RÈGLEMENT (CEE) N° 3711/86 DE LA COMMISSION

du 4 décembre 1986

modifiant le règlement (CEE) n° 625/78 relatif aux modalités du stockage public du lait écrémé en poudre

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu le règlement (CEE) n° 804/68 du Conseil, du 27 juin 1968, portant organisation commune des marchés dans le secteur du lait et des produits laitiers (1), modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 1335/86 (2), et notamment son article 7 paragraphe 5,

considérant que le règlement (CEE) n° 1014/68 du Conseil, du 20 juillet 1968, établissant les règles générales régissant le stockage public du lait écrémé en poudre (3), modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 1272/79 (4), dispose dans son article 3 que le prix d'intervention s'applique à du lait écrémé en poudre rendu à un entrepôt situé à une distance maximale, à déterminer, du lieu où il était entreposé ; que, si l'entrepôt où le lait écrémé en poudre est livré est situé à une distance supérieure à cette distance maximale, les frais supplémentaires de transport, à déterminer forfaitairement, sont supportés par l'organisme d'intervention ;

considérant que le règlement (CEE) n° 625/78 de la Commission (5), modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2256/86 (6), a fixé à 100 kilomètres la distance maximale en question ; que l'expérience acquise a démontré que cette distance maximale était insuffisante pour permettre aux organismes d'intervention de gérer, dans les meilleures conditions possibles, l'accès aux entrepôts publics ; qu'il convient par conséquent de porter cette distance à 350 kilomètres ;

considérant que l'annexe I du règlement (CEE) n° 625/78 concernant la qualité du lait écrémé en poudre indique au paragraphe 2 les méthodes de contrôle utilisées pour la recherche de certains produits ; qu'il se révèle opportun de prévoir la référence aux normes internationales pour la prise d'échantillons ;

considérant que l'annexe IV du règlement (CEE) n° 625/78 prévoit la méthode de dosage de l'acide sialique libre pour la recherche du lactosérum présuré dans le lait écrémé en poudre destiné au stockage public ; que cette méthode était utilisée à titre temporaire jusqu'au 31 mars 1986 ; qu'il convient, dès lors, de supprimer ladite annexe ;

considérant que le comité de gestion du lait et des produits laitiers n'a pas émis d'avis dans le délai imparti par son président,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT :

Article premier

Le règlement (CEE) n° 625/78 est modifié comme suit.

1) À l'article 5 paragraphe 1, les termes « 100 kilomètres » sont remplacés par les termes « 350 kilomètres ».

2) À l'annexe I paragraphe 2 point a), les termes « norme ISO » sont chaque fois remplacés par les termes « norme internationale ISO ».

3) À l'annexe I paragraphe 2 point b), le texte du deuxième tiret est remplacé par le texte suivant :

« — Lactosérum présuré :

dosage des glycomacropeptides par la chromatographie liquide à haute performance (3) ».

4) À l'annexe I paragraphe 2, le point c) suivant est ajouté :

« c) Le prélèvement des échantillons est effectué selon la procédure prévue par la norme internationale ISO 707 ; les États membres peuvent toutefois utiliser une autre méthode d'échantillonnage pour autant que cette dernière soit conforme aux principes de la norme précitée. »

5) À l'annexe I, la note (4) au bas de page est supprimée.

6) L'annexe IV est supprimée.

7) L'annexe V est remplacée par le texte repris à l'annexe du présent règlement.

Article 2

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

Les points 4 et 7 de l'article 1er sont applicables à partir du 2 février 1987.

(1) JO n° L 148 du 28. 6. 1968, p. 13.
(2) JO n° L 119 du 8. 5. 1986, p. 19.
(3) JO n° L 173 du 22. 7. 1968, p. 4.
(4) JO n° L 161 du 29. 6. 1979, p. 11.
(5) JO n° L 84 du 31. 3. 1978, p. 19.
(6) JO n° L 196 du 18. 7. 1986, p. 41.

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

Fait à Bruxelles, le 4 décembre 1986.

Par la Commission
Frans ANDRIESSEN
Vice-président

ANNEXE

« ANNEXE V

RECHERCHE DU LACTOSÉRUM PRÉSURÉ DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE DESTINÉ AU STOCKAGE PUBLIC PAR LE DOSAGE DES GLYCOMACROPEPTIDES AU MOYEN DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

1. **Objet et domaine d'application**

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

2. **Références**

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

3. **Définition**

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

4. **Principe**

— Reconstitution du lait écrémé en poudre, élimination des matières grasses et des protéines avec l'acide trichloracétique, et centrifugation,

— détermination de la quantité de glycomacropeptides (GMP) présents dans le surnageant par chromatographie liquide à haute performance (CLHP),

— évaluation du résultat obtenu par rapport à des échantillons témoins constitués de lait écrémé en poudre exempts ou additionnés d'un pourcentage connu de lactosérum en poudre.

