



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS LES PRODUITS LAITIERS

1. APPLICATION

La présente méthode peut servir à déterminer l'activité de la phosphatase alcaline dans les produits laitiers comme indice de pasteurisation, conformément à l'Article B.08.030 du Règlement sur les aliments et drogues.

2. DESCRIPTION

La phosphatase alcaline est une enzyme thermolabile [EC 3.1.3.1; phosphohydrolase de monoester ortho-phosphorique] endogène à tous les produits laitiers, y compris le lait cru. Sa température d'inactivation dépasse légèrement celle qui détruit les micro-organismes pathogènes les plus résistants qu'on est susceptible de trouver dans le lait. C'est pourquoi cette méthode sert à déterminer si la pasteurisation a été suffisante ou à repérer la contamination de produits pasteurisés par le lait cru après la transformation.

Un premier résultat positif ne signifie toutefois pas nécessairement que la pasteurisation présentait des lacunes ou que le produit a été contaminé par du lait cru. La méthode peut produire des résultats faussement positifs dans trois situations différentes :

- 2.1 Phosphatase microbienne : Les micro-organismes présents dans les produits laitiers pasteurisés peuvent produire des phosphatases microbiennes thermolabiles sensibles à la pasteurisation ou des phosphatases microbiennes thermostables : tout dépend du type de contaminant microbien. Afin de confirmer que la phosphatase initiale est attribuable à la phosphatase alcaline et n'est pas reliée à l'activité enzymatique de ces phosphatases microbiennes, on pasteurise et analyse de nouveau une partie de l'unité d'échantillonnage. Si l'équivalent phénol ne diminue pas de façon significative, il faut attribuer le résultat initial à la présence de phosphatases microbiennes thermostables.
- 2.2 Réactivation de la phosphatase : On peut observer des résultats positifs à la phosphatase dans des produits laitiers faits de lait transformé par pasteurisation à haute température pendant une brève période (HTST) ou à ultra haute température pendant une brève période (UHTST). Cette réaction peut être causée par la réactivation de la phosphatase. La phosphatase réactivée se distingue de la phosphatase résiduelle par sa réactivation rehaussée lorsqu'elle est exposée à des sels de magnésium. On compare alors l'activité enzymatique de l'échantillon dilué (1:6) à l'activité enzymatique d'une partie de l'échantillon non dilué.
- 2.3 Substances interférentes : On peut relier des résultats positifs initiaux aux effets de substances interférentes qui réagissent directement avec le réactif 2,6-Dichloroquinone-4-chloroimide (CQC) pour produire une coloration de fond de l'ordre de 620 nm (p. ex., phénol libre, acide vanilique), ce qui produit des résultats faussement positifs. Par ailleurs, des substances ajoutées aux produits, comme des

aromatisants ou des colorants, pourraient nuire à l'activité de la phosphatase (p. ex., chocolat ou cacao) et produire ainsi des résultats faussement négatifs.

3. PRINCIPE

La phosphatase alcaline présente dans le lait cru libère du phénol d'un substrat de phénylphosphate disodique (monoester de phosphate) à un pH et à une température contrôlés. Le phénol libéré réagit ensuite avec le 2,6-dichloroquinone-4-chloroimide (CQC) pour former du bleu d'indophénol. La quantité de phénol libérée est proportionnelle à l'activité de l'enzyme présente. On peut mesurer l'intensité par colorimétrie à 620 nm. On quantifie le niveau de l'activité enzymatique au moyen d'une courbe d'étalonnage.

4. DÉFINITIONS

4.1 Chaque unité d'échantillonnage doit renfermer au moins 100 mL ou g.

4.2 Voir l'Annexe A du volume 1.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

5.1 Prélever au hasard trois unités d'échantillonnage dans chaque lot.

5.2 Voir l'Annexe B du volume 1.

6. FOURNITURES ET MATÉRIEL SPÉCIAUX

Voir la formule de chaque solution à la section 10 :

