RÈGLEMENT (CE) N° 322/96 DE LA COMMISSION

du 22 février 1996

relatif aux modalités d'application du stockage public du lait écrémé en poudre

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté 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 (CE) n° 2931/95 de la Commission (2), et notamment son article 7 paragraphe 5 et son article 28,

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° 3577/90 (4), sera abrogé avec effet au 1er mars 1996 par le règlement (CE) n° 1538/95 du Conseil (5); qu'il y a lieu, par conséquent, d'inclure les règles qui n'ont pas été incorporées au règlement (CEE) n° 804/68 dans les modalités d'application du stockage public du lait écrémé en poudre prévues par le règlement (CEE) n° 625/78 de la Commission (6), modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 1802/95 (7); que l'importance des adaptations à apporter audit règlement ainsi que le nombre élevé de modifications dont ce règlement a déjà fait l'objet rendent appropriée la refonte de celui-ci pour des raisons de clarté et de transparence; qu'il y a lieu en conséquence d'abroger le règlement (CEE) n° 625/78;

considérant que ne peut être acheté par les organismes d'intervention que le lait écrémé en poudre respectant une teneur minimale en matière protéique; que, en outre, le prix d'achat peut varier selon la teneur en matière protéique; qu'il y a lieu de déterminer la méthode d'analyse à utiliser pour constater ladite teneur et de préciser la façon de calculer le prix d'achat;

considérant que, afin d'assurer qu'aucun paiement du lait écrémé en poudre acheté n'est effectué indûment, il convient de préciser que le respect de toutes les conditions requises soit vérifié et que la teneur en matière protéique soit constatée avant le paiement;

considérant qu'une méthode de référence pour la détection de babeurre a été mise au point; que, afin de garantir une application uniforme des mesures de contrôle, il y a lieu d'avoir recours à cette méthode d'analyse pour le contrôle du lait écrémé en poudre acheté par les organismes d'intervention;

considérant que la directive 92/46/CEE du Conseil, du 16 juin 1992, arrêtant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait (8), modifiée en dernier lieu par la directive 94/71/CE (9), prévoit que le lait dont la teneur en substances antimicrobiennes dépasse le niveau autorisé par le règlement (CEE) n° 2377/90 du Conseil (10), modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 282/96 (11), ne peut être destiné à la consommation humaine; qu'il est opportun de contrôler le lait écrémé en poudre acheté par les organismes d'intervention sur la présence des substances antimicrobiennes qui sont couramment utilisées; qu'il y a lieu de prévoir une méthode de contrôle à cet effet;

considérant que, pour le reste, les dispositions relatives au stockage public du lait écrémé en poudre ont fait leurs preuves et, avec certaines adaptations d'ordre technique, peuvent être maintenues;

considérant que les faits générateurs du taux de conversion agricole applicable au régime de stockage public sont déterminés par le règlement (CEE) n° 1756/93 de la Commission (12), modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 693/95 (13);

considérant que 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:

Article premier

1. Les organismes d'intervention n'achètent que du lait écrémé en poudre qui répond à la définition prévue à l'article 7 paragraphe 1 du règlement (CEE) n° 804/68 et aux exigences de qualité visées à l'annexe I et pour lequel les conditions suivantes sont satisfaites:

a) le contrôle de qualité a été effectué selon les méthodes d'analyses visées aux annexes I, V, VI et VII et sur la base des échantillons prélevés selon les modalités visées à l'annexe IV;

(1) JO n° L 148 du 28. 6. 1968, p. 13.
(2) JO n° L 307 du 20. 12. 1995, p. 10.
(3) JO n° L 173 du 22. 7. 1968, p. 4.
(4) JO n° L 353 du 17. 12. 1990, p. 23.
(5) JO n° L 148 du 30. 6. 1995, p. 17.
(6) JO n° L 84 du 31. 3. 1978, p. 19.
(7) JO n° L 174 du 26. 7. 1995, p. 27.
(8) JO n° L 268 du 14. 1. 1992, p. 1.
(9) JO n° L 368 du 31. 12. 1994, p. 33.
(10) JO n° L 224 du 18. 8. 1990, p. 1.
(11) JO n° L 37 du 15. 2. 1996, p. 9.
(12) JO n° L 161 du 2. 7. 1993, p. 48.
(13) JO n° L 71 du 31. 3. 1995, p. 52.

b) répondant aux conditions prévues aux annexes II et III en ce qui concerne l'emballage et le marquage;

c) ne contenant pas d'autres produits, notamment du babeurre ou du lactosérum;

d) fabriqué au cours de la période d'un mois précédant le jour de la réception de l'offre de vente par l'organisme d'intervention ou, dans le cas visé à l'annexe III point e) deuxième phrase, de quatre semaines précédant la semaine dans laquelle l'offre est reçue;

e) ne dépassant pas les niveaux maximaux admissibles de radioactivité rendus applicables par la réglementation communautaire.

