

I

(Actes dont la publication est une condition de leur applicabilité)

RÈGLEMENT (CE) N° 213/2001 DE LA COMMISSION
du 9 janvier 2001

portant modalités d'application du règlement (CE) n° 1255/1999, en ce qui concerne les méthodes à utiliser pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers et modifiant les règlements (CE) n° 2771/1999 et (CE) n° 2799/1999

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu le règlement (CE) n° 1255/1999 du Conseil du 17 mai 1999 portant organisation commune des marchés dans le secteur du lait et des produits laitiers ⁽¹⁾, et notamment ses articles 10 et 15, son article 26, paragraphe 3, son article 29, paragraphe 1, et son article 31, paragraphe 14,

considérant ce qui suit:

(1) Les règlements de la Commission (CEE) n° 1216/68, (CEE) n° 3942/92, (CE) n° 86/94, (CE) n° 2721/95, (CE) n° 1080/96, (CE) n° 1081/96, (CE) n° 1082/96, (CE) n° 1854/96, (CE) n° 880/98 et (CE) n° 1459/98 dont les références complètes figurent à l'annexe XXVI du présent règlement fixent des méthodes de référence et de routine pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers ainsi que le domaine et les règles d'application desdites méthodes. Pour des raisons de clarté, afin de fournir aux opérateurs du secteur un corpus unique desdites méthodes et des règles pour leur application, il convient de procéder à la refonte des règlements susmentionnés, en les regroupant dans un seul texte. Dans le même but, il convient de modifier les règlements de la Commission (CE) n° 2771/1999 du 16 décembre 1999 portant modalités d'application du règlement (CE) n° 1255/1999 du Conseil en ce qui concerne les mesures d'intervention sur le marché du beurre et de la crème de lait ⁽²⁾ et (CE) n° 2799/1999 du 17 décembre 1999 portant modalités d'application du règlement (CE) n° 1255/1999 en ce qui concerne l'octroi d'une aide au lait écrémé et au lait écrémé en poudre destinés à l'alimentation des animaux et la vente dudit lait écrémé en poudre ⁽³⁾ en vue d'incorporer dans le présent règlement leurs annexes concernant des méthodes d'analyse.

(2) Les caractéristiques de composition et de qualité du lait et des produits laitiers fixées dans le cadre des régimes prévus par le règlement (CE) n° 1255/1999 doivent être vérifiées pour garantir qu'elles sont strictement conformes aux exigences fixées.

(3) Il est souvent disposé que les méthodes de référence à utiliser pour de telles vérifications sont des méthodes publiées par des organismes internationaux tels que CEN, FIL, ISO et AOAC International et régulièrement mises à jour par ces organismes. Dans certains cas, une méthode de référence communautaire est établie; dans d'autres cas, aucune méthode de référence n'est spécifiée dans la réglementation communautaire. En vue de garantir l'uniformité d'application des méthodes de référence, il convient d'établir chaque année une liste des méthodes de référence et de préciser que la méthode à appliquer doit figurer sur cette liste.

(4) L'application de méthodes de routine ne doit pas être exclue; les conditions de leur utilisation doivent, dès lors, être spécifiées.

(5) Afin d'établir une pratique uniforme pour l'évaluation des résultats des analyses, il convient également de fixer des méthodes communes. Il en va de même pour l'évaluation sensorielle des produits concernés et pour le réexamen des résultats qui ont fait l'objet d'une contestation.

(6) Pour effectuer certaines analyses il n'existe pas actuellement de méthodes de référence internationalement acceptées qui ont été validées; de ce fait, aucune information n'est disponible quant aux variations des résultats d'analyse d'un laboratoire à l'autre; il convient dès lors de fixer des méthodes au niveau communautaire, qui ont été validées conformément aux règles établies internationalement et qui sont appliquées en tant que méthodes de référence.

⁽¹⁾ JO L 160 du 26.6.1999, p. 48.

⁽²⁾ JO L 333 du 24.12.1999, p. 11.

⁽³⁾ JO L 340 du 31.12.1999, p. 3.

- (7) Le règlement (CE) n° 2571/97 de la Commission du 15 décembre 1997 relatif à la vente à prix réduit de beurre et à l'octroi d'une aide à la crème, au beurre et au beurre concentré destinés à la fabrication de produits de pâtisserie, de glaces alimentaires et autres produits alimentaires ⁽¹⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 635/2000 ⁽²⁾, prévoit, dans certaines circonstances, le traçage de la crème, du beurre et du beurre concentré pour garantir une utilisation finale correcte de ces produits. Compte tenu de l'importance du traçage pour le bon fonctionnement du régime et afin de garantir une égalité de traitement entre opérateurs qui y participent, il convient d'établir, dans la mesure du possible, des méthodes communes de détermination de certains de ces traceurs.
- (8) Le beurre concentré doit faire l'objet d'un traçage soumis à contrôle, conformément au règlement (CEE) n° 3143/85 de la Commission du 11 novembre 1985 relatif à l'écoulement à prix réduit de beurre d'intervention destiné à la consommation directe sous forme de beurre concentré ⁽³⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 101/1999 ⁽⁴⁾ et au règlement (CEE) n° 429/90 de la Commission du 20 février 1990 relatif à l'octroi par adjudication d'une aide au beurre concentré destiné à la consommation directe dans la Communauté ⁽⁵⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 124/1999 ⁽⁶⁾ et au règlement (CE) n° 2571/97. Le strict respect des conditions relatives au marquage du beurre concentré est indispensable pour prévenir le risque de détournement. Il convient dès lors de définir une méthode commune de détection de ces traceurs.
- (9) Une aide au stockage privé des fromages à base de lait de brebis peut être octroyée en vertu de l'article 9 du règlement (CE) n° 1255/1999. Une restitution spéciale peut être octroyée pour les mêmes produits en vertu de l'article 31 du même règlement. Il est prévu d'importer dans la Communauté à partir de certains pays tiers dans des conditions préférentielles des fromages à base de lait de brebis, de lait de chèvre et de lait de bufflonne ou de mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne. En raison des dispositions susvisées, il est nécessaire de vérifier par des contrôles appropriés qu'il n'a pas été incorporé de lait de vache dans les produits concernés. Par conséquent il convient d'établir une méthode de référence communautaire de détection du lait de vache, sans préjudice de l'application de méthodes de routine si celles-ci sont conformes à certains critères.
- (10) Le règlement (CEE) n° 2921/90 de la Commission du 10 octobre 1990 relatif à l'octroi des aides au lait écrémé en vue de la fabrication de caséine et de caséinates ⁽⁷⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 2654/1999 ⁽⁸⁾, prévoit que l'absence de coliformes doit être constatée. La méthode de référence acceptée sur le plan international pour la recherche des coliformes dans le lait et les produits laitiers est la norme internationale FIL73A:1985; toutefois, elle n'est applicable que sous une forme modifiée pour la détection des coliformes dans une certaine quantité de produit. Une méthode communautaire de référence pour la détection des coliformes fondée sur la norme susmentionnée est donc établie.
- (11) Le règlement (CEE) n° 2658/87 du Conseil du 23 juillet 1987 relatif à la nomenclature tarifaire et statistique et au tarif douanier commun ⁽⁹⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 254/2000 ⁽¹⁰⁾, différencie les taux des droits de douane pour les aliments composés pour animaux relevant de la position tarifaire 2309, en fonction de leur teneur en produits laitiers. Afin d'assurer une application uniforme des dispositions en question, il convient de déterminer une méthode d'analyse de la teneur en lactose obligatoire pour tous les États membres et de retenir à cette fin une méthode généralement reconnue.
- (12) Le règlement (CE) n° 1255/1999 prévoit que certaines conditions qualitatives doivent être respectées en ce qui concerne le beurre et le lait écrémé en poudre destinés à l'intervention ou, dans le cas du lait écrémé en poudre, destiné à l'alimentation des animaux; il convient par conséquent de fixer des méthodes de référence pour la vérification desdites conditions.
- (13) La mise en œuvre de certaines des méthodes introduites pour la première fois par le présent règlement nécessite une période d'adaptation; il convient dès lors d'en différer l'application.
- (14) Le comité de gestion du lait et des produits laitiers n'a pas émis d'avis dans le délai imparti par son président,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

CHAPITRE I

DISPOSITIONS GÉNÉRALES

Article premier

Objet et champ d'application

Le présent règlement fixe les règles relatives à l'application des méthodes d'analyse chimique, physique, microbiologique et pour l'évaluation sensorielle du lait et des produits laitiers dans le cadre des régimes prévus par l'organisation commune des marchés dans le secteur du lait et des produits laitiers, établie par le règlement (CE) n° 1255/1999, ainsi que certaines de ces méthodes.

⁽⁹⁾ JO L 256 du 7.9.1987, p. 1.

⁽¹⁰⁾ JO L 28 du 3.2.2000, p. 16.

⁽¹⁾ JO L 350 du 20.12.1997, p. 3.

⁽²⁾ JO L 76 du 25.3.2000, p. 9.

⁽³⁾ JO L 298 du 12.11.1985, p. 9.

⁽⁴⁾ JO L 11 du 16.1.1999, p. 14.

⁽⁵⁾ JO L 45 du 21.2.1990, p. 8.

⁽⁶⁾ JO L 16 du 21.1.1999, p. 19.

⁽⁷⁾ JO L 279 du 11.10.1990, p. 22.

⁽⁸⁾ JO L 325 du 17.12.1999, p. 10.

*Article 2***Liste de méthodes**

1. La liste des méthodes de référence applicables aux analyses visées à l'article 1^{er} est fixée à l'annexe I.
2. Au moins une fois par an, la Commission met à jour ladite liste conformément à la procédure prévue à l'article 42 du règlement (CE) n° 1255/1999.

*Article 3***Méthodes de routine**

Des méthodes de routine peuvent être utilisées pour les analyses prévues par la réglementation communautaire à condition qu'elles soient correctement calibrées et régulièrement contrôlées par rapport à la méthode de référence.

La procédure figurant à l'annexe II peut être appliquée à la vérification des résultats obtenus par des méthodes de routine, proches des limites spécifiées dans les règlements concernés.

En cas de litige, les résultats obtenus par la méthode de référence sont déterminants.

*Article 4***Validation des méthodes de référence**

1. Une méthode de référence est validée si elle est conforme à des critères de précision préétablis, concernant la limite de répétabilité et de reproductibilité.
2. Si une méthode de référence fixée par les règlements concernés n'a pas été validée, les États membres établissent une limite de reproductibilité provisoire.

Cette limite est obtenue conformément à la procédure définie à l'annexe III, point b). Toutefois, pendant les dix-huit mois suivant l'entrée en vigueur du présent règlement, les États membres peuvent utiliser une procédure équivalente.

Le respect de la limite est vérifié au moins une fois par an.

3. Si les résultats de l'application de méthodes de référence validées ou de méthodes avec des chiffres provisoires relatifs à la précision indiquent qu'une limite a été dépassée, la méthode d'évaluation des résultats d'analyse décrite à l'annexe IV s'applique en vue de déterminer la différence critique par rapport à cette limite.

*Article 5***Admissibilité des résultats d'analyses**

1. Les analyses sont effectuées dans des laboratoires qui appliquent une méthode interne de contrôle de la qualité

conforme à celle décrite à l'annexe V, point a), ou une méthode d'un niveau comparable.

Une description détaillée de la méthode appliquée doit être disponible dans le laboratoire.

2. Les laboratoires établissent leurs normes internes de précision dans une série pour toutes les méthodes selon:

- a) la méthode définie à l'annexe V, point b), ou
- b) une méthode validée, publiée, donnant une répétabilité établie.

Le respect de la limite de reproductibilité doit être vérifié au moins une fois par an conformément à la procédure définie à l'annexe III, point a).

Le deuxième alinéa ne s'applique pas si le laboratoire a participé à un programme d'essai d'aptitude au cours de l'année.

3. Le rapport de laboratoire sur les résultats de l'analyse doit contenir des éléments suffisants pour permettre une évaluation des résultats selon l'annexe IV et l'annexe VIII.

4. Les résultats d'une analyse sont considérés admissibles s'ils ont été obtenus conformément aux critères d'acceptabilité spécifiés dans la méthode interne de contrôle de la qualité visée au paragraphe 1 et aux normes internes de précision visées au paragraphe 2.

*Article 6***Évaluation sensorielle**

1. En ce qui concerne le beurre, les méthodes de l'annexe VI sont appliquées pour la vérification du travail des estimateurs et la fiabilité des résultats. La méthode décrite à l'annexe VII est appliquée en tant que méthode de référence pour l'évaluation sensorielle.

2. En ce qui concerne le lait et les produits laitiers autres que le beurre, les États membres utilisent, comme méthode de référence pour l'évaluation sensorielle, soit la norme FIL 99C/1997 soit d'autres méthodes comparables qu'ils communiquent à la Commission.

Les méthodes de l'annexe VI peuvent être appliquées pour la vérification du travail des estimateurs et la fiabilité des résultats.

*Article 7***Échantillonnage et contestation des résultats d'analyses**

1. En vue des analyses prévues par la réglementation communautaire, des échantillons en double doivent être pris.

2. La procédure définie à l'annexe VIII s'applique dans les cas où les résultats d'une analyse ne sont pas acceptés par l'opérateur.

CHAPITRE II

MÉTHODES D'ANALYSES

Article 8

Teneur en eau/matières sèches/matières grasses dans le beurre

1. La méthode d'analyse décrite à l'annexe IX est appliquée, en tant que méthode de référence, pour la détermination de la teneur en eau du beurre.
2. La méthode d'analyse décrite à l'annexe X est appliquée, en tant que méthode de référence, pour la détermination de la teneur en matières sèches non grasses du beurre.
3. La méthode d'analyse décrite à l'annexe XI est appliquée, en tant que méthode de référence, pour la détermination de la teneur en matières grasses du beurre.

Article 9

Traceurs

1. La méthode d'analyse décrite à l'annexe XII s'applique comme méthode de référence pour la détermination de la vanilline dans le beurre concentré, dans le beurre ou dans la crème.
2. La méthode d'analyse décrite à l'annexe XIII s'applique comme méthode de référence pour déterminer la quantité d'ester éthylique de l'acide β -apo-8'-caroténique dans le beurre concentré ou le beurre.
3. La méthode d'analyse décrite à l'annexe XIV s'applique comme méthode de référence pour la détermination de la teneur du beurre et du beurre concentré en stigmastérol ou en β -sitostérol.
4. Le beurre concentré, le beurre, ou la crème ont été tracés conformément à la pertinente réglementation communautaire si les résultats obtenus correspondent aux spécifications du point 8 des annexes visées aux paragraphes 1, 2 et 3.

Article 10

Détection de la caséine de lait de vache

1. La méthode d'analyse de référence figurant en annexe XV est appliquée pour garantir que le fromage devant être produit exclusivement avec du lait de brebis, du lait de chèvre ou du lait de bufflonne ou un mélange de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne ne contient pas de caséine de lait de vache.

La caséine de lait de vache est considérée comme présente si la teneur apparente en caséine de lait de vache de l'échantillon à analyser est égale ou supérieure à la teneur de l'échantillon de référence contenant 1 % de lait de vache, prévu à l'annexe XV.

2. Les méthodes de routine pour la détection de la caséine de lait de vache dans les fromages visés au paragraphe 1

peuvent être utilisées dans les conditions suivantes:

- a) la limite de détection doit être de 0,5 % ou moins;
- b) il ne peut pas y avoir de résultats faux positifs;
- c) la caséine de lait de vache doit être détectable avec la sensibilité requise, même après de longues périodes de maturation, comme cela peut se produire dans les conditions habituelles de l'exploitation commerciale.

Si la condition prévue au point b) n'est pas remplie, tout échantillon donnant un résultat positif doit être analysé au moyen de la méthode de référence.

Si l'exigence prévue au point c) n'est pas satisfaite pour un des types de fromages visés au paragraphe 1, ce fromage doit être analysé au moyen de la méthode de référence.

Article 11

Détection des coliformes

1. La méthode d'analyse de référence décrite en annexe XVI est applicable pour la détection de la présence de coliformes dans le beurre, le lait écrémé en poudre, la caséine et les caséinates.
2. Des méthodes de routine pour la détection des coliformes peuvent être utilisées, à condition que les résultats obtenus soient comparables à ceux obtenus par la méthode de référence décrite à ladite annexe. Les méthodes de routine doivent, en particulier, avoir une limite de détection suffisante. Il ne peut y avoir de faux négatifs. Si l'on ne peut exclure l'apparition de faux positifs, tout résultat positif doit être confirmé en utilisant la méthode de référence.

Article 12

Teneur en lactose

La méthode pour déterminer la teneur en lactose des produits relevant de la position 2309 de la nomenclature combinée est définie à l'annexe XVII.

Article 13

Détection du lactosérum présure

1. La méthode pour détecter la présence de lactosérum présure dans le lait écrémé en poudre destiné au stockage public est définie à l'annexe XVIII.
2. La méthode pour détecter la présence de lactosérum présure dans le lait écrémé en poudre et dans les mélanges destinés à l'alimentation animale est définie à l'annexe XIX.

Article 14

Détection du babeurre

La méthode pour détecter la présence du babeurre dans le lait écrémé en poudre est définie à l'annexe XX.

*Article 15***Résidus d'antimicrobiotique**

La méthode pour déterminer la présence de résidus d'antibiotiques et de sulfonamides/dapson dans le lait écrémé en poudre est définie à l'annexe XXI.

*Article 16***Teneur en lait écrémé en poudre**

La méthode pour déterminer la teneur en lait écrémé en poudre dans les aliments composés des animaux est définie à l'annexe XXII.

*Article 17***Détection de l'amidon**

La méthode pour détecter la présence d'amidon dans le lait écrémé en poudre, le lait en poudre dénaturé et les aliments composés pour animaux est définie à l'annexe XXIII.

*Article 18***Teneur en humidité du babeurre acide en poudre**

La méthode pour déterminer la teneur en humidité du babeurre acide en poudre destiné à être utilisé dans les aliments pour animaux est définie à l'annexe XXIV.

*Article 19***Détection des matières grasses étrangères**

La méthode pour déterminer la présence de matières grasses étrangères dans les matières grasses lactiques est définie à l'annexe XXV.

CHAPITRE III

DISPOSITIONS FINALES*Article 20***Modifications du règlement (CE) n° 2771/1999**

Le règlement (CE) n° 2771/1999 est modifié comme suit:

- 1) À l'article 4, paragraphe 1, la première phrase est remplacée par le texte suivant: «Les autorités compétentes contrôlent la qualité du beurre selon les méthodes visées à l'annexe I et sur la base des échantillons prélevés selon les modalités visées à l'annexe IV».
- 2) À l'annexe I, le texte de la note n° 2 de bas de page est remplacé par le texte suivant: «Voir annexe I du règlement (CE) n° 213/2001.»

3) Les annexes II et III sont supprimées.

4) À l'annexe IV, point 2, avant-dernière ligne, les termes «à l'annexe III» sont remplacés par les termes «à l'annexe VII du règlement (CE) n° 213/2001.»

*Article 21***Modification du règlement (CE) n° 2799/1999**

Le règlement (CE) n° 2799/1999 est modifié comme suit:

1) À l'article 20, les paragraphes 1, 2, 3 et 4 sont remplacés par le texte suivant:

«1. La teneur en lait écrémé en poudre des mélanges et des aliments composés est vérifiée au moyen d'une analyse, effectuée au moins en double, conformément à la méthode définie à l'annexe XXII du règlement (CE) n° 213/2001, complétée par les mesures de contrôle mentionnées à l'article 17, paragraphe 3, du présent règlement. En cas de discordance entre les résultats de ces vérifications, le résultat des contrôles sur place est déterminant.

2. L'absence de lactosérum présumé est établie selon la méthode définie à l'annexe XIX du règlement (CE) n° 213/2001.

3. La teneur en amidon des aliments composés est établie par les mesures de contrôle mentionnées à l'article 17, paragraphe 3, du présent règlement qui doivent être complétées par la méthode d'analyse définie à l'annexe XXIII du règlement (CE) n° 213/2001.

4. La teneur en humidité du babeurre acide en poudre est établie selon la méthode d'analyse définie à l'annexe XXIV du règlement (CE) n° 213/2001.»

2) Les annexes III, IV, V et VI sont supprimées.

*Article 22***Abrogations**

Les règlements (CEE) n° 1216/68, (CEE) n° 3942/92, (CE) n° 86/94, (CE) n° 2721/95, (CE) n° 1854/96, (CE) n° 1080/96, (CE) n° 1081/96, (CE) n° 1082/96, (CE) n° 880/98 et (CE) n° 1459/98 sont abrogés.

Les références faites aux règlements abrogés s'entendent comme faites au présent règlement.

*Article 23***Entrée en vigueur**

Le présent règlement entre en vigueur le septième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

Toutefois, les méthodes prévues aux annexes III, IV point 4, V, VI et VIII sont applicables à partir du dix-huitième mois après l'entrée en vigueur de ce règlement.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 9 janvier 2001.

Par la Commission
Franz FISCHLER
Membre de la Commission

ANNEXE I

(Article 2)

LISTE DES MÉTHODES DE RÉFÉRENCE

Index

Min. = minimum, Max. = maximum, Annexe = annexe du règlement cité, m.s.n.g. = matières sèches non grasses, AGL = acides gras libres, IP = indice de peroxyde, A = aspect, G = goût, C = consistance, TTG = teneur totale en germes, Therm. = teneur en germes thermophiles, EM = État membre, FIL = Fédération internationale de laiterie, ISO = International Organization for Standardization (Organisation internationale de normalisation), UICPA = Union internationale de chimie pure et appliquée, ADPI = American Dairy Products Institute, LCS = lait concentré sucré, LCC = lait ou crème évaporé, MSNGL = matières sèches non grasses laitières.

PARTIE A

Règlement de la Commission	Produit	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
Règlement (CE) n° 2771/1999 Stockage public (JO L 333 du 24.12.1999, p. 11)	Beurre non salé	Matières grasses laitières Eau m.s.n.g. AGL (Max.) IP (Max.) Coliformes Matières grasses non lactiques Marqueurs: stérols Autres marqueurs: — vanilline — ester éthylique de l'acide caroténique — triglycérides de l'acide énanthique Caractéristiques sensorielles Dispersion de l'eau	Min. 82 % Max. 16 % Max. 2 % 1,2 mmole/100 g de matières grasses 0,3 méq. d'oxygène/1 000 g de matières grasses Non détectables dans 1 g Non détectables par l'analyse des triglycérides Non détectables Non détectables Non détectables Non détectables Au moins 4 points sur 5 pour A, G et C Au moins 4 points	Annexe XI Annexe IX Annexe X Norme FIL 6B:1989 Norme FIL 74A:1991 (version anglaise) Annexe XVII Annexe XXVI Annexe XIV Annexe XII Annexe XIII UICPA 2.301 sub 5 Annexe VII Norme FIL 112A:1989	Remarque 1 Remarque 3
Règlement (CE) n° 2771/1999 Stockage privé	Beurre non salé	Matières grasses laitières Eau	Min. 82 % Max. 16 %	Annexe XI Annexe IX	Remarque 6
Règlement (CE) n° 2771/1999 Stockage privé	Beurre salé	Matières grasses laitières Eau Sel	Min. 80 % Max. 16 % Max. 2 %	Annexe XI Annexe IX Norme FIL 12B:1988	Remarque 6

Règlement de la Commission	Produit	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
Règlement (CE) n° 2571/97 (JO L 350 du 20.12.1997, p. 3)	Beurre non salé	Matières grasses laitières Eau Marqueurs: — stérols — vanilline — ester éthylique de l'acide caroténique — triglycérides de l'acide énanthique	Min. 82 % Max. 16 %	Annexe XI Annexe IX Annexe XIV Annexe XII Annexe XIII UICPA 2.301 sub 5	
Règlement (CE) n° 2571/97	Beurre salé	Matières grasses laitières Eau Sel Marqueurs: — stérols — vanilline — ester éthylique de l'acide caroténique — triglycérides de l'acide énanthique	Min. 80 % Max. 16 % Max. 2 %	Annexe XI Annexe IX Norme FIL 12B:1988 Annexe XIV Annexe XII Annexe XIII UICPA 2.301 sub 5	
Règlement (CE) n° 2571/97	Beurre concentré	Matières grasses laitières Humidité et MSNGL AGL IP (Max.) Matières grasses non lactiques Goût Odeur Autres Marqueurs: — stérols — vanilline — ester éthylique de l'acide caroténique — triglycérides de l'acide énanthique	Min. 99,8 % Max. 0,2 % Max. 0,35 % (oléique) 0,5 méq. d'oxygène/1 000 g de matières grasses Absent Franc Absence d'odeurs étrangères Absence d'agents neutralisants, d'antioxygènes et de conservateurs	Norme FIL 24:1964 Norme FIL 23A:1988 (humidité) Norme FIL 24:1964 (MSNGL) Norme FIL 6B:1989 Norme FIL 74A:1991 (version anglaise) Annexe XXV Annexe XIV Annexe XII Annexe XIII UICPA 2.301 sub 5	Remarque 1

Règlement de la Commission	Produit	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
Règlement (CE) n° 2571/97	Crème	Matières grasses Marqueurs: — stérols — vanilline — ester éthylique de l'acide caroténique — triglycérides de l'acide énanthique	35 %	Norme FIL 16C:1987 Méthodes approuvées par l'autorité compétente Annexe XII Méthodes approuvées par l'autorité compétente UICPA 2.301 sub 5	Remarque 2 Remarque 2
Règlement (CEE) n° 429/90 (JO L 45 du 21.2.1990, p. 8)	Beurre concentré	Matières grasses du lait m.s.n.g. Marqueurs: — stigmastérol (95 %) — stigmastérol (85 %) — triglycérides de l'acide énanthique — ester éthylique de l'acide butyrique et stigmastérol — Lécithine (E322) NaCl AGL IP (Max.) Goût Odeur Autres	Min. 96 % Max. 2 % 15 g/100 kg de beurre concentré 17 g/100 kg de beurre concentré 1,1 kg/100 kg de beurre concentré Voir annexe, point 1 c) Max. 0,5 % Max. 0,75 % Max. 0,35 % (oléique) Max. 0,5 méq. d'oxygène/1 000 g de matières grasses Franc Absence d'odeurs étrangères Absence d'agents neutralisants, d'antioxygènes et de conservateurs	Méthodes approuvées par l'autorité compétente Méthodes approuvées par l'autorité compétente Annexe XIV Annexe XIV UICPA 2.301 sub 5 Annexe XIV Méthode approuvée par l'autorité compétente (aide butyrique) Méthodes approuvées par l'autorité compétente Norme FIL 12B:1988 Norme FIL 6B:1989 Norme FIL 74A:1991 (version anglaise)	Remarque 2 Remarque 2 Remarque 2 Remarque 2 Remarque 1
Règlement (CEE) n° 2191/81 (JO L 213 du 1.8.1981, p. 20)	Beurre non salé	Matières grasses laitières Eau	Min. 82 % Max. 16 %	Annexe XI Annexe IX	

Règlement de la Commission	Produit	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
Règlement (CEE) n° 2191/81	Beurre salé	Matières grasses laitières Eau Sel	Min. 80 % Max. 16 % Max. 2 %	Annexe XI Annexe IX Norme FIL 12B:1988	
Article 9 et titre II du règlement (CE) n° 1255/1999	Fromage à base de lait de brebis et/ou de chèvre	Lait de vache	< 1 %	Annexe XV	
Règlement (CEE) n° 2921/90	Annexe I — Caséine acide	Eau Matières grasses Acidité libre	Max. 12,00 % Max. 1,75 % Max. 0,30 % (lactique)	Norme FIL 78C:1991 FIL 127A: 1988 Norme FIL 91:1979	
Règlement (CEE) n° 2921/90	Annexe I — Caséine présure	Eau Matières grasses Cendres	Max. 12,00 % Max. 1,00 % Min. 7,50 %	Norme FIL 78C:1991 FIL 127A:1998 Norme FIL 90:1979	
Règlement (CEE) n° 2921/90	Annexe I — Caséinate	Eau Protéines du lait Matières grasses et cendres	Max. 6,00 % Min. 88,00 % Max. 6,00 %	Norme FIL 78C:1991 Norme FIL 92:1979 FIL 127A:1988 Norme FIL 89:1979 ou Norme FIL 90:1979	
Règlement (CEE) n° 2921/90	Annexe II — Caséine acide	Eau Matières grasses Acidité libre TTG (Max.) Coliformes Therm. (Max.)	Max. 10,00 % Max. 1,50 % Max. 0,20 % (lactique) 30 000/1 g Absence/0,1 g 5 000/1 g	Norme FIL 78C:1991 FIL 127A:1988 Norme FIL 91:1979 Norme FIL 100B:1991 Annexe XVI Norme FIL 100B:1991	Remarque 3 Remarque 3 Remarques 3, 4
Règlement (CEE) n° 2921/90	Annexe II — Caséine présure	Eau Matières grasses Cendres TTG (Max.) Coliformes Therm. (Max.)	Max. 8,00 % Max. 1,00 % Min. 7,50 % 30 000/1 g Absence/0,1 g 5 000/1 g	Norme FIL 78C:1991 FIL 127A:1988 Norme FIL 90:1979 Norme FIL 100B:1991 Annexe XVI Norme FIL 100B:1991	Remarque 3 Remarque 3 Remarques 3, 4

Règlement de la Commission	Produit	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
Règlement (CEE) n° 2921/90	Annexe II — Caséinate	Eau Protéines du lait Matières grasses et cendres TTG (Max.) Coliformes Therm. (Max.)	Max. 6,00 % Min. 88,00 % Max. 6,00 % 30 000/1 g Absence/0,1 g 5 000/1 g	Norme FIL 78C:1991 Norme FIL 92:1979 FIL 127A:1988 FIL 89:1979 ou FIL 90:1979 Norme FIL 100B:1991 Annexe XVI Norme FIL 100B:1991	Remarque 3 Remarque 3 Remarques 3, 4
Règlement (CEE) n° 2921/90	Annexe III — Caséinate	Eau Protéines du lait Matières grasses Lactose Cendres TTG (Max.) Coliformes Therm. (Max.)	Max. 6,00 % Min. 85,00 % Max. 1,50 % Max. 1,00 % Max. 6,50 % 30 000/1 g Absence/0,1 g 5 000/1 g	Norme FIL 78C:1991 Norme FIL 92:1979 FIL 127A:1988 Norme FIL 106:1982 FIL 89:1979 ou FIL 90:1979 Norme FIL 100B:1991 Annexe XVI Norme FIL 100B:1991	Remarque 3 Remarque 3 Remarques 3, 4
Règlement (CEE) n° 2799/1999 (JO L 340 du 31.12.1999, p. 3)	Aliments composés pour animaux et lait écrémé en poudre (LEP) (pour l'alimentation des animaux)	Eau (babeurre acide en poudre) Protéines Eau (LEP) Matières grasses (LEP) Lactosérum présure (LEP) Amidon (LEP) Eau (mélange) Matières grasses (mélange) Lactosérum présure (mélange) Teneur en LEP (du produit final) Matières grasses (du produit final) Amidon (du produit final) Cuivre (du produit final)	Max. 5 % 31,4 % (min. sur l'extrait sec non gras) Max. 5 % Max. 11 % Absence Absence 5 % max. sur l'extrait sec non gras — Absence Min. 50 % Min. 2,5 % ou 5 % Min. 2 % 25 ppm	Norme FIL 20B:1993 Norme FIL 26A:1993 Norme FIL 9C:1987 Annexe XIX Annexe XXIII Norme FIL 26A:1993 Directive 84/4/CEE de la Commission (JO L 15 du 18.1.1984, p. 28) Annexe XIX Annexe XXII Directive 84/4/CEE de la Commission Annexe XXIII Directive 78/633/CEE de la Commission (JO L 206 du 26.7.1987, p. 43)	Remarque 7 Remarque 7 Remarque 8 Remarque 9

Règlement de la Commission	Produit	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
Règlement (CE) n° 322/96 (JO L 45 du 23.2.1996, p. 5)	LEP (procédé spray)	Matières grasses	Max. 1,0 %	Norme FIL 9C:1987	
		Protéines	31,4 % (min. sur l'extrait sec non gras)	Norme FIL 20B:1993	
		Eau	Max. 3,5 %	Norme FIL 26A:1993	
		Acidité (N/10 NaOH)	Max. 19,5 ml	Norme FIL 86:1981	
		Lactates	Max. 150 mg/100 g	Norme FIL 69B:1987	
		Phosphate	Négatif	Norme ISO 3356:1975	
		Solubilité	Max. 0,5 ml à 24 °C	FIL 129A:1988	
		Particules brûlées	Filtre B Min. (15,0 mg)	ADPI:1990	
		TTG	40 000/1 g	Norme FIL 100B:1991	Remarque 3
		Coliformes	Négatif/0,1 g	Annexe XVI	Remarque 3
		Babeurre	Négatif	Annexe XX	
		Lactosérum présure	Négatif	Annexe XVIII	
		Lactosérum acide	Négatif	Méthode approuvée par l'autorité compétente	Remarque 2
	Agents antimicrobiens		Annexe XXI		

PARTIE B

Les méthodes de référence reprises à la partie B sont applicables pour l'analyse de produits couverts par n'importe quel règlement indiqué dans la première colonne.

Règlement de la Commission	Produit	Code NC	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
Règlement (CEE) n° 2658/87 (JO L 256 du 7.9.1987, p. 1) Règlement (CE) n° 2414/98 (JO L 299 du 10.11.1998, p. 7) Règlement (CE) n° 1374/98 (JO L 185 du 30.6.1998, p. 21) Règlement (CE) n° 2508/97 (JO L 345 du 16.12.1997, p. 31) Règlement (CE) n° 174/1999 (JO L 20 du 27.1.1999, p. 8)	Lait et crème de lait non concentrés ni additionnés de sucre ou d'autres édulcorants	0401	Matières grasses (≤ 6 %)	Les limites sont celles spécifiées dans la description du code NC pour le produit particulier et, le cas échéant, précisées par le règlement (CEE) n° 3846/87 de la Commission (JO L 366 du 24.12.1987, p. 1), partie 9 de la nomenclature à l'exportation ou par le règlement (CE) n° 1374/1998 (JO L 185 du 30.6.1998, p. 21)	Norme FIL 1D:1996	
Matières grasses (> 6 %)			Norme FIL 16C:1987			

Règlement de la Commission	Produit	Code NC	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
	Lait et crème de lait, concentrés ou additionnés de sucre ou d'autres édulcorants	0402	Matières grasses (forme liquide) Matières grasses (forme solide) Protéines Saccharose (teneur normale) Saccharose (faible teneur) Matière sèche (LCS) Matière sèche (LCC) Eau (lait et poudre de crème)		Norme FIL 13C:1987 Norme FIL 9C:1987 Norme FIL 20B:1993 Norme FIL 35A:1992 Méthodes approuvées par l'autorité compétente Norme FIL 15B:1991 Norme FIL 21B:1987 Norme FIL 26A:1993	Remarque 2
	Babeurre, lait et crème fermentés ou acidifiés, concentrés ou non concentrés, additionnés de sucre ou d'autres édulcorants	0403	Matières grasses Protéines Saccharose (teneur normale) Saccharose (faible teneur) Eau (babeurre acide en poudre) Eau (babeurre doux en poudre) Matière sèche (autres produits)		FIL 1D:1996, FIL 9C:1987, FIL 16C:1987, FIL 22B:1987, FIL 126A:1988 Norme FIL 20B:1993 Norme FIL 35A:1992 Méthodes approuvées par l'autorité compétente Annexe XXIV Norme FIL 26A:1993	Remarque 2
	Lactosérum, concentré ou non concentré ou additionné de sucre ou d'autres édulcorants; produits composés de composants naturels du lait	0404	Matières grasses Protéines Saccharose (teneur normale) Saccharose (faible teneur)		FIL 9C:1987, FIL 16C:1987, FIL 22B:1987 Norme FIL 20B:1993 Norme FIL 35A:1992 Méthodes approuvées par l'autorité compétente	Remarque 2
		0404 90	Protéines Eau Matière sèche (Produits concentrés)		Norme FIL 20B:1993 Norme FIL 26A:1993 Norme FIL 15B:1991 Norme FIL 21B:1987	
	Beurre et autres matières grasses du lait; pâtes à tartiner laitières	0405	Matières grasses (si ≤ 85 %) Eau m.s.n.g. NaCl Matières grasses (si > 99 %) Eau (si matières grasses < 99 %)		Annexe XI Annexe IX Annexe X Norme FIL 12B:1998 Norme FIL 24:1964 Norme FIL 23A:1988	
		Beurre				
		Butteroil				

Règlement de la Commission	Produit	Code NC	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
	Fromage et caillebotte	0406	Matières grasses Matière sèche Matière sèche (Ricotta) NaCl Lactose		Norme FIL 5B:1986 Norme FIL 4A:1982 Norme FIL 58:1970 Norme FIL 88A:1988 Norme FIL 79B:1991	
Règlement (CEE) n° 2658/87	Aliments composés pour animaux	2309	Lactose		Annexe XVII	

Remarques concernant la liste des méthodes de référence de l'Union européenne:

Remarque 1: Isolation des matières grasses du lait comme décrit dans la norme FIL 6B:1989 (protection contre la lumière).

Remarque 2: Aucune méthode de référence n'a été établie.

Remarque 3: L'échantillon doit être préparé conformément à la norme FIL 122C:1996 ou conformément à la norme FIL 73A:1985.

Remarque 4: Incubation pendant 48 heures à une température de 55 °C, précautions à prendre contre l'assèchement du milieu de culture.

Remarque 5: % m.s.n.g. = % matière sèche - % matière grasse.

Remarque 6: Le beurre doit correspondre à la classe nationale de qualité de l'État de production visé à l'annexe V du règlement (CE) n° 2771/1999 de la Commission.

Remarque 7: Directive 84/4/CEE de la Commission.

Remarque 8: Règlement (CE) n° 1758/94 de la Commission (JO L 183 du 19.7.1994, p. 14).

Remarque 9: Directive 78/633/CEE de la Commission.

ANNEXE II

(Article 3)

VÉRIFICATION DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LES MÉTHODES DE ROUTINE, PROCHE DES LIMITES POUR LES CARACTÉRISTIQUES DE COMPOSITION ET DE QUALITÉ SPÉCIFIÉES DANS LES RÈGLEMENTS

Si m_o est une limite pour les caractéristiques de composition et de qualité spécifiées dans un règlement, la limite de décision (L) est:

$$L = m_o$$

si $R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}} \leq 1$

R_{Rout} : Limite de reproductibilité de la méthode de routine

R_{Ref} : Limite de reproductibilité de la méthode de référence

Si m_o est une limite supérieure et $R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}} > 1$, la limite de décision est obtenue par la formule:

$$L = m_o - [(R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}}) - 1] \cdot \text{CrD}_{95}$$

Si, dans les mêmes conditions, m_o est une limite inférieure, la limite de décision est obtenue par la formule:

$$L = m_o + [(R_{\text{Rout}}/R_{\text{Ref}}) - 1] \cdot \text{CrD}_{95}$$

dans laquelle CrD_{95} est la différence critique de la méthode de référence, cf. annexe IV.

Si m_o est une limite supérieure, un résultat final obtenu par une méthode de routine, supérieur à la limite de décision, doit être remplacé par un résultat final obtenu par la méthode de référence. Ce résultat final doit être fondé sur au moins le même nombre d'analyses/d'échantillons que le résultat final de la méthode de routine.