- 1) Carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) (PF 106,00)
- 2) Bicarbonate de sodium anhydre (NaHCO_3) (PF 84,01)
- 3) Phénylphosphate disodique, sel (sans phénol) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4\text{Na}_2$) (PF 218,10)
- 4) Acide trichloroacétique ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) (PF 163,39)
- 5) Acide chlorhydrique (HCl ca 37 %) (PF 36,46)
- 6) Calgon (hexamétaphosphate de sodium) (NaPO_3)₆ (PF 611,77)
(Synonymes courants : acide métaphosphorique, sel hexasodique; métaphosphate sodique vitreux; SHMP)
- 7) 2,6-Dichloroquinone-4-chloroimide (CQC) ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_3\text{NO}$) (PF 210,4)
- 8) Phénol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$) (PF 94,11)
- 9) Alcool éthylique (absolu) anhydre ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (PF 46,07)
- 10) Chlorure de magnésium (hexahydraté) ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (PF 203,31)
- 11) Spectrophotomètre ou colorimètre pour mesures à 620 nm.
- 12) Agitateurs en verre
- 13) Filtre Whatman n° 42 de 11 cm
- 14) Pipettes volumétriques (classe A) de 1, 2 et 10 mL

15) Fioles volumétriques

Note : Il faut éviter de contaminer la verrerie avec du phénol, du crésol ou d'autres substances phénoliques. Ne pas laver la verrerie avec du détergent contenant des substances phénoliques.

16) Bain-marie capable de maintenir une température de 37 °C.

17) Bain-marie capable de maintenir une température de 63,3 °C.

18) Bain-marie capable de maintenir une température de 90 à 95 °C.

19) Bain-marie capable de maintenir une température de 34 °C.

Note : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que l'on maintient les incubateurs ou les bains-marie à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être réglé à $35 \pm 1,0$ °C. De même, les températures plus basses de 30 ou 25 °C peuvent être réglées à $\pm 1,0$ °C près. Lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est toutefois impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à 0,5 °C près car l'utilisation de températures plus élevées peuvent être mortelles pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

7. MARCHE À SUIVRE

Il faut analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement. Il faut effectuer l'épreuve conformément aux instructions suivantes :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

7.1.1 À l'exception des aliments qui se conservent bien à la température de la pièce, il faut que les unités d'échantillonnage demeurent réfrigérées (0 - 5°C) au cours de l'entreposage et du transport. Les unités d'échantillonnage congelées doivent le rester. Faire décongeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur, ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.

7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

7.2.1 Préparer toute les solutions tampons et les solutions de la façon décrite à la section 10.

7.2.2 Établir la courbe d'étalonnage du phénol et calculer la pente de la façon décrite en 7.4.1

7.2.3 Préparer tous les témoins et vérifier qu'ils conviennent de la façon décrite en 7.4.2, 7.4.3 et 7.4.4

7.3 Préparation des échantillons

Note : Dans le cas du **lait glacé** ou de la **crème glacée**, faire fondre une partie convenable de produit et laisser reposer 1 heure à la température ambiante (ou toute la nuit au réfrigérateur) afin de libérer l'air emprisonné, enlever tous les fruits ou les noix et par la suite procéder comme pour le lait tel que décrit en 7.3.1 (8.1)

7.3.1 Lait et autres produits laitiers à l'état liquide :

Pipetter des portions de 1 mL des unités d'échantillonnage dans des éprouvettes de 25 x 150 mm.

Note : Dans le cas du **lait de chèvre**, pipetter des portions de **3 mL**.

7.3.2 Poudre de lait entier, partiellement écrémé ou écrémé :

Il faut reconstituer la poudre en déposant $10 \pm 0,1$ g de produit laitier en poudre dans 90 mL d'eau distillée à la température de la pièce. Passer au mélangeur pendant 90 secondes et laisser ensuite reposer le mélange à la température de la pièce pendant cinq minutes avant de prélever l'échantillon (8.1, 8.17).

(Note : Cette méthode ne s'applique pas à la caséine.)

7.3.3 Fromage :

Déposer des quantités de 0,5 g (prélevées à au moins 0,5 po. sous une surface fraîchement exposée) dans des éprouvettes, ajouter 0,5 mL d'eau distillée, laisser tremper pendant 10 minutes et mélanger le fromage avec une tige en verre pour le transformer en pâte.

Note : Dans le cas du **fromage de chèvre**, prélever des échantillons de **1,5 g** et ajouter **1,5 mL** d'eau distillée.

