

ISO/TC 34/SC 5

Date: 2020-01

Deleted: 12

ISO 23293 | FIL 247:2020(F)

Deleted: /PRF

ISO/TC 34/SC 5

Secrétariat: NEN

**Formules infantiles en poudre à base de lait — Quantification de la teneur en protéine de lactosérum par électrophorèse capillaire sur gel contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-CGE)**

*Milk-based infant formula powders — Quantification of whey protein content by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE)*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 23293:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/112485af-b68b-49ad-99d7-f3ff48939cfb/iso-23293-2020>

© ISO et FIL, 2020

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 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

International Dairy Federation

Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8

Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B

CH-1214 Vernier, Genève

B-1030 Brussels

Tél.: +41 22 749 01 11

Tél.: + 32 2 325 67 40

Fax: +41 22 749 09 47

Fax: + 32 2 325 67 41

E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)

E-mail: [info@fil-idf.org](mailto:info@fil-idf.org)

Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

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

Publié en Suisse

Deleted: 2019

Deleted: Droits de reproduction

Deleted: indication contraire,

Deleted: exigence

Deleted: l'affichage

Deleted: sur

Deleted: Les demandes d'autorisation peuvent

Deleted: adressées

Deleted: ISO Copyright Office  
CP

Deleted: Geneva

Deleted: Email: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Site web:

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 23293:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/112485af-b68b-49ad-99d7-13ff48939cfb/iso-23293-2020>

<b>Sommaire</b>	<b>Page</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>1 Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4 Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>5 Réactifs et matériaux</b> .....	<b>2</b>
<b>6 Appareillage</b> .....	<b>3</b>
<b>7 Mode opératoire</b> .....	<b>3</b>
7.1 Préparation des échantillons .....	3
7.2 Analyse par CGE .....	4
7.3 Traitement de l'électrophérogramme.....	4
7.3.1 Intégration de l'électrophérogramme.....	4
7.3.2 Identification du domaine de la caséine.....	5
<b>8 Aptitude du système</b> .....	<b>5</b>
<b>9 Calcul et expression des résultats</b> .....	<b>5</b>
9.1 Calcul de la teneur en protéine de lactosérum .....	5
9.2 Expression des résultats .....	6
<b>10 Fidélité</b> .....	<b>6</b>
10.1 Essais interlaboratoires .....	6
10.2 Formules infantiles avec une teneur en protéine de lactosérum de 40 % ou plus .....	6
10.2.1 Répétabilité.....	6
10.2.2 Reproductibilité.....	7
10.3 Formules infantiles avec une teneur en protéine de lactosérum inférieure à 40 %.....	7
10.3.1 Répétabilité.....	7
10.3.2 Reproductibilité.....	7
<b>11 Rapport d'essai</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe A (informative) Exemple d'analyse CGE</b> .....	<b>8</b>
<b>Annexe B (informative) Données de fidélité</b> .....	<b>12</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>14</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 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](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 [www.iso.org/avant-propos](http://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* et la Fédération internationale du lait (FIL) en collaboration avec l'AOAC INTERNATIONAL. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément par l'AOAC INTERNATIONAL. La méthode décrite dans le présent document est équivalente à la méthode officielle de l'AOAC 2016.15: *Quantification de la teneur en protéine de lactosérum dans les formules infantiles en poudre à base de lait par électrophorèse capillaire sur gel contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-CGE), Première action 2016, Action finale 2018.*

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](http://www.iso.org/fr/members.html).

Deleted: le lien suivant:

Deleted: [iso/fr/](http://iso/fr/)

Deleted: [.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 sur 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.

Deleted: à

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)).

Deleted: attirée

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.

Deleted: ).

Deleted: ,

Le présent document a été élaboré par le *Comité permanent chargé des Méthodes d'analyse pour la composition (SCAMC)* de la Fédération internationale du lait (FIL) et le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, en collaboration avec l'AOAC INTERNATIONAL. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément par l'AOAC INTERNATIONAL. La méthode décrite dans le présent document est équivalente à la méthode officielle de l'AOAC 2016.15: *Quantification de la teneur en protéine de lactosérum dans les formules infantiles en poudre à base de lait par électrophorèse capillaire sur gel contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-CGE)*, Première action 2016, Action finale 2018.

L'ensemble des travaux a été confié à l'équipe d'action mixte ISO/FIL (C31) du *Comité permanent chargé des Méthodes d'analyse pour la composition*, sous la conduite de son chef de projet, monsieur E. Konings (CH).