Si m_o est une limite inférieure, suivre la même procédure pour un résultat final obtenu par une méthode de routine, qui est inférieur à la limite de décision.

Remarque

La procédure décrite ci-dessus peut être appliquée en l'absence d'effets décelables dus à la matrice.

Ces effets peuvent être décelés de la manière suivante: pour chaque échantillon utilisé pour l'étalonnage, la différence (w) entre les résultats obtenus par la méthode de référence et par la méthode de routine est calculée.

L'écart type calculé selon la formule:

$$s = \sqrt{(\sum w_i^2)/2m}$$

m : nombre d'échantillons utilisés pour l'étalonnage

est comparé avec la moyenne arithmétique de l'écart type de répétabilité de la méthode de référence et de la méthode de routine:

$$s_r = \sqrt{(s_{r(\text{ref})}^2 + s_{r(\text{rout})}^2)/2}$$

Un effet du à la matrice ne peut pas être exclu si:

$$m \bullet s^2/s_r^2 > \text{Chi}_{f;1-\alpha}^2$$

formule dans laquelle:

$f = m$ (f : nombre de degrés de liberté)

$\alpha =$ probabilité d'erreur; $\alpha = 0,05$.

Dans ce cas, d'autres recherches sont nécessaires pour qu'il soit possible de fixer une limite de décision.

ANNEXE III
(Articles 4 et 5)

a) Procédure relative à la détermination de la conformité avec une limite de reproductibilité établie (analyse chimique)

La conformité avec la limite de reproductibilité est vérifiée par comparaison des résultats du laboratoire avec ceux d'un laboratoire expérimenté ⁽¹⁾, obtenus avec un échantillon identique. Une double détermination est effectuée dans les deux laboratoires et les résultats sont évalués selon la formule:

$$CrD_{95}(|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|) = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

dans laquelle

CrD_{95} : différence critique ($P = 0,95$)

\bar{y}_1 : moyenne arithmétique de deux résultats obtenus dans le laboratoire 1

\bar{y}_2 : moyenne arithmétique de deux résultats obtenus dans le laboratoire 2

R: limite de reproductibilité: à établir par interpolation

r: limite de répétabilité: si la précision varie avec la concentration.

Si la différence critique est dépassée, une autre expérience doit être réalisée dans un délai de deux mois. Si les résultats de cette seconde expérience ne sont pas conformes à la limite de reproductibilité, les autorités compétentes prennent toutes mesures nécessaires.

b) Procédure à suivre pour obtenir une limite de reproductibilité provisoire (analyse chimique)

Une limite de reproductibilité provisoire (R_{prov}) est établie à l'aide de l'équation suivante:

$$R_{prov} = \sqrt{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)^2 + \frac{r^2}{2}}$$

dans laquelle

\bar{y}_1 : moyenne de deux résultats obtenus dans le laboratoire 1

\bar{y}_2 : moyenne de deux résultats obtenus dans le laboratoire 2 (cf. annexe III, partie a)

r: limite de répétabilité ou limite de répétabilité provisoire.

Remarques:

1. R_{prov} peut être utilisée pour calculer les différences critiques (cf. annexe VI).
2. R_{prov} est fixée à $2r$ si la valeur calculée pour R_{prov} est inférieure à $2r$.
3. Si la valeur calculée est supérieure à $3r$ ou supérieure au double de la valeur R calculée au moyen de l'équation Horwitz (*), R_{prov} est alors une valeur inacceptablement élevée et ne peut être utilisée pour calculer la différence critique.
4. R_{prov} doit être calculée au moins une fois par an sur la base des résultats obtenus dans deux laboratoires (cf. annexe IV).
5. La valeur moyenne de R_{prov} doit être utilisée pour calculer les différences critiques. Les règles établies aux points 2 et 3 s'appliquent à la valeur moyenne de R_{prov} .

(*) Équation de Horwitz:

$$RSD_R(\%) = 2^{1-0,5 \log_{10} c}$$

dans laquelle:

RSD_R : Écart type relatif de la reproductibilité

c: concentration exprimée en fraction décimale (exemple: 10 g/100 g = 0,1).

Référence:

Peeler, J.T., Horwitz, W. and Albert, R.
J. Ass. Off. Anal. Chem.
72(5), 784-806 (1989).

⁽¹⁾ En règle générale, le laboratoire expérimenté doit être un laboratoire qui a participé avec succès soit à la validation de la méthode d'essai soit à un test d'adéquation

La limite de reproductibilité (valeur R) est obtenue à partir de la valeur RSD_R calculée comme suit:

$$R = 0,0283 \bar{x} RSD_R$$

(\bar{x} = moyenne arithmétique des résultats obtenus)

Exemples de valeurs RSD_R calculées

Concentration	RSD_R (%)
1 g/100 g	4
0,01 g/100 g	8
1 mg/1 000 g	16

Pour une concentration de l'analyte de 1 g/100 g on obtient:

$$R = 0,0283 * 1 * 4 = 0,11 \text{ g/100 g.}$$

ANNEXE IV

(Article 4)

ÉVALUATION DES RÉSULTATS D'ANALYSE OBTENUS SELON DES MÉTHODES VALIDÉES

S'il ressort d'un résultat d'analyse qu'une limite a été dépassée, la moyenne arithmétique de deux résultats ou plus est calculée. La procédure suivante s'applique:

- 1) Si le résultat d'analyse est un résultat unique, une seconde analyse est effectuée dans des conditions de répétabilité. Si les deux analyses ne peuvent être effectuées dans ces conditions, une nouvelle analyse est effectuée en double dans des conditions de répétabilité et les résultats obtenus sont utilisés pour estimer la conformité avec la différence critique.
- 2) La valeur absolue de la différence entre la moyenne arithmétique des résultats obtenus dans des conditions de répétabilité et la limite sont calculées. Une valeur absolue de la différence, qui est supérieure à la différence critique, signifie que l'échantillon analysé ne remplit pas les conditions requises.

La différence critique est établie au moyen de la formule suivante:

$$CrD_{95}(|y - m_0|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \frac{n-1}{n}}$$

dans laquelle

\bar{y} : moyenne arithmétique des résultats obtenus

m_0 : limite

n : nombre d'analyses/échantillon

Si la précision varie avec la concentration, il peut être nécessaire d'établir r et R par interpolation.

Normalement, un résultat final enregistré pour un échantillon doit indiquer qu'une limite a été respectée.

Des résultats finals compris

— dans l'intervalle m_0 et $m_0 + CrD_{95}(\bar{y} - m_0)$, si la limite est une valeur maximale,

— dans l'intervalle m_0 et $m_0 - CrD_{95}(\bar{y} - m_0)$, si la limite est une valeur minimale,

ne devraient donc se produire qu'exceptionnellement.

Des résultats finals situés dans les intervalles mentionnés ne sont acceptables que s'ils ne se produisent qu'une fois sur 5 échantillons au maximum analysés par lot. Si moins de 5 échantillons sont analysés pour chaque lot, un résultat compris dans la fourchette mentionnée est acceptable. Toutefois, la règle selon laquelle il n'est obtenu qu'un résultat situé dans les fourchettes mentionnées pour 5 échantillons analysés doit être respectée si les lots sont fournis régulièrement par un producteur.

- 3) Si le résultat final x est calculé à l'aide d'une formule telle que $x = y_1 +/ - y_2$ (exemple: eau + teneur en matière sèche non grasse du beurre pour calculer la teneur en matière grasse), dans laquelle y_1 et y_2 sont les résultats finaux d'un seul type d'analyse, alors les limites générales de répétabilité et de reproductibilité r_x et R_x des résultats finals x sont calculées comme suit:

$$r_x = \sqrt{r_1^2 + r_2^2}$$

$$R_x = \sqrt{R_1^2 + R_2^2}$$

formule dans laquelle r_1 et r_2 sont les limites de répétabilité et R_1 et R_2 les limites de reproductibilité respectives de y_1 et y_2 .

x est comparé avec la limite m_0 selon les règles établies aux points 1 et 2. La différence critique est calculée selon la formule

$$CrD_{95}(|x - m_0|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

dans laquelle x est la moyenne arithmétique des résultats x_i obtenus.

- 4) Si le résultat final est calculé selon une formule telle que

$$x = \frac{y_1}{y_2}$$

(exemple: teneur en matières grasses sur la matière sèche du fromage)

formule dans laquelle y_1 et y_2 sont les résultats finaux d'un seul type d'analyse, les limites générales de répétabilité et de reproductibilité r_x et R_x sont calculées comme suit:

$$r_x = \mu_x \sqrt{r_{s1}^2 + r_{s2}^2}$$

$$R_x = \mu_x \sqrt{R_{s1}^2 + R_{s2}^2}$$

$$\mu_x = \mu_1 | \mu_2$$

μ_1 : limite ou valeur cible pour y_1 (exemple: matière grasse)

μ_2 : limite ou valeur cible pour y_2 (exemple: matière sèche)

$$r_{s1} = \frac{r_1}{\mu_1} \leq 0.15 \qquad r_{s2} = \frac{r_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

formule dans laquelle

r_1 : limite de répétabilité y_1

r_2 : limite de répétabilité y_2

$$R_{s1} = \frac{R_1}{\mu_1} \leq 0.15 \qquad R_{s2} = \frac{R_2}{\mu_2} \leq 0.15$$

formule dans laquelle

R_1 : limite de reproductibilité y_1

R_2 : limite de reproductibilité y_2 .

Les procédures de calcul de r_x et R_x ne sont pas applicables que si les limites relatives de répétabilité et de reproductibilité (r^*1 , r^*2 ; R^*1 ; R^*2) sont égales ou inférieures à 0,15.

x est comparé avec la limite μ_x suivant les règles prévues aux points 1. et 2. La différence critique est établie selon la formule

$$CrD_{95}(|\bar{x} - \mu_x|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R_x^2 - r_x^2 \frac{n-1}{n}}$$

dans laquelle \bar{x} est la valeur arithmétique des résultats x obtenus par ordre chronologique (*).

(*) N.B.: Si, par exemple, on obtient les résultats y_{11} , y_{12} , y_{21} et y_{22} , la moyenne arithmétique de y_{11}/y_{21} et y_{12}/y_{22} doit être calculée.

ANNEXE V
CONTRÔLE INTERNE

(Article 5)

a) Méthode de contrôle interne de la qualité (CIQ) (analyse chimique)

Définition du matériau de contrôle

Un matériau utilisé aux fins du CIQ est soumis à la même procédure, éventuellement partielle, que celle appliquée aux matériaux testés.

Un matériau de contrôle peut être:

- un matériau de référence certifié,
- un matériau de référence interne,
- un matériau approuvé par un essai interlaboratoire,
- un matériau supplémenté.

Procédure à suivre pour établir le CIQ

Le laboratoire doit fixer le CIQ conformément à la procédure décrite dans le document de l'IUPAC «Directives harmonisées relatives au contrôle interne de la qualité dans les laboratoires d'analyse»⁽¹⁾.

Le CIQ s'effectue par inclusion des matériaux de contrôle dans la séquence analytique ou par une analyse en réplication de l'échantillon à tester. Les matériaux de contrôle doivent être similaires, par leur composition chimique, aux échantillons à tester, et posséder une stabilité appropriée pendant la période à prendre en considération. Il doit être démontré qu'ils peuvent être convenablement divisés en portions identiques pour analyse et que leur concentration en analyte convient pour l'intervalle recherché.

Un matériau de contrôle doit être introduit au moins une fois dans chaque série d'analyses et la valeur obtenue portée sur un graphique de contrôle en vue de mesurer les erreurs à long terme. En outre, le laboratoire doit périodiquement démontrer qu'il remplit les conditions de répétabilité pendant la série d'analyses. Ceci s'effectue par une répétition de l'analyse des matériaux de contrôle et/ou des matériaux à tester. Les résultats de ces analyses doivent être comparés avec toute limite de répétabilité publiée et les données existantes sur le degré interne de précision.

Si des matériaux de contrôle sont utilisés, les valeurs obtenues pour l'analyse du matériau de contrôle entre les séries sont représentées sur un graphique Shewhart [ISO 8258 (1991)] avec des limites de contrôle appropriées. Les limites d'action sont fixées à

$$x \pm 3s_t$$

s_t étant l'écart type total,

les limites d'avertissement étant fixées

$$x \pm 2s_t$$

Écart type total:

$$s_t = \sqrt{s_b^2 + s_w^2/n}$$

formule dans laquelle:

s_b : écart type entre séries

s_w : écart type à l'intérieur d'une série

n : nombre de déterminations

Dans les cas où il n'est pas utilisé de matériaux de contrôle (par exemple par manque de stabilité) au moins un des matériaux à tester doit être analysé en double dans chaque série.

Les différences absolues résultant des analyses en double à l'intérieur d'une série (cf. annexe III) sont transcrites sur graphique. La ligne centrale représente $1,128 s_w$, la limite inférieure est égale à zéro, la limite supérieure (limite d'activité) représente $3,686 s_w$, formule dans laquelle s_w est l'écart type à l'intérieur d'une série.

La méthode de contrôle doit comprendre des matériaux à teneurs faibles et élevées lorsque la fourchette de concentration est grande.

⁽¹⁾ M. Thompson and R. Wood: «Pure and Applied Chemistry» 67 (4), 649-666 (1995)

Si les matériaux à tester couvrent une large fourchette de concentrations d'analyte, le laboratoire doit établir le rapport entre la précision et la concentration. Si la précision est proportionnelle à la concentration, le contrôle suivant doit s'effectuer sur la base de la précision relative (c'est-à-dire la différence absolue en pourcentage de la valeur moyenne).

La fiabilité du système d'analyse disparaît si l'une des situations suivantes se présente:

- A) la valeur actuelle de la représentation graphique se situe en dehors des limites d'action;
- B) la valeur actuelle et la valeur précédente se situent en dehors des limites d'avertissement mais à l'intérieur des limites d'action;
- C) si des matériaux de contrôle sont utilisés, neuf valeurs successives se situent du même côté de la droite moyenne.

Dans cette situation, le laboratoire

- A) arrête l'analyse en attendant le résultat des essais de diagnostic et des mesures propres à remédier à la situation et
- B) rejette les résultats de la série et procède à une nouvelle analyse des matériaux à tester.

b) Procédure de sélection du matériau de contrôle interne et de fixation des limites de précision «internes» (analyse chimique)

Des données relatives à la précision des essais de laboratoire sont établies par une analyse en réplication de matériaux de contrôle et/ou une analyse en réplication d'échantillons à tester.

Pour établir des paramètres de précision relatifs aux variations au sein d'une série et entre séries, destinés à être utilisés par la suite pour établir les graphiques de contrôle, les laboratoires procèdent selon la procédure suivante. Les laboratoires peuvent adopter des procédures différentes s'ils sont en mesure de démontrer de façon appropriée que des données fiables quant à la précision ont été calculées.

1. Sélection des matériaux de contrôle

S'il y a lieu que le laboratoire utilise un matériau de contrôle, des données doivent être réunies auparavant en vue de fixer des limites. Dans la mesure du possible, des Matériaux de Référence Certifiés (MRC) doivent être utilisés. Les matériaux de contrôle proposés doivent être analysés dans des conditions de répétabilité au cours d'une même série comprenant des MRC appropriés et faire l'objet de répliques et d'essais aléatoires. Si cette méthode n'est pas utilisable, les laboratoires s'efforceront de participer à des essais d'aptitude et d'établir des moyennes consensuelles (valeurs attribuées) qui peuvent être considérées comme une véritable moyenne conventionnelle accompagnée d'une forte incertitude. D'autres procédures consistent notamment à attribuer une valeur réelle par la formulation ou l'utilisation de matériaux de contrôle dopés.

En outre, si le laboratoire effectue régulièrement ce type d'analyse et a déjà établi un contrôle statistique, tous les nouveaux matériaux de contrôle (par exemple matériaux demandés pour cause de rupture de stock) doivent être obtenus par référence aux analyses à propos desquelles un contrôle est en cours avec les matériaux existants.

2. Fixation de limites

Après avoir choisi un matériau de contrôle, le laboratoire fixe, à l'aide de ce matériau, des chiffres de précision à l'intérieur d'une série et entre les séries.

La condition minimale requise pour la fixation des chiffres de précision à l'intérieur d'une série est que le matériau de contrôle soit analysé en 12 doubles. L'analyse en double doit être effectuée dans des conditions de répétabilité, c'est-à-dire par le même opérateur, avec les mêmes réactifs, etc. L'analyse en double du matériau de contrôle doit être effectuée au hasard à l'intérieur d'une série d'analyses. Chaque double doit être effectuée un jour différent au cours d'une période déterminée, afin de garantir une variation raisonnable entre les séries, compte tenu des variations normales concernant par exemple les réactifs, le réétalonnage des instruments et, le cas échéant, le changement des analystes.

NB. Il faut savoir que l'utilisation de données qui ne sont pas entièrement représentatives de la variation entre les séries peut amener à refaire inutilement une analyse par suite de la fixation de limites trop étroites. À l'inverse, un laboratoire présentant des données de précision trop imprécises peut être dans l'impossibilité de respecter les limites prescrites dans les méthodes de référence; on pourrait supposer que son niveau de performance est faible par rapport à d'autres laboratoires comparables et il se pourrait qu'il ne fournisse pas les données appropriées pour le but recherché.

2.1. Détermination de la précision à l'intérieur d'une série

2.1.1. Précision à l'intérieur d'une série lorsqu'un matériau de contrôle est disponible

Des données doubles (au moins 12 doubles) doivent tout d'abord être soumises au test de variance maximale de Cochran. Ceci implique la comparaison de l'intervalle de double maximal au carré avec la somme des intervalles au carré.

$$c = \frac{d^2 \max}{\sum_{i=1}^p d_i^2}$$

formule dans laquelle

$d_i =$ la différence entre doubles.

La valeur du paramètre de Cochran, C , est comparée avec les valeurs des tables [ISO 5725 (1994)]. Si une valeur peut être classée comme suspecte ou aberrante, le résultat doit être analysé en vue d'en trouver l'explication, par exemple erreur technique, erreur informatique, erreur dans la réalisation de l'essai, analyse d'un échantillon inadéquat. Si l'explication de l'erreur technique est telle qu'il s'avère impossible de remplacer le résultat douteux, celui-ci doit être éliminé comme cas effectivement aberrant. Si des valeurs suspectes ou aberrantes, qui ne peuvent être expliquées, subsistent, les valeurs suspectes sont retenues comme correctes et les valeurs statistiques aberrantes rejetées. Le laboratoire doit s'efforcer d'obtenir des valeurs de remplacement.

Dès que le laboratoire a l'assurance que les données ne comportent plus de valeurs aberrantes, l'écart type à l'intérieur de la série s_w est calculé comme suit:

Pour chaque paire X_{i1} , X_{i2} des données doubles p , la somme des doubles,

$$s_i = x_{i1} + x_{i2}$$

et la différence des doubles,

$$d_i = x_{i2} - x_{i1}$$

sont calculées et additionnées pour donner

$$A = \sum_{i=1}^p s_i$$

$$B = \sum_{i=1}^p d_i^2$$

$$C = \sum_{i=1}^p s_i^2$$

L'estimation de l'écart type à l'intérieur de la série est la suivante:

$$s_w = \sqrt{\frac{B}{2p}}$$

La limite interne de précision est $2,8 s_w$.

Si une méthode de référence est utilisée, la limite interne de précision est comparée avec la limite de répétabilité publiée. Le laboratoire doit se conformer à l'exigence de la méthode de référence. Si cette exigence n'est pas respectée une enquête s'impose.

Les limites fixées doivent être considérées comme provisoires et susceptibles d'être révisées.

2.1.2. Précision à l'intérieur d'une série en l'absence d'un matériau de contrôle

Le laboratoire peut opter pour l'établissement de la précision à l'intérieur d'une série par analyse double d'échantillons à tester, représentatifs (minimum de 12 analyses doubles). S'il est impossible d'utiliser des matériaux de contrôle, par exemple à cause de leur instabilité, des données sur des doubles doivent être produites par cette méthode.

NB. Il est supposé que les analyses couvrent une fourchette de valeurs relativement étroite et que, de ce fait, une valeur unique peut être appliquée à tous les échantillons. Si la fourchette des résultats est plus large, qu'elle dépasse par exemple un ordre de grandeur et que la précision dépend de la concentration, les laboratoires doivent s'efforcer d'utiliser les écarts types relatifs.

Les données doivent être soumises au test de Cochran comme au point 2.1.1. Dès que le laboratoire a l'assurance que les données ne comprennent pas de valeurs aberrantes, l'écart type à l'intérieur de la série et la limite interne de précision peuvent être calculés comme au point 2.1.1.

L'écart type à l'intérieur de la série, s_w , peut être utilisé pour établir des graphiques de contrôle (cf. annexe II). Les limites fixées doivent être considérées comme provisoires et sujettes à révision.

2.2. Détermination de la précision entre séries

Calculer la valeur moyenne ($S_1/2$) pour chaque paire et soumettre les valeurs obtenues au test de Grubbs [ISO 5725 (1994)]. Les critères de rejet/d'acceptation pour les valeurs aberrantes ou suspectes sont celles décrites au point 2.1.1. Le laboratoire s'efforcera de trouver une valeur de remplacement pour tout résultat refusé. Dès que le laboratoire a l'assurance que les données sont exemptes de valeurs aberrantes, l'écart type S_b entre les séries est calculé.

$$s_b = \sqrt{\frac{1}{4(p-1)} \left(C - \frac{p-1}{p} B - \frac{A^2}{p} \right)}$$

ou 0 si l'indication sous le signe de la racine carrée est négative.

L'écart type total s_t est utilisé pour établir les graphiques de contrôle pour la moyenne de n déterminations (cf. annexe II). Les limites fixées doivent être considérées comme provisoires et sujettes à révision.

3. Révision des limites initiales

Les limites de contrôle fixées conformément aux dispositions ci-dessus doivent être considérées comme des estimations initiales.

Pour mettre à jour les limites fixées sur la base d'une précision acceptable à l'intérieur des séries (section 2.1.2.), il convient de réunir d'autres données de double au sujet des échantillons à tester. L'intervalle avant révision dépendra de la fréquence d'analyse. À titre indicatif, les données devraient être révisées après obtention de dix nouvelles valeurs doubles. Toutes les données devraient alors être soumises au test de Cochran et les limites fixées de nouveau sur la base de la nouvelle valeur de l'écart type. Les décisions ultérieures relatives à la validité des limites de contrôle doivent être prises en tenant compte des données supplémentaires.

La révision des données initiales obtenues au sujet de la précision à l'intérieur d'une série dépend aussi de la fréquence de l'analyse. À titre indicatif, après que dix autres données ont été obtenues à partir de l'analyse du matériau de contrôle à raison d'une analyse par lot, les hypothèses de départ faites au sujet de l'écart type et de la moyenne devraient être révisées.

Toutes les données doivent être soumises au test de Grubbs, afin de déceler les valeurs extrêmes aberrantes. L'écart moyen et l'écart type devraient être recalculés sur la base des nouvelles données.

En outre, à ce stade, le laboratoire devrait appliquer un graphique Cusum [BS 5700: (1984) et modification 5 480 (1987)] pour analyser tous les problèmes pouvant être associés par exemple au vieillissement des réactifs. Tout résultat simple sortant des limites du «masque-V» Cusum doit être analysé.

Les nouvelles limites (écart moyen et écart type) doivent être contrôlées régulièrement selon la technique Cusum. Toute indication selon laquelle la validité du matériau de contrôle est mise en doute doit être analysée soigneusement.

4. Communication des données de précision

Le laboratoire transmet les informations suivantes à l'autorité nationale compétente:

- la méthode employée
- l'écart type à l'intérieur des séries, s_w , et la limite interne de précision
- l'écart type entre séries s_b
- l'écart type total, s_t
- le nombre d'analyses nécessaires pour obtenir les données de précision.

ANNEXE VI

(Article 6)

ÉVALUATION DES ESTIMATEURS ET DE LA FIABILITÉ DES RÉSULTATS RELATIFS AUX ANALYSES SENSORIELLES

Les procédures suivantes sont applicables en cas de recours à des méthodes de notation (norme FIL 99C/1997).

a) *Détermination de «l'indice de répétabilité»*

Au moins dix échantillons seront analysés sous forme de double en aveugle par un estimateur au cours d'une période de 12 mois. Cette opération se fait habituellement en plusieurs sessions. Les résultats des caractéristiques des divers produits sont évalués par application de la formule suivante:

$$w_1 = 1 + \frac{\sum (x_{i1} - x_{i2})^2}{n}$$

dans laquelle

- w_1 : indice de répétabilité
 x_{i1} : note relative à la première évaluation de l'échantillon x_i
 x_{i2} : note relative à la seconde évaluation de l'échantillon x_i
 n : nombre d'échantillons

Les échantillons à évaluer doivent représenter une large gamme de qualité. w_1 ne doit pas dépasser 1,5 (échelles à 5 points).

b) *Détermination de «l'indice de l'écart»*

Cet indice doit être utilisé pour vérifier si un estimateur utilise la même échelle d'évaluation de la qualité qu'un groupe d'estimateurs expérimentés. Les notes données par l'estimateur sont comparées avec la moyenne des notes accordées par le groupe.

La formule suivante est utilisée pour l'évaluation des résultats:

$$D_1 = 1 + \frac{\sum [(x_{i1} - \bar{x}_{i1})^2 + (x_{i2} - \bar{x}_{i2})^2]}{2n}$$

formule dans laquelle:

- x_{i1} ; x_{i2} : cf. point a)
 \bar{x}_{i1} ; \bar{x}_{i2} : note moyenne accordée par le groupe d'estimateurs respectivement pour la première et la seconde évaluation de l'échantillon x_i
 n : nombre d'échantillons (au moins 10 par période de 12 mois).

Les échantillons à évaluer doivent représenter une large gamme de qualité. D_1 ne doit pas dépasser 1,5 (échelles à 5 points).

Les États membres communiquent toute difficulté rencontrée lors de l'application de cette méthode.

c) *Comparaison des résultats obtenus dans diverses régions d'un État membre et dans divers États membres*

Le cas échéant, au moins une fois par an un test permettant de comparer les résultats obtenus par des estimateurs de différentes régions doit être organisé. Si des différences significatives sont observées, les mesures nécessaires doivent être prises pour en déterminer les raisons et aboutir à des résultats comparables.

Les États membres peuvent organiser des tests permettant de comparer les résultats obtenus par leurs propres estimateurs et par les estimateurs d'États membres voisins. En cas de différences significatives, une étude approfondie est entreprise en vue d'obtenir des résultats comparables.

Les États membres communiquent les résultats de ces comparaisons à la Commission.

ANNEXE VII

(Article 6)

ÉVALUATION SENSORIELLE DU BEURRE

1. Champ d'application

L'objectif du présent procédé d'évaluation sensorielle du beurre est de fournir une méthode uniforme, applicable dans tous les États membres.

2. Définitions

Par *évaluation sensorielle*, on entend l'examen des propriétés d'un produit par les organes des sens.

Par *jury*, on entend un groupe d'évaluateurs sélectionnés travaillant, au cours de l'évaluation, sans communiquer entre eux et sans exercer d'influence les uns sur les autres.

Par *notation*, on entend l'évaluation sensorielle par un jury, au moyen d'une échelle numérique. Une nomenclature des défauts doit être utilisée.

Par *classification*, on entend une classification de la qualité effectuée sur la base de la notation.

Par *documents de contrôle*, on entend les documents utilisés pour enregistrer les notes attribuées à chaque propriété et la qualité finale du produit (la composition chimique peut également être consignée dans ces documents).

3. Salle d'essai

3.1. Des précautions doivent être prises pour que les évaluateurs dans la salle d'essai ne soient pas influencés par des facteurs extérieurs.

3.2. La salle d'essai doit être exempte d'odeurs étrangères et facile à nettoyer. Les murs doivent être de couleur claire.

3.3. La salle d'essai et son éclairage ne doivent pas affecter les propriétés des produits à noter. La salle doit être équipée d'un système approprié de contrôle de la température.

4. Sélection des évaluateurs

L'évaluateur doit être familiarisé avec les produits du beurre et posséder les compétences nécessaires pour effectuer une classification sensorielle. Ses compétences doivent être évaluées régulièrement (au moins une fois par an) par l'autorité compétente.

5. Exigences applicables au jury

Le jury doit être composé d'un nombre impair d'évaluateurs, au minimum trois. La majorité d'entre eux doivent être employés auprès de l'autorité compétente ou être des personnes agréées non employées dans le secteur du lait.

Plusieurs facteurs doivent être pris en considération avant l'évaluation afin d'obtenir des performances optimales de la part des sujets:

- les sujets ne doivent souffrir d'aucune maladie pouvant affecter leurs performances. Si de telles conditions se présentent, il convient d'intégrer un autre sujet au panel,
- les sujets doivent être à l'heure pour participer à l'évaluation et s'assurer qu'ils ont réservé suffisamment de temps pour effectuer l'évaluation,
- les sujets doivent éviter d'utiliser des produits fortement odorants tels que parfums, lotions après-rasage, déodorants, et de manger des aliments fortement aromatisés (épicés), etc,
- les sujets ne peuvent ni fumer, ni manger, ni boire autre chose que de l'eau pendant la dernière demi-heure précédant l'évaluation.

6. Évaluation de la valeur de chaque propriété

6.1. L'évaluation sensorielle doit être effectuée en relation avec les trois propriétés suivantes: l'aspect, la consistance et la saveur.

L'*aspect* couvre les éléments suivants: la couleur, la pureté apparente, la moisissure et la dispersion de l'eau. La dispersion de l'eau est testée conformément à la norme FIL 112A/1989.

La *consistance* couvre les éléments suivants: la fermeté et la tartinabilité.

Des méthodes physiques peuvent être appliquées pour l'évaluation de la consistance du beurre. La Commission envisage d'harmoniser ces méthodes.

La *flaveur* couvre les éléments suivants: le goût et l'odeur.

Un écart de température important par rapport à la température recommandée empêche une évaluation fiable de la consistance et de la flaveur. La température a une importance capitale.

- 6.2. Chaque propriété doit faire l'objet d'une évaluation sensorielle séparée. La notation doit être effectuée conformément au tableau 1.
- 6.3. Il peut être souhaitable pour les évaluateurs, avant de commencer l'évaluation, de noter ensemble un ou plusieurs échantillons de référence pour l'aspect, la consistance et la flaveur, dans un souci d'uniformité.
- 6.4. Les notes sont les suivantes:

	Maximum	Note exigée
Aspect	5	4
Consistance	5	4
Flaveur	5	4

Dans les cas où la note exigée n'est pas obtenue, une description du défaut doit être donnée. La note donnée par chaque évaluateur pour chaque propriété doit être enregistrée dans le document de contrôle. *Le produit est accepté ou rejeté sur la base d'une décision prise à la majorité.* Les cas où les différences entre les notes attribuées à chaque propriété dépassent 1 point ne devraient pas se produire fréquemment (pas plus d'une fois pour 20 échantillons), à défaut de quoi la compétence du jury devrait être soumise à un contrôle par le président du jury.

7. Surveillance

Un président de jury, qui doit être un employé officiel de l'autorité compétente et peut être un membre du jury, doit être généralement responsable de la procédure entière. Il doit enregistrer les notes attribuées à chaque propriété dans le document de contrôle et certifier si le produit est accepté ou rejeté.

8. Échantillonnage et préparation de l'échantillon

- 8.1. — Il est souhaitable que l'identité des échantillons soit tenue secrète au cours de l'évaluation pour éviter toute influence.
 - L'échantillonnage et la préparation de l'échantillon devraient être organisés par le président du jury préalablement à l'évaluation, sans la présence des autres membres du jury.
- 8.2. Dans les cas où l'évaluation sensorielle est effectuée dans l'entrepôt frigorifique, l'échantillon est prélevé au moyen d'une sonde à beurre. Si elle est effectuée ailleurs que dans l'entrepôt frigorifique, un échantillon d'au moins 500 g devrait être prélevé.
- 8.3. Au cours de l'évaluation, le beurre devrait avoir la température de 10 à 12 °C. De grands écarts par rapport à cette température devraient être évités à tout prix.

9. Nomenclature

Voir tableau 2 ci-joint.

Tableau 1: notation du beurre

Aspect			Consistance			Flaveur		
Points	Nu-méro (1)	Remarques	Points (catégorie de qualité)	Nu-méro (1)	Remarques	Points (catégorie de qualité)	Nu-méro (1)	Remarques
5		<i>très bon</i> type idéal qualité la meilleure (égal, sec)	5		<i>très bon</i> type idéal qualité la meilleure (bien tartinable)	5		<i>très bon</i> type idéal qualité la meilleure (arôme le plus fin, absolu- ment pur)
4		<i>bon</i> (2) aucun défaut évident	4	17 18	<i>bon</i> (2) dur mou	4		<i>bon</i> (2) aucun défaut évident
3	1 2 3 4 5 6 7 8	<i>assez bon (légers défauts)</i> aqueux, goutelettes d'eau apparentes couleur non homogène, bicolore rayé marbré tacheté (points colorés, taches de beurre fondu) séparation d'huile trop coloré inclusion d'air apparente (poreux)	3	14 15 16 17 18	<i>assez bon (légers défauts)</i> pâte courte, cassante, beurre grumeleux pâteux, pommadeux collant dur mou	3	21 22 25 27 33 34 35	<i>assez bon (légers défauts)</i> impur goût étranger, arrière-goût acide goût de cuit goût de brûlé goût de fourrage âcre, amer trop salé
2	1 3 4 5 6 10 11 12	<i>mauvais (défauts évidents)</i> aqueux, goutelettes d'eau apparentes rayé marbré tacheté (points colorés, taches de beurre fondu) séparation d'huile matières étrangères moisi sel non dissous	2	14 15 16 17 18	<i>mauvais (défauts évidents)</i> pâte courte, cassante, beurre grumeleux pâteux, pommadeux collant dur mou	2	21 22 23 25 32 33 34 35 36 38	<i>mauvais (défauts évidents)</i> impur goût étranger, arrière-goût goût de vieux acide goût d'oxydé goût métallique goût de fourrage âcre, amer trop salé goût de vase, fade, putride goût de produits chimiques
1	1 3 4 5 6 7 9 10 11 12	<i>très mauvais (défauts importants)</i> aqueux, goutelettes d'eau apparentes rayé marbré tacheté (points colorés, taches de beurre fondu) séparation d'huile trop coloré granuleux matières étrangères moisi sel non dissous	1	14 15 16 17 18	<i>très mauvais (défauts importants)</i> pâte courte, cassante, beurre grumeleux pâteux, pommadeux collant dur mou	1	22 24 25 26 28 29 30 31 32 34 36 37 38	<i>très mauvais (défauts importants)</i> goût étranger, arrière-goût goût de fromage, goût de fromage acide acide levuré goût de moisi rance huileux, goût d'huile de poisson, goût de poisson suiffeux goût d'oxydé goût métallique âcre, amer goût de vase, fade, putride malté (goût de malt) goût de produits chimiques

(1) Tableau 2.

(2) Les défauts visés sous «bon» ne constituent que de très petits écarts par rapport au type idéal.

Tableau 2: nomenclature des défauts du beurre**I. Aspect**

1. aqueux, gouttelettes d'eau apparentes
2. couleur non homogène bicolore
3. rayé
4. marbré
5. tacheté (points colorés, taches de beurre fondu)
6. séparation d'huile
7. trop coloré
8. inclusion d'air apparente (poreux)
9. granuleux
10. matières étrangères
11. moisi
12. sel non dissous

II. Consistance

14. pâte courte, cassante, beurre grumeleux
15. pâteux, pommadeux
16. collant
17. dur
18. mou

III. Flaveur

20. manque d'arôme, fade
21. impur ⁽¹⁾
22. goût étranger, arrière-goût
23. goût de vieux
24. goût de fromage,
goût de fromage acide
25. acide
26. levuré
27. a) goût de cuit
b) goût de brûlé
28. goût de moisi
29. rance
30. huileux, goût d'huile de poisson, goût de poisson
31. suiffeux
32. a) goût d'oxydé
b) goût métallique
33. goût de fourrage
34. âcre, amer
35. trop salé
36. goût de vase, fade, putride
37. malté (goût de malt)
38. goût de produits chimiques

⁽¹⁾ Cette appellation doit être utilisée le plus rarement possible et seulement quand on ne peut définir le défaut de façon plus précise.

ANNEXE VIII

(Article 7)

PROCÉDURE À SUIVRE EN CAS DE CONTESTATION DES RÉSULTATS D'ANALYSE (ANALYSE CHIMIQUE)

1. Une nouvelle analyse est effectuée à la demande de l'opérateur, dans les 7 jours ouvrables qui suivent la communication des résultats de la première analyse, à condition que des échantillons doubles du produit soient disponibles sous scellé et aient été stockés dans des conditions appropriées auprès des organismes compétents.
2. L'organisme compétent envoie, à la demande et aux frais de l'opérateur ces échantillons à un second laboratoire. Ce dernier doit être autorisé à exécuter des analyses officielles et doit avoir une qualification prouvée pour exécuter les analyses concernées. Cette qualification doit être établie par une participation réussie à des études en collaboration, des tests d'adéquation ou des comparaisons interlaboratoires. Le second laboratoire doit utiliser la méthode de référence. Les résultats obtenus par les deux laboratoires sont évalués comme suit:

a) *Les deux laboratoires respectent les exigences de répétabilité et de reproductibilité*

La moyenne arithmétique des résultats des tests obtenus par les deux laboratoires est communiquée comme étant le résultat final. Celui-ci est évalué à partir de la différence critique à l'aide de la formule suivante:

$$CrD_{95}(|\bar{y} - m_o|) = \frac{0.84}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

formule dans laquelle

\bar{y} : moyenne arithmétique de tous les résultats obtenus par les deux laboratoires

m_o : limite

R: reproductibilité

r: répétabilité

n_1 : nombre de résultats obtenus par le laboratoire 1

n_2 : nombre de résultats obtenus par le laboratoire 2.

Remarque: Si le résultat final est calculé suivant la formule

$$x = y_1 \pm y_2 \text{ ou } x = y_1/y_2$$

(voir respectivement annexe IV, points 3 et 4), remplacer R^2 et r^2 par R_x^2 et r_x^2 dans la formule.

b) *Les deux laboratoires respectent la condition de répétabilité mais pas la condition de reproductibilité*

Si la deuxième analyse confirme la première, la quantité soumise à analyse est rejetée comme non conforme. Dans le cas contraire, la quantité est acceptée.

c) *Un seul laboratoire respecte la condition de répétabilité*

Le résultat final du laboratoire respectant la condition de répétabilité est pris en considération pour arrêter la décision sur l'acceptabilité de la quantité soumise à analyse.

d) *Aucun laboratoire ne respecte la condition de répétabilité mais la condition de reproductibilité est respectée*

Le point a) s'applique.

e) *Aucun laboratoire ne respecte ni la condition de répétabilité ni la condition de reproductibilité*

La quantité soumise à analyse est acceptée si les résultats obtenus par un laboratoire aboutissent à cette conclusion.

f) *Les résultats ont été obtenus par des méthodes non validées*

La quantité soumise à analyse est acceptée si les résultats obtenus par un laboratoire aboutissent à cette conclusion.