Les niveaux applicables sont ceux fixés à l'article 3 du règlement (CEE) n° 737/90 du Conseil (1). Le contrôle du niveau de contamination radioactive du produit n'est effectué que si la situation l'exige et pendant la période nécessaire. En cas de besoin, la durée et la portée des mesures de contrôle sont déterminées selon la procédure prévue à l'article 30 du règlement (CEE) n° 804/68.

2. Au sens du présent règlement, on entend par:

a) «babeurre»: le sous-produit de la fabrication du beurre, obtenu après barattage ou burification en continu de la crème et séparation de la phase grasse solide;

b) «lactosérum»: le sous-produit de la fabrication du fromage ou de la caséine moyennant l'action des acides, de la présure et/ou des procédés chimico-physiques.

3. La quantité minimale de l'offre est de vingt tonnes. Les États membres peuvent augmenter la quantité minimale et/ou prévoir que le lait écrémé en poudre soit offert par tonne entière.

4. L'organisme d'intervention enregistre le jour de la réception de l'offre de vente ainsi que les quantités et les dates de fabrication correspondantes, de même que le lieu où le lait écrémé en poudre offert est entreposé.

5. Une offre n'est valable que si la preuve est apportée que le soumissionnaire a constitué une garantie égale à douze écus par tonne de lait écrémé en poudre offerte.

Dans le cadre du présent règlement, le maintien de l'offre et la livraison du lait écrémé en poudre à l'entrepôt désigné par l'organisme d'intervention constituent les exigences principales dont l'exécution est assurée par cette garantie. Toutefois, dans le cas où il résulterait du contrôle visé au paragraphe 1 point a) que le lait écrémé en poudre n'est pas conforme aux exigences prévues au paragraphe 1, la garantie sera néanmoins libérée pour les quantités non encore livrées.

La garantie est constituée dans l'État membre où l'offre est introduite.

Article 2

1. L'entreprise visée à l'article 7 paragraphe 1 du règlement (CEE) n° 804/68 n'est agréée que si:

a) elle est agréée selon l'article 10 de la directive 92/46/CEE et dispose des installations techniques appropriées;

b) elle s'engage à tenir en permanence les registres, déterminés par l'organisme compétent de chaque État membre, consignant l'origine des matières premières, les quantités de lait écrémé, de babeurre et de lactosérum traitées, le type de traitement thermique du lait écrémé, les quantités de produits obtenues, le conditionnement, l'identification et la date de sortie de chaque lot de lait écrémé en poudre, de babeurre en poudre et de lactosérum en poudre;

c) elle accepte de soumettre sa fabrication de lait écrémé en poudre susceptible d'être offert à l'intervention publique à un contrôle officiel spécifique;

d) elle s'engage à informer l'organisme compétent chargé du contrôle, au moins deux jours ouvrables à l'avance, de son intention de fabriquer du lait écrémé en poudre pour l'intervention publique. Toutefois, l'État membre peut fixer un délai plus bref.

2. Afin d'assurer le respect des dispositions du présent règlement, les organismes compétents assurent des contrôles inopinés sur place, en fonction du programme de production de lait écrémé en poudre d'intervention des ateliers de production concernés.

Ces contrôles doivent assurer au moins:

— un contrôle par période de vingt-huit jours de fabrication pour l'intervention et au moins une fois par semestre, afin d'examiner les éléments visés au paragraphe 1 point b),

— un contrôle par semestre, afin de vérifier le respect des conditions d'agrément mentionnées au paragraphe 1.

3. L'agrément est retiré si les conditions préalables prévues au paragraphe 1 ne sont plus satisfaites. À la demande de l'entreprise concernée, l'agrément peut être rétabli après une période de six mois à l'issue d'un contrôle approfondi.

