I

(Actes pris en application des traités CE/Euratom dont la publication est obligatoire)

RÈGLEMENTS

RÈGLEMENT (CE) Nº 273/2008 DE LA COMMISSION

du 5 mars 2008

portant modalités d'application du règlement (CE) nº 1255/1999 du Conseil en ce qui concerne les méthodes à utiliser pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu le règlement (CE) nº 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 4,

considérant ce qui suit:

(1) Le règlement (CE) nº 213/2001 de la Commission [2] fixe les modalités d'application du règlement (CE) nº 1255/1999 du Conseil en ce qui concerne les méthodes à utiliser pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers. À la lumière des progrès techniques réalisés dans le domaine des méthodes d'analyse, il convient d'effectuer d'autres modifications substantielles. Par souci de clarté et d'efficacité, et compte tenu du nombre et du caractère technique des modifications nécessaires, il est opportun d'abroger le règlement (CE) nº 213/2001 et de le remplacer par un nouveau règlement.

(2) Il importe de vérifier les caractéristiques de composition et de qualité du lait et des produits laitiers établies dans le cadre des régimes prévus par le règlement (CE) nº 1255/1999 pour garantir qu'elles sont strictement conformes aux exigences fixées.

(3) Les méthodes de référence à appliquer pour ces vérifications sont souvent des méthodes publiées par des organismes internationaux tels que le Comité européen de normalisation (CEN), la Fédération internationale de laiterie (FIL), l'Organisation internationale de normalisation (ISO) et l'Association scientifique garante de l'excellence des méthodes analytiques (AOAC International) et régulièrement mises à jour par ces organismes. Dans certains cas, une méthode de référence communautaire est établie, alors que dans d'autres, 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 une liste des méthodes de référence et de donner à la Commission les moyens d'adapter la liste si nécessaire.

(4) Il n'y a pas lieu d'exclure l'application de méthodes de routine, raison pour laquelle il importe de spécifier les conditions minimales de leur utilisation.

(5) Afin d'assurer une pratique uniforme pour l'évaluation des résultats des analyses, il convient également d'établir des procédures 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 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 est donc nécessaire de définir au niveau communautaire des méthodes qui ont été validées conformément aux règles établies internationalement et qu'il convient d'appliquer en tant que méthodes de référence.

(7) Le règlement (CE) nº 1898/2005 de la Commission [3] fixe les modalités d'application du règlement (CE) nº 1255/1999 du Conseil en ce qui concerne les mesures d'écoulement sur le marché communautaire pour la crème, le beurre et le beurre concentré, et prévoit des outils de traçage de la crème, du beurre et du beurre concentré dans certaines circonstances, afin de veiller à une utilisation finale correcte de ces produits. Le traçage est indispensable au bon fonctionnement de ce programme. Pour garantir l'égalité de traitement entre les opérateurs participants, il convient de fixer des méthodes communes pour déterminer certains de ces traceurs.

[1] JO L 160 du 26.6.1999, p. 48. Règlement modifié en dernier lieu par le règlement (CE) nº 1152/2007 (JO L 258 du 4.10.2007, p. 3). Le règlement (CE) nº 1255/1999 sera remplacé par le règlement (CE) nº 1234/2007 (JO L 299 du 16.11.2007, p. 1) à compter du 1er juillet 2008.

[2] JO L 37 du 7.2.2001, p. 1.

[3] JO L 308 du 25.11.2005, p. 1. Règlement modifié en dernier lieu par le règlement (CE) nº 1546/2007 (JO L 337 du 21.12.2007, p. 68).

(8) 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) nº 1255/1999. Une restitution spéciale peut être octroyée pour les mêmes produits au titre de l'article 31 dudit 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 que du lait de vache n'a pas été incorporé 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, sous réserve que celles-ci soient conformes à certains critères.

(9) Le règlement (CEE) nº 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 [1] prévoit que l'absence de coliformes doit être recherchée. Les méthodes de référence internationalement reconnues pour la recherche de coliformes dans le lait et les produits laitiers relèvent de la norme ISO 4831. Une méthode de référence communautaire pour la recherche des coliformes fondée sur ladite norme a donc été établie.

(10) Le règlement (CEE) nº 2658/87 du Conseil du 23 juillet 1987 relatif à la nomenclature tarifaire et statistique et au tarif douanier commun [2] 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 pour l'analyse de la teneur en lactose une méthode généralement reconnue et obligatoire pour tous les États membres.

(11) Le règlement (CE) nº 1255/1999 prévoit que certaines exigences 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 du respect desdites exigences.

(12) Certaines méthodes sont introduites pour la première fois dans le présent règlement. Il importe de prévoir à compter de la date d'entrée en vigueur du présent règlement un délai suffisant pour permettre aux laboratoires d'assurer une introduction et une utilisation correctes de ces méthodes. À chaque fois qu'une méthode de référence visée à l'annexe I est révisée puis publiée par l'organisme de normalisation compétent, il convient d'accorder aux laboratoires une période de six mois pour mettre à jour leurs procédures d'analyse conformément à la nouvelle norme.

(13) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité de gestion du lait et des produits laitiers,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

CHAPITRE I

DISPOSITIONS GÉNÉRALES

Article premier

Objet et champ d'application

1. Le présent règlement fixe certaines méthodes de référence pour l'analyse chimique, physique et microbiologique et pour l'évaluation sensorielle du lait et des produits laitiers, à utiliser 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) nº 1255/1999, ainsi que les règles relatives à l'application de ces méthodes.

2. La liste des méthodes de référence applicables aux analyses visées au paragraphe 1 figure à l'annexe I du présent règlement.

3. La Commission met à jour ladite liste conformément à la procédure prévue à l'article 42 du règlement (CE) nº 1255/1999.

Article 2

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. Il convient de tenir compte du biais constant, de la répétabilité et de la reproductibilité pour comparer les résultats.

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

Les États membres informent la Commission du recours aux méthodes de routine dans le cadre de l'analyse visée à l'article 1er.

CHAPITRE II

MÉTHODES D'ANALYSE

Article 3

Évaluation de la conformité d'un lot avec la limite réglementaire

Sauf en ce qui concerne l'analyse des traceurs, l'annexe II du présent règlement s'applique pour définir la conformité avec les exigences légales en matière de composition.

[1] JO L 279 du 11.10.1990, p. 22. Règlement modifié en dernier lieu par le règlement (CE) nº 1487/2006 (JO L 278 du 10.10.2006, p. 8).

[2] JO L 256 du 7.9.1987, p. 1. Règlement modifié en dernier lieu par le règlement (CE) nº 1352/2007 de la Commission (JO L 303 du 21.11.2007, p. 3).

Article 4

Évaluation sensorielle

1. En ce qui concerne le lait et les produits laitiers autres que le beurre destiné au stockage public, 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 procédures de l'annexe III sont appliquées pour la vérification du travail des évaluateurs et la fiabilité des résultats dans les analyses sensorielles.

2. Pour le beurre destiné au stockage public, les procédures de l'annexe III sont appliquées pour la vérification du travail des évaluateurs et la fiabilité des résultats dans les analyses sensorielles.

La méthode décrite à l'annexe IV est appliquée comme méthode de référence pour l'évaluation sensorielle.

Article 5

Traceurs

1. La méthode d'analyse décrite à l'annexe V s'applique comme méthode de référence pour la détermination de la teneur du beurre, du butteroil et de la crème en triglycérides de l'acide énanthique.

2. La méthode d'analyse décrite à l'annexe VI s'applique comme méthode de référence pour la détermination de la vanilline dans le beurre concentré, dans le beurre ou dans la crème.

3. La méthode d'analyse décrite à l'annexe VII s'applique comme méthode de référence pour la détermination de la teneur du beurre concentré ou du beurre en ester éthylique de l'acide β-apo-8'-caroténique.

4. La méthode d'analyse décrite à l'annexe VIII s'applique comme méthode de référence pour la détermination de la teneur du beurre et du beurre concentré en β-sitostérol ou en stigmastérol.

5. Le beurre concentré, le beurre ou la crème sont réputés avoir été tracés conformément à la réglementation communautaire adoptée en la matière si les résultats obtenus correspondent aux spécifications des points 10 et 11 de l'annexe V et du point 8 des annexes VI, VII et VIII.

Article 6

Détection de la caséine de lait de vache

1. La méthode d'analyse de référence figurant à l'annexe IX est appliquée pour garantir l'absence de caséine de lait de vache dans le fromage produit exclusivement à partir du lait de brebis, du lait de chèvre ou du lait de bufflonne ou à partir d'un mélange de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne.

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

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 maximale est de 0,5 %;

b) il n'y a pas de résultats faux positifs; et

c) la caséine de lait de vache est 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.

Les méthodes de référence de l'annexe IX s'appliquent si une seule des exigences susmentionnées n'est pas satisfaite.

Article 7

Détection des coliformes

La recherche de coliformes dans le beurre, le lait écrémé en poudre, la caséine et les caséinates est effectuée conformément à la méthode de référence décrite à l'annexe X.

Article 8

Détermination de la teneur en lactose

La teneur en lactose des produits relevant du code NC 2309 est déterminée conformément à la méthode de référence décrite à l'annexe XI.

Article 9

Détection du lactosérum présure

1. La recherche de lactosérum présure dans le lait écrémé en poudre destiné au stockage public est effectuée conformément à la méthode de référence décrite à l'annexe XII.

2. La recherche de lactosérum présure dans le lait écrémé en poudre et les mélanges destinés à l'alimentation animale est effectuée conformément à la méthode de référence décrite en annexe XII. C'est l'annexe XIII qui doit être appliquée en cas de détection de lactosérum présure.

Article 10

Détection du babeurre

La recherche de babeurre dans le lait écrémé en poudre est effectuée conformément à la méthode de référence décrite à l'annexe XIV.

Article 11

Détection des résidus antimicrobiotiques

La recherche de résidus antimicrobiotiques dans le lait écrémé en poudre est effectuée conformément à la méthode de référence décrite à l'annexe XV.

Article 12

Détermination de la teneur en lait écrémé en poudre

La teneur en lait écrémé en poudre des aliments composés pour animaux est déterminée conformément à la méthode de référence décrite à l'annexe XVI.

Article 13

Détection de l'amidon

La recherche de l'amidon dans le lait écrémé en poudre, dans le lait en poudre dénaturé et dans les aliments composés pour animaux est effectuée conformément à la méthode de référence décrite à l'annexe XVII.

Article 14

Détermination de la teneur en humidité de la crème déshydratée

La teneur en humidité de la crème déshydratée est déterminée conformément à la méthode de référence décrite à l'annexe XVIII.

Article 15

Détermination de la teneur en humidité du babeurre acide en poudre

La teneur en humidité du babeurre acide en poudre destiné aux aliments pour animaux est déterminée conformément à la méthode de référence décrite à l'annexe XIX.

Article 16

Détermination de la pureté des matières grasses lactiques

La pureté des matières grasses lactiques est déterminée conformément à la méthode de référence décrite à l'annexe XX.

CHAPITRE III

DISPOSITIONS GÉNÉRALES ET FINALES

Article 17

Assurance qualité

Les analyses sont effectuées dans des laboratoires qui disposent d'un système d'assurance qualité appliqué aux analyses et incluant des procédures de contrôle interne de la qualité. Les laboratoires non agréés se prêtent au moins une fois par an à des essais d'aptitude dont les résultats ne s'écartent pas de plus de $2\sigma_R$ (écart-type de reproductibilité de la méthode de référence) de la valeur de consensus. Une description détaillée des systèmes appliqués doit être disponible dans le laboratoire.

Sont dispensés d'essais d'aptitude les laboratoires agréés conformément aux normes visées à l'article 12 du règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux [1].

Article 18

Échantillonnage et contestation des résultats d'analyses

1. L'échantillonnage est effectué conformément à la réglementation applicable au produit concerné. Si l'échantillonnage ne fait l'objet d'aucune disposition particulière, il convient d'appliquer les dispositions de la norme ISO 707 | IDF 50, Lait et produits laitiers — Lignes directrices pour l'échantillonnage.

2. Les rapports de laboratoire sur les résultats de l'analyse contiennent des éléments suffisants pour permettre une évaluation des résultats conformément à l'annexe II et à l'annexe XXI.

3. Des échantillons dédoublés sont prélevés aux fins des analyses prévues par la réglementation communautaire.

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

5. Si, dans les cinq jours ouvrables qui suivent la prise d'échantillons, le fabricant apporte la preuve que la procédure d'échantillonnage n'a pas été effectuée correctement, l'échantillonnage est, si possible, répété. Dans le cas où un nouvel échantillonnage n'est pas possible, le lot est accepté.

Article 19

Période de transition

L'évaluation de la conformité prévue à l'annexe II du présent règlement intervient dans les douze mois suivant l'entrée en vigueur de ce dernier. Les États membres signalent immédiatement à la Commission, le cas échéant, tout problème grave lié à la procédure de contrôle statistique pendant cette période.

Article 20

Abrogations

Le règlement (CE) n° 213/2001 est abrogé.

Les références au règlement abrogé s'entendent comme faites au présent règlement et sont à lire selon le tableau de correspondance figurant à l'annexe XXII.

[1] JO L 165 du 30.4.2004, p. 1.

Article 21

Entrée en vigueur

Le présent règlement entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Il s'applique à compter du 31 mars 2008.

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

Fait à Bruxelles, le 5 mars 2008.

Par la Commission
Mariann FISCHER BOEL
Membre de la Commission

ANNEXE I

(Article 1er)

LISTE DES MÉTHODES DE RÉFÉRENCE

Index Min. = minimum, Max. = maximum, Annexe = annexe au règlement cité, m.s.n.g. = matières sèches non grasses, IP = indice de peroxyde, A = aspect, G = goût, C = consistance, TTG = teneur totale en germes, Therm. = teneur en germes thermophiles, EM = Etat membre, FIL = Fédération internationale de laiterie, ISO = International Standards Organization (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.

PARTIE A

Règlement de la Commission	Produits concernés	Paramètre	Limite (1)	Méthode de référence	Remarque
Règlement (CE) nº 2771/1999 — Stockage public	Beurre non salé	Matières grasses	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Eau	Max. 16 % m/m,	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		m.s.n.g.	Max. 2 % m/m,	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
		Acides gras	1,2 mmole/100 g de matières grasses	ISO 1740:2004|FIL 6:2004	
		IP (max.)	0,3 méq. d'oxygène/1 000 g de matières grasses	ISO 3976:2006|FIL 74:2006	Note 1
		Coliformes	Non détectables dans 1 g	Annexe X	Note 3
		Matières grasses non lactiques	Non détectables par l'analyse des triglycérides	Annexe XX	
		Traceurs: stérol	Non détectables, β-sitostérol ≤ 40 mg/kg	Annexe VIII	
		Autres traceurs			
		— vanilline	Non détectable	Annexe VI	
		— ester éthylique de l'acide caroténique	≤ 6 mg/kg	Annexe VII	
		— triglycérides de l'acide énanthique	Non détectables	Annexe V	
		Caractéristiques sensorielles	Au moins 4 points sur 5 pour A, F et C	Annexe IV	

Règlement de la Commission	Produits concernés	Paramètre	Limite (1)	Méthode de référence	Remarque
		Dispersion de l'eau	Au moins 4 points	ISO 7586:1985 — FIL 112A:1989	
Règlement (CE) nº 2771/1999 — Stockage public	Beurre non salé	Matières grasses	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Eau	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		m.s.n.g.	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
Règlement (CE) nº 2771/1999 Stockage public	Beurre salé	Matières grasses	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Eau	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		m.s.n.g. (hors sel)	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
		Sel	Max. 2 % m/m	ISO 15648:2004|FIL 179:2004	
Règlement (CE) nº 1898/2005 — chapitre II	Beurre non salé	Matières grasses	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Matières grasses non lactiques		Annexe XX	
		Eau	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1 2001|FIL 80-1:2001	
		m.s.n.g.	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
		Traceurs:			
		— stérols	Voir l'annexe VIII	Annexe VIII	
		— vanilline	Voir l'annexe VI	Annexe VI	
		— ester éthylique de l'acide caroténique	Voir l'annexe VII	Annexe VII	
		— triglycérides de l'acide énanthique	Voir l'annexe V	Annexe V	
Règlement (CE) nº 1898/2005 — chapitre II	Beurre salé	Matières grasses	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Matières grasses non lactiques		Annexe XX	
		Eau	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		m.s.n.g. (hors sel)	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
		Sel	Max. 2 % m/m	ISO 15648:2004|FIL 179:2004	
		Traceurs:			
		— stérols	Voir l'annexe VIII	Annexe VIII	
		— vanilline	Voir l'annexe VI	Annexe VI	

Règlement de la Commission	Produits concernés	Paramètre	Limite (1)	Méthode de référence	Remarque
		— ester éthylique de l'acide caroténique	Voir l'annexe VII	Annexe VII	
		— triglycérides de l'acide énanthique	Voir l'annexe V	Annexe V	
Règlement (CE) n° 1898/2005 — chapitre II	Beurre concentré	Matières grasses	Min. 99,8 % m/m	FIL 24:1964	
		Eau et m.s.n.g.	Max. 0,2 % m/m	ISO 5536:2002|FIL 23:2002 (humidité) FIL 24:1964 (m.s.n.g.)	
		Acides gras	1,2 mmole/100 g de matières grasses	ISO 1740:2004|FIL 6:2004	
		IP (max.)	0,5 méq. d'oxygène/1 000 g de matières grasses	ISO 3976:2006|FIL 74:2006	Note 1
		Matières grasses non lactiques	Absence	Annexe XX	
		Goût	Franc		
		Odeur	Absence d'odeurs étrangères		
		Autres	Absence d'agents neutralisants, d'antioxygènes et de conservateurs		
		Traceurs:			
		— stérols	Voir l'annexe VIII	Annexe VIII	
		— vanilline	Voir l'annexe VI	Annexe VI	
		— ester éthylique de l'acide caroténique	Voir l'annexe VII	Annexe VII	
		— triglycérides de l'acide énanthique	Voir l'annexe V	Annexe V	
Règlement (CE) n° 1898/2005 — chapitre II	Crème	Matières grasses	Minimum 35 % m/m	ISO 2450:1999|FIL 16 C:1987	
		Matières grasses non lactiques		Annexe XX	
		Traceurs:			
		— stérols	Voir l'annexe VIII		Note 2
		— vanilline	Voir l'annexe VI	Annexe VI	
		— ester éthylique de l'acide caroténique	Voir l'annexe VII		Note 2
		— triglycérides de l'acide énanthique	Voir l'annexe V	Annexe V	

Règlement de la Commission	Produits concernés	Paramètre	Limite (1)	Méthode de référence	Remarque
Règlement (CE) nº 1898/2005 — chapitre III	Beurre concentré	Matières grasses	Min. 96 % m/m		Note 2
		Matières grasses non lactiques		Annexe XX	
		m.s.n.g.	Max. 2 % m/m		Note 2
		Traceurs:			
		— stigmastérol (95 % m/m)	15 g/100 kg de beurre concentré	Annexe VIII	
		— stigmastérol (85 % m/m)	17 g/100 kg de beurre concentré	Annexe VIII	
		— triglycérides de l'acide énanthique	10,34 kg/t de beurre concentré	Annexe V	
		— ester éthylique de l'acide butyrique et stigmastérol		— ester éthylique de l'acide butyrique — stigmastérol: annexe VIII	Note 2
		— ester éthylique de l'acide butyrique et triglycérides de l'acide énanthique		— ester éthylique de l'acide butyrique — triglycérides de l'acide énanthique: annexe V	Note 2
		Lécithine (E 322)	Max. 0,5 % m/m		Note 2
		NaC1	Max. 0,75 % m/m	ISO 15648:2004|FIL 179:2004	
		Acides gras	1,2 mmole/100g de matières grasses	ISO 1740:2004|FIL 6:2004	
		IP (max.)	Max. 0,5 méq. d'oxygène/1 000 g de matières grasses	ISO 3976:2006|FIL 74:2006	Note 1
		Goût	Franc		
		Odeur	Absence d'odeurs étrangères		
		Autres	Absence d'agents neutralisants, d'antioxygènes et de conservateurs		
Règlement (CE) nº 1898/2005 — chapitre IV	Beurre non salé	Matières grasses	Min. 82 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Eau	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		m.s.n.g.	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
Règlement (CE) nº 1898/2005 — chapitre IV	Beurre salé	Matières grasses	Min. 80 % m/m	ISO 17189:2003|FIL 194:2003	

Règlement de la Commission	Produits concernés	Paramètre	Limite (1)	Méthode de référence	Remarque
		Eau	Max. 16 % m/m	ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
		m.s.n.g. (hors sel)	Max. 2 % m/m	ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	
		Sel	Max. 2 % m/m	ISO 15648:2004|FIL 179:2004	
Article 9 et titre II du règlement (CE) nº 1255/1999	Fromage à base de lait de brebis et/ou de chèvre	Lait de vache	< 1 % m/m	Annexe IX	
Règlement (CEE) nº 2921/90	Annexe I — Caséine acide	Eau	Max. 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Matières grasses	Max. 1,75 % m/m	ISO 5543:2004|IDF127:2004	
		Acidité libre	Max. 0,30 ml de solution NaOH 0,1 N/g	ISO 5547:1978 — FIL 91:1979	
Règlement (CEE) nº 2921/90	Annexe I — Caséine présure	Eau	Max. 12,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Matières grasses	Max. 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Cendres	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978|FIL 90:1979	
Règlement (CEE) nº 2921/90	Annexe I — Caséinates	Eau	Max. 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Protéines du lait	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978|FIL 92:1979	
		Matières grasses et cendres	Max. 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Cendres fixes		ISO 5544:1978|FIL 89:1979	
		Cendres		ISO 5545:1978|FIL 90:1979	
Règlement (CEE) nº 2921/90	Annexe II — Caséine acide	Eau	Max. 10,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Matières grasses	Max. 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Acidité libre	Max. 0,20 ml de solution NaOH 0,1 N/g	ISO 5547:1978|FIL 91:1979	
		TTG (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Note 3
		Coliformes	Absence/0,1 g	Annexe X	Note 3
		Therm. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Notes 3 et 4
Règlement (CEE) nº 2921/90	Annexe II — Caséine présure	Eau	Max. 8,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Matières grasses	Max. 1,00 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Cendres	Min. 7,50 % m/m	ISO 5545:1978|FIL 90:1979	
		TTG (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Note 3
		Coliformes	Absence/0,1 g	Annexe X	Note 3

Règlement de la Commission	Produits concernés	Paramètre	Limite (1)	Méthode de référence	Remarque
		Therm. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Notes 3 et 4
Règlement (CEE) nº 2921/90	Annexe II — Caséinates	Eau	Max. 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Protéines du lait	Min. 88,00 % m/m	ISO 5549:1978|FIL 92:1979	
		Matières grasses et cendres	Max. 6,00 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004 ISO 5544:1978|FIL 89:1979 ou ISO 5545:1978|FIL 90:1979	
		TTG (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Note 3
		Coliformes	Absence/0,1 g	Annexe X	Note 3
		Therm. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Notes 3 et 4
Règlement (CEE) nº 2921/90	Annexe III — Caséinates	Eau	Max. 6,00 % m/m	ISO 5550:2006|FIL 78:2006	
		Protéines du lait	Min. 85,00 % m/m	ISO 5549:1978|FIL 92:1979	
		Matières grasses	Max. 1,50 % m/m	ISO 5543:2004|FIL 127:2004	
		Lactose	Max. 1,00 % m/m	ISO 5548:2004|FIL 106:2004	
		Cendres	Max. 6,50 % m/m	ISO 5544:1978|FIL 89:1979 ou ISO 5545:1978|FIL 90:1979	
		TTG (max.)	30 000/g	ISO 4833:2003	Note 3
		Coliformes	Absence/0,1 g	Annexe X	Note 3
		Therm. (max.)	5 000/g	ISO 4833:2003	Notes 3 et 4
Règlement (CE) nº 2799/1999	Aliments composés pour animaux et lait écrémé en poudre (LEP) (pour l'alimentation des animaux)	Eau (babeurre acide en poudre)	Max. 5 % m/m	Annexe XIX	
		Protéines	31,4 % m/m (min.) sur l'extrait sec non gras	ISO 8968-1|2|3:2001|FIL 20-1|2|3:2001	
		Eau (LEP)	Max. 5 % m/m	ISO 5537:2004|FIL 26:2004	
		Matières grasses (LEP)	Max. 11 % m/m	ISO 1736:2000|FIL 9C:1987	
		Lactosérum présure (LEP)	Absence	Annexe XIII	Note 6
		Amidon (LEP)	Absence	Annexe XVII	
		Eau (mélange)	Max. 5 % m/m sur l'extrait sec non gras	ISO 5537:2004|FIL 26:2004	
		Matières grasses (mélanges)		Directive 84/4/CEE de la Commission (JO L 15 du 18.1.1984, p. 29)	

Règlement de la Commission	Produits concernés	Paramètre	Limite (1)	Méthode de référence	Remarque
		Lactosérum présure (mélanges)	Absence	Annexe XIII	
		Teneur en LEP (du produit final)	Min. 50 % m/m	Annexe XVI	
		Matières grasses (du produit final)	Min. 2,5 % m/m ou 5 % m/m	Directive 84/4/CEE de la Commission (JO L 15 du 18.1.1984, p. 29)	Note 7
		Amidon (du produit final)	Min. 2 % m/m	Annexe XVII	Note 8
		Cuivre (du produit final)	25 ppm	Directive 78/633/CEE de la Commission (JO L 206 du 26.7.1987, p. 43)	
Règlement (CE) nº 214/2001	LEP (procédé spray)	Matières grasses	Max. 1,0 % m/m	ISO 1736:2000|FIL 9C:1987	
		Protéines	31,4 % (2)m/m (min.) sur l'extrait sec non gras	ISO 8968-1/2:2001|FIL 20-1/2:2001	
		Eau	Max. 3,5 % m/m	ISO 5537:2004|FIL 26:2004	
		Acidité	Max. 19,5 ml, NaOH 0,1N, 10 g de matières sèches non grasses	ISO 6091:1980|FIL 86:1981	
		Lactates	Max. 150 mg/100 g de matières sèches non grasses	ISO 8069:2005|FIL 69:2005	
		Phosphatase	Négatif	ISO 11816-1:2006|FIL 155-1:2006	
		Indice d'insolubilité	Max. 0,5 ml à 24 °C	ISO 8156:2005|FIL 129:2005	
		Particules brûlées	Filtre A ou B (15,0 mg)	ADPI (1990)	
		TTG	40 000/g	ISO 4833:2003	Note 3
		Coliformes	Négatif/ 0,1 g	Annexe X	Note 3
		Babeurre	Négatif	Annexe XIV	
		Lactosérum présure	Négatif	Annexe XII	
		Lactosérum acide	Négatif		Note 2
		Agents antimicrobiens		Annexe XV	

(1) Sans préjudice des exigences prévues par le règlement concerné.
(2) La teneur moyenne en protéines passerait à 34 % au 1er septembre 2009.

PARTIE B

Les méthodes de référence énumérées 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	Produits concernés	Code NC	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
Règlement (CEE) nº 2658/87 Règlement (CE) nº 2535/2001 Règlement (CE) nº 1282/2006	Lait et crème de lait, non concentrés ni additionnés de sucre ou d'autres édulcorants	0401	Matières grasses (≤ 6 % m/m)	Les limites sont celles spécifiées dans la description du code NC pour le produit concerné et, le cas échéant, précisées par le règlement (CEE) nº 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) nº 2535/2001 (JO L 341 du 22.12.2001, p. 29)	ISO 1211:2001|FIL 1D:1996	
			Matières grasses (> 6 % m/m)		ISO 2450:1999|FIL 16C:1987	
	Lait et crème de lait, concentrés ou additionnés de sucre ou d'autres édulcorants	0402	Matières grasses (forme liquide)		ISO 1737:1999|FIL 13C:1987	
			Matières grasses (forme solide)		ISO 1736:2000|FIL 9C:1987	
			Protéines		ISO 8968-1|2|3:2001|IDF 20-1|2|3:2001	
			Saccharose (teneur normale)		ISO 2911:2004|FIL 35:2004	
			Saccharose (faible teneur)			Note 2
			Matière sèche (LCS)		ISO 6734:1989|FIL 15B:1991	
			Matière sèche (LCC)		ISO 6731:1989|FIL 21B:1987	
			Eau (lait en poudre)		ISO 5537:2004|FIL 26:2004	
			Eau (crème en poudre)		Annexe XVIII	
	Babeurre, lait et crème fermentés ou acidifiés, concentrés ou non concentrés, additionnés de sucre ou d'autres édulcorants	0403	Matières grasses		ISO 1211:2001|FIL 1D:1996 ISO 1736:2000|FIL 9C:1987 ISO 2450:1999|FIL 16 C:1987 ISO 7208:1999|FIL 22B:1987 ISO 8262-3:2005|FIL 124-3:2005	

Règlement de la Commission	Produits concernés	Code NC	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
			Protéines		ISO 8968-1|2|3:2001|FIL 20-1|2|3:2001	
			Saccharose (teneur normale)		ISO 2911:2004|FIL 35:2004	
			Saccharose (faible teneur)			Note 2
			Eau (babeurre acide en poudre)		Annexe XIX	
			Eau (babeurre doux en poudre)		ISO 5537:2004|IDF26:2004	
			Matière sèche (autres produits)		Méthodes approuvées par l'autorité compétente	
	Lactosérum, même concentré ou additionné de sucre ou d'autres édulcorants; produits composés de composants naturels du lait	0404	Matières grasses		ISO 1736:2000|FIL 9C:1987 ISO 2450:1999|FIL 16C:1987 ISO 7208:1999|FIL 22B:1987	
			Protéines		ISO 8968-1|2|3:2001|FIL 20-1|2|3:2001	
			Saccharose (teneur normale)		ISO 2911:2004|FIL 35:2004	
			Saccharose (faible teneur)			Note 2
		0404 90	Protéines		ISO 8968 1/2 2001|FIL 20-1/2:2001	
			Eau		FIL 21B:1987	
			Matière sèche		ISO 6734:1989|FIL 15B:1991	
			(Produits concentrés)		ISO 6731:1989|FIL 21B:1987	
	Beurre et autres matières grasses du lait; pâtes à tartiner laitières	0405	Matières grasses (si ≤ 85 % m/m)		ISO 17189:2003|FIL 194:2003	
		Beurre	Eau		ISO 3727-1:2001|FIL 80-1:2001	
			m.s.n.g.		ISO 3727-2:2001|FIL 80-2:2001	

Règlement de la Commission	Produits concernés	Code NC	Paramètre	Limite	Méthode de référence	Remarque
			NaCl		ISO 15648:2004|FIL 179:2004	
			Matières grasses (si > 99 % m/m)		FIL 24:1964	
	Butteroil		Eau (si matières grasses < 99 % m/m)		ISO 5536:2002|FIL 23:2002	
	Fromages et caillebotte	0406	Matières grasses		ISO 1735:2004|FIL 5:2004	
			Matière sèche		ISO 5534:2004|FIL 4:2004	
			Matière sèche (Ricotta)		ISO 2920:2004|FIL 58:2004	
			NaCl		ISO 5943:2006|FIL 88:2006	
			Lactose		ISO 5765-1/2:2002|FIL 79-1/2:2002	
Règlement (CEE) nº 2658/87	Aliments composés pour animaux	2309	Lactose		Annexe XI	

Remarques concernant la liste des méthodes de référence de l'Union européenne:
Note 1: Isolement de la matière grasse laitière conformément à la norme ISO 1740:1991 (protection contre la lumière).
Note 2: Aucune méthode de référence n'a été définie. Méthodes approuvées par l'autorité compétente.
Note 3: Préparation de l'échantillon conformément à la norme ISO 8261:2001|FIL 122:2001.
Note 4: Incubation pendant 48 heures à une température de 55 °C. Veiller à empêcher le milieu de culture de s'assécher.
Note 5: % m/m de m.s.n.g. = % m/m de matière sèche — % m/m de matière grasse.
Note 6: Directive 84/4/CEE de la Commission.
Note 7: Règlement (CE) nº 2799/1999 de la Commission (JO L 340 du 31.12.1999, p. 3.27)
Note 8: Directive 78/633/CEE de la Commission.