3. Les résultats de la deuxième analyse sont communiqués à l'opérateur par l'autorité compétente dans les meilleurs délais. Les coûts de la seconde analyse sont à la charge de l'opérateur dans le cas où la quantité soumise à analyse est rejetée.
4. Dans les 5 jours ouvrables qui suivent la prise d'échantillons, si l'opérateur porte la preuve que la procédure d'échantillonnage n'était pas correcte, l'échantillonnage doit, si possible, être répété. Dans le cas où un nouveau échantillonnage n'est pas possible, la quantité soumise à analyse est acceptée.

ANNEXE IX

(Article 8)

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN EAU DU BEURRE**1. Portée et champ d'application**

La présente méthode de référence sert à déterminer la teneur en eau du beurre.

2. Référence

Fédération internationale de laiterie — Norme 50 C: 1995 — lait et produits laitiers — méthode d'échantillonnage.

3. Définition

Teneur en eau du beurre: la perte de masse après l'achèvement du processus de chauffage spécifié dans la présente norme. Cette teneur est exprimée en grammes pour 100 grammes.

4. Principe

Évaporation de l'eau de la portion à analyser en présence de pierre ponce à une température de 102 °C dans un four à dessiccation.

5. Matériel et produits

Matériel de laboratoire usuel, et en particulier:

- 5.1. Balance de précision, sensibilité 1 mg.
- 5.2. Dessiccateur fourni avec un agent desséchant efficace (par exemple un gel de silice fraîchement séché avec indicateur hygrosopique).
- 5.3. Four à dessiccation ventilé, avec dispositif thermostatique assurant une température de 102 ± 2 °C dans tout l'espace de travail.
- 5.4. Plats en verre, porcelaine ou métal non corrosif, d'une hauteur d'environ 20 mm et d'un diamètre compris entre 60 et 80 mm.
- 5.5. Granules de pierre ponce en lavée, d'un diamètre compris entre 0,8 et 10 mm.

6. Échantillonnage

Voir norme FIL 50 C: 1995.

7. Mode opératoire**7.1. Préparation de l'échantillon à analyser**

Chauffer l'échantillon de laboratoire dans le récipient fermé en verre ou en matière plastique adéquate, rempli au moins à moitié et au plus aux deux tiers, à une température telle que l'échantillon soit assez mou pour qu'on puisse le malaxer facilement jusqu'à obtention d'un état homogène (soit au moyen d'un agitateur mécanique, soit manuellement). Le malaxage doit s'effectuer normalement à une température ne dépassant pas 35 °C. Laisser refroidir l'échantillon à température ambiante. Aussitôt que possible après le refroidissement, ouvrir le récipient contenant l'échantillon et remuer ce dernier pendant un bref laps de temps (pas plus de 10 secondes) à l'aide d'un instrument approprié, par exemple une cuillère ou une spatule, avant de le peser.

7.2. Détermination de la teneur en eau

- 7.2.1. Placer environ 10 grammes de pierre ponce dans le plat (5.4).
- 7.2.2. Sécher le plat contenant la pierre ponce dans le four (5.3) à 102 ± 2 °C pendant au moins une heure.

Remarque: les phases de séchage visées aux points 7.2.2, 7.2.5 et 7.2.7 commencent lorsque la température dans le four atteint 102 ± 2 °C.
- 7.2.3. Laisser le plat refroidir dans le dessiccateur (5.2) jusqu'à la température de la pièce où se trouve la balance et peser avec une précision de 1 mg.

- 7.2.4. Peser dans le plat, avec une précision de 1 mg, une portion d'environ 5 g de l'échantillon à analyser.
- 7.2.5. Placer le plat dans le four à 102 ± 2 °C et le laisser pendant 3 heures.
- 7.2.6. Laisser le plat refroidir dans le dessiccateur jusqu'à la température de la pièce où se trouve la balance et le peser avec une précision de 1 mg.
- 7.2.7. Renouveler le processus de séchage pendant des périodes supplémentaires d'une heure en refroidissant et en pesant chaque fois conformément aux indications données au point 7.2.6, jusqu'à obtention d'une masse constante (acquise lorsque la variation de masse ne dépasse pas 1 mg).

Dans l'éventualité d'un accroissement de la masse, prendre comme base de calcul la masse la plus basse enregistrée.

8. Expression des résultats

8.1. Méthode de calcul et formule

Calculer la teneur en eau W en pourcentage de la masse, en appliquant la formule

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

où

m_0 désigne la masse en grammes du plat contenant la pierre ponce (7.2.3);

m_1 désigne la masse en grammes de la portion à analyser, du plat et de la pierre ponce avant séchage (7.2.4);

m_2 désigne la masse en grammes de la portion à analyser, du plat et de la pierre ponce après séchage (7.2.7).

Transcrire le résultat avec une décimale.

8.2. Répétabilité

La différence en valeur absolue entre les résultats respectifs de deux déterminations effectuées simultanément ou successivement sans perte de temps intermédiaire par le même opérateur dans les mêmes conditions sur un matériel à analyser identique, ne doit pas dépasser 0,2 %.

8.3. Reproductibilité

La différence en valeur absolue entre deux résultats respectivement obtenus par deux opérateurs travaillant dans des laboratoires différents sur un matériel à examiner identique, ne doit pas dépasser 0,3 %.

9. Rapport d'analyse

Le rapport d'analyse doit spécifier la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit aussi mentionner tous les détails opératoires non spécifiés dans la présente norme internationale ou considérés comme facultatifs, ainsi que les détails relatifs à tout incident susceptible d'avoir influé sur les résultats. Le rapport doit contenir tous les éléments d'information nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

ANNEXE X

(Article 8)

BEURRE: DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN MATIÈRES SÈCHES NON GRASSES**1. Portée et champ d'application**

La présente norme décrit une méthode servant à déterminer la teneur du beurre en matières sèches non grasses.

2. Références

FIL — Norme 50 C: 1995 — Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage.

3. Définitions

Teneur du beurre en matières sèches non grasses: le pourcentage des substances en cause, rapporté à la masse, déterminé selon le mode opératoire spécifié; il est exprimé en grammes pour 100 grammes.

4. Principe

Évaporation de l'eau d'une masse connue de beurre, extraction des matières grasses au pétrole léger et pesage du résidu.

5. Réactif

Pétrole léger ayant un intervalle d'ébullition compris entre 30 et 60 °C. Le réactif ne doit pas laisser subsister plus de 1 mg de résidu après l'évaporation de 100 ml.

6. Matériels et produits

- 6.1. Balance de précision ayant une sensibilité de 1 mg.
- 6.2. Dessiccateur pourvu d'un agent desséchant efficace (par exemple un gel de silice fraîchement séché avec indicateur hygrosopique).
- 6.3. Four à dessiccation, ventilé, avec dispositif thermostatique assurant une température de 102 ± 2 °C dans la totalité de l'espace de travail.
- 6.4. Plats en verre, en porcelaine ou en métal non corrosif, ayant un rebord d'une hauteur d'environ 20 mm, un diamètre de 60 à 80 mm, et munis d'un agitateur en verre.
- 6.5. Creuset à filtration, verre fritté, diamètre des pores 16 à 40 μm , avec flacon d'aspiration.

7. Échantillonnage

Voir FIL — Norme 50 C: 1995.

8. Mode opératoire**8.1. Préparation de l'échantillon à analyser**

Chauffer l'échantillon de laboratoire dans le récipient fermé en verre ou en matière plastique adéquate, rempli au moins à demi et au plus aux deux tiers, à une température telle que l'échantillon soit assez mou pour qu'on puisse le malaxer facilement jusqu'à obtention d'un état homogène (soit au moyen d'un agitateur mécanique, soit manuellement). Le malaxage doit s'effectuer normalement à une température ne dépassant pas 35 °C. Laisser refroidir l'échantillon à température ambiante. Aussitôt que possible après le refroidissement, ouvrir le récipient contenant l'échantillon et remuer ce dernier pendant un bref laps de temps (pas plus de 10 secondes) à l'aide d'un instrument approprié, par exemple une cuillère ou une spatule, avant de le peser.

8.2. Détermination

- 8.2.1. Sécher le plat avec l'agitateur (6.4) et le creuset à filtration (6.5) dans le four (6.3) pendant une heure. Laisser ces objectifs refroidir dans le dessiccateur et les peser ensemble (c'est-à-dire plat, agitateur et creuset à filtration) avec une précision de 1 mg (m_0).

Notes: — En règle générale, une durée de refroidissement de 45 minutes est suffisante.

— Il importe que la même combinaison plat/agitateur/creuset à filtration soit utilisée pour chaque portion à analyser lorsque le lot en cause en comporte plusieurs.

- 8.2.2. Enlever le creuset à filtration, enregistrer le poids de l'ensemble constitué par le plat et par l'agitateur, avec une précision de 1 mg (m_1).
- 8.2.3. Peser dans le plat, avec une précision de 1 mg, une portion d'environ 5 g de l'échantillon à analyser (8.1) (m_2).

- 8.2.4. Placer le plat (contenant l'agitateur et le beurre) dans le four à 102 ± 2 °C et l'y laisser toute la nuit.
- 8.2.5. Laisser le plat (8.2.3) refroidir jusqu'à température ambiante.
- 8.2.6. Verser 15 ml d'esther de pétrole chaud (environ 25 °C) dans le plat et détacher à l'aide de l'agitateur en verre la plus grande quantité possible du sédiment adhérent au plat. Transférer le solvant dans le creuset à filtration et le filtrer dans le flacon à aspiration.
- 8.2.7. Effectuer l'opération 8.2.6 quatre nouvelles fois. S'il n'y a pas de traces de matières grasses à la surface du plat, transférer quantitativement, pendant le quatrième lavage, la plus grande quantité possible du sédiment dans le creuset à filtration. S'il subsiste des traces de matières grasses, répéter l'opération 8.2.6 jusqu'à leur élimination totale.
- 8.2.8. Laver le sédiment dans le creuset à filtration avec 25 ml d'esther de pétrole chaud.
- 8.2.9. Sécher le plat et l'agitateur, ainsi que le creuset à filtration, dans le four à 102 ± 2 °C, pendant 30 minutes.
- 8.2.10. Laisser refroidir dans le dessiccateur jusqu'à température ambiante et peser avec une précision de 1 mg.
- 8.2.11. Répéter les opérations 8.2.9 et 8.2.10 jusqu'à obtention d'une masse constante (acquise lorsque la variation de masse ne dépasse pas 1 mg) pour l'ensemble constitué par le plat, l'agitateur et le creuset à filtration (m_3).

9. Expression des résultats

9.1. Calcul de la teneur en matières sèches non grasses

Calculer la teneur en matières sèches non grasses (msng), exprimée en pourcentage de la masse, en appliquant la formule:

$$MSNG = \frac{m_3 - m_0}{m_2 - m_1} \times 100$$

où

m_0 désigne la masse en grammes du plat vide avec l'agitateur en verre et le creuset à filtration (8.2.1);

m_1 désigne la masse en grammes du plat vide avec l'agitateur en verre (8.2.2);

m_2 désigne la masse en grammes de la portion à analyser et du plat avec l'agitateur en verre (8.2.3);

m_3 désigne la masse en grammes du plat avec l'agitateur et le creuset à filtration contenant le sédiment (8.2.11)

Transcrire le résultat avec une décimale.

9.2. Répétabilité

La différence en valeur absolue entre les résultats respectifs de deux déterminations, effectuées simultanément ou successivement sans perte de temps intermédiaire par le même opérateur dans les mêmes conditions sur un matériel à analyser identique, ne doit pas dépasser 0,1 %.

9.3. Reproductibilité

La différence en valeur absolue entre deux résultats respectivement obtenus par deux opérateurs travaillant dans des laboratoires différents sur un matériel à analyser identique, ne doit pas dépasser 0,2 %.

10. Rapport d'analyse

Le rapport d'analyse doit spécifier la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit aussi mentionner tous les détails opératoires non spécifiés dans la présente norme internationale ou considérés comme facultatifs, ainsi que les détails relatifs à tout incident susceptible d'avoir influé sur les résultats. Le rapport doit contenir tous les éléments d'information nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Note:

S'il s'agit de beurre salé, le sel ajouté est déterminé en tant que matière sèche non grasse. Aux fins de la détermination de la teneur en matières sèches non grasses du lait, la teneur en sel ajouté doit être déduite de la teneur en matières sèches non grasses. Les résultats des calculs effectués pour chiffrer la précision de la détermination des matières sèches non grasses laitières sont les suivants:

Répétabilité: $r = 0,104$ %

Reproductibilité: $R = 0,206$ %.

Il est permis d'en conclure que les résultats chiffrés relatifs à la précision obtenus pour la détermination des matières sèches non grasses sont également valables pour la détermination de la teneur en matières sèches non grasses laitières.

ANNEXE XI

(Article 8)

DÉTERMINATION DE LA TENEUR DU BEURRE EN MATIÈRES GRASSES

La teneur en matières grasses se calcule indirectement à partir de la teneur en eau et de la teneur en matières sèches non grasses, respectivement déterminées selon les annexes IX et X. Le pourcentage de matières grasses, rapporté à la masse, est égal à

$$100 - (W + \text{MSNG})$$

où

W désigne le pourcentage d'eau (rapporté à la masse) et

MSNG désigne le pourcentage de matières sèches non grasses, rapporté à la masse.

Les chiffres obtenus quant à la précision de la détermination de la teneur en matières grasses sont les suivants:

Répétabilité: $r = 0,22 \%$

Reproductibilité: $R = 0,36 \%$.

ANNEXE XII

(Article 9)

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN VANILLINE DANS LE BEURRE CONCENTRÉ, DANS LE BEURRE OU DANS LA CRÈME À L'AIDE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE**1. Objet et champ d'application**

La méthode décrit un mode opératoire permettant la détermination quantitative de vanilline dans le beurre, le beurre concentré ou dans la crème.

2. Principe

Extraction d'une quantité connue d'échantillon à l'aide d'un mélange d'isopropanol/éthanol/acétonitrile (1:1:2). Précipitation de la plus grande partie de la matière grasse par réfrigération (température comprise entre -15 et -20 °C), suivie par une centrifugation.

Après dilution avec de l'eau, détermination de la teneur en vanilline par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

3. Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment les éléments suivants:

- 3.1. congélateur, d'une amplitude de température comprise entre -15 et -20 °C;
- 3.2. seringues, jetables, d'une capacité de 2 ml;
- 3.3. microfiltres à membranes (diamètre des pores: 0,45 μm), résistant à une solution contenant 5 % de solution d'extraction (4.4);
- 3.4. système de chromatographie liquide composé d'une pompe (flux de 1,0 ml/min), d'un injecteur (injection de 20 μl , automatique ou manuelle), d'un détecteur d'UV (fonctionnant à 306 nm, 0,01 AU pleine échelle), d'un enregistreur ou d'un intégrateur ainsi que d'un four thermostatique à colonne fonctionnant à 25 °C;
- 3.5. colonne analytique (250 mm \times 4,6 mm ID) garnie avec la phase LiChrospher RP 18 (Merck, 5 μm) ou équivalent;
- 3.6. précolonne (environ 20 mm \times 3 mm ID) garnie à sec avec la phase Perisorb RP 18 (30 à 40 μm) ou équivalent.

4. Réactifs

Tous les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

- 4.1. Isopropanol
- 4.2. Éthanol 96 % (v/v)
- 4.3. Acétonitrile
- 4.4. Solution d'extraction

Mélanger de l'isopropanol (4.1), de l'éthanol (4.2) et de l'acétonitrile (4.3) dans le rapport de 1:1:2 (v/v).
- 4.5. Vanilline (4-hydroxy-3-méthoxy-benzaldéhyde)
 - 4.5.1. Solution mère de vanilline (= 500 $\mu\text{g/ml}$)

Peser à 0,1 mg près environ 50 mg (mg CM) de vanilline (4.5) dans une fiole jaugée de 100 ml, ajouter 25 ml de solution d'extraction (4.4) et compléter avec de l'eau.
 - 4.5.2. Solution étalon de vanilline (= 10 $\mu\text{g/ml}$)

À l'aide d'une pipette, introduire 5 ml de solution mère de vanilline (4.5.1) dans une fiole jaugée de 250 ml et compléter avec de l'eau.
- 4.6. Méthanol, qualité CLHP
- 4.7. Acide acétique glacial
- 4.8. Eau, qualité CLHP

4.9. Phase mobile CLHP

Mélanger 300 ml de méthanol (4.6) à environ 500 ml d'eau (4.8) et à 20 ml d'acide acétique (4.7) dans une fiole jaugée de 1 000 ml et compléter en volume avec de l'eau (4.8). Filtrer à travers un filtre (0,45 µm) (3.3).

5. Mode opératoire

5.1. Préparation de l'échantillon pour essai

5.1.1. Beurre

Chauffer l'échantillon jusqu'à ce qu'il commence à fondre. Éviter toute surchauffe locale au-dessus de 40 °C. Lorsque l'échantillon devient suffisamment plastique, l'homogénéiser en l'agitant. Remuer le beurre pendant 15 s avant de prendre un échantillon. Introduire dans une fiole jaugée de 100 ml environ 5 g (g SM) de beurre et le peser à 1 mg près.

5.1.2. Beurre concentré

Immédiatement avant l'échantillonnage, placer dans un four à 40-50 °C le récipient contenant le beurre concentré jusqu'à ce qu'il fonde complètement. Mélanger l'échantillon en le faisant tourner ou en le remuant; éviter la formation de bulles d'air lors d'une opération trop vigoureuse. Introduire dans une fiole jaugée de 100 ml environ 4 g (g SM) de beurre concentré et le peser à 1 mg près.

5.1.3. Crème

Chauffer l'échantillon dans un bain-marie ou une étuve à une température de 35 à 40 °C. Répartir la graisse de manière homogène en le faisant tourner et, si nécessaire, en le remuant. Refroidir rapidement l'échantillon (20 ± 2 °C). L'échantillon doit avoir un aspect homogène, sinon recommencer l'opération. Introduire dans une fiole jaugée de 100 ml environ 10 g (g SM) de crème et le peser à 1 mg près.

5.2. Préparation de la solution d'essai

Ajouter environ 75 ml de solution d'extraction (4.4) à la prise d'essai (5.1.1, 5.1.2 ou 5.1.3), remuer ou secouer vigoureusement pendant environ 15 min et compléter avec la solution d'extraction (4.4). Transférer environ 10 ml de cet extrait dans un tube à essai pourvu d'un bouchon. Placer le tube à essai dans le congélateur (3.1) et le laisser reposer environ 30 min. Centrifuger l'extrait froid pendant 5 min à environ 2 000 rpm et décanter immédiatement. Laisser la solution décantée se refroidir à la température ambiante. Introduire à la pipette 5 ml de la solution décantée dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter avec de l'eau. Filtrer une partie aliquote à l'aide d'un microfiltre à membrane (3.3). Le filtrat est prêt pour la détermination par CLHP.

5.3. Calibrage

Introduire à la pipette 5 ml de la solution étalon de vanilline (4.5.2) dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter 5 ml de solution d'extraction (4.4) et compléter avec de l'eau jusqu'à la marque. Cette solution contient 0,5 µg/ml de vanilline.

5.4. Détermination par CLHP

Laisser le système chromatographique se stabiliser pendant environ 30 min. Injecter la solution étalon (5.3). Répéter cette opération jusqu'à ce que la différence de l'aire des pics ou la hauteur des pics entre deux injections successives soit inférieure à 2 %. Dans les conditions décrites, le temps de rétention de la vanilline est d'environ 9 min. Analyser la solution étalon (5.3) en double en injectant 20 µl. Injecter 20 µl des solutions d'essai (5.2). Déterminer la superficie ou la hauteur du pic de vanilline obtenu. Recommencer en double l'injection de solution étalon (5.3) après 10 injections d'échantillons pour essais (5.2).

6. Calcul des résultats

Calculer la superficie (ou la hauteur) moyenne (AC) des pics de vanilline correspondant aux injections en double encadrant chaque lot de solutions d'essai (4 surfaces ou hauteurs).

Calculer le facteur de réponse (R):

$$R = AC/CM$$

où CM est la masse de vanilline en mg (4.5.1).

La teneur (mg/kg) en vanilline (C) de l'échantillon d'essai est donnée par la formule suivante:

$$C = \frac{AS \times 20 \times 0,96}{SM \times R}$$

où

AS = superficie du pic de vanilline de l'échantillon d'essai,

SM = masse de l'échantillon d'essai en g (5.1.1, 5.1.2 ou 5.1.3).

Lorsque la crème est analysée pour la détermination de la vanilline, on doit exprimer la concentration du traceur en mg de traceur/kg de matière grasse butyrique, en multipliant C par 100/f, f étant la teneur en matière grasse de la crème en % (m/m).

20 = facteur qui prend en compte les dilutions de l'étalon et de l'échantillon d'essai,

0,96 = facteur de correction pour la teneur en matière grasse lors de la première dilution de l'échantillon d'essai.

Note: On peut utiliser les hauteurs de pics au lieu de la surface des pics (voir point 8.3).

7. Précision de la méthode

7.1. Répétabilité (r)

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées dans l'intervalle de temps le plus bref possible par un seul opérateur utilisant le même appareillage sur du matériel d'essai identique ne doit pas dépasser 16 mg/kg.

7.2. Reproductibilité (R)

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées par des opérateurs de différents laboratoires, utilisant des appareillages différents sur du matériel d'essai identique, ne peut dépasser 27 mg/kg.

8. Limites de tolérance

8.1. Trois échantillons doivent être prélevés sur le produit tracé afin de vérifier l'homogénéité.

8.2. Traceur obtenu soit à partir de vanille soit à partir de vanilline synthétique.

8.2.1. Le taux d'incorporation de 4-hydroxy-3-méthoxy-benzaldéhyde est de 250 g par tonne de beurre concentré ou de beurre. Lorsque c'est de la crème qui est tracée, le taux d'incorporation est de 250 g par tonne de matière grasse butyrique.

8.2.2. On utilise les résultats obtenus pour les trois échantillons à partir de l'analyse du produit pour vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, et on compare le plus faible de ces résultats avec les limites suivantes [en prenant en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95})]:

— 221,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal),

— 159,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal).

La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre 221,0 mg/kg et 159,0 mg/kg.

8.3. Traceur obtenu exclusivement à partir de gousses de vanille ou d'extraits intégraux de ces dernières.

8.3.1. Le taux d'incorporation du 4-hydroxy-3-méthoxy-benzaldéhyde est 100 g par tonne de beurre concentré ou de beurre. Lorsque c'est de la crème qui est tracée, le taux d'incorporation est de 100 g par tonne de matière grasse butyrique.

8.3.2. On utilise les résultats obtenus pour les trois échantillons à partir de l'analyse du produit pour vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, et on compare le plus faible de ces résultats avec les limites suivantes [en prenant en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95})]:

— 79,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal),

— 54,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal).

La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre 79,0 mg/kg et 54,0 mg/kg.

9. Notes

9.1. La répétabilité r est la valeur en dessous de laquelle la différence absolue entre deux résultats d'essais individuels obtenus avec la même méthode sur du matériel d'essai identique dans les mêmes conditions (même matériel, même laboratoire et dans un bref intervalle de temps) peut — selon toute vraisemblance — se situer dans une probabilité précise; en l'absence d'autres indications, cette probabilité est de 95 %.

- 9.2. La reproductibilité R est la valeur en dessous de laquelle la différence absolue entre deux résultats d'essais individuels obtenus avec la même méthode sur du matériel d'essai identique dans des conditions différentes (opérateurs différents, matériel différent, laboratoires différents et/ou délai différent) peut être escomptée se situer dans une probabilité précise; en l'absence d'autres indications, cette probabilité est de 95 %.
- 9.3. La récupération de la vanilline ajoutée à un niveau de 250 mg/kg de butteroil varie de 97,0 à 103,8. La teneur moyenne qui a été constatée était de 99,9 % avec un écart type de 2,7 %.
- 9.4. La solution étalon contient 5 % de solution d'extraction pour compenser l'élargissement du pic provoqué par la présence de 5 % de solution d'extraction des échantillons d'essai. Cela permet une quantification par hauteur de pic.
- 9.5. L'analyse se fonde sur une ligné d'étalonnage linéaire (intercept: zéro).

En utilisant des dilutions appropriées de la solution étalon (4.5.2), on vérifie la linéarité la première fois que l'analyse est effectuée et ensuite à intervalles réguliers ainsi qu'après la modification ou la rénovation de l'équipement CLHP.

ANNEXE XIII

(Article 9)

DÉTERMINATION DE LA QUANTITÉ D'ESTER ÉTHYLIQUE DE L'ACIDE β -APO-8'-CAROTÉNIQUE DANS LE BEURRE CONCENTRÉ ET LE BEURRE PAR SPECTROMÉTRIE**1. Portée et champ d'application**

La méthode décrit une procédure pour déterminer la quantité d'ester éthylique de l'acide β -apo-8'-caroténique (ester apo-caroténique) dans le beurre concentré et le beurre. L'ester apo-caroténique est la somme de toutes les substances présentes dans un concentré d'échantillons obtenu dans les conditions décrites dans la méthode, qui absorbent le rayonnement à 440 nm.

2. Principe

La matière grasse butyrique est dissoute dans de l'essence minérale légère et l'absorbance est mesurée à 440 nm. La quantité d'ester apo-caroténique est déterminée par référence à une norme externe.

3. Équipement

- 3.1. Pipettes graduées à 0,25, 0,50, 0,75 et 1,0 ml.
- 3.2. Spectrophotomètre, conçu pour un usage à 440 nm (et 447-449 nm) et équipé de cellules de 1 cm de longueur de chemin optique.
- 3.3. Fioles volumétriques, 20 ml et 100 ml.
- 3.4. Balance analytique, sensibilité de 0,1 mg.

4. Réactifs

Tous les réactifs doivent avoir un degré analytique reconnu.

- 4.1. Suspension d'ester apo-caroténique (environ 20 %).

- 4.1.1. Établir le contenu de la suspension comme suit:

Peser avec précision environ 400 mg dans une fiole jaugée, (100 ml), dissoudre dans 20 ml de chloroforme (4.4) et amener au volume avec du cyclohexane (4.5). Diluer 5 ml de cette solution à 100 ml avec du cyclohexane (solution A). Diluer 5 ml de la solution A à 100 ml avec du cyclohexane. Mesurer l'absorbance à 447-449 nm (mesurer le maximum en prenant le cyclohexane comme blanc et en utilisant des cuves de 1 cm de trajet optique).

$$\text{Teneur en ester apo-caroténique (\%)} = \frac{A_{\max} \cdot 40\,000}{A \cdot 2\,550}$$

A_{\max} = absorbance maximale de la solution de mesure

A = poids de l'échantillon (g)

2 550 = valeur de référence A (1 %, 1 cm)

P exprime la pureté de la suspension (%).

Remarque: l'ester apo-caroténique en suspension est sensible à l'air, à la chaleur et à la lumière. Il peut se conserver environ douze mois dans son emballage original, fermé (scellé sous azote) et stocké dans un endroit frais. Après ouverture, le contenu doit être utilisé dans un bref délai.

- 4.1.2. Solution standard d'ester apo-caroténique, environ 0,2 mg/ml

Prélever environ, à 0,1 mg près, 0,100 g d'ester apo-caroténique en suspension (4.1.1) (Wg), dissoudre dans de l'essence minérale (4.2), transférer quantitativement dans une fiole volumétrique de 100 ml et compléter jusqu'au trait avec de l'essence minérale.

Cette solution contient (W.P) 10 mg/ml d'ester apo-caroténique.

Remarque: la solution doit être stockée dans un endroit frais, dans le noir. Après un mois, elle n'est plus utilisable.

- 4.2. Essence minérale (40-60 °C).
- 4.3. Sulfate de sodium, anhydre, cristallisé, préalablement séché à 102 °C pendant deux heures.
- 4.4. Chloroforme.
- 4.5. Cyclohexane.

5. Procédure

5.1. Préparation de l'échantillon test

5.1.1. Beurre concentré

Faire fondre l'échantillon dans un four à 45 °C environ.

5.1.2. Beurre

Faire fondre l'échantillon dans un four à 45 °C environ et en filtrer une partie à l'aide d'un filtre contenant environ 10 g de sulfate de sodium anhydre (4.3). L'opération doit se faire à l'abri de toute lumière naturelle ou artificielle forte et la température doit rester maintenue à 45 °C. Prélever une quantité convenable de matière grasse butyrique.

5.2. Détermination

Prélever, à 1 mg près, environ 1 g de beurre concentré ou de matière grasse butyrique (5.1.2), (Mg). Transférer quantitativement dans une fiole volumétrique de 20 ml (Vml), remplir jusqu'au trait avec de l'essence minérale (4.2) et mélanger soigneusement.

Déposer une petite quantité de ce mélange sur une cellule de 1 cm et mesurer l'absorbance à 440 nm par rapport à de l'essence minérale comme valeur de référence. On obtient la concentration d'ester apo-caroténique dans la solution par référence à la courbe d'étalonnage (C µg/ml).

5.3. Courbe d'étalonnage

Introduire à l'aide des pipettes graduées 0, 0,25, 0,5, 0,75 et 1,0 ml de solution standard d'ester apo-caroténique (4.1.2) dans cinq fioles volumétriques de 100 ml. Diluer en remplissant jusqu'au trait avec de l'essence minérale (4.2) et mélanger.

Les concentrations des solutions s'échelonnent entre 0 et 2 µg/ml et sont calculées de manière précise par référence à la concentration de la solution standard (4.1.2), WP/10 mg/ml. Mesurer les absorbances à 440 nm par rapport à de l'essence minérale (4.2) comme valeur de référence.

Reporter les valeurs d'absorbance sur l'axe des ordonnées et les concentrations d'ester apo-caroténique sur l'axe des abscisses.

6. Calcul des résultats

6.1. La teneur en ester apo-caroténique, exprimée en mg/kg de produit, est donnée par:

Beurre concentré (C.V)/M

Beurre: 0,82 (C.V)M

où:

C = la teneur en ester apo-caroténique, µg/ml, donnée par la courbe d'étalonnage (5.3)

V = volume (ml) de la solution d'essai (5.2)

M = la masse (g) de la portion test (5.2)

0,82 = un coefficient correcteur pour la teneur en matière grasse butyrique du beurre.

7. Précision de la méthode

7.1. Répétabilité

7.1.1. Analyse du beurre

La différence de résultats entre deux déterminations effectuées sur du matériel de test identique, dans le laps de temps le plus bref possible et par un seul opérateur utilisant le même équipement ne devra pas excéder 1,4 mg/kg.

7.1.2. Analyse du beurre concentré

La différence de résultats entre deux déterminations effectuées sur du matériel de test identique, dans le laps de temps le plus bref possible et par un seul opérateur utilisant le même équipement ne devra pas excéder 1,6 mg/kg.

7.2. Reproductibilité

7.2.1. Analyse du beurre

La différence de résultats entre deux déterminations effectuées sur du matériel de test identique, par des opérateurs travaillant dans des laboratoires différents et utilisant des équipements différents ne devra pas excéder 4,7 mg/kg.

7.2.2. Analyse du beurre concentré

La différence de résultats entre deux déterminations effectuées sur du matériel de test identique, par des opérateurs travaillant dans des laboratoires différents et utilisant des équipements différents ne devra pas excéder 5,3 mg/kg.

7.3. Source des données techniques

Les données techniques ont été définies sur la base d'une expérience menée en 1995, qui impliquait onze laboratoires et qui portait sur douze échantillons tracés (six doubles aveugles) pour le beurre et sur douze échantillons tracés (six doubles aveugles) pour le beurre concentré.

8. Limites de tolérance

8.1. Pour vérifier si le produit a été tracé correctement, il faut prélever trois échantillons du produit tracé.

8.2. Beurre

8.2.1. Le taux d'incorporation pour le beurre, compte tenu de l'absorbance de fond, est de 22 mg/kg.

8.2.2. On utilise les résultats obtenus pour les trois échantillons à partir de l'analyse du produit pour vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, et on compare le plus faible de ces résultats avec les limites suivantes [en prenant en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95})]:

- 18,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal),
- 13,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal).

La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre 18,0 mg/kg et 13,0 mg/kg.

8.3. Beurre concentré

8.3.1. Le taux d'incorporation pour le beurre concentré, compte tenu de l'absorbance de fond, est de 24 mg/kg.

8.3.2. On utilise les résultats obtenus pour les trois échantillons à partir de l'analyse du produit pour vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, et on compare le plus faible de ces résultats avec les limites suivantes [en prenant en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95})]:

- 20,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal),
- 14,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal).

La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre 20,0 mg/kg et 14,0 mg/kg.

ANNEXE XIV

(Article 9)

DÉTERMINATION DU SITOSTÉROL OU DU STIGMASTÉROL DANS LE BEURRE CONCENTRÉ OU LE BEURRE PAR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE AVEC COLONNE CAPILLAIRE**1. Objet et domaine d'application**

La méthode décrit une procédure permettant la détermination quantitative du sitostérol ou du stigmastérol dans le beurre concentré et le beurre. Le sitostérol est la somme du β -sitostérol et du 22-dihydro- β -sitostérol, les autres sitostérols étant considérés comme peu importants.

2. Principe

Le beurre concentré ou le beurre est saponifié à l'aide d'hydroxyde de potassium dans une solution d'éthanol et les insaponifiables sont extraits à l'aide d'éther.

Les stérols sont transformés en triméthyl-silyl-éthers et sont analysés par chromatographie en phase gazeuse avec colonne capillaire par rapport à un étalon interne: la bétuline.

3. Appareillage

- 3.1. Ballon de saponification de 150 ml équipé d'un réfrigérant à reflux à embouts rodés.
- 3.2. Ampoules à décanter de 500 ml.
- 3.3. Ballons de 250 ml.
- 3.4. Ampoules d'égalisation de la pression, de 250 ml ou d'une contenance similaire, destinées à recueillir l'éther à jeter.
- 3.5. Colonne de verre, de 350 mm \times 20 mm, dotée d'un accord en verre fritté.
- 3.6. Bain-marie ou manchon isotherme.
- 3.7. Flacons à réaction, de 2 ml.
- 3.8. Appareil de chromatographie en phase gazeuse pouvant être utilisé avec une colonne capillaire, muni d'un dispositif de fonctionnement composé:
 - 3.8.1. d'un four thermostaté pour les colonnes pouvant maintenir la température souhaitée avec une précision de ± 1 °C;
 - 3.8.2. d'un injecteur thermoréglable;
 - 3.8.3. d'un détecteur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur;
 - 3.8.4. d'un intégrateur-enregistreur pouvant être utilisé avec le convertisseur-amplificateur (3.8.3).
- 3.9. Colonne capillaire en verre de silice entièrement recouverte de BP 1 ou d'une substance équivalente d'une épaisseur uniforme de 0,25 μ m; la colonne doit être en mesure de résoudre les dérivés triméthyl-silyl du lanostérol et du sitostérol. Une colonne BP 1 de 12 m de longueur et de diamètre interne de 0,2 mm est appropriée.
- 3.10. Microseringue à aiguille en acier trempé pour chromatographie en phase gazeuse de 1 μ l.

4. Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau d'une pureté au moins équivalente.

- 4.1. Éthanol, pur au moins à 95 %.
- 4.2. Hydroxyde de potassium, solution à 60 %, dissoudre 600 g d'hydroxyde de potassium (minimum 85 %) dans de l'eau et compléter à 1 l avec de l'eau.
- 4.3. Bétuline d'une pureté d'au moins 99 %.
 - 4.3.1. Solutions de bétuline dans l'éther diéthylique (4.4).
 - 4.3.1.1. La concentration de la solution de bétuline utilisée pour la détermination du sitostérol doit être de 1,0 mg/ml.
 - 4.3.1.2. La concentration de la solution de bétuline utilisée pour la détermination du stigmastérol doit être de 0,4 mg/ml.

- 4.4. Éther diéthylique, de pureté analytique (exempt de peroxydes ou de résidus).
- 4.5. Sulfate de sodium, anhydre, en granulés, préalablement séché à 102 °C pendant 2 heures.
- 4.6. Réactif de silylation, par exemple, TRI-SIL (pouvant être obtenu auprès de Pierce Chemical Co, Cat n° 49001), ou équivalent (Attention: le TRI-SIL est inflammable et toxique, corrosif et peut-être carcinogène. Le personnel de laboratoire doit bien connaître les règles de sécurité applicables au TRI-SIL et prendre les précautions qui s'imposent).
- 4.7. Lanostérol.
- 4.8. Sitostérol, de pureté connue, égale ou supérieure à 90 % (P).

Note 1: La pureté des matériaux étalons utilisés pour le calibrage doit être déterminée à l'aide de la méthode de normalisation. On part de l'hypothèse que tous les stérols présents dans l'échantillon sont représentés dans le chromatogramme, que la surface totale des pics représente 100 % des constituants stéroliques et que les stérols donnent la même réponse au détecteur. La linéarité du système doit être vérifiée pour les niveaux de concentration considérés.
- 4.8.1. Solution étalon de sitostérol: préparer une solution à 0,001 mg/ml près, contenant environ 0,5 mg/ml (W₁) de sitostérol (4.8) dans de l'éther diéthylique (4.4).
- 4.9. Stigmastérol, d'une pureté connue, égale ou supérieure à 90 % (P).
- 4.9.1. Solution étalon de stigmastérol, préparer une solution à 0,001 mg/ml près, contenant environ 0,2 mg/ml (W₁) de stigmastérol (4.9) dans l'éther diéthylique (4.4).
- 4.10. Mélange pour le test de résolution: préparer une solution contenant 0,05 mg/ml de lanostérol (4.7) et 0,5 mg/ml de sitostérol (4.8) dans de l'éther diéthylique (4.4).

5. Mode opératoire

- 5.1. Préparation des solutions étalons pour la chromatographie: ajouter la solution étalon interne (4.3.1) à la solution étalon de stérol appropriée en même temps qu'à l'échantillon saponifié (5.2.2).
- 5.1.1. Solution chromatographique étalon de sitostérol: transférer 1 ml de solution étalon de sitostérol (4.8.1) dans chacun des deux flacons à réaction (3.7) et éliminer l'éther sous un flux d'azote. Ajouter 1 ml de solution interne (4.3.1.1) et éliminer l'éther sous un flux d'azote.
- 5.1.2. Solution chromatographique étalon de stigmastérol: transférer 1 ml de solution étalon de stigmastérol (4.9.1) dans chacun des deux flacons à réaction (3.7) et éliminer l'éther sous un flux d'azote. Ajouter 1 ml de solution étalon interne (4.3.1.2) et éliminer l'éther sous un flux d'azote.
- 5.2. *Préparation des insaponifiables*
- 5.2.1. Faire fondre l'échantillon de beurre à une température de 35 °C au maximum; le mélanger soigneusement en le remuant.

Peser à 1 mg près, environ 1 g de beurre (W₂) ou de beurre concentré (W₂) dans un flacon de 150 ml (3.1). Ajouter 50 ml d'éthanol (4.1) et 10 ml de solution d'hydroxyde de potassium (4.2). Adapter le réfrigérant à reflux et porter à environ 75 °C pendant 30 minutes. Détacher le réfrigérant et laisser refroidir le ballon à la température ambiante.
- 5.2.2. Ajouter 1,0 ml de solution étalon interne dans le ballon (4.3.1.1 s'il s'agit de déterminer le sitostérol ou 4.3.1.2 s'il s'agit de déterminer le stigmastérol). Mélanger soigneusement. Transférer le contenu du ballon quantitativement dans une ampoule à décanter de 500 ml (3.2). Rincer le ballon avec 50 ml d'eau, puis 250 ml d'éther diéthylique (4.4). Agiter vigoureusement l'ampoule à décanter pendant 2 minutes et laisser les phases se séparer. Éliminer la phase aqueuse inférieure et laver la phase étherée en agitant avec 4 parties aliquotes successives de 100 ml d'eau.

