



## NORME INTERNATIONALE ISO 3356-1975 (F)/AMENDEMENT 2

Publié 1975-11-01

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION · МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ · ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

### iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

Lait et lait sec, babeurre et poudre de babeurre, sérum et poudre de sérum — Détermination de l'activité phosphatasique (Méthode de référence)

[ISO 3356:1975](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/66cc5bf9-b6dc-4c33-a091-82e98f29ba3f/iso-3356-1975>

#### AMENDEMENT 2

*Avant-propos (Page de couverture intérieure)*

Ajouter à la fin :

« Cette Norme Internationale a été élaborée conjointement avec la FIL (Fédération Internationale de Laiterie) et l'AOAC (Association des Chimistes Analytiques Officiels, U.S.A.) sur la base d'un projet FIL. Le texte, approuvé par les organisations susmentionnées, a été également publié par la FIL (Norme FIL n° 63) et par l'AOAC (Official Methods of Analysis). »

Page blanche

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

ISO 3356:1975

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/66cc5bf9-b6dc-4c33-a091-82e98f29ba3f/iso-3356-1975>

---

# NORME INTERNATIONALE **ISO** 3356



---

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION · МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ · ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

---

## Lait et lait sec, babeurre et poudre de babeurre, sérum et poudre de sérum — Détermination de l'activité phosphatasique (Méthode de référence)

*Milk and dried milk, buttermilk and buttermilk powder, whey and whey powder — Determination of phosphatase activity (Reference method)*

Première édition — 1975-07-15

**(standards.iteh.ai)**

[ISO 3356:1975](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/66cc5b9-b6dc-4c33-a091-82e98f29ba3f/iso-3356-1975)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/66cc5b9-b6dc-4c33-a091-82e98f29ba3f/iso-3356-1975>

---

CDU 637.14 : 545

Réf. n° : ISO 3356-1975 (F)

Descripteurs : produit laitier, lait, babeurre, lait en poudre, petit-lait, analyse chimique, dosage, activité enzymatique, phosphatase.

## AVANT-PROPOS

L'ISO (Organisation Internationale de Normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (Comités Membres ISO). L'élaboration de Normes Internationales est confiée aux Comités Techniques ISO. Chaque Comité Membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du Comité Technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les Projets de Normes Internationales adoptés par les Comités Techniques sont soumis aux Comités Membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes Internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme Internationale ISO 3356 a été établie par le Comité Technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et soumise aux Comités Membres en avril 1974.

Elle a été approuvée par les Comités Membres des pays suivants :

Afrique du Sud, Rép. d'	France	Pays-Bas
Allemagne	Hongrie	Pologne
Autriche	Inde	Roumanie
Belgique	Iran	Tchécoslovaquie
Bulgarie	Irlande	Thaïlande
Canada	Israël	Turquie
Chili	Italie	U.R.S.S.
Espagne	Nouvelle-Zélande	Yougoslavie

Le Comité Membre du pays suivant a désapprouvé le document pour des raisons techniques :

Royaume-Uni

# Lait et lait sec, babeurre et poudre de babeurre, sérum et poudre de sérum – Détermination de l'activité phosphatasique (Méthode de référence)

## 1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente Norme Internationale spécifie une méthode de référence pour la détermination de l'activité phosphatasique du lait et du lait sec, du babeurre et de la poudre de babeurre, ainsi que du sérum et de la poudre de sérum.

La méthode peut être utilisée pour contrôler si la pasteurisation de ces produits a été effectuée correctement.

## 2 RÉFÉRENCE

ISO/R 707, *Lait et produits laitiers – Méthode d'échantillonnage*.

## 3 DÉFINITION

Dans le cadre de la présente Norme Internationale, la définition suivante est applicable :

**activité phosphatasique** : Quantité de phosphatase alcaline active présente dans un produit, exprimée par le nombre de microgrammes de phénol libéré, dans les conditions spécifiées, par 1 ml de produit liquide ou, s'il s'agit de produits déshydratés, par 1 ml de produit liquide reconstitué.

## 4 PRINCIPE

Dilution du produit liquide ou du produit liquide reconstitué avec une solution tampon de pH 10,6 contenant du phénylphosphate de sodium et incubation durant 1 h à 37 °C, libérant du phénol par réaction avec la phosphatase alcaline présente dans le produit. Réaction du phénol avec le dibromoquinonechlorimide et mesurage photométrique de la coloration obtenue.

## 5 RÉACTIFS

Les réactifs doivent être de pureté analytique, et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de pureté au moins équivalente rendue exempte de dioxyde de carbone.

### 5.1 Tampon borate-hydroxyde de baryum.

5.1.1 Dissoudre dans l'eau 50,0 g d'hydroxyde de baryum  $[\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$  exempt de carbonate. Compléter à 1 000 ml.

5.1.2 Dissoudre 22,0 g d'acide borique ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) dans l'eau et compléter à 1 000 ml.