Note : Dans le cas des fromages affinés à pâte molle ou semi-molle, il faut prendre des précautions spéciales pour éviter de contaminer l'échantillon par des phosphatases qui pourraient être présentes à la surface.

7.3.4 Beurre : Déposer des quantités de 1,0 g directement dans les éprouvettes.

7.3.5 Déterminer l'activité initiale de la phosphatase alcaline de la façon décrite en 7.5.

7.4 Courbe d'étalonnage du phénol et témoins

7.4.1 Courbe d'étalonnage du phénol

7.4.1.1. Utiliser des pipettes volumétriques pour déposer des volumes de 1 à 10 mL de la solution de phénol (10.8) dans des éprouvettes séparées et diluer à 10 mL avec le tampon au carbonate (10.1).

7.4.1.2 Ajouter 1 mL de solution de Calgon (10.5) et 1 mL de réactif CQC (10.6) et mélanger.

7.4.1.3 Préparer de la même façon un « blanc » contenant seulement 10 mL de tampon au carbonate.

7.4.1.4 Placer toutes les éprouvettes pendant 15 min dans un bain-marie à 37 °C pour que la coloration se forme complètement.

- 7.4.1.5 Mesurer, par rapport au « blanc » (7.4.1.3), la coloration bleue formée à une longueur d'onde de 620 nm (c.-à-d. remettre l'instrument à zéro avec le blanc à une longueur d'onde de 620 nm).
- 7.4.1.6 Calculer la pente de la partie rectiligne de la courbe d'étalonnage du phénol en utilisant des valeurs d'absorbance (densité optique) (c.-à-d. 2-log % divisé par les µg de phénol présents). Cette valeur servira à calculer la teneur en phénol des unités d'échantillonnage à analyser en 7.5.9.

Note : Il faut tracer la courbe d'étalonnage au phénol au moins une fois tous les 6 mois

7.4.2 Témoin négatif

- 7.4.2.1 Prévoir un témoin négatif pour chaque échantillon analysé (c.-à-d. 1 témoin négatif plus 1 détermination pour chacune des 3 unités d'échantillonnage).
- 7.4.2.2 Préparer un témoin négatif de la même façon qu'une unité d'échantillonnage, comme en 7.3. Chauffer le témoin négatif à 90-95 °C pendant 2 min, et laisser ensuite refroidir à la température de la pièce. Analyser de la même façon qu'en 7.5.

7.4.3 Témoin positif

- 7.4.3.1 Prévoir un témoin positif pour chaque série d'unités d'échantillonnage analysées.
- 7.4.3.2 Préparer un témoin positif en chauffant du lait cru à 90-95 °C pendant 3 min. Faire refroidir rapidement à la température de la pièce et ajouter 0,2 % de lait cru frais. On peut congeler des fractions de témoin positif. À l'aide d'une pipette, prélever 1 mL dans une éprouvette de 25 sur 150 mm et analyser comme en 7.5. On peut aussi utiliser un échantillon positif connu de fromage fait de lait non pasteurisé et le préparer de la façon décrite en 7.3.3.
- 7.4.3.3 Un résultat positif doit être obtenu

7.4.4 Réactif témoin

- 7.4.4.1 Prévoir un seul réactif témoin pour chaque série d'unités d'échantillonnage analysées.
- 7.4.4.2 Déposer 10 mL de substrat tamponné frais (10.2) dans une éprouvette de 25 x 150 mm et analyser en incubant le témoin avec les échantillons de la façon décrite en 7.5.1.

7.5 Détermination de l'activité initiale de la phosphatase alcaline

CQ : Prévoir un témoin négatif (7.4.2) pour chaque échantillon, un témoin positif (7.4.3) et un réactif témoin (7.4.4).

- 7.5.1 Ajouter 10 mL du substrat tamponné (10.2) à chaque éprouvette contenant 1 mL de portion à analyser, bien mélanger et incubé dans un bain-marie à 37 °C pendant 1 heure en agitant de temps à autre.

Note : Dans le cas des **produits de lait de chèvre**, ajouter seulement **8 mL** de substrat tamponné.