Note 2: Pour éviter la formation d'une émulsion, il est indispensable que les deux premiers rinçages à l'eau soient effectués délicatement (10 inversions). Pour le troisième rinçage, on peut agiter vigoureusement pendant 30 secondes. Si une émulsion se forme, elle peut être éliminée par l'addition de 5 à 10 ml d'éthanol. Si de l'éthanol est ajouté, il est indispensable de procéder à deux nouveaux et vigoureux lavages à l'eau.
- 5.2.3. Faire passer la phase étherée limpide et exempte de savon sur une colonne en verre (3.5) contenant 30 g de sulfate de sodium anhydre (4.5). Collecter l'éther dans un ballon de 250 ml (3.3). Ajouter des billes antiprojection et évaporer jusqu'à la quasi-dessiccation dans un bain-marie ou un manchon isotherme en prenant soin de collecter les solvants à éliminer.

Note 3: Si des extraits d'échantillons sont évaporés à sec à une température trop élevée, il peut y avoir des pertes de stérol.

5.3. Préparation des triméthyl-silyl-éthers

- 5.3.1. Transférer la solution d'éther restant dans le ballon dans un flacon à réaction de 2 ml (3.7) à l'aide de 2 ml d'éther et éliminer l'éther sous un flux d'azote. Laver le ballon avec deux parties aliquotes supplémentaires de 2 ml d'éther en transférant dans le flacon et en éliminant l'éther sous azote à chaque fois.
- 5.3.2. Silyler l'échantillon en ajoutant 1 ml de TRI-SIL (4.6). Fermer le flacon et agiter vigoureusement pour dissoudre. Si la dissolution est incomplète, porter à 65-70 °C. Laisser reposer pendant au moins 5 minutes avant d'injecter dans le chromatographe en phase gazeuse. Silyler les étalons de la même manière que les échantillons. Silyler le mélange pour le test de résolution (4.10) de la même manière que les échantillons.

Note 4: La silylation doit se faire dans un environnement anhydre. Une silylation incomplète de la bétuline est indiquée par un second pic proche de celui de la bétuline.

La présence d'éthanol lors de la silylation interférera avec la silylation. Ceci peut résulter d'un lavage insuffisant lors de l'extraction. Si ce problème persiste, un cinquième rinçage, avec agitation vigoureuse pendant 30 secondes, peut être introduit à l'étape de l'extraction.

5.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

5.4.1. Choix des conditions opératoires.

Programmer le chromatographe en phase gazeuse selon les instructions du fabricant.

Les conditions opératoires indicatives sont les suivantes:

- température de la colonne: 265 °C
- température de l'injecteur: 280 °C
- température du détecteur: 300 °C
- débit du gaz vecteur: 0,6 ml/min
- pression de l'hydrogène: 84 kPa
- pression de l'air: 155 kPa
- injection fractionnée: de 10/1 à 50/1; le rapport de fuite doit être optimisé en fonction des instructions du fabricant et la linéarité de la réponse du détecteur validée ensuite pour l'étendue des concentrations qui nous intéressent.

Note 5: Il est particulièrement important que la chambre de vaporisation soit régulièrement nettoyée.

- quantité de substance injectée: 1 µl de solution TMSE.

Laisser le système s'équilibrer jusqu'à l'obtention d'une réponse suffisamment stable avant d'entreprendre toute analyse.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et du chromatographe en phase gazeuse de manière à obtenir des chromatogrammes qui satisfassent aux conditions suivantes:

- le pic de sitostérol doit présenter une résolution suffisante par rapport au lanostérol. La figure 1 présente un chromatogramme typique tel qu'il doit être obtenu à partir d'un mélange silylé du test de résolution (4.10)
- les temps de rétention relatifs des stérols suivants devraient être d'environ:
 - cholestérol: 1,0
 - stigmastérol: 1,3
 - sitostérol: 1,5
 - bétuline: 2,5
- le temps de rétention de la bétuline devrait être d'environ 24 minutes.

5.4.2. Mode opératoire analytique:

Injecter 1 µl de solution étalon silylée (stigmastérol ou sitostérol) et ajuster les paramètres de calibration de l'intégrateur.

Injecter de nouveau 1 µl de solution étalon silylée pour déterminer le coefficient de réponse par rapport à la bétuline.

Injecter 1 µl de solution d'échantillon silylée et mesurer la surface des pics. Chaque série d'échantillons doit être précédée et suivie d'une injection d'étalons.

En règle générale, l'injection d'étalons peut être effectuée après une série de six échantillons.

Note 6: L'intégration du pic du stigmastérol devrait comporter les traînées indiquées par les points 1, 2 et 3 de la figure 2b.

L'intégration du pic du sitostérol devrait englober la surface du pic du 22-dihydro-β-sitostérol (stigmastanol) élué immédiatement après le sitostérol (figure 3b) lors de l'évaluation du sitostérol total.

6. Calcul des résultats

- 6.1. Déterminer la surface des pics de stérol et des pics de bétuline dans les deux étalons en début et fin de chaque série et calculer R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{surface moyenne du pic du stérol dans l'étalon}}{\text{surface moyenne du pic de bétuline dans l'étalon}}$$

Déterminer la surface du pic du stérol (stigmastérol et sitostérol) et du pic de bétuline dans l'échantillon et calculer R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{surface du pic du stérol dans l'échantillon}}{\text{surface du pic de bétuline dans l'échantillon}}$$

W_1 = teneur en stérol de l'étalon (mg) contenu dans 1 ml de solution étalon (4.8.1 ou 4.9.1)

W_2 = poids de l'échantillon (g) (5.2.1)

P = pureté du stérol étalon (4.8 ou 4.9)

$$\text{Teneur de l'échantillon en stérol (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10$$

7. Précision de la méthode

7.1. *Beurre*

7.1.1. Répétabilité

7.1.1.1. Stigmastérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées dans l'intervalle de temps le plus court possible pour un opérateur utilisant le même appareillage, sur du matériel d'essai identique, ne doit pas dépasser 19,3 mg/kg.

7.1.1.2. Sitostérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées dans l'intervalle le plus court possible, par un seul opérateur utilisant le même appareillage, sur du matériel d'essai identique ne doit pas dépasser 23,0 mg/kg.

7.1.2. Reproductibilité

7.1.2.1. Stigmastérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées par des opérateurs dans des laboratoires différents utilisant des appareillages différents sur du matériel d'essai identique, ne doit pas dépasser 31,9 mg/kg.

7.1.2.2. Sitostérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées par des opérateurs dans des laboratoires différents utilisant des appareillages différents, sur du matériel d'essai identique, ne doit pas dépasser 8,7 % par rapport à la moyenne des déterminations.

7.1.3. Source de données de précision

Les données de précision ont été déterminées à partir d'une expérience menée en 1992 dans huit laboratoires et concernant six échantillons (trois en double aveugle) pour le stigmastérol et six échantillons (trois en double aveugle) pour le sitostérol.

7.2. *Beurre concentré*

7.2.1. Répétabilité

7.2.1.1. Stigmastérol

La différence entre les résultats des deux déterminations effectuées dans l'intervalle de temps le plus court possible pour un opérateur utilisant le même appareillage sur du matériel d'essai identique ne doit pas dépasser 10,2 mg/kg.

7.2.1.2. Sitostérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées dans l'intervalle le plus court possible par un seul opérateur utilisant le même appareillage sur du matériel d'essai identique ne doit pas dépasser 3,6 % par rapport à la moyenne des déterminations.

7.2.2. Reproductibilité

7.2.2.1. Stigmastérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées par des opérateurs dans différents laboratoires utilisant des appareillages différents sur du matériel identique ne doit pas dépasser 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitostérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées par des opérateurs dans des laboratoires différents utilisant des appareillages différents sur du matériel d'essai identique ne doit pas dépasser 8,9 % par rapport à la moyenne des déterminations.

7.2.3. Source de données de précision

Les données de précision ont été déterminées à partir d'une expérience menée en 1991 impliquant neuf laboratoires et six échantillons (3 en double aveugle), pour le stigmastérol; six échantillons (3 en double aveugle), pour le sitostérol.

8. Limites de tolérance

8.1. Pour vérifier si le produit a été tracé correctement, il faut prélever trois échantillons du produit tracé.

8.2. *Beurre*

8.2.1. Stigmastérol

8.2.1.1. Le taux d'incorporation pour le stigmastérol est de 150 g de stigmastérol, pur au moins à 95 %, par tonne de beurre, c'est-à-dire 142,5 mg/kg, ou de 170 g de stigmastérol pur au moins à 85 % par tonne de beurre, soit 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. On utilise les résultats obtenus pour les trois échantillons à partir de l'analyse de produit pour vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, et on compare le plus faible de ces résultats avec les limites suivantes [en prenant en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95})]:

- 116,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 95 %),
- 118,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 85 %),
- 81,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 95 %),
- 82,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 85 %).

La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre 116,0 mg/kg et 81,0 mg/kg ou entre 118,0 mg/kg et 82,0 mg/kg.

8.2.2. Sitostérol

8.2.2.1. Le taux d'incorporation du sitostérol est de 600 g de sitostérol pur à au moins 90 % par tonne de beurre, c'est-à-dire 540 mg/kg.

8.2.2.2. On utilise les résultats obtenus pour les trois échantillons à partir de l'analyse du produit pour vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, et on compare le plus faible de ces résultats avec les limites suivantes [en prenant en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95})]:

- 486,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du sitostérol pur à 90 %),
- 358,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du sitostérol pur à 90 %).

La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre 486,0 mg/kg et 358,0 mg/kg.

8.3. *Beurre concentré*

8.3.1. Stigmastérol

8.3.1.1. Le taux d'incorporation pour le stigmastérol est de 150 g de stigmastérol, pur au moins à 95 %, par tonne de beurre concentré, c'est-à-dire 142,5 mg/kg; ou de 170 g de stigmastérol pur au moins à 85 % par tonne de beurre concentré, soit 144,5 mg/kg.

8.3.1.2. On utilise les résultats obtenus pour les trois échantillons à partir de l'analyse du produit pour vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, et on compare le plus faible de ces résultats avec les limites suivantes [en prenant en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95})]:

- 120,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 95 %),
- 122,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 85 %),
- 84,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 95 %),
- 86,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 85 %).

La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre 120,0 mg/kg et 84,0 mg/kg ou entre 122,0 mg/kg et 86,0 mg/kg.

8.3.2. Sitostérol

8.3.2.1. Le taux d'incorporation du sitostérol est de 600 g de sitostérol pur au moins 90 % par tonne de beurre concentré, c'est-à-dire 540 mg/kg.

8.3.2.2. On utilise les résultats obtenus pour les trois échantillons à partir de l'analyse du produit pour vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, et on compare le plus faible de ces résultats avec les limites suivantes [en prenant en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95})]:

- 486,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du sitostérol pur à 90 %),
- 358,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du sitostérol pur à 90 %).

La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre 486,0 mg/kg et 358,0 mg/kg.

Figure 1

Chromatogramme du mélange pour le test de résolution

La résolution complète est préférable, c'est-à-dire que le tracé du pic du lanostérol doit rejoindre la ligne de base avant de remonter pour le pic du sitostérol, quoiqu'une résolution incomplète soit tolérable.

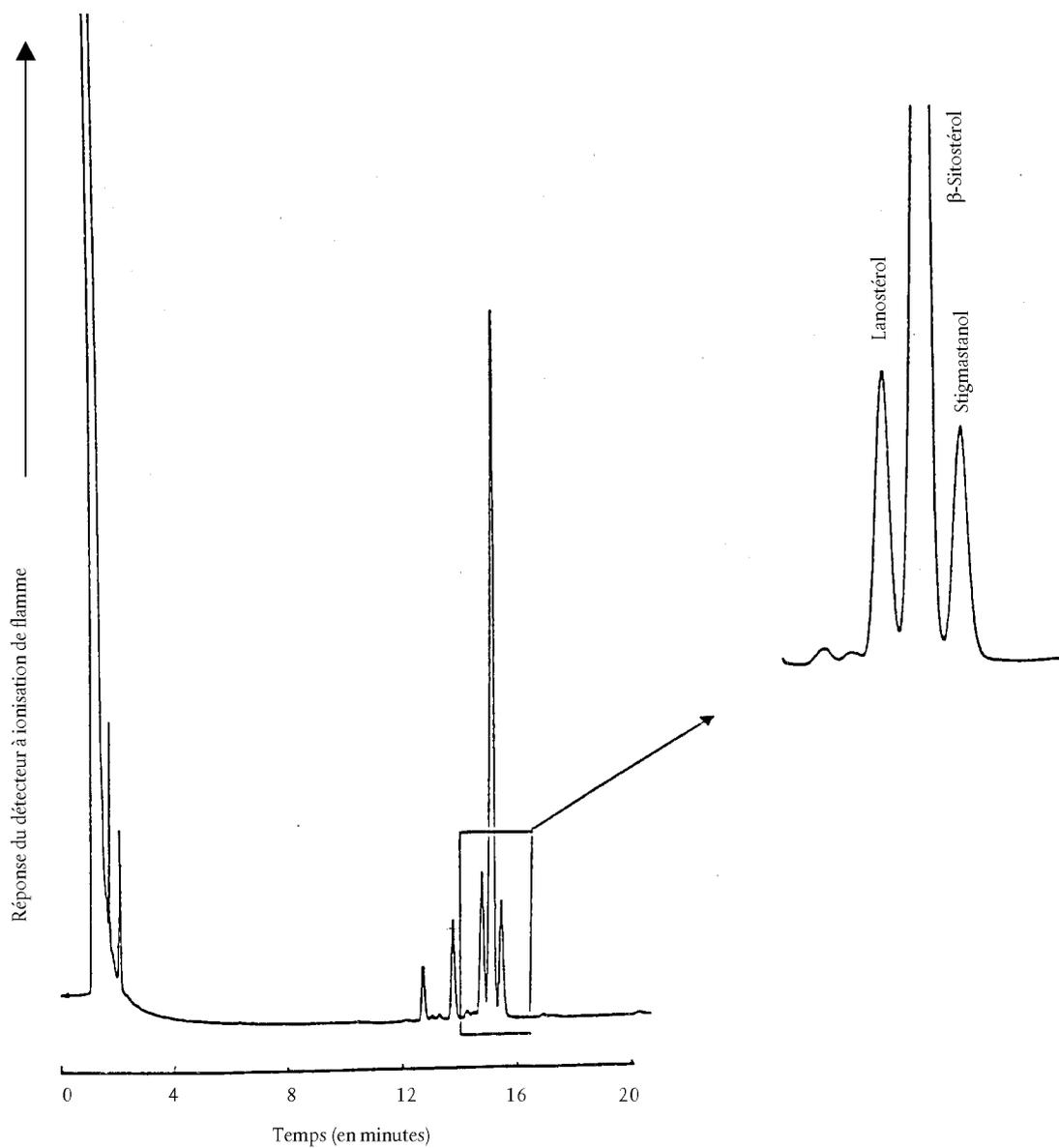


Figure 2a
Stigmastérol étalon

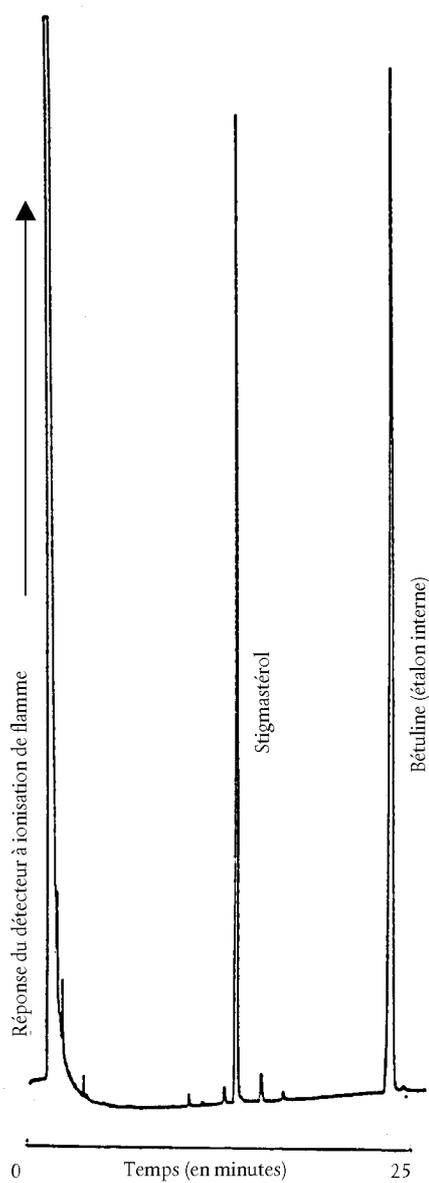
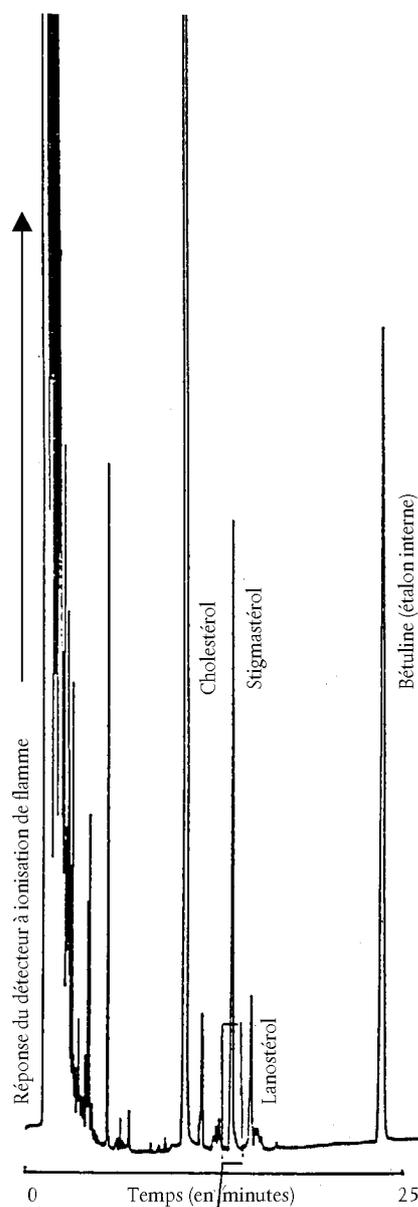


Figure 2b
Échantillon de beurre
dénaturé avec du stigmastérol



Note: L'intégration du pic du stigmastérol devrait inclure toutes les traînées comprises entre les points 1, 2 et 3.

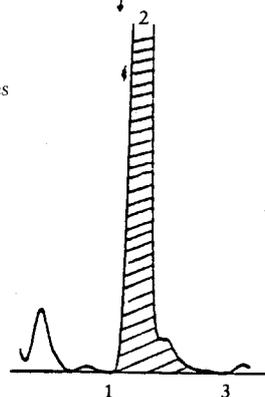


Figure 3a
β-sitostérol étalon

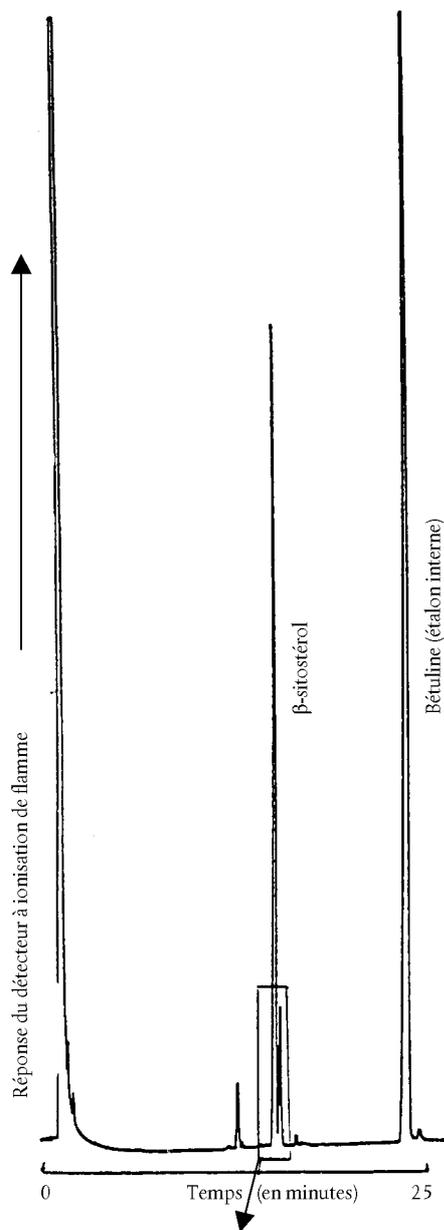
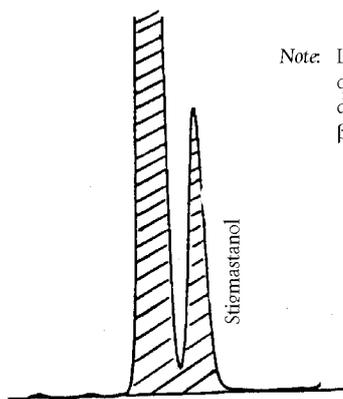
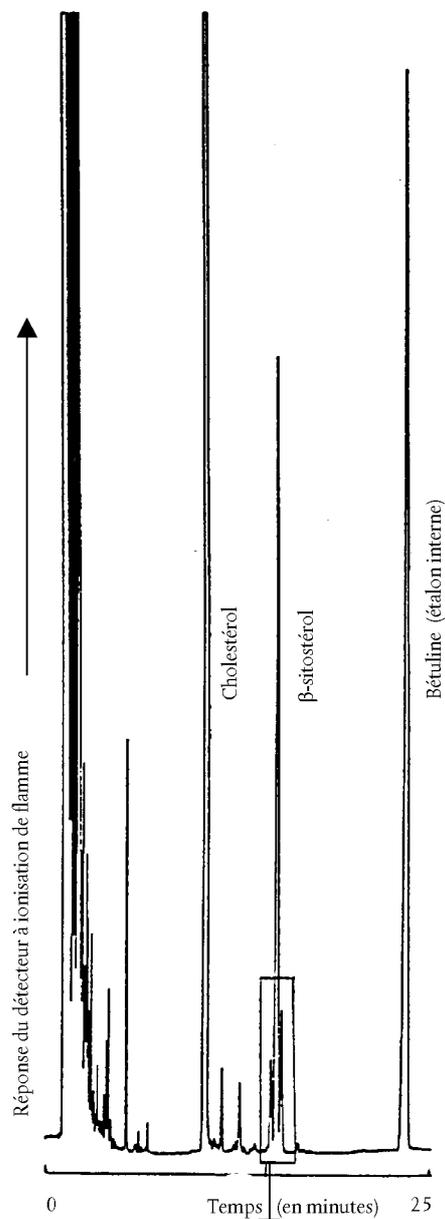
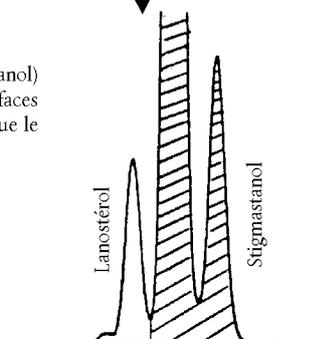


Figure 3b
Échantillon de beurre
dénaturé avec du β-sitostérol



Note: Le β-sitostérol contient souvent une impureté (le stigmastanol) qui est éluée immédiatement après le β-sitostérol. Les surfaces de ces deux pics doivent être additionnées lorsqu'on évalue le β-sitostérol total présent.



ANNEXE XV

(Article 10)

MÉTHODE DE RÉFÉRENCE POUR LA DÉTECTION DE LAIT DE VACHE ET DE CASÉINATES DANS LES FROMAGES À BASE DE LAIT DE BREBIS, DE LAIT DE CHÈVRE OU DE LAIT DE BUFFLONNE OU DE MÉLANGES DE LAIT DE BREBIS, DE CHÈVRE ET DE BUFFLONNE**1. Objet**

Détection de lait de vache et de caséinates dans les fromages à base de lait de brebis, de lait de chèvre, de lait de bufflonne ou de mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne au moyen de la focalisation isoélectrique des caséines γ (gamma) après action de la plasmine.

2. Champ d'application

Cette méthode convient pour la détection sensible et spécifique de lait de vache et de caséinates traités ou non thermiquement dans les fromages frais et affinés à base de lait de brebis, de lait de chèvre, de lait de bufflonne ou de mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne. Elle ne convient pas pour la détection de l'adultération du lait et du fromage au moyen de concentrés de protéines de lactosérum de vache traités thermiquement.

3. Principe de la méthode

- 3.1. Isolement des caséines du fromage et des échantillons de référence
- 3.2. Dissolution des caséines isolées et protéolyse par la plasmine (EC.3.4.21.7)
- 3.3. Focalisation isoélectrique des caséines soumises à l'action de la plasmine en présence d'urée et coloration des protéines.
- 3.4. Interprétation des profils de caséine γ_3 et γ_2 (identification du lait de vache) par comparaison du profil obtenu pour l'échantillon avec celui obtenu sur le même gel pour les échantillons de référence contenant 0 et 1 % de lait de vache

4. Réactifs

Sauf indication contraire, les produits chimiques utilisés doivent être analytiquement purs. L'eau doit être bidistillée ou d'une pureté équivalente.

Remarque: les données suivantes s'appliquent à des gels de polyacrylamide préparés en laboratoire contenant de l'urée, de $265 \times 125 \times 0,25$ mm. Si d'autres dimensions et types de gel sont utilisés, il peut être nécessaire d'ajuster les conditions de séparation.

Focalisation isoélectrique

4.1. Réactifs destinés à la production des gels de polyacrylamide contenant de l'urée**4.1.1. Solution «mère» ou solution «stock» du gel**

Dissoudre:

4,85 g d'acrylamide

0,15 g N,N'-méthylène-bis-acrylamide (BIS)

48,05 g d'urée

15,00 g de glycérol (87 % m/m),

dans de l'eau, amener à 100 ml et conserver au froid dans une bouteille de verre brun.

Remarque: les quantités indiquées d'acrylamide neurotoxique peuvent être remplacées par une solution d'acrylamide et bis-acrylamide prémélangés disponible dans le commerce. Dans le cas où la solution du commerce a une concentration de 30 % d'acrylamide et 0,8 % de bis-acrylamide, les quantités indiquées dans la préparation susmentionnée (4,85 g d'acrylamide et 0,15 g de BIS) doivent être remplacées par un volume de 16,2 ml de cette solution du commerce. La solution «stock» ne peut être conservée que dix jours au maximum. Si sa conductivité est supérieure à $5 \mu\text{S}$, il faut déioniser en mélangeant avec 2 g d'Amberlite MB-3 pendant 30 min, ensuite filtrer à travers une membrane de $0,45 \mu\text{m}$.

- 4.1.2. Solution de gel
- Préparer une solution de gel en mélangeant des additifs et des ampholytes avec la solution «mère» ou solution «stock» de gel (4.1.1):
- 9,0 ml de solution «mère» ou «stock» de gel
 - 24 mg de β -alanine
 - 500 μ l d'ampholyte pH 3,5-9,5 ⁽¹⁾
 - 250 μ l d'ampholyte pH 5-7 ⁽¹⁾
 - 250 μ l d'ampholyte pH 6-8 ⁽¹⁾
- Mélanger la solution de gel et la dégazer dans un bain à ultrasons ou sous vide pendant 2 à 3 min.
- Remarque:* la solution doit être préparée juste avant d'être coulée (6.2).
- 4.1.3. Catalyseurs
- 4.1.3.1. N, N, N', N'-tétraméthylènediamine (TEMED)
- 4.1.3.2. Solution de persulfate d'ammonium (PER) à 400 g/l
- Dissoudre 800 mg de PER dans de l'eau à porter à 2 ml.
- Remarque:* utiliser toujours une solution de PER fraîchement préparée.
- 4.2. *Liquide de contact*
- Kérosène ou paraffine liquide
- 4.3. *Solution anodique*
- Ajouter de l'eau à 5,77 g d'acide phosphorique (85 % m/m) jusqu'à obtention d'un volume de 100 ml.
- 4.4. *Solution cathodique*
- Dissoudre 2,00 g d'hydroxyde de sodium dans de l'eau jusqu'à obtention d'un volume de 100 ml.
- Préparation des échantillons
- 4.5. *Réactifs destinés à l'isolement (ou extraction) des protéines*
- 4.5.1. Solution diluée d'acide acétique (25 ml d'acide acétique cristallisable complété à 100 ml avec de l'eau)
- 4.5.2. Dichlorométhane
- 4.5.3. Acétone
- 4.6. *Solution tampon de dissolution des protéines*
- Dissoudre:
- 5,75 g de glycérol (87 % m/m)
 - 24,03 g d'urée
 - 250 mg de dithiothréitol,
- dans de l'eau jusqu'à obtention d'un volume de 50 ml.
- Remarque:* stocker au froid. La solution se conserve une semaine au maximum.
- 4.7. *Réactifs destinés à la protéolyse due à la plasmine*
- 4.7.1. Tampon de carbonate d'ammonium
- Ajuster jusqu'à pH 8 une solution d'hydrogénocarbonate d'ammonium à 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml d'eau) contenant 0,05 mol/l d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, 1,46 g/100 ml) à l'aide d'une solution de carbonate d'ammonium à 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml d'eau) contenant 0,05 mol/l d'EDTA.
- 4.7.2. Plasmine bovine (E.C. 3.4.21.7), dont l'activité est au minimum SU/ml
- 4.7.3. Solution d'acide ϵ -aminocaproïque destinée à l'inhibition de l'enzyme
- Dissoudre 2,624 g d'acide ϵ -aminocaproïque (acide amino 6 n-hexanoïque) dans 100 ml d'éthanol à 40 % (v/v).

⁽¹⁾ Les produits Ampholine® pH 3,5-9,5 (Pharmacia) et Resolyte® pH 5-7 et pH 6-8 (BDH, Merck) se révèlent particulièrement efficaces pour obtenir la résolution de la γ -caséine.

4.8. Échantillons de référence

4.8.1. Des échantillons de référence certifiés d'un mélange de lait écrémé de brebis et de chèvre emprésuré contenant 0 et 1 % de lait de vache peuvent être obtenus auprès de l'Institut des matériaux et des mesures de référence de la Commission à B-2440 Geel-Belgique.

4.8.2. Préparation des échantillons de référence intermédiaires de laboratoire de lait de bufflonne emprésuré contenant 0 et 1 % de lait de vache

Le lait cru de bufflonne ou de vache est écrémé par centrifugation à 37 °C (2 500 g, 20 minutes). Refroidir le tube et son contenu rapidement à 6-8 °C, puis éliminer complètement la couche de matières grasses rassemblée en surface. Pour la préparation d'un échantillon de référence de 1 %, ajouter 5,00 ml de lait de vache écrémé à 495 ml de lait de bufflonne écrémé dans un bécher de 1 l et ajuster le pH à 6,4 en ajoutant de l'acide lactique dilué à 10 % v/v. Ajuster la température à 35 °C et ajouter 100 µl de présure de veau (d'activité 1: 10 000, environ 3 000 U/ml), mélanger pendant 1 min., puis couvrir le bécher d'une feuille d'aluminium et laisser reposer à 35 °C pendant une heure pour laisser le caillé se former. Après formation du caillé, le lait emprésuré est entièrement lyophilisé sans homogénéisation préalable et égouttage du lactosérum. Le lait lyophilisé est finement broyé en une poudre homogène. Pour la préparation de l'échantillon de référence de 0 %, suivre la même procédure avec du lait écrémé pur de bufflonne. Stocker les échantillons de référence à -20 °C.

Remarque: il est recommandé de vérifier la pureté du lait de bufflonne par focalisation isoélectrique des caséines soumises à l'action de la plasmine avant la préparation des échantillons de référence.

Réactifs destinés à la coloration des protéines

4.9. Fixateur

Dissoudre 150 g d'acide trichloroacétique dans de l'eau jusqu'à l'obtention d'un volume de 1 000 ml.

4.10. Solution de décoloration

Mélanger 500 ml de méthanol et 200 ml d'acide acétique cristallisable avec de l'eau distillée et amener à 2 000 ml.

Remarque: renouveler quotidiennement la solution de décoloration; elle peut être préparée par mélange à volume égal d'une solution «stock» de méthanol à 50 % (v/v) et d'une solution «stock» d'acide acétique cristallisable à 20 % (v/v).

4.11. Solutions de coloration

4.11.1. Solution de coloration (solution «stock» 1)

Dissoudre 3,0 g de bleu brillant G 250 de Coomassie (C.I. 42655) dans 1 000 ml de méthanol à 90 % (v/v) au moyen d'un agitateur magnétique (environ 45 min), passer la solution à travers deux filtres plissés.

4.11.2. Solution de coloration (solution «stock» 2)

Dissoudre 5,0 g de sulfate de cuivre pentahydraté dans 1 000 ml d'acide acétique à 20 % (v/v).

4.11.3. Solution de coloration (prête à l'emploi)

Mélanger 125 ml de chaque solution «stock» (4.11.1, 4.11.2) immédiatement avant la coloration.

Remarque: la solution de coloration prête à l'emploi doit être utilisée le jour de sa préparation.

5. Appareillage et accessoires

5.1. Plaques de verre (265 × 125 × 4 mm); rouleau en caoutchouc d'une largeur de 15 cm; table à niveau réglable

5.2. Feuille de support de gel (265 × 125 mm)

5.3. Seconde feuille (280 × 125 mm). Coller sur les deux longueurs de cette feuille une bande de ruban adhésif de 280 × 6 × 0,25 mm (figure 1)

5.4. Cuve d'électrofocalisation à plaque de refroidissement (par exemple 265 × 125 mm) et générateur de tension approprié (≥ 2,5 kV) ou appareil automatique d'électrophorèse

5.5. Cryostat à circulation, maintenu à la température de 12 ± 0,5 °C

5.6. Centrifugeuse réglable à 3 000 g

5.7. Bandes de papier pour électrodes (≥ 265 mm de long)

- 5.8. Flacons compte-gouttes en matière synthétique pour les solutions anodique et cathodique
- 5.9. Applicateurs d'échantillon 10 × 5 mm (viscose ou papier filtre à faible absorption des protéines)
- 5.10. Ciseaux, scalpels et pincettes en acier inoxydable
- 5.11. Cuves de coloration et de décoloration en acier inoxydable (par exemple, cuves d'une dimension de 280 × 150 mm)
- 5.12. Homogénéisateur réglable (tige de 10 mm de diamètre), vitesse de rotation de 8 000 à 20 000 tours par minute
- 5.13. Agitateur magnétique
- 5.14. Bain à ultrasons
- 5.15. Appareil de soudure des feuilles
- 5.16. Pipettes graduées en microlitres (de 5 à 25 µl)
- 5.17. Centrifugeuse sous vide ou appareil de lyophilisation
- 5.18. Bain-marie réglable à 35 et 40 ± 1 °C à dispositif d'agitation
- 5.19. Densitomètre (lecture à une longueur d'onde de 634 nm)

6. Mode opératoire

6.1. Préparation des échantillons

6.1.1. Extraction ou isolement des caséines

Introduire l'équivalent de 5 g de matière sèche de fromage ou d'échantillon de référence dans un tube de centrifugation de 100 ml, ajouter 60 ml d'eau distillée et homogénéiser à l'aide de l'homogénéisateur (8 000 à 10 000 tours/min). Ajuster à un pH de 4,6 à l'aide d'une solution d'acide acétique dilué (4.5.1) et centrifuger (5 min, 3 000 g). Éliminer les matières grasses et la phase sérique; homogénéiser le culot de centrifugation à 20 000 tours/min dans 40 ml d'eau distillée ajustée à pH 4,5 à l'aide de la solution d'acide acétique dilué (4.5.1). Ajouter 20 ml de dichlorométhane (4.5.2), homogénéiser de nouveau et centrifuger 5 min à 3 000 g. Récupérer la couche de caséine se trouvant entre la phase aqueuse et la phase organique (figure 2) à l'aide d'une spatule et éliminer les deux phases. Homogénéiser de nouveau la caséine dans 40 ml d'eau distillée (voir ci-dessus) et 20 ml de dichlorométhane (4.5.2) et centrifuger. Répéter ce processus jusqu'à ce que la coloration des phases d'extraction devienne négligeable (deux ou trois fois). Homogénéiser le résidu de protéines avec 50 ml d'acétone (4.5.3) et filtrer la solution sur un filtre plissé. Laver le résidu deux fois avec 25 ml d'acétone sur le filtre et laisser sécher à l'air ou sous un courant d'azote; réduire ensuite en fines particules dans un mortier.

Remarque: les extraits protéiques séchés doivent être conservés à -20 °C.

6.1.2. Transformation des caséines β en caséines γ par action de la plasmine

Mettre en suspension 25 mg de caséines isolées (6.1.1) dans 0,5 ml de tampon de carbonate d'ammonium (4.7.1) et homogénéiser pendant 20 min en utilisant, par exemple, le traitement ultrasonique. Porter à 40 °C et ajouter 10 µl de plasmine (4.7.2); mélanger et incubé pendant une heure à 40 °C sans cesser d'agiter. Pour inhiber l'enzyme, ajouter 20 µl de solution d'acide ε-aminocaproïque (4.7.3), puis ajouter 200 mg d'urée et 2 mg de dithiothréitol.

Remarque: pour obtenir une meilleure symétrie des bandes de caséine focalisées, il est recommandé de lyophiliser la solution après avoir ajouté l'acide ε-aminocaproïque et dissous les lyophilisats obtenus dans 0,5 ml de solution tampon (4.6).

6.2. Préparation des gels de polyacrylamide contenant de l'urée

Appliquer au rouleau, sur une plaque de verre (5.1) la feuille de support du gel (5.2) à l'aide de quelques gouttes d'eau; éponger l'eau excédentaire avec une serviette de papier. De la même manière, appliquer au rouleau la seconde feuille (5.3), pourvue de ruban adhésif (écarteurs de 0,25 mm), sur une autre plaque de verre. Cette seconde plaque est posée horizontalement sur une table à niveau réglable.

Ajouter à la solution de gel préparée et dégazée (4.1.2) 10 µl de TEMED (4.1.3.1); agiter et ajouter 10 µl de solution PER (4.1.3.2); la mélanger soigneusement et la verser rapidement et uniformément au centre de la seconde sur la plaque de la seconde feuille et l'abaisser lentement jusqu'à ce qu'un film de gel se forme et s'étende uniformément, sans inclusion de bulles, entre les feuilles (figure 3). À l'aide d'une fine spatule, abaisser soigneusement et complètement la plaque de support du gel et y poser, pour faire pression, trois autres plaques de verre. Après polymérisation complète (environ 60 min), récupérer en même temps le gel polymérisé sur la feuille de support du gel ainsi que sur l'autre feuille en écartant les deux plaques de verre. Nettoyer soigneusement le dos de la feuille de support des restes de gel et de l'urée. Souder entre eux les bords du «sandwich de gel» dans le sens de la longueur, on obtient ainsi un tube que l'on peut conserver au réfrigérateur (six semaines au maximum).