ANNEXE II

(Article 3)

ÉVALUATION DE LA CONFORMITÉ D'UN LOT AVEC LA LIMITE RÉGLEMENTAIRE

1. PRINCIPE

Dans les cas où la réglementation prévoit des procédures d'échantillonnage détaillées, il convient de suivre ces procédures. Dans tous les autres cas, on utilise un échantillon d'au moins trois unités prélevées de manière aléatoire du lot soumis à vérification. Un échantillon composite peut être préparé. Le résultat obtenu est comparé aux limites réglementaires par le calcul d'un intervalle de confiance de 95 % correspondant à deux fois l'écart-type, ce dernier étant établi différemment selon que 1) la méthode est validée dans le cas d'une collaboration internationale avec des valeurs définies pour σr et σ_R, ou que 2), en cas de validation interne, une valeur de reproductibilité interne a été calculée. Cet intervalle de confiance est dès lors égal à l'incertitude de mesure du résultat.

2. LA MÉTHODE EST VALIDÉE DANS LE CADRE D'UNE COLLABORATION INTERNATIONALE

Dans ce cas de figure, l'écart-type de répétabilité σr et l'écart-type de reproductibilité σ_R ont été définis et le laboratoire peut prouver sa conformité avec les caractéristiques de performances de la méthode validée.

Calculer la moyenne arithmétique $\bar{x}$ des mesures répétées *n* fois.

Calculer l'incertitude étendue ($k = 2$) de $\bar{x}$ comme

$$U = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \frac{n-1}{n}\sigma_r^2}$$

Si le résultat final *x* de la mesure est calculé au moyen d'une formule du type $x = y_1 + y_2$, $x = y_1 - y_2$, $x = y_1 \cdot y_2$ ou $x = y_1 / y_2$ ou il convient de suivre les procédures habituelles de combinaison des écarts-types appliquées en pareils cas.

Le lot est jugé non conforme à la limite réglementaire supérieure *UL* si

$\bar{x} - U > UL$;

Il est jugé conforme à *UL* dans tous les autres cas.

Le lot est jugé non conforme à la limite réglementaire inférieure *LL* si

$\bar{x} + U < LL$;

Il est jugé conforme à *LL* dans tous les autres cas.

3. VALIDATION INTERNE AVEC CALCUL DE L'ÉCART-TYPE DE REPRODUCTIBILITÉ INTERNE

En cas d'utilisation de méthodes non prévues au présent règlement et si aucune mesure de précision n'a été définie, la validation doit être faite en interne. Dans les formules de calcul de l'incertitude étendue *U*, il convient d'utiliser un écart-type de répétabilité interne s_{ir} et un écart-type de reproductibilité interne s_{iR} au lieu respectivement de σ_r et σ_R.

Les règles de décision sont celles visées au point 1. Si toutefois le lot est jugé non conforme à la limite réglementaire, les mesures doivent être répétées avec la méthode spécifiée au présent règlement et la décision prise conformément au point 1.

ANNEXE III

(Article 4)

ÉVALUATION DES ÉVALUATEURS 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 évaluateur au cours d'une période de douze mois. Cette opération se fait habituellement en plusieurs sessions. Les résultats des caractéristiques des divers produits sont évalués par application de la formule suivante:

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

dans laquelle:

w_I: 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_I 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 évaluateur utilise la même échelle d'évaluation de la qualité qu'un groupe d'évaluateurs expérimentés. Les notes données par l'évaluateur sont comparées avec la moyenne des notes accordées par le groupe.

La formule suivante est utilisée aux fins de l'évaluation des résultats:

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

dans laquelle:

x_{i1}; x_{i2}: Voir point (A)

$\bar{x}_{i1}$; $\bar{x}_{i2}$: note moyenne accordée par le groupe d'évaluateurs respectivement pour la première et la seconde évaluation de l'échantillon x_i

n: nombre d'échantillons (au moins dix par période de douze mois).

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

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

Lorsque certains évaluateurs dépassent la limite de 1,5 fixée en termes d'indices de l'écart ou de répétabilité, les experts des autorités officielles procèdent au «réexamen» aléatoire d'un ou plusieurs des échantillons que ces évaluateurs classifieront au cours des semaines suivantes, ou ils réalisent un ou plusieurs contrôles «accompagnés» avec ces évaluateurs. Une surveillance étroite est nécessaire pour décider s'il convient de continuer de recourir à leurs services. Les conclusions doivent être documentées et conservées comme preuve d'une action de suivi.

C. COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS D'UN ÉTAT MEMBRE ET DANS DIFFÉRENTS ÉTATS MEMBRES

Si possible, un test permettant de comparer les résultats obtenus par des évaluateurs de différentes régions doit être organisé au moins une fois par an. Si des écarts significatifs sont observés, 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 évaluateurs et par ceux d'États membres voisins. En cas de différences significatives, une étude approfondie est réalisée entreprise en vue d'obtenir des résultats comparables.

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

ANNEXE IV

(Article 4)

ÉVALUATION SENSORIELLE DU BEURRE

1. CHAMP D'APPLICATION

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

Pour plus de détails, se reporter à la norme internationale FIL Lait et produits laitiers, FIL 99, Parties 1, 2 et 3 sur l'évaluation sensorielle.

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 «évaluateur», on entend une personne choisie pour son aptitude à pratiquer un test sensoriel. Ce type d'évaluateur peut n'avoir qu'une expérience limitée.

Par «évaluateur expert», on entend une personne dotée d'une sensibilité sensorielle aiguë et d'une longue expérience de la méthodologie sensorielle, capable de pratiquer des évaluations sensorielles cohérentes et fiables sur divers produits. Ce type d'évaluateur disposera d'une bonne mémoire sensorielle à long terme.

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 la 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

Pour plus de détails, voir ISO 8589 et ISO/DIS 22935-2 | FIL 99-2, paragraphe 7.

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

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

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 thermostatique approprié permettant de maintenir le beurre à une température constante. La température du beurre doit être de 12 °C (± 2 °C) au moment de la classification.

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.

4.1. Pour plus de détails sur les exigences générales et les tests de présélection à faire passer à tout nouveau candidat évaluateur, consulter la norme ISO/DIS 22935-1 | FIL 99-1, paragraphe 4 (recrutement) et paragraphe 5.1.

Il est crucial que la formation soit continue et que des sessions générales aient lieu à intervalles réguliers. Pour plus d'informations sur la formation du jury, voir la norme ISO 8586-1.

4.2. La formation initiale doit inclure les éléments suivants:

— théorie générale et importance pratique de l'évaluation sensorielle,

— méthodes, échelles et description des impressions sensorielles,

— détection et identification des propriétés sensorielles et des notions sensorielles spécifiques,

— formation de base sur la fabrication du beurre,

— références et échantillons validés pour aider l'évaluateur à reconnaître des saveurs spécifiques et l'intensité des saveurs dans le produit.

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.

Le président du jury est responsable de toute la procédure et peut participer aux travaux du jury.

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 tel est le cas, il convient de remplacer l'évaluateur concerné par un autre sujet,

— 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 ne doivent pas utiliser de produits fortement odorants tels que parfums, lotions après-rasage, déodorants, et doivent éviter 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. PERFORMANCES

Pour maintenir leurs compétences à niveau, tous les évaluateurs sont tenus de participer régulièrement à des jurys d'évaluation sensorielle dont la fréquence sera fonction des volumes de production de beurre, à raison si possible d'une évaluation par mois.

Les évaluateurs experts sont eux aussi tenus de participer à plusieurs évaluations chaque année et, si possible, au moins une fois par trimestre.

7. ÉCHANTILLONNAGE ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Il est indispensable que l'identité des échantillons soit tenue secrète au cours de l'évaluation pour éviter toute influence. Il convient donc d'attribuer un code aux échantillons.

Ce code doit être attribué avant l'évaluation. La température du beurre pendant son transport jusqu'à la salle d'essai est fixée à 6 °C ± 2 °C.

Lorsque l'évaluation sensorielle est effectuée dans un 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 doit être prélevé. Au cours de l'évaluation, le beurre doit avoir une température de 12 °C (± 2 2 °C) (voir ISO/DIS 22935-2 | FIL 99-2 qui fixe la température d'évaluation du beurre à 14 °C ± 2 °C). Il est absolument nécessaire d'éviter de grands écarts par rapport à cette température.

8. ÉVALUATION DE LA VALEUR DE CHAQUE PROPRIÉTÉ

8.1. L'évaluation sensorielle doit être effectuée pour les trois propriétés suivantes: l'aspect, la consistance et la flaveur.

L'«aspect» couvre les éléments suivants: la couleur, la pureté apparente, l'absence de contamination physique, de moisissure et l'uniformité de 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: le corps, la texture et la fermeté. Si, dans le souci de répondre aux exigences des consommateurs, un État membre donné le souhaite, la tartinabilité du beurre peut être évaluée au moyen de méthodes physiques. La Commission pourrait envisager une harmonisation de ces méthodes à l'avenir.

Le «corps» désigne la cohésion du produit lorsqu'il est consommé. Il est généralement associé aux notions de fermeté et de tartinabilité et doit être uniforme dans l'ensemble du produit. Il est étroitement lié à la texture et caractérise l'aptitude du produit à se tenir sous son propre poids. La résistance pendant la coupe donne une indication du corps, qui se mesure mécaniquement mais aussi en bouche et au toucher.

La «flaveur» désigne les caractéristiques perçues lors de la mise en bouche, principalement par les papilles gustatives présentes sur la langue.

L'«arôme» désigne les caractéristiques perçues par l'odorat.

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

La procédure de classification du beurre doit être reportée si la température se situe en dehors de la plage recommandée.

8.2. Chaque propriété doit faire l'objet d'une évaluation sensorielle séparée. La notation s'effectue conformément au tableau 1.

8.3. Il peut être utile pour les évaluateurs de noter ensemble, avant de commencer l'évaluation, un ou plusieurs échantillons de référence en termes d'aspect, de consistance et de flaveur, dans un souci d'uniformité.

8.4. Les notes sont les suivantes:

Voir partie 7 — Nomenclature et description des critères d'attribution des points lors de la notation.

	Note maximale	Note exigée
Aspect	5	4
Consistance	5	4
Flaveur/Arôme	5	4

— Lorsque la note exigée n'est pas atteinte, une description du défaut doit être donnée.

— La note attribuée 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 écarts entre les notes attribuées par les différents membres du jury 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.

9. SURVEILLANCE

Un président de jury, qui doit être un employé officiel de l'autorité compétente et peut être membre du jury, assume la responsabilité générale 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.

10. NOMENCLATURE

Voir tableau 2 ci-joint.

11. RÉFÉRENCE

FIL-IDF 99C:1997 Évaluation sensorielle des produits laitiers par notation — Méthode de référence

ISO/DIS 22935 | FIL 99 Norme internationale Lait et produits laitiers — Analyse sensorielle — Parties 1-3

ISO 8586-1 Analyse sensorielle — Guide général pour la sélection, l'entraînement et le contrôle des sujets — Partie 1

ISO 8589 Analyse sensorielle — Directives générales pour la conception de locaux destinés à l'analyse

FIL-IDF 112A:1989 Beurre — Détermination de la valeur de dispersion de l'eau

Tableau 1

Notation du beurre

Aspect			Consistance			Flaveur + arôme		
Points	N° [1]	Remarques	Points (qualité)	No [1]	Remarques	Points (qualité)	N° [1]	Remarques
5		*Très bon* type idéal qualité la plus élevée (taux d'humidité uniforme)	5		*Très bon* type idéal qualité la plus élevée (bonne tartinabilité)	5		*Très bon* type idéal qualité la plus élevée (arôme pur beurre très fin)
4		*Bon* [2] pas de défauts apparents	4		*Bon* [2]	4		*Bon* [2] pas de défauts apparents
				17	dur			
				18	mou			
3		*Moyen (légers défauts)*	3		*Moyen (légers défauts)*	3		*Moyen (légers défauts)*
	1	aqueux, gouttelettes d'eau apparentes		14	pâte courte, cassante, beurre grumeleux		21	impur
	2	couleur non homogène, bicolore		15	pâteux, pommadeux		22	goût étranger, arrière-goût
	3	rayé		16	collant		25	acide
	4	marbré		17	dur		27	goût de cuit, goût de roussi
	5	tacheté (points colorés, taches de beurre fondu)		18	mou		33	goût de fourrage
	6	séparation d'huile					34	âcre, amer
	7	trop coloré					35	trop salé
	8	inclusion d'air apparente (poreux)						
2		*Mauvais (défauts évidents)*	2		*Mauvais (défauts évidents)*	2		*Mauvais (défauts évidents)*
	1	aqueux, gouttelettes d'eau apparentes		14	pâte courte, cassante, beurre grumeleux,		21	impur
	3	rayé		15	pâteux, pommadeux		22	goût étranger, arrière-goût
	4	marbré		16	collant		23	goût de vieux
	5	tacheté (points colorés, taches de beurre fondu)		17	dur		25	acide
	6	séparation d'huile		18	mou		32	goût d'oxydé, goût métallique
	10	matières étrangères					33	goût de fourrage
	11	moisi					34	âcre, amer
	12	sel non dissous					35	trop salé
							36	goût de vase, fade, putride
							38	goût de produits chimiques
1		*Très mauvais (défauts prononcés)*	1		*Très mauvais (défauts prononcés)*	1		*Très mauvais (défauts prononcés)*
	1	aqueux, gouttelettes d'eau apparentes		14	pâte courte, cassante, beurre grumeleux,		22	goût étranger, arrière-goût
	3	rayé		15	pâteux, pommadeux		24	goût de fromage, goût de fromage acide
	4	marbré		16	collant		25	acide
	5	tacheté (points colorés, taches de beurre fondu)		17	dur		26	levuré
	6	séparation d'huile		18	mou		28	goût de moisi
	7	trop coloré					29	rance
	9	granuleux					30	huileux, goût d'huile de poisson, goût de poisson
	10	matières étrangères					31	suiffeux
	11	moisi					32	goût d'oxydé, goût métallique
	12	sel non dissous					34	âcre, amer
							35	trop salé
							36	goût de vase, fade, putride
							37	malté (goût de malt)
							38	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

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 et arôme
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 roussi
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.	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 V

(Article 5)

DÉTERMINATION DE LA TENEUR DU BEURRE, DU BUTTEROIL ET DE LA CRÈME EN TRIGLYCÉRIDES DE L'ACIDE ÉNANTHIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES TRIGLYCÉRIDES

1. CHAMP D'APPLICATION

La présente méthode permet de déterminer la teneur du butteroil, du beurre et de la crème en triglycérides de l'acide énanthique.

2. TERMES ET DÉFINITION

Teneur en acide énanthique: teneur en triglycérides de l'acide énanthique déterminée conformément à la procédure établie dans la présente méthode.

Note: La teneur en acide énanthique s'exprime en kg par tonne de produit pour le butteroil et le beurre, et en kg par tonne de matières grasses lactiques pour la crème.

3. PRINCIPE

Les matières grasses lactiques sont extraites des différents produits conformément à la norme ISO 14156 | FIL 172:2001. La détermination quantitative de la teneur des matières grasses extraites en triglycérides de l'acide énanthique s'effectue par chromatographie en phase gazeuse (CPG) capillaire. Le résultat obtenu pour l'échantillon est évalué en référence aux triglycérides de l'acide caproïque comme étalon interne.

Note: La tributyrine est également considérée comme un étalon interne satisfaisant.

4. RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

4.1. n-hexane

4.2. Triglycéride de l'acide caproïque standard, pureté d'au moins 99 %

4.3. Triglycéride de l'acide énanthique standard, pureté d'au moins 99 %

4.4. Sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4)

5. MATÉRIEL

On utilise du matériel de laboratoire courant et notamment:

5.1. Balance de précision ayant une sensibilité de 1 mg

5.2. Fioles jaugées d'une capacité de 10 ml et 20 ml

5.3. Tubes à centrifugation d'une capacité de 30 ml

5.4. Évaporateur rotatif

5.5. Four pouvant être maintenu à une température de 50 °C ± 5 °C

5.6. Papier-filtre de porosité moyenne et d'environ 15 cm de diamètre

5.7. Dispositif de chromatographie en phase gazeuse

5.7.1. Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un injecteur de type split/splitless ou on column et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID)

5.7.2. Colonne CPG dotée d'une phase stationnaire ayant prouvé son efficacité à réaliser la séparation des triglycérides (100 % diméthylpolysiloxane ou 5 % phényle-95 % méthylpolysiloxane). Choisir la phase stationnaire, la longueur de la colonne (entre 4m et 15m), le diamètre intérieur (entre 0,22 mm et 0,50 mm) et l'épaisseur du film (au moins 0,12 µm) en tenant compte de l'expérience de laboratoire et du système d'injection utilisé. Dans tous les cas, la colonne choisie doit être de nature à produire non seulement une séparation complète entre le pic du solvant et les triglycérides de l'acide caproïque, mais aussi une résolution ligne de base entre les pics des triglycérides de l'acide caproïque et énanthique. Des exemples de conditions applicables sont donnés ci-dessous.

5.7.2.1. Exemple de conditions applicables en cas d'utilisation d'un injecteur de type split:

— Gaz vecteur: hélium

— Pression de la tête de colonne: 100 kPa

— Colonne: 12m de long, 0,5 mm de diamètre intérieur, film d'une épaisseur de 0,1 µm, colonne de silice fondue

— Phase stationnaire: 100 % diméthylpolysiloxane ou 5 % phényle-95 % diméthylpolysiloxane (ex. HT5)

— Température de la colonne: température initiale de 130 °C, maintenue pendant 1 minute, poussée à 260 °C à une vitesse de 20 °C/min puis poussée à 360 °C à une vitesse de 30 °C/min; maintien à 360 °C pendant 10 minutes

— Température du détecteur: 370 °C

— Température de l'injecteur: 350 °C

— Rapport de division 1:30

— Quantité d'échantillon injectée: 1 µl

5.7.2.2. Exemple de conditions applicables en cas d'utilisation d'un injecteur on column

— Gaz vecteur: hydrogène (système à débit constant)

— Pression de la tête de colonne: 89 kPa

— Colonne: 4m de long, 0,32 mm de diamètre intérieur, film d'une épaisseur de 0,25 µm, colonne de silice fondue

— Phase stationnaire: 5 % phényle, 95 % diméthylpolysiloxane

— Température de la colonne: température initiale de 60 °C, maintenue pendant 2 minutes, poussée à 340 °C à une vitesse de 35 °C/min, maintenue à cette température pendant 5 minutes

— Température du détecteur: 350 °C

— Quantité d'échantillon injectée: 1 µl

5.8. Seringue d'injection d'une capacité de 5 µl

6. ÉCHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon qui soit vraiment représentatif et n'ait été ni endommagé ni modifié lors du transport ou du stockage.

L'échantillonnage n'est pas couvert par la méthode décrite dans cette norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est présentée dans les normes FIL: 50C:1995 ou ISO 707-1997 — Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage.

7. MODE OPÉRATOIRE

7.1. **Préparation de l'échantillon d'essai et de la prise d'essai**

Procéder suivant les normes ISO 14156 | FIL 172:2001.

7.1.1. *Butteroil, beurre*

7.1.1.1. Faire fondre 50g à 100g d'échantillon d'essai au four (5.5)

7.1.1.2. Placer 0,5g à 1,0g de sulfate de sodium anhydre (5.4) dans un papier-filtre plié

7.1.1.3. Filtrer la matière grasse à travers le papier-filtre contenant le sulfate de sodium anhydre en recueillant le filtrat dans un bécher gardé au four (5.5). Pour décanter le beurre fondu sur le papier-filtre, veiller à ce que le sérum n'ait pas traversé

7.1.2. *Crème*

7.1.2.1. Porter l'échantillon d'essai à une température de 20 °C ± 2 °C

7.1.2.2. Mélanger ou agiter soigneusement l'échantillon

7.1.2.3. Diluer une quantité adaptée d'échantillon d'essai pour obtenir 100 ml d'une prise d'essai avec une fraction massique de matière grasse d'environ 4 %

7.1.2.4. Procéder comme pour le lait cru et le lait homogénéisé (voir ISO 14156 | FIL 172:2001, §8.3) pour extraire la matière grasse de la crème

7.1.2.5. Dans une fiole jaugée de 10 ml (5.2), peser 1g de la matière grasse extraite, à 1 mg près. Ajouter 1 ml de la solution 7.2.2. Compléter jusqu'à 10 ml avec du n-hexane (5.1) et homogénéiser

7.1.2.6. Introduire 1 ml de la solution 7.1.1.2 dans une fiole jaugée de 10 ml (5.2) et diluer jusqu'à 10 ml avec du n-hexane (4.1)

7.2. **Préparation des standards d'étalonnage**

7.2.1. Dissoudre 100 mg des triglycérides de l'acide énanthique (4.3) dans 10 ml de n-hexane (4.1)

7.2.2. Dissoudre 100 mg des triglycérides de l'acide caproïque (4.2) dans 10 ml de n-hexane (4.1)

7.2.3. Introduire 1 ml de la solution 7.2.2 dans une fiole jaugée de 10 ml (5.2). Compléter jusqu'à 10 ml avec du n-hexane (4.1)

7.2.4. Introduire 1 ml de la solution 7.2.1 et 1 ml de la solution 7.2.2 dans une fiole jaugée de 10 ml (5.2). Compléter jusqu'à 10 ml avec du n-hexane (4.1)

7.2.5. Introduire 1 ml de la solution 7.2.4 dans une fiole jaugée de 10 ml (5.2) et compléter jusqu'à 10 ml avec du n-hexane (4.1)

7.3. **Détermination chromatographique**

7.3.1. Injecter deux fois 1 µl de la solution étalon 7.2.5

7.3.2. Injecter 1 µl de chaque solution d'essai

Note: Si le système d'injecteur on column est adopté, il convient d'appliquer une dilution supérieure non seulement à la solution étalon mais aussi à la solution d'essai.

7.3.3. Répéter l'opération 7.3.1 tous les 3 échantillons afin d'encadrer les échantillons entre deux séries de deux injections d'étalons. Les résultats reposent sur les coefficients de réponse moyens des chromatogrammes standard.

8. CALCUL DES RÉSULTATS

Pour chaque chromatogramme, intégrer l'aire des pics correspondant aux triglycérides de l'acide énanthique et de l'acide caproïque.

Suivre ces instructions pour chaque séquence encadrée, c'est-à-dire pour chaque série d'échantillons précédés et suivis d'une injection d'étalons; l'étalon injecté deux fois juste avant lesdits échantillons est STD_1 et l'étalon injecté deux fois juste après ceux-ci est STD_2.

8.1. **Étalonnage**

8.1.1. Calculer le coefficient de réponse pour chaque double de STD_1, Rf_1(a) et Rf_1(b)

Rf_1 (a) ou (b) = (Aire des pics pour les triglycérides de l'acide caproïque/Aire des pics pour les triglycérides de l'acide énanthique) × 100

Calculer le coefficient de réponse moyen, Rf_1

$$Rf_1 = (Rf_1(a) + Rf_1(b)) / 2$$

8.1.2. De même, calculer le coefficient de réponse moyen STD_2, Rf_2

8.1.3. Calculer le coefficient de réponse moyen, Rf

$$Rf = (Rf_1 + Rf_2) /2$$

8.2. **Échantillons d'essai**

Pour chaque chromatogramme test obtenu entre STD_1 et STD_2, calculer la teneur en acide énanthique, C (kg/tonne):

C = (Aire des pics pour les triglycérides de l'acide énanthique × Rf × 100)/(Aire des pics pour les triglycérides de l'acide caproïque × Wt × 1 000)

où:

— Wt = poids de matière grasse prélevée (g),

— 100 = volume de dilution de l'échantillon,

— 1 000 = coefficient de conversion (de µg/g en kg/t)

Pour les échantillons de beurre, prendre en considération leur teneur en matières grasses et calculer une valeur de concentration corrigée, C_{beurre} (kg/t de beurre)

$$C_{beurre} = C_{mat.\ grasses} \times F$$

où F est la teneur en matières grasses du beurre.

9. PRÉCISION

Le point 12 décrit un essai interlaboratoire mené sur le beurre conformément aux normes ISO 5725-1 et ISO 5725-2 en ce qui concerne l'exactitude des méthodes de mesure.

Les valeurs de la limite de répétabilité et de reproductibilité sont exprimées pour un taux de probabilité de 95 % et elles ne sont pas applicables à d'autres plages et matrices de concentration que celles indiquées.

9.1. **Répétabilité**

La différence absolue entre deux résultats d'essai obtenus, dans un court intervalle de temps, par la même méthode sur du matériel d'essai identique, dans le même laboratoire et par le même opérateur utilisant les mêmes équipements ne peut dépasser 0,35 kg/t dans plus de 5 % des cas.

9.2. **Reproductibilité**

La différence absolue entre deux résultats d'essais obtenus par la même méthode sur du matériel d'essai identique, dans des laboratoires différents et par des opérateurs différents utilisant des équipements différents, ne peut dépasser 0,66 kg/t dans plus de 5 % des cas.

10. LIMITES DE TOLÉRANCE: LIMITES BASSES (POUR DES QUANTITÉS INSUFFISANTES)

10.1. **Pour vérifier si le produit a été tracé correctement, il convient de prélever trois échantillons du produit tracé**

10.2. **Beurre et beurre concentré**

10.2.1. On incorpore par tonne de beurre 11 kg de triglycéride de l'acide énanthique d'une pureté d'au moins 95 %, soit 10,45 kg/t

10.2.2. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, le plus faible de ces résultats étant comparé avec les limites suivantes:

— 9,51 kg/t (95 % du taux d'incorporation minimal de triglycéride de l'acide énanthique d'une pureté de 95 %, détermination unique),

— 6,89 kg/t (70 % du taux d'incorporation minimal de triglycéride de l'acide énanthique d'une pureté de 95 %, détermination unique),

— La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation respectivement entre 9,51 kg/t et 6,89 kg/t.

10.3. **Crème**

10.3.1. On incorpore par tonne de matières grasses butyriques 10 kg de triglycéride de l'acide énanthique d'une pureté d'au moins 95 %, soit 9,50 kg/t de matières grasses butyriques tracées

10.3.2. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, le plus faible de ces résultats étant comparé avec les limites suivantes:

— 8,60 kg/t (95 % du taux d'incorporation minimal de triglycéride de l'acide énanthique d'une pureté de 95 %, détermination unique),

— 6,23 kg/t (70 % du taux d'incorporation minimal de triglycéride de l'acide énanthique d'une pureté de 95 %, détermination unique),

— La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation respectivement entre 8,60 kg/t et 6,23 kg/t.

11. LIMITES DE TOLÉRANCE: LIMITES HAUTES (POUR DES QUANTITÉS SUPÉRIEURES DE PLUS DE 20 %)

11.1. **Pour vérifier si le produit a été tracé correctement, il convient de prélever trois échantillons du produit tracé**

11.2. **Beurre et beurre concentré**

11.2.1. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, la moyenne de ces résultats étant comparée avec les limites suivantes:

— Limite haute: 12,96 kg/t.

11.3. **Crème**

11.3.1. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, la moyenne de ces résultats étant comparée avec les limites suivantes:

— Limite haute: 11,82 kg/t.

12. INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES: ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS DE LA DÉTERMINATION DE LA TENEUR DE LA GRAISSE BUTYRIQUE EN TRIHEPTANOATE PAR ANALYSE DES TRIGLYCÉRIDES

Quatre essais interlaboratoires ont été menés pour déterminer la teneur du beurre tracé en triheptanoate.

Neuf laboratoires ont participé au 1er essai circulaire pour lequel aucune méthode analytique n'a été spécifiée.

Pour le 2e essai circulaire (dix laboratoires participants), 4 méthodes différentes ont été appliquées:

— Quantification du méthylheptanoate avec le n-nonane ou le méthylnonanoate comme étalon interne

— Quantification du triheptanoate avec le tricaproate comme étalon interne

— Quantification du méthylheptanoate avec un échantillon/mélange d'étalonnage

— Quantification du méthylheptanoate avec un mélange d'étalonnage

En outre, lorsque les FAME ont été analysés, on a eu recours à deux méthodes de méthylation différentes (De Francesco et Christopherson & Glass).

Sur la base des résultats obtenus, deux méthodes ont été retenues pour le 3e essai circulaire:

— Quantification du méthylheptanoate avec le n-nonane ou le méthylnonanoate comme étalon interne

— Quantification du triheptanoate avec le tricaproate comme étalon interne

Les résultats de 7 laboratoires ont montré que la méthode fondée sur les FAME était source d'une plus grande variabilité. Il a donc été décidé de se limiter à la détermination des triglycérides du triheptanoate en suivant la méthode de la quantification du triheptanoate avec le tricaproate comme étalon interne. Par ailleurs, l'analyse des triglycérides a dû être réalisée sur colonne capillaire.

Au cours du 4e essai circulaire, quatre échantillons (A, B, C, D) ont été étudiés par neuf laboratoires (résultats dans les tableaux 1 et 2).

Deux laboratoires (DE et UE) ont analysé les échantillons à l'aide de la méthode fondée sur les FAME.

Étant donné le nombre réduit de laboratoires, le calcul statistique se base à la fois sur l'ensemble complet (figures 1 et 2) des données, résultats de l'analyse des FAME inclus, et sur les données obtenues par l'analyse des TG.