5. **Réactifs**

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

5.1. *Solution d'acide trichloracétique*

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

5.2. *Solution éluante, pH 6,0*

Dissoudre 1,74 g de phosphate dipotassique (K_2HPO_4), 12,37 g de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) et 21,41 g de sulfate de sodium (Na_2SO_4) dans 700 ml d'eau environ.

Ajuster, si nécessaire, à pH 6,0 à l'aide d'une solution d'acide phosphorique ou d'hydroxyde de potassium.

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

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

5.3. *Solution de lavage et de conservation des colonnes*

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

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

5.4. *Échantillons témoins*

5.4.1. Lait écrémé en poudre répondant aux exigences du règlement (CEE) n° 625/78, soit [O].

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

6. **Appareillage**

6.1. Balance analytique.

6.2. Centrifugeuse pouvant atteindre une force centrifuge de 2 200 g et munie de tubes à centrifuger bouchés d'une capacité d'environ 25 ml.

6.3. Agitateur mécanique.

6.4. Agitateur magnétique.

6.5. Entonnoirs en verre, d'environ 7 cm de diamètre.

6.6. Papiers filtres, filtration moyenne, d'environ 12,5 cm de diamètre.

6.7. Dispositif de filtration en verre muni de membrane filtrante de 0,45 µm de diamètre de pore.

6.8. Pipette graduée permettant de délivrer 10 ml, conforme à l'ISO 648, classe A, ou à l'ISO/R 835.

6.9. Bain d'eau thermostaté réglé à 25 plus ou moins 0,5 °C.

6.10. Équipement CLHP comprenant :

6.10.1. pompe,

6.10.2. injecteur, manuel ou automatique, de 15 à 30 µl de capacité,

6.10.3. deux colonnes en série TSK 2 000 SW (longueur 30 cm, diamètre intérieur 0,75 cm) ou des colonnes d'efficacité équivalente et une précolonne en amont (3 cm × 0,3 cm) garnie de I 125 ou d'un matériel d'une efficacité équivalente,

6.10.4. four à colonne thermostaté réglé à 35 plus ou moins 1 °C,

6.10.5. détecteur UV à longueur d'onde variable, permettant d'effectuer des mesures à 205 nm à une sensibilité de 0,008 A,

6.10.6. intégrateur pouvant intégrer de vallée à vallée.

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

7. **Échantillonnage**

7.1. Norme internationale ISO 707 — « Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage » conformément aux indications reprises au paragraphe 2 point c) de l'annexe I.

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

8. **Mode opératoire**

8.1. *Préparation de l'échantillon pour essai*

Transvaser le lait en poudre dans un récipient de capacité environ double du volume de la poudre, muni d'un couvercle étanche à l'air. Fermer le récipient immédiatement.

Bien mélanger le lait en poudre par retournement successif du récipient.

8.2. *Prise d'essai*

Peser 2,000 plus ou moins 0,001 g d'échantillon pour essai dans un tube à centrifuger (6.2).

8.3. *Élimination des matières grasses et des protéines*

8.3.1. Ajouter 20,0 g d'eau tiède (50° C) à la prise d'essai. Dissoudre la poudre en agitant pendant 5 minutes à l'aide de l'agitateur (6.3). Ramener la température du tube à 25 °C.

8.3.2. Ajouter en 2 minutes, 10,0 ml de la solution d'acide trichloracétique (5.1) sous agitation magnétique (6.4). Placer le tube dans le bain d'eau (6.9) et l'y maintenir 60 minutes.

8.3.3. Centrifuger (6.2) 2 200 g pendant 10 minutes. Ou filtrer sur papier (6.6), rejeter les 5 premiers ml de filtrat.

8.4. *Détermination chromatographique*

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

Note :

1. Maintenir la solution éluante (5.2) à 85 °C durant toute l'analyse chromatographique afin de conserver l'éluant dégazé et de prévenir toute prolifération bactérienne. Toute précaution ayant un effet similaire est acceptable.
2. Lors de chaque interruption, rincer les colonnes à l'eau. Ne jamais les laisser sous la solution éluante (5.2).

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

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

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

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

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

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

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

A_{II} : surface du pic II,

A_{III} : surface du pic III,

A_{IV} : surface du pic IV.

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

En cas de doute, répéter l'analyse.