Remarque: la seconde feuille avec les écarteurs peut être réutilisée. Le gel de polyacrylamide peut être découpé en plus petits formats; ceci est recommandé en cas d'échantillonnages restreints ou en cas d'utilisation d'un appareil automatique d'électrophorèse (2 gels de format 4,5 × 5 cm).

6.3. Focalisation isoélectrique

Régler le cryostat à 12 °C. Essuyer le dos de la feuille de support du gel à l'aide de kérosène, verser quelques gouttes de kérosène (4.2) au centre du bloc de refroidissement. Appliquer le «sandwich de gel» en éliminant les bulles d'air, côté support vers le bas. Essuyer l'excédent de kérosène et retirer la seconde feuille. Imbiber les bandes des solutions anodique et cathodique (4.3 et 4.4), les couper à la longueur du gel et les mettre en place (distance des électrodes: 9,5 cm).

Procéder à la focalisation dans les conditions suivantes.

6.3.1. Format du gel: 265 × 125 × 0,25 mm

Étape	Durée (min)	Tension (V)	Courant (mA)	Puissance (W)	Volts/heures (Vh)
1. Préfocalisation	30	Au maximum 2 500	Au maximum 15	Constante 4	Environ 300
2. Focalisation d'échantillons (1)	60	Au maximum 2 500	Au maximum 15	Constante 4	Environ 1 000
3. Focalisation finale	60	Au maximum 2 500	Au maximum 5	Au maximum 20	Environ 3 000
	40	Au maximum 2 500	Au maximum 6	Au maximum 20	Environ 3 000
	30	Au maximum 2 500	Au maximum 7	Au maximum 25	Environ 3 000

(1) Application des échantillons: après avoir procédé à la préfocalisation (étape 1), déposer à l'aide d'une pipette 18 µl de l'échantillon et des solutions étalons sur les applicateurs d'échantillons (10 × 5 mm); les poser sur le gel à intervalle de 1 mm les uns des autres et à 5 mm le long de l'anode et appuyer légèrement. Procéder à la focalisation en respectant les conditions indiquées ci-dessous et après 60 min de focalisation des échantillons, retirer délicatement les applicateurs d'échantillons.

Remarque: si l'épaisseur ou la largeur des gels change, les valeurs du courant et de la puissance doivent être adaptées (par exemple, doubler les valeurs du courant et de la puissance en cas d'utilisation d'un gel de format 265 × 125 × 0,5).

6.3.2. Exemple de programmation d'un appareil automatique d'électrophorèse (2 gels de 5,0 × 4,5 cm): placer les électrodes sans bande directement sur le gel

Étape	Tension	Courant	Puissance	Température	Volt/heures
1. Préfocalisation	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Focalisation des échantillons	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Focalisation	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Focalisation	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

Placer l'applicateur d'échantillons à l'étape 2 à 00 Vh.

Ôter l'applicateur d'échantillons à l'étape 2 à 30 Vh.

6.4. Coloration des protéines

6.4.1. Fixation des protéines

Après avoir coupé le courant, retirer immédiatement les bandes et placer le gel dans une cuve de coloration/décoloration remplie de 200 ml de fixateur (4.9); laisser reposer 15 min en agitant continuellement.

6.4.2. Lavage et coloration de la plaque de gel

Décantier soigneusement le fixateur et procéder à deux lavages de 30 secondes de la plaque de gel avec 100 ml de solution de décoloration (4.10). Decantier la solution de décoloration, remplir la cuve avec 250 ml de solution de coloration (4.11.3) et procéder à la coloration pendant 45 min en agitant légèrement.

6.4.3. Décoloration de la plaque de gel

Décanner la solution de coloration et procéder à deux lavages de la plaque de gel avec 100 ml de solution de décoloration (4.10), agiter ensuite deux fois pendant 15 min avec 200 ml de solution de décoloration et répéter l'étape de décoloration au moins deux à trois fois jusqu'à ce que le fond devienne clair et perde sa coloration. Laver ensuite la plaque de gel avec de l'eau distillée (deux fois 2 min) et sécher à l'air (2 à 3 heures) ou à l'aide d'un sèche-cheveux (de 10 à 15 min).

Remarque 1: effectuer les opérations de fixation, de lavage, de coloration et de décoloration à 20 °C. Ne pas utiliser de température élevée.

Remarque 2: si la préférence est donnée à une coloration à l'argent plus sensible (par exemple, Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Code n° 17-1150-01), diluer à 5 mg/ml les échantillons de caséine à traiter à la plasmine.

7. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats se fait en comparant le profil des protéines de l'échantillon à examiner avec ceux des échantillons de référence sur le même gel. Le lait de vache est détecté dans les fromages à base de lait de brebis, de lait de chèvre et de lait de bufflonne et dans les mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne par la mise en évidence des caséines γ_2 et γ_3 dont les points isoélectriques se situent entre pH 6,5 et 7,5 (figures 4a, b, figure 5). La limite de détection est inférieure à 0,5 %.

7.1. Interprétation visuelle

Pour une interprétation visuelle de la quantité de lait de vache, il est recommandé d'adapter les concentrations d'échantillons et d'échantillons de référence afin d'obtenir le même degré d'intensité des caséines γ_2 et γ_3 de lait de brebis, de chèvre et/ou de bufflonne (« γ_2 E, G, B» et « γ_3 E, G, B» dans les figures 4a, b et 5). Ensuite, la quantité de lait de vache (inférieure, égale ou supérieure à 1 %) dans l'échantillon à examiner peut être jugée directement par comparaison de l'intensité des caséines γ_3 et γ_2 du lait de vache (voir « γ_3 C» et « γ_2 C» dans les figures 4a, b et 5) avec celles des échantillons de référence à 0 et 1 % (brebis, chèvre) ou des échantillons intérimaires de laboratoire (bufflonne).

7.2. Estimation densitométrique

Si possible, appliquer la densitométrie (5.19) pour la détermination du rapport de la surface de pic entre les caséines γ_2 et γ_3 du lait de vache et du lait de brebis, du lait de chèvre et/ou du lait de bufflonne (figure 5). Comparer cette valeur avec le rapport de la surface de pic des caséines γ_2 et γ_3 de l'échantillon de référence à 1 % (lait de brebis, lait de chèvre) ou de l'échantillon de référence intérimaire de laboratoire (lait de bufflonne) analysés sur le même gel.

Remarque: cette méthode fonctionne de façon satisfaisante s'il existe un signal nettement positif pour les deux caséines γ_2 et γ_3 de lait de vache dans l'échantillon de référence à 1 % mais non dans l'échantillon de référence à 0 %. Dans le cas contraire, optimiser la procédure en suivant soigneusement les instructions de la méthode.

Un échantillon est jugé positif si les deux caséines γ_2 et γ_3 de lait de vache ou les rapports de surface de pic correspondants sont égaux ou supérieurs aux chiffres concernant l'échantillon de référence à 1 %.

8. Références

1. Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: *Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins.* *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: *A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting.* *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).
3. Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: *Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilised pH gradient — isoelectric focusing of γ -caseins using plasmin as signal amplifier.* in: *Electrophoresis-Forum* 89 (B. J. Radola, ed.) pp. 389-393, Bode-Verlag, München (1989).
4. Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: *Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen.* *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 195-199 (1982).
5. Radola B.J.: *Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films.* *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

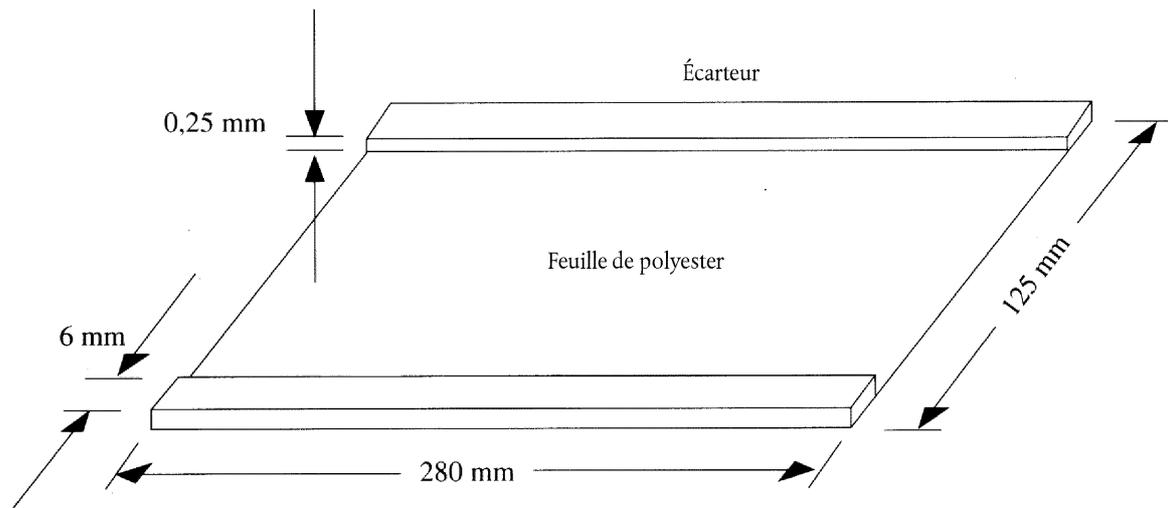


Figure 1: dessin schématique de la seconde feuille

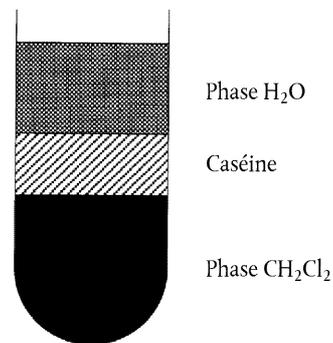


Figure 2: couche de caséine surnageante entre la phase aqueuse et la phase organique après centrifugation

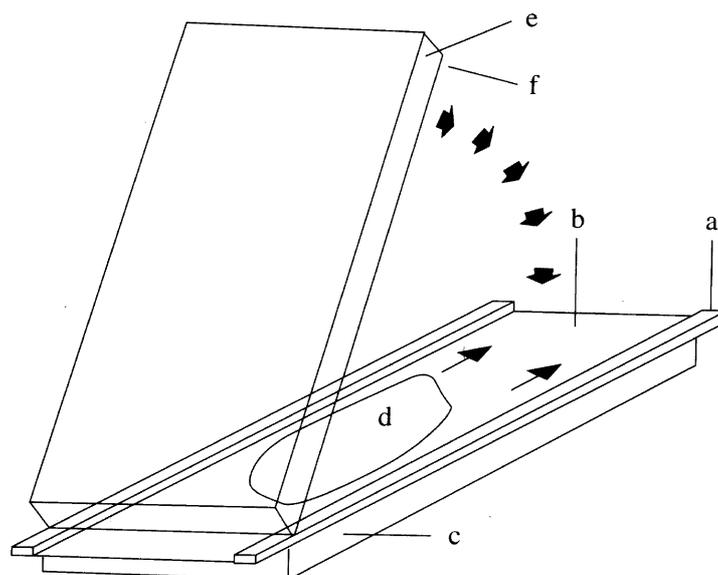


Figure 3: technique de rabat pour la coulée de gels de polyacrylamide ultrafin

a = écarteur (0,25 mm); b = seconde feuille (5.3); c, e = plaques de verre (5.1); d = solution de gel (4.1.2); f = feuille de support de gel (5.2)

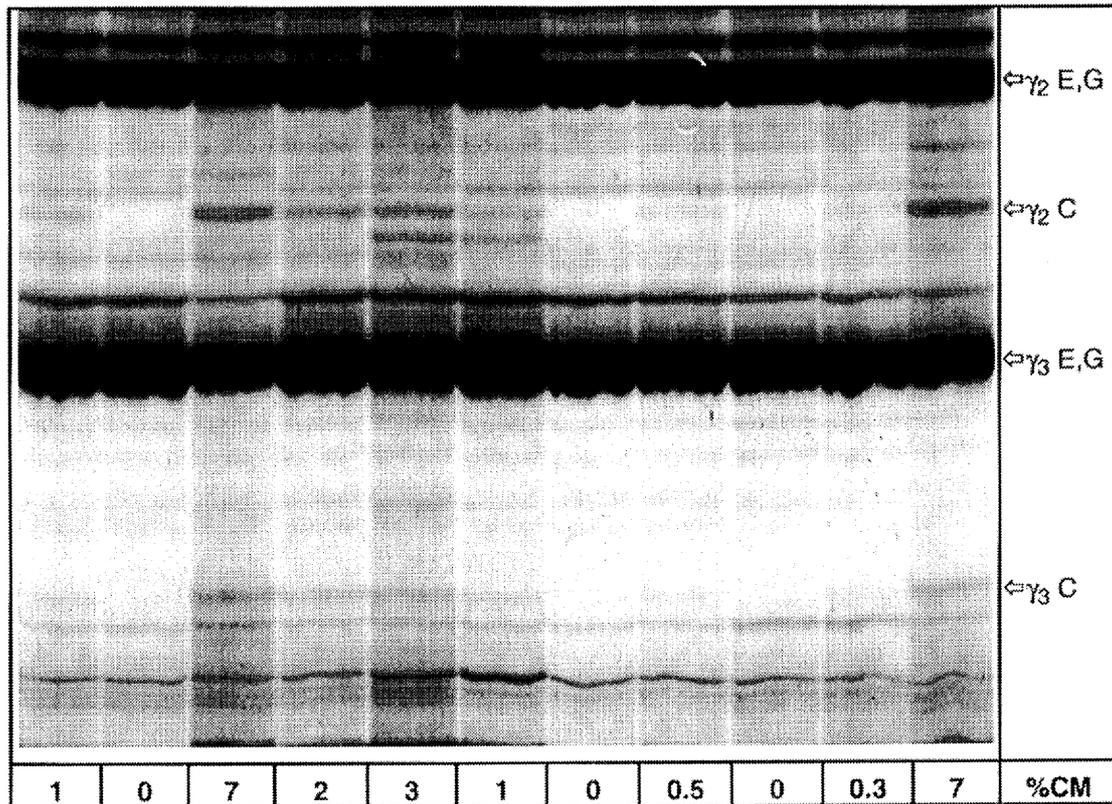


Figure 4a: focalisation isoélectrique des caséines de fromage de lait de brebis et de lait de chèvre contenant différentes quantités de lait de vache, soumises à l'action de la plasmine
 % CM = pourcentage de lait de vache; C = vache; E = brebis; G = chèvre
 La moitié supérieure du gel I.E.F est indiquée.

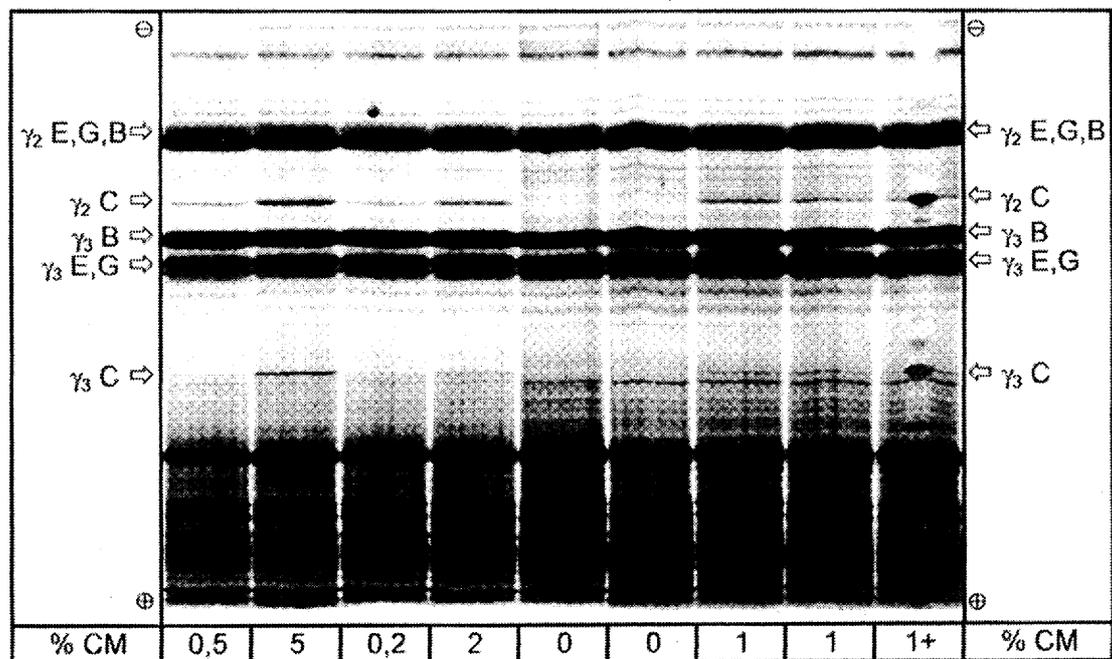


Figure 4b: focalisation isoélectrique des caséines de fromages produits à partir de mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne contenant différentes quantités de lait de vache, soumises à l'action de la plasmine
 % CM = pourcentage de lait de vache; 1 + = échantillon contenant 1 % de lait de vache et dopé de caséine pure de lait de vache au milieu du trajet; C = vache; E = brebis; G = chèvre; B = bufflonne.
 La distance totale de séparation du gel I.E.F. est indiquée.

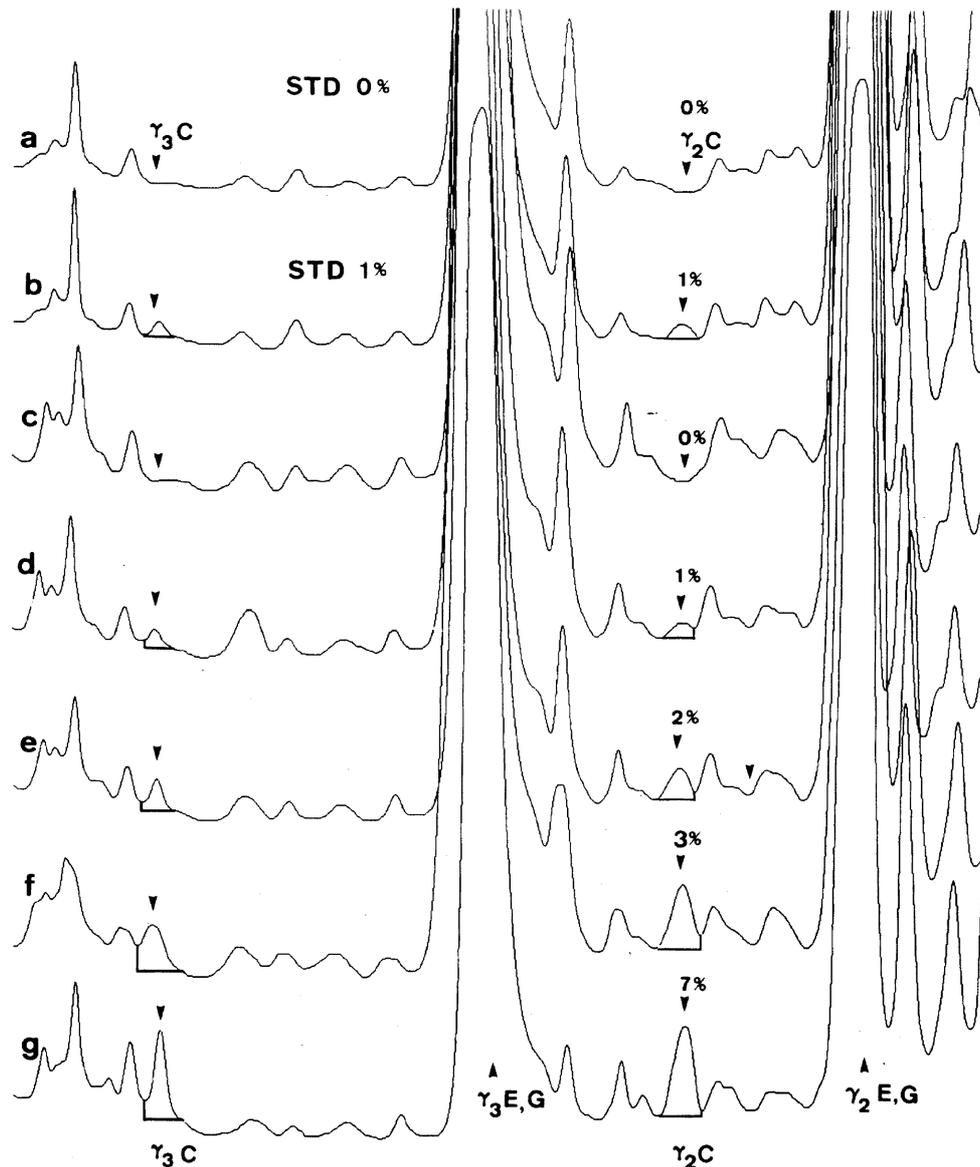


Figure 5: superposition des densitogrammes des échantillons de référence (STD) et des échantillons de fromage produits à partir d'un mélange de lait de brebis et de lait de chèvre après focalisation isoélectrique.

a, b = échantillons de référence contenant 0 et 1 % de lait de vache; c-g = échantillons de fromage contenant 0, 1, 2, 3 et 7 % de lait de vache; C = vache; E = brebis; G = chèvre.

La moitié supérieure du gel a été lue à une longueur d'onde $\lambda = 634$ nm.

ANNEXE XVI

(Article 11)

MÉTHODE DE RÉFÉRENCE POUR LA DÉTECTION DES COLIFORMES DANS LE BEURRE, LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE, LA CASÉINE ET LES CASÉINATES

Des échantillons correspondant à 1 gramme de beurre sont inoculés dans le milieu de culture, si le beurre est examiné pour rechercher la présence de coliformes.

Si on recherche la présence de coliformes dans le lait écrémé en poudre, la caséine et les caséinates, des échantillons de 0,1 gramme sont inoculés dans le milieu de culture.

La norme IFL 73A:1985, méthode B, est appliquée avec les modifications suivantes:

- 1) Préparation de l'échantillon conformément à la norme IFL 122B:1992. Pour la caséine acide, la procédure de préparation d'échantillon décrite dans la norme IFL 73A:1985 peut être utilisée comme solution de rechange.
- 2) Seuls des tubes inoculés avec des échantillons pesant respectivement 1 gramme (beurre) ou 0,1 gramme (lait écrémé en poudre, caséine/caséinates) sont incubés et évalués. Il n'est pas effectué de dilutions décimales.

Évaluation des résultats

Trois résultats négatifs:	Prescription respectée
Deux ou trois résultats positifs:	Prescription non respectée
Deux résultats négatifs:	Analyser deux échantillons supplémentaires pesant respectivement 1 gramme (beurre) et 0,1 gramme (lait écrémé en poudre, caséine/caséinates). La prescription est respectée si les deux derniers résultats sont négatifs, sinon, la prescription n'est pas respectée.

Remarque

Teneur en coliformes: 1/10 g pour le beurre, 1/g pour le lait écrémé en poudre, la caséine ou les caséinates, sur la base d'une moyenne.

Les résultats indiquant que la prescription est respectée sont obtenus avec une probabilité de 93 %.

Teneur en coliformes: 1/g pour le beurre, 1/0,1 g pour le lait écrémé en poudre, la caséine ou les caséinates, sur la base d'une moyenne.

Les résultats indiquant que la prescription n'est pas respectée sont obtenus avec une probabilité de 91 %.

(Hypothèse: Distribution de Poisson)

ANNEXE XVII

(Article 12)

MÉTHODE D'ANALYSE POUR LA DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN LACTOSE DANS LES PRODUITS RELEVANT DE LA POSITION 2309 DE LA NOMENCLATURE COMBINÉE ⁽¹⁾

PARTIE I

1. Domaine d'application

La méthode est applicable dans les cas d'une teneur en lactose supérieure à 0,5 %.

2. Principe

Dissoudre les sucres dans de l'eau. Faire agir la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) qui laisse le lactose intact. Déterminer la teneur en lactose de la solution, selon la méthode Luff-Schoorl, après défécation et filtration.

3. Réactifs

Thiosulfate de sodium 0,1 N

Indicateur: solution d'amidon. Un mélange de 5 g d'amidon soluble (ajouter, éventuellement, 10 mg d'iodure de mercure comme agent de conservation) et de 30 ml d'eau est ajouté à 1 litre d'eau bouillante; maintenir ce mélange à l'ébullition pendant 3 minutes; laisser refroidir.

Solution d'iodure de potassium p.a. à 30 % (p/v).

Solution d'acide sulfurique 6 N

Réactif selon Luff-Schoorl:

- a) Dissoudre 25 g de sulfate de cuivre p.a. exempt de fer ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans 100 ml d'eau;
- b) Dissoudre 50 g d'acide citrique p.a. ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dans 50 ml d'eau;
- c) Dissoudre, dans environ 300 ml d'eau chaude, 143,8 g de carbonate de sodium p.a. anhydre (Na_2CO_3).

Verser b) dans c) (après refroidissement), en agitant prudemment, et ajouter ensuite a). Compléter à 1 litre, laisser reposer pendant une nuit et filtrer. Il y a lieu de vérifier les normalités du réactif ainsi obtenu (0,1 N en Cu, 2 N en Na_2CO_3). Le pH doit être voisin de 9,4.

Solution Carrez I: dissoudre 23,8 g de Zn ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)₂·2H₂O et 3 g d'acide acétique glacial dans l'eau et compléter à 100 ml.

Solution Carrez II: dissoudre 10,6 g de $\text{K}_4\text{F}_2(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau et compléter à 100 ml.

Grains de pierre ponce, traités à l'ébullition par l'acide chlorhydrique, lavés à l'eau et séchés, Suspension de *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g de levure fraîche dans 100 ml d'eau (ne pas conserver plus d'une semaine au réfrigérateur).

4. Mode opératoire

Peser, à 1 mg près, 1 g de l'échantillon à analyser, introduire la prise dans un ballon jaugé de 100 ml. Ajouter 25 à 30 ml d'eau. Placer le ballon pendant 30 minutes dans un bain-marie bouillant; refroidir ensuite à 35 °C environ.

Ajouter 5 ml de la suspension de levure ⁽²⁾ et agiter. Maintenir le ballon jaugé et son contenu durant 2 h au bain-marie, à la température de 38 à 40 °C.

Après la fermentation, refroidir à une température d'environ 20 °C. Ajouter 2,5 ml de la solution Carrez I et agiter pendant 30 secondes; ajouter ensuite 2,5 ml de la solution Carrez II et agiter à nouveau pendant 30 secondes. Compléter à 100 ml avec de l'eau, mélanger et filtrer. Pipetter une quantité de filtrat n'excédant pas 25 ml et contenant de préférence de 40 à 80 mg de lactose; si nécessaire, compléter à 25 ml avec de l'eau et déterminer la teneur en lactose anhydre selon Luff-Schoorl.

Procéder à un essai à blanc complet avec la levure seule.

⁽¹⁾ Règlement (CEE) n° 222/88.

⁽²⁾ Dans le cas des produits contenant plus de 40 % de sucres fermentescibles, augmenter la quantité de suspension.

PARTIE II

1. Détermination de la teneur en lactose suivant la méthode Luff-Schoorl

Pipetter 25 ml de réactif selon Luff-Schoorl et les porter dans un Erlenmeyer de 300 ml; ajouter 25 ml, exactement mesurés, de la solution déféquée.

Après avoir ajouté deux grains de pierre ponce, chauffer, en agitant à la main, au-dessus d'une flamme libre de hauteur moyenne et porter le liquide à l'ébullition durant 2 minutes environ. Placer immédiatement l'Erlenmeyer sur une toile métallique, pourvue d'un écran d'amiante, sous laquelle on a préalablement allumé une flamme. Celle-ci est réglée de telle façon que l'Erlenmeyer soit chauffé uniquement sous la base; adapter ensuite un réfrigérant à reflux. À partir de cet instant, faire bouillir pendant 10 minutes exactement. Refroidir immédiatement dans l'eau froide et après 5 minutes environ, titrer comme suit:

Ajouter au liquide 10 ml d'iodure de potassium et, immédiatement après, mais avec prudence (en raison de la formation d'une mousse abondante) 25 ml d'acide sulfurique 6 N.

Titrer ensuite avec le thiosulfate de sodium jusqu'à l'apparition d'une teinte jaune terne et, vers la fin de la titration, ajouter l'indicateur à l'amidon.

Effectuer la même titration sur un mélange rigoureusement mesuré de 25 ml de réactif selon Luff-Schoorl et 25 ml d'eau, après avoir ajouté 10 ml d'iodure de potassium et 25 ml d'acide sulfurique 6 N, cette fois sans porter à l'ébullition.

Établir un moyen de la table ci-après la quantité en mg de lactose correspondant à la différence des résultats des deux titrations (exprimés en ml de thiosulfate de sodium 0,1 N).

TABLE

Table pour 25 ml de réactif suivant Luff-Schoorl

(voir conditions indiquées dans le texte)

1. Tiosulfate de sodium 0,1 N

2. Lactose $C_{12}H_{22}O_{11}$

1			2		
ml	mg	Différence	ml	mg	Différence
1	3,6	3,7	12	44,6	3,8
2	7,3	3,7	13	48,4	3,8
3	11,0	3,7	14	52,2	3,8
4	14,7	3,7	15	56,0	3,9
5	18,4	3,7	16	59,9	3,9
6	22,1	3,7	17	63,8	3,9
7	25,8	3,7	18	67,7	4,0
8	29,5	3,7	19	71,7	4,0
9	33,2	3,8	20	75,7	4,1
10	37,0	3,8	21	79,8	4,1
11	40,8	3,8	22	83,9	4,1
		3,8	23	88,0	4,1

ANNEXE XVIII

(Article 13)

RECHERCHE DU LACTOSÉRUM PRÉSURÉ DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE DESTINÉ AU STOCKAGE PUBLIC PAR LE DOSAGE DES GLYCOMACROPEPTIDES AU MOYEN DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP)**1. Objet et domaine d'application**

Cette méthode permet de mettre en évidence la présence de lactosérum présuré dans le lait écrémé en poudre destiné au stockage public par dosage des glycomacropéptides.

2. Références

Norme Internationale ISO 707 — «Lait et produits laitiers — Méthode d'échantillonnage» conformément aux indications reprises à l'annexe I, paragraphe 2, point c), dernier alinéa.

3. Définition

Teneur en glycomacropéptides du lait écrémé en poudre: teneur en substances déterminée selon la méthode décrite ci-après et exprimée en pourcentage en masse.

4. Principe

- Reconstitution du lait écrémé en poudre, élimination des matières grasses et des protéines avec l'acide trichloracétique, et centrifugation,
- détermination de la quantité de glycomacropéptides (GMP) présents dans le surnageant par chromatographie liquide à haute performance (CLHP),
- évaluation du résultat obtenu par rapport à des échantillons témoins constitués de lait écrémé en poudre exempts ou additionnés d'un pourcentage connu de lactosérum en poudre.

5. Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée est de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

5.1. Solution d'acide trichloracétique

Dissoudre 240 g d'acide trichloracétique (Cl_3CCOOH) dans de l'eau et compléter à 1 000 ml.

5.2. Solution éluante, pH 6,0

Dissoudre 1,74 g de phosphate dipotassique (K_2HPO_4), 12,37 g de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) et 21,41 g de sulfate de sodium (Na_2SO_4) dans 700 ml d'eau environ. Ajuster, si nécessaire, à pH 6,0 à l'aide d'une solution d'acide phosphorique ou d'hydroxyde de potassium.

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau et homogénéiser.

Filtrer la solution éluante, avant utilisation, sur une membrane filtrante de 0,45 μm de diamètre de pore.

5.3. Solution de lavage et de conservation des colonnes

Mélanger un volume d'acétonitrile (CH_3CN) à 9 volumes d'eau. Filtrer le mélange, avant utilisation, sur une membrane filtrante de 0,45 μm de diamètre de pore.

Note: Toute autre solution de lavage ayant un effet bactéricide et n'altérant pas l'efficacité de résolution des colonnes peut être utilisée.

5.4. Échantillons témoins

5.4.1. Lait écrémé en poudre répondant aux exigences du présent règlement, soit [0].

5.4.2. Le même lait écrémé en poudre adultéré à 5 % (m/m) par du lactosérum en poudre de type présuré de composition moyenne, soit [5].

6. Appareillage

- 6.1. Balance analytique.
- 6.2. Centrifugeuse pouvant atteindre une force centrifuge de 2 200 g et munie de tubes à centrifuger bouchés d'une capacité d'environ 25 ml.
- 6.3. Agitateur mécanique.
- 6.4. Agitateur magnétique.
- 6.5. Entonnoirs en verre, d'environ 7 cm de diamètre.
- 6.6. Papiers filtres, filtration moyenne, d'environ 12,5 cm de diamètre.
- 6.7. Dispositif de filtration en verre muni de membrane filtrante de 0,45 µm de diamètre de pore.
- 6.8. Pipette graduée permettant de délivrer 10 ml, conforme à l'ISO 648, classe A, ou à l'ISO/R 835.
- 6.9. Bain d'eau thermostaté réglé à 25 plus ou moins 0,5 °C.
- 6.10. Équipement CLHP comprenant:
 - 6.10.1. pompe,
 - 6.10.2. injecteur, manuel ou automatique, de 15 à 30 µl de capacité,
 - 6.10.3. deux colonnes en série TSK 2 000 SW (longueur 30 cm, diamètre intérieur 0,75 cm) ou des colonnes d'efficacité équivalente et une précolonne en amont (3 cm × 0,3 cm) garnie de I 125 ou d'un matériel d'une efficacité équivalente,
 - 6.10.4. four à colonne thermostaté réglé à 35 plus ou moins 1 °C,
 - 6.10.5. détecteur UV à longueur d'onde variable, permettant d'effectuer des mesures à 205 nm à une sensibilité de 0,008 A,
 - 6.10.6. intégrateur pouvant intégrer de vallée à vallée.

Note: Il est possible de travailler avec des colonnes maintenues à température ambiante mais leur pouvoir de résolution est légèrement plus faible. Dans ce cas, les variations de température au cours d'une même série d'analyses doivent être inférieures à plus ou moins 5 °C.

7. Échantillonnage

- 7.1. Norme internationale ISO 707 — «Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage» conformément aux indications reprises au paragraphe 2, point c), de l'annexe I.
- 7.2. Conserver l'échantillon dans des conditions telles qu'aucune détérioration ni modification de composition ne puisse intervenir.

8. Mode opératoire

- 8.1. *Préparation de l'échantillon pour essai*

Transvaser le lait en poudre dans un récipient de capacité environ double du volume de la poudre, muni d'un couvercle étanche à l'air. Fermer le récipient immédiatement. Bien mélanger le lait en poudre par retournement successif du récipient.
- 8.2. *Prise d'essai*

Peser 2,000 plus ou moins 0,001 g d'échantillon pour essai dans un tube à centrifuger (6.2).
- 8.3. *Élimination des matières grasses et des protéines*
 - 8.3.1. Ajouter 20,0 g d'eau tiède (50 °C) à la prise d'essai. Dissoudre la poudre en agitant pendant 5 minutes à l'aide de l'agitateur (6.3). Ramener la température du tube à 25 °C.
 - 8.3.2. Ajouter en 2 minutes, 10,0 ml de la solution d'acide trichloracétique (5.1) sous agitation magnétique (6.4). Placer le tube dans le bain d'eau (6.9) et l'y maintenir 60 minutes.
 - 8.3.3. Centrifuger (6.2) 2 200 g pendant 10 minutes. Ou filtrer sur papier (6.6), rejeter les 5 premiers ml de filtrat.

8.4. Détermination chromatographique

- 8.4.1. Injecter de 15 à 30 µl mesurés exactement, de surnageant ou de filtrat (8.3.3) dans l'appareil CLHP (6.10) sous un débit de 1,0 ml de solution éluante (5.2) par minute.

Note:

1. Maintenir la solution éluante (5.2) à 85 °C durant toute l'analyse chromatographique afin de conserver l'éluant dégazé et de prévenir toute prolifération bactérienne. Toute précaution ayant un effet similaire est acceptable.

2. Lors de chaque interruption, rincer les colonnes à l'eau. Ne jamais les laisser sous la solution éluante (5.2).

Avant toute interruption supérieure à 24 heures, rincer les colonnes à l'eau puis les laver avec la solution (5.3) pendant au moins 3 heures sous un débit de 0,2 ml par minute.

- 8.4.2. Les résultats de l'analyse chromatographique de l'échantillon pour essai [E] sont obtenus sous la forme d'un chromatogramme où chaque pic est identifié par son temps de rétention RT, soit:

pic II: deuxième pic du chromatogramme dont le RT est de 12,5 minutes environ,

pic III: troisième pic du chromatogramme, correspondant aux GMP, dont le RT de 15,5 plus ou moins 1,0 minute,

pic IV: quatrième pic du chromatogramme dont le RT est de 17,5 minutes environ.

La qualité des colonnes peut influencer sur le temps de rétention des différents pics.

L'intégrateur (6.10.6) calcule automatiquement la surface A de chaque pic, soit:

A_{II}: surface du pic II,

A_{III}: surface du pic III,

A_{IV}: surface du pic IV.

Afin de détecter les anomalies éventuelles dues soit à un mauvais fonctionnement de l'appareillage ou des colonnes, soit à l'origine et à la nature de l'échantillon analysé, il est nécessaire d'observer l'aspect de chaque chromatogramme avant toute interprétation quantitative.

En cas de doute, répéter l'analyse.

8.5. Étalonnage

- 8.5.1. Appliquer exactement aux échantillons témoins (5.4) le mode opératoire décrit du point 8.2 au point 8.4.2.

Utiliser des solutions fraîchement préparées car les GMP se dégradent en milieu trichloracétique à 8 %. En effet, leur teneur diminue approximativement de 0,2 % par heure à 30 °C.

- 8.5.2. Avant de procéder à toute détermination chromatographique des échantillons, conditionner les colonnes par injections répétées de la solution (8.5.1) de l'échantillon témoin (5.4.2) jusqu'à ce que la surface et le temps de rétention du pic correspondant aux GMP soient constants.

- 8.5.3. Déterminer les coefficients de réponse R en injectant le même volume de filtrats (8.5.1) que celui utilisé pour les échantillons.

9. Expression des résultats

9.1. Mode de calcul et formules

- 9.1.1. Calcul des coefficients de réponse R:

$$\text{pic II:} \quad R_{II} = \frac{100}{A_{II}[0]}$$

$$\text{pic IV:} \quad R_{IV} = \frac{100}{A_{IV}[0]}$$

où

R_{II} et R_{IV} = respectivement les coefficients de réponse des pics II et IV,

A_{II} [0] et A_{IV} [0] = respectivement les surfaces des pics II et IV de l'échantillon témoin [0] obtenues au point 8.5.3,

$$\text{pic III:} \quad R_{III} = \frac{W}{A_{III}[5] - A_{III}[0]}$$

où

R_{III} = le coefficient de réponse du pic III,

A_{III} [0] et A_{III} [5] = respectivement les surfaces du pic III dans les échantillons témoins [0] et [5] obtenues au point 8.5.3,

W = la quantité de lactosérum présent dans l'échantillon témoin [5], soit 5.