Tests pour la recherche de valeurs aberrantes:

— échantillon A. Les tests de Dixon, Cochran et Grubbs à des seuils de 1 et 5 % ont révélé une valeur aberrante dans l'analyse,

— échantillon B. Le test de Grubbs à un seuil de 5 % a révélé une valeur aberrante dans l'analyse,

— échantillon C. Les tests de Dixon et Grubbs à des seuils de 1 et 5 % ont révélé une valeur aberrante dans l'analyse,

— échantillon D. Les tests de Dixon et Grubbs à des seuils de 1 et 5 % ont révélé une valeur aberrante dans l'analyse.

La valeur aberrante a été exclue du calcul.

Il faut noter que les résultats obtenus par la méthode fondée sur les FAME n'ont jamais été considérés comme des valeurs aberrantes d'après les tests utilisés.

Paramètres de précision

Les tableaux 1 et 2 indiquent les résultats de tous les laboratoires et les paramètres de précision calculés pour un nombre acceptable (8) de laboratoires mais, malheureusement, non obtenus par la même méthode d'analyse.

Les tableaux 3 et 4 indiquent les résultats obtenus uniquement par l'analyse des TG et les paramètres de précision correspondants. Ces paramètres sont acceptés sous réserve de l'acceptation du nombre réduit de laboratoires (6).

Les figures 2 et 3 illustrent la tendance de Sr et SR calculée pour les 4 échantillons des deux ensembles de données décrits ci-dessus.

Le tableau 5 indique les valeurs de Sr et SR avec les valeurs collectives correspondantes et les paramètres totaux de r et R.

Enfin, la différence critique au seuil de probabilité de 95 % a été calculée.

Tableau 1

Résultats statistiques des méthodes TG + FAME*

Échantillon A		R_1	R_2	Moyenne	Nombre de laboratoires retenu après élimination des valeurs aberrantes	8
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Nombre de valeurs aberrantes	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Valeurs aberrantes	DK
ZPLA	DE*	11,6	11,8	11,7	Valeur moyenne	11,3
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valeur réelle	11,0
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Écart-type de répétabilité (Sr)	0,09
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Écart-type relatif de répétabilité (RSDr %)	0,80
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Répétabilité r (95 %)	0,26
ISPRA	UE*	11,0	11,0	11,0	Répétabilité relative r %	2,24
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Écart-type de reproductibilité (SR)	0,23
					Écart-type relatif de reproductibilité (RSDR %)	2,04
					Reproductibilité R (95 %)	0,84
					Reproductibilité relative R %	5,71
Échantillon B		R_1	R_2	Moyenne	Nombre de laboratoires retenu après élimination des valeurs aberrantes	8
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Nombre de valeurs aberrantes	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Valeurs aberrantes	DK
ZPLA	DE*	14,0	13,8	13,9	Valeur moyenne	13,4
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valeur réelle	13,5
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Écart-type de répétabilité (Sr)	0,14
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Écart-type relatif de répétabilité (RSDr %)	1,04
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Répétabilité r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	13,2	13,3	13,3	Répétabilité relative r %	2,91
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Écart-type de reproductibilité (SR)	0,35
					Écart-type relatif de reproductibilité (RSDR %)	2,61
					Reproductibilité R (95 %)	0,99
					Reproductibilité relative R %	7,31

Tableau 2

Résultats statistiques des méthodes TG + FAME*

Échantillon C		R_1	R_2	Moyenne	Nombre de laboratoires retenu après élimination des valeurs aberrantes	8
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Nombre de valeurs aberrantes	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Valeurs aberrantes	DK
ZPLA	DE*	9,2	9,4	9,3	Valeur moyenne	9,3
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valeur réelle	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Écart-type de répétabilité (Sr)	0,14
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Écart-type relatif de répétabilité (RSDr %)	1,50
EELA	FI	9,4	9,6	9,5	Répétabilité r (95 %)	0,40
ISPRA	UE*	9,4	9,3	9,4	Répétabilité relative r %	4,20
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Écart-type de reproductibilité (SR)	0,17
					Écart-type relatif de reproductibilité (RSDR %)	1,82
					Reproductibilité R (95 %)	0,47
					Reproductibilité relative R %	5,10

Échantillon D		R_1	R_2	Moyenne	Nombre de laboratoires retenu après élimination des valeurs aberrantes	8
RENNES	R1	1,6	1,6	1,6	Nombre de valeurs aberrantes	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Valeurs aberrantes	DK
ZPLA	DE*	2,3	2,3	2,3	Valeur moyenne	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valeur réelle	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Écart-type de répétabilité (Sr)	0,08
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Écart-type relatif de répétabilité (RSDr %)	3,81
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Répétabilité r (95 %)	0,22
ISPRA	UE*	2,3	2,3	2,3	Répétabilité relative r %	10,67
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Écart-type de reproductibilité (SR)	0,24
					Écart-type relatif de reproductibilité (RSDR %)	11,43
					Reproductibilité R (95 %)	0,67
					Reproductibilité relative R %	32,00

Tableau 3

Résultats statistiques des méthodes TG + FAME*

Échantillon A		R_1	R_2	Moyenne	Nombre de laboratoires retenu après élimination des valeurs aberrantes	6
RENNES	FR1	11,0	11,1	11,1	Nombre de valeurs aberrantes	1
RIKILT	NL	11,2	11,2	11,2	Valeurs aberrantes	DK
ADAS	GB	11,4	11,2	11,3	Valeur moyenne	11,2
CNEVA	FR2	11,4	11,4	11,4	Valeur réelle	11,0
LODI	IT	11,1	11,3	11,2	Écart-type de répétabilité (Sr)	0,09
EELA	FI	11,3	11,2	11,3	Écart-type relatif de répétabilité (RSDr %)	0,80
D.V.F.A.	DK	13,3	11,8	12,6	Répétabilité r (95 %)	0,25
					Répétabilité relative r %	2,24
					Écart-type de reproductibilité (SR)	0,13
					Écart-type relatif de reproductibilité (RSDR %)	1,16
					Reproductibilité R (95 %)	0,36
					Reproductibilité relative R %	3,25
Échantillon B		R_1	R_2	Moyenne	Nombre de laboratoires retenu après élimination des valeurs aberrantes	6
RENNES	FR1	12,7	12,8	12,8	Nombre de valeurs aberrantes	1
RIKILT	NL	13,5	13,3	13,4	Valeurs aberrantes	DK
ADAS	GB	13,4	13,5	13,5	Valeur moyenne	13,3
CNEVA	FR2	13,3	13,4	13,4	Valeur réelle	13,5
LODI	IT	13,9	13,5	13,7	Écart-type de répétabilité (Sr)	0,15
EELA	FI	13,4	13,2	13,3	Écart-type relatif de répétabilité (RSDr %)	1,13
D.V.F.A.	DK	14,1	14,8	14,5	Répétabilité r (95 %)	0,42
					Répétabilité relative r %	3,16
					Écart-type de reproductibilité (SR)	0,33
					Écart-type relatif de reproductibilité (RSDR %)	2,48
					Reproductibilité R (95 %)	0,93
					Reproductibilité relative R %	6,94

Tableau 4

Résultats statistiques de la méthode TG

Échantillon C		R_1	R_2	Moyenne	Nombre de laboratoires retenu après élimination des valeurs aberrantes	6
RENNES	FR1	8,9	9,2	9,1	Nombre de valeurs aberrantes	1
RIKILT	NL	9,2	9,3	9,3	Valeurs aberrantes	DK
ADAS	GB	9,5	9,3	9,4	Valeur moyenne	9,3
CNEVA	FR2	9,4	9,4	9,4	Valeur réelle	9,3
LODI	IT	9,2	9,5	9,4	Écart-type de répétabilité (Sr)	0,15
ËÈLA	FI	9,4	9,6	9,5	Écart-type relatif de répétabilité (RSDr %)	1,61
D.V.F.A.	DK	10,7	10,9	10,8	Répétabilité r (95 %)	0,42
					Répétabilité relative r %	4,51
					Écart-type de reproductibilité (SR)	0,19
					Écart-type relatif de reproductibilité (RSDR %)	2,04
					Reproductibilité R (95 %)	0,53
					Reproductibilité relative R %	5,71
Échantillon D		R_1	R_2	Moyenne	Nombre de laboratoires retenu après élimination des valeurs aberrantes	6
RENNES	FR1	1,6	1,6	1,6	Nombre de valeurs aberrantes	1
RIKILT	NL	2,1	2,1	2,1	Valeurs aberrantes	DK
					Valeur moyenne	2,1
ADAS	GB	2,1	2,2	2,2	Valeur réelle	2,1
CNEVA	FR2	2,1	2,1	2,1	Écart-type de répétabilité (Sr)	0,09
LODI	IT	2,2	1,9	2,1	Écart-type relatif de répétabilité (RSDr %)	4,29
EELA	FI	2,3	2,3	2,3	Répétabilité r (95 %)	0,26
D.V.F.A.	DK	3,4	2,9	3,2	Répétabilité relative r %	12,01
					Écart-type de reproductibilité (SR)	0,25
					Écart-type relatif de reproductibilité (RSDR %)	11,90
					Reproductibilité R (95 %)	0,69
					Reproductibilité relative R %	33,32

Tableau 5

Répétabilité et reproductibilité (avec FAME)

	Nb. de labos	Valeur aberrante	Répétabilité Sr (95 %)	Reproductibilité SR (95 %)
Échantillon A	8	1	0,09	0,23
Échantillon B	8	1	0,14	0,35
Échantillon C	8	1	0,14	0,17
Échantillon D	8	1	0,08	0,24
Valeur collective			0,116	0,256
			R	**R**
Valeur collective* 2,8			**0,324**	**0,716**

CrD95 = 0,40

Pureté minimum indiquée pour le triheptanoate = 95 %

Limite minimum indiquée pour la teneur de la graisse butyrique en triheptanoate = 11 kg/t

Si l'on prend en considération la différence critique pour un seuil de probabilité de 95 %, la moyenne des deux résultats ne doit pas être inférieure à:

en cas d'incorporation de triheptanoate d'une pureté de 95 %: 10,05 kg/t.

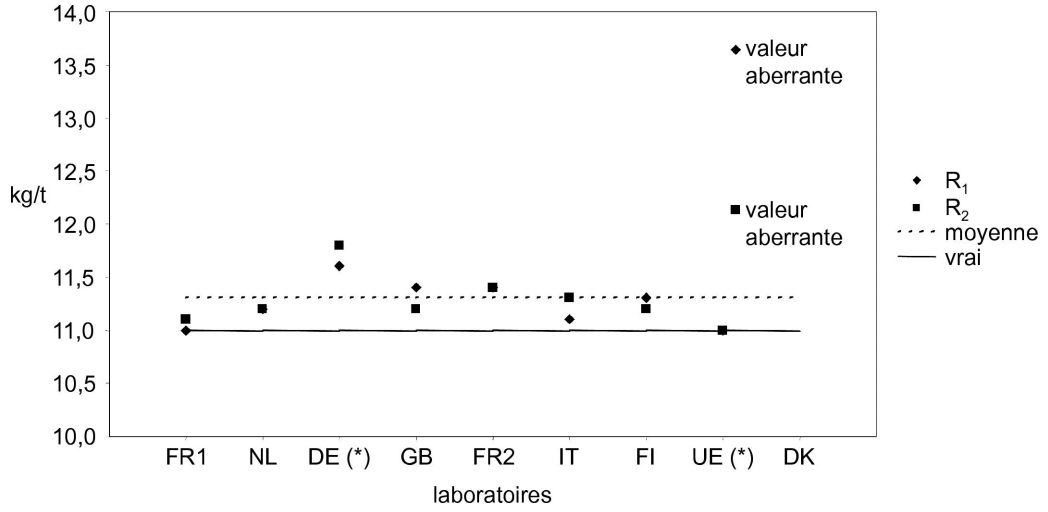
Répétabilité et reproductibilité (sans FAME)

	Nb. de labos	Valeur aberrante	Répétabilit Sr (95 %)	Reproductibilité SR (95 %)
Échantillon A	6	1	0,09	0,13
Échantillon B	6	1	0,15	0,33
Échantillon C	6	1	0,15	0,19
Échantillon D	6	1	0,09	0,25
Valeur collective			0,124	0,237
			r	**R**
Valeur collective * 2,8			**0,347**	**0,663**

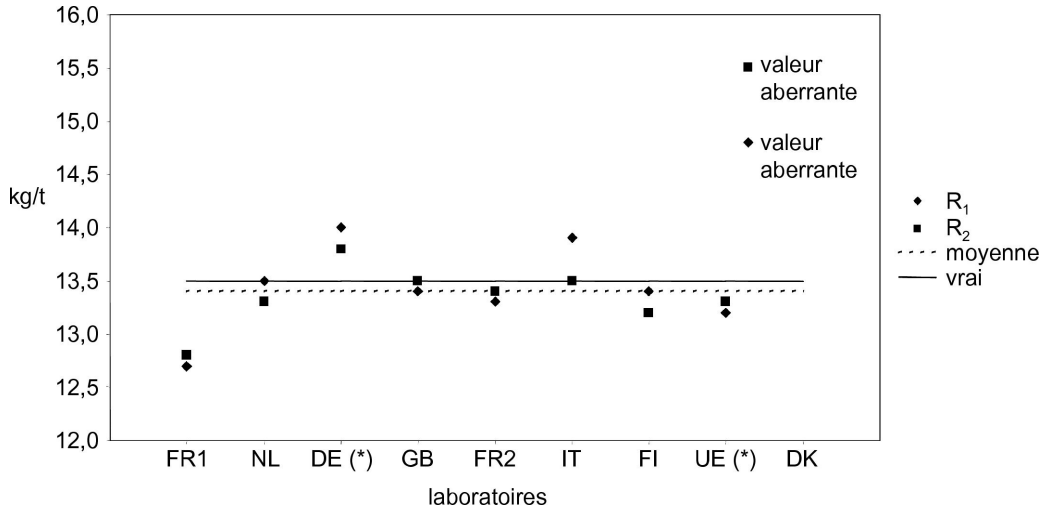
CrD95 = 0,36
Pureté minimum indiquée pour le triheptanoate = 95 %
Teneur limite minimum indiquée de la graisse butyrique en triheptanoate = 11 kg/t
Si l'on prend en considération la différence critique pour un seuil de probabilité de 95 %, la moyenne des deux résultats ne doit pas être inférieure à:
en cas d'incorporation de triheptanoate d'une pureté de 95 %: 10,09 kg/t.

Figure 1 (*)

Résultat de l'expérience: Échantillon A

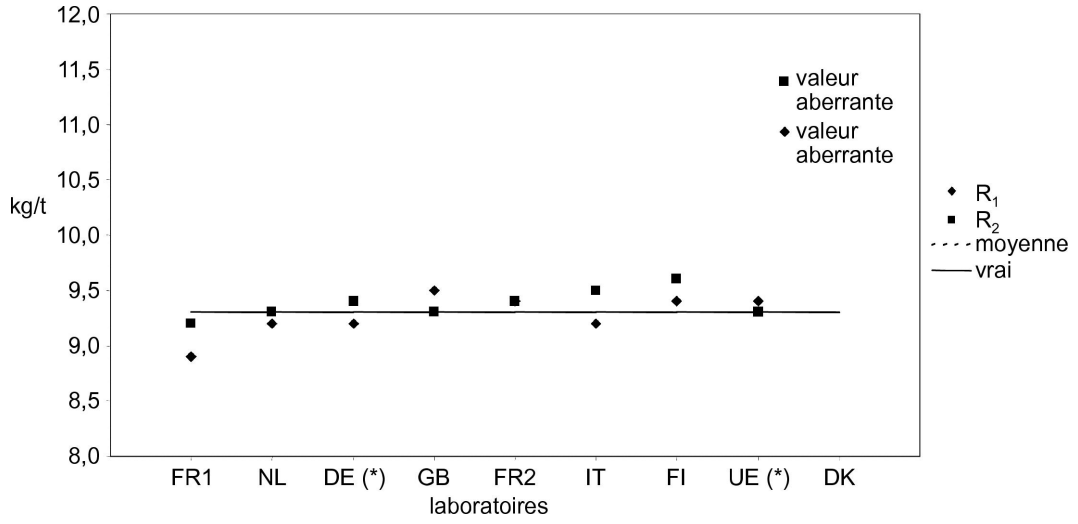


Résultat de l'expérience: Échantillon B



(*) = méthode FAME

Résultat de l'expérience: Échantillon C



Résultat de l'expérience: Échantillon D

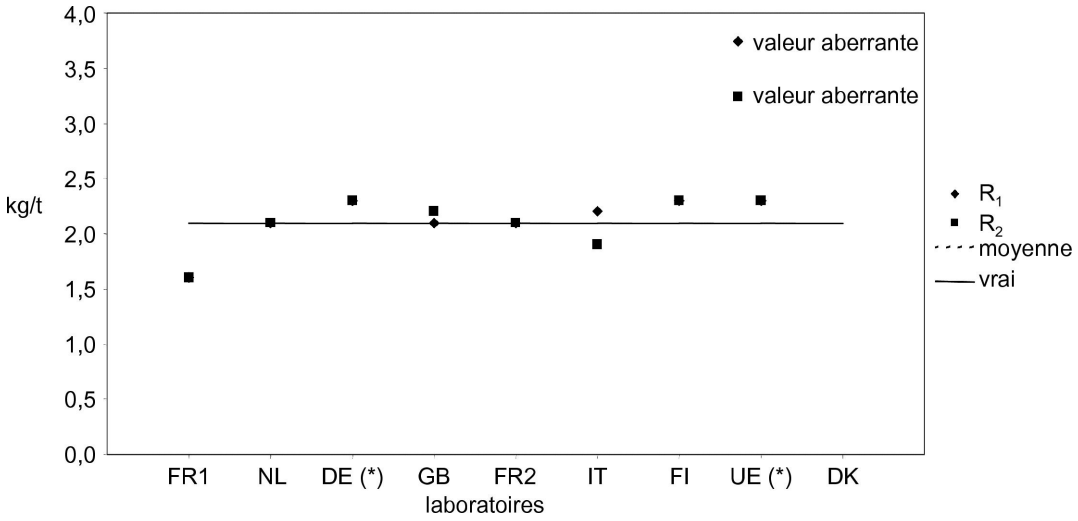


Figure 2

Écart type de répétabilité et de reproductibilité à différents seuils (TG+FAME)

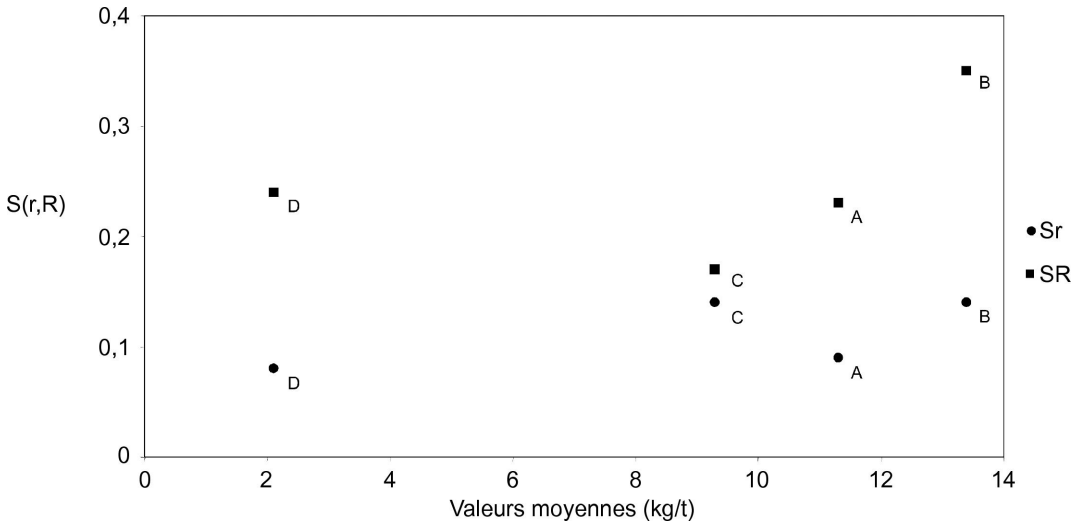


Figure 3

Écart type de répétabilité et de reproductibilité à différents seuils (TG)

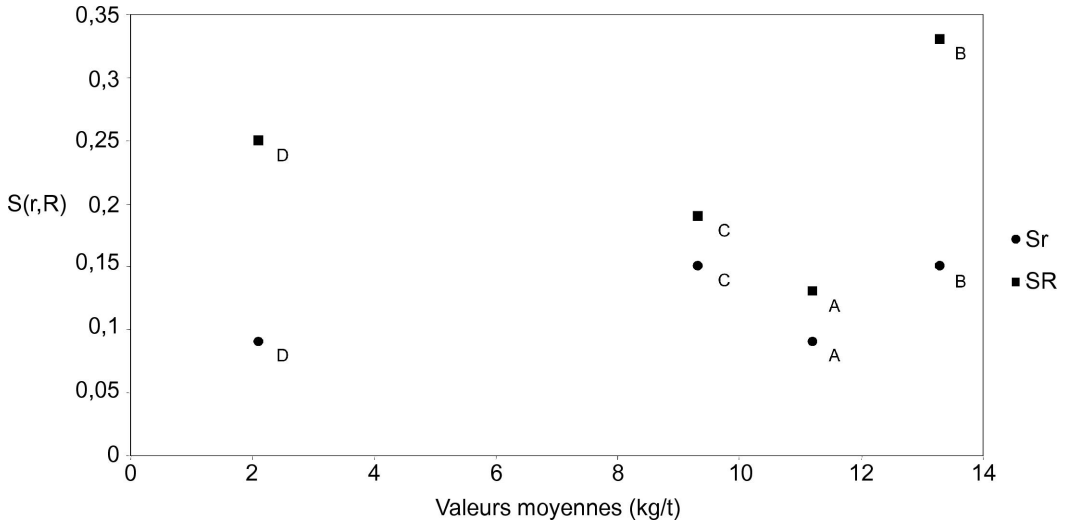
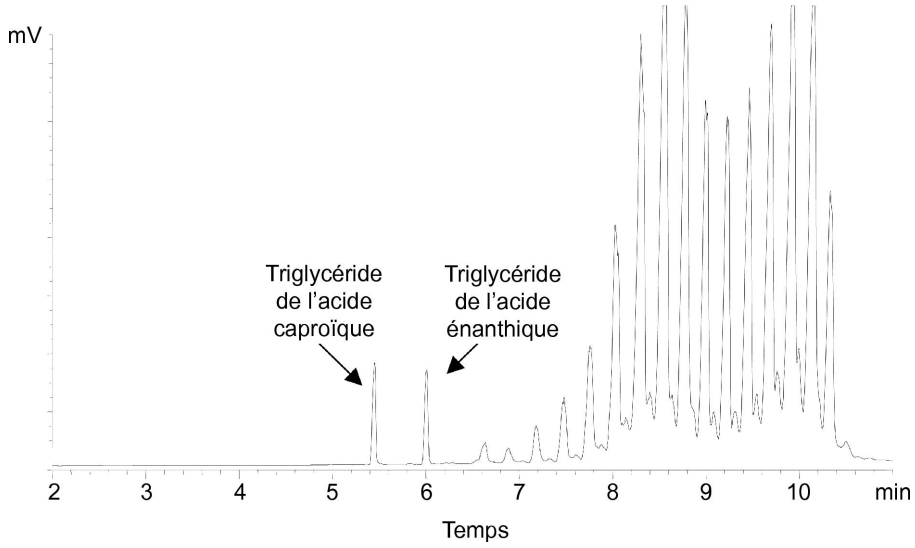


Figure 4

Exemple d'utilisation d'un injecteur on-column



ANNEXE VI

(Article 5)

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN VANILLINE DU BEURRE CONCENTRÉ, DU BEURRE OU DE LA CRÈME PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

1. OBJET ET CHAMP D'APPLICATION

La méthode décrit un mode opératoire permettant la détermination quantitative de la vanilline dans le beurre, le beurre concentré ou 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 d'une centrifugation.

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

3. INSTRUMENTS

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 membrane (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 (débit 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 Å 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 × 4,6 mm ID), garnie avec la phase LiChrospher RP 18 (Merck, 5 µm) ou équivalent

3.6. précolonne (environ 20 mm × 3 mm ID) garnie à sec avec la phase Perisorb RP 18 (5 à 10 µm) ou équivalent

3.7. Centrifugeuse fonctionnant à 2 000 t/min.

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) selon un rapport de 1:1:2 (v/v).

4.5. Vanilline (4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde) ≥ 98 %

4.5.1. *Solution mère de vanilline (= 500 µg/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 µg/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.

4.5.3. *Méthanol, qualité CLHP*

4.5.4. *Acide acétique, glacial*

4.5.5. *Eau, qualité CLHP*

4.5.6. *Phase mobile CLHP*

Mélanger 300 ml de méthanol (4.5.3) à environ 500 ml d'eau (4.5.5) et à 20 ml d'acide acétique (4.5.4) dans une fiole jaugée de 1 000 ml et compléter avec de l'eau (4.5.5). Filtrer à travers un filtre (0,45 µm) (3.3).

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. **Préparation de l'échantillon d'essai**

5.1.1. *Beurre*

Chauffer l'échantillon jusqu'à ce qu'il commence à fondre. Éviter toute surchauffe locale au-dessus de 30 °C. Le beurre ne peut en aucun cas se séparer en deux phases. 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, faute de quoi l'opération doit être recommencée. Introduire dans une fiole jaugée de 100 ml environ 10 g (g SM) de crème et la 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 minutes 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 minutes. Centrifuger l'extrait froid pendant 5 minutes à environ 2 000 t/min et décanter immédiatement. Laisser la solution décantée revenir 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. À l'aide d'une seringue (3.2), filtrer une partie aliquote à travers un microfiltre à membrane (3.3). Le filtrat est prêt pour la détermination par CLHP.

5.3. **Étalonnage**

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'au trait. Cette solution contient 0,5 µg/ml de vanilline.

5.4. **Détermination par CLHP**

Laisser le système chromatographique se stabiliser pendant environ 30 minutes. 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 minutes. Analyser la solution étalon (5.3) en double en injectant 20 µl. Injecter 20 µl des solutions d'essai (5.2). Déterminer l'aire ou la hauteur du pic de vanilline obtenu. Recommencer l'injection en double de solution étalon (5.3) après 10 injections d'échantillons d'essai (5.2).

6. CALCUL DES RÉSULTATS

Calculer l'aire (ou la hauteur) moyenne (AC) des pics de vanilline correspondant aux injections en double encadrant chaque lot de solutions d'essai (4 aires ou hauteurs au total).

Calculer le coefficient 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:

$$C = \left|(AS \times 20 \times 0{,}96) / (SM \times R)\right|$$

où:

AS = aire ou hauteur 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).

Note: Lorsque la crème est analysée pour la détermination de la vanilline, on doit exprimer la concentration du traceur en mg de traceur/kg de matières grasses butyriques en multipliant C par 100/f, f étant la teneur en matières grasses 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 matières grasses lors de la première dilution de l'échantillon d'essai

Note: On peut utiliser les hauteurs de pics au lieu de l'aire 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 laboratoires différents, 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 le traçage concerne la crème, le taux d'incorporation est de 250 g par tonne de matières grasses butyriques.

8.2.2. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, le plus faible de ces résultats étant comparé avec les limites suivantes:

— 220,8 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal),

— 158,3 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 220,8 mg/kg et 158,3 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 de 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde est de 100 g par tonne de beurre concentré ou de beurre. Lorsque le traçage concerne la crème, le taux d'incorporation est de 100 g par tonne de matières grasses butyriques.

8.3.2. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, le plus faible de ces résultats étant comparé avec les limites suivantes:

— 78,3 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal),

— 53,3 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 78,3 mg/kg et 53,3 mg/kg.

9. NOTES

9.1. 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 constatée était de 99,9 % avec un écart type de 2,7 %.

9.2. 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. Cette manière de procéder permet une quantification par hauteur de pic.

9.3. L'analyse se fonde sur une ligne d'étalonnage linéaire (intercept: zéro).

9.4. 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. La vanilline peut se décomposer en acide vanillique, en divanilline et d'autres composés sous l'effet des enzymes intrinsèques contenus dans la crème non pasteurisée ou les produits de celle-ci.

ANNEXE VII

(Article 5)

DÉTERMINATION DE LA QUANTITÉ D'ESTER ÉTHYLIQUE DE L'ACIDE β-APO-8'-CAROTÉNIQUE DANS LE BEURRE CONCENTRÉ ET LE BEURRE PAR SPECTROMÉTRIE

1. OBJET ET CHAMP D'APPLICATION

La méthode décrit une procédure permettant la détermination quantitative de l'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. INSTRUMENTS

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 d'une longueur optique de 1 cm

3.3. Fioles jaugées de 20 ml et 100 ml

3.4. Balance analytique d'une sensibilité de 0,1 mg, capable de peser au mg près, lisibilité de 0,1 mg

3.5. Four à 45 °C ± 1 °C

3.6. Filtres sans cendres à filtration rapide

4. RÉACTIFS

Tous les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

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

4.1.1. Établir le contenu de la suspension comme suit:

Chauffer la suspension entre 45 °C et 50 °C et l'homogénéiser dans l'emballage original fermé. Peser environ 400 mg dans une fiole jaugée (100 ml), les dissoudre dans 20 ml de chloroforme (4.4) et compléter en 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 cellules d'une longueur optique de 1 cm).

Teneur en ester apo-caroténique P (%) = $(Abs_{max} \times 40\,000)/(M_{susp} \times 2\,550)$ **ou** forme développée: $(Abs_{max}/2\,550) \times (100/5) \times (100/5) \times (100/M_{susp})$

Abs_{max} = absorbance maximale de la solution de mesure

M_{susp} = masse de la suspension (g)

2 550 = valeur d'absorbance de référence (1 %, 1 cm)

P = Pureté (teneur) de la suspension (%)

Note: 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 rapidement.

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

Prélever, à 1 mg près, environ 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 jaugée 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.

Note: la solution doit être stockée dans un endroit frais, à l'abri de la lumière. Après un mois, elle n'est plus utilisable.

4.2. Essence minérale (40-60 °C)

4.3. Sulfate de sodium, anhydre, en granulés, préalablement séché à 102 °C pendant 2 heures

4.4. Chloroforme

4.5. Cyclohexane

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. **Préparation de l'échantillon d'essai**

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 représentative 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 être maintenue à 45 °C. Prélever une quantité appropriée de graisse butyrique.

5.2. **Détermination**

Peser, à 1 mg près, environ 1 g de beurre concentré ou de graisse butyrique extraite (5.1.2), (M). Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 20 ml (V), 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 en prenant comme blanc de l'essence minérale. On obtient la concentration d'ester apo-caroténique dans la solution par référence à la courbe d'étalonnage (C µ/ml).