- 7.5.2 Après une heure d'incubation, ajouter 1 mL de la solution d'acides trichloracétique et chlorhydrique en le laissant s'écouler lentement le long de la paroi de chaque éprouvette. Mélanger et filtrer sur papier Whatman n° 42 de 11 cm.

Note : Dans le cas des **produits de lait de chèvre**, incuber pendant 2 heures.

- 7.5.3 Utiliser une pipette pour transférer 5 mL de filtrat limpide dans une éprouvette, ajouter 1 mL de solution de Calgon (10.5), 5 mL de carbonate de sodium (10.3) et 1 mL de réactif au 2,6-dichloroquinonechloroimide (CQC) (10.6).
- 7.5.4 Déposer toutes les éprouvettes dans un bain-marie à 37 °C pendant 15 min.
- 7.5.5 Utiliser une longueur d'onde de 620 nm pour mettre le spectrophotomètre (ou colorimètre) à zéro avec de l'eau distillée dans un premier temps, et ensuite mettre à zéro avec le réactif témoin (7.4.4).
- 7.5.6 Pour chacun des échantillons, mesurer la densité optique obtenue (ou %T) du témoin négatif (7.4.2).
- 7.5.7 Si le témoin négatif donne un résultat de $\leq 5 \mu\text{g}$ de phénol/g pour le fromage ou de $\leq 2 \mu\text{g}$ de phénol/mL de lait, il faut remettre le spectrophotomètre (ou colorimètre) à zéro au moyen du témoin négatif et effectuer la lecture de densité optique (ou %T) des échantillons préparés comme en 7.5.9.
- 7.5.8 Si le témoin négatif donne un résultat de $> 5 \mu\text{g}$ de phénol/g dans le cas du fromage ou de $> 2 \mu\text{g}$ de phénol/mL de lait, déterminer les substances interférentes de la façon décrite en 7.6.1.
- 7.5.9 Pour chaque détermination, multiplier l'absorbance mesurée ($2\text{-log } \%T$) par le facteur 1,2 et diviser ensuite la valeur obtenue par la pente de la droite d'étalonnage du phénol (7.4.1.6). Ce calcul donne la valeur de la phosphatase en μg de phénol par 0,25 g de produit solide ou par 0,5 mL de produit liquide. Convertir le résultat final en unités de μg de phénol/g ou mL de produit.
- 7.5.10 Si les résultats sont négatifs, indiquer $\leq 5 \mu\text{g}$ de phénol/g pour le fromage ou $\leq 2 \mu\text{g}$ de phénol/mL de lait.
- 7.5.11 Si les résultats sont positifs (ce qui indique une pasteurisation incomplète), procéder aux analyses de confirmation. Il faut procéder aux analyses de confirmation suivantes :
- 1) analyses de détermination des substances interférentes;
 - 2) phosphatase microbienne;
 - 3) phosphatase réactivée.

NOTE : Un fromage fait de lait cru **peut** produire une coloration trop intense pour être mesurée avec précision. On peut observer des transmissions de moins de 1 %, ce qui correspond à environ 60 μg de phénol par 0,25 g de fromage.

7.6 Procédures de confirmation des résultats initiaux positifs pour l'activité de la phosphatase alcaline

7.6.1 Vérification des substances interférentes

- 7.6.1.1 Reprendre l'épreuve ordinaire de la phosphatase, en utilisant la même quantité d'échantillon analysé. Remplacer le substrat tamponné (10.2) par la même quantité de solution tampon au carbonate (10.1) qui ne contient pas de phénylphosphate disodique.

7.6.1.2 Toute coloration bleue dans cette vérification est attribuable à la présence de substances interférentes. Cependant, si l'équivalent de phénol de l'épreuve pour laquelle on a utilisé le substrat tamponné est supérieur à l'équivalent de phénol de vérification, c'est un signe de pasteurisation incomplète, de contamination par le produit brut, ou de présence de phosphatase microbienne.

7.6.2 Vérification de la présence de phosphatase microbienne

7.6.2.1 Pasteuriser à nouveau une portion de l'unité d'échantillonnage à 63,3 °C pendant 30 min. Agiter fréquemment et garder un thermomètre précis constamment immergé dans la portion d'unité d'échantillonnage.