9.1.2. Calcul de la surface relative des pics de l'échantillon [E]

$$S_{II} [E] = R_{II} \times A_{II} [E]$$

$$S_{III} [E] = R_{III} \times A_{III} [E]$$

$$S_{IV} [E] = R_{IV} \times A_{IV} [E]$$

où

$S_{II} [E]$, $S_{III} [E]$, $S_{IV} [E]$ = respectivement les surfaces relatives des pics II, III et IV de l'échantillon [E],

$A_{II} [E]$, $A_{III} [E]$, $A_{IV} [E]$ = respectivement les surfaces des pics II, III et IV de l'échantillon [E] obtenues au point 8.4.2,

R_{II} , R_{III} , R_{IV} = les coefficients de réponse calculés au point 9.1.1.

9.1.3. Calcul du temps de rétention relatif du pic III de l'échantillon [E]:

$$RRT_{III} [E] = \frac{RT_{III} [E]}{RT_{III} [5]}$$

où

$RRT_{III} [E]$ = le temps de rétention relatif du pic III de l'échantillon [E],

$RT_{III} [E]$ = le temps de rétention du pic III de l'échantillon [E] obtenu au point 8.4.2.

$RT_{III} [5]$ = le temps de rétention du pic III de l'échantillon témoin [5] obtenu au point 8.5.3.

9.1.4. Par expérimentation, il a été démontré qu'il existe une relation linéaire entre le temps de rétention relatif du pic III soit $RRT_{III} [E]$ et le pourcentage de lactosérum en poudre ajouté jusqu'à 10 %:

— à une teneur > 5 %, le $RRT_{III} [E]$ est < 1,000,

— à une teneur ≤ 5 %, le $RRT_{III} [E]$ est ≥ 1,000.

L'incertitude admise pour les valeurs de RRT_{III} est de plus ou moins 0,002.

Normalement, la valeur de $RRT_{III} [0]$ est peu différente de 1,034. Selon l'état des colonnes, cette valeur peut se rapprocher de 1,000 mais elle doit toujours lui être supérieure.

9.2. Calcul du pourcentage de lactosérum présuré en poudre présent dans l'échantillon soit:

$$W = S_{III} [E] - [1,3 + (S_{III} [0] - 0,9)]$$

où

W = le pourcentage m/m de lactosérum présuré présent dans l'échantillon [E],

$S_{III} [E]$ = la surface relative du pic III de l'échantillon pour essai [E] obtenu au point 9.1.2,

1,3 = la surface relative moyenne du pic III, exprimée en g pour 100 g de lactosérum présuré déterminée dans des laits écrémés en poudre non adultérés d'origine diverse. Ce chiffre a été obtenu expérimentalement,

$S_{III} [0]$ = la surface relative du pic III qui est égale à $R_{III} \times A_{III} [0]$. Ces valeurs sont obtenues respectivement aux points 9.1.1 et 8.5.3,

$(S_{III} [0] - 0,9)$ = la correction à apporter à la surface relative moyenne 1,3 quand la valeur $S_{III} [0]$ s'écarte de 0,9. Expérimentalement, la surface relative moyenne du pic III de l'échantillon témoin [0] est de 0,9.

9.3. Précision de la méthode

9.3.1. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou dans un court intervalle de temps par le même analyste utilisant le même appareillage, sur la même prise d'échantillon, ne doit pas dépasser 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproductibilité

La différence entre deux résultats individuels et indépendants obtenus dans deux laboratoires différents, sur la même prise d'échantillon, ne doit pas dépasser 0,4 % m/m.

9.4. *Interprétation*

- 9.4.1. Conclure à l'absence de lactosérum si la surface relative du pic III, S_{III} [E], exprimée en grammes de lactosérum présuré pour 100 grammes de produit est $\leq 0,2 + (S_{III} [0] - 0,9)$

où

2,0 est la valeur maximale admise pour la surface relative du pic III qui tient compte de la surface relative du pic III, soit 1,3 de l'incertitude due aux variations de composition des laits écrémés en poudre et de la reproductibilité de la méthode (9.3.2),

$(S_{III} [0] - 0,9)$ est la correction à apporter quand la surface $S_{III} [0]$ est différente de 0,9 (voir au point 9.2).

- 9.4.2. Si la surface relative du pic III, S_{III} [E] est $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ et la surface relative du pic II, S_{II} [E] ≤ 160 , calculer la teneur en lactosérum présuré présent comme indiqué au point 9.2.

- 9.4.3. Si la surface relative du pic III, S_{III} [E] est $> 2,0 + (S_{III} [0] - 0,9)$ et la surface relative du pic II, S_{II} [E] > 160 , déterminer la teneur en matières protéiques totales (P %); examiner ensuite les graphiques 1 et 2.

- 9.4.3.1. Les données obtenues après analyse d'échantillons de laits écrémés en poudre non adultérés, à teneur en matières protéiques totales élevées, sont regroupées dans les graphiques 1 et 2.

La droite figurant en trait plein représente la droite de régression linéaire dont les coefficients sont calculés par la méthode des moindres carrés.

La droite figurant en trait discontinu fixe la limite supérieure de la surface relative du pic III, avec une probabilité de ne pas être dépassée dans 90 % des cas.

Les équations des droites en trait discontinu des graphiques 1 et 2 sont respectivement égales à:

$$S_{III} = 0,376 P \% - 10,7 \quad (\text{graphique 1})$$

$$S_{III} = 0,0123 S_{III} [E] + 0,93 \quad (\text{graphique 2})$$

où

S_{III} est la surface relative du pic III calculé soit d'après la teneur en matières protéiques totales, soit d'après la surface relative du pic S_{III} [E],

P % est la teneur en matières protéiques totales exprimée en pourcentage pondéral,

S_{III} [E] est la surface relative de l'échantillon calculée au point 9.1.2.

Ces équations sont équivalentes au chiffre 1,3 mentionné au point 9.2.

L'écart (T_1 et T_2) entre la surface relative S_{III} [E] trouvée et la surface relative S_{III} est donnée par les relations suivantes:

$$T_1 = S_{III} [E] - [(0,376 P \% - 10,7) + (S_{III} [0] - 0,9)]$$

$$T_2 = S_{III} [E] - [(0,0123 S_{III} [E] + 0,93) + (S_{III} [0] - 0,9)]$$

- 9.4.3.2. Si T_1 et/ou T_2 sont inférieurs ou égaux à zéro, la présence de lactosérum présuré ne peut être établie.

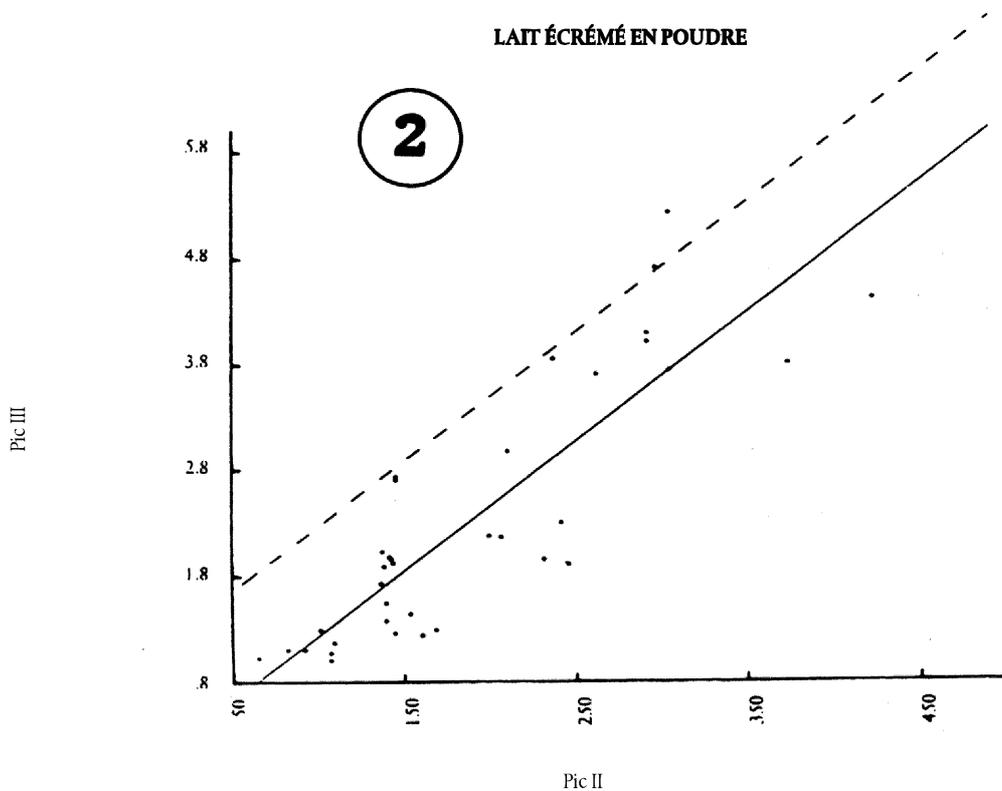
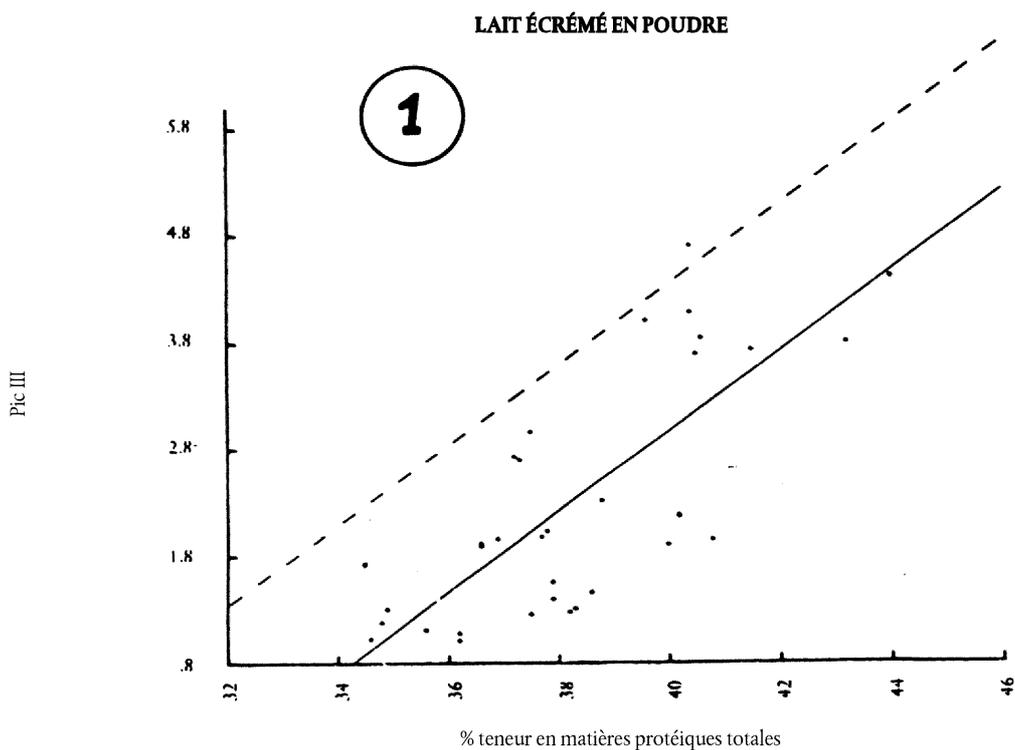
Si T_1 et T_2 sont supérieurs à zéro, la conclusion est présence de lactosérum présuré.

La teneur en lactosérum présent est calculée selon la formule suivante:

$$W = T_2 + 0,91$$

où

0,91 représente l'écart sur l'axe vertical entre la droite en trait plein et la droite en trait discontinu.



ANNEXE XIX

(Article 13)

LA DÉTERMINATION DE LACTOSÉRUM PRÉSURE SEC DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUVRE ET LES MÉLANGES VISÉS AU RÈGLEMENT (CE) N° 2799/1999**1. Objectif: Détection d'addition de lactosérum présure sec dans les produits suivants:**

- a) Lait écrémé en poudre défini à l'article 2 du règlement (CE) n° 2799/1999
- b) Les mélanges définis à l'article 4 du règlement (CE) n° 2799/1999

2. Références: Norme internationale ISO 707**3. Définition**

La teneur de lactosérum présure sec est définie comme le pourcentage (en masse) déterminé par la procédure décrite.

4. Principe

Détermination de la teneur en glycomacropéptide A conformément à l'annexe XVIII. Les échantillons donnant des résultats positifs sont analysés pour détecter les glycomacropéptides A (GMPA) par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (méthode CLHP). L'évaluation du résultat est obtenue par référence aux échantillons étalons constitués de lait écrémé en poudre avec et sans addition de lactosérum en poudre. Des résultats supérieurs à 1 % (m/m) prouvent la présence de lactosérum présure sec.

5. Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau ayant une pureté au moins équivalente. L'acétonitrile doit être de qualité spectroscopique ou HPLC.

Les réactifs utilisés pour la procédure sont décrits à l'annexe XVIII du présent règlement.

Réactifs pour la procédure CLHP en phase inversée.

5.1. Solution d'acide trichloracétique

Dissoudre 240 g d'acide trichloracétique (CCl_3COOH) dans de l'eau et compléter à 1 000 ml.

5.2. Éluants A et B

Éluant A: introduire, dans une fiole jaugée de 1 000 ml, 150 ml d'acétonitrile (CH_3CN), 20 ml d'isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) et 1,00 ml d'acide trifluoroacétique (TFA, CF_3COOH). Diluer à 1 000 ml avec de l'eau. Éluant B: introduire, dans une fiole jaugée de 1 000 ml, 550 ml d'acétonitrile, 20 ml d'isopropanol et 1,00 ml de TFA. Diluer à 1 000 ml avec de l'eau. Filtrer la solution éluante, avant l'utilisation, sur une membrane filtrante de 0,45 micromètre (μm) de diamètre de pore.

5.3. Conservation de la colonne

Après les analyses, la colonne est rincée avec l'éluant B (à l'aide d'un gradient) puis rincée avec de l'acétonitrile (à l'aide d'un gradient pendant 30 minutes). La colonne est conservée dans l'acétonitrile.

5.4. Échantillons témoins

- 5.4.1. Lait écrémé en poudre répondant aux exigences pour le stockage public, soit (0).
- 5.4.2. Le même lait écrémé en poudre adultéré à 5 % (m/m) par du lactosérum en poudre de type présure de composition standard, soit (5).
- 5.4.3. Le même lait écrémé en poudre adultéré à 50 % (m/m) par du lactosérum en poudre de type présure de composition standard, soit (50) ⁽¹⁾.

6. Appareillage

L'appareillage requis pour le mode opératoire décrit est décrit à l'annexe XVIII du présent règlement.

6.1.1. Balance analytique.

- 6.2. Centrifugeuse pouvant atteindre une force centrifuge de 2 200 g et munie de tubes à centrifuger bouchés, d'une capacité d'environ 50 ml.

⁽¹⁾ Le lactosérum en poudre de type présure de composition standard ainsi que la poudre de lait écrémé adultéré peuvent être obtenus auprès de NIZO, Kernhemseweg 2, PO Box 20, NL-6710 BA. Cependant, les poudres donnant des résultats équivalents à ceux des poudres NIZO peuvent également être utilisées.

- 6.3. Agitateur mécanique pouvant agiter à 50 °C.
- 6.4. Agitateur magnétique.
- 6.5. Entonnoirs en verre, d'environ 7 cm de diamètre.
- 6.6. Papiers filtres, filtration moyenne, d'environ 12,5 cm de diamètre.
- 6.7. Dispositif de filtration en verre muni de membrane filtrante de 0,45 micromètre de diamètre de pore.
- 6.8. Pipettes graduées, permettant de délivrer 10 ml (ISO 648, classe A ou ISO/R 835) ou un système pouvant délivrer 10,0 ml en deux minutes.
- 6.9. Bain d'eau thermostaté réglé à $25 \pm 0,5$ °C.
- 6.10. Équipement CLHP comprenant:
 - 6.10.1. Pompe à gradient binaire.
 - 6.10.2. Injecteur, manuel ou automatique, de 100 microlitres (μ l) de capacité.
 - 6.10.3. Une colonne Dupont Protein Plus (longueur: 25 cm, diamètre intérieur: 0,46 cm) ou une colonne équivalente en phase inverse, à base de silice, à larges pores.
 - 6.10.4. Four à colonne thermostatée réglé à 35 ± 1 °C.
 - 6.10.5. Détecteur UV à longueur d'onde variable, permettant d'effectuer des mesures à 210 nm (si nécessaire, une longueur d'onde supérieure pouvant atteindre 220 nm peut être utilisée) à une sensibilité de 0,02 Å.
 - 6.10.6. Intégrateur pouvant intégrer de vallée à vallée.

Note

Il est possible de travailler avec des colonnes maintenues à température ambiante à condition que cette température ambiante ne fluctue pas plus de 1 °C; sinon, on constate des variations assez grandes dans le temps de rétention de GMPA.

7. Échantillonnage

- 7.1. Le prélèvement des échantillons est effectué selon la procédure prévue par la norme internationale ISO 707. Les États membres peuvent toutefois utiliser une autre méthode d'échantillonnage pour autant que cette dernière soit conforme aux principes de la norme précitée.
- 7.2. Conserver l'échantillon dans des conditions telles qu'aucune détérioration ou modification de composition ne puisse intervenir.

8. Mode opératoire

- 8.1. *Préparation de l'échantillon pour essai*

Transvaser le lait en poudre dans un récipient de capacité environ double du volume de la poudre, muni d'un couvercle étanche à l'air. Fermer le récipient immédiatement. Bien mélanger le lait en poudre par retournements successifs du récipient.
- 8.2. *Prise d'essai*

Peser $2,00 \pm 0,001$ g d'échantillon pour essai dans un tube à centrifuger (point 6.2) ou dans un ballon bouché (50 ml).
- 8.3. *Élimination des matières grasses et des protéines*
 - 8.3.1. Ajouter 20,0 g d'eau chaude (50 °C) à la prise d'essai. Dissoudre la poudre en agitant pendant cinq minutes à l'aide de l'agitateur ou pendant trente minutes, dans le cas de babeurre acide, à l'aide de l'agitateur mécanique (point 6.3). Placer le tube dans le bain d'eau (point 6.9) et ramener la température du tube à 25 °C.
 - 8.3.2. Ajouter, en deux minutes, 10,0 ml de la solution d'acide trichloracétique à 25 °C (point 5.1), tout en agitant vigoureusement à l'aide de l'agitateur magnétique (point 6.4). Placer le tube dans le bain d'eau (point 6.9) et l'y maintenir 60 minutes.
 - 8.3.3. Centrifuger (point 6.2) 2 200 g pendant dix minutes, ou filtrer sur papier (point 6.6), rejeter les cinq premiers ml de filtrat.
- 8.4. *Détermination chromatographique*
 - 8.4.1. Procéder à l'analyse CLHP telle qu'elle est décrite à l'annexe XVIII. Si le résultat est négatif, l'échantillon analysé ne contient pas de lactosérum présente en quantités décelables. Si le résultat est positif, il faut appliquer la méthode CLHP en phase inverse décrite ci-après. La présence de babeurre acide en poudre peut donner lieu à de faux résultats positifs. La méthode CLHP en phase inverse exclut cette possibilité.

- 8.4.2. Avant de mettre en œuvre l'analyse CLHP en phase inverse, il faut optimiser les conditions de gradient. Un temps de rétention de 26 minutes \pm 2 minutes pour les GMP est idéal pour les systèmes à gradient ayant un volume mort d'environ 6 ml (volume du point où les solvants se retrouvent au volume de la boucle de l'injecteur compris). Dans le cas de systèmes à gradient ayant un volume mort inférieur (par exemple 2 ml) on devrait appliquer comme temps de rétention optimal une durée de 22 minutes.

Préparer les échantillons étalons (voir point 5.4) sans et avec 50 % de lactosérum présumé.

Injecter 100 μ l de surnageant ou de filtrat (voir point 8.3.3) dans l'appareil CLHP en utilisant les conditions du gradient de référence indiquées au tableau 1.

Tableau 1

Conditions du gradient de référence pour l'optimisation de la chromatographie

Temps (minutes)	Débit (ml/minute)	% A	% B	Courbe
Init	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	lin
32	1,0	10	90	lin
37	1,0	10	90	lin
42	1,0	90	10	lin

La comparaison des deux chromatogrammes doit faire apparaître le pic de GMP_A.

À l'aide de la formule donnée ci-après, la composition du solvant initial à utiliser pour le gradient normal (voir point 8.4.3) peut être calculée comme suit:

$$\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{\text{GMP}_A} - 26)/6) * 30 / 27$$

$$\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{\text{GMP}_A} - 26)/6) * 1,11$$

dans laquelle:

RT_{GMP_A} = temps de rétention du GMP_A, dans le gradient de référence

10 = le % B initial du gradient de référence

2,5 = % B au point central moins % B au début dans le gradient normal

13,5 = temps à mi-parcours du gradient de référence

26 = temps de rétention nécessaire pour le GMP_A

6 = rapport des pentes du gradient de référence et du gradient normal

30 = % B au début moins % B à 27 minutes. Dans le gradient de référence

27 = temps de parcours du gradient de référence.

- 8.4.3. Injection des échantillons pour essai

Injecter 100 μ l mesurés exactement de surnageant ou de filtrat (point 8.3.3) dans l'appareil CLHP sous un débit de 1,0 ml de solution éluante (point 5.2) par minute.

La composition de l'éluant au début de l'analyse découle du point 8.4.2. Elle est normalement proche de A: B = 76 : 24 (point 5.2). Immédiatement après l'injection on démarre le gradient linéaire pour arriver après 27 minutes à un pourcentage B supérieur de 5 %. Puis, on démarre le gradient linéaire qui amène la composition de l'éluant B à 90 % en cinq minutes. Cette composition est maintenue pendant cinq minutes. Puis, toujours à l'aide d'un gradient linéaire, revenir à la composition initiale en 5 minutes. Selon le volume interne du système de pompage, l'injection suivante peut être faite 15 minutes après avoir atteint les conditions initiales.

Remarques

- Le temps de rétention des glycomacropéptides devrait être de 26 minutes \pm 2 minutes, ce qui peut être obtenu en variant les conditions initiales et les conditions finales du premier gradient. Cependant, la différence dans le % B entre les conditions initiales et les conditions finales du premier gradient doit rester de 5 % B.
- Les éluants doivent être dégazés suffisamment et doivent également être conservés dégazés. Cela est indispensable au bon fonctionnement du système de pompage du gradient. L'écart type concernant le temps de rétention du pic du GMP doit être inférieur à 0,1 minute (n = 10).
- Tous les cinq échantillons, il y a lieu d'injecter et d'utiliser l'échantillon de référence (5) pour calculer un nouveau coefficient de réponse R (voir 9.1.1).

- 8.4.4. Les résultats de l'analyse chromatographique de l'échantillon pour essai (E) sont obtenus sous la forme d'un chromatogramme où le pic de GMP est identifié par son temps de rétention d'environ 26 minutes.

L'intégrateur (point 6.10.6) calcule automatiquement la hauteur de pic H du pic de GMP. La ligne de base doit être vérifiée pour chaque chromatogramme. L'analyse ou l'intégration doit être répétée si la ligne de base est incorrectement située.

Afin de détecter les anomalies éventuelles dues soit à un mauvais fonctionnement de l'appareillage ou de la colonne, soit à l'origine et à la nature de l'échantillon analysé, il est nécessaire d'observer l'aspect de chaque chromatogramme avant toute interprétation quantitative. En cas de doute, répéter l'analyse.

8.5. *Étalonnage*

- 8.5.1. Appliquer exactement aux échantillons témoins (points 5.4.1 et 5.4.2) le mode opératoire décrit du point 8.2 au point 8.4.4. Utiliser des solutions fraîchement préparées car le GMP se dégrade en milieu trichloracétique à 8 %, à température ambiante. À 4 °C la solution reste stable pendant 24 heures. Dans le cas de longues séries d'analyses, il est opportun d'utiliser un plateau dans l'injecteur automatique référencé.

Note

Le point 8.4.2 peut être omis si le % B aux conditions initiales est connu à partir d'analyses antérieures.

Le chromatogramme de l'échantillon de référence (5) doit être conforme à la figure 1. Dans cette figure, le pic du GMP_A est précédé par deux petits pics. Il est indispensable d'obtenir une séparation comparable.

- 8.5.2. Avant de procéder à toute détermination chromatographique des échantillons, injecter 100 ml de l'échantillon étalon sans lactosérum présure (0) (point 5.4.1).

Le chromatogramme ne doit pas présenter de pic au temps de rétention du pic du GMP_A.

- 8.5.3. Déterminer les coefficients de réponse R en injectant le même volume de filtrat (point 8.5.1) que celui qui a été utilisé pour les échantillons.

9. **Expression des résultats**

9.1. *Mode de calcul et formules*

- 9.1.1. Calcul du coefficient de réponse R

$$\text{Pic GMP} = W/H$$

où:

R = le coefficient de réponse du pic GMP

H = la hauteur du pic GMP

W = la quantité de lactosérum contenue dans l'échantillon témoin (5).

- 9.2. *Calcul du pourcentage de lactosérum présure en poudre présent dans l'échantillon*

$$W(E) = R \times H(E)$$

où:

W(E) = le pourcentage m/m de lactosérum présure présent dans l'échantillon (E),

R = le coefficient de réponse du pic GMP (point 9.1.1),

H(E) = la hauteur du pic GMP de l'échantillon (E).

Si W(E) est supérieur à 1 % et si la différence entre le temps de rétention et celui de l'échantillon témoin (5) est inférieur à 0,2 minute, la présence de lactosérum présure est démontrée.

9.3. *Précision de la méthode*

- 9.3.1. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou dans un court intervalle de temps par le même analyste utilisant le même appareillage, sur la même prise d'échantillon, ne doit pas dépasser 0,2 % m/m.

9.3.2. Reproductibilité

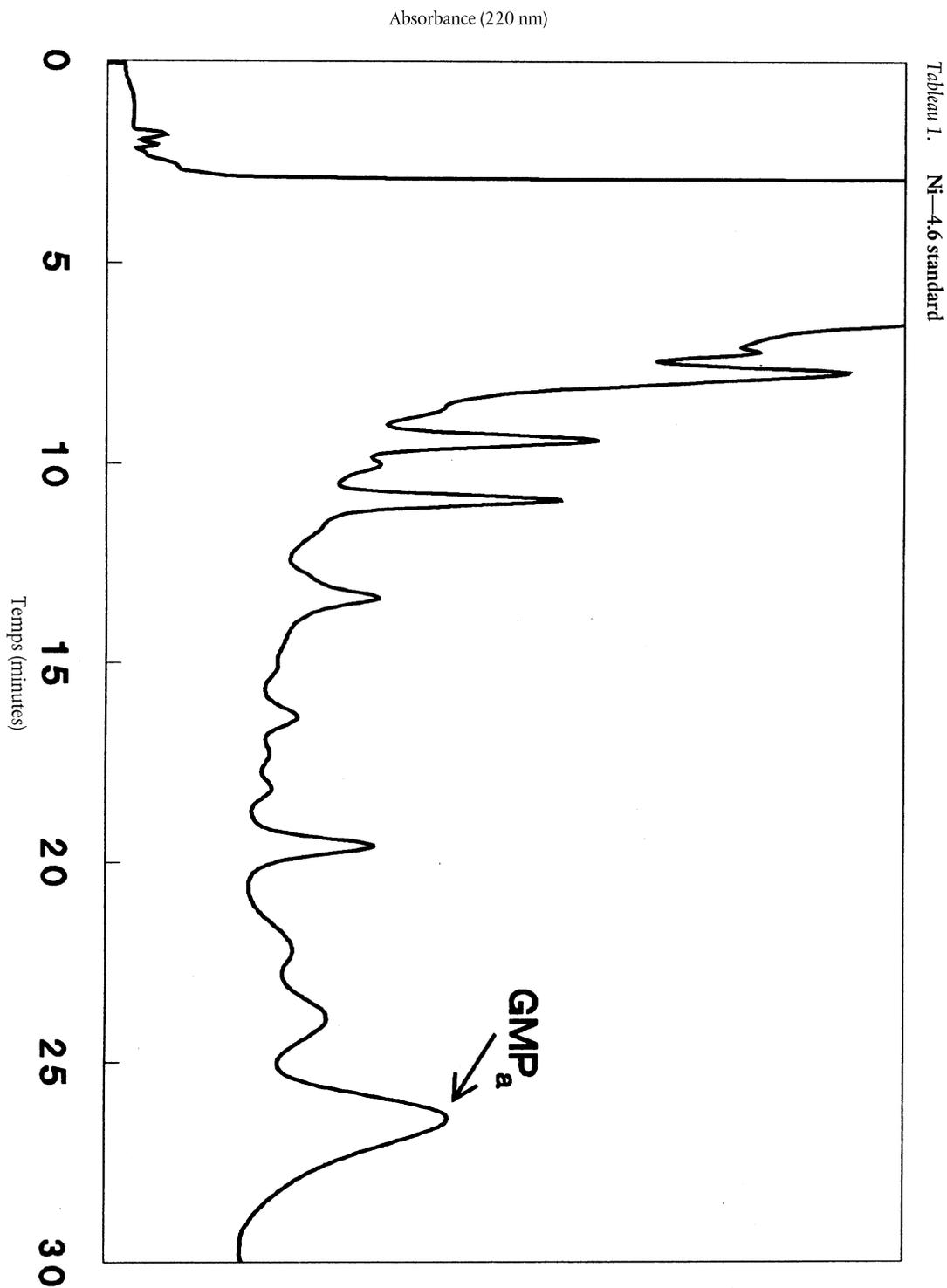
Pas encore déterminée.

9.3.3. Linéarité

Jusqu'à 16 % de lactosérum présure, on obtient une relation linéaire avec un coefficient de corrélation $> 0,99$.

9.4. *Interprétation*

- 9.4.1. Conclure à la présence de lactosérum si le résultat obtenu au point 9.2 est supérieur à 1 % m/m et si le temps de rétention du pic du GMP diffère de moins de 0,2 minute de celui de l'échantillon standard (5). La limite de 1 % est fixée conformément aux dispositions des points 9.2 et 9.4.1 de l'annexe V du règlement (CEE) 625/78.



ANNEXE XX

(Article 14)

LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE: DOSAGE DE LA PHOSPHATIDYLSÉRINE ET DE LA PHOSPHATIDYL-ÉTHANOLAMINE**Méthode CLHT à phases inversées****1. Objet et domaine d'application**

Cette méthode décrit une procédure de dosage de la phosphatidylsérine (PS) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) dans le lait écrémé en poudre (LEP) et permet d'y mettre en évidence les solides du babeurre.

2. Définition

Teneur en PS + PE: la fraction massique de la substance déterminée selon la présente procédure. Le résultat est exprimé en mg de phosphatidyléthanolamine dipalmitoyl (PEDP) pour 100 grammes de poudre.

3. Principe

Extraction au méthanol des aminophospholipides de la poudre de lait reconstitué. Dosage des PS et PE sous forme de dérivés de o-phthaldialdéhyde (OPA) par CLHP à phases inversées (PI) et détection par fluorescence. Dosage des PS et PE dans l'échantillon à doser par rapport à un échantillon de référence contenant une quantité connue de PEDP.

4. Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau doit être distillée ou avoir un degré de pureté au moins équivalent sauf spécification contraire.

4.1. *Matériel de référence: PEDP, d'une pureté minimale de 99 %*

NB: Le matériel de référence doit être stocké à -18°C .

4.2. *Réactifs pour l'échantillon de référence et la préparation de l'échantillon à doser*

4.2.1. Méthanol de qualité CLHP

4.2.2. Chloroforme de qualité CLHP

4.2.3. Monohydrochlorure de tryptamine

4.3. *Réactifs pour dérivatisation de l'o-phthaldialdéhyde*

4.3.1. Hydroxyde de sodium, solution aqueuse à 12 M

4.3.2. Acide borique, solution aqueuse à 0,4 M réglé à pH 10,0 à l'aide d'hydroxyde de sodium (4.3.1)

4.3.3. 2-mercaptoéthanol

4.3.4. o-phthaldialdéhyde (OPA)

4.4. *Solvants d'élution pour CLHP*

Préparer les solvants d'élution à l'aide de réactifs de qualité CLHP.

4.4.1. Eau de qualité CLHP

4.4.2. Méthanol d'une pureté fluorimétrique testée

4.4.3. Tétrahydrofurane

4.4.4. Phosphate de sodium dihydrogéné

4.4.5. Acétate de sodium

4.4.6. Acide acétique

5. Appareillage

5.1. Balance analytique

5.2. Bêchers d'une capacité de 25 et 100 ml

5.3. Pipettes permettant de délivrer des quantités de 1 et 10 ml

5.4. Agitateur magnétique

- 5.5. Pipettes graduées permettant de délivrer 0,2, 0,5 et 5 ml
- 5.6. Ballons jaugés d'une capacité de 10, 50 et 100 ml
- 5.7. Seringues d'une capacité de 20 et 100 µl
- 5.8. Bain ultrasonique
- 5.9. Centrifugeuse opérant à 27 000 × g
- 5.10. Fioles de verre, d'une capacité d'environ 5 ml
- 5.11. Tube gradué d'une capacité de 25 ml
- 5.12. pH-mètre
- 5.13. Équipement CLHP
 - 5.13.1. Système de pompage réglable, capable de fonctionner à un débit de 1,0 ml/min sous 200 bar
 - 5.13.2. Autoéchantillonneur avec possibilité de dérivation
 - 5.13.3. Réchauffeur de colonne réglé à 30 °C
 - 5.13.4. Détecteur de fluorescence réglé à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm et à une longueur d'onde d'émission de 440 nm
 - 5.13.5. Intégrateur ou logiciel de traitement de données capable de mesurer une surface de pic
 - 5.13.6. Colonne ichrosphère – 100 (250 × 4,6 mm) ou une colonne équivalente garnie d'octadécylsilane (C 18) d'une granulométrie de 5 µm

6. Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme IDF 50B:1985.

7. Mode opératoire

7.1. Préparation de la solution de référence interne

Peser 30,0 ± 0,1 mg de monohydrochlorure de tryptamine (4.2.3) dans un ballon jaugé de 100 ml (5.6) et porter à la marque avec du méthanol (4.2.1). Pipetter 1 ml (5.3) de cette solution dans un ballon jaugé de 10 ml (5.6) et porter à la marque avec du méthanol (4.2.1) pour obtenir une concentration de tryptamine de 0,15 mM.

7.2. Préparation de la solution de l'échantillon à doser

Peser 1,000 ± 0,001 g de l'échantillon de LEP dans un bécher de 25 ml (5.2). Ajouter 10 ml d'eau distillée à 40 °C à l'aide d'une pipette (5.3) et remuer à l'aide d'un agitateur magnétique (5.4) pendant 30 minutes pour dissoudre tout amas. Pipetter 0,2 ml (5.5) de lait reconstitué dans un ballon jaugé de 10 ml (5.6), ajouter 100 µl de la solution de tryptamine à 0,15 mM (7.1) à l'aide d'une seringue (5.7) et porter au trait avec du méthanol (4.2.1). Mélanger soigneusement par retournement et soniquer (5.8) pendant 15 minutes. Centrifuger (5.9) à 27 000 × g pendant 10 minutes et recueillir la phase surnageante dans une fiole de verre (5.10).

NB: Stocker la solution de l'échantillon à doser à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse CLHP.

7.3. Préparation de la solution de référence externe

Peser 55,4 mg de PEDP (4.1) dans un ballon jaugé de 50 ml (5.6) et ajouter environ 25 ml de chloroforme (4.2.2) à l'aide d'une colonne graduée (5.11). Chauffer le ballon à bouchon rodé pour le porter à 50 °C et mélanger soigneusement jusqu'à dissolution du PEDP. Refroidir le ballon à 20 °C, porter au trait avec du méthanol (4.2.1) et mélanger par retournement. À l'aide d'une pipette, transvaser 1 ml (5.3) de la solution dans un ballon jaugé de 100 ml (5.6) et porter jusqu'au trait avec du méthanol (4.2.1). À l'aide d'une pipette, transvaser 1 ml (5.3) de la solution dans un ballon jaugé de 10 ml (5.6), ajouter 100 µl (5.7) de la solution de tryptamine à 0,15 mM (7.1) et porter jusqu'au trait avec du méthanol (4.2.1). Mélanger par retournement.

NB: Stocker la solution de l'échantillon de référence à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse CLHP.

7.4. Préparation du réactif de dérivation

Peser 25,0 ± 0,1 mg d'OPA (4.3.4) dans un ballon jaugé de 10 ml (5.6), ajouter 0,5 ml (5.5) de méthanol (4.2.1) et mélanger soigneusement pour dissoudre l'OPA. Porter jusqu'à la marque avec une solution d'acide borique (4.3.2) et ajouter 20 µl de 2-mercaptoéthanol (4.3.3) à l'aide d'une seringue (5.7).

NB: Conserver le réactif de dérivation à 4 °C dans une fiole de verre sombre; celui-ci reste stable pendant une semaine.

7.5. Dosage par CLHP

7.5.1. Solvants d'élution (4.4)

Solvant A:

solution de phosphate de sodium dihydrogéné à 0,3 mM et d'acétate de sodium à 3 mM (réglée à un pH de 6,5 à l'aide d'acide acétique): de méthanol: de tétrahydrofurane = 558:440:2 (v/v/v)

Solvant B:

méthanol

7.5.2. Degré d'élution préconisé:

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Débit (ml/min)
Initial	40	60	0
0,1	40	60	0,1
5,0	40	60	0,1
6,0	40	60	1,0
6,5	40	60	1,0
9,0	36	64	1,0
10,0	20	80	1,0
11,5	16	84	1,0
12,0	16	84	1,0
16,0	10	90	1,0
19,0	0	100	1,0
20,0	0	100	1,0
21,0	40	60	1,0
29,0	40	60	1,0
30,0	40	60	0

NB: Le degré d'élution peut obliger à une légère modification en vue d'obtenir la résolution indiquée au schéma 1.

Température de la colonne: 30 °C

7.5.3. Volume d'injection: 50 µl de réactif de dérivation et 50 µl de la solution de l'échantillon.

7.5.4. Colonne d'équilibrage

En commençant l'expérience sur une base quotidienne, rincer la colonne à l'aide d'une solution de solvant B à 100 % pendant 15 minutes puis la régler selon la formule A : B = 40 : 60 et équilibrer à 1 ml/min pendant 15 minutes. Effectuer un passage à blanc par injection de méthanol (4.2.1).

NB: Avant conservation de longue durée, rincer la colonne à l'aide d'une solution de méthanol et de chloroforme dans la proportion de 80 : 20 (v/v) pendant 30 minutes.

7.5.5. Dosage des PS + PE dans l'échantillon à doser

7.5.6. Effectuer la série d'analyses chromatographiques sans modifier le temps de passage à passage afin d'obtenir des temps de rétention constants. Injecter la solution de référence externe (7.3) toutes les 5 à 10 solutions d'échantillon à doser afin d'évaluer le facteur de réponse.

NB: Nettoyer la colonne par rinçage à l'aide de solvant B à 100 % (7.5.1) pendant au moins 30 minutes tous les 20 à 25 passages.

7.6. Mode d'intégration

7.6.1. Pic PEDP

Eluer le PEDP sous forme d'un seul pic. Déterminer la surface de pic par intégration de vallée à vallée.

7.6.2. Pic de tryptamine

Eluer la tryptamine sous forme d'un pic unique (schéma 1). Déterminer la surface du pic par intégration de vallée à vallée.