5.3. **Étalonnage**

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

Les concentrations des solutions s'échelonnent approximativement entre 0 et 2 µg/ml et sont calculées de manière précise par référence à la concentration de la solution étalon (4.1.2), (W × P)/10 mg/ml. Mesurer les absorbances à 440 nm en prenant comme blanc de l'essence minérale (4.2).

Reporter les valeurs d'absorbance sur l'axe des ordonnées et les concentrations d'ester apo-caroténique sur l'axe des abscisses. Calculer l'équation de la courbe type.

6. CALCUL DES RÉSULTATS

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

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 = masse (g) de la prise d'essai (5.2)

0,82 = un coefficient correcteur pour la teneur en graisse butyrique du beurre

7. PRÉCISION DE LA MÉTHODE

7.1. **Répétabilité**

7.1.1. *Analyse du beurre*

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées, dans l'intervalle de temps le plus court possible, sur du matériel d'essai identique et par un seul opérateur utilisant le même appareillage ne doit pas dépasser 1,4 mg/kg.

7.1.2. *Analyse du beurre concentré*

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées, dans l'intervalle de temps le plus court possible, sur du matériel d'essai identique et par un seul opérateur utilisant le même appareillage ne doit pas dépasser 1,6 mg/kg.

7.2. **Reproductibilité**

7.2.1. *Analyse du beurre*

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées sur du matériel d'essai identique par des opérateurs travaillant dans des laboratoires différents et utilisant un appareillage différent ne doit pas dépasser 4,7 mg/kg.

7.3. **Analyse du beurre concentré**

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées sur du matériel d'essai identique par des opérateurs travaillant dans des laboratoires différents et utilisant un appareillage différent ne doit pas dépasser 5,3 mg/kg.

7.4. **Source des données de précision**

Les données de précision ont été définies sur la base d'une expérience menée en 1995 qui impliquait onze laboratoires et 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. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, le plus faible de ces résultats étant comparé avec les limites suivantes:

— 17,7 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal),

— 12,2 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 17,7 mg/kg et 12,2 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.

Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, le plus faible de ces résultats étant comparé avec les limites suivantes:

— 19,2 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal),

— 13,2 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 19,2 mg/kg et 13,2 mg/kg.

ANNEXE VIII

(Article 5)

DÉTERMINATION DU SITOSTÉROL OU DU STIGMASTÉROL DANS LE BEURRE OU LE BEURRE CONCENTRÉ PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE AVEC COLONNE CAPILLAIRE

1. OBJET ET CHAMP D'APPLICATION

La méthode décrit une procédure permettant la détermination quantitative du sitostérol ou du stigmastérol dans le beurre et le beurre concentré. 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 ou le beurre concentré est saponifié à l'aide d'hydroxyde de potassium dans une solution d'éthanol et les insaponifiables sont extraits à l'aide d'éther diéthylique.

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. INSTRUMENTS

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 diéthylique à éliminer

3.5. Colonne de verre, de 350 mm × 20 mm, dotée d'un raccord 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 fractionnement 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. Une colonne capillaire de silice fondue entièrement recouverte de BP1 ou d'une substance équivalente (ou toute autre colonne permettant d'obtenir une résolution au moins équivalente) sur une épaisseur uniforme de 0,25 μm; la colonne doit être en mesure de séparer les dérivés triméthyl-silyl du lanostérol et du sitostérol. Une colonne BP1 de 12 m de longueur et de 0,2 mm de diamètre interne est appropriée.

3.10. Microseringue à aiguille en acier trempé pour chromatographie en phase gazeuse de 1 μl

4. 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.

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 péroxydes 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 l'aire 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 (W_1) 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 standard de stigmastérol — préparer une solution à 0,001 mg/ml près, contenant environ 0,2 mg/ml (W_1) 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 (voir 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 diéthylique sous un flux d'azote. Ajouter 1 ml de solution interne (4.3.1.1) et éliminer l'éther diéthylique 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 diéthylique sous un flux d'azote. Ajouter 1 ml de solution étalon interne (4.3.1.2) et éliminer l'éther diéthylique 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 (W_2) ou de beurre concentré (W_2) 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 éthérée 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 éthérée limpide et exempte de savon à travers 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 une bille 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 diéthylique et éliminer l'éther sous un flux d'azote. Laver le ballon avec deux parties aliquotes supplémentaires de 2 ml d'éther diéthylique 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 ce processus. Cette présence peut résulter d'un lavage insuffisant lors de l'extraction. Si le 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: 265 °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 division doit être optimisé en fonction des instructions du fabricant et de la linéarité de la réponse du détecteur et validée ensuite pour l'étendue des concentrations considérées.

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 doivent 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 d'étalonnage de l'intégrateur.

Injecter à 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 l'aire 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 l'aire 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 l'aire 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 = (aire moyenne du pic de stérol dans l'étalon)/(aire moyenne du pic de bétuline dans l'étalon)

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

R_2 = (aire du pic de stérol dans l'échantillon)/(aire 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)

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

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 le plus court possible, sur du matériel d'essai identique et par un seul opérateur utilisant le même appareillage 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, sur du matériel d'essai identique et par un seul opérateur utilisant le même appareillage 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 des 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 de deux déterminations effectuées, dans l'intervalle le plus court possible, sur du matériel d'essai identique par un seul opérateur utilisant le même appareillage 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, sur du matériel d'essai identique par un seul opérateur utilisant le même appareillage 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 sur du matériel d'essai identique par des opérateurs dans des laboratoires différents utilisant des appareillages différents ne doit pas dépasser 25,3 mg/kg.

7.2.2.2. Sitostérol

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

7.2.3. *Source des données de précision*

Les données de précision ont été déterminées à partir d'une expérience menée en 1991 dans neuf laboratoires et concernant six échantillons (trois en double aveugle) pour le stigmastérol et six échantillons (trois 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 du stigmastérol est de 150 g de stigmastérol pur à au moins 95 % par tonne de beurre, soit 142,5 mg/kg, ou de 170 g de stigmastérol pur à au moins 85 % par tonne de beurre, soit 144,5 mg/kg.

8.2.1.2. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, le plus faible de ces résultats étant comparé avec les limites suivantes:

— 115,8 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 95 %),

— 117,7 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 85 %),

— 80,1 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 95 %),

— 81,5 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 115,8 mg/kg et 80,1 mg/kg ou entre 117,7 mg/kg et 81,5 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, soit 540 mg/kg

8.2.2.2. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, le plus faible de ces résultats étant comparé avec les limites suivantes:

— 482,6 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du sitostérol pur à 90 %),

— 347,6 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 482,6 mg/kg et 347,6 mg/kg.

8.3. **Beurre concentré**

8.3.1. *Stigmastérol*

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

8.3.1.2. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, le plus faible de ces résultats étant comparé avec les limites suivantes:

— 118,5 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 95 %),

— 120,4 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 85 %),

— 82,9 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 95 %),

— 84,3 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 118,5 mg/kg et 82,9 mg/kg ou entre 120,4 mg/kg et 84,3 mg/kg.

8.3.2. *Sitostérol*

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

8.3.2.2. Les résultats des trois échantillons obtenus suite à l'analyse du produit servent à vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, le plus faible de ces résultats étant comparé avec les limites suivantes:

— 480,9 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du sitostérol pur à 90 %),

— 345,9 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 480,9 mg/kg et 345,9 mg/kg.

Figure 1

Chromatogramme du mélange pour le test de résolution

Une résolution complète est préférable, c'est-à-dire que le tracé des pics du lanostérol doit revenir à la ligne de base avant de partir vers le pic de sitostérol. Une résolution incomplète est toutefois acceptable.

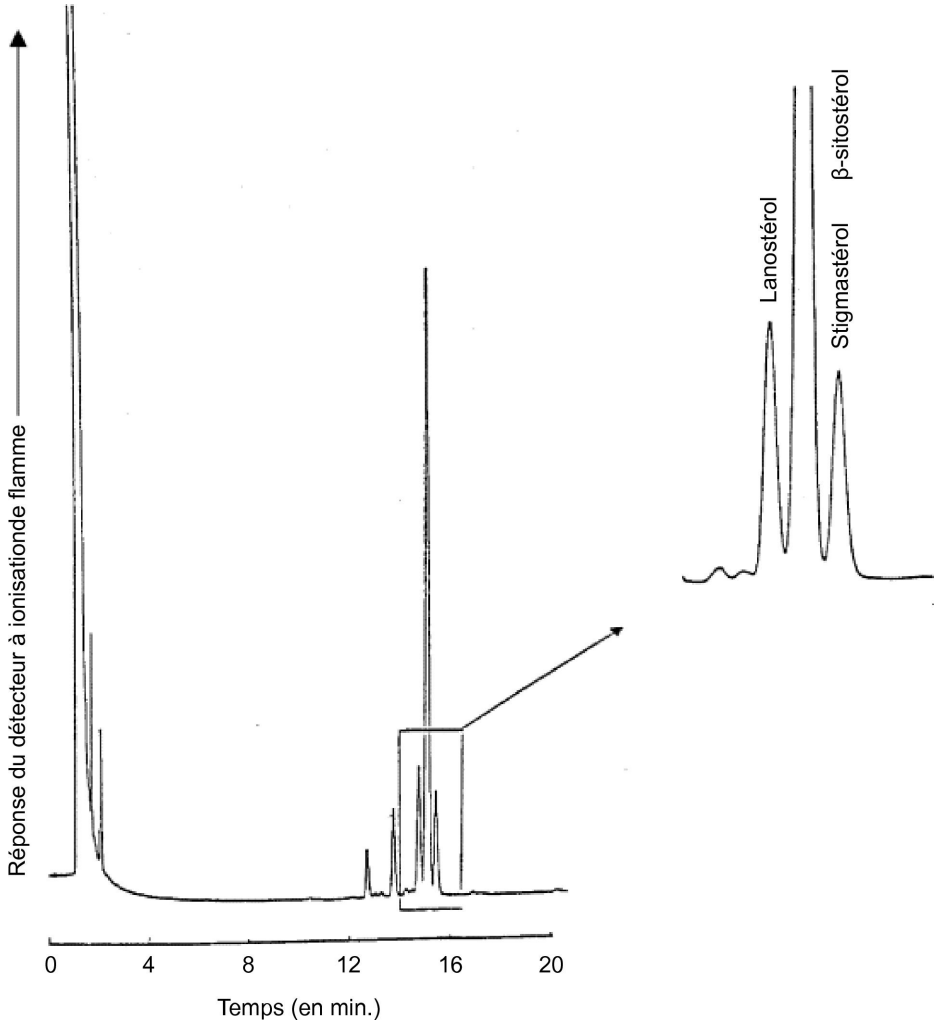


Figure 2a

Stigmastérol étalon

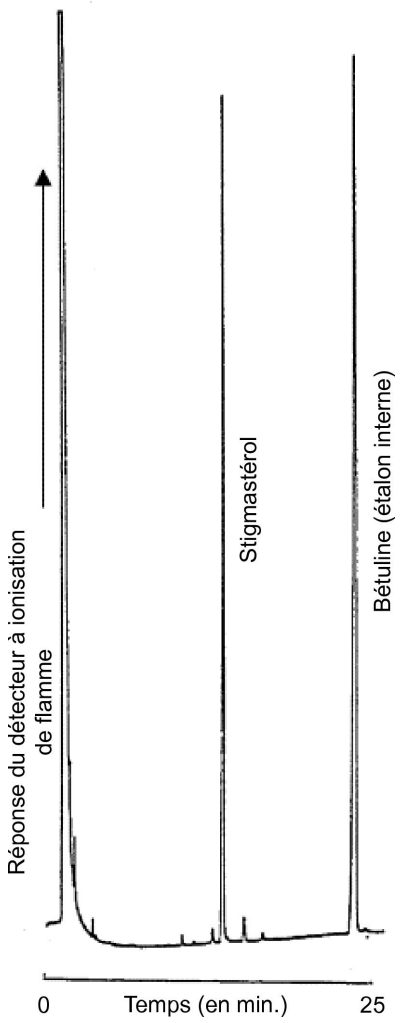
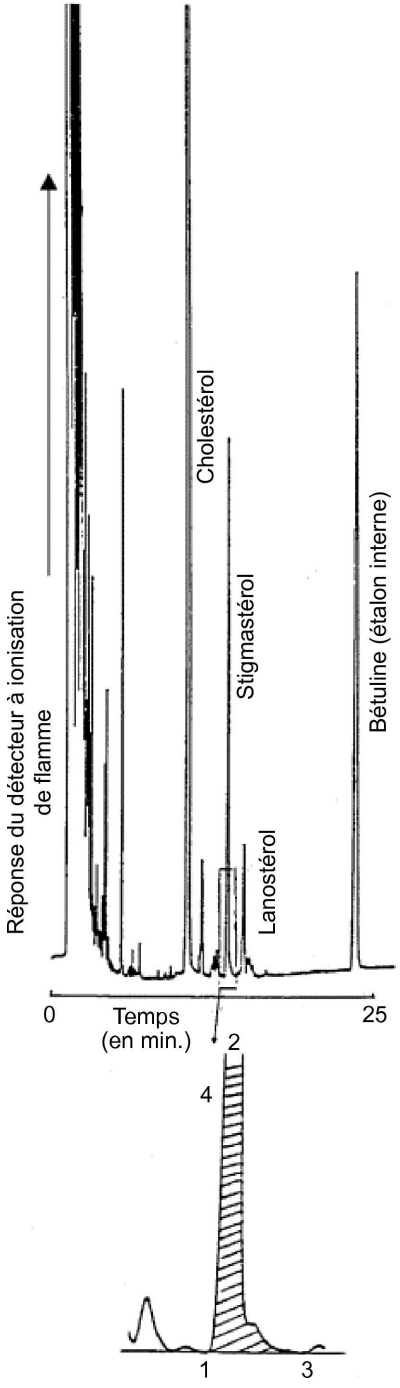


Figure 2b

Échantillon de beurre dénaturé par le stigmastérol



Note: L'intégration du pic du stigmastérol doit comporter les traînées indiquées par les points 1, 2 et 3

Figure 3a

Sitostérol étalon

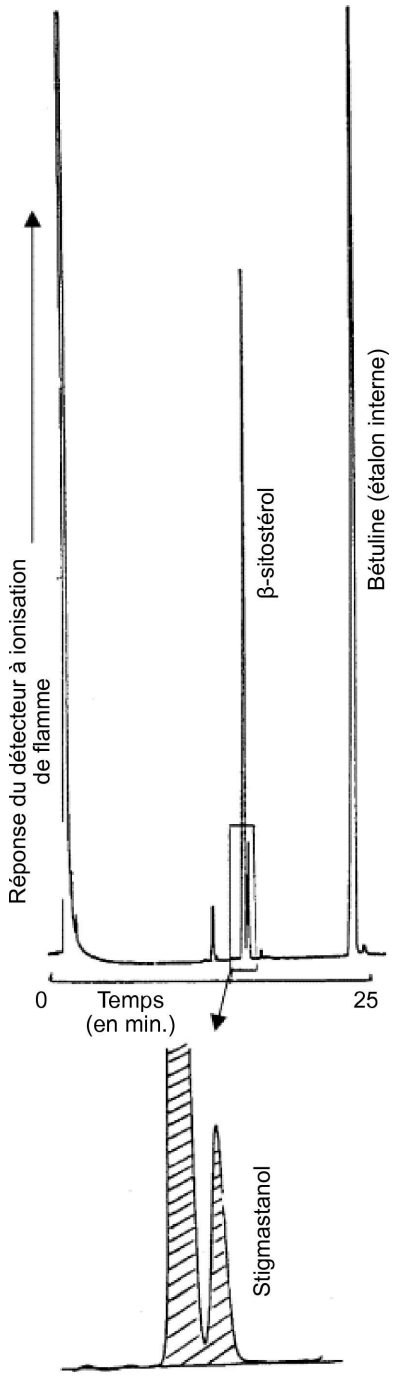
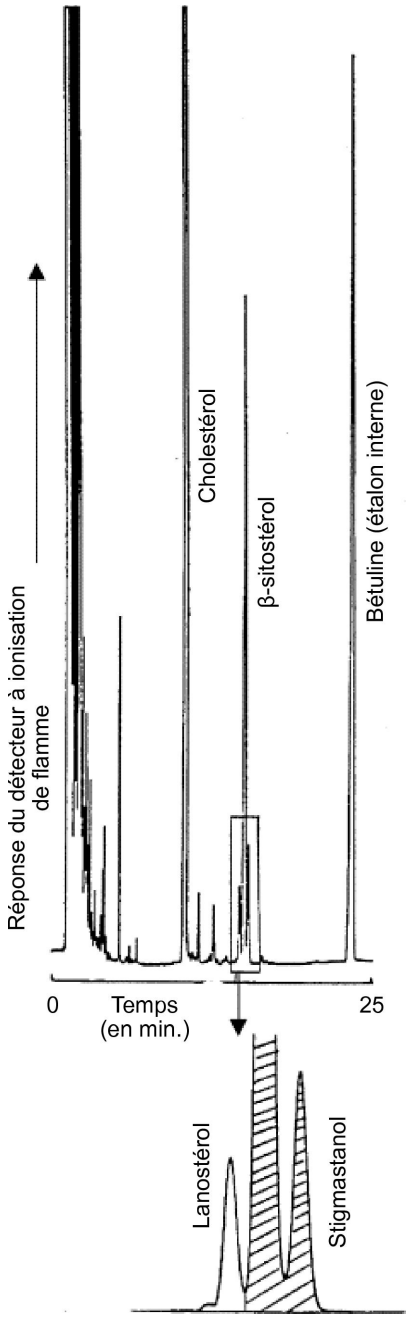


Figure 3b

Échantillon de beurre dénaturé par le β-sitostérol



Note: Le β-sitostérol contient fréquemment une impureté (appelée stigmastanol) éluée immédiatement après le β-sitostérol. L'aire de ces deux pics s'additionne lors de l'évaluation du β-sitostérol total présent.

ANNEXE IX

(Article 6)

MÉTHODE DE RÉFÉRENCE POUR LA DÉTECTION DE CASÉINATES ET DE LAIT DE VACHE 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 caséinates et de lait de vache 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 après action de la plasmine.

2. CHAMP D'APPLICATION

Cette méthode convient pour la détection sensible et spécifique de caséinates et de lait de vache 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 colorés (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 de qualité analytique. L'eau doit être bidistillée ou d'une pureté équivalente.

Note: Les informations ci-après s'appliquent aux gels de polyacrylamide contenant de l'urée et préparés en laboratoire, de dimensions 265 × 125 × 0,25 mm. En présence d'autres dimensions et d'autres types de gels, il peut être nécessaire d'adapter 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 de gel*

Dissoudre:

4,85 g d'acrylamide

0,15 g de 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.

Note: 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 cette solution a une concentration de 30 % m/v d'acrylamide et 0,8 % m/v de bis-acrylamide, les quantités indiquées dans la préparation susmentionnée doivent être remplacées par un volume de 16,2 ml de cette solution. La solution mère ne peut être conservée que dix jours au maximum. Si sa conductivité est supérieure à 5 µS, déioniser en mélangeant avec 2 g d'Amberlite MB-3 pendant 30 minutes, ensuite filtrer à travers une membrane de 0,45 µm.

4.1.2. *Solution de gel*

Préparer une solution de gel en mélangeant des additifs et des ampholytes avec la solution mère de gel (4.1.1):

9,0 ml de solution mère de gel

24 mg de β-alanine

500 µl d'ampholyte pH 3,5-9,5 ([1])

250 µl d'ampholyte pH 5-7 ([1])

250 µl 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 minutes.

Note: la solution doit être préparée juste avant d'être coulée (6.2).

4.1.3. *Catalyseurs*

4.1.3.1. N, N, N' N'-tétraméthyléthylènediamine (Temed)

4.1.3.2. Solution de persulfate d'ammonium (PER) à 40 % m/v:

Dissoudre 800 mg de PER dans de l'eau et porter à 2 ml.

Note: 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 de l'échantillon

4.5. **Réactifs destinés à l'isolement des protéines**

4.5.1. *Solution diluée d'acide acétique (25 ml d'acide acétique glacial 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.

Note: stockée 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 un pH de 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.

([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.

4.7.2. *Plasmine bovine (EC. 3.4.21.7), dont l'activité est au minimum de 5 U/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 6-amino-n-hexanoïque) dans 100 ml d'éthanol à 40 % (v/v).

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 intérimaires 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 étalon 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 % m/v. Ajuster la température à 35 °C et ajouter 100 µl de présure de veau (activité 1: 10 000, environ 3 000 U/ml), mélanger pendant 1 minute., 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 ni 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.

Note: 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 trichloracétique dans de l'eau jusqu'à l'obtention d'un volume de 1 000 ml.

4.10. **Solution de décoloration**

Diluer 500 ml de méthanol et 200 ml d'acide acétique glacial dans de l'eau distillée et amener à 2 000 ml.

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

4.11. **Solutions de coloration**

4.11.1. *Solution de coloration (solution mère 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 à une vitesse moyenne.

4.11.2. *Solution de coloration (solution mère 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 mère (4.11.1, 4.11.2) immédiatement avant la coloration.

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

5. INSTRUMENTS

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 du 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 plastique 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 ou en verre (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 (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 λ = 634 nm)

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1. **Préparation des échantillons**

6.1.1. *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 un pH de 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 minutes 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 cette opération 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 à vitesse moyenne. 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.

Note: 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 minutes en utilisant, par exemple, le traitement ultrasonique. Chauffer à 40 °C puis ajouter 10 µl de plasmine (4.7.2), mélanger et laisser incuber une heure à 40 °C sous agitation continue. Pour inhiber l'enzyme, ajouter 20 µl de solution d'acide ε-aminocaproïque (4.7.3), puis ajouter 200 mg d'urée solide et 2 mg de dithiothréitol.

Note: 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 10 µl de Temed (4.1.3.1) à la solution de gel préparée et désaérée (4.1.2), remuer et ajouter 10 µl de solution de PER (4.1.3.2), mélanger soigneusement et déverser le mélange immédiatement et uniformément au centre de la seconde feuille. Placer un bord de la plaque de support du gel (côté feuille vers le bas) sur la plaque de la seconde feuille et l'abaisser lentement jusqu'à formation entre les feuilles d'un film de gel qui s'étale régulièrement sans créer de bulles (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 minutes), 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).

Note: la seconde feuille avec les écarteurs peut être réutilisée. Le gel de polyacrylamide peut être découpé en des dimensions plus petites, ce qui est préconisé en présence d'un faible nombre d'échantillons ou d'un dispositif d'électrophorèse automatique (deux gels, dimensions 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 et verser ensuite 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 des solutions anodique et cathodique (4.3 et 4.4) les bandes pour électrodes; 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. *Dimension du gel 265 × 125 × 0,25 mm*

Étapes	Temps (min.)	Tension (V)	Courant (mA)	Puissance (W)	Volt-heures (Vh)
1. Préfocalisation	30	maximum 2 500	maximum 15	constante 4	env. 300
2. Focalisation des échantillons [1]	60	maximum 2 500	maximum 15	constante 4	env. 1 000
3. Focalisation finale	60	maximum 2 500	maximum 5	maximum 20	env. 3 000
	40	maximum 2 500	maximum 6	maximum 20	env. 3 000
	30	maximum 2 500	maximum 7	maximum 25	env. 3 000

[1] Application des échantillons: Après la préfocalisation (étape 1), déposer à l'aide d'une pipette 18 µl des solutions échantillons et étalons sur les applicateurs d'échantillons (10 × 5 mm), les placer sur le gel en les écartant de 1 mm les unes des autres et de 5 mm longitudinalement par rapport à l'anode et appuyer légèrement. Réaliser la focalisation dans les conditions ci-dessus en retirant soigneusement les applicateurs d'échantillons après les 60 minutes de focalisation des échantillons.

Note: 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 mm).

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*

Étapes	Tension	Courant	Puissance	Temp.	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 0 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); les laisser 15 minutes en agitant continuellement.

6.4.2. *Lavage et coloration de la plaque de gel*

Décanter 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). Décanter la solution de décoloration, remplir la cuve avec 250 ml de solution de coloration (4.11.3) et procéder à la coloration pendant 45 minutes en agitant légèrement.

6.4.3. *Décoloration de la plaque de gel*

Décanter 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 pendant 15 minutes 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 minutes) et sécher à l'air (2 à 3 heures) ou à l'aide d'un sèche-cheveux (de 10 à 15 minutes).

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

Note 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 traités à la plasmine.

7. ÉVALUATION

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 les 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 des échantillons et des échantillons de référence afin d'obtenir le même degré d'intensité des caséines γ_2 et γ_3 des laits de brebis, de chèvre et/ou de bufflonne (voir «γ_2 E,G,B» et «γ_3 C» sur 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» sur les figures 4a, b et 5) avec celles des échantillons de référence à 0 et 1 % (brebis, chèvre) ou des échantillons de référence 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 celles 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.

Note: Cette méthode fonctionne de façon satisfaisante s'il existe un signal nettement positif pour les deux caséines γ_2 et γ_3 du 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 du 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/immobilized 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 and 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 µm polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. Electrophoresis 1, 43-56 (1980).*

Figure 1

Schéma de la seconde feuille

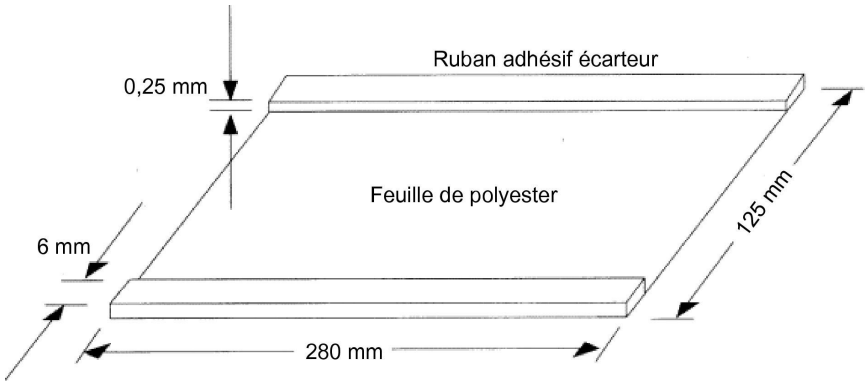


Figure 2

Couche de caséine en flottaison entre les phases aqueuse et organique après centrifugation

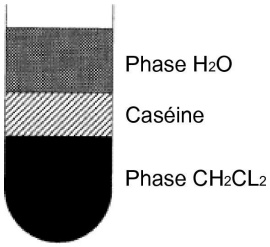
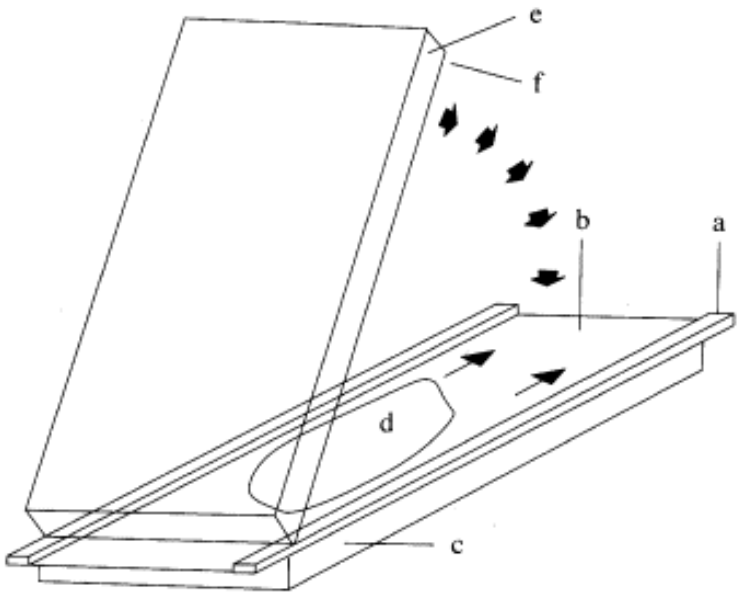


Figure 3

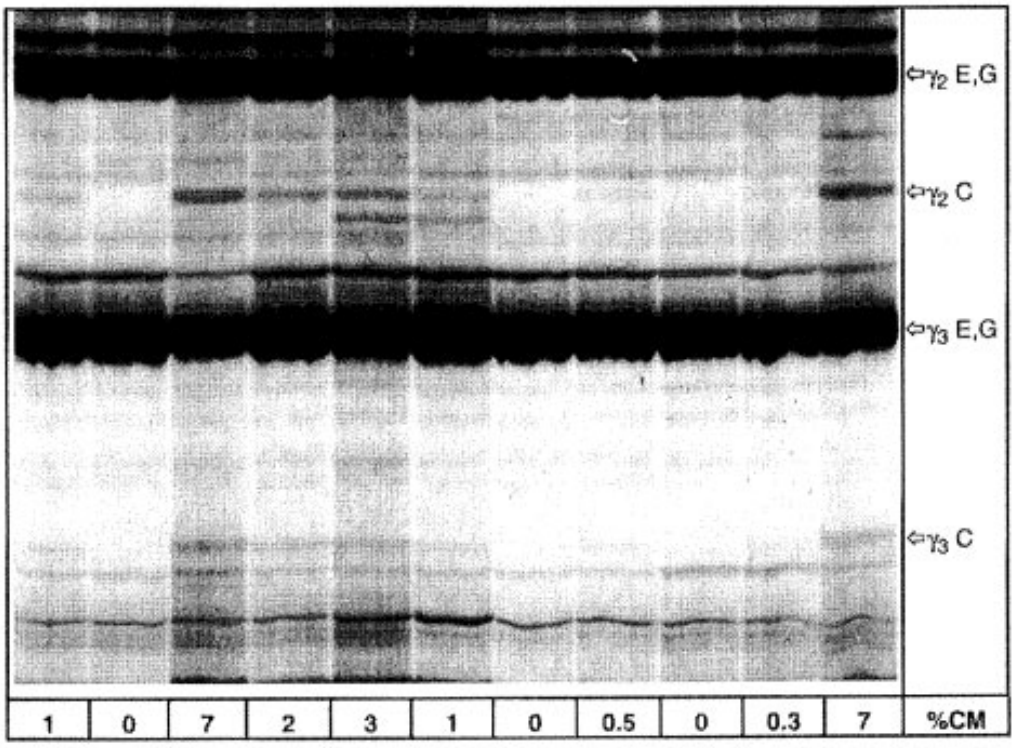
Technique de battement pour la coulée de gels de polyacrylamide ultraminces



a = ruban adhésif 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 du 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

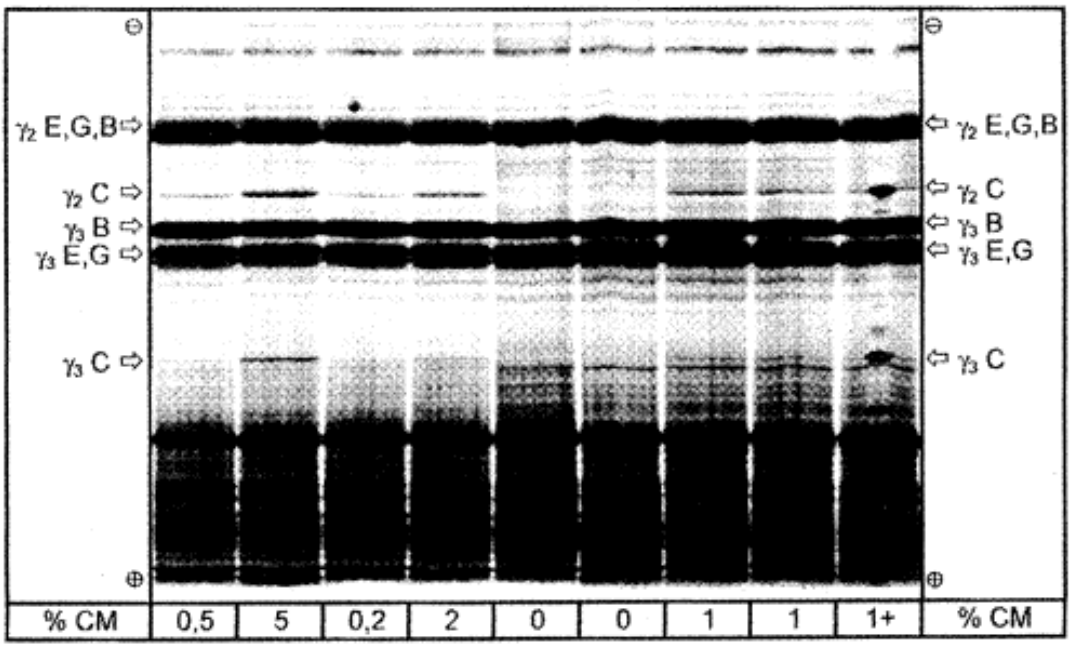


% CM = pourcentage de lait de vache, C = vache, E = brebis, G = chèvre.