7.6.2.2 Refroidir la portion d'unité d'échantillonnage.

7.6.2.3 Répéter l'analyse (7.5) avec la portion d'unité d'échantillonnage re-pasteurisée, l'unité d'échantillonnage originale et le témoin négatif.

7.6.2.4 Si l'unité d'échantillonnage re-pasteurisée ne présente pas de réduction importante en équivalent de phénol, le résultat initial doit être attribuable à la présence de phosphatase microbienne thermorésistante. Le résultat est alors faussement positif et il faut l'inscrire comme négatif.

7.6.3 Phosphatase réactivée

7.6.3.1 Diluant (échantillon inactivé) :

Échantillons liquides : Déposer une portion de 10 mL de lait ou de crème dans un bain-marie bouillant et maintenir dans le bain-marie pendant une minute après que la température des portions a atteint 95 °C. Laisser refroidir les portions et utiliser celles-ci pour préparer les dilutions 1:6 requises (7.6.3.5).

Échantillons solides : Mélanger dans une éprouvette des proportions égales de l'échantillon solide et un volume égal d'eau distillée (p. ex., 2,5 g d'échantillon + 2,5 mL d'eau distillée). Désactiver en maintenant dans un bain-marie bouillant pendant une minute après que la température des portions a atteint 95 °C. Laisser refroidir les portions et utiliser celles-ci pour préparer les dilutions 1:6 requises (7.6.3.5).

7.6.3.2 Préparer deux aliquotes de 5 mL (ou 2,5 g d'échantillon solide + 2,5 mL d'eau distillée) de l'échantillon à analyser et déposer dans des éprouvettes à bouchon (sans phénol). Ajouter de la solution de $MgCl_2$ (10.9) à une des éprouvettes. La quantité de $MgCl_2$ est déterminée par la teneur en gras de l'échantillon. Le tableau 1 indique les quantités précises.

7.6.3.3 Incuber les deux aliquotes dans un bain-marie à 34 °C pendant 1 h.

7.6.3.4 Retirer les deux aliquotes du bain-marie.

7.6.3.5 Préparer une dilution de 1:6 en ajoutant 1 mL de l'aliquote qui contient le $MgCl_2$ à 5 mL du diluant correspondant préparé en 7.6.3.1 ci-dessus. Bien mélanger.

7.6.3.6 Utiliser une pipette pour déposer 1 mL de la fraction non diluée ne contenant pas de $MgCl_2$ (7.6.3.2) et 1 mL de la fraction diluée contenant le $MgCl_2$ (7.6.3.5) dans des éprouvettes de 25 sur 150 mm.

7.6.3.7 Analyser les deux fractions pour déterminer l'activité de la phosphatase de la même façon qu'en 7.5.

- 7.6.3.8 Si la dilution à 1:6 qui contient le $MgCl_2$ a une activité égale ou supérieure à la fraction non diluée sans $MgCl_2$, on considère que l'unité d'échantillonnage est négative pour la phosphatase résiduelle. Ce résultat indique une réactivation de la phosphatase.
- 7.6.3.9 Si la fraction diluée contenant le $MgCl_2$ a moins d'activité que la fraction non diluée sans $MgCl_2$, et si l'épreuve initiale classique de la phosphatase a donné un résultat positif, on considère que l'unité d'échantillonnage est positive pour la phosphatase résiduelle.

Note : Si on laisse une unité d'échantillonnage susceptible de se réactiver reposer pendant plus de 4 heures à 16 °C ou 2 heures à 21 °C, il se peut que cette épreuve ne s'applique pas, car la phosphatase réactivée donnera les résultats de la phosphatase résiduelle. (Il peut être nécessaire d'utiliser les épreuves microbiologiques pour évaluer la qualité du produit).