7.6.3. Groupes de pics de PS et PE

Dans les conditions décrites (schéma 1), PS est élué sous forme de 2 pics en partie non résolus précédés d'un pic mineur. PE est élué sous forme de 3 pics en partie non résolus. Déterminer la surface totale de chaque grappe de pics en fixant la ligne de base comme indiqué au schéma 1.

8. Calcul et expression des résultats

Les teneurs en PS et PE de l'échantillon à doser sont calculées comme suit:

$$C = 55,36 \times \frac{A_2}{A_1} \times \frac{T_1}{T_2}$$

formule dans laquelle:

- C = la teneur en PS ou PE (mg/100 g de poudre de l'échantillon à doser)
 A₁ = surface de pic de PEDP de la solution de l'échantillon de référence (7.3)
 A₂ = surface de pic de PS ou PE de la solution de l'échantillon à doser (7.2)
 T₁ = surface de pic de la tryptamine de la solution de l'échantillon de référence (7.3)
 T₂ = surface de pic de la tryptamine de la solution de l'échantillon à doser (7.2).

9. Précision

NB: Les valeurs relatives à la répétabilité ont été calculées conformément à la norme internationale IDF ⁽¹⁾. La limite de reproductibilité provisoire a été calculée conformément à l'annexe III, point b.

9.1. Répétabilité

L'écart type relatif de la répétabilité, qui exprime la variabilité des résultats d'analyse indépendants obtenus par le même opérateur utilisant le même appareillage dans les mêmes conditions sur le même échantillon à doser, à intervalle court, ne devrait pas dépasser 2 % en valeur relative. Si deux dosages sont effectués dans ces conditions, la différence relative entre les deux résultats ne devrait pas dépasser 6 % de la moyenne arithmétique des résultats.

9.2. Reproductibilité

Si deux résultats sont obtenus par des opérateurs travaillant dans des laboratoires différents, utilisant des appareillages différents dans des conditions différentes pour l'analyse du même échantillon à doser, la différence relative entre les deux résultats ne devrait pas dépasser 11 % de la moyenne arithmétique des résultats.

10. Bibliographie

- 10.1. Resmini (P.), Pellegrino (L.), Hogenboom (J.A.), Sadini (V.), Rampilli (M.), «Détection des solides du babeurre dans le lait écrémé en poudre par dosage des aminophospholipides à la CLHP», Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39, 395 (1988).

⁽¹⁾ International IDF Standard 135B/1991. Milk and milk products. Precision characteristics of analytical methods. Outline of collaborative study procedure (schéma d'une méthode d'étude en collaboration).

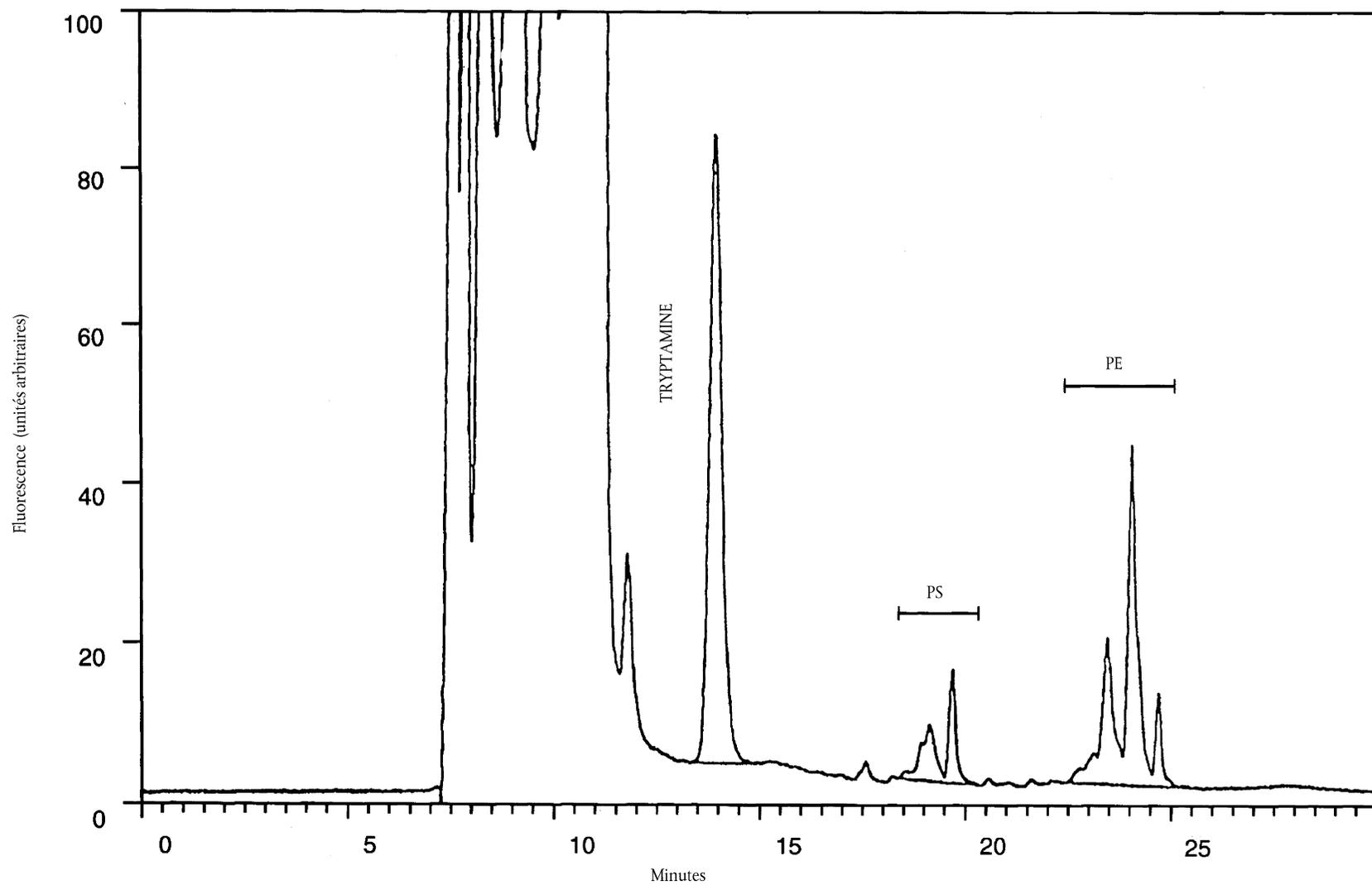


Schéma 1: Schéma CLHP des dérivés de l'OPA de la phosphatidylsérine (PS) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) contenus dans l'extrait méthanolé du lait écrémé en poudre reconstitué. Le mode d'intégration des pics de PS, PE et de la tryptamine (étalon interne) est indiqué.

ANNEXE XXI

(Article 15)

RECHERCHE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES ET DE SULFONAMIDES/DAPSON DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE

Un essai de dépistage d'un inhibiteur microbien à l'aide de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 en tant que micro-organisme d'essai, et d'une sensibilité suffisante pour déceler 4 µg de benzylpénicilline par litre de lait et 100 µg de sulfadimidine par litre de lait, est utilisé. Des nécessaires d'essai commerciaux sont disponibles et peuvent être utilisés s'ils présentent la sensibilité requise pour la benzylpénicilline et la sulfadimidine (¹).

Pour l'essai, utiliser du lait écrémé en poudre reconstitué (1 g de poudre + 9 ml d'eau distillée). Effectuer l'essai conformément à la procédure IDF (bulletin n° 258/1991, section 1 chapitre 2) ou conformément aux instructions du fabricant du nécessaire d'essai.

Interpréter comme suit les résultats positifs:

- 1) répéter l'essai en ajoutant de la pénicillinase au système d'essai:
résultat positif: la substance inhibitrice n'est pas identifiable par cette procédure,
résultat négatif: la substance inhibitrice est un antibiotique β-lactam;
- 2) répéter l'essai en ajoutant de l'acide p-aminobenzoïque au système d'essai:
résultat positif: la substance inhibitrice n'est pas identifiable par cette procédure,
résultat négatif: la substance inhibitrice est un sulfonamide/dapson;
- 3) répéter l'essai en ajoutant de la pénicillinase + de l'acide p-aminobenzoïque au système d'essai:
résultat positif: la substance inhibitrice n'est pas identifiable par cette procédure,
résultat négatif: les substances inhibitrices sont un antibiotique β-lactam et un sulfonamide/dapson.

⁽¹⁾ Note importante: Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus à l'analyse du lait écrémé en poudre. C'est pourquoi il est important de vérifier que le système d'essai utilisé ne donne pas de tels résultats.

ANNEXE XXII

(Article 16)

DÉTERMINATION DE LA QUANTITÉ DE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE PRÉSENT DANS LES ALIMENTS COMPOSÉS DES ANIMAUX, PAR COAGULATION ENZYMATIQUE DE LA PARACASÉINE**1. Objet**

Détermination de la quantité de lait écrémé en poudre présent dans un aliment composé des animaux par coagulation enzymatique de la paracaséine.

2. Domaine d'application

Cette méthode s'applique aux aliments composés des animaux contenant au moins 10 % de lait écrémé en poudre; la présence de quantités importantes de babeurre et/ou de certaines protéines non laitières peut provoquer des interférences.

3. Principe de la méthode

- 3.1. Solubilisation de la caséine contenue dans l'aliment composé des animaux par extraction avec une solution de citrate de sodium.
- 3.2. Rétablissement de la concentration en ions calcium nécessaire à la précipitation de la paracaséine; transformation de la caséine en paracaséine par l'action de la présure.
- 3.3. Détermination de l'azote de la paracaséine après minéralisation selon la méthode de Kjeldahl, visée dans la norme FIL 20 A 1986; calcul de la quantité de lait écrémé en poudre présente sur la base d'un contenu minimal en caséine de 27,5 % (voir point 9.1).

4. Réactifs

Les réactifs utilisés sont de pureté analytique. L'eau utilisée est de l'eau distillée ou de pureté équivalente. À l'exception de la présure (point 4.5), tous les réactifs et solutions employés devront être exempts de substances azotées.

- 4.1. Citrate trisodique dihydraté (solution à 1 % p/v)
- 4.2. Chlorure de calcium (solution 2M). Peser 20,018 g de CaCO_3 (pureté analytique) dans une capsule de porcelaine de dimension appropriée (150-200 ml) ou dans un becher. Couvrir d'eau distillée et transférer sur un bain-marie. Ajouter lentement 50 à 60 ml d'une solution de HCl (conc. HCl: eau = 1:1) pour dissoudre entièrement le carbonate. Maintenir au bain-marie jusqu'à déshydratation au CaCl_2 pour éliminer le HCl qui n'a pas réagi. Transférer avec de l'eau distillée dans un ballon jaugé de 100 ml et diluer jusqu'à la marque. Contrôler la valeur du pH qui ne doit pas être inférieure à 4,0. Conserver la solution dans un réfrigérateur.
- 4.3. Hydroxyde de sodium 0,1 N
- 4.4. Acide chlorhydrique 0,1 N
- 4.5. Solution de présure standardisée au 1:10 000 (extrait de caillette de veau). Conserver au réfrigérateur 4-6 °C
- 4.6. Réactifs pour le dosage de l'azote selon la méthode de Kjeldahl, visée dans la norme FIL 20 A 1986

5. Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

- 5.1. Mortier ou moulin homogénéisateur
- 5.2. Balance analytique
- 5.3. Centrifugeuse de table (2 000 à 3 000 tpm) équipée de tubes à centrifuger de 50 ml
- 5.4. Agitateur magnétique avec barreaux de 10 à 15 mm
- 5.5. Bechers de 150 à 200 ml
- 5.6. Matras de 250 ml et de 500 ml
- 5.7. Entonnoirs en verre d'un diamètre de 60-80 mm
- 5.8. Filtres circulaires exempts de cendres, à filtration rapide, d'un diamètre de 150 mm (S.S. 589² S.S. 595 1/2)
- 5.9. Pipettes de différentes tailles

- 5.10. Bain-marie réglé à 37 °C par thermostat
- 5.11. pH mètre
- 5.12. Minéralisateur et distillateur pour la méthode de Kjeldahl avec accessoires correspondants
- 5.13. Burette graduée de 25 ml pour tirage
- 5.14. Pissette en plastique pour eau distillée
- 5.15. Spatules en acier inoxydable
- 5.16. Thermomètre
- 5.17. Étuve à chaleur réglable

6. Mode opératoire

- 6.1. Préparation de l'échantillon

10-20 g de l'échantillon sont broyés dans un mortier ou agités en homogénéisateur mélangeur afin d'obtenir un mélange homogène.
- 6.2. Solubilisation de la poudre de lait et séparation du résidu insoluble
 - 6.2.1. Peser 1,000 ± 0,002 g d'aliment composé des animaux bien homogénéisé (6.1) directement dans un tube à centrifuger de 50 ml. Ajouter 30 ml de solution de citrate trisodique (4.1) préalablement réchauffée à 45 °C. Disperser la poudre par agitation magnétique pendant au moins 5 minutes.
 - 6.2.2. Centrifuger à 500 g (2 000 à 3 000 tpm) pendant 10 minutes et recueillir le surnageant aqueux dans un becher de 150-200 ml. Éviter la perte de particules insolubles pendant le transfert du surnageant.
 - 6.2.3. Procéder à deux autres extractions sur le résidu, en suivant le même mode opératoire et en mélangeant les trois extraits aqueux.
 - 6.2.4. Au cas où une remontée de matière grasse se produirait, refroidir jusqu'à solidification de la phase grasse qui sera ensuite enlevée à l'aide d'une spatule.
- 6.3. Coagulation de la caséine par les enzymes de la présure
 - 6.3.1. À l'extrait aqueux total (environ 100 ml) ajouter goutte à goutte, sous agitation, 3,4 ml d'une solution saturée de chlorure de calcium (4.2). Ajuster le pH à 6,4-6,5 avec des solutions diluées de NaOH (4.3) ou HCl (4.4). Placer la solution dans un bain thermostaté à 37 °C pendant 15 à 20 minutes pour permettre à l'équilibre salin de s'établir. Ceci se manifeste par l'apparition d'un aspect lactescent.
 - 6.3.2. Transférer le liquide dans un (ou deux) tube(s) à centrifuger et centrifuger à 2 000 g pendant 10 minutes afin d'éliminer le précipité. Transférer le surnageant, sans laver le sédiment, dans un (ou deux) tube(s) à centrifuger.
 - 6.3.3. Ramener la température du surnageant à 37 °C. Ajouter goutte-à-goutte à l'extrait, en remuant, 0,5 ml de présure liquide (4.5). La coagulation se forme en une ou deux minutes.
 - 6.3.4. Remettre l'échantillon au bain-marie et laisser à une température de 37 °C pendant 15 minutes. Enlever l'échantillon du bain et rompre le coagulum en agitant. Centrifuger à 2 000 g pendant 10 minutes. Filtrer le surnageant à l'aide d'un filtre approprié⁽¹⁾. (Whatman n° 541 ou équivalent) et conserver le filtre. Laver le sédiment dans le tube à centrifuger à l'aide de 50 ml d'eau à environ 35 °C en remuant le sédiment.

Centrifuger de nouveau à 2 000 g pendant 10 minutes. Filtrer le surnageant à travers le filtre conservé antérieurement.
- 6.4. Détermination de l'azote caséinique
 - 6.4.1. Après lavage, transférer quantitativement le sédiment dans le filtre conservé antérieurement (6.3.4) à l'aide d'eau distillée. Transférer le filtre dans le ballon Kjeldahl. Déterminer la teneur en azote selon la méthode Kjeldahl décrite dans la norme FIL 20 A 1986.

7. Essai à blanc

- 7.1. Effectuer systématiquement un essai à blanc en utilisant un filtre exempt de cendres (5.8) humecté à l'aide d'un mélange composé de 90 ml d'une solution citrate de sodium (4.1), 1 ml d'une solution saturée de chlorure de calcium (4.2), 0,5 ml de présure liquide (4.5), et lavé à l'aide de 3 × 15 ml d'eau avant d'être minéralisé selon la méthode Kjeldahl, visée dans la norme FIL 20 A 1986.
- 7.2. Déduire du volume d'acide (4.4) versé pour le tirage de l'échantillon examiné le volume nécessaire pour l'essai à blanc.

⁽¹⁾ Utiliser un papier exempt de cendre à filtrage rapide.

8. Essai de contrôle

- 8.1. En vue de contrôler le procédé analytique et les réactifs mentionnés ci-dessus, exécuter une détermination sur un aliment composé des animaux, de composition standard, dont la teneur en lait écrémé en poudre connue a été établie par une analyse circulaire. Le résultat moyen d'une détermination en double ne doit pas s'écarter de plus de 1 % de celui obtenu par l'analyse circulaire.

9. Expression des résultats

- 9.1. Le pourcentage de lait écrémé en poudre dans l'aliment composé se calcule selon la formule suivante:

$$\% \text{ MMP} = \frac{\left(\frac{N \times 6,38}{27,5} \times 100 \right) - 2,81}{0,908}$$

où N représente le pourcentage d'azote de la para-caséine, 27,5 est le facteur de conversion de la caséine déterminée en un pourcentage de lait écrémé en poudre, 2,81 et 0,908 sont des facteurs de correction obtenus par analyse de régression.

10. Précision de la méthode

10.1. Répétabilité

Dans au moins 95 % des cas étudiés, la différence entre deux résultats individuels, obtenus sur un même échantillon, dans le même laboratoire par le même opérateur, ne doit pas excéder 2,3 g de lait écrémé en poudre pour 100 g d'aliment composé des animaux examinés.

10.2. Reproductibilité

Dans au moins 95 % des cas étudiés, la différence entre les résultats obtenus par deux laboratoires sur un même échantillon ne doit pas dépasser 6,5 g de lait écrémé en 100 g d'aliment composé des animaux examinés.

11. Limite de tolérance

La valeur de CrD_{95} (différence critique; limite de confiance 95 %) se calcule selon la formule (ISO 5725):

$$CrD_{95} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{R^2 - r^2 \left(\frac{n-1}{n} \right)}$$

(R: reproductibilité; r: répétabilité)

Double détermination: $CrD_{95} = 4,5$ g

Lorsque le résultat de l'analyse chimique ne diffère pas de la teneur déclarée en lait écrémé en poudre de plus de 4,5 g (double détermination), le lot d'aliment composé est réputé conforme à la présente disposition du règlement.

12. Observations

- 12.1. L'addition d'un pourcentage important de certaines protéines non laitières, et notamment de celles de soja, pour autant qu'elles aient été chauffées avec le lait écrémé en poudre, entraîne des résultats trop élevés du fait de la coprécipitation de celles-ci avec la paracaséine du lait.
- 12.2. L'addition de babeurre peut entraîner parfois des chiffres trop bas, car la détermination ne porte que sur l'extrait dégraissé. L'addition de certains babeurre de crème acide peut donner des chiffres nettement plus faibles, car leur dissolution dans la solution de citrate est incomplète.
- 12.3. L'addition d'au moins 0,5 % de lécithine peut également entraîner des résultats trop faibles.
- 12.4. L'incorporation de lait en poudre chauffé à haute température (*high-heat*) peut donner des valeurs trop élevées, du fait de la coprécipitation de certaines protéines du lactosérum avec la paracaséine du lait.

ANNEXE XXIII

(Article 17)

DÉTERMINATION QUALITATIVE DE L'AMIDON DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE, LE LAIT EN POUDRE DÉNATURÉ ET LES ALIMENTS COMPOSÉS**1. Domaine d'application**

La présente méthode s'applique à la détection de l'amidon utilisé comme traceur dans les poudres de lait dénaturées. Le seuil de détection de la méthode est de 0,05 g d'amidon environ par 100 g d'échantillon.

2. Principe

La réaction est basée sur celle qui est utilisée dans l'iodométrie:

- fixation par les colloïdes de l'iode libre dans une solution aqueuse,
- absorption par les micelles de l'amidon et formation de couleur.

3. Réactif

3.1. Solution iodée:

- iode: 1 g,
- iodure de potassium: 2 g,
- eau distillée: 100 ml.

4. Appareillage

- 4.1. Balance analytique
- 4.2. Bain-marie
- 4.3. Tubes à essais, 25 × 200 mm

5. Mode opératoire

Peser 1 g d'échantillon et transférer dans un tube à essais (point 4.3).
Ajouter 20 ml d'eau distillée et agiter pour disperser l'échantillon.
Placer dans le bain-marie bouillant (point 4.2) pendant 5 minutes.
Retirer du bain-marie et laisser refroidir à température ambiante.
Ajouter 0,5 ml de la solution iodée (point 3.1); agiter et observer la couleur obtenue.

6. Expression des résultats

Une coloration bleue indique la présence d'amidon natif dans l'échantillon.
Lorsque l'échantillon contient de l'amidon modifié, la couleur ne doit pas être bleue.

7. Remarques

La couleur, l'intensité de la couleur et l'aspect microscopique de l'amidon varient selon l'origine de l'amidon natif (par exemple: maïs ou pomme de terre) et selon le type d'amidon modifié présent dans l'échantillon.

En présence d'amidons modifiés, la couleur obtenue vire au violet, au rouge ou au brun, suivant le degré de modification de la structure cristalline de l'amidon natif.

ANNEXE XXIV

(Article 18)

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN HUMIDITÉ DU BABEURRE ACIDE EN POWDRE**1. Objet**

Déterminer la teneur en humidité du babeurre à base de crème acide en poudre destiné à être utilisé dans les aliments pour animaux.

2. Principe

La prise d'essai est soumise à la dessiccation sous vide. La perte de masse est déterminée par pesée.

3. Appareillage

- 3.1. Balance analytique
- 3.2. Récipients secs en métal résistant à la corrosion ou en verre munis de couvercles à fermeture étanche; surface utile permettant d'obtenir une répartition de la prise d'essai de 0,3 g par cm²
- 3.3. Étuve à vide électrique réglable pourvue d'une pompe à huile et d'un mécanisme d'introduction d'air sec chaud ou d'un agent déshydratant (par exemple: oxyde de calcium)
- 3.4. Dessiccateur doté d'un déshydratant efficace
- 3.5. Étuve à dessiccation ventilée et contrôlée par thermostat, température réglée à 102 ± 2 °C

4. Procédure

Chauffer un récipient (point 3.2) et son couvercle dans l'étuve (point 3.5) pendant une heure au minimum. Placer le couvercle sur le récipient, transférer immédiatement le récipient dans un dessiccateur (point 3.4), l'y laisser refroidir jusqu'à la température ambiante et peser à 0,5 mg près.

Tarer, à 0,5 mg près, un récipient (point 3.2) muni de son couvercle. Peser, à 1 mg près, dans le récipient taré environ 5 g de l'échantillon et répartir uniformément la prise d'essai. Placer le récipient dans l'étuve à vide (point 3.3) préalablement chauffée à 83 °C, le couvercle étant enlevé. Pour éviter que la température de l'étuve ne descende trop, introduire le récipient en un temps minimal.

Amener la pression à 100 torrs (13,3 kPa) et laisser sécher à cette pression durant quatre heures, soit sous un courant d'air sec et chaud, soit à l'aide d'un déshydratant (300 g environ pour vingt échantillons). Dans ce dernier cas, couper la connexion avec la pompe à vide lorsque la pression prescrite est atteinte. Compter la durée de séchage à partir du moment où l'étuve a atteint à nouveau la température de 83 °C. Ramener ensuite avec précaution l'étuve à la pression atmosphérique. Ouvrir l'étuve, couvrir immédiatement le récipient de son couvercle, retirer le récipient de l'étuve, laisser refroidir durant 30 à 45 minutes dans le dessiccateur (point 3.4) et peser à 1 mg près. Procéder à une dessiccation complémentaire de 30 minutes dans l'étuve à vide (point 3.3) à la température de 83 °C et peser à nouveau. L'écart entre les deux pesées ne doit pas excéder 0,1 % d'humidité.

5. Calcul

$$(E - m) \cdot \frac{100}{E}$$

où

E = la masse initiale, en grammes de la prise d'essai;

m = la masse, en grammes, de la prise d'essai sèche.

6. Précision**6.1. Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées dans l'intervalle le plus court possible, par un seul opérateur utilisant le même appareillage, sur du matériel d'essai identique, ne doit pas dépasser 0,4 g d'eau pour 100 g du babeurre acide en poudre.

6.2. *Reproductibilité*

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées par des opérateurs dans des laboratoires différents utilisant des appareillages différents, sur du matériel d'essai identique, ne doit pas dépasser 0,6 g d'eau pour 100 g du babeurre acide en poudre.

6.3. *Source de données de précision*

Les données de précision ont été déterminées à partir d'une expérience menée en 1995 dans huit laboratoires et concernant douze échantillons (six en double aveugle).

ANNEXE XXV

(Article 19)

MÉTHODE DE RÉFÉRENCE DE DÉTECTION DES MATIÈRES GRASSES ÉTRANGÈRES DANS LES MATIÈRES GRASSES LACTIQUES PAR ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE DES TRIGLYCÉRIDES — RÉVISION 1**1. Objet et champ d'application**

La présente norme définit une méthode de détection des matières grasses étrangères, végétales comme animales, telles que la graisse de bœuf et le saindoux, dans les matières grasses lactiques du lait et des produits laitiers au moyen de l'analyse chromatographique en phase gazeuse des triglycérides.

À l'aide de formules de triglycérides définies, une analyse quantitative des graisses végétales et animales est effectuée dans les matières grasses lactiques pures, indépendamment des conditions d'administration ou de lactation.

Note 1: Bien que l'acide butyrique (C 4), présent exclusivement dans les matières grasses lactiques, permette d'effectuer des estimations quantitatives de petites et moyennes quantités de matières grasses lactiques dans les graisses végétales, des informations qualitatives et quantitatives ne peuvent guère être fournies dans l'intervalle d'un ajout d'au moins jusqu'à 20 % de matières grasses étrangères aux matières grasses lactiques pures en raison de la grande variation de C 4, qui va approximativement de 3,5 % à 4,5 %.

Note 2: Des résultats quantitatifs ne peuvent pratiquement être obtenus que par des analyses des triglycérides parce que la teneur en stérols des graisses végétales varie selon les conditions de production et de traitement.

2. Notion

Matières grasses étrangères dans les matières grasses lactiques: les matières grasses étrangères définies dans la présente norme sont l'ensemble des graisses végétales et animales, à l'exception des matières grasses lactiques.

3. Principe de la méthode

Après extraction des matières grasses lactiques, une solution mère est préparée. À partir de cette solution, les triglycérides (nombres totaux de carbones) sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse sur colonnes à garnissage. En insérant le pourcentage du poids des molécules de matières grasses de différentes tailles (C24 — C54 — uniquement nombres pairs) dans la formule de triglycérides, une analyse qualitative ou quantitative des matières grasses étrangères peut être effectuée.

Note: Moyennant respect de la procédure décrite ci-dessus, la méthode de la chromatographie en phase gazeuse avec colonnes capillaires peut être utilisée si des résultats comparables sont garantis ⁽¹⁾.

4. Réactifs

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique.

- 4.1. Gaz vecteur: azote, degré de pureté $\geq 99,996$ %
- 4.2. Triglycérides de référence ⁽²⁾, saturés et cholestérol pour l'adoption comme référence d'une matière grasse conformément au point 6.5.4.
- 4.3. Méthanol, sans eau
- 4.4. n-Hexane
- 4.5. n-Heptane
- 4.6. Toluène
- 4.7. Solution de diméthylchlorosilane: 50 ml de diméthylchlorosilane sont dissous dans 283 ml de toluène
- 4.8. Gaz combustible: hydrogène et air synthétique
- 4.9. Phase stationnaire, 3 % OV-1 sur 125/150 μm (100/120 mesh) de Gas ChromQ ⁽³⁾
- 4.10. Solution de beurre de cacao à 10 %

5. Appareillage

Appareillage de laboratoire normal, et en particulier les appareils suivants:

- 5.1. Chromatographe en phase gazeuse à haute température, adapté à des températures d'au moins 400 à 450 °C, équipé d'un détecteur d'ionisation à flamme (DIF) et d'un régulateur de débit à masse constante pour le gaz vecteur. Gaz de combustion: 30 ml d'H₂, par minute, 270 ml d'air synthétique par minute.

⁽¹⁾ Des méthodes adéquates ont déjà été décrites. Voir D. Precht et J. Molkentin: Quantitative tryglyceride analysis using short capillary columns, Chrompack News 4 16-17 (1993).

⁽²⁾ Des produits adéquats sont disponibles dans le commerce.

⁽³⁾ Des marques telles que Extrelut, GasChromQ, Chrompack sont des exemples de produits adéquats disponibles dans le commerce spécialisé. Cette information est fournie à titre purement indicatif. Le grain est indiqué en pm (unité SI), conformément à la norme britannique BS 410: 1988 «British Standard Specification for test sieves».

Compte tenu du débit élevé du gaz vecteur, le jet de flamme devrait être particulièrement grand.

Note: en raison des températures élevées au cours des analyses des triglycérides, les inserts de verre dans le détecteur d'ionisation à flamme ou dans le système d'injection doivent être fréquemment nettoyés.

Le chromatographe en phase gazeuse doit être équipé de septums résistant à des températures élevées, qui peuvent être fréquemment utilisés et qui présentent généralement un faible degré «d'écoulement».

Note: Les septums Chromblue (tm) (Chrompack) sont appropriés.

Les septums doivent être remplacés à intervalles réguliers, par exemple après environ 100 injections ou dès que la résolution se détériore (voir schéma 4).

5.2. Colonne de chromatographie

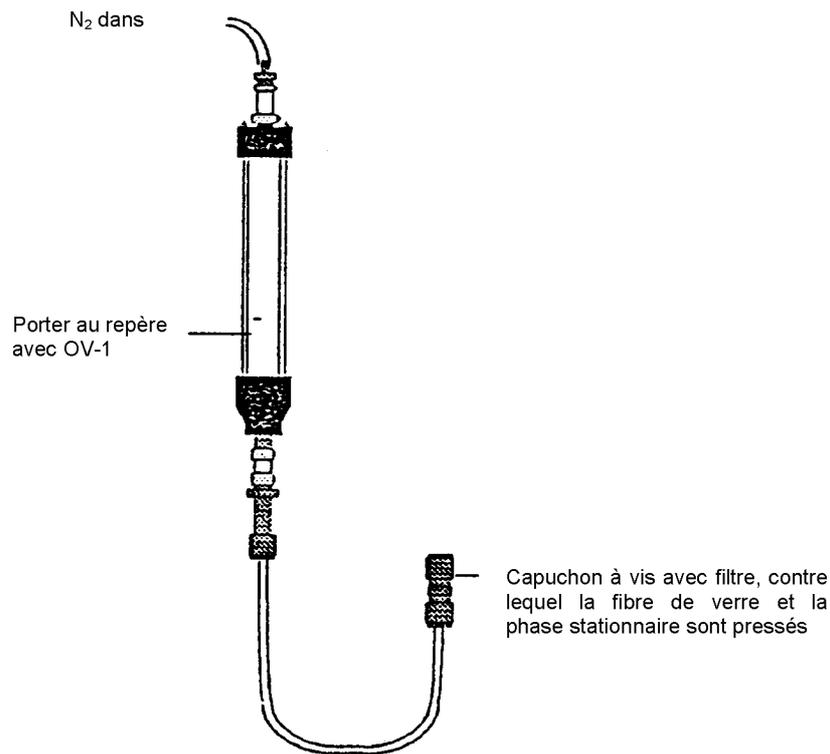
Colonne de verre en forme de U (de 2 mm de diamètre intérieur et de 500 mm de long), qu'il convient d'abord de silaniser conformément au point 6.1 avec du diméthylchlorosilane, afin de désactiver la surface de verre.

Note: Des colonnes à garnissage un peu plus longues (de 800 à 2 000 mm de long) sont également appropriées. Elles permettent d'obtenir une reproductibilité des résultats légèrement meilleure. En revanche, la phase stationnaire présente parfois des fractures après emploi, qui peuvent entraîner, à leur tour, des résultats quantitatifs plus mauvais. En outre, la flamme du détecteur d'ionisation à flamme s'éteint facilement parce que le débit exigé du gaz vecteur est extrêmement élevé (de 75 à 85 ml/min.)

5.3. Dispositif de remplissage de la colonne (voir schéma 1)

Schéma 1

Remplissage de la colonne



Colonne de verre à remplir

- 5.3.1. Colonne de plastique avec capuchons vissés qui comporte un repère indiquant jusqu'où la quantité exigée de phase stationnaire peut être versée
- 5.3.2. Tamis (taille des mailles environ 100 μm) avec capuchon à vis, permettant de fermer hermétiquement la colonne de verre conformément au schéma 1
- 5.3.3. Laine de verre silanisée, désactivée
- 5.3.4. Vibreur pour une distribution uniforme de la phase stationnaire au cours du remplissage
- 5.4. 1 à 3 ml de colonne d'Extrelut⁽¹⁾ avec silicagel. Cette colonne peut être utilisée alternativement pour l'extraction en vue de l'obtention des matières grasses lactiques.

⁽¹⁾ Voir note de bas de page 3 de la page 86.

- 5.5. Joint de graphite de 6,4 mm (1/4") avec 6 mm de diamètre intérieur
- 5.6. Dispositifs pour silaniser la surface de verre de la colonne (point 6.1)
 - 5.6.1. Flacon de Woulff
 - 5.6.2. Pompe d'extraction d'eau
- 5.7. Bain-marie, réglable à (50 ± 2) °C
- 5.8. Armoire de dessiccation, réglable à (50 ± 2) °C et à (100 ± 2) °C
- 5.9. Pipette graduée en microlitres
- 5.10. Pipette graduée de 5 ml pour le dosage de 1,5 ml de méthanol
- 5.11. Fiole à fond rond de 50 ml
- 5.12. Fiole d'Erlenmeyer, volume nominal 50 ml
- 5.13. Entonnoir
- 5.14. Filtre à micropores
- 5.15. Évaporateur rotatif
- 5.16. Ampoules au volume nominal de 1 ml, pouvant se fermer avec un capuchon en aluminium, muni d'un septum à l'intérieur
- 5.17. Seringue à injection (le piston de la seringue utilisée ne doit pas toucher le bout de l'aiguille)

Note: De telles seringues permettent une meilleure reproductibilité des résultats.

Pour éviter que le septum ne se détériore, il est souhaitable de contrôler régulièrement la pointe de l'aiguille (par exemple avec un stéréomicroscope).

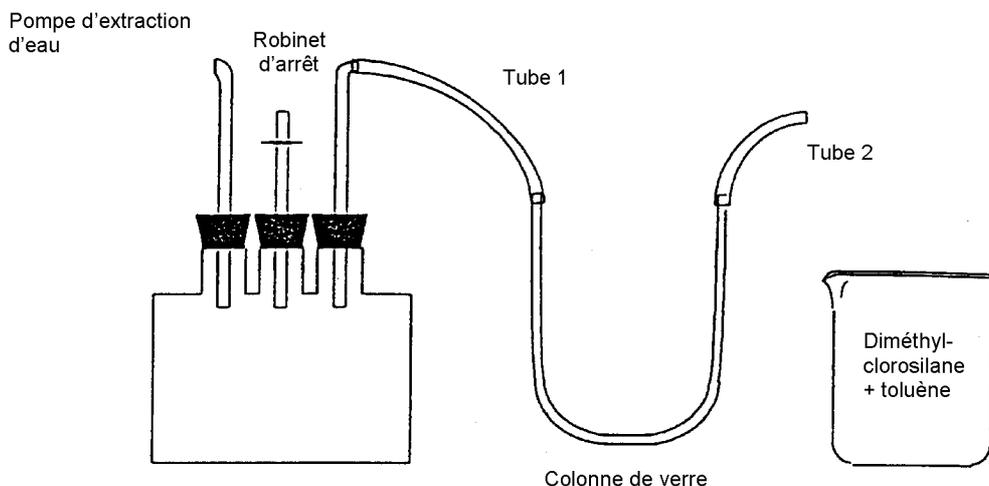
6. Procédure

6.1. Préparation de la colonne (silanisation)

Après raccordement du flacon de Woulff à la pompe d'extraction d'eau, comme indiqué au schéma 2, le tube 2 est plongé dans la solution visée au point 4.7. En fermant le robinet d'arrêt, la colonne est remplie; ensuite, les deux tubes sont enlevés.

Schéma 2

Dispositif de silanisation



La colonne est fixée sur un support et complètement remplie avec la solution de diméthylchlorosilane au moyen d'une pipette.

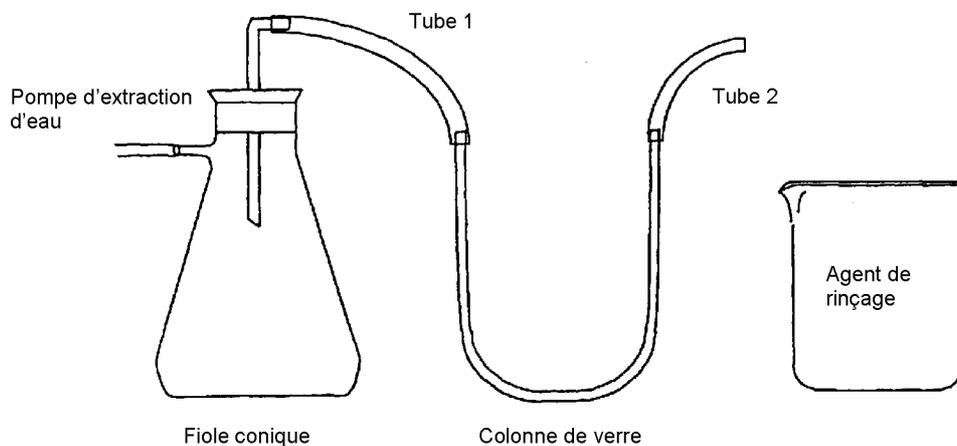
Après 20 à 30 min, le flacon de Woulff est remplacé par une fiole conique et la colonne vidée en étant raccordée à la pompe d'extraction d'eau (voir schéma 3).

6.2. Remplissage de la colonne

Des rinçages successifs sont effectués avec 75 ml de toluène et 50 ml de méthanol; ensuite, la colonne vidée est séchée dans l'armoire de dessiccation à 100 °C pendant environ 30 min.

Schéma 3

Dispositif de rinçage



Le remplissage de la colonne est effectué conformément au schéma 1. La phase stationnaire visée au point 4.9 est versée dans la colonne de plastique jusqu'au repère.

L'extrémité inférieure de la colonne de verre à remplir est munie d'un tampon de laine de verre d'environ 1 cm de long, préalablement silanisé et introduit à l'aide d'une baguette métallique. Ensuite, l'extrémité de la colonne est fermée avec le tamis (point 5.3.2).

La colonne est remplie sous pression (3 bar, à l'azote) avec la phase stationnaire. Pour obtenir un garnissage uniforme, continu et compact, un vibreur est actionné de haut en bas dans la colonne de verre au cours du remplissage. Après le remplissage, un tampon solide de laine de verre silanisé est introduit dans l'autre extrémité de la colonne remplie. Les extrémités qui dépassent sont coupées et le tampon est tassé sur quelques millimètres à l'intérieur de la colonne avec une spatule.

6.3. Préparation des échantillons

Pour la préparation des échantillons, une des trois méthodes suivantes est utilisée.