5.1.3 Chauffer à 50 °C 500 ml de chacune de ces solutions, les mélanger, agiter, refroidir rapidement à 20 °C, ajuster le pH, si nécessaire, à  $10,6 \pm 0,1$  par addition de solution 5.1.1 ou 5.1.2, puis filtrer.

Conserver la solution dans un récipient bouché hermétiquement.

Avant utilisation, diluer la solution avec un égal volume d'eau.

### 5.2 Tampon pour le développement de la coloration.

Dissoudre dans l'eau 6,0 g de métaborate de sodium ( $\text{NaBO}_2$ ) ou 12,6 g de  $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  et 20,0 g de chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) et compléter à 1 000 ml.

### 5.3 Tampon de couleur dilué.

Prendre 10 ml du tampon pour le développement de la coloration (5.2) et diluer à 100 ml avec de l'eau.

### 5.4 Substrat tamponné.

Dissoudre 0,5 g de phénylphosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dans 4,5 ml de tampon pour le développement de la coloration (5.2), ajouter 2 gouttes de la solution de BQC (5.6) et laisser reposer à la température ambiante durant 30 min. Au moyen de 2,5 ml de butanol-1, extraire la coloration obtenue et laisser reposer jusqu'à séparation du butanol-1. Soutirer et éliminer le butanol-1. Recommencer l'extraction, si nécessaire.

La solution peut être conservée quelques jours au réfrigérateur. Développer la couleur et extraire à nouveau avant l'emploi. Préparer le substrat tamponné, immédiatement avant emploi, en diluant 1 ml de cette solution et en complétant à 100 ml avec le tampon borate-hydroxyde de baryum (5.1).

### 5.5 Défécant cuivre-zinc.

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(II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) et compléter à 100 ml.

### 5.6 2,6-dibromoquinonechlorimide, solution (Réactif de Gibbs).

Dissoudre  $40 \pm 1$  mg de 2,6-dibromoquinonechlorimide (BQC) ( $\text{O} = \text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2 = \text{NCl}$ ) dans 10 ml d'éthanol à 96 % (V/V).

## ISO 3356-1975 (F)

Conserver au réfrigérateur dans un récipient de couleur foncée. Rejeter la solution si elle change de couleur ou si elle a plus de 1 mois.

### 5.7 Sulfate de cuivre(II), solution.

Dissoudre dans l'eau 0,05 g de sulfate de cuivre(II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) et compléter à 100 ml.

### 5.8 Hydroxyde de sodium, solution 0,5 N.

### 5.9 Phénol, solution étalon.

**5.9.1** Peser  $200 \pm 2$  mg de phénol pur anhydre, les transvaser dans une fiole jaugée de 100 ml, compléter avec de l'eau jusqu'au trait repère et mélanger.

Cette solution mère reste stable plusieurs mois au réfrigérateur.

**5.9.2** Prendre 10 ml de cette solution mère, compléter à 100 ml avec de l'eau et mélanger.

1 ml de cette solution contient  $200 \mu\text{g}$  de phénol.

## 6 APPAREILLAGE

### NOTES

1 Toute la verrerie, les bouchons et le matériel de prélèvement doivent être soigneusement nettoyés. Il est conseillé de les rincer à l'eau distillée récemment bouillie ou de les passer à la vapeur d'eau.

2 Certains types de fermeture en matière plastique peuvent provoquer une contamination phénolique; il faut donc éviter de les utiliser.

### 6.1 Balance analytique.

### 6.2 Bain d'eau, réglable à $37 \pm 1$ °C.

**6.3 Spectrophotomètre**, permettant d'effectuer des lectures à une longueur d'onde de 610 nm.

**6.4 Tubes à essais**, 16 ou 18 mm X 150 mm, de préférence gradués à 5 et 10 ml.

**6.5 Pipettes**, graduées de 1 et 10 ml (ISO/R 835).

**6.6 Entonnoirs en verre**, de dimensions convenables, par exemple de 5 cm de diamètre.

**6.7 Papier filtre**.<sup>1)</sup>

**6.8 Fioles jaugées**, pour la préparation des solutions étalons.

**6.9 Papier tournesol.**

## 7 ÉCHANTILLONNAGE

Voir ISO/R 707 (5.3, échantillonnage en vue de l'analyse bactériologique).

## 8 MODE OPÉRATOIRE

### NOTES

1 Éviter l'influence de la lumière solaire directe au cours de la détermination.

2 La contamination par des traces de salive ou de transpiration peut donner des résultats positifs inexacts; il faut donc l'éviter. En conséquence, apporter une attention particulière au pipetage.

### 8.1 Préparation de l'échantillon pour essai

#### 8.1.1 Lait, babeurre et sérum

**8.1.1.1** Effectuer l'analyse de préférence directement après l'échantillonnage. Dans le cas contraire, conserver l'échantillon au réfrigérateur, mais pas plus de 2 jours.

**8.1.1.2** Mélanger l'échantillon avec soin, en chauffant légèrement si cela est nécessaire. La température ne doit, en aucun cas, dépasser 35 °C au cours du mélange.

#### 8.1.2 Lait sec, poudre de babeurre et poudre de sérum

Dissoudre 10 g du produit dans 90 ml d'eau. La température utilisée pour la dissolution ne doit, en aucun cas, dépasser 35 °C.