# Formules infantiles en poudre à base de lait — Quantification de la teneur en protéine de lactosérum par électrophorèse capillaire sur gel contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-CGE)

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination du rapport protéine de lactosérum/caséine allant de 20:80 à 80:20 dans les formules infantiles en poudre à base de lait de vache.

Cette méthode ne s'applique pas à l'analyse des formules infantiles contenant une protéine hydrolysée ou des protéines provenant d'autres sources (par exemple plantes ou lait d'autres mammifères).

## 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:

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

### 3.1

#### formule infantile

substitut du lait maternel spécialement fabriqué pour satisfaire, par lui-même, les besoins nutritionnels des nourrissons pendant les premiers mois de la vie jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée

[SOURCE: Norme Codex 72-1981]

## 4 Principe

En électrophorèse capillaire sur gel contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-CGE), les protéines dans les échantillons de formule infantile sont dénaturées par le tensioactif anionique SDS et réduites par le  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les protéines liées au SDS et électriquement chargées migrent dans un champ électrique rempli d'un gel de séparation et sont détectées par UV à 220 nm. Les caséines et les protéines de lactosérum sont séparées en deux groupes de pics distincts qui ne se chevauchent pas, dont le rapport peut être établi par intégration des surfaces sans avoir recours à une courbe d'étalonnage. Dans le calcul de la teneur en protéine de lactosérum, une valeur de 1,4 a été utilisée pour le facteur de correction de la masse par rapport à la surface pour les protéines de lactosérum par rapport aux caséines.

## 5 Réactifs et matériaux

Au cours de l'analyse, sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

Les données de l'étude interlaboratoires ont été obtenues avec des produits chimiques provenant du kit SDS-MW 390953 de Beckman Coulter/Sciex<sup>1</sup>. La recette du tampon de séparation SDS-MW décrit ci-dessous (5.1) a été soumise à l'essai lors d'une étude séparée et a été jugée équivalente au tampon de séparation SDS-MW du commerce inclus dans le kit. Un laboratoire a utilisé des réactifs (5.2 à 5.5) «maison». Tous les laboratoires ont utilisé l'étalon interne de protéine 10 kDa (5.6) et l'étalon de taille SDS-MW (5.7) provenant du kit. Avant d'utiliser des étalons équivalents, une vérification est nécessaire.

**5.1 Tampon de séparation SDS-MW**, tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris), acide borique, SDS, EDTA, glycérol et dextran 2000<sup>1</sup>.

Dissoudre 0,726 g de base Tris et 0,371 g d'acide borique dans 9 ml d'eau. Ajouter 20 mg de SDS, 1 g de dextran 2000, 14,6 mg d'EDTA et 1 ml de glycérol. Bien mélanger. Laisser reposer une nuit pour permettre la solubilisation complète du dextran.

NOTE Le dextran 2000 a un poids moléculaire moyen de 2 000 000 Da.

**5.2 Tampon d'échantillon SDS-MW**, 100 mmol/l de Tris, pH 9,0, 1 % de SDS.

Dissoudre 109,4 mg de base Tris, 15,2 mg de chlorhydrate de Tris et 0,1 g de SDS dans 10 ml d'eau.

**5.3 Solution de lavage acide**, acide chlorhydrique, concentration en substance  $c = 0,1$  mol/l.

**5.4 Solution de lavage basique**, hydroxyde de sodium,  $c = 0,1$  mol/l.

**5.5  $\beta$ -mercaptoéthanol**, <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/112485af-b68b-49ad-99d7-13ff48939cfb/iso-23293-2020>

**5.6 Étalon interne de protéine 10 kDa**, concentration massique  $\rho = 5$  mg/ml.

**5.7 Étalon de taille SDS-MW**, 10 à 225 kDa,  $\rho = 16$  mg/ml.

**5.8 Pré-solution avant passage de l'échantillon.**

Mélanger le tampon d'échantillon SDS-MW (5.2) avec l'étalon interne de protéine 10 kDa (5.6) selon un rapport de 84:1. Préparer un volume suffisant basé sur le nombre total d'échantillons à analyser dans le lot d'échantillons (90  $\mu$ l de pré-solution avant le passage de l'échantillon sont nécessaires pour chaque échantillon).

