation de chaque échantillon pour essai, nettoyer tous les instruments ayant été en contact avec le fromage ou la croûte, tout d'abord à l'eau chaude, puis au méthanol (5.1). Les sécher soigneusement, par exemple au moyen d'un jet d'air comprimé.

## 8.2 Intérieur du fromage et fromage fondu

Après avoir retiré la croûte (8.1), découper une tranche d'une épaisseur maximale de 1 mm, prise sur toute la surface extérieure de l'échantillon pour essai, en utilisant pour ce faire l'appareil à trancher fin (6.3).

Débiter toutes les tranches de fromage en petits morceaux d'environ 50 mm<sup>2</sup> et mélanger soigneusement. Transférer immédiatement une quantité de l'échantillon ainsi préparé dans un récipient (6.17).

Après préparation de chaque échantillon pour essai, nettoyer tous les instruments ayant été en contact avec l'échantillon pour essai, tout d'abord à l'eau chaude, puis au méthanol (5.1). Les sécher soigneusement, par exemple au moyen d'un jet d'air comprimé.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Prise d'essai

#### 9.1.1 Croûte de fromage iTeh STANDARD PREVIEW

Peser, à 10 mg près, environ 10,00 g de l'échantillon pour essai (8.1) et les transférer dans une fiole conique de capacité 200 ml (6.7).

#### 9.1.2 Intérieur du fromage et fromage fondu

Peser à 10 mg près environ 5,00 g de l'échantillon pour essai (8.2) et les transférer dans une fiole conique de capacité 100 ml (6.7).

### 9.2 Préparation de la solution d'essai

#### 9.2.1 Croûte de fromage

##### 9.2.1.1 Préparation

Ajouter 100 ml de méthanol (5.1) à la prise d'essai dans la fiole conique (9.1.1) Mélanger le contenu de la fiole pendant 90 min au moyen d'un agitateur magnétique (6.6) ou secouer pendant 90 min dans l'appareil à secouer (6.6).

Ajouter 50 ml d'eau. Placer immédiatement la fiole conique au congélateur (6.12) pendant environ 60 min.

##### 9.2.1.2 Filtration

Filtrer l'extrait froid au travers d'un papier-filtre plissé (6.10), en éliminant les premiers 5 ml de filtrat. Il convient d'effectuer la filtration pendant que la suspension est encore froide afin d'éviter la dissolution de la matière grasse et par là même l'obtention de filtrats troubles.

Amener le filtrat à température ambiante. Prélever une quantité du filtrat dans une seringue (6.8). Filtrer au travers d'un premier microfiltre de grosseur de pore 0,45 µm (6.9), puis au travers d'un second microfiltre de grosseur de pore de 0,20 µm (6.9).

La quantité minimale de solution d'essai (filtrat) requise est de 20 µl par injection pour une mesure chromatographique directe (9.3.4) et de 25 ml et 50 ml respectivement pour des concentrations de 5 fois et de 10 fois dans le cas de faibles teneurs en natamycine (9.3.5).

## 9.2.2 Intérieur du fromage et fromage fondu

### 9.2.2.1 Préparation

Ajouter, en utilisant une éprouvette graduée, 50 ml de méthanol (5.1) à la prise d'essai dans la fiole conique (9.1.2). Mélanger le contenu de la fiole pendant 90 min au moyen d'un agitateur magnétique (6.6) ou secouer pendant 90 min dans l'appareil à secouer (6.6).

Utiliser une éprouvette graduée, pour ajouter 25 ml d'eau. Placer immédiatement la fiole conique au congélateur (6.12) pendant environ 60 min.

### 9.2.2.2 Filtration

Filtrer la solution de la manière décrite en 9.2.1.2.

## 9.3 Détermination

### 9.3.1 Limites de détection et de détermination

Le laboratoire mettant en œuvre la méthode doit établir les limites de détection et de détermination selon ses propres conditions instrumentales en utilisant des méthodes de calcul reconnues pour vérifier que la teneur en natamycine peut être déterminée à des limites inférieures de 0,5 mg/kg et 0,03 mg/dm<sup>2</sup>.

### 9.3.2 Réglage de la chromatographie liquide (6.14)

Les conditions de chromatographie suivantes sont recommandées.

Phase mobile: Méthanol (5.1):eau:acide acétique (5.5) — avec un rapport 12:8:1 (fraction volumique)

Débit: 1 ml/min

Détecteur: 303 nm, 0,005 unité d'absorbance, pleine échelle

Enregistreur: 10 mV

Nombre de plateaux théoriques (types): 1 500 minimum

Lorsqu'une colonne autre que celle donnée en exemple (6.15) est utilisée, ajuster le rapport méthanol/eau. Toutefois, la quantité relative d'acide acétique (5.5) spécifiée par rapport au méthanol est essentielle pour maintenir l'absorbance maximale à 303 nm.

Avant chaque série d'échantillons, un étalon à teneur connue en natamycine doit être injecté pour déterminer le temps de rétention et pour vérifier la courbe d'étalonnage (9.3.3).

La natamycine étant instable dans la solution aqueuse de méthanol, effectuer la mesure aussi rapidement que possible.

### 9.3.3 Courbe d'étalonnage

Transférer, à l'aide d'une pipette, respectivement 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml et 8 ml de la solution étalon de travail de natamycine (5.4) dans une série de fioles jaugées à un trait de capacité 50 ml (6.1). Diluer au trait avec la solution aqueuse de méthanol (5.2), puis mélanger.