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

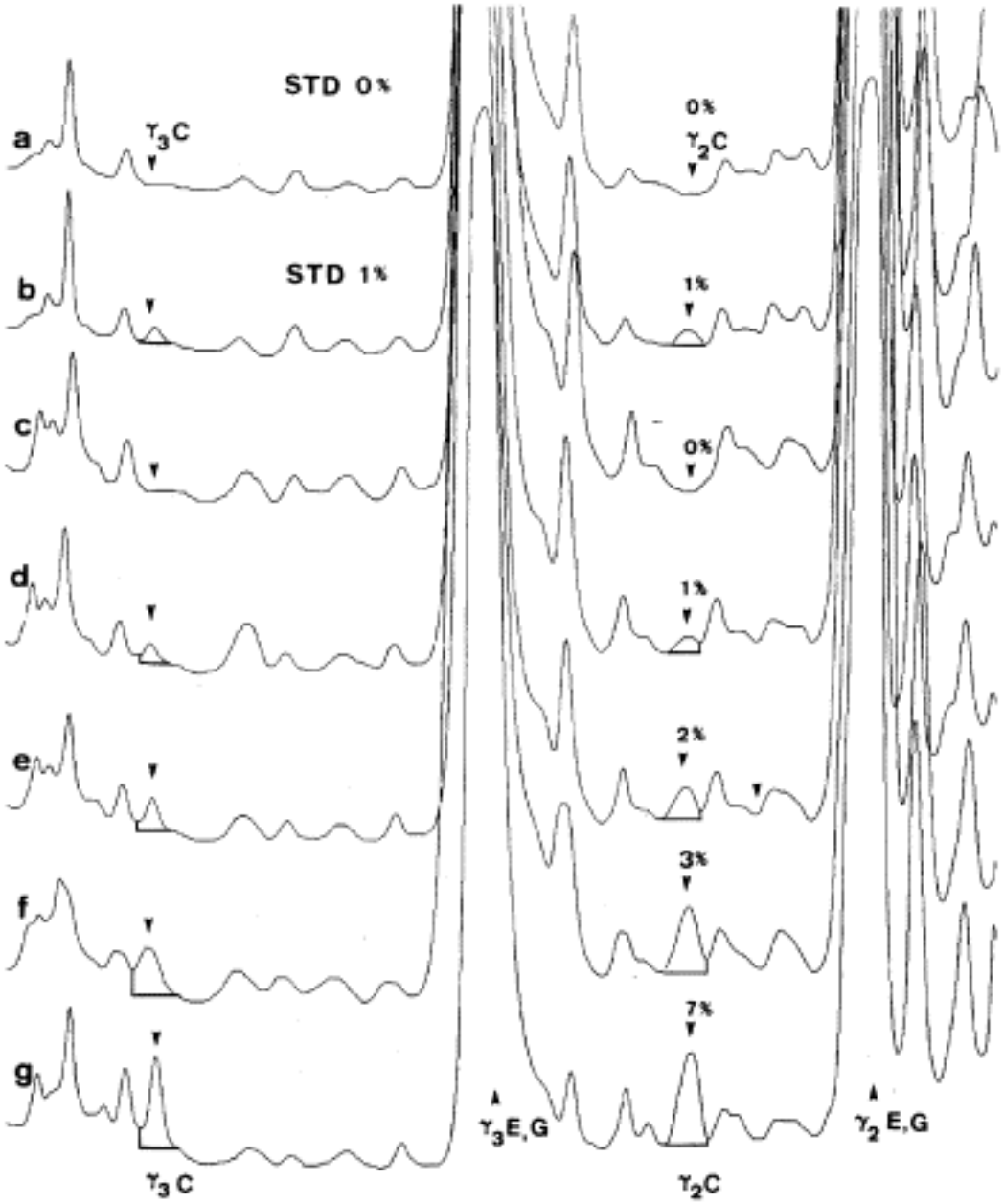


% CM = pourcentage de lait de vache; 1 + = échantillon contenant 1 % de lait de vache et dopé de caséine pure de lait de vache au milieu du trajet. C = vache, E = brebis, G = chèvre, B = bufflonne.

La distance totale de séparation du gel I.E.F. est indiquée.

Figure 5

Superposition de densitogrammes des échantillons de référence (STD) et d'échantillons de fromages à base d'un mélange de lait de brebis et 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 λ = 634 nm.

ANNEXE X

(Article 7)

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

1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Norme ISO 8261.

2. MODE OPÉRATOIRE

Norme ISO 4831.

On inocule dans le milieu de culture des échantillons correspondant à 1 g de beurre ou à 0,1 g de lait écrémé en poudre ou de caséine/caséinates.

On inocule trois tubes par échantillon.

3. RÉSULTATS

Si les 3 tubes produisent 3 résultats négatifs, le résultat est «conforme»

Si les 3 tubes produisent 2 ou 3 résultats positifs, le résultat est «non conforme»

Si les 3 tubes produisent 2 résultats négatifs, l'analyse est refaite deux fois (avec deux tubes)

— Si les 2 résultats sont négatifs, le résultat est «conforme»

— Si au moins 1 résultat est positif, le résultat est «non conforme»

ANNEXE XI

(Article 8)

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN LACTOSE DES ALIMENTS COMPOSÉS POUR ANIMAUX

1. OBJET ET CHAMP D'APPLICATION

Détermination de la teneur en lactose des aliments composés pour animaux.

2. RÉFÉRENCE

La teneur en lactose est définie comme le pourcentage en masse déterminé par la procédure décrite.

3. DÉFINITION

La teneur en lactose anhydre est exprimée en grammes par 100 g.

4. PRINCIPE

Les aliments composés pour animaux sont reconstitués dans l'eau. On ajoute une solution «Biggs» à une partie aliquote diluée et pesée pour extraire par précipitation les fractions de matières grasses et de composants protéiques de l'aliment composé pour animaux. L'échantillon est filtré (ou centrifugé) et le filtrat (ou surnageant) est injecté sur une colonne CLHP échangeuse de cations (forme plomb) en utilisant de l'eau de qualité CLHP comme phase mobile. Le lactose élué est détecté par un réfractomètre différentiel [i].

5. RÉACTIFS

5.1. **Généralités**

Utiliser exclusivement des réactifs de qualité analytique reconnue, sauf indication contraire, et de l'eau de qualité CLHP dégazée.

5.2. **Lactose**

Le D-Lactose monohydraté ($(C_{12}H_{22})O_{11}H_2O$) peut absorber l'humidité en excès. Avant utilisation, mesurer la quantité d'eau réelle à l'aide d'un titrimètre Karl Fischer ou éliminer l'excédent d'humidité en laissant le lactose 8 heures dans un four à 105 °C (ce traitement ne fait pas perdre au lactose son eau cristallisée).

5.3. **Solution Biggs/Szijarto concentrée** [ii]

Dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre 9,10 g d'acétate de zinc dihydraté $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) et 5,46 g d'acide phosphotungstique monohydraté ($H_3[P(W_3O_{10})_4.xH_2O]$) dans environ 70 ml d'eau de qualité CLHP (6.8).

Ajouter 5,81 ml d'acide acétique glacial (CH_3COOH). Diluer jusqu'à la marque des 100 ml avec de l'eau de qualité CLHP (6.8) et mélanger. La solution se conserve 1 an à température ambiante.

5.4. **Solution Biggs/Szijarto diluée**

Diluer 25 ml de solution Biggs/Szijarto concentrée (5.3) dans l'eau jusqu'à la marque des 500 ml à l'aide d'une fiole jaugée. La solution se conserve 1 mois à température ambiante.

5.5. **Préparation d'eau de qualité CLHP**

Filtrer l'eau ultrapure (6.8) à l'aide du système de filtration sous vide (6.9). Pour améliorer les performances de la pompe et obtenir une ligne de base stable, dégazer la phase mobile une fois par jour en choisissant l'une des techniques disponibles, comme le barbotage à l'hélium, la sonication, le dégazage sous vide ou en ligne.

Note: Pour prolonger la durée de vie de la colonne, il est crucial d'avoir une teneur en dioxyde de carbone de l'éluant réduite au minimum et d'éviter le recaptage.

6. INSTRUMENTS

Matériel courant de laboratoire, et notamment les éléments suivants:

6.1. **Colonne CLHP sur résine échangeuse d'ions**

Garnissage de la colonne: copolymère polystyrène-divinylbenzène réticulé à 8 % fonctionnalisé avec des groupes échangeurs d'ions sous la forme plomb.

Dimensions de la colonne: longueur 300 mm, diamètre intérieur environ 8 mm.

Possibilité d'utiliser d'autres diamètres à condition d'ajuster le débit en conséquence.

6.2. **Précolonne**

La précolonne associe un échangeur de cations séparé (H^+) et un échangeur d'anions (CO_3-), qui sont chacun introduits dans des colonnes d'environ 30 mm × 4,6 mm (L × d.i.) (*ex.* micro-précolonnes dans un support de micro-précolonnes) et reliés en série ou sous la forme d'un lit mixte constitué par une AG 50W-X4, – 400 mesh (H^+) et une AG3-X4A, 200-400 mesh (OH-) sous le rapport de 35:65 (m/m) manuellement introduites dans une colonne d'environ 20 × 9 mm (L × d.i.).

6.3. **Four à colonne**

Four capable de maintenir une température constante de 85 °C ± 1 °C.

6.4. **Pompe CLHP**

Pompe capable de générer un débit constant (variations < 0,5 %) à 0,2-1,0 m/min.

6.5. **Dispositif d'injection CLHP**

Autoéchantillonneur capable d'injecter 25 µl et ayant un facteur de répétabilité < 0,5 %.

On peut aussi utiliser un dispositif manuel (mêmes critères que l'auto-échantillonneur).

6.6. **Détecteur CLHP**

Détecteur à indice de réfraction à haute sensibilité ayant un facteur de bruit < 5.10^{-9} unités IR.

6.7. **Intégrateur**

Logiciel ou intégrateur spécial pour l'acquisition des données, le traitement et la génération des aires de pics et des hauteurs de pics, convertibles en concentrations de lactose.

6.8. **Unité de purification de l'eau**

Système capable de produire de l'eau ultrapure (type 1) ayant une résistivité >14 MΩ.cm.

6.9. **Unité de filtration par solvant**

Système permettant la filtration de l'eau à l'aide d'un filtre à membrane d'une taille de pores de 0,45 µm.

Note: De nombreuses unités de purification d'eau (6.8) possèdent un dispositif de filtration de 0,45 ou 0,2 µm. On peut se dispenser d'une étape de filtration supplémentaire si cette eau est utilisée directement.

6.10. **Balance analytique**

Balance ayant un cadran de lecture à 0,1 mg près.

6.11. **Bain-marie**

Bain-marie capable de maintenir une température de 40 °C (± 0,5).

6.12. **Centrifugeuse**

Capable de générer au moins 3 000 g pour des tubes Eppendorf ou des types de fioles équivalents ou plus grands.

6.13. **Fiole jaugée de 50 ml**

Capacité de 50 ml, classe A.

Note: En fonction du coefficient de volume, on peut utiliser des fioles d'une autre capacité.

6.14. **Fiole jaugée de 100 ml**

Capacité de 100 ml, classe A.

6.15. **Pipette graduée**

Pipette graduée de 10 ml

Note: On peut aussi utiliser un pipetteur manuel d'une capacité de 5 ml, auquel cas on ajoutera deux fois un volume de 5 ml de réactif (5.3).

7. ÉCHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon prélevé conformément à la norme ISO 707/FIL 50 [iii], qui soit vraiment représentatif et n'ait pas été endommagé lors du transport ou du stockage.

8. PRÉPARATION DE LA SOLUTION ÉTALON DE LACTOSE

8.1. **Étalon 1**

Dans une fiole jaugée de 100 ml (5.2) dissoudre, après l'avoir pesée avec précision (lecture à 0,1 mg près), une quantité d'environ 50 mg de lactose monohydraté (6.14) et compléter avec de l'eau jusqu'à la marque.

8.2. **Étalon 2**

Dans une fiole jaugée de 100 ml (5.2) dissoudre, après l'avoir pesée avec précision (lecture à 0,1 mg près), une quantité d'environ 100 mg de lactose monohydraté (6.14) et compléter avec de l'eau jusqu'à la marque.

Note: Les solutions étalons se conservent jusqu'à une semaine à environ 5 °C.

9. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON D'ESSAI

9.1. **Reconstitution de l'échantillon**

Peser environ 5 g de poudre dans une fiole de 50 ml (6.13) et noter le poids à 1 mg près (W_1, (11)). Ajouter 50 ml d'eau et noter l'augmentation du poids (W_2 (11)) à 0,01 g près. Placer la fiole fermée dans le bain-marie (6.11) pendant 30 minutes et la retourner deux ou trois fois pendant ce laps de temps. Laisser refroidir à température ambiante.

9.2. **Traitement de l'échantillon**

Prélever environ 1 g de cette solution et la déposer dans une fiole jaugée de 50 ml (6.13), noter le poids à 1 mg près (W_3 (11)), ajouter 20 ml d'eau puis ajouter 10 ml de réactif de Biggs/Szijarto dilué (5.4), compléter avec de l'eau jusqu'à la marque. Retourner doucement la fiole 5 fois au cours des 30 premières minutes.

Au bout d'une heure, prélever une partie aliquote et centrifuger (6.12) à 3 000 g pendant 10 minutes (on peut utiliser un poids plus élevé, sur une durée plus brève). Utiliser une partie aliquote du surnageant pour procéder à l'analyse CLHP.

10. DOSAGE CLHP

10.1. **Préparation préalable de la CLHP**

10.1.1. *Installation de la colonne et de la précolonne*

Installer la précolonne (6.2) à l'extérieur du four (6.3) et la colonne (6.1) dans le four.

Note: Si le four est dépourvu de canalisation pour préchauffer l'éluant, ce dernier doit traverser un tube d'acier inoxydable de 15 cm environ dans le four avant d'entrer dans la colonne. (Il est indispensable que l'éluant soit chauffé avant d'entrer dans la colonne, faute de quoi il se produit un étalement des pics.)

10.1.2. *Détecteur et débit initial*

Pour obtenir une ligne de base stable, mettre le détecteur (6.6) en marche au moins 24 heures avant le début de l'analyse. Régler la température interne du détecteur à 35 °C. Régler le débit à 0,2 ml/min (6.4) pendant au moins 20 minutes, le four à colonne (6.3) étant réglé à la température ambiante.

10.1.3. *Four à colonne et débit final*

Régler le four à colonne (6.3) à 85 °C. Une fois la température atteinte, augmenter toutes les 30 minutes le débit pour le porter de 0,2 ml/min à 0,6 ml/min (6.4). Laisser le système s'équilibrer à ce débit et à 85 °C pendant 2 heures jusqu'à obtention d'une ligne de base stable.

10.1.4. *Intégration*

Choisir soigneusement les paramètres d'acquisition et d'intégration (6.7) tels que la vitesse des données, la sensibilité, la constante de temps, la largeur des pics et le seuil.

La durée de rétention du lactose est voisine de 11 minutes.

Note: De nombreux logiciels d'acquisition de données (6.7) permettent de déterminer facilement le nombre de plateaux théoriques. Mesurer régulièrement le nombre de plateaux théoriques de l'étalon 1 (8.1) et remplacer la colonne (6.1) lorsque ce nombre est inférieur de 25 % à la valeur initiale d'une nouvelle colonne.

10.1.5. *Essai de la précolonne*

Contrôler à intervalles réguliers (au moins une fois par séquence) la capacité de la précolonne (6.2) à éliminer les sels de l'échantillon en injectant 25 µl d'une solution de chlorure de sodium à 0,05 %. Remplacer la précolonne dès l'apparition de pics.

10.2. **Injection des étalons**

Injecter au début de chaque série d'analyses 25 µl (6.5) de l'étalon 1 (8.1) puis de l'étalon 2 (8.2). Répéter après 10 à 20 échantillons ainsi qu'à la fin de la séquence.

10.3. **Injection des échantillons**

Injecter 25 µl du surnageant (9.2) de l'échantillon.

11. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

11.1. **Étalonnage**

Normalement on utilise les hauteurs de pics pour calculer les résultats mais, si le signal contient trop de bruit, on peut utiliser l'aire des pics (les pics de composants présents en faible concentration et partiellement, mais insuffisamment, séparés du pic de lactose influencent dans une moindre mesure la quantification par la hauteur des pics).

Le logiciel (6.7) doit calculer une courbe d'étalonnage linéaire forcée à travers l'origine. Vérifier si la courbe ne présente pas de non linéarité (la non linéarité apparente est très probablement due à une erreur dans la préparation des étalons 1 (8.1) ou 2 (8.2), à une mauvaise intégration ou, moins vraisemblablement, à un dysfonctionnement de l'injecteur).

Utiliser en entrée les concentrations de lactose calculées en mg/ml des étalons 1 (8.1) et 2 (8.2) comme lactose anhydre.

La pente (RF) de la courbe d'étalonnage est définie par le rapport aire/concentration en mg/ml.

11.2. **Échantillons**

Le résultat de l'analyse est exprimé en g/100 g et calculé à l'aide du logiciel (6.7) ou en appliquant la formule suivante:

$$C = \frac{H \times (W_1 + W_2) \times 50}{RF \times W_1 \times W_3} \times 0{,}1$$

où:

C: concentration de lactose en g/100 g de poudre

H: hauteur des pics de lactose dans l'échantillon

RF: Coefficient de réponse (ou pente) de la courbe d'étalonnage en mV/mg/ml

W_1: poids en g de l'échantillon de poudre (9.1)

W_2: poids en g de l'eau ajoutée à l'échantillon de poudre (9.1)

W_3: poids en g de la solution reconstituée de poudre (9.2)

50: Volume de la fiole jaugée utilisée au point (9.2)

0,1: conversion du résultat en g/100 g

12. PRÉCISION

Les valeurs dérivées de l'essai interlaboratoire peuvent ne pas être applicables aux gammes de concentration et aux matrices autres que celles données. Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité seront dérivées du résultat d'un essai interlaboratoire réalisé conformément à la norme ISO 5725 ([iv]).

12.1. **Répétabilité**

La différence absolue entre deux résultats d'essai obtenus, dans un intervalle de temps court, par la même méthode sur du matériel d'essai identique, dans le même laboratoire et par le même opérateur utilisant les mêmes équipements ne peut dépasser xxx (à déterminer à l'issue d'un essai interlaboratoire) dans plus de 5 % des cas ([v]).

12.2. **Reproductibilité**

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels obtenus par la même méthode sur du matériel d'essai identique, dans des laboratoires différents et par des opérateurs différents utilisant des équipements différents, ne peut dépasser 0,5 g/100 g (à déterminer à l'issue d'un essai interlaboratoire) dans plus de 5 % des cas.

13. RÉFÉRENCES

([i]) J. Koops et C. Olieman, Netherlands Milk and Dairy Journal, 39 (1985) 89-106.

([ii]) D.A. Biggs et L. Szijarto, Journal of Dairy Science, 46 (1963) 1196.

([iii]) ISO 707 (FIL 50), Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage.

([iv]) ISO 5725-1, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 1: Principes généraux et définitions.

([v]) ISO 5725-2, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée.

ANNEXE XII

(Article 9)

DÉTECTION DU LACTOSÉRUM PRÉSURE DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE DESTINÉ AU STOCKAGE PUBLIC, AU MOYEN DU DOSAGE DES CASÉINOMACROPEPTIDES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

1. OBJET ET CHAMP D'APPLICATION

Cette méthode permet de mettre en évidence la présence de lactosérum présure dans le lait écrémé en poudre destiné au stockage public, par dosage des *caséinomacropeptides*.

2. RÉFÉRENCE

Norme internationale ISO 707 — Lait et produits laitiers — Lignes directrices pour l'échantillonnage, conformément aux indications de l'annexe I, paragraphe 2, point c), dernier alinéa.

3. DÉFINITION

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

4. PRINCIPE

— Reconstitution du lait écrémé en poudre, élimination des matières grasses et des protéines à l'acide trichloracétique, suivies d'une centrifugation ou d'une filtration.

— Détermination de la quantité de caséinomacropeptides (CMP) présents dans le surnageant par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

— Évaluation du résultat obtenu par rapport à des échantillons étalons 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 doit être de l'eau distillée ou de l'eau ayant une pureté au moins équivalente.

5.1. **Solution d'acide trichloracétique**

Dissoudre 240 g d'acide trichloracétique (CCl_3COOH) dans de l'eau et compléter à 1000 ml. La solution doit être transparente et incolore.

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 un pH de 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.

Note: La composition de l'éluant peut être adaptée en fonction du certificat de conformité aux normes ou des recommandations du fabricant du matériau de garnissage de la colonne.

Filtrer la solution éluante, avant l'utilisation, sur une membrane filtrante de 0,45 micromètre (µm) de diamètre de pore.

5.3. **Solution de lavage**

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 étalons**

5.4.1. *Lait écrémé en poudre répondant aux exigences de la présente résolution (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 standard, soit [5].*

6. INSTRUMENTS

6.1. Balance analytique

6.2. Centrifugeuse (facultative) pouvant atteindre une force centrifuge de 2 200 g et munie de tubes à centrifuger bouchés d'une capacité d'environ 50 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 micromètre de diamètre de pore

6.8. Pipettes graduées, permettant de délivrer 10 ml (ISO 648, classe A ou ISO/R 835) ou système pouvant délivrer 10,0 ml en deux minutes

6.9. Système pouvant délivrer 20,0 ml d'eau à 50 °C environ

6.10. Bain-marie thermostaté réglé à 25 ± 0,5 °C

6.11. Équipement CLHP comprenant:

6.11.1. Pompe

6.11.2. Injecteur, manuel ou automatique, d'une capacité de 15 à 30 µl

6.11.3. deux colonnes en série TSK 2 000-SW (longueur 30 cm, diamètre intérieur 0,75 cm) ou colonnes équivalentes (ex. une TSK 2 000-SWxl et une Agilent Technologies Zorbax GF 250) et une précolonne (3 cm × 0,3 cm) garnie de I 125 ou d'un matériau d'efficacité équivalente

6.11.4. Four à colonne thermostaté réglé à 35 ± 1 °C

6.11.5. Détecteur UV à longueur d'onde variable, permettant d'effectuer des mesures à 205 nm à une sensibilité de 0,008 Å

6.11.6. 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 ± 5 °C.

7. ÉCHANTILLONNAGE

7.1. Le prélèvement des échantillons est effectué conformément à 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 d'essai**

Transvaser le lait en poudre dans un récipient d'une capacité équivalant environ au 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 2,000 ± 0,001 g d'échantillon d'essai dans un tube à centrifuger (point 6.2) ou dans un ballon à bouchon rodé (50 ml).

8.3. **Élimination des matières grasses et des protéines**

8.3.1. Ajouter 20,0 ml d'eau chaude (50 °C) à la prise d'essai. Dissoudre la poudre en agitant pendant 5 minutes à l'aide de l'agitateur mécanique (6.3). Placer le tube dans le bain-marie (6.10) 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 (5.1) à 25 °C environ, tout en agitant vigoureusement à l'aide de l'agitateur magnétique (6.4). Placer le tube dans le bain-marie (6.10) et l'y maintenir 60 minutes.

8.3.3. Centrifuger (6.2) à 2 200 g pendant 10 minutes ou filtrer sur papier (6.6). Rejeter les 5 premiers millilitres 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 (6.11) sous un débit de 1,0 ml de solution éluante (5.2) par minute.

Note 1: En fonction du diamètre intérieur des colonnes utilisées ou des instructions du fabricant de la colonne, un autre débit peut être utilisé.

Note 2: 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.

Note 3: Lors de chaque interruption, rincer les colonnes à l'eau. Ne jamais y laisser 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 d'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 CMP, dont le RT est de 15,5.

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

L'intégrateur (6.11.6) calcule automatiquement l'aire A de chaque pic, soit:

A_{II}:	aire du pic II,
A_{III}:	aire du pic III,

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 aux échantillons étalons (5.4) le mode opératoire exact décrit aux points 8.2 à 8.4.2

Utiliser des solutions fraîchement préparées car les CMP 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 étalon (5.4.2) jusqu'à ce que l'aire et le temps de rétention du pic correspondant aux CMP soient constants

8.5.3. Déterminer les coefficients de réponse R en injectant le même volume de filtrat (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:*

Pic II:	$R_{II} = 100/(A_{II}[0])$

où:

R_{II} = le coefficient de réponse des pics II,

A_{II} [0] = l'aire des pics II de l'échantillon étalon [0] obtenue au point 8.5.3.

Pic III:	$R_{III} = W/(A_{III}[5] - A_{III}[0])$

où:

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

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

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

9.1.2. *Calcul de l'aire 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 aires relatives des pics II, III et IV dans l'échantillon [E],

A_{II} [E], A_{III} [E] = respectivement les aires des pics II et III dans l'échantillon [E] obtenues au point 8.4.2,

R_{II}, R_{III} = le coefficient de réponse calculé au point 9.1.1.

9.1.3. *Calcul du temps de rétention relatif du pic III de l'échantillon [E]: $RRT_{III}[E] = (RT_{III}[E])/(RT_{III}[5])$*

où:

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

RT_{III} [E] = le temps de rétention du pic III dans 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. Les expériences ont révélé 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 pour atteindre 10 %

— RRT_{III} [E] est < 1,000 quand la teneur en lactosérum est > 5 %,

— RRT_{III} [E] est ≥ 1,000 quand la teneur en lactosérum est ≤ 5 %.

Une marge d'erreur de ± 0,002 est appliquée aux valeurs de RRT_{III}.

Normalement, la valeur de RRT_{III} [0] s'écarte très peu 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 présure en poudre dans l'échantillon:

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

où:

W	=	le pourcentage m/m de lactosérum présure présent dans l'échantillon [E];
S_{III} [E]	=	l'aire relative du pic III de l'échantillon d'essai [E] obtenue au point 9.1.2;
1,3	=	représente l'aire moyenne relative du pic III exprimée en grammes de lactosérum présure pour 100 g déterminée dans du lait écrémé en poudre non adultéré d'origines diverses (chiffre obtenu expérimentalement);
S_{III} [0]	=	représente l'aire moyenne relative du pic III qui est égale à $R_{III} \times A_{III}$ [0] (valeurs obtenues respectivement aux points 9.1.1 et 8.5.3);
(S_{III} [0] – 0,9)	=	représente la correction à apporter à l'aire moyenne relative de 1,3 quand S_{III} [0] est différent de 0,9. Expérimentalement, l'aire moyenne relative du pic III de l'échantillon témoin [0] est de 0,9.

9.3. **Précision de la procédure**

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 du matériel d'essai identique 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 du matériel d'essai identique ne doit pas dépasser 0,4 % m/m.

9.4. **Interprétation**

9.4.1. Conclure à l'absence de lactosérum si l'aire relative du pic III, S_{III} [E], exprimée en grammes de lactosérum présure pour 100 grammes de produit, est ≤ 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9), où

2,0	=	la valeur maximale autorisée pour l'aire relative du pic III compte tenu de l'aire relative du pic III, à savoir 1,3, de la marge d'erreur due aux variations de la composition du lait écrémé en poudre et de la reproductibilité de la méthode (9.3.2);
(S_{III} [0] – 0,9)	=	la correction à apporter quand la surface S_{III} [0] est différente de 0,9 (voir point 9.2)

9.4.2. Si l'aire relative du pic III, S_{III} [E] est > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) et l'aire relative du pic II, S_{II} [E] ≤ 160, déterminer la teneur en lactosérum présure comme indiqué au point 9.2.

9.4.3. Si l'aire relative du pic III, S_{III} [E] est > 2,0 + (S_{III}[0] – 0,9) et l'aire 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 élevée, 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 l'aire 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:

$S_{III} = 0{,}376\ P\ \% - 10{,}7$	(graphique 1)
$S_{III} = 0{,}0123\ S_{II}$ [E] + 0,93	(graphique 2)

où, respectivement:

S_{III} = l'aire relative du pic III calculée soit d'après la teneur en matières protéiques totales, soit d'après l'aire relative du pic S_{II} [E];

P % = la teneur en matières protéiques totales exprimée en pourcentage pondéral;

S_{II} [E] = l'aire relative de l'échantillon calculée au point 9.1.2.

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

L'écart (T_1 et T_2) entre l'aire relative S_{III} [E] trouvée et l'aire relative S_{III} est donné par les relations suivantes: $T_1 = S_{III}[E] - [(0{,}376\ P\ \% - 10{,}7) + (S_{III}[0] - 0{,}9)] T_2 = S_{III}[E] - [(0{,}0123\ S_{II}[E] + 0{,}93) + (S_{III}[0] - 0{,}9)]$

9.4.3.2.