#### 8.1.3 Neutralisation des produits acides

Ajouter aux produits acides une solution d'hydroxyde de sodium (5.8) jusqu'à ce qu'une goutte conduise à la neutralité au papier de tournesol (6.9).

### 8.2 Prise d'essai

Introduire, à la pipette, dans deux tubes à essais (6.4), respectivement, 1 ml de l'échantillon pour essai (8.1). Un de ces tubes servira comme témoin ou essai à blanc.

### 8.3 Détermination

**8.3.1** Chauffer l'essai à blanc durant 2 min dans l'eau bouillante contenue dans un bécher; recouvrir le tube et le bécher avec une feuille d'aluminium, afin d'être sûr que la totalité du tube sera chauffée. Refroidir à température ambiante.

**8.3.2** À partir de ce moment, traiter l'essai à blanc et la prise d'essai de la même manière. Ajouter 10 ml de substrat tamponné (5.4) et mélanger.

1) Whatman n° 42, S & S 597 ou équivalent.

**8.3.3** Incuber immédiatement au bain d'eau à 37 °C durant 60 min, en agitant de temps en temps le contenu des tubes.

**8.3.4** Chauffer dans l'eau bouillante durant 2 min dans les mêmes conditions qu'en 8.3.1. Refroidir à la température ambiante.

**8.3.5** Ajouter 1 ml du défécant cuivre-zinc (5.5) dans chacun des tubes et mélanger soigneusement.

**8.3.6** Filtrer sur papier filtre sec, rejeter les premières gouttes, filtrer à nouveau si cela est nécessaire, jusqu'à ce que le filtrat devienne limpide, et recueillir 5 ml dans un tube à essais.

**8.3.7** Ajouter 5 ml de tampon pour le développement de la coloration (5.2).

**8.3.8** Ajouter 0,1 ml de la solution de BQC (5.6), mélanger et laisser la coloration se développer durant 30 min à la température ambiante.

**8.3.9** Mesurer l'absorbance par rapport à l'essai à blanc au moyen du spectrophotomètre (6.3) à la longueur d'onde de 610 nm.

**8.3.10** Si l'absorbance mesurée en 8.3.9 est supérieure à l'absorbance de la solution étalon contenant 20 µg de phénol par tube mesurée en 8.4.4, recommencer la détermination avec une dilution appropriée de l'échantillon pour essai.

Préparer cette dilution en mélangeant 1 volume de l'échantillon avec une fraction de ce même échantillon pour essai que l'on aura soigneusement fait bouillir, afin d'inactiver la phosphatase.

#### 8.4 Préparation de la courbe d'étalonnage

**8.4.1** À partir de la solution étalon (5.9.2), préparer des solutions étalons diluées contenant 0 (témoin ou essai à blanc), 2, 5, 10 et 20 µg de phénol par millilitre, et introduire à la pipette respectivement 1 ml d'eau et 1 ml de chacune de ces quatre solutions étalons dans cinq tubes à essais.

**8.4.2** Ajouter à chaque tube 1 ml de la solution de sulfate de cuivre(II) (5.7), 5 ml du tampon de couleur dilué (5.3), 3 ml d'eau et 0,1 ml de la solution de BQC (5.6); mélanger.

**8.4.3** Laisser la coloration se développer durant 30 min à la température ambiante.

**8.4.4** Mesurer l'absorbance par rapport à l'essai à blanc au moyen du spectrophotomètre à une longueur d'onde de 610 nm.

**8.4.5** Tracer la courbe d'étalonnage, en portant sur un graphique l'absorbance en fonction des quantités de phénol en microgrammes, indiquées en 8.4.1. La courbe d'étalonnage doit être une ligne droite.

## 9 EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 9.1 Mode de calcul

**9.1.1** Au moyen de la courbe d'étalonnage, convertir en microgrammes de phénol l'absorbance mesurée en 8.3.9.

**9.1.2** Calculer l'activité phosphatasique, exprimée en microgrammes de phénol, par millilitre de produit liquide ou, s'il s'agit de produits déshydratés, par millilitre de produit liquide reconstitué, au moyen de la formule

$$\text{Activité phosphatasique} = 2,4 \times A \times D$$

où  $A$  est la quantité de phénol, en microgrammes, obtenue en 9.1.1;

$D$  est le facteur de dilution selon 8.1.3 et/ou 8.3.10. (S'il n'y a pas dilution,  $D = 1$ .)

### 9.2 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste ne doit pas excéder 2 µg de phénol. Si une dilution a été effectuée selon 8.1.3 et/ou 8.3.10, cette limite se rapporte aux résultats obtenus sur l'échantillon dilué.

## 10 PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme Internationale ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Page blanche

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

ISO 3356:1975

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/66cc5b9-b6dc-4c33-a091-82e98f29ba3f/iso-3356-1975>



Page blanche

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

ISO 3356:1975

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/66cc5b9-b6dc-4c33-a091-82e98f29ba3f/iso-3356-1975>