Dans le cas où il est constaté qu'une entreprise n'a pas respecté l'un de ses engagements visés au paragraphe 1 points b), c) et d), sauf en cas de force majeure, l'agrément est suspendu pour une période allant d'un à douze mois en tenant compte de la gravité de l'irrégularité.

L'État membre peut décider de ne pas imposer ladite sanction lorsqu'il est établi que l'irrégularité n'a pas été commise délibérément ou par négligence grave et qu'elle est d'une importance minime au regard de l'efficacité des contrôles prévus au paragraphe 2.

(1) JO n° L 82 du 29. 3. 1990, p. 1.

4. Les contrôles effectués en vertu des paragraphes 2 et 3 doivent faire l'objet d'un rapport précisant:

— la date du contrôle,

— sa durée,

— les opérations effectuées.

Le rapport de contrôle doit être signé par l'agent responsable.

5. Les États membres communiquent à la Commission les mesures prises concernant les contrôles prévus aux paragraphes 2 et 3 dans un délai d'un mois à compter de leur adoption.

Article 3

L'organisme qui assure le contrôle du respect des dispositions prévues à l'article 1er paragraphe 1 consigne, en précisant chacune des caractéristiques du produit énumérées à l'annexe I point 1, les résultats de l'analyse de chaque lot offert, qui sont ultérieurement repris dans un certificat, délivré sur demande, notamment dans les cas d'échanges entre États membres ou d'exportation.

Article 4

1. Après vérification des éléments de l'offre, l'organisme d'intervention délivre sans délai un bon de livraison daté et numéroté indiquant:

a) la quantité à livrer;

b) la date limite de livraison du lait écrémé en poudre;

c) l'entrepôt où il doit être livré.

2. La livraison du lait écrémé en poudre doit avoir lieu dans un délai de vingt-huit jours suivant le jour de la réception de l'offre de vente visée à l'article 1er paragraphe 1 point d). La livraison peut être fractionnée.

3. Au sens du présent règlement, la prise en charge du lait écrémé en poudre par l'organisme d'intervention intervient le jour de l'entrée du lait écrémé en poudre dans l'entrepôt, mais au plus tôt le jour suivant le jour de l'émission du bon de livraison visé au paragraphe 1.

4. Le paiement du lait écrémé en poudre acheté par l'organisme d'intervention est effectué entre le cent vingtième et le cent quarantième jour après la prise en charge du lait écrémé en poudre, pour autant que le respect des exigences visées à l'article 1er soit vérifié.

5. Le prix d'achat du lait écrémé en poudre est calculé comme suit:

— si la teneur en matière protéique de l'extrait sec non gras, constatée selon la méthode indiquée à l'annexe I, est égale ou supérieure à 35,6 %, le prix d'achat est égal au prix d'intervention,

— si cette teneur est d'au moins 31,4 % et inférieure à 35,6 %, le prix d'achat est égal au prix d'intervention réduit d'un montant calculé de la façon suivante: prix d'intervention × [(0,356 − teneur en matière protéique) × 1,75].

6. Par son offre, le vendeur s'engage, dans le cas où il résulterait du contrôle que le lait écrémé en poudre n'est pas conforme aux exigences prévues à l'article 1er paragraphe 1:

— à reprendre la marchandise en cause,

— à payer les frais de stockage des quantités concernées, établis à partir du jour de la prise en charge jusqu'à la date de sortie.

Ces frais de stockage sont fixés forfaitairement par tonne de la façon suivante:

a) 21 écus pour les frais fixes;

b) 0,10 écu par jour de stockage pour les frais d'entreposage.

Les montants sont portés en crédit au compte du Fonds européen d'orientation et de garantie agricole (FEOGA), section «garantie».

Article 5

1. Les entrepôts visés à l'article 7 paragraphe 1 quatrième alinéa du règlement (CEE) n° 804/68 doivent remplir les conditions suivantes:

a) être secs, dans un bon état d'entretien et exempts de vermine;

b) ne présenter aucune odeur étrangère;

c) permettre une bonne aération;

d) disposer d'une capacité suffisante et d'un équipement en rapport avec cette capacité.

Les risques liés au stockage du lait écrémé en poudre sont couverts par une assurance prenant la forme soit d'une obligation contractuelle des stockeurs, soit d'une assurance globale de l'organisme d'intervention. L'État membre peut aussi être son propre assureur.

2. Les organismes d'intervention exigent que la mise en stock et le stockage du lait écrémé en poudre soient effectués sur palettes et de manière à constituer des lots facilement identifiables et aisément accessibles.