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

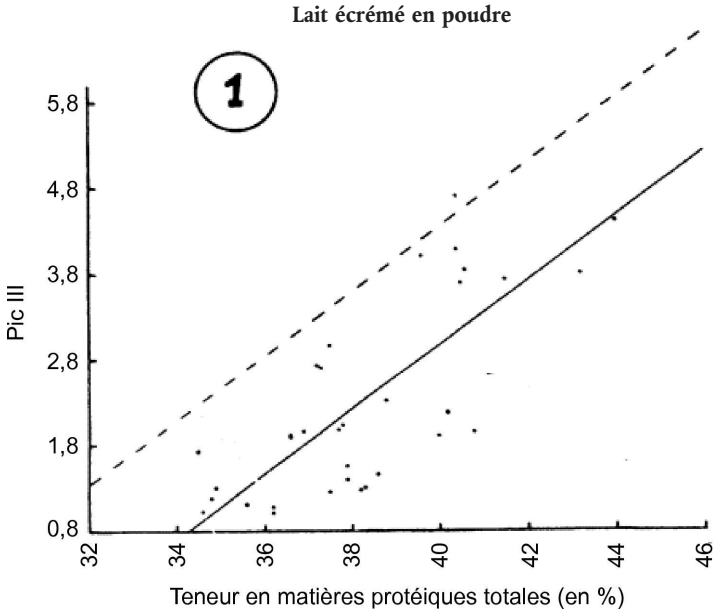
Si T_1 et T_2 sont supérieurs à zéro, l'échantillon contient du lactosérum présure.

La teneur en lactosérum présure est calculée selon la formule suivante: $W = T_2 + 0{,}91$

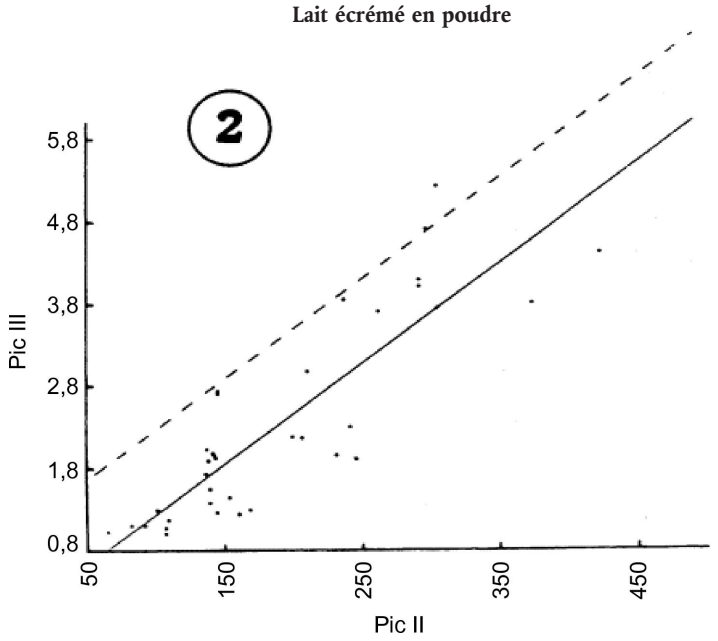
où:

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

Lait écrémé en poudre



Lait écrémé en poudre



ANNEXE XIII

(Article 9)

DÉTERMINATION DU LACTOSÉRUM PRÉSURE SEC DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE ET LES MÉLANGES VISÉS AU RÈGLEMENT (CE) Nº 2799/1999

1. OBJECTIF: DÉTECTION D'ADDITION DE LACTOSÉRUM PRÉSURE SEC DANS LES PRODUITS SUIVANTS

a) le lait écrémé en poudre défini à l'article 2 du règlement (CE) nº 2799/1999; et

b) les mélanges définis à l'article 4 du règlement (CE) nº 2799/1999.

2. RÉFÉRENCES: NORME INTERNATIONALE ISO 707

3. DÉFINITION

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

4. PRINCIPE

La teneur en caséinomacropeptides A est déterminée conformément à l'annexe XII. Les échantillons donnant des résultats positifs sont analysés pour détecter les caséinomacropeptides A par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (méthode CLHP). On peut aussi analyser directement les échantillons par CLHP en phase inverse. 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) indiquent 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 de qualité CLHP.

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

Réactifs pour la procédure CLHP en phase inverse.

5.1. **Solution d'acide trichloracétique**

Dissoudre 240 g d'acide trichloracétique (CCl_3COOH) dans de l'eau et compléter à 1 000 ml. La solution doit être transparente et incolore.

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 ($CH_3CHOHCH_3$), et 1,00 ml d'acide trifluoracétique (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 étalons**

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 présuré 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 présuré de composition standard, soit [50] (1).

6. INSTRUMENTS

L'appareillage requis est décrit à l'annexe XII du présent règlement.

6.1. Balance analytique

6.2. Centrifugeuse (facultative) pouvant atteindre une force centrifuge de 2 200 g et munie de tubes à centrifuger bouchés d'une capacité d'environ 50 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 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. Système pouvant délivrer 20,0 ml d'eau à 50 °C environ

6.10. Bain-marie thermostaté réglé à 25 ± 0,5 °C

6.11. Équipement CLHP comprenant:

6.11.1. Pompe à gradient binaire

6.11.2. Injecteur, manuel ou automatique, de 100 microlitres (µl) de capacité

6.11.3. Une colonne Agilent Technologies Zorbax 300 SB-C3 (longueur: 25 cm, diamètre intérieur: 0,46 cm) ou une colonne en phase inverse équivalente, à base de silice, à larges pores

6.11.4. Four à colonne thermostaté réglé à 35 ± 1 °C

6.11.5. 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

6.11.6. Intégrateur pouvant intégrer la ligne de base commune ou 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 de plus de 1 °C; sinon, on constate des variations assez grandes dans le temps de rétention des CMP_A.

7. ÉCHANTILLONNAGE

7.1. Le prélèvement des échantillons est effectué conformément à 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

(1) Le lactosérum en poudre de type présure de composition standard ainsi que le lait écrémé en poudre 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.

8. MODE OPÉRATOIRE

8.1. **Préparation de l'échantillon d'essai**

Transvaser le lait en poudre dans un récipient d'une capacité équivalant environ au 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 ± 0,001 g d'échantillon d'essai dans un tube à centrifuger (point 6.2) ou dans un ballon à bouchon rodé (50 ml).

Note: En cas de mélanges, peser une quantité d'échantillon d'essai permettant d'aboutir à une prise d'échantillon dégraissée correspondant à 2,00 g.

8.3. **Élimination des matières grasses et des protéines**

8.3.1. Ajouter 20,0 ml d'eau chaude (50 °C) à la prise d'essai. Dissoudre la poudre en agitant pendant cinq minutes, 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-marie (6. 10) 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 (5.1), tout en agitant vigoureusement à l'aide de l'agitateur magnétique (6.4). Placer le tube dans le bain-marie (6.10) et l'y maintenir 60 minutes.

8.3.3. Centrifuger (6.2) à 2 200 g pendant dix minutes, ou filtrer sur papier (6.6), rejeter les cinq premiers millilitres de filtrat.

8.4. **Détermination chromatographique**

8.4.1. Procéder à l'analyse CLHP telle qu'elle est décrite à l'annexe XII. Si le résultat est négatif, l'échantillon analysé ne contient pas de lactosérum présure sec en quantités décelables. Si le résultat est positif, il faut appliquer la méthode CLHP en phase inverse décrite ci-après. On peut aussi appliquer directement la méthode CLHP en phase inverse. La présence de babeurre acide en poudre peut donner lieu à des résultats faux-positifs si l'on utilise la méthode décrite à l'annexe XII. 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 ± 2 minutes pour les CMP_A 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 (5.4) sans et avec 50 % de lactosérum présure.

Injecter 100 µl de surnageant ou de filtrat (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'optimalisation de la chromatographie

Temps (min)	Débit (ml/min)	% A	% B	Courbe
Début	1,0	90	10	*
27	1,0	60	40	linéaire
32	1,0	10	90	linéaire
37	1,0	10	90	linéaire
42	1,0	90	10	linéaire

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

À l'aide de la formule ci-dessous, la composition du solvant initial à utiliser pour le gradient normal (voir le point 8.4.3) peut être calculée comme % B = 10-2,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} − 26) / 6 x 30 / 27 % B = 7,5 + (13,5 + (RT_{cmpA} − 26) / 6) x 1,11

où:

RT_{cmpA}: temps de rétention des CMP_A dans le gradient de référence

10: le % B initial du gradient de référence

2,5: % B au point central moins % B initial dans le gradient normal

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

26: temps de rétention nécessaire pour les CMP_A

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

30: % B initial moins % B à 27 minutes dans le gradient de référence

27: temps de parcours du gradient de référence.

8.4.3. Injection des échantillons d'essai:

Injecter 100 µl, mesurés exactement, de surnageant ou de filtrat (8.3.3) dans l'appareil CLHP sous un débit de 1,0 ml de solution éluante (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 (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 effectuée 15 minutes après que les conditions initiales aient été atteintes.

Note 1: Le temps de rétention des CMP_A doit être de 26 minutes ± 2 minutes, ce qui peut être obtenu en modifiant 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.

Note 2: Les éluants doivent être dégazés suffisamment et conservés dégazés. Cette exigence est indispensable au bon fonctionnement du système de pompage du gradient. L'écart type concernant le temps de rétention du pic de CMP_A doit être inférieur à 0,1 minute (n = 10).

Note 3: 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. (9.1.1).

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

L'intégrateur (6.11.6) calcule automatiquement la hauteur de pic H du pic de CMP_A. 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.

Note: Si le pic de CMP_A est suffisamment séparé des autres pics, il convient d'utiliser la ligne de base de vallée à vallée. Dans le cas contraire, appliquer des perpendiculaires de transfert vers une ligne de base commune dont le point de départ doit être voisin du pic de CMP_A (et donc à un moment différent de t = 0 min!). Utiliser le même type d'intégration pour l'étalon et les échantillons et vérifier, en cas d'utilisation d'une ligne de base commune, qu'elle est cohérente pour les échantillons et l'étalon.

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 aux échantillons étalons (points 5.4.1 et 5.4.2) le mode opératoire exact décrit aux points 8.2 à 8.4.4. Utiliser des solutions fraîchement préparées car le CMP se dégrade en milieu d'acide 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 d'échantillon refroidi dans l'injecteur automatique.

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. Sur cette figure, le pic du CMP_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] (5.4.1).

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

8.5.3. Déterminer les coefficients de réponse R en injectant le même volume de filtrat (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:*

pic de CMP_A: $R = W/H$

où:

R = le coefficient de réponse du pic de CMP_A

H = la hauteur du pic de CMP_A

W = la quantité de lactosérum dans l'échantillon étalon [5].

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

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

où:

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

R = le coefficient de réponse du pic de CMP_A (9.1.1)

H(E) = la hauteur du pic de CMP_A 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 étalon [5] est inférieure à 0,2 minute, la présence de lactosérum présure sec est démontrée.

9.3. **Précision de la procédure**

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 le même matériel d'essai ne doit pas dépasser 0,2 % m/m.

9.3.2. *Reproductibilité*

Non déterminée.

9.3.3. *Linéarité*

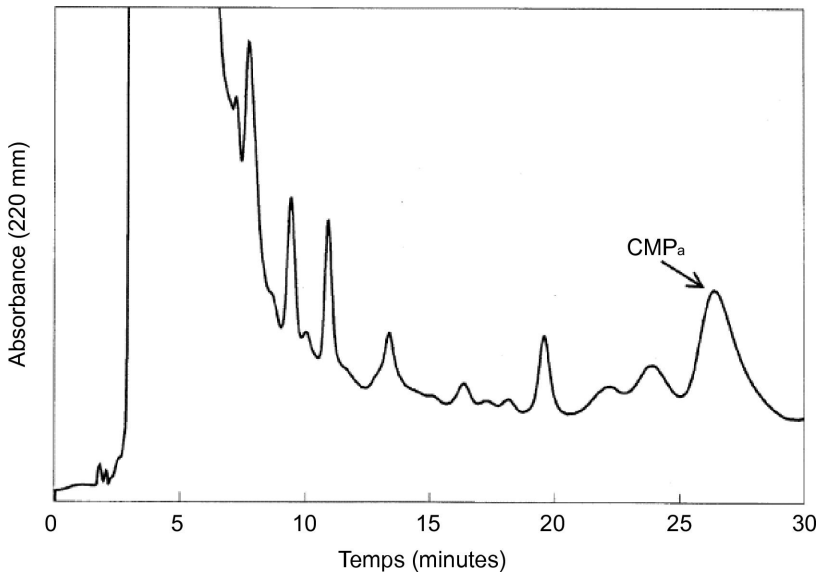
Jusqu'à 16 % de lactosérum présure, on obtient une relation linéaire avec un coefficient de corrélation > 0,99.

9.4. **Interprétation**

La limite de 1 % a été établie conformément aux dispositions des points 9.2 et 9.4.1 de l'annexe XIX du règlement (CE) nº 214/2001 et tient compte d'une marge d'erreur due à la reproductibilité.

Tableau 1

Étalon Ni-4.6



ANNEXE XIV

(Article 10)

LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE: DOSAGE DE LA PHOSPHATIDYLSÉRINE ET DE LA PHOSPHATIDYLÉTHANOLAMINE

Méthode: CLHP en phase inverse.

1. OBJET ET CHAMP 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 de mettre en évidence les solides du babeurre présents dans le LEP.

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 DE LA MÉTHODE

Extraction au méthanol des aminophospholipides de la poudre de lait reconstitué. Dosage de la PS et de la PE sous forme de dérivés de o-phtaldialdéhyde (OPA) par CLHP en phase inverse (PI) et détection par fluorescence. Dosage de la PS et de la PE dans l'échantillon d'essai par rapport à un échantillon étalon 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 étalon: PEDP, d'une pureté minimale de 99 %**

Note: Le matériel étalon doit être stocké à — 18 °C.

4.2. **Réactifs pour la préparation de l'échantillon étalon et de l'échantillon d'essai**

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-phtaldialdéhyde**

4.3.1. Hydroxyde de sodium, solution aqueuse à 12 M

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

4.3.3. 2-mercaptoéthanol

4.3.4. o-phtaldialdéhyde (OPA)

4.4. **Solvants d'élution pour CLHP**

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

4.4.2. Eau de qualité CLHP

4.4.3. Méthanol d'une pureté fluorimétrique testée

4.4.4. Tétrahydrofurane

4.4.5. Phosphate de sodium dihydrogéné

4.4.6. Acétate de sodium

4.4.7. Acide acétique

5. INSTRUMENTS

5.1. Balance analytique, pesant à 1 mg près et d'une lisibilité de 0,1 mg

5.2. Béchers 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 pouvant délivrer des quantités de 0,2, 0,5 et 5 ml

5.6. Fioles jaugées d'une capacité de 10, 50 et 100 ml

5.7. Seringues d'une capacité de 20 et 100 µl

5.8. Bain à ultrasons

5.9. Centrifugeuse pouvant fonctionner 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 d'une précision de 0,1 unité de pH

5.13. Équipement de 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 dérivatisation

5.13.3. Dispositif de chauffage de colonne capable de maintenir la colonne à 30 °C ± 1 °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 aire de pic

5.13.6. Colonne Lichrosphère — 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 ISO 707.

7. MODE OPÉRATOIRE

7.1. **Préparation de la solution étalon interne**

7.1.1. Peser 30,0 ± 0,1 mg de monohydrochlorure de tryptamine (4.2.3) dans une fiole jaugée de 100 ml (5.6) et porter à la marque avec du méthanol (4.2.1).

7.1.2. À l'aide d'une pipette, verser 1 ml (5.3) de cette solution dans une fiole jaugée 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 d'échantillon d'essai**

7.2.1. 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 ± 1 °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.

7.2.2. À l'aide d'une pipette, verser 0,2 ml (5.5) de lait reconstitué dans une fiole jaugée 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.

7.2.3. Centrifuger (5.9) à 27 000 × g pendant 10 minutes et recueillir la phase surnageante dans une fiole de verre (5.10).

Note: Stocker la solution de l'échantillon d'essai à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse CLHP.

7.3. **Préparation de la solution étalon externe**

7.3.1. Peser 55,4 mg de PEDP (4.1) dans une fiole jaugée de 50 ml (5.6) et ajouter environ 25 ml de chloroforme (4.2.2) à l'aide d'un tube gradué (5.11). Chauffer le ballon à bouchon rodé pour le porter à 50 °C ± 1 °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.

7.3.2. À l'aide d'une pipette, transvaser 1 ml (5.3) de la solution dans une fiole jaugée 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 une fiole jaugée 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.

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

7.4. **Préparation du réactif de dérivatisation**

Peser 25,0 ± 0,1 mg d'OPA (4.3.4) dans une fiole jaugée 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).

Note: Conserver le réactif de dérivatisation 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 (ajustée à un pH de 6,5 ± 0,1 à l'aide d'acide acétique), méthanol:et tétrahydrofurane dans la proportion de 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)
Début	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

Note: Le degré d'élution peut rendre nécessaire une légère modification en vue d'obtenir la résolution indiquée sur la figure 1.

Température de la colonne: 30 °C.

7.5.3. *Volume d'injection: 50 µl de réactif de dérivatisation et 50 µl de la solution échantillon*

7.5.4. *Équilibrage de la colonne*

En commençant l'expérience sur une base quotidienne, rincer la colonne à l'aide d'un 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).

Note: Avant un stockage 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 de la PS et de la PE dans l'échantillon d'essai*

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 étalon externe (7.3) toutes les 5 à 10 injections de solution d'échantillon d'essai afin d'évaluer le coefficient de réponse0*

Note: 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 de PEDP*

Éluer le PEDP sous forme d'un seul pic. Déterminer l'aire du pic par intégration de vallée à vallée.

7.6.2. *Pic de tryptamine*

Éluer la tryptamine sous forme d'un pic unique (figure 1). Déterminer l'aire du pic par intégration de vallée à vallée.

7.6.3. *Groupes de pics de PS et de PE*

Dans les conditions décrites (figure 1), la PS est éluée sous forme de 2 pics en partie non résolus précédés d'un pic mineur. La PE est éluée sous forme de 3 pics principaux en partie non résolus. Déterminer l'aire totale de chaque grappe de pics en fixant la ligne de base comme indiqué sur la figure 1.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les teneurs en PS et PE de l'échantillon d'essai sont calculées comme suit: $C = 55{,}36 \times ((A_2)/(A_1)) \times ((T_1)/(T_2))$

où:

C = teneur en PS ou PE (mg/100 g de poudre) dans l'échantillon d'essai

A_1 = aire du pic de PEDP de la solution d'échantillon étalon (7.3)

A_2 = aire du pic de PS ou de PE de la solution d'échantillon d'essai (7.2)

T_1 = aire du pic de la tryptamine de la solution d'échantillon étalon (7.3)

T_2 = Aire du pic de la tryptamine de la solution d'échantillon d'essai (7.2).

9. PRÉCISION DE LA MÉTHODE

Note: Les valeurs relatives à la répétabilité ont été calculées conformément à la norme internationale FIL [1]. La limite de reproductibilité provisoire a été calculée conformément à la procédure définie 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, dans un court intervalle de temps, par le même opérateur utilisant le même appareillage dans les mêmes conditions sur le même échantillon d'essai 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.

[1] Norme FIL internationale 135B/1991. Lait et produits laitiers. Caractéristiques de fidélité des méthodes d'analyse. Schéma d'une méthode d'étude en collaboration.

9.2. **Reproductibilité**

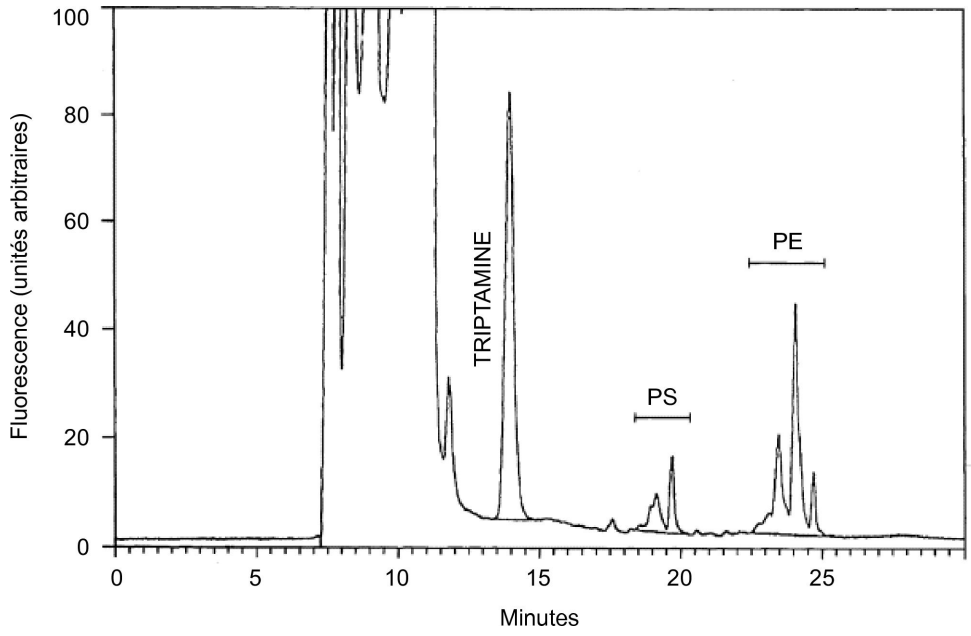
Si deux résultats sont obtenus par des opérateurs travaillant dans des laboratoires différents et utilisant des appareillages différents dans des conditions différentes pour l'analyse du même échantillon d'essai, la différence relative entre les deux résultats ne devrait pas dépasser 11 % de la moyenne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

10. RÉFÉRENCES

10.1. *Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., «Detection of buttermilk solids in skimmilk powder by HPLC quantification of aminophospholipids.» Sci. Tecn. Latt.-Cas., 39,395 (1988).*

Figure 1

Modèle de CLHP des dérivés d'OPA de la phosphatidylsérine (PS) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) dans un échantillon de lait écrémé en poudre reconstitué extrait au méthanol. Le mode d'intégration des pics de PS, PE et de la tryptamine (étalon interne) est indiqué.



ANNEXE XV

(Article 11)

DÉTECTION DE RÉSIDUS ANTIMICROBIENS DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE

On a recours à un essai de dépistage d'inhibiteurs microbiens utilisant *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (identique à la souche C953) comme micro-organisme d'essai et présentant une sensibilité suffisante pour déceler 4 µg de benzylpénicilline par kg de lait et 100 µg de sulfadimidine par kg de lait. Des nécessaires d'essai sont disponibles dans le commerce et peuvent être utilisés s'ils présentent la sensibilité requise pour la benzylpénicilline et la sulfadimidine.

Pour l'essai, utiliser du lait écrémé en poudre reconstitué (1g de poudre + 9 ml d'eau distillée). L'essai est réalisé conformément à la norme ISO/TS 26844:2006 Lait et produits laitiers — Détermination de résidus antimicrobiens — Test de dissémination en tube, à la norme FIL — Bulletin N° 258/1991, section 1, chapitre 2, ou selon les instructions du fabricant du nécessaire d'essai ([1]).

Interpréter comme suit les résultats positifs:

1. La présence de β-lactames peut être confirmée en répétant l'essai après avoir ajouté de la pénicillinase au système d'essai ([2]):

   Résultat négatif: la substance inhibitrice est un antibiotique β-lactame

   Le résultat reste positif: la substance inhibitrice n'est pas identifiable par cette procédure, passer au point 2.

2. La présence de sulfonamides peut être confirmée en répétant l'essai après avoir ajouté de l'acide p-aminobenzoïque au système d'essai:

   Résultat négatif: la substance inhibitrice est un sulfonamide.

   Le résultat reste positif: la substance inhibitrice n'est pas identifiable par cette procédure, passer au point 3.

3. La présence d'une combinaison d'un β-lactame et d'un sulfonamide peut être confirmée en répétant l'essai après avoir ajouté de la pénicillinase et de l'acide p-aminobenzoïque au système d'essai:

   Résultat négatif: les substances inhibitrices sont un antibiotique β-lactame et un sulfonamide.

   Résultat positif: la substance inhibitrice n'est pas identifiable par cette procédure.

([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.

([2]) Certains β-lactames sont moins sensibles au β-lactamase. Dans ces cas-là, il est recommandé d'effectuer un prétraitement supplémentaire sur l'échantillon, (1 ml de l'échantillon d'essai avec 0,3 ml de concentré de penase à 37 °C pendant 2 heures).

ANNEXE XVI

(Article 12)

DÉTERMINATION DE LA QUANTITÉ DE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE PRÉSENT DANS UN ALIMENT COMPOSÉ POUR ANIMAUX PAR COAGULATION ENZYMATIQUE DE LA PARACASÉINE

1. OBJET

Détermination, par coagulation enzymatique de la paracaséine, de la quantité de lait écrémé en poudre présente dans les aliments composés pour animaux.

2. CHAMP D'APPLICATION

Cette méthode s'applique aux aliments composés pour 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 pour 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 par addition de présure.

3.3. Détermination de la teneur en azote de la paracaséine après minéralisation selon la méthode de Kjeldahl, visée dans la norme ISO 8968-2:2001/FIL 20 A 1986; calcul de la quantité de lait écrémé en poudre présente sur la base d'une teneur minimale en caséine de 27,5 % (voir point 8.1).

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 doivent être exempts de substances azotées.

4.1. Citrate trisodique dihydraté (solution à 1 % m/v)

4.2. Chlorure de calcium (solution à 5 M environ)

Dissoudre 75g de $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ dans 100 ml d'eau distillée en agitant (surveiller les réactions exothermiques). Attendre le lendemain pour filtrer la solution. Stocker la solution dans un réfrigérateur.

4.3. Hydroxyde de sodium 0,1 N

4.4. Acide chlorhydrique 0,1 N

4.5. Présure liquide de veau (activité d'environ 100 IMCU/ml selon la norme ISO 11815/FIL 157). Conserver au frais de 4 à 6 °C

4.6. Réactifs pour la détermination de la teneur en azote selon la méthode de Kjeldahl, visée dans la norme ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001

5. INSTRUMENTS

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

5.1. Mortier ou moulin homogénéisateur

5.2. Balance analytique pesant à 1 mg près et d'une lisibilité de 0,1 mg.

5.3. Centrifugeuse de table (500 g ou 2 000 à 3 000 t/min) avec tubes de 50 ml et 2 000 g

5.4. Agitateur magnétique avec barreaux de 10 à 15 mm

5.5. Béchers de 150 à 200 ml

5.6. Matras de 250 et 500 ml

5.7. Entonnoirs en verre de 60-80 mm de diamètre

5.8. Filtres sans cendres à filtration rapide de 150 mm de diamètre (Whatman n° 41 ou équivalent)

5.9. Pipettes de différentes tailles

5.10. Bain-marie thermostaté réglé à 37 °C ± 1 °C

5.11. pH-mètre d'une précision de 0,1 unité

5.12. Thermomètres d'une précision de 1 °C

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1. **Préparation de l'échantillon**

Broyer 10 à 20 g de l'échantillon dans un mortier ou les agiter 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 directement dans un tube à centrifuger de 50 ml 1,000 ± 0,002 g de l'aliment composé pour animaux bien homogénéisé (6.1). Ajouter 30 ml de solution de citrate trisodique (4.1) préalablement réchauffée à 45 °C ± 2 °C. Mélanger au moins cinq minutes à l'aide de l'agitateur magnétique ou par agitation manuelle vigoureuse.

6.2.2. Centrifuger à 500 g (2 000 à 3 000 t/min) pendant 10 minutes et recueillir le surnageant aqueux clair dans un bécher de 150 à 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. Si une couche de matières grasses se forme à la surface, 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, en remuant constamment, 2 ml d'une solution 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-marie thermostaté à 37 °C ± 1 °C pendant 15 à 20 minutes pour permettre à l'équilibre salin de s'établir, lequel se manifeste par l'apparition d'un aspect lactescent.

6.3.2. Transférer le liquide dans un tube 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 tube à centrifuger.

6.3.3. Ramener la température du surnageant à 37 °C ± 1 °C. Ajouter goutte-à-goutte à l'extrait, en remuant, 0,5 ml de présure liquide (4.5). La coagulation se forme en deux minutes.

6.3.4. Remettre l'échantillon dans le bain-marie et laisser à une température de 37 °C ± 1 °C pendant 15 minutes. Enlever l'échantillon du bain et rompre le coagulum en le remuant. Centrifuger à 2 000 g pendant 10 minutes. Filtrer le surnageant à l'aide d'un papier filtre approprié (5.8) et conserver le filtre. En le remuant, laver le précipité dans le tube à centrifuger à l'aide de 50 ml d'eau à environ 35 °C.

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 précipité dans le filtre conservé antérieurement (6.3.4) à l'aide d'eau distillée. Transférer le filtre séché dans le matras de Kjeldahl. Déterminer la teneur en azote à l'aide de la méthode de Kjeldahl, décrite dans la norme ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001.

7. ESSAI À BLANC

7.1. Il convient de pratiquer régulièrement des essais à blanc par minéralisation selon la méthode de Kjeldahl, décrite dans la norme ISO 8968-2:2001/FIL 20-2:2001, en utilisant un papier-filtre sans cendres (5.8) humidifié avec un mélange composé de 90 ml (4.1) de solution de citrate de sodium, de 2 ml d'une solution de chlorure de calcium (4.2), de 0,5 ml de présure liquide (4.5), et lavé avec 3 × 15 ml d'eau distillée.

7.2. Déduire du volume d'acide (4.4) versé pour le titrage de l'échantillon examiné le volume nécessaire pour l'essai à blanc.

8. EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1. Le pourcentage de lait écrémé en poudre dans l'aliment composé pour animaux se calcule selon la formule suivante:

$$\%\ \text{LEP} = \frac{\left(\frac{N \times 6{,}38}{27{,}5} \times 100\right) - 2{,}81}{0{,}908}$$

N représentant le pourcentage d'azote de la paracaséine,

27,5 étant le facteur de conversion de la caséine déterminée en un pourcentage de lait écrémé en poudre,

2,81 et 0,908 étant des facteurs de correction obtenus par analyse de régression.

9. PRÉCISION DE LA MÉTHODE

9.1. **Répétabilité**

Dans au moins 95 % des cas étudiés, la différence entre deux résultats individuels, obtenus sur un même échantillon, dans le même laboratoire et par le même opérateur ne doit pas excéder 2,3 g de lait écrémé en poudre pour 100 g d'aliment composé pour animaux examiné.

9.2. **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 poudre pour 100 g d'aliment composé pour animaux examiné.