---

<sup>1</sup> Ceci est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée pour des raisons pratiques aux utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuve ou recommande ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

## 6 Appareillage

Verrerie et matériel courants de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

**6.1 Instrument d'électrophorèse capillaire**, muni d'un détecteur UV réglé à 220 nm et pouvant maintenir le capillaire et le passeur d'échantillons à  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

Il convient qu'un logiciel adapté soit disponible pour l'intégration des pics.

**6.2 Capillaires nus en silice fondue**, de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre intérieur  $\times$  30 cm, avec une longueur utile de 20 cm.

**6.3 Bain-marie thermostaté ou bloc chauffant**, pouvant maintenir une température de  $95\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ .

**6.4 Micro-centrifugeuse**, avec des adaptateurs pour flacons de centrifugeuse de 1,5 ml.

**6.5 Agitateur vortex.**

**6.6 Pipettes et embouts ajustables**, d'un volume de 20  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  et 1 000  $\mu\text{l}$ .

**6.7 Flacons de micro-centrifugeuse à verrou de sûreté**, d'un volume de 1,5 ml ou de 2,0 ml.

**6.8 Tubes à centrifuger à fond rond**, d'un volume de 10 ml.

**6.9 Balance analytique**, réalisant des pesées à quatre décimales près.

## 7 Mode opératoire

### 7.1 Préparation des échantillons

**7.1.1** Peser  $500\text{ mg} \pm 20\text{ mg}$  de formule infantile en poudre dans un tube à centrifuger de 10 ml. Un échantillon de poudre de lait écrémé (SMP) est utilisé comme référence pour aligner les domaines des protéines de lactosérum et des caséines dans les échantillons de formules infantiles. Préparer la SMP en utilisant une masse d'échantillon de  $135\text{ mg} \pm 5\text{ mg}$ .

**7.1.2** Disperser l'échantillon dans 5 ml d'eau. Agiter chaque tube dans un agitateur vortex jusqu'à ce que la solution apparaisse homogène. Chaque solution finale contient entre 10 mg/ml et 15 mg/ml de protéine.

**7.1.3** Introduire au moyen d'une pipette 10  $\mu\text{l}$  de chaque solution échantillon dans des flacons de micro-centrifugeuse séparés.

**7.1.4** Ajouter de façon séquentielle 85  $\mu\text{l}$  de la pré-solution avant passage de l'échantillon (5.8) et 5  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoéthanol (5.5) dans chaque flacon de micro-centrifugeuse. Bien mélanger avant de chauffer les flacons dans un bain-marie ou avec un bloc chauffant à  $95\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$  pendant 10 min. Laisser refroidir à la température ambiante. Centrifuger à la température ambiante pendant 1 min à environ 5 000 g (approximativement 7 000 r/min dans une centrifugeuse de table).

**7.1.5** Agiter dans un agitateur vortex avant de transférer chaque échantillon dans les flacons d'injection correspondants.

Deleted: 000 g

## 7.2 Analyse par CGE

**7.2.1** La séparation et la quantification se sont avérées satisfaisantes en suivant les conditions expérimentales ci-dessous.

**7.2.2** Charger les réactifs selon les instructions du fabricant de l'instrument d'électrophorèse capillaire (voir la Figure A.1 pour un exemple).

**7.2.3** Définir une méthode de séparation optimisée pour l'analyse de lots incluant un blanc de réactif (10 µl d'eau à la place de la solution échantillon), un étalon de taille pour le poids moléculaire (5.7) et un échantillon de SMP.

Pour préparer le blanc de réactif, remplacer la solution échantillon (voir 7.1.3) par 10 µl d'eau. Sa fonction est de contrôler toute contamination dans le tampon ou les réactifs (il ne devrait y avoir aucun pic dans la plage de migration de la protéine de lait, comme défini à partir de l'étalon interne de protéine 10 kDa). La SMP sert de référence pour vérifier les durées de migration des protéines de lactosérum et des caséines.

**7.2.4** Pour chaque cycle de séparation (45 min), préconditionner le capillaire tout d'abord avec de la solution de lavage basique (5.4) pendant 3 min, puis de la solution de lavage acide (5.3) pendant 1 min et de l'eau pendant 1 min. Remplir le capillaire avec du tampon de séparation SDS-MW (5.1) pendant 10 min. Régler la durée de la séparation à 30 min.

**7.2.5** Introduire les échantillons électrocinétiquement en appliquant une tension de -5 kV pendant 20 s.

**7.2.6** Réaliser l'électrophorèse à une tension constante avec une intensité de champ de -497 V/cm et un capillaire thermostaté à 25 °C à l'aide d'un liquide de refroidissement recirculant.