3. L'organisme compétent chargé du contrôle procède au contrôle de la présence des produits en entrepôt tel que prévu à l'article 4 du règlement (CEE) n° 618/90 de la Commission (1).

Article 6

1. L'organisme d'intervention choisit l'entrepôt disponible le plus proche du lieu où le lait écrémé en poudre est entreposé.

(1) JO n° L 67 du 15. 3. 1990, p. 21.

Toutefois, et pour autant que le choix d'un autre entrepôt n'entraîne pas de frais supplémentaires de stockage, l'organisme peut:

a) choisir un autre entrepôt à l'intérieur de la distance visée au paragraphe 2;

b) au-delà de cette distance, choisir un autre entrepôt lorsque ce choix conduit à une moindre dépense, en tenant compte des frais de stockage et de transport concernés. Dans ce cas, l'organisme d'intervention communique son choix sans délai à la Commission.

2. La distance maximale visée à l'article 7 paragraphe 1 troisième alinéa du règlement (CEE) n° 804/68 est fixée à 350 kilomètres. Au-delà de cette distance, les frais supplémentaires de transport supportés par l'organisme d'intervention sont fixés à 0,05 écu par tonne et par kilomètre.

Toutefois, dans le cas où l'organisme d'intervention acheteur relève d'un autre État membre que celui sur le territoire duquel le lait écrémé en poudre est entreposé, il n'est pas tenu compte, pour le calcul de la distance maximale visée au premier alinéa, de la distance entre l'entrepôt de stockage du vendeur et la frontière de l'État membre de l'organisme d'intervention acheteur.

Article 7

Lors du déstockage, l'organisme d'intervention, en cas de livraison départ entrepôt, met à la disposition le lait écrémé en poudre:

— chargé, à l'entrepôt sur moyen de transport, à l'exclusion de l'arrimage, s'il s'agit d'un camion ou d'un wagon de chemin de fer,

— à la sortie de l'entrepôt, s'il s'agit d'un autre moyen de transport, notamment d'un conteneur.

Les frais d'arrimage et de dépalettisage éventuels sont à la charge de l'acheteur du lait écrémé en poudre. Ces frais sont fixés forfaitairement par l'État membre qui en informe chaque intéressé à sa demande.

Article 8

Le règlement (CEE) n° 625/78 est abrogé.

Les références au règlement (CEE) n° 625/78 doivent s'entendre comme étant faites au présent règlement.

Article 9

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

Il est applicable à partir du 1er mars 1996.

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

Fait à Bruxelles, le 22 février 1996.

Par la Commission

Franz FISCHLER

Membre de la Commission

ANNEXE I

QUALITÉ DU LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE

1. **Caractéristiques:**

a) teneur en matière protéique:	au minimum 31,4 % sur l'extrait sec non gras
b) teneur en matières grasses:	au maximum 1,00 %
c) teneur en eau:	au maximum 3,5 %
d) acidité titrable en millilitres de solution d'hydroxyde de sodium décinormale:	au maximum 19,5 ml
e) teneur en lactates:	au maximum 150 mg/100 g
f) additifs:	aucun
g) épreuve de la phosphatase:	négative, c'est-à-dire égale ou inférieure à 4 microgrammes de phénol par gramme de lait reconstitué
h) indice d'insolubilité:	au maximum 0,5 ml (24 °C)
i) teneur en particules brûlées:	au maximum 15,0 mg, à savoir au moins disque B
j) teneur en micro-organismes:	au maximum 40 000 par g
k) recherche des coliformes:	négative dans 0,1 g
l) recherche de babeurre:	négative
m) recherche du lactosérum:	négative
n) goût et odeur:	francs
o) aspect:	couleur blanche ou légèrement jaunâtre, absence d'impuretés et de parcelles colorées
p) antimicrobiotiques:	négative (1)

2. **Méthodes de contrôle**

a) Sans préjudice des dispositions relatives à l'harmonisation des méthodes d'analyse, sont obligatoires, pour l'application du présent règlement, les méthodes de référence mentionnées ci-dessous:

— dosage des matières protéiques (N × 6,38):	norme internationale FIL 20B: 1993
— dosage des matières grasses:	norme internationale FIL 9C: 1987
— dosage de l'eau:	norme internationale FIL 26A: 1993
— dosage de l'acidité:	norme internationale FIL 86: 1981
— dosage des lactates:	norme internationale FIL 69B: 1987
— épreuve de la phosphatase:	norme internationale ISO 3356: 1975
— indice d'insolubilité:	norme internationale FIL 129A: 1988
— détermination de la teneur en particules brûlées:	ADPI Standard Methods 1990
— dénombrement des micro-organismes:	norme internationale FIL 100B: 1991
— recherche des coliformes:	norme internationale FIL 73A: 1985

b) En ce qui concerne les recherches:

— du lactosérum présuré:	dosage des glycomacropeptides par la chromatographie liquide à haute performance selon la méthode d'analyse reprise à l'annexe V
— du lactosérum acide:	épreuves établies par les États membres
— du babeurre:	l'absence de babeurre peut être établie soit par un contrôle inopiné sur place de l'atelier de production, effectué au moins une fois par semaine, soit par l'analyse de laboratoire — selon la méthode reprise à l'annexe VI — du produit fini indiquant au maximum 69,31 mg de PEDP par 100 g
— des substances antimicrobiennes:	selon la méthode décrite à l'annexe VII.

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.

---

(1) Le lait cru utilisé pour la fabrication du lait écrémé en poudre doit satisfaire aux exigences prévues à l'annexe A chapitre III partie D de la directive 92/46/CEE.

ANNEXE II

EMBALLAGE

1. **Emballages**

Les emballages sont neufs, secs et intacts, d'un contenu d'un poids net de 25 kg et d'une confection répondant à l'une des formules suivantes:

a) — 4 sacs en papier kraft, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 70 g/m²,

— 1 sac en papier goudronné interposé, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 140 g/m²,

— 1 poche intérieure en polyéthylène, d'au moins 0,08 mm d'épaisseur, soudée ou à double ligature;

b) — 1 sac en papier kraft, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 70 g/m²,

— 1 sac en papier kraft avec couche polyéthylène, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 80 + 15 g/m²,

— 3 sacs en papier kraft, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 70 g/m²,

— 1 poche intérieure en polyéthylène, d'au moins 0,08 mm d'épaisseur, soudée ou à double ligature;

c) — 1 sac extérieur en papier kraft, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 85 g/m²,

— 1 sac en papier kraft avec couche polyéthylène, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 70 + 15 g/m²,

— 2 sacs en papier kraft, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 70 g/m²,

— 1 poche intérieure en polyéthylène, d'une épaisseur d'au moins 0,12 mm soudée ou à double ligature;

d) — 1 sac extérieur en papier kraft semi-extensible, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 95 g/m²,

— 1 sac en papier kraft semi-extensible avec une couche intérieure en polyéthylène, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 95 + 15 g/m²,

— 1 sac en papier kraft semi-extensible, d'une résistance correspondant à un poids d'au moins 85 g/m²,

— 1 poche intérieure en polyéthylène, d'une épaisseur d'au moins 0,12 mm, soudée ou à double ligature.

2. **Remplissage**

Lors du remplissage, le sac doit être bien tassé. La pénétration de poudre en vrac entre les différents plis doit être absolument évitée.

3. **Procédure d'essai**

L'emballage, conformément au point 1, doit pouvoir répondre à une tension moyenne d'absorption de 420 joules/m² pour trois couches de papier au minimum selon la méthode ISO 1924-2-1985.

ANNEXE III

MARQUAGE

L'emballage porte au moins les indications suivantes, le cas échéant transcrites en code:

a) dénomination dans une des langues de la Communauté «lait écrémé en poudre spray»;

b) poids net;

c) numéro du lot de fabrication;

d) numéro d'agrément identifiant l'usine et l'État membre de production;

e) date de fabrication. Si le lait écrémé en poudre est stocké en silos, la date de fabrication est remplacée par la semaine de fabrication.