10. OBSERVATIONS

10.1. 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.

10.2. 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 babeurres de crème acide peut donner des chiffres nettement plus faibles, car leur dissolution dans la solution de citrate est incomplète.

10.3. L'addition d'au moins 0,5 % de lécithine peut également entraîner des résultats trop faibles.

10.4. 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 XVII

(Article 13)

DÉTECTION DE L'AMIDON DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE, LE LAIT DÉNATURÉ EN POUDRE ET LES ALIMENTS COMPOSÉS POUR ANIMAUX

1. CHAMP D'APPLICATION

La présente méthode s'applique à la détection de l'amidon utilisé comme traceur dans les poudres de lait dénaturées.

La limite de détection de la méthode est de 0,05 g d'amidon environ pour 100 g d'échantillon.

2. PRINCIPE

La réaction est basée sur celle qui est utilisée en 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. RÉACTIFS

3.1. Solution iodée:

— Iode: 1,0 g,

— Iodure de potassium: 2,0 g,

— Eau distillée: 100 ml,

— Dissoudre dans l'eau 1,0 g d'iode et 2,0 g d'iodure de potassium dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger.

4. INSTRUMENTS

4.1. Balance analytique

4.2. Bain-marie bouillant

4.3. Tubes à essai, 25 mm × 200 mm

5. PROCÉDURE

Peser 1,0 g d'échantillon à 0,1 g près et transférer dans un tube à essai (4.3).

Ajouter 20 ml d'eau distillée et agiter pour disperser l'échantillon.

Placer dans le bain-marie bouillant (4.2) pendant 5 minutes.

Retirer du bain-marie et laisser refroidir à température ambiante.

Ajouter 0,5 ml de la solution iodée (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 XVIII

(Article 14)

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN HUMIDITÉ DE LA CRÈME DÉSHYDRATÉE

1. CHAMP D'APPLICATION

La présente annexe décrit une méthode de détermination de la teneur en humidité de la crème déshydratée.

2. TERMES ET DÉFINITIONS

Aux fins de la annexe, la définition suivante s'applique.

Teneur en humidité: La perte de masse déterminée par la procédure spécifiée dans la présente norme internationale.

Elle est exprimée par un pourcentage en masse.

3. PRINCIPE

Sécher une prise d'essai à 102 ± 2 °C jusqu'à obtention d'une masse constante et peser pour déterminer la perte de masse.

4. INSTRUMENTS

Matériel courant de laboratoire et notamment les éléments suivants:

4.1. Balance analytique pesant à 1 mg près et d'une lisibilité de 0,1 mg.

4.2. Étuve de dessiccation bien ventilée contrôlée par thermostat, température réglée à 102 ± 2 °C dans tout l'espace de travail.

4.3. Dessiccateur muni de gel de silice fraîchement séché avec indicateur hygrométrique ou un autre agent de dessiccation.

4.4. Cuvettes à fond plat en matériau adapté (par exemple verre, acier inoxydable, nickel ou aluminium), d'environ 25 mm de profondeur, d'un diamètre d'environ 50 mm et équipés de couvercles ajustés et faciles à enlever.

4.5. Flacons équipés de bouchons serrés pour mélanger les échantillons de laboratoire.

5. ÉCHANTILLONNAGE

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon qui soit vraiment représentatif et n'ait été ni endommagé ni modifié lors du transport ou du stockage.

L'échantillonnage n'est pas couvert par la méthode décrite dans la présente norme internationale. Les normes ISO 707|FIL 50 exposent une méthode d'échantillonnage recommandée.

Conserver l'échantillon dans des conditions telles qu'aucune détérioration ou modification de composition ne puisse intervenir.

6. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON D'ESSAI

Bien mélanger l'échantillon d'essai sous agitation et par retournements successifs du récipient (si nécessaire après avoir transféré tous les échantillons d'essai dans un récipient étanche d'une capacité suffisante).

Dans le cas où cette manière de procéder n'aurait pas donné une homogénéité complète, prélever les prises d'essai (pour 2 déterminations individuelles) de l'échantillon préparé en deux points les plus éloignés possible l'un de l'autre.

7. MODE OPÉRATOIRE

7.1. **Préparation de la cuvette**

7.1.1. Chauffer pendant au moins 1 h une cuvette découverte et son couvercle (4.4) dans l'étuve (4.2) réglée à 102 ± 2 °C.

7.1.2. Placer le couvercle sur la cuvette, transférer la cuvette couverte vers le dessiccateur (4.3), laisser revenir à la température ambiante et peser au mg près en notant le poids à 0,1 mg près.

7.2. **Prise d'essai**

Transférer environ 1 à 3 g de l'échantillon d'essai préparé (6) dans la cuvette, le couvrir et peser au mg près en notant le poids à 0,1 mg près.

7.3. **Détermination**

7.3.1. Ôter le couvercle et le mettre pendant 2 heures, avec la cuvette, dans l'étuve (4.2) réglée à 102 ± 2 °C.

7.3.2. Remettre le couvercle, transférer la cuvette couverte vers le dessiccateur, laisser revenir à la température ambiante et peser au mg près en notant le poids à 0,1 mg près.

7.3.3. Ôter le couvercle et le à nouveau dans l'étuve pendant 1 heure avec la cuvette. Puis répéter l'opération du point 7.3.2.

7.3.4. Répéter les opérations de chauffage et pesée jusqu'à ce que la masse diminue de 1 mg ou moins, ou augmente entre deux pesées successives.

Pour le calcul, retenir la plus faible masse obtenue.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1. **Calcul**

La teneur en humidité, exprimée en g/100g, est égale à:

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

où:

m_0 est la masse, en grammes, de la cuvette et du couvercle (7.1.2);

m_1 est la masse, en grammes, de la cuvette, du couvercle et de la prise d'essai avant dessiccation (7.2);

m_2 est la masse, en grammes, de la cuvette, du couvercle et de la prise d'essai après dessiccation (7.3.4).

Transcrire le résultat à la deuxième décimale.

9. PRÉCISION

Note: Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité proviennent des résultats d'un essai interlaboratoire (cf. Steiger, G. Bulletin de la norme FIL N° 285/1993, p. 21-28) réalisé conformément à la norme FIL 135B:1991. Lait et produits laitiers. Caractéristiques de fidélité des méthodes d'analyse. Schéma d'une méthode d'étude en collaboration.

9.1. **Répétabilité**

La différence absolue entre deux résultats d'essai indépendants obtenus, dans un court intervalle de temps, par la même méthode sur du matériel d'essai identique, dans le même laboratoire et par le même opérateur utilisant les mêmes équipements ne peut dépasser 0,20 g d'humidité pour 100 g de produit dans plus de 5 % des cas.

9.2. **Reproductibilité**

La différence absolue entre deux résultats d'essais indépendants obtenus par la même méthode sur du matériel d'essai identique, dans des laboratoires différents et par des opérateurs différents utilisant des équipements différents, ne peut dépasser 0,40 g d'humidité pour 100 g de produit que dans plus de 5 % des cas.

10. COMPTE-RENDU D'ESSAI

Le compte rendu d'essai doit indiquer:

— toutes les informations nécessaires à l'identification complète de l'échantillon,

— la méthode d'échantillonnage utilisée, pour autant qu'elle soit connue,

— la méthode d'essai utilisée en référence à la présente norme internationale,

— 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.

Les résultats de l'essai et, sous réserve de l'étude de la répétabilité, le résultat final obtenu.

ANNEXE XIX

(Article 15)

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN HUMIDITÉ DU BABEURRE ACIDE EN POUDRE

1. CHAMP D'APPLICATION

Déterminer la teneur en humidité du babeurre acide en poudre destiné à être utilisé dans les aliments pour animaux.

2. PRINCIPE

L'échantillon est soumis à la dessiccation sous vide. La perte de masse est déterminée par pesée.

3. INSTRUMENTS

3.1. Balance analytique pesant au mg près et d'une lisibilité de 0,1 mg

3.2. Cuvettes en métal résistant à la corrosion ou en verre munis de couvercles à fermeture étanche; surface utile permettant d'obtenir une répartition de l'échantillon d'essai de 0,3 g/cm^2

3.3. Étuve électrique réglable équipée d'une pompe à huile et d'un mécanisme d'introduction d'air chaud séché à travers une tour contenant par exemple de l'oxyde de calcium ou du sulfate de calcium (un indicateur d'humidité)

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. MODE OPÉRATOIRE

Chauffer une cuvette (3.2) et son couvercle dans l'étuve (3.5) pendant une heure au minimum. Placer le couvercle sur le récipient, transférer immédiatement le récipient dans un dessiccateur (3.4), l'y laisser refroidir jusqu'à la température ambiante et peser au mg près en notant la masse à 0,1 mg près.

Ôter le couvercle et transférer environ 5g d'échantillon dans la cuvette. Peser au mg près en notant la masse à 0,1 mg près. Placer la cuvette, à côté de son couvercle, dans l'étuve à vide (point 3.3) préalablement chauffée à 83 °C. Pour éviter que la température de l'étuve ne descende trop, introduire la cuvette en un temps minimal.

Porter la pression à 100 torr (13,3 kPa) et laisser sécher à poids constant (environ 4 heures) à cette pression sous un courant d'air chaud et sec.

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 la cuvette de son couvercle, la retirer de l'étuve, laisser refroidir durant 30 à 45 minutes dans le dessiccateur (3.4) et peser à 1 mg près en notant la masse à 0,1 mg près. Procéder à une dessiccation complémentaire de 30 minutes dans l'étuve à vide (3.3) à la température de 83 °C et peser à nouveau. Répéter les opérations de chauffage et de pesée jusqu'à ce que la masse de la cuvette avec son couvercle diminue de 1 mg ou moins, ou bien augmente, entre deux pesées successives. Pour le calcul, retenir la masse la plus faible obtenue.

5. CALCUL

$\%\ \text{d'humidité} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100\ \%$

où:

m_0 est la masse de la cuvette et du couvercle,

m_1 est la masse de la cuvette, du couvercle et de la prise d'essai avant dessiccation,

m_2 est la masse de la cuvette, du couvercle et de la prise d'essai après dessiccation.

Transcrire le résultat à 0,1 g près/100 g.

6. PRÉCISION

6.1. **Limite de répétabilité**

La différence absolue entre deux résultats d'essai indépendants obtenus, dans un court intervalle de temps, par la même méthode sur du matériel d'essai identique, dans le même laboratoire et par le même opérateur utilisant les mêmes équipements ne peut dépasser 0,4 g d'eau pour 100 g de babeurre acide en poudre dans plus de 5 % des cas.

6.2. **Limite de reproductibilité**

La différence absolue entre deux résultats d'essais indépendants obtenus par la même méthode sur du matériel d'essai identique, dans des laboratoires différents et par des opérateurs différents utilisant des équipements différents ne peut dépasser 0,6 g d'eau pour 100 g de babeurre acide en poudre dans plus de 5 % des cas.

6.3. **Source des 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 XX

(Article 16)

MÉTHODE DE RÉFÉRENCE POUR LA DÉTERMINATION DE LA PURETÉ DES MATIÈRES GRASSES LACTIQUES PAR ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE DES TRIGLYCÉRIDES — RÉVISION 2

1. CHAMP ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente norme décrit une méthode de référence pour la détermination de la pureté des matières grasses lactiques par analyse chromatographique en phase gazeuse des triglycérides. Tant les matières grasses végétales que les matières grasses animales, telles que le suif de bœuf et le saindoux, peuvent être détectées.

On détermine l'intégrité des matières grasses lactiques à l'aide de formules de triglycérides définies. La méthode s'applique fondamentalement au lait de vache en vrac ou aux produits fabriqués à partir de celui-ci, indépendamment des conditions d'alimentation, de reproduction ou de lactation. Seul un niveau d'alimentation exceptionnellement élevé en huiles végétales pures, par exemple en huile de colza, peut conduire à un résultat faux-positif. L'analyse des produits laitiers de chaque vache prise individuellement peut aussi donner un résultat faux-positif.

La méthode s'applique en particulier aux matières grasses extraites de produits laitiers supposés contenir des matières grasses lactiques pures et de composition intacte, comme le beurre, la crème, le lait et le lait en poudre. Le traitement technologique des matières grasses lactiques, comme l'élimination ou le fractionnement du cholestérol, peuvent produire un résultat faux-positif. Ce qui précède vaut également pour les matières grasses lactiques obtenues à partir du lait écrémé ou du babeurre. La méthode n'est pas toujours applicable aux matières grasses extraite du fromage, le processus d'affinage pouvant en effet avoir un effet tel sur la composition des matières grasses qu'il en résulte un résultat faux-positif.

Note 1: L'acide butyrique (n-butanoïque) (C_4), présent exclusivement dans les matières grasses lactiques, permet de réaliser des estimations quantitatives de petites et moyennes quantités de matières grasses lactiques dans les graisses végétales et animales. Toutefois, en raison de la grande variation de C_4 (fraction massique comprise entre environ 3,1 et 3,8 %), il est difficile de fournir des informations qualitatives et quantitatives concernant la présence de matières grasses étrangères dans les matières grasses lactiques pour des fractions massiques allant jusqu'à 20 % [1].

Note 2: En pratique, il est impossible d'obtenir des résultats quantitatifs à partir de la teneur en stérols des graisses végétales car cette teneur dépend des conditions de production et de transformation. Qui plus est, la détermination qualitative des matières grasses étrangères sur la base des stérols est ambiguë.

2. DÉFINITION

Pureté des matières grasses lactiques: absence de matières grasses végétales et animales déterminée par la procédure définie dans la présente norme.

Note: La pureté est déterminée à l'aide des valeurs *S*, calculées à partir de la composition des triglycérides. Les fractions massiques des triglycérides sont exprimées en pourcentage.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les matières grasses extraites du lait ou des produits laitiers sont analysées par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire courte ou sur une colonne à garnissage, en vue de la détermination des triglycérides (TG), séparés par le nombre total de carbones. En insérant la fraction massique, exprimée en pourcentage, des molécules de matières grasses de différentes tailles (C_{24} à C_{54}, avec des nombres de carbone exclusivement pairs) dans la formule des TG, on peut calculer les valeurs *S*. Un dépassement des valeurs *S* définies pour les matières grasses lactiques pures, indique la présence de matières grasses étrangères.

Note 1: L'adéquation et l'équivalence des colonnes à garnissage et des colonnes capillaires ont déjà été démontrées précédemment [2-4].

Note 2: La valeur *S* est la somme des fractions massiques de TG multipliées respectivement par des facteurs définis.

4. RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

4.1. Gaz vecteur: azote, ou hélium ou hydrogène, ayant tous une pureté d'au moins 99,995 %.

4.2. Étalons de matières grasses pour définir un étalon de matière grasse lactique conformément au point 7.3.3.

4.2.1. Étalons triglycérides, saturés, les produits adaptés sont disponibles dans le commerce.

4.2.2. Étalon cholestérol.

4.3. Méthanol (CH_3OH), anhydre.

4.4. n-hexane ($CH_3(CH_2)4CH_3$).

4.5. n-heptane ($CH_3(CH_2)5CH_3$).

4.6. Autres gaz: hydrogène, d'une pureté d'au moins 99,995 %, exempt d'impuretés organiques (C_nH_m < 1 µl/l); air synthétique, exempt d'impuretés organiques (C_nH_m < 1 µl/l).

4.7. Sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4).

5. INSTRUMENTS

Matériel courant de laboratoire, et notamment les éléments suivants:

5.1. **Chromatographe en phase gazeuse à haute température**

Le chromatographe en phase gazeuse à haute température doit supporter des températures d'au moins 400 °C et être équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les septums utilisés dans l'injecteur doivent résister à des températures élevées et accuser de très faibles pertes de liquide. En cas de CG capillaire, utiliser un injecteur on column. Utiliser toujours des joints en graphite pour fixer les raccords de la colonne mais aussi de l'injecteur et/ou du détecteur (le cas échéant).

5.2. **Colonne de chromatographie**

5.2.1. *Colonne à garnissage*

Utiliser une colonne en verre de 2 mm de diamètre intérieur et de 500 mm de long, garnie d'une phase stationnaire de 3 % OV-1 sur Gas ChromQ de 125 µm à 150 µm (100 à 120 mesh) [1]). La préparation, la silanisation, le garnissage et le conditionnement de la colonne à garnissage sont décrits à l'annexe A.

Une colonne capillaire peut également être utilisée (5.2.2).

5.2.2. *Colonne capillaire*

Utiliser une colonne capillaire courte, c'est-à-dire de 5 m de long avec une phase stationnaire non polaire pouvant résister à des températures de 400 °C ou plus [2]). Conditionner la colonne en effectuant 20 analyses de matières grasses lactiques en solution (7.2) dans les 2 à 3 jours en utilisant les paramètres définis au point 7.3.4.2. Après quoi les coefficients de réponse (7.3.3) doivent être voisins de 1 et inférieurs à 1,20.

Note: On peut utiliser des colonnes de dimensions différentes et garnies d'une phase non polaire différente résistant aux températures élevées, pour autant que leurs performances soient conformes à la présente norme. Voir aussi le point 7.3.4.2.

5.3. Colonne Extrelut d'une capacité de 1 ml à 3 ml, remplie de gel de silice, nécessaire aux fins de l'extraction des matières grasses lactiques conformément au point 7.1.3 uniquement.

5.4. Joints de graphite pouvant supporter des températures d'au moins 400 °C; à utiliser pour le raccordement de la colonne ainsi que pour les raccords de l'injecteur et/ou du détecteur.

5.5. Bain-marie capable de maintenir une température de 50 °C ± 2 °C.

5.6. Four capable de fonctionner à 50 °C ± 2 °C et 100 °C ± 2 °C.

5.7. Pipette graduée en microlitres.

([1]) Exemple de produit adapté disponible dans le commerce. Cette information est fournie à titre indicatif aux utilisateurs de la présente norme internationale et elle ne constitue en rien une approbation de ce produit.

([2]) CP-Ultimetal SimDist (5 m × 0,53 mm × 0,17 µm) est un exemple de produit adapté disponible dans le commerce. Cette information est fournie à titre indicatif aux utilisateurs de la présente norme internationale et elle ne constitue en rien une forme d'approbation de ce produit.

5.8. Pipette graduée d'une capacité de 5 ml.

5.9. Fiole à fond arrondi d'une capacité de 50 ml.

5.10. Fiole Erlenmeyer, volume nominal de 250 ml.

5.11. Entonnoir.

5.12. Papier-filtre à micropores.

5.13. Évaporateur rotatif.

5.14. Ampoules d'une capacité nominale de 1 ml, et munies d'un bouchon à vis ou d'un bouchon serti en aluminium avec revêtement de polytétrafluoroéthylène.

5.15. Seringue d'injection dont le piston n'atteint pas le bout de l'aiguille (colonne à garnissage).

Note: Ce type de seringues permet d'obtenir une meilleure répétabilité des résultats.

5.16. Balance analytique pesant au mg près et d'une lisibilité de 0,1 mg.

6. ÉCHANTILLONNAGE

Le laboratoire doit avoir reçu un échantillon représentatif. Celui-ci ne doit avoir été ni endommagé ni modifié lors du transport ou du stockage.

L'échantillonnage n'est pas couvert par la méthode décrite dans la présente norme internationale. Les normes ISO 707|FIL 50 [5] exposent une méthode d'échantillonnage recommandée.

7. MODE OPÉRATOIRE

7.1. **Préparation des échantillons d'essai**

Pour préparer l'échantillon d'essai, utiliser l'une des trois méthodes d'extraction des matières grasses lactiques décrites ci-dessous.

7.1.1. *Isolement des matières grasses lactiques du beurre ou du butteroil*

Faire fondre 50 g à 100 g d'échantillon d'essai à 50 °C dans un bain-marie (5.5) ou au four (5.6). Placer 0,5 à 1,0 g de sulfate de sodium (4.7) dans un papier-filtre plié (5.12). Préchauffer, dans un four réglé (5.6) à 50 °C, une fiole Erlenmeyer de 250 ml (5.10) et un entonnoir (5.11) garni du filtre. En gardant au four la fiole, l'entonnoir et le filtre inséré préchauffés, filtrer la couche de matières grasses de l'échantillon fondu. Veiller à ce que le sérum ne soit pas transféré.

En présence d'une quantité limitée d'échantillon d'essai, et uniquement dans ce cas, on peut utiliser un échantillon d'essai plus petit, ce qui nécessite de revoir la procédure en conséquence. Il faut toutefois noter qu'une prise d'essai plus petite augmente le risque d'obtenir un échantillon non représentatif.

Note 1: La crème permet d'obtenir du beurre par barattage et lavage soigneux du grain de beurre résultant.

Note 2: Les matières grasses lactiques obtenues à l'aide de la procédure décrite au point 7.1.1 est quasiment exempte phospholipides.

7.1.2. *Extraction selon la méthode gravimétrique Röse–Gottlieb*

Extraire la fraction grasse de l'échantillon d'essai à l'aide de la méthode gravimétrique décrite dans l'une des normes suivantes: ISO 1211 FIL 001D, ISO 2450FIL 016C ou ISO 7328FIL 116A.

Note: Si les matières grasses lactiques obtenues contiennent des phospholipides, le pic de cholestérol obtenu augmentera d'environ 0,1 %. L'influence sur le spectre de triglycérides standardisé à 100 % avec le cholestérol est négligeable.

7.1.3. *Extraction du lait au moyen des colonnes de gel de silice*

À l'aide d'une pipette graduée en microlitres (5.7), ajouter 0,7 ml de l'échantillon d'essai porté à 20 °C à une colonne Extrelut de 1 ml à 3 ml (5.3). Le laisser se répartir uniformément sur le gel de silice pendant environ 5 minutes.

Pour dénaturer les complexes protéines-lipides, ajouter à l'aide de la pipette graduée (5.8) 1,5 ml de méthanol (4.3) à la colonne Extrelut. Extraire ensuite la fraction grasse de l'échantillon d'essai à l'aide de 20 ml de *n*-hexane (4.4). Ajouter le *n*-hexane lentement et en petites quantités. Recueillir le solvant qui s'égoutte dans une fiole de 50 ml à fond arrondi (5.9) préalablement séchée jusqu'à obtention d'une masse connue constante et pesée au mg près, en notant la masse obtenue à 0,1 mg près.

Laisser la colonne se vider complètement après l'extraction. Éliminer les solvants de l'éluat par distillation sur un évaporateur rotatif (5.13) dont le bain-marie est réglé entre 40 °C et 50 °C. Une fois les solvants éliminés, sécher puis peser la fiole à fond arrondi et son contenu au mg près en notant la masse obtenue à 0,1 mg. Déterminer le rendement massique de la matière grasse en déduisant de la masse obtenue la masse de la fiole à fond arrondi vide et séchée.

Note: Les extractions de matières grasses selon les méthodes Gerber, Weibull-Berntrop ou Schmid-Bondzynski-Ratzlaff ou l'isolement des matières grasses au moyen de détergents (méthode BDI) ne conviennent pas à l'analyse des triglycérides étant donné que, avec ces méthodes, des quantités plus ou moins grandes de glycérides ou de phospholipides partiels peuvent passer dans la phase grasse. En conséquence, l'application de cette norme internationale est limitée en ce qui concerne certains produits, en particulier les fromages.

7.2. **Préparation de la solution échantillon**

Pour une chromatographie en phase gazeuse sur une colonne à garnissage, préparer une solution à 5 % (fraction volumique) des matières grasses (obtenues selon le point 7.1) dans du *n*-hexane (4.4) ou du *n*-heptane (4.5). Selon les dimensions de la colonne, une concentration de 1 % sera appropriée (0,53 mm, tube ouvert de grand diamètre); mais la concentration sera inférieure en cas d'injection on column avec une colonne capillaire.

Selon la colonne utilisée et la masse de matières grasses obtenue au point 7.1.3, déterminer la quantité de solvant (4.4 ou 4.5) à ajouter à l'échantillon d'essai dans la fiole en pesant au mg près, et en notant la masse obtenue à 0,1 mg près. Dissoudre complètement les substances restantes.

Transférer environ 1 ml de la solution échantillon dans une ampoule (5.14).

7.3. **Analyse chromatographique des triglycérides**

7.3.1. *Variation de la ligne de base*

Pour minimiser l'élévation de la ligne de base, la colonne doit être conditionnée comme indiqué au point 5.2.2 (colonne capillaire) ou à l'annexe A.4 (colonne à garnissage).

Note: La température élevée de la colonne rend l'analyse particulièrement sensible à une élévation de la ligne de base dans la plage haute des nombres de carbones.

7.3.2. *Technique d'injection*

7.3.2.1. Colonne à garnissage

Pour éviter des effets de discrimination, appliquer la technique de l'aiguille chaude afin d'améliorer la quantification des composants de triglycérides à point d'ébullition élevé. Remplir l'aiguille d'air en aspirant la solution de matières grasses dans la seringue. Insérer l'aiguille dans l'injecteur. Chauffer l'aiguille avant injection pendant 3 secondes environ puis injecter rapidement le contenu de la seringue.

7.3.2.2. Colonne capillaire

En cas d'injection on column à froid (7.3.4.2), insérer l'aiguille de la seringue et injecter immédiatement. Le temps de séjour de l'aiguille dans l'orifice d'injection doit être suffisamment bref pour éviter les larges traînées du pic de solvant.

Note: Le temps de séjour optimal est typiquement d'environ 3 secondes.

7.3.3. *Étalonnage*

7.3.3.1. Généralités

Pour étalonner les échantillons d'essai, analyser deux à trois fois la matière grasse lactique de référence au début de chaque journée. La dernière analyse permettra de déterminer les coefficients de réponse, RF_{si} (fraction massique/fraction de surface) des TG et du cholestérol et de les appliquer aux échantillons d'essai suivants (voir le point 9.1):

$$RF_{Si} = \frac{w_{Si} \times \sum A_{Si}}{\sum w_{Si} \times A_{Si}} \quad (1)$$

où:

w_{si} est la fraction massique, exprimée en pourcentage, de chaque TG ou cholestérol contenu dans la matière grasse lactique de référence;

A_{si} est la valeur numérique de l'aire des pics de chaque TG ou cholestérol contenu dans la matière grasse lactique de référence.

Se référer aux points 7.3.3.2 ou 7.3.3.3 pour l'obtention de matière grasse lactique de référence avec une composition de triglycérides connue.

7.3.3.2. Étalon de matière grasse lactique disponible dans le commerce

Pour déterminer au mieux le coefficient de réponse de chaque constituant de l'échantillon d'essai, il convient d'utiliser une matière grasse lactique de référence avec une composition de TG certifiée.

Note: L'étalon CRM 519 (matière grasse lactique anhydre) peut être obtenu auprès de l'Institut des matériaux et des mesures de référence (IRMM) à B-2440 Geel-Belgique ([1]).

7.3.3.3. Étalon de matière grasse lactique préparé en laboratoire

Préparer environ 1 g d'un mélange des étalons de matières grasses (voir le point 4.2, contenant au moins les triglycérides saturés, C_{24}, C_{30}, C_{36}, C_{42}, C_{48} et $C_5$4, et le cholestérol; plus, de préférence, C_{50} et C_{52}) en pesant au mg près, en notant la masse obtenue à 0,1 mg près, pour obtenir une composition de triglycérides relative similaire à celle de la matière grasse lactique.

Procéder à plusieurs analyses d'une solution du mélange d'étalons de matière grasse dans le *n*-hexane (4.4) ou le *n*-heptane (4.5) selon le point 7.3.4. Dans la même séquence, procéder à plusieurs analyses de la matière grasse lactique de composition moyenne.

Déterminer les coefficients de réponse des TG à partir du mélange d'étalons de matières grasses. On opère une interpolation mathématique pour calculer les coefficients de réponse intermédiaires des TG absents du mélange. Appliquer les coefficients de réponse obtenus à la matière grasse lactique afin d'obtenir une composition de référence. La matière grasse lactique de référence ainsi obtenue se conserve plusieurs années sous atmosphère d'azote à une température ne dépassant pas – 18 °C.

7.3.4. *Conditions chromatographiques*

Note: L'utilisation de colonnes à garnissage ou de colonnes capillaires entraîne généralement une résolution similaire à celle de la figure 1. Les cas de dissociation des TG numérotés pairs ne sont normalement pas observés et doivent être évités.

7.3.4.1. Colonne à garnissage

a) Programme de température: régler le four à une température initiale de 210 °C. Maintenir cette température pendant 1 minute puis la porter à 350 °C à raison de 6 °C/min. Maintenir cette température (finale) pendant 5 minutes.

b) Température du détecteur et de l'injecteur: réglée à 370 °C.

c) Gaz vecteur: utiliser de l'azote à un débit constant d'environ 40 ml/min. Ajuster exactement le débit de gaz vecteur de façon à éluer C_{54} à 341 °C.

d) Durée de l'analyse: 29,3 min.

e) Volume d'injection: injecter 0,5 µl d'une solution échantillon à 5 % (fraction volumique).

([1]) Exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est fournie à titre indicatif aux utilisateurs de la présente norme internationale et elle ne constitue en rien une forme d'approbation de ce produit.

Si aucune analyse des TG n'est effectuée, maintenir le four à la température initiale indiquée au point a), le détecteur et l'injecteur à la température indiquée au point b) et le débit du gaz vecteur comme indiqué au point c), y compris la nuit, les week-ends et en période de vacances, pour garantir une performance optimale de la colonne.

7.3.4.2. Colonne capillaire

a) Programme de température: régler le four à une température initiale de 80 °C. Maintenir cette température pendant 0,5 minute puis la porter à 190 °C à raison de 50 °C/min puis à 350 °C à raison de 6 °C/min. Maintenir cette température (finale) pendant 5 minutes.

b) Température du détecteur: réglée à 370 °C.

c) Gaz vecteur: utiliser de l'azote à un débit constant d'environ 3 ml/min.

d) Durée de l'analyse: 34,4 min.

e) Volume d'injection: injecter 0,5 µl d'une solution échantillon à 1 % (fraction volumique).

Maintenir ces paramètres lorsqu'aucune analyse n'est effectuée, pour garantir des performances optimales (voir le point 7.3.4.1).

Les paramètres d'analyse donnés au point 7.3.4.2 conviennent pour une utilisation avec une colonne de grand diamètre (diamètre intérieur de 0,53 mm) comme décrit au point 5.2.2. Des conditions différentes peuvent se révéler plus indiquées pour d'autres dimensions de colonne ou d'autres phases.

8. INTÉGRATION, ÉVALUATION ET CONTRÔLE DES PERFORMANCES D'ANALYSE

Évaluer les pics du chromatogramme à l'aide d'un système d'intégration permettant de tracer la ligne de base et de procéder à une réintégration. La figure 1 illustre un chromatogramme correctement intégré, tandis que la figure 2 représente une erreur sporadique à l'extrémité de la ligne de base après C_{54} qui influe sur le pourcentage de tous les TG. Exclure néanmoins de l'évaluation les pics élués après C_{54}.