8.5. *Étalonnage*

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

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

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

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

9. Expression des résultats

9.1. *Mode de calcul et formules*

9.1.1. Calcul des coefficients de réponse R :

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

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

où :

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

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

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

où

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

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

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

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

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

où :

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

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

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

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

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

où :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

où :

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

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

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

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

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

9.3. *Précision de la méthode*

9.3.1. Répétabilité

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

9.3.2. Reproductibilité

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

9.4. *Interprétation*

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

où

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

où

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

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

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

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

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

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

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

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

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

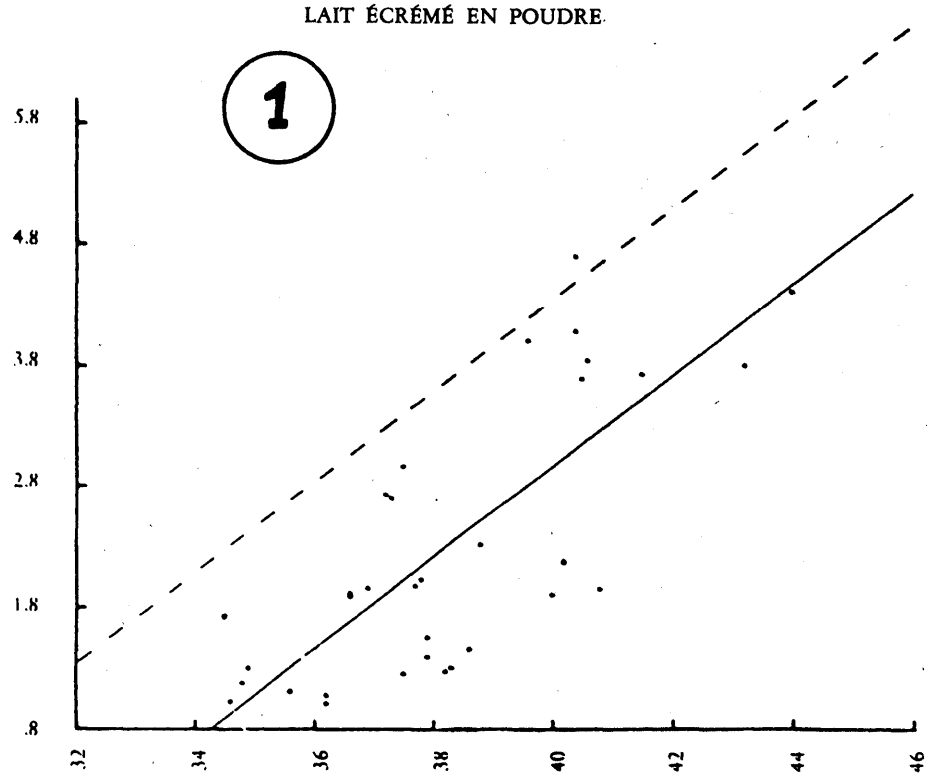
La teneur en lactosérum présent est calculée selon la formule suivante :

$$W = T_2 + 0{,}91$$

où

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

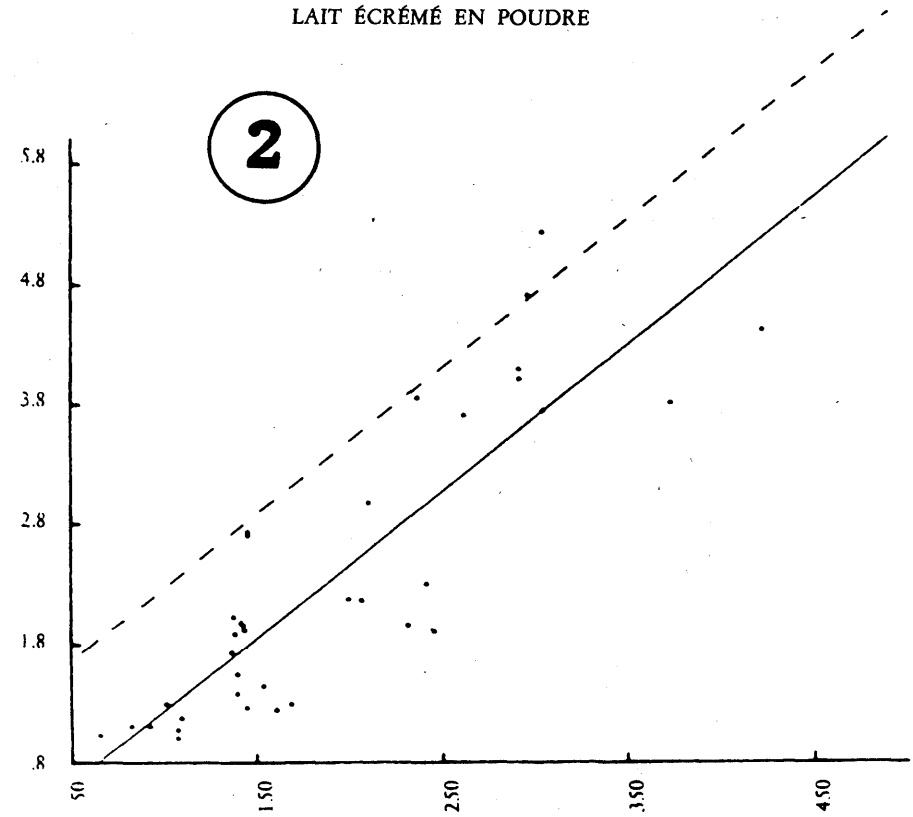
LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE



% teneur en matières protéiques totales

Pic III

LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE



Pic II »

Pic III