ANNEXE IV

ÉCHANTILLONNAGE ET ANALYSE DU LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE OFFERT

1. Nombre d'emballages à choisir par sondage pour l'échantillonnage:
   — offres contenant jusqu'à 800 sacs de 25 kilogrammes: 8 au moins,
   — offres contenant plus que 800 sacs de 25 kilogrammes: 8 + 1 par tout ou partie d'une tranche supplémentaire de 800 sacs, au moins.
2. Poids de l'échantillon: au moins 200 grammes sont prélevés de chaque emballage.
3. Groupement des échantillons: au maximum 9 échantillons sont réunis dans un échantillon global.
4. Analyse des échantillons: chaque échantillon global est soumis à une analyse susceptible de vérifier toutes les caractéristiques qualitatives prévues à l'annexe I.
5. Lignes directrices à suivre en cas de défaut de l'échantillon:
   a) si un échantillon composite présente un défaut pour un paramètre, la quantité représentée par cet échantillon est rejetée;
   b) si un échantillon composite présente un défaut pour plusieurs paramètres, la quantité représentée par cet échantillon est rejetée et le reste des quantités de l'offre qui proviennent de la même usine est soumis à un deuxième échantillonnage déterminant pour analyse. Dans ce cas:
      — le nombre d'échantillons prévus au point 1 est doublé,
      — si un échantillon composite présente un défaut pour un ou plusieurs paramètres, la quantité représentée par cet échantillon est rejetée.

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 présent règlement, soit [0].

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

6. **Appareillage**

6.1. Balance analytique.

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

6.3. Agitateur mécanique.

6.4. Agitateur magnétique.

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

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

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

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

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

6.10. Équipement CLHP comprenant:

6.10.1. pompe,

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

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

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

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

6.10.6. intégrateur pouvant intégrer de vallée à vallée.

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

7. **Échantillonnage**

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

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

8. **Mode opératoire**

8.1. *Préparation de l'échantillon pour essai*

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

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

8.2. *Prise d'essai*

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

8.3. *Élimination des matières grasses et des protéines*

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

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

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

8.4. *Détermination chromatographique*

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

Note:

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

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

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

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

pic III: troisième pic du chromatogramme, correspondant aux GMP, dont le RT 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} × A_{II} [E]

S_{III} [E] = R_{III} × A_{III} [E]

S_{IV} [E] = R_{IV} × A_{IV} [E]

où

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

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

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

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

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

où

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

où

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

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

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

S_{III} [0] = la surface relative du pic III qui est égale à R_{III} × 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.

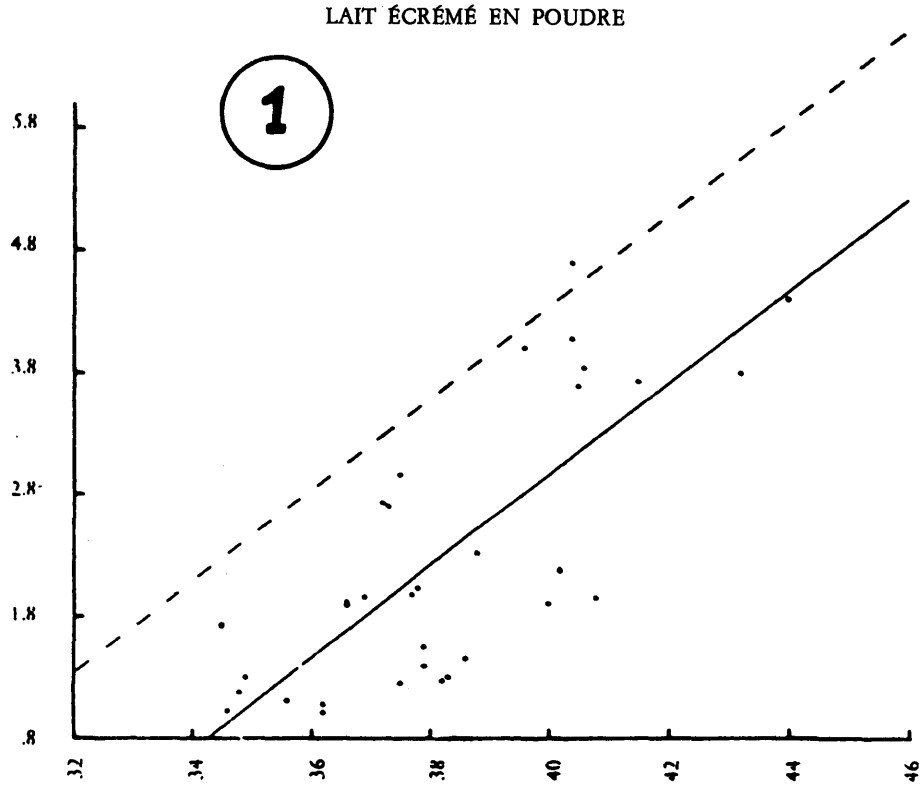
La teneur en lactosérum présent est calculée selon la formule suivante:

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

où

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