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 American Public Health Association. 1992. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, (16^e éd.), American Public Health Association, Washington, D.C.
- 8.2 Association of Official Analytical Chemists. 1999. *Phosphatase (residual) in milk*. 33.2.47 Méthode officielle 946.01 de l'AOAC.
- 8.3 Atherton, H. V. et J.A. Newlander. 1981. *Chemistry and Testing of Dairy Products* (Quatrième éd.), AVI Publishing Company, Westport, Conn. pp.176-183.
- 8.4 Fédération internationale de laiterie, Groupe d'experts E52. 1991. Alkaline phosphatase test as a measure of correct pasteurization. Bulletin n° 262 de la Fédération internationale de laiterie.
- 8.5 Kannan, A. et K.P. Basu. 1948. Phosphate in milk: part 1. Variation in the phosphatase content of milk of Indian cows, buffaloes, goats and sheep. *Indian J. Dairy Sci.* 1:6-22
- 8.6 Kay, H.D. et W.R. Graham. 1935. The phosphatase test for pasteurized milk. *J. Dairy Res.* 6:191-203.
- 8.7 Klinger, I. et I. Rosenthal. 1997. Public health and the safety of milk and milk products from sheep and goats. *Rev. Sci. Tech.* 16:482-8.
- 8.8 Kosikowski, F.V. 1949. A simple universal dairy products phosphatase test (Cornell Method). *Science.* 110:480-481.
- 8.9 Linden, G., P. Mazon, J.B. Michalowski et C. Alais. 1974. Purification and molecular and kinetic properties of alkaline phosphatase of cow's milk. *Biochem. Biophys. Acta* 358:82-90.
- 8.10 Mathur, M.P. 1974. Studies on alkaline phosphatase in goat milk. *Indian J. Dairy Sci.* 28:145-147.
- 8.11 Sanders, G.P. et O.S. Sager. 1947. Phosphatase test for various dairy products. *J.Dairy Sci.* 12: 909.
- 8.12 Scharer, H. 1938. A rapid phosphomonoesterase test for control of dairy pasteurization. *J. Dairy Sci.* 21:21-34.
- 8.13 Williams, D.J. 1986. A modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test suitable for goat's milk. *Aust. J. Dairy Technol.* 41:28-30.
- 8.14 Williams, D.J. et S.M. Nottingham. 1990. Suitability of a modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test for goat's milk: collaborative study. *Aust. J. Dairy Technol.* 45:21-23.
- 8.15 Williams, D.J., S.M. Nottingham, M. Petroff et S.J. Veldhoven. 1991. Annual variation of alkaline phosphatase activity in goat's milk and its effect on the detection of unpasteurised milk. *Aust. J. Dairy Technol.* 46:69-71.
- 8.16 American Dairy Products Institute. 1990. Determination of Solubility Index. Standard For Grades of Dry Milks Including Methods of Analysis, Bulletin 916 (Revised). Chicago, Illinois. pp:30-31.

Tableau 1

Quantité requise de $MgCl_2$ par rapport à la teneur en matières grasses du lait dans l'échantillon

Teneur en matières grasses du lait dans l'échantillon (*) (%)	Solution de $MgCl_2$ par fraction de 5 mL (mL)
3-7	0,200
8-12	0,175
13-18	0,150
19-25	0,125
26-31	0,100
32-40	0,075

* Note : Dans le cas des échantillons de fromage, utiliser le contenu en matières grasses de l'unité d'échantillonnage indiqué sur l'étiquette divisé par deux puisqu'on utilise au début un mélange de 0,5 g de fromage et de 0,5 mL d'eau distillée. (7.3.3)

9 INTERPRÉTATION

Il faut utiliser les tolérances indiquées ci-dessous, qui représentent l'activité maximale de la phosphatase alcaline mesurée à partir de la quantité de phénol libérée des produits laitiers, dans des conditions prescrites pour déterminer si le lot de produit analysé est conforme à l'Article B.08.030 du Règlement sur les aliments et drogues.

L'activité de la phosphatase alcaline maximale permise pour chaque lot est représentée par une quantité de phénol libérée dans des conditions prescrites ne dépassant pas :

- (1) 2 µg de phénol par mL dans plus de deux des trois unités d'échantillonnage de lait ou d'autres produits laitiers liquides;
- (2) 4 µg de phénol par mL dans n'importe quelle unité d'échantillonnage de lait ou d'autre produit laitier liquide, comprise dans l'échantillon prélevé sur un lot.
- (3) 5 µg de phénol par mL dans plus de deux des trois unités d'échantillonnage de fromage ou d'autre produit laitier solide; et
- (4) 10 µg de phénol par mL dans n'importe quelle unité d'échantillonnage de fromage ou d'autre produit laitier solide, comprise dans l'échantillon prélevé sur un lot.