**7.2.7** Il convient que l'intensité générée soit d'environ 27 µA.

**7.2.8** Pour éviter l'épuisement du réactif, programmer le système pour incrémenter la position de flacon de tous les réactifs tous les huit cycles.

## 7.3 Traitement de l'électrophérogramme

### 7.3.1 Intégration de l'électrophérogramme

Intégrer automatiquement les électrophérogrammes à partir de la vallée située entre 0,5 min et 1 min avant le pic de l'étalon interne de protéine 10 kDa (inclure tout pic immédiatement adjacent au pic de l'étalon interne de protéine 10 kDa) jusqu'à la vallée comprise entre la fin du pic de κ-caséine et le pic de Ig H et BSA (il convient de ne générer aucun pic négatif du fait de l'intégration). Ensuite, réaliser une intégration manuelle à partir de la vallée avant le pic de Ig H et BSA jusqu'à l'extrémité du dernier pic de l'électrophérogramme (intégrer tous les pics y compris ceux situés après le pic de Ig H et BSA, le cas échéant). Des exemples d'électrophérogrammes incluant les domaines d'intégration automatique et manuelle sont donnés aux Figures A.2 et A.3 pour la SMP et les formules infantiles, respectivement. Des exemples de paramètres d'intégration sont donnés dans le Tableau A.1.

### 7.3.2 Identification du domaine de la caséine

Dans la SMP, la zone d'intégration de la caséine commence juste avant le pic de  $\beta$ -caséine (le pic le plus haut de l'électrophérogramme) et s'arrête à la vallée située entre l'extrémité du pic de  $\kappa$ -caséine et le pic de Ig H et BSA. Pour les formules infantiles, identifier le pic de  $\beta$ -caséine et la vallée par comparaison avec l'électrophérogramme de la SMP.

## 8 Aptitude du système

### 8.1 Généralités

Étudier l'aptitude du système en utilisant l'étalon interne de protéine 10 kDa (5.6) et l'étalon de taille SDS-MW (5.7). Définir au préalable la durée de migration de l'étalon interne de protéine 10 kDa pour chaque combinaison instrument, capillaire et réactifs. Les critères d'acceptation pour l'aptitude du système sont les suivants.

**8.2** Il convient que la durée de migration de l'étalon interne de protéine 10 kDa corresponde à la valeur initialement établie à  $\pm 5\%$  près. Il convient que les sept marqueurs MW (10 kDa, 20 kDa, 35 kDa, 50 kDa, 100 kDa, 150 kDa et 225 kDa) soient complètement séparés (voir la Figure A.4).

**EXEMPLE** Avec un instrument, des capillaires et des réactifs de Beckman Coulter/Sciex<sup>2</sup>, la durée de migration de l'étalon interne de protéine 10 kDa est de 12,3 min  $\pm$  0,5 min, et les sept marqueurs MW sont complètement séparés en moins de 30 min (voir la Figure A.4).

**8.3** Les critères d'acceptation pour les cycles de séparation sont les suivants:

- il convient que la durée de migration de l'étalon interne de protéine 10 kDa corresponde à la valeur initialement établie à  $\pm 5\%$  près;
- il convient que le degré de chute de la ligne de base à partir de l'étalon interne jusqu'à la vallée située entre la fin des pics de  $\kappa$ -caséine et de Ig H et BSA ne dépasse pas 25 % de la hauteur du pic de l'étalon interne de protéine dans l'échantillon.

## 9 Calcul et expression des résultats

### 9.1 Calcul de la teneur en protéine de lactosérum

Additionner séparément les surfaces des pics dans trois domaines, deux à chaque extrémité de l'électrophérogramme (protéines de lactosérum avec le poids moléculaire le plus bas et le plus élevé), et un au centre. Le domaine central correspond aux protéines de caséine ( $A_{cn}$ ) et les deux autres sont additionnés pour obtenir les protéines de lactosérum ( $A_w$ ). Il convient que la surface de l'étalon interne ne soit pas incluse dans le calcul de  $A_w$ . Se référer au passage à blanc pour identifier les produits de dégradation potentiels de l'étalon interne de protéine 10 kDa. Le cas échéant, il convient de ne pas les inclure dans le calcul de  $A_w$ .

---

<sup>2</sup> Ceci est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Ces informations sont données par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne sauraient constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ce produit.