Combiner les TG ayant un indice impair d'acyle-C ($2n + 1$) avec le TG ayant un indice pair précédent ($2n$). Ignorer la faible teneur en C_{56}. Multiplier les pourcentages d'aire des TG restants, y compris le cholestérol, par les coefficients de réponse correspondants de la matière grasse lactique de référence (dernier étalonnage) et normaliser le tout à 100 % conformément au point 9.1.

Figure 1

Exemple de chromatogramme des triglycérides de la matière grasse lactique dont la ligne de base est correctement tracée

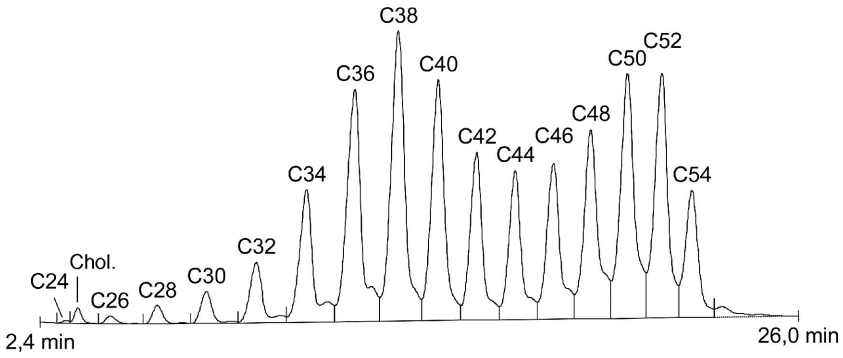
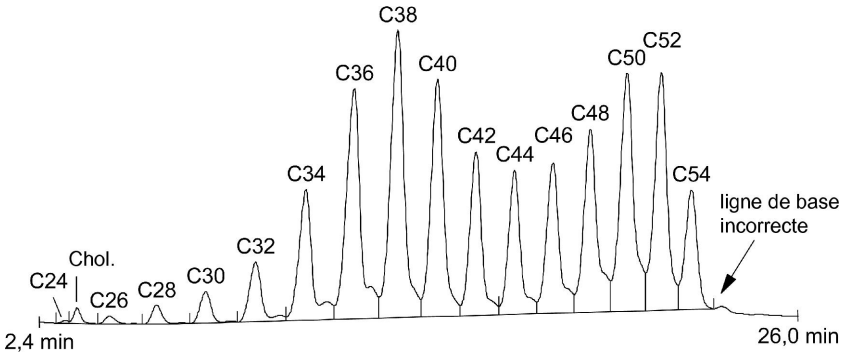


Figure 2

Exemple de chromatogramme des triglycérides de la matière grasse lactique dont la ligne de base est tracée incorrectement



Pour contrôler les conditions de mesure, procéder à une comparaison avec les coefficients de variation (CV) exprimés en pourcentage, des divers TG donnés dans le tableau 1. Ces coefficients ont été calculés à partir de 19 analyses consécutives du même échantillon de matière grasse lactique.

Si les CV sont nettement supérieurs aux valeurs données dans le tableau 1, les conditions chromatographiques ne sont pas appropriées.

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 CV plus élevés, il faut tout de même respecter les limites de répétabilité et reproductibilité données au point 10.

Tableau 1

Coefficients de variation de la teneur en triglycérides (19 analyses consécutives)

Triglycéride	CV %
C_{24}	10,00
C_{26}	2,69
C_{28}	3,03
C_{30}	1,76
C_{32}	1,03
C_{34}	0,79
C_{36}	0,25
C_{38}	0,42
C_{40}	0,20
C_{42}	0,26
C_{44}	0,34
C_{46}	0,37
C_{48}	0,53
C_{50}	0,38
C_{52}	0,54
C_{54}	0,60

9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

9.1. **Composition des triglycérides**

9.1.1. *Calcul*

Calculer, à l'aide de la formule suivante, la fraction massique, w_i, de chaque TG (pour i = C_{24}, C_{26}, C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{38}, C_{40}, C_{42}, C_{44}, C_{46}, C_{48}, C_{50}, C_{52} et C_{54}), ainsi que du cholestérol, exprimée en pourcentage de la teneur en TG totale de l'échantillon d'essai:

$$w_1 = \frac{A_1 \times RF_{si}}{\sum(A_1 \times RF_{si})} \times 100 \qquad (2)$$

où

A_i est la valeur numérique de l'aire des pics de chaque TG dans l'échantillon d'essai;

RF_{si} est le coefficient de réponse de chaque TG déterminé par étalonnage (7.3.3).

9.1.2. *Expression des résultats*

Transcrire les résultats à la deuxième décimale.

9.2. **Valeurs *S***

9.2.1. *Calcul*

9.2.1.1. Calculer les valeurs *S*, exprimées en pourcentage, en insérant dans les formules (3) à (7) la valeur calculée de w_i (9.1.1) des pourcentages de triglycérides appropriés. Toutes les formules doivent être utilisées, quel que soit le type de matière grasse étrangère recherché.

9.2.1.2. 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

$$S = 2{,}098\ 3 \cdot w_{C30} + 0{,}728\ 8 \cdot w_{C34} + 0{,}692\ 7 \cdot w_{C36} + 0{,}635\ 3 \cdot w_{C38} + 3{,}745\ 2 \cdot w_{C40} - 1{,}292\ 9 \cdot w_{C42} + 1{,}354\ 4 \cdot w_{C44} + 1{,}701\ 3 \cdot w_{C46} + 2{,}528\ 3 \cdot w_{C50} \quad (3)$$

9.2.1.3. Graisse de coco et de palmiste

$$S = 3{,}745\ 3 \cdot w_{C32} + 1{,}113\ 4 \cdot w_{C36} + 1{,}364\ 8 \cdot w_{C38} + 2{,}154\ 4 \cdot w_{C42} + 0{,}427\ 3 \cdot w_{C44} + 0{,}580\ 9 \cdot w_{C46} + 1{,}292\ 6 \cdot w_{C48} + 1{,}030\ 6 \cdot w_{C50} + 0{,}995\ 3 \cdot w_{C52} + 1{,}239\ 6 \cdot w_{C54} \quad (4)$$

9.2.1.4. Huile de palme et suif de bœuf

$$S = 3{,}664\ 4 \cdot w_{C28} + 5{,}229\ 7 \cdot w_{C30} - 12{,}507\ 3 \cdot w_{C32} + 4{,}428\ 5 \cdot w_{C34} - 0{,}201\ 0 \cdot w_{C36} + 1{,}279\ 1 \cdot w_{C38} + 6{,}743\ 3 \cdot w_{C40} - 4{,}271\ 4 \cdot w_{C42} + 6{,}373\ 9 \cdot w_{C46} \quad (5)$$

9.2.1.5. Saindoux

$$S = 6{,}512\ 5 \cdot w_{C26} + 1{,}205\ 2 \cdot w_{C32} + 1{,}733\ 6 \cdot w_{C34} + 1{,}755\ 7 \cdot w_{C36} + 2{,}232\ 5 \cdot w_{C42} + 2{,}800\ 6 \cdot w_{C46} + 2{,}543\ 2 \cdot w_{C52} + 0{,}989\ 2 \cdot w_{C54} \quad (6)$$

9.2.1.6. Total

$$S = -2{,}757\ 5 \cdot w_{C26} + 6{,}407\ 7 \cdot w_{C28} + 5{,}543\ 7 \cdot w_{C30} - 15{,}324\ 7 \cdot w_{C32} + 6{,}260\ 0 \cdot w_{C34} + 8{,}010\ 8 \cdot w_{C40} - 5{,}033\ 6 \cdot w_{C42} + 0{,}635\ 6 \cdot w_{C44} + 6{,}017\ 1 \cdot w_{C46} \quad (7)$$

9.2.2. *Expression des résultats d'essai*

Transcrire les résultats à la deuxième décimale.

9.3. **Détection des matières grasses étrangères**

Comparer les cinq valeurs *S* obtenues au point 9.2.1 avec les limites *S* correspondantes données dans le tableau 2.

Lorsque les cinq valeurs *S* s'inscrivent toutes dans les limites indiquées dans le tableau 2, l'échantillon d'essai est considéré comme de la matière grasse lactique pure. Si en revanche certaines valeurs *S* sortent desdites limites, l'échantillon est réputé contenir des matières grasses étrangères.

Bien que les formule (3) à (6) soient plus sensibles pour certaines matières grasses étrangères que la formule totale (7) (voir le tableau B.1), l'obtention d'un résultat positif à partir d'une seule des formules (3) à (6) n'est pas suffisante pour tirer des conclusions sur le type de matière grasse étrangère en présence.

L'annexe B décrit une procédure permettant de calculer la teneur de la matière grasse lactique adultérée en matière grasse végétale ou animale. Cette procédure n'étant pas validée, elle n'est fournie qu'à titre d'information.

Tableau 2

Limites de *S* pour les matières grasses lactiques pures

Matières grasses étrangères	Formule	Limites *S* [a]
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	(3)	98,05 à 101,95
Graisse de coco et de palmiste	(4)	99,42 à 100,58
Huile de palme et suif de bœuf	(5)	95,90 à 104,10
Saindoux	(6)	97,96 à 102,04
Total	(7)	95,68 à 104,32

[a] Calcul sur la base d'un niveau de confiance de 99 %. L'addition de matières grasses étrangères n'est indiquée que si les limites de détection de la formule concernée sont dépassées (voir le tableau B.1).

10. PRÉCISION

10.1. **Essai interlaboratoire**

Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité se basent sur les formules (3) à (7) utilisant de la matière grasse lactique pure et ne sont pas applicables à d'autres matrices que celles données.

10.2. **Répétabilité**

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels obtenus, dans un court intervalle de temps, par la même méthode sur du matériel d'essai identique, dans le même laboratoire et par le même opérateur utilisant les mêmes équipements ne peut dépasser les limites indiquées dans le tableau 3 dans plus de 5 % des cas.

Tableau 3

Limites de répétabilité, r, pour les formules (3) à (7)

Matières grasses étrangères	Formule	r %
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	(3)	0,67
Graisse de coco et de palmiste	(4)	0,12
Huile de palme et suif de bœuf	(5)	1,20
Saindoux	(6)	0,58
Total	(7)	1,49

10.3. **Reproductibilité**

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels obtenus par la même méthode sur du matériel d'essai identique, dans des laboratoires différents et par des opérateurs différents utilisant des équipements différents, ne peut dépasser les limites indiquées dans le tableau 4 dans plus de 5 % des cas.

Tableau 4

Limites de reproductibilité, R, pour les formules (3) à (7)

Matières grasses étrangères	Formule	R %
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	(3)	1,08
Graisse de coco et de palmiste	(4)	0,40
Huile de palme et suif de bœuf	(5)	1,81
Saindoux	(6)	0,60
Total	(7)	2,07

11. INCERTITUDE DE MESURE

À partir de la répétabilité, *r*, et de la reproductibilité, *R*, on peut calculer l'incertitude majorée pour une valeur *S*.

L'inclusion de l'incertitude majorée (basée sur des analyses doubles) dans les limites *S* du tableau 2 donne les limites *S* étendues présentées dans le tableau 5.

Tableau 5

Limites *S* étendues pour les matières grasses butyriques pures, incertitude majorée incluse

Matières grasses étrangères	Formule	Limites *S* étendues
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	(3)	97,36 à 102,64
Graisse de coco et de palmiste	(4)	99,14 à 100,86
Huile de palme et suif de bœuf	(5)	94,77 à 105,23
Saindoux	(6)	97,65 à 102,35
Total	(7)	94,42 à 105,58

12. COMPTE RENDU D'ESSAI

Le compte rendu d'essai doit indiquer:

— toutes les informations nécessaires à l'identification complète de l'échantillon,

— la méthode d'échantillonnage utilisée, pour autant qu'elle soit connue,

— la méthode d'essai utilisée en référence à la présente norme internationale,

— 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,

— les résultats de l'essai et, sous réserve de l'étude de la répétabilité, le résultat final obtenu.

ANNEXE A

(normative)

PRÉPARATION DE LA COLONNE À GARNISSAGE

A.1. RÉACTIFS ET INSTRUMENTS

A.1.1. **Toluène** ($C_6H_5CH_3$).

A.1.2. **Diméthyldichlorosilane** [$Si(CH_3)_2Cl_2$] en solution.

Dissoudre 50 ml de diméthyldichlorosilane dans 283 ml de toluène (A.1.1).

A.1.3. **Beurre de cacao** en solution, fraction massique de 5 % de beurre de cacao dans le *n*-hexane (4.4) ou le *n*-heptane (4.5).

A.1.4. **Phase stationnaire**, 3 % OV-1 sur Gas ChromQ de 125 µm à 150 µm (100 à 120 mesh) ([1]).

Note: Conversion de la notation granulométrique en micromètres conformément à BS 410 (toutes les parties) [6].

A.1.5. **Colonne de verre**, diamètre intérieur de 2 mm et longueur de 500 mm, en forme de U.

A.1.6. **Dispositif**, pour remplir la colonne à garnissage.

A.1.6.1. *Colonne de remplissage*, avec capuchons vissés qui comporte un repère indiquant jusqu'où la quantité exigée de phase stationnaire peut être versée.

A.1.6.2. *Tamis*, (taille des mailles environ 100 µm) avec capuchon à vis, permettant de fermer hermétiquement la colonne de verre conformément à la figure A.3.

A.1.6.3. *Laine de verre silanisée*, désactivée.

A.1.6.4. *Vibrateur* pour une distribution uniforme de la phase stationnaire au cours du remplissage.

A.1.6.5. *Dispositifs de silanisation*, pour silaniser la surface en verre de la colonne.

A.1.6.6. *Flacon de Woulff*.

A.1.6.7. *Pompe d'extraction d'eau*.

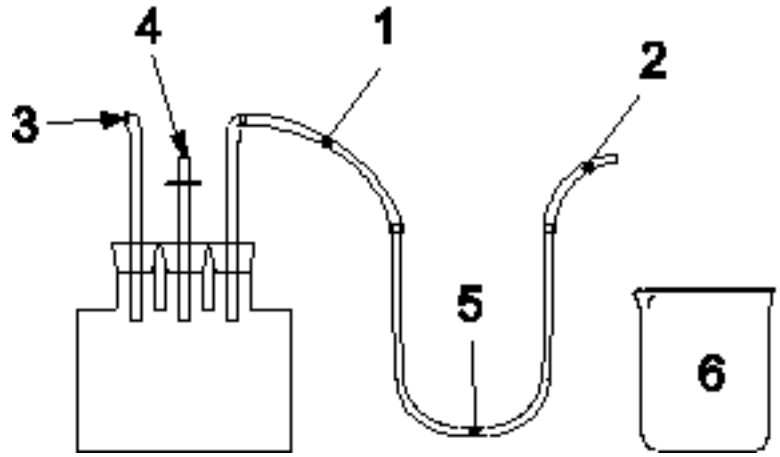
A.2. SILANISATION (DÉSACTIVATION DE LA SURFACE EN VERRE)

Une fois le flacon de Woulff (A.1.6.6) raccordé à la pompe d'extraction d'eau (A.1.6.7), plonger le tube 2 (voir la figure A.1) dans la solution de diméthyldichlorosilane (A.1.2). Remplir la colonne (A.1.5) de cette solution en fermant le robinet d'arrêt. Rouvrir le robinet d'arrêt puis retirer les deux tubes. Fixer la colonne sur un support puis la remplir complètement à l'aide d'une pipette avec la solution de diméthyldichlorosilane (A.1.2).

([1]) Exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est fournie à titre indicatif aux utilisateurs de cette norme internationale et elle ne constitue en rien une recommandation de ce produit par les normes ISO ou FIL.

Figure A.

Dispositif de silanisation



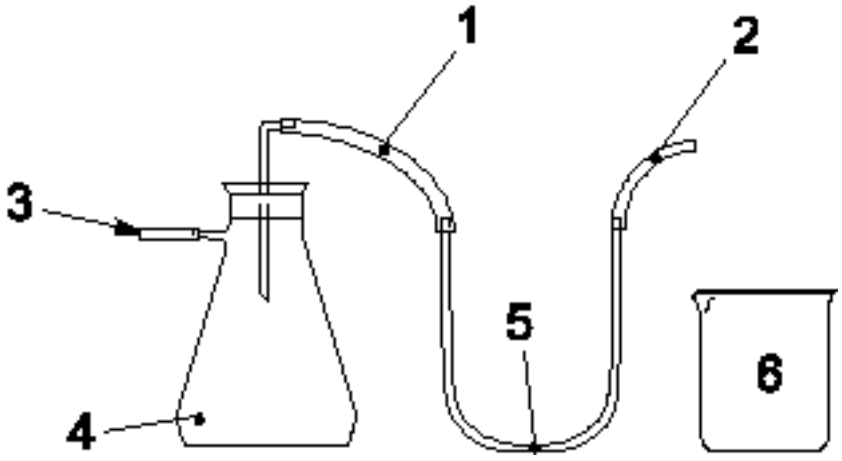
Légende

1) tube 1
2) tube 2
3) pompe d'extraction d'eau
4) robinet d'arrêt
5) colonne de verre
6) diméthyldichlorosilane et toluène

Laisser la colonne au repos pendant une durée de 20 minutes à 30 minutes puis remplacer le flacon de Woulff par une fiole à filtrer. Vider la colonne en la raccordant à la pompe d'extraction d'eau (A.1.6.7) (voir la figure A.2). Rincer la colonne vidée successivement avec 75 ml de toluène (A.1.1) et 50 ml de méthanol (4.3) en plongeant le tube 2 dans le solvant. Dans un four (5.6) réglé à 100 °C, sécher la colonne rincée pendant environ 30 minutes.

Figure A.

Dispositif de rinçage



Légende

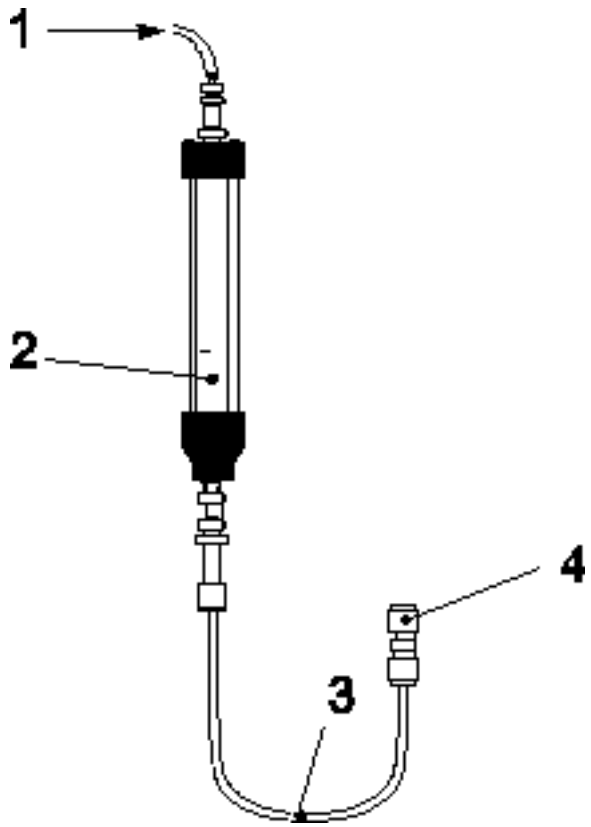
1) tube 1
2) tube 2
3) pompe d'extraction d'eau
4) fiole à filtrer
5) colonne de verre
6) agent de rinçage

A.3. REMPLISSAGE

Remplir la colonne à l'aide du dispositif représenté sur la figure A.3. Verser la phase stationnaire (A.1.4) dans la colonne de remplissage (A.1.6.1) jusqu'au trait. Fermer hermétiquement l'extrémité inférieure de la colonne de verre à remplir à l'aide d'un tampon de laine de verre comprimée silanisée d'environ 1 cm de long (A.1.6.3). Boucher l'extrémité de la colonne à l'aide du tamis à mailles fines (A.1.6.2).

Figure A.

Remplissage de la colonne de verre



Légende

1) admission de l'azote
2) colonne de remplissage à remplir jusqu'au trait avec de l'OV-1
3) colonne de verre à remplir
4) bouchon à vis muni d'un filtre contre lequel la fibre de verre et la phase stationnaire sont comprimés

Remplir la colonne sous pression (300 kPa, à l'azote) avec la phase stationnaire. Pour obtenir un garnissage uniforme, continu et compact, un vibrateur 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 silanisée (A.1.6.3) est introduit dans l'autre extrémité de la colonne remplie. Rogner les extrémités faisant saillie. Enfoncer le tampon de quelques millimètres dans la colonne à l'aide d'une spatule.

A.4. CONDITIONNEMENT

Au cours des étapes a) à c), l'extrémité arrière de la colonne n'est pas reliée au détecteur pour éviter toute contamination. Pour conditionner la colonne remplie (A.3) procéder comme suit:

a) rincer la colonne à l'azote pendant 15 minutes en réglant le débit à 40 ml/min et le four à colonne à 50 °C;

b) chauffer la colonne jusqu'à 355 °C à raison de 1 °C/min sous débit d'azote réglé à 10 ml/min;

c) maintenir la colonne à 355 °C pendant 12 h à 15 h;

d) injecter deux fois 1 µl de solution de beurre de cacao (A.1.3) en respectant le programme de température pour la colonne à garnissage indiqué au point 7.3.4.1;

Note: Le beurre de cacao se compose presque exclusivement de triglycérides C_{50} à C_{54} à point d'ébullition élevé, ce qui simplifie le conditionnement de la colonne du fait de leurs coefficients de réponse respectifs.

e) procéder à 20 injections de 0,5 µl d'une solution de matière grasse lactique conformément au point 7.2 dans un délai de 2 à 3 jours en utilisant les paramètres définis pour la colonne à garnissage figurant au point 3.4.1.

— Pour l'analyse des échantillons d'essai, n'utiliser que des colonnes dont le coefficient de réponse est voisin de 1, et inférieur à 1,20.

ANNEXE B

(pour information)

QUANTIFICATION DE LA TENEUR EN MATIÈRES GRASSES ÉTRANGÈRES

B.1. GÉNÉRALITÉS

Le tableau B.1 indique les limites de détection pour diverses matières grasses étrangères calculées sur la base d'un niveau de confiance de 99 %. La colonne du milieu présente les limites de détection de la meilleure des formules (3) à (6).

Les limites de détection de la formule totale (7), indiquées dans la colonne de droite, sont un peu plus élevées. En principe, la formule (7) ne sert qu'à quantifier les matières grasses étrangères.

Toutes les formules permettent également de détecter des combinaisons de différentes matières grasses étrangères. La variation de la composition des TG d'une sorte de matières grasses étrangères d'un échantillon à un autre n'a pas d'effet notable sur les limites de détection.

Les limites de détection s'appliquent lorsqu'on utilise tant les formules individuelles que la formule totale, mais la valeur *S* de la formule totale est dans certains cas nécessaire pour la quantification (B.2).

Tableau B.1

Limites de détection des matières grasses étrangères ajoutées à la matière grasse lactique (niveau de confiance 99 %)

Matières grasses étrangères	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
Huile de noix 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 graines de coton	3,3	4,4
Saindoux	2,7	4,7
Suif de bœuf	5,2	5,4
Huile de poisson hydrogénée	5,4	6,1

B.2. CALCUL

Il convient de déterminer la teneur en matières grasses étrangères uniquement si au moins l'une des limites *S* (tableau 2 ou tableau 5) est dépassée. Pour obtenir des informations quantitatives, calculer la fraction massique des matières grasses étrangères ou la fraction massique du mélange de matières grasses étrangères, w_f, exprimée en pourcentage, dans l'échantillon d'essai à l'aide de la formule suivante:

$$w_f = 100 \cdot \left| \frac{(100 - S)}{(100 - S_f)} \right| \quad (B.1)$$

où:

S est le résultat obtenu en insérant dans l'une des formules (3) à (7) les données des TG obtenues à partir de la matière grasse lactique à laquelle une sorte de matières grasses étrangères ou un mélange de matières grasses étrangères ont été ajoutés;

S_f est une constante, qui dépend du type de matières grasses étrangères ajouté.

Si le type de matières grasses étrangères ajouté à la matière grasse lactique n'est pas connu, utiliser une valeur S_f générale de 7,46 (tableau B.2). Toujours partir de la valeur *S* obtenue par la formule (7), même si ses limites *S* ne sont pas franchies, mais que celles d'une autre formule le sont.

Si les matières grasses étrangères sont connues, insérer les valeurs S_f individuelles correspondantes (tableau B.2) dans la formule (B.1). Pour calculer *S*, choisir la formule de matières grasses étrangères qui convient parmi les formules (3) à (6).

Tableau B.2

Valeurs S_f des différentes matières grasses étrangères

Matières grasses étrangères	S_f
Produit inconnu	7,46
Huile de soja	8,18
Huile de tournesol	9,43
Huile d'olive	12,75
Huile de noix 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 graines de coton	41,18
Saindoux	177,55
Suif de bœuf	17,56
Huile de poisson	64,12

B.3 EXPRESSION DES RÉSULTATS D'ESSAI

Transcrire les résultats à la deuxième décimale.

Bibliographie

(1) Molkentin, J., Precht, D. Representative determination of the butyric acid content in European milk fats. *Milchwissenschaft*, 52, 1987, pp. 82-85

(2) Precht, D., Molkentin, J. Quantitative triglyceride analysis using short capillary columns. *Chrompack News*, 4, 1993, pp. 16-17

(3) Molkentin, J., Precht, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. *Chromatographia*, 39, 1994, pp. 265-270

(4) Molkentin, J., Precht, D. Equivalence of packed and capillary GC columns with respect to suitability for foreign fat detection in butter using the triglyceride formula method. *Chromatographia*, 52, 2000, pp. 791-797

(5) ISO 707FIL 50, Lait et produits laitiers — Méthode d'échantillonnage

(6) BS 410:1988, Tamis de contrôle — Exigences techniques et vérifications

(7) Precht, D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, 43, 1991, pp. 219-242

(8) Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analyses. *Fat Sci. Technol.*, 93, 1991, pp. 538-544

(9) DIN 10336:1994, Nachweis *und Bestimmung von Fremdfetten in Milchfett anhand einer gaschromatographischen Triglyceridanalyse* [Detection and determination of foreign fats in milk fat using a gas chromatographic triglyceride analysis]

(10) 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. No VI/2644/91, VI/8.11.91, VI/1919/92, VI 3842/92. VI/5317/92, VI/4604/93

(11) Molkentin, J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 2007, pp. 505-510

ANNEXE XXI

(Article 18)

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

1. Une nouvelle analyse est effectuée si l'opérateur en fait la demande dans les 7 jours ouvrables qui suivent la communication des résultats de la première analyse et à condition que des échantillons doubles du produit soient disponibles sous scellés et aient été stockés dans des conditions appropriées auprès des organismes compétents. La nouvelle analyse est effectuée dans les 21 jours ouvrables après réception de la demande, dans un autre laboratoire approuvé par l'organisme compétent à l'aide de la méthode adéquate. 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.

2. Les incertitudes majorées ($k = 2$) de la moyenne $\bar{y}_1$ des mesures répétées n_1 fois dans le laboratoire 1 et de la moyenne $\bar{y}_2$ des mesures répétéesn_2 fois dans le laboratoire 2 sont

3. $U_{\bar{y}_1} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_1}\right)}$ et $U_{\bar{y}_2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(1 - \frac{1}{n_2}\right)}$ resp., où σ_r est l'écart type de répétabilité et σ_R est l'écart type de reproductibilité de la méthode appliquée. Si le résultat final *y* de la mesure obtenue dans les laboratoires est calculé à l'aide d'une formule de type $y = x_1 + x_2$, $y = x_1 - x_2$, $y = x_1 \cdot x_2$ ou $y = x_1/x_2$ il convient d'appliquer les méthodes habituelles de combinaison des écarts types pour obtenir l'incertitude.

4. Pour tester la conformité des résultats des deux laboratoires avec l'écart type de reproductibilité σ_R de la méthode, l'incertitude majorée de la différence $\bar{y}_1 - \bar{y}_2$ est calculée comme suit:

5. $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2} = \sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = 2\sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}$ Si la valeur absolue de la différence des moyennes de laboratoire, $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$, n'est pas supérieure à son incertitude $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

   $$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| \leq U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

   les résultats des deux laboratoires sont conformes à l'écart type de reproductibilité σ_r, et la moyenne arithmétique des deux moyennes de laboratoire,

   $$\bar{y} = \frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_2}{2},$$

   est rapportée comme étant le résultat final. Son incertitude majorée est

   $$U_{\bar{y}} = \frac{1}{2}\sqrt{U_{\bar{y}_1}^2 + U_{\bar{y}_1}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2\left(2 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}.$$

   La quantité à analyser est rejetée car jugée non conforme à une limite réglementaire supérieure *UL* si

   $$\bar{y} - U_{\bar{y}} > \text{UL};$$

   dans le cas contraire, elle est acceptée car jugée conforme à *UL*.

   La quantité à analyser est rejetée car jugée non conforme à une limite réglementaire inférieure *LL* si

   $$\bar{y} - U_{\bar{y}} < \text{LL};$$

   dans le cas contraire, elle est acceptée car jugée conforme à *LL*.

   Si la valeur absolue de la différence des moyennes de laboratoire, $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$, est supérieure à son incertitude $U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}$,

   $$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| > U_{\bar{y}_1 - \bar{y}_2},$$

les résultats des deux laboratoires ne sont pas conformes à l'écart type de reproductibilité.

Dans ce cas, la quantité à analyser est rejetée car jugée non conforme si la seconde analyse confirme la première. Dans le cas contraire, la quantité à analyser est acceptée car jugée conforme.

Le résultat final doit être communiqué dès que possible par l'organisme compétent à l'opérateur. Les coûts de la seconde analyse sont à la charge de l'opérateur dans le cas où la quantité à analyser est rejetée.

ANNEXE XXII

TABLEAU DE CORRESPONDANCE

Règlement (CE) nº 213/2001	Présent règlement
Article 1er	Article 1er
Article 2	Article 1er
Article 3	Article 2
—	Article 3
Article 4	—
Article 5	—
Article 6	Article 4
Article 7	Article 18
Article 8	—
Article 9	Article 5
Article 10	Article 6
Article 11	Article 7
Article 12	Article 8
Article 13	Article 9
Article 14	Article 10
Article 15	Article 11
Article 16	Article 12
Article 17	Article 13
—	Article 14
Article 18	Article 15
Article 19	Article 16
	Article 17
	Article 19
Article 20	—
Article 21	—
Article 22	Article 20
Article 23	Article 21