Le tableau qui suit résume ces tolérances :

<u>Produit</u>	<u>n</u>	<u>c</u>	<u>m</u>	<u>M</u>
Lait, etc.	3	2	2 µg	4 µg
Fromage, etc.	3	2	5 µg	10 µg

n = Nombre d'unités d'échantillonnage (sous-échantillons) qu'il faut examiner par lot.

c = Nombre maximal d'unités d'échantillonnage (sous-échantillons) par lot qui peuvent avoir une activité de la phosphatase alcaline (dosage du phénol) supérieure à la valeur prévue sous « m » sans enfreindre le Règlement.

m = Activité de la phosphatase alcaline (dosage du phénol) maximale par mL ou g de produit laitier qui ne présente pas de risque (correspondant à une pasteurisation adéquate).

M = Activité de la phosphatase alcaline (dosage du phénol) maximale qui, si elle est dépassée par une unité d'échantillonnage (sous-échantillon) quelconque, rend le lot examiné non conforme au Règlement.

10 PRÉPARATION DES MILIEUX

10.1 Tampon carbonate

Dissoudre 23,0 g de Na_2CO_3 anhydre et 20,3 g de NaHCO_3 anhydre dans de l'eau distillée et diluer à 2 000 mL. pH final = 9,80.

CQ : Vérifier si le tampon carbonate s'est détérioré en le chauffant à 85 ± 1 °C pendant 2 min. Ajouter 2 gouttes de CQC fraîchement préparé à 10 mL de tampon et incuber à la température ambiante pendant 5 min. S'il y a formation d'une coloration, jeter le tampon.

10.2 Substrat tamponné

Dissoudre 270 ± 3 mg de phénylphosphate disodique (sans phénol) dans 250 mL de tampon carbonate.

CQ : Préparer immédiatement avant d'utiliser.

10.3 Solution de carbonate de sodium à 8 % (p/v)

Dissoudre 80 g de Na_2CO_3 anhydre dans 1 000 mL d'eau distillée.

10.4 Solution d'acides trichloroacétique et chlorhydrique

Dissoudre 125 ± 1 g d'acide trichloroacétique dans de l'eau distillée, diluer à 250 mL avec de l'eau distillée. Avant d'utiliser, ajouter 250 mL de HCl (à environ 37 %) et mélanger soigneusement.

CQ : Préparer la journée même de l'analyse

Mesure de sécurité : Porter des lunettes et des gants de sécurité appropriés pour manipuler ces produits chimiques.

10.5 Solution au Calgon

Dissoudre 10 g d'hexamétaphosphate de sodium dans de l'eau distillée et diluer à 100 mL.

CQ : Le pH de cette solution doit être d'environ 6,3.

10.6 Solution de 2,6-Dichloroquinonechloroimide (CQC) (à 0,02 % (p/v))

Dissoudre 10 mg de CQC dans 25 mL d'alcool éthylique absolu et ajouter 25 mL d'eau distillée.

CQ : Conserver la solution au réfrigérateur (dans l'obscurité) pendant 2 jours au maximum.

10.7 Solution-mère de phénol (1 000 µg/mL)

Dissoudre 100 ± 1 mg de cristaux secs de phénol dans de l'eau distillée et diluer à 100 mL.

10.8 **Solution diluée de phénol (2 µg/mL)**

Utiliser une pipette volumétrique pour déposer 1 mL de solution-mère de phénol dans 500 mL de tampon carbonate (10.1).

10.9 **Solution de chlorure de magnésium**

Préparer une solution de $MgCl_2$ en dissolvant 100 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ dans 25 mL d'eau distillée. Chauffer légèrement pour favoriser la dissolution. Verser la solution dans un flacon volumétrique de 100 mL, rincer le contenant initial plusieurs fois avec des portions de 5 mL d'eau distillée et ajouter la solution de rinçage au flacon volumétrique. Laisser refroidir la solution et en porter le volume à 100 mL. Cette solution contient 0,1196 g de Mg par mL.