6.3.1. Isolation des matières grasses lactiques du beurre

5 à 10 g de beurre sont fondus dans un récipient adéquat au bain-marie (point 5.7), à 50 °C.

Une fiole d'Erlenmeyer de 50 ml et un entonnoir avec filtre inséré (point 5.14) sont chauffés dans l'armoire de dessiccation à 50 °C. La couche de matières grasses de l'échantillon de beurre fondu est filtrée à l'aide du dispositif préchauffé.

De telles matières grasses lactiques sont presque exemptes de phospholipides.

6.3.2. Extraction de la fraction de matières grasses conformément à la méthode de Röse-Gottlieb

L'extraction est effectuée conformément à la norme FIL 1C: 1987, 16C: 1987, 116A: 1987 ou 22 B: 1987.

Avec de telles matières grasses lactiques, les phospholipides permettent d'obtenir un pic de cholestérol accru d'environ 0,1 %.

L'influence sur le spectre de triglycérides standardisé à 100 avec le cholestérol est négligeable.

6.3.3. Extraction du lait au moyen des colonnes de silicagel

On introduit dans une colonne d'Extrelut de 3 ml, avec une pipette graduée en microlitres (5.4), 0,7 ml d'un échantillon de lait porté à la température de 20 °C, qu'on laisse se répartir uniformément sur le silicagel pendant environ 5 min.

Pour dénaturer les complexes protéines-lipides, on ajoute 1,5 ml de méthanol avec la pipette. Ensuite, l'échantillon est extrait avec 20 ml de n-hexane. Le n-hexane est lentement ajouté par petites quantités et le solvant qui s'égoutte est recueilli dans une fiole à fond rond de 50 ml, préalablement séchée jusqu'à stabilisation de son poids.

Après extraction, on laisse la colonne s'écouler jusqu'à ce qu'elle soit vide.

À partir de l'éluat, les solvants sont éliminés par distillation sur un évaporateur rotatif à une température au bain-marie de 40 à 50 °C.

La fiole est séchée et la matière grasse récoltée pesée.

Note: Les extractions de matières grasses selon Gerber, Weibull-Berntrop, Schmid-Bondzynski-Ratzlaff ou l'isolation des matières grasses au moyen de détergents (méthode BDI) ne conviennent pas à l'analyse des triglycérides parce que, avec ces méthodes, des quantités plus ou moins grandes de glycérides ou de phospholipides partiels peuvent passer dans la phase de matières grasses.

6.4. Préparation de la solution d'échantillon

Pour la chromatographie en phase gazeuse, on utilise une solution à 5 % des matières grasses dans du n-heptane (6.3). Pour préparer cette solution d'échantillon, une certaine quantité de l'échantillon obtenu conformément aux points 6.3.1 et 6.3.2 est pesée et dissoute dans une quantité correspondante de n-heptane.

Avec la préparation de l'échantillon conformément au point 6.3.3, la quantité de n-heptane à ajouter à l'échantillon dans la fiole est calculée sur la base de la pesée et le reste est dissous dedans.

Environ 1 ml de la solution d'échantillon est versé dans une ampoule (point 5.16).

6.5. Analyse chromatographique des triglycérides

Avec des températures élevées allant jusqu'à 350 °C pour éluer les triglycérides C52 et C56 à longue chaîne, il se produit facilement un relèvement de la ligne de base, en particulier si les colonnes n'ont pas été adéquatement conditionnées au début. Ce relèvement de la ligne de base à des températures élevées peut être évité complètement, soit par la combinaison de deux colonnes soit par soustraction de la ligne de base.

Avec le mode compensateur ou le fonctionnement avec des colonnes uniques, ainsi que pour les inserts de verre dans l'injecteur et dans le détecteur, il convient d'utiliser les joints de graphite (point 5.5).

6.5.1. Correction de la ligne de base

Pour éviter un relèvement de la ligne de base, une des quatre méthodes suivantes est utilisée.

6.5.1.1. Combinaison de colonnes

Deux colonnes à garnissage sont utilisées en mode compensateur.

6.5.1.2. Correction de la ligne de base par le chromatographe en phase gazeuse

On peut éviter un relèvement de la ligne de base en faisant fonctionner le chromatographe sans y injecter de solution de matières grasses et en soustrayant ensuite la ligne de base enregistrée.

6.5.1.3. Correction de la ligne de base par logiciel d'intégration

On peut éviter un relèvement de la ligne de base en faisant fonctionner le système d'intégration sans y injecter de solution de matières grasses et en soustrayant ensuite la ligne de base enregistrée.

6.5.1.4. Correction de la ligne de base par conditionnement adéquat

Si le conditionnement initial de la colonne est adéquat et qu'environ 20 injections sont effectuées avec des solutions de matières grasses lactiques, un relèvement de la ligne de base à des températures élevées est souvent si faible qu'il n'est pas nécessaire de corriger celle-ci.

6.5.2. Technique d'injection

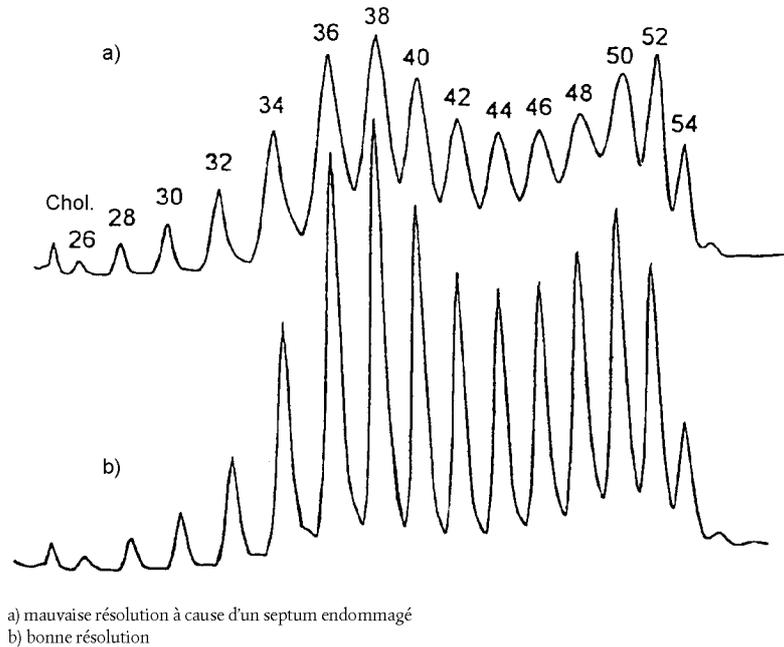
Pour éviter des effets de discrimination, la technique «d'injection chaude» est appliquée pour obtenir de meilleurs résultats quantitatifs avec les composants de triglycérides à point d'ébullition élevé. Dans ce cas, la solution de matières grasses est aspirée dans la seringue et l'aiguille froide de la seringue chauffée préalablement à l'injection pendant environ 3 secondes dans la tête de l'injecteur. Ensuite, le contenu de la seringue est rapidement injecté.

Note: Avec cette technique d'injection, le risque de fractionnement à l'intérieur de la seringue ou du bloc d'injection est réduit. Une injection directe «on column» dans la partie supérieure, élargie, chauffée de la colonne n'est pas effectuée parce que les fragments du septum, qui s'accumulent à cet endroit, et les contaminations peuvent facilement être éliminés avec la technique utilisée en remplaçant régulièrement un insert de l'injecteur sans démonter la colonne.

Il faut absolument éviter que la pointe de l'aiguille ne se courbe en touchant le fond du becher de l'échantillon (même si c'est à peine visible à l'œil nu), afin de ne pas endommager le septum.

Schéma 4

Chromatogramme de triglycérides d'un échantillon de matières grasses lactiques



6.5.3. Conditionnement d'une colonne à garnissage

Au cours des phases a) à c), l'extrémité supérieure de la colonne n'est pas reliée au détecteur pour éviter toute contamination.

Les colonnes remplies conformément au point 6.2 sont conditionnées comme suit:

- débit N_2 à 50 °C de 40 ml/min pendant 15 min;
- amener à la température de 355 °C à raison de 1 K/min sous 10 ml N_2 /min;
- maintenir à 355 °C pendant 12 à 15 heures;
- effectuer 2 injections de 1 μ l de la solution de beurre de cacao (point 4.10) et programmer à la température adéquate;
- effectuer 20 injections de 0,5 μ l d'une solution de matières grasses lactiques pendant 2 à 3 jours (point 6.4).

Note: Le beurre de cacao est constitué presque exclusivement de triglycérides C50 à C56 à point d'ébullition élevé. L'injection avec du beurre de cacao a pour objectif un conditionnement spécial dans cet intervalle à longue chaîne. Avec les triglycérides C50 à C54 à point d'ébullition élevé, les coefficients de réponse peuvent aller jusqu'à 1,20. En principe, avec une injection répétée d'une solution de matières grasses lactiques, il faut s'attendre à une réduction des coefficients de réponse initialement élevés pour C50 à C54. Avec des triglycérides présentant un faible indice d'acyle-c, les coefficients avoisinent 1.

Trois paires de colonnes remplies conformément au point 6.2 sont séparées. Les paires conditionnées sont vérifiées, respectivement, au moyen d'une analyse des matières grasses lactiques pour analyse de routine. La paire qui présente les meilleurs résultats quantitatifs (coefficients de réponse atteignant presque 1) est retenue. Dans les cas où les coefficients de réponse dépassent 1,20, la colonne n'est pas utilisée.

6.5.4. Étalonnage

Pour l'étalonnage, les coefficients de réponse des triglycérides correspondants, ainsi que du cholestérol d'une matière grasse lactique (matière grasse de référence) devraient être déterminés à l'aide des triglycérides de référence (au moins les triglycérides saturés C24, C30, C36, C42, C48 et C54, ainsi que le cholestérol; de préférence, ajouter encore C50 et C52). Des coefficients de réponse intermédiaires peuvent être trouvés par interpolation mathématique.

Deux à trois étalonnages doivent être effectués tous les jours au moyen de la matière grasse de référence. Si les résultats obtenus sont presque identiques, des résultats quantitatifs facilement reproductibles sont atteints avec l'analyse des triglycérides des échantillons.

Les matières grasses lactiques de référence peuvent être conservées pendant plusieurs mois à une température de -18 °C au maximum et donc être utilisées comme références.

Note: Le facteur de réponse de chaque constituant peut également être déterminé en utilisant une matière grasse de référence dont la composition en triglycérides est certifiée, telle que le CRM 519 (matière grasse lactique anhydre) mise en vente par l'«Institut de Matériaux de Référence et de Mesures» à Geel/Belgique.

6.5.5. Programme de température, gaz vecteur et autres conditions applicables à l'analyse des triglycérides

Programme de température: régler la température initiale de la colonne à 210 °C, maintenir pendant 1 min, puis porter à 350 °C, en programmant une élévation de la température de 6 °C par minute, et maintenir à cette température finale pendant 5 min.

Température du détecteur et de l'injecteur: 370 °C

Note: Les températures du détecteur, de l'injecteur et du four (température initiale) devraient être maintenues à un niveau constant (y compris pendant la nuit, les week-ends et les vacances).

Gaz vecteur: azote, débit 40 ml/min

Note: Dans les cas où des colonnes de 80 cm sont utilisées, le débit doit être d'au moins 75 ml d' N_2 par min. Le débit du gaz vecteur doit être maintenu constant (y compris pendant la nuit, les week-ends et les vacances). Le débit exact du gaz vecteur doit être ajusté de manière que, indépendamment de la longueur de la colonne, C54 soit élué à 341 °C.

Durée de l'analyse : 29,3 min

Volume d'injection : 0,5 μ l

Note: La seringue doit être rincée plusieurs fois avec de l'heptane pur après chaque injection.

Conditions DIF: voir point 5.1

Note: Le détecteur d'ionisation à flamme est allumé, respectivement, au début de chaque journée de travail.

7. Intégration, évaluation et contrôle des conditions de mesurage

Les triglycérides ayant un indice impair d'acyle-c ($2n + 1$) sont combinés avec le triglycéride précédant à l'indice pair ($2n$). Les faibles teneurs en C56, moins reproductibles, ne sont pas prises en considération. Les triglycérides restants (surface de pic) dans le chromatogramme, y compris le cholestérol (pic proche de C24), sont multipliés par les coefficients de réponse respectifs des matières grasses de référence (dernier étalonnage) et, ensemble, normalisés à 100. Outre le cholestérol libre, les triglycérides C24, C26, C28, C30, C32, C34, C36, C38, C40, C42, C44, C46, C48, C50, C52 et C54 sont donc évalués. Les résultats sont donnés en % poids (g/100 g).

L'évaluation des pics du chromatogramme devrait être effectuée avec un intégrateur, avec lequel la ligne de base peut être tracée. Une réintégration avec des paramètres d'intégration optimisés devrait être possible.

Les schémas 5 et 6 fournissent deux exemples de chromatogrammes de triglycérides. Le schéma 5 montre un chromatogramme qui peut être bien évalué, tandis que le schéma 6 représente une erreur sporadique dans l'intervalle C50 à C54, le tracé de la ligne de base étant incorrect par rapport à celui du schéma 5. De telles erreurs typiques peuvent être détectées avec un haut degré de certitude et ne peuvent être évitées que par l'utilisation d'un intégrateur avec lequel la ligne de base est tracée.

Schéma 5

Chromatogramme facile à évaluer des triglycérides d'une matière grasse lactique avec ligne de base tracée

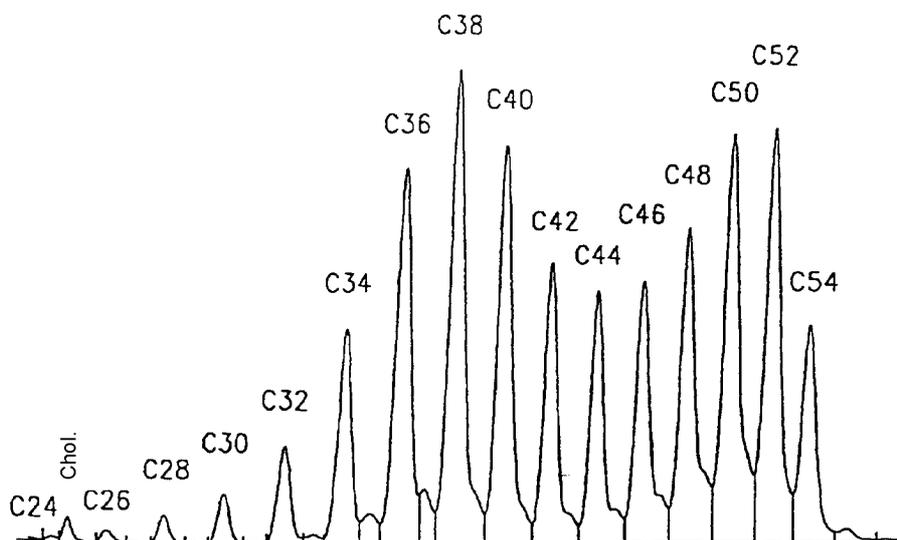
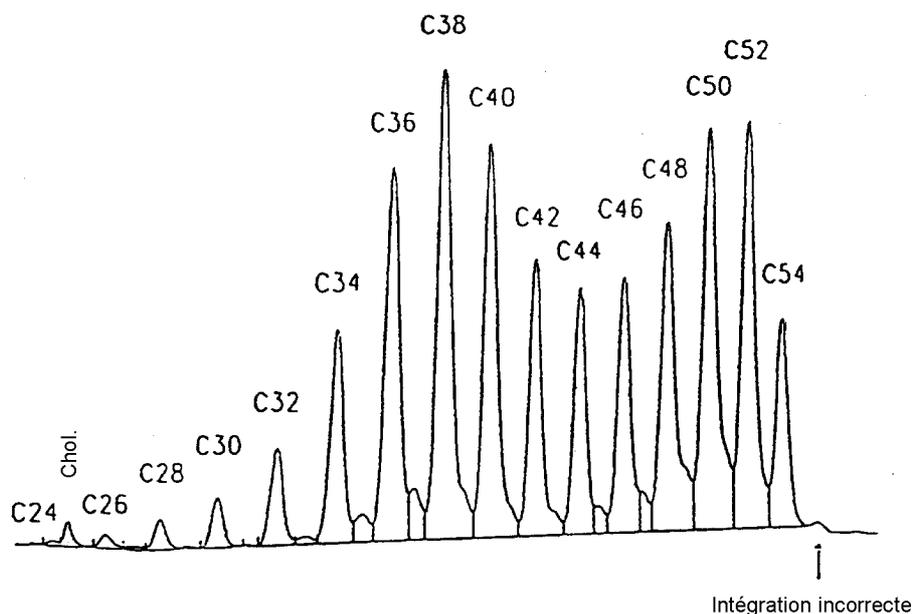


Schéma 6

Chromatogramme de matières grasses lactiques incorrectement intégré



Pour contrôler les conditions de mesure, on peut utiliser les écart types relatifs (RSD: coefficient de variation $\times 100$) présentés au tableau 1 pour les différents triglycérides. Ils ont été calculés à partir de 19 analyses consécutives de la même matière grasse lactique.

Tableau 1

Écart types relatifs (RSD) des teneurs en triglycérides (n = 19)

Tryglycéride	RSD (%)
C24	10,00
C26	2,69
C28	3,03
C30	1,76
C32	1,03
C34	0,79
C36	0,25
C38	0,42
C40	0,20
C42	0,26
C44	0,34
C46	0,37
C48	0,53
C50	0,38
C52	0,54
C54	0,60

Lorsque les RSD sont nettement supérieurs aux valeurs du tableau 1, les conditions chromatographiques ne sont pas appropriées et les septa ou encore le débit du gaz vecteur doivent être vérifiés. De plus, de petites particules de septum peuvent avoir formé des dépôts sur la laine de verre en tête de colonne ou c'est la colonne qui n'est pas utilisable à cause de son vieillissement, de l'influence de la température, etc. (voir figure 3).

Note: Les valeurs données dans le tableau 1 n'ont pas de caractère obligatoire et donneront simplement une orientation pour le contrôle qualité. Quand on accepte des RSD plus élevés, il faut tout de même respecter les limites de répétabilité et reproductibilité données au point 11.

8. Détection qualitative des matières grasses étrangères

Pour la détection des matières grasses étrangères, des formules de triglycérides (tableau 2) avec des limites 5 (tableau 3) ont été établies, dans lesquelles les valeurs 5 des matières grasses lactiques pures peuvent fluctuer. Dans les cas où ces limites sont dépassées, on peut supposer qu'une matière grasse étrangère est présente.

La formule la plus efficace pour la détection d'ajouts de saindoux, par exemple, est la suivante:

$$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S$$

Note: En utilisant 755 échantillons différents de matières grasses lactiques, l'intervalle de confiance s'établit à 99 % entre $S = 97,96$ et $102,04$ pour les échantillons de matières grasses lactiques pures. L'écart type est de $0,39897$ pour toutes les valeurs S .

En partant de la composition des triglycérides d'un échantillon de matières grasses inconnu autorisée par une formule, sans utiliser d'ordinateur, pour vérifier simplement si la somme des teneurs en triglycérides énoncées avec les coefficients correspondants sort de l'intervalle $97,96 - 102,04$, on a très probablement affaire à un ajout de matières grasses.

Pour détecter différentes matières grasses étrangères, le tableau 2 indique différentes formules de triglycérides. Pour la détection de l'huile de soja, de l'huile de tournesol, de l'huile d'olive, de l'huile de colza, de l'huile de lin, de l'huile de germe de blé, de l'huile de germe de maïs, de l'huile de coton et de l'huile de poisson hydrogénée, pour les graisses végétales de coco et de palmiste, ainsi que pour l'huile de palme et la graisse de bœuf, une formule commune peut être utilisée.

Étant donné que la composition des triglycérides des matières grasses étrangères peut également fluctuer, jusqu'à 4 données différentes, mesurées expérimentalement, concernant les triglycérides des matières grasses étrangères d'un même type ont été utilisées. [Avec les mêmes types de matières grasses étrangères, la limite la moins favorable a été prise en considération (voir tableau 4)].

Avec la «formule totale» suivante, de bons résultats peuvent similairement être obtenus pour toutes les matières étrangères:

$$- 2,7575 \cdot C26 + 6,4077 \cdot C28 + 5,5437 \cdot C30 - 15,3247 \cdot C32 + 6,2600 \cdot C34 + 8,0108 \cdot C40 - 5,0336 \cdot C42 + 0,6356 \cdot C44 + 6,0171 \cdot C46 = S$$

Les calculs de détection de combinaisons de matières grasses étrangères dans les matières grasses lactiques ont révélé que, par exemple, bien que, avec la formule du saindoux indiquée au tableau 2, la limite applicable à cette matière grasse étrangère soit faible (2,7 %), d'autres matières grasses, telles que la graisse de coco, l'huile de palme ou la graisse de palmiste, avec des limites de détection respectives de 26,8 %, 12,5 % et 19,3 %, peuvent, avec cette formule, uniquement être détectées si des quantités extrêmement importantes ont été ajoutées aux matières grasses lactiques. Cette observation s'applique également à d'autres formules du tableau 2.

Tableau 2

Formules de triglycérides pour la détection de diverses matières grasses étrangères dans les matières grasses lactiques, indiquant les écarts types pour les valeurs S

Formule applicable à l'huile de soja, de tournesol, d'olive, de colza, de lin, de germe de blé, de germe de maïs, de graines de coton et de poisson

$$2,0983 \cdot C30 + 0,7288 \cdot C34 + 0,6927 \cdot C36 + 0,6353 \cdot C38 + 3,7452 \cdot C40 - 1,2929 \cdot C42 + 1,3544 \cdot C44 + 1,7013 \cdot C46 + 2,5283 \cdot C50 = S; SD = 0,38157$$

Formule applicable à la graisse de coco et de palmiste

$$3,7453 \cdot C32 + 1,1134 \cdot C36 + 1,3648 \cdot C38 + 2,1544 \cdot C42 + 0,4273 \cdot C44 + 0,5809 \cdot C46 + 1,2926 \cdot C48 + 1,0306 \cdot C50 + 0,9953 \cdot C52 + 1,2396 \cdot C54 = S; SD = 0,11323$$

Formule applicable à l'huile de palme et à la graisse de bœuf

$$3,6644 \cdot C28 + 5,2297 \cdot C30 - 12,5073 \cdot C32 + 4,4285 \cdot C34 - 0,2010 \cdot C36 + 1,2791 \cdot C38 + 6,7433 \cdot C40 - 4,2714 \cdot C42 + 6,3739 \cdot C46 = S; SD = 0,81094$$

Formule applicable au saindoux

$$6,5125 \cdot C26 + 1,2052 \cdot C32 + 1,7336 \cdot C34 + 1,7557 \cdot C36 + 2,2325 \cdot C42 + 2,8006 \cdot C46 + 2,5432 \cdot C52 + 0,9892 \cdot C54 = S; SD = 0,39897$$

Pour contrôler un échantillon de matières grasses inconnu, toutes les formules indiquées au tableau 2 et la formule totale (2) doivent donc être utilisées si l'échantillon est susceptible d'être un mélange de matières grasses lactiques et d'une des 14 différentes matières grasses étrangères ou une combinaison de ces matières grasses étrangères. Dans les cas où, en insérant les triglycérides d'un échantillon de matières grasses à analyser, une valeur S est obtenue qui sort des intervalles du tableau 3 d'une seule des 5 formules, l'échantillon est très probablement une matière grasse lactique modifiée. La détection d'une matière grasse étrangère dans une matière grasse lactique au moyen d'une des 4 formules du tableau 2 ne permet pas de tirer de conclusion sur le type de matière grasse étrangère incorporée.

Tableau 3

Limites S applicables aux matières grasses lactiques

Matières grasses détectées	Intervale S
Huile de soja, de tournesol, d'olive, de colza, de lin, de germe de blé, de germe de maïs, de coton, de poisson	98,05 — 101,95
Graisses de coco et de palmiste	99,42 — 100,58
Huile de palme et graisse de bœuf	95,90 — 104,10
Saindoux	97,96 — 102,04
Formule totale	95,68 — 104,32

Le tableau 4 indique les limites de détection des différentes matières grasses étrangères avec un intervalle de confiance de 99 %. La première colonne indique les limites de détection minimales pour les meilleures formules de matières grasses lactiques du tableau 2. Dans la seconde colonne, ce sont les limites de détection applicables à la formule totale qui sont indiquées. Bien que les limites soient quelque peu supérieures, seule cette formule-là est nécessaire pour détecter des quantités légèrement plus importantes de matières grasses étrangères. Toutes les formules permettent également de détecter des combinaisons de différentes matières grasses étrangères. Les intervalles de variation des triglycérides de différentes matières grasses étrangères d'un même type n'ont pas une grande influence sur les limites de détection.

Tableau 4

Limites de détection établies avec un intervalle de confiance de 99 % par ajout de matières grasses étrangères aux matières grasses lactiques (en pourcentage)

	Formule individuelle	Formule totale
Huile de soja	2,1	4,4
Huile de tournesol	2,3	4,8
Huile d'olive	2,4	4,7
Graisse de coco	3,5	4,3
Huile de palme	4,4	4,7
Graisse de palmiste	4,6	5,9
Huile de colza	2,0	4,4
Huile de lin	2,0	4,0
Huile de germe de blé	2,7	6,4
Huile de germe de maïs	2,2	4,5
Huile de coton	3,3	4,4
Saindoux	2,7	4,7
Graisse de boeuf	5,2	5,4
Huile de poisson hydrogénée	5,4	6,1

Note: Les intervalles S sont calculés de manière qu'une matière grasse étrangère n'est supposée présente que si les limites des formules individuelles sont dépassées (voir tableau 4).

9. Détermination quantitative des matières grasses étrangères

Pour obtenir des informations quantitatives sur la concentration en matières grasses étrangères d'un échantillon de matières grasses lactiques, on utilise la formule suivante:

$$X (\%) = 100 \cdot | (100 - S)(3)/(100 - S_p) |,$$

X est la quantité d'une matière grasse étrangère inconnue ou d'un mélange de matières grasses étrangères dans une matière grasse lactique inconnue. S résulte de l'ajout d'une matière grasse étrangère inconnue par l'insertion des triglycérides du mélange de matières grasses étrangères ou de matières grasses lactiques dans la formule totale de triglycérides précitée. Si une matière grasse étrangère inconnue est ajoutée à la matière grasse lactique, la valeur S moyenne des différentes matières grasses étrangères pour la formule totale est retenue pour S_p ; cette valeur S moyenne est obtenue en insérant les données relatives aux triglycérides des matières grasses étrangères pures dans cette formule et en calculant une valeur moyenne ($S_p = 7,46$). De bons résultats quantitatifs concernant les ajouts de matières grasses lactiques sont également obtenus avec la formule applicable à l'huile de palme ou à la graisse de bœuf (tableau 2) et une valeur moyenne S_p de 10,57.

En ce qui concerne les types de matières grasses étrangères connus, les valeurs S_p suivantes doivent être insérées dans la formule précitée et la formule appropriée du tableau 2 doit être retenue.

Tableau 5

Valeurs S_F de diverses matières grasses étrangères

Matières grasses étrangères	S_F
Huile de soja	8,18
Huile de tournesol	9,43
Huile d'olive	12,75
Graisse de coco	118,13
Huile de palme	7,55
Huile de palmiste	112,32
Huile de colza	3,30
Huile de lin	4,44
Huile de germe de blé	27,45
Huile de germe de maïs	9,29
Huile de coton	41,18
Saindoux	177,55
Graisse de bœuf	17,56
Huile de poisson	64,12

10. Champ d'application de la méthode de détection

La méthode décrite s'applique aux laits en vrac et est fondée sur la représentativité des échantillons de matières grasses lactiques.

Une détection hautement spécifique serait possible si, pour un nombre représentatif de matières grasses lactiques, des formules comme celles qui sont décrites ci-dessus étaient extrapolées pour différents pays.

Des possibilités de détection particulièrement appropriées pourraient être obtenues si, dans les formules des différents pays, on établissait un nombre représentatif d'échantillons de matières grasses lactiques. Dans ce cas, l'utilisation de programmes informatiques complexes n'est pas nécessaire si les combinaisons de triglycérides utilisées dans le tableau 2 sont appliquées et que les coefficients sont redéterminés par la méthode des moindres carrés.

En appliquant les intervalles S indiqués dans le tableau 3, dans des conditions d'alimentation particulières comme une sous-alimentation ou l'administration à des vaches de levure pour animaux ou de sels de Ca, les formules sont généralement applicables. Ce n'est que dans des situations exceptionnelles (par exemple en cas d'administration importante d'huiles alimentaires pures ou de sels de Ca combinés à des graisses alimentaires), que les formules indiquent en partie des matières grasses lactiques modifiées.

Note: Les matières grasses lactiques fractionnées sont généralement considérées comme des matières grasses non modifiées. Une modification n'est supposée exister que si les limites sont dépassées. Ce n'est qu'avec des matières grasses lactiques fractionnées ayant une composition en matières grasses lactiques inhabituelle, comme c'est le cas, par exemple, avec une fraction dure, obtenue avec fractionnement par des méthodes physiques à des températures élevées d'environ 30 °C avec de faibles rendements de quelques points de pourcentage ou avec fractionnement à CO₂ supercritique, que les formules indiquent une modification.

Cependant, le fractionnement des matières grasses lactiques peut être détecté par d'autres procédés, par exemple par analyse calorimétrique différentielle.

11. Précision de la méthode

Déterminée au moyen des matières grasses lactiques sur la base des formules du tableau 2 et des intervalles S du tableau 3.

11.1. Répétabilité

Établie par la différence des valeurs S de deux déterminations effectuées dans l'intervalle de temps le plus court possible par un opérateur utilisant les mêmes procédés et des échantillons identiques dans les mêmes conditions (même personne, même appareillage, même laboratoire)

Tableau 6

Limites de répétabilité (r) pour les différentes formules

Matières grasses détectées	r
Huile de soja, de tournesol, d'olive, de colza, de lin, de germe de blé, de germe de maïs, de coton, de poisson	0,67
Graisse de coco et de palmiste	0,12
Huile de palme et graisse de bœuf	1,20
Saindoux	0,58
Formule totale	1,49

11.2. *Reproductibilité*

Établie par la différence des valeurs S de deux déterminations effectuées par des opérateurs dans différents laboratoires, selon le même procédé, avec des échantillons identiques, dans des conditions différentes (différentes personnes, appareillages différents), à différents moments.

Tableau 7

Limites de reproductibilité (R) pour les différentes formules

Matières grasses détectées	R
Huile de soja, de tournesol, d'olive, de colza, de lin, de germe de blé, de germe de maïs, de coton, de poisson	1,08
Graisse de coco et de palmiste	0,40
Huile de palme et graisse de bœuf	1,81
Saindoux	0,60
Formule totale	2,07

11.3. *Différence critique*

Avec les limites de répétabilité (r) et de reproductibilité (R), les différences critiques peuvent être calculées pour tous les intervalles S du tableau 3 (contre-analyses). Les valeurs respectives sont indiquées dans le tableau 8.

Tableau 8

Différences critiques pour toutes les formules de triglycérides

Matières grasses détectées	Intervalle
Huile de soja, de tournesol, d'olive, de colza, de lin, de germe de blé, de germe de maïs, de coton, de poisson	97,43 — 102,57
Graisse de coco et de palmiste	99,14 — 100,86
Huile de palme et graisse de bœuf	94,91 — 105,09
Saindoux	97,65 — 102,35
Formule totale	94,58 — 105,42

11.4. *Acceptabilité des résultats*

Toutes les teneurs en triglycérides étalonnées, arrondies à la deuxième décimale, de C24, C26, C28 à C54, ainsi que le cholestérol doivent être normalisés exactement à 100.

Les résultats de la contre-analyse sont utilisés pour contrôler la répétabilité. Si la différence absolue entre les deux résultats S pour l'ensemble des 5 formules de triglycérides ne dépasse pas les limites de répétabilité r du tableau 6, l'exigence de répétabilité est satisfaite.

Pour assurer des conditions de chromatographie en phase gazeuse optimales, et notamment une qualité optimale de la colonne, il faut veiller à ce que, avec 10 cycles de fonctionnement, la différence entre les valeurs S maximales et minimales de l'ensemble des 5 formules de triglycérides ne dépasse pas l'intervalle $x \cdot r$ ($x = 1,58$) (pour 10 cycles de fonctionnement, voir ouvrage de référence 16) et les limites de répétabilité r pour les différentes formules du tableau 6.

12. **Normes citées**

DIN 10 336: 1994	Nachweis und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse
Norme FIL 1C: 1987	Milk. Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method
Norme FIL 16C: 1987	Cream. Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method
Norme FIL 116A: 1987	Milk-Based Edible Ices and Ice Mixes. Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method
Norme FIL 22B: 1987	Skimmed Milk, Whey & Buttermilk. Determination of Fat Content — Röse Gottlieb Gravimetric Method

13. **Références**

1. Commission des Communautés européennes: *Detection of foreign fats in milk fat by means of gas chromatographic triglyceride analysis*, doc. n°s VI/5202/90-EN, VI/2645/91.
2. Commission des Communautés européennes: *Control of butter fat purity of 100 different samples of different feeding periods from 11 EEC countries*, doc. n° VI/4577/93.
3. Commission des Communautés européennes: *Consideration of results from the first, second, third, fourth, fifth and sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat*, doc n°s VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI/3842/92, VI/5317/92, VI/4604/93.
4. Timms, R. E.: *Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats*. Dairy Research 4 72 95-303 (1980).
5. Precht, D., Heine, K.: *Nachweis von modifiziertem Milchfett mit der Triglyceridanalyse. 2. Fremdfettnachweis im Milchfett mit Hilfe von Triglyceridkombinationen* 41 406-410 (1986).
6. Luf, W., Stock, A., Brandl, E.: *Zum Nachweis von Fremdfett in Milchfett über die Triglyceridanalyse*. Österr. Milchwirtsch. Wissensch. Beilage 5, 42 20-35 (1987).
7. Precht, D.: *Bestimmung von pflanzlichen Fetten oder tierischen Depotfetten in Milchfett*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 143-157 (1989).
8. Precht, D.: *Schnelle Extraktion von Milchfett*, Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 119-128 (1990).
9. Precht, D.: *Schnelle gaschromatographische Triglyceridanalyse von Milchfett*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 42 139-154 (1990).
10. Precht, D.: *Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis*. Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 43 (3) 219-242 (1991).
11. Precht, D.: *Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analysis*. Fat Sci. Technol. 93 538-544 (1991).
12. Precht, D.: *Detection for foreign fat in milk fat. I. Qualitative detection by triacylglycerol formulae. II. Quantitative evaluation of foreign fat mixtures*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194 1-8, 107-114 (1992).
13. Precht, D.: *Gas chromatography of triacylglycerols and other lipids on packed columns* i CRC Handbook of Chromatography: Analysis of Lipids, p. 123-138, Ed. K.D. Mukherjee, N. Weber, J. Sherma, CRC Press, Boca Raton (1993).
14. Precht, D., Molkenin, J.: *Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns*, Chrompack News 4 16-17 (1993).
15. Molkenin, J., Precht, D.: *Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat*. Chromatographia 39 (5/6) 265-270 (1994).
16. Stange, K.: *Angewandte Statistik, Erster Teil, Eindimensionale Probleme*, Springer-Verlag, Berlin, p. 378 (1970).

ANNEXE XXVI

LISTE DES RÈGLEMENTS VISÉS AU CONSIDÉRANT PREMIER

- Règlement (CEE) n° 1216/68 de la Commission du 9 août 1968 déterminant la méthode de constatation de la teneur en lactose des aliments composés pour animaux importés en provenance des pays tiers ⁽¹⁾, modifié par le règlement (CEE) n° 222/88 de la Commission du 22 décembre 1987 modifiant certains actes dans le secteur du lait et des produits laitiers suite à l'instauration de la nomenclature combinée ⁽²⁾,
- Règlement (CEE) n° 3942/92 de la Commission du 22 décembre 1992 établissant une méthode de référence pour la détermination du sitostérol et du stigmastérol dans le butteroil ⁽³⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 175/1999 de la Commission modifiant les règlements (CEE) n° 3942/92, (CE) n° 86/94, (CE) n° 1082/96 et (CE) n° 1459/98 établissant des méthodes de référence pour la détermination de certains traceurs dans le beurre, le butteroil et la crème ⁽⁴⁾,
- Règlement (CE) n° 86/94 de la Commission du 19 janvier 1994 établissant une méthode de référence pour la détermination du sitostérol et du stigmastérol dans le beurre ⁽⁵⁾, modifié par le règlement (CE) n° 175/1999,
- Règlement (CE) n° 2721/95 de la Commission du 24 novembre 1995 fixant les règles d'application de méthodes de référence et de routine à utiliser pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers conformément à l'organisation commune des marchés ⁽⁶⁾,
- Règlement (CE) n° 1080/96 de la Commission du 14 juin 1996 établissant une méthode de référence pour la détection des coliformes dans le beurre, le lait écrémé en poudre, la caséine et les caséinates ⁽⁷⁾,
- Règlement (CE) n° 1081/96 de la Commission du 14 juin 1996 établissant une méthode de référence pour la détection de lait de vache et de caséinates dans les fromages à base de lait de brebis, de lait de chèvre ou de lait de bufflonne ou de mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne et abrogeant le règlement (CEE) n° 690/92 ⁽⁸⁾,
- Règlement (CE) n° 1082/96 de la Commission du 14 juin 1996 portant établissement d'une méthode de référence pour déterminer la quantité d'esther éthylique de l'acide β -apo-8'-caroténique dans le beurre concentré et le beurre ⁽⁹⁾, modifié par le règlement (CE) n° 175/1999,
- Règlement (CE) n° 1854/96 de la Commission du 26 septembre 1996 établissant une liste des méthodes de référence à appliquer à l'analyse et à l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers conformément à l'organisation commune des marchés ⁽¹⁰⁾, modifié par le règlement (CE) n° 881/1999 ⁽¹¹⁾,
- Règlement (CE) n° 880/98 de la Commission du 24 avril 1998 établissant une liste des méthodes de référence pour la détermination des teneurs du beurre en eau, en matières sèches non grasses et en matières grasses ⁽¹²⁾,
- Règlement (CE) n° 1459/98 de la Commission du 8 juillet 1998 établissant une méthode de référence pour la détermination de la vanilline dans le beurre concentré, dans le beurre et dans la crème ⁽¹³⁾, modifié par le règlement (CE) n° 175/1999.

⁽¹⁾ JO L 198 du 10.8.1968, p. 13.
⁽²⁾ JO L 28 du 1.2.1988, p. 1.
⁽³⁾ JO L 399 du 31.12.1992, p. 29.
⁽⁴⁾ JO L 20 du 27.1.1999, p. 22.
⁽⁵⁾ JO L 17 du 20.1.1994, p. 7.
⁽⁶⁾ JO L 283 du 25.11.1995, p. 7.
⁽⁷⁾ JO L 142 du 15.6.1996, p. 13.
⁽⁸⁾ JO L 142 du 15.6.1996, p. 15.
⁽⁹⁾ JO L 142 du 15.6.1996, p. 26.
⁽¹⁰⁾ JO L 246 du 27.9.1996, p. 5.
⁽¹¹⁾ JO L 111 du 29.4.1999, p. 24.
⁽¹²⁾ JO L 124 du 25.4.1998, p. 16.
⁽¹³⁾ JO L 193 du 9.7.1998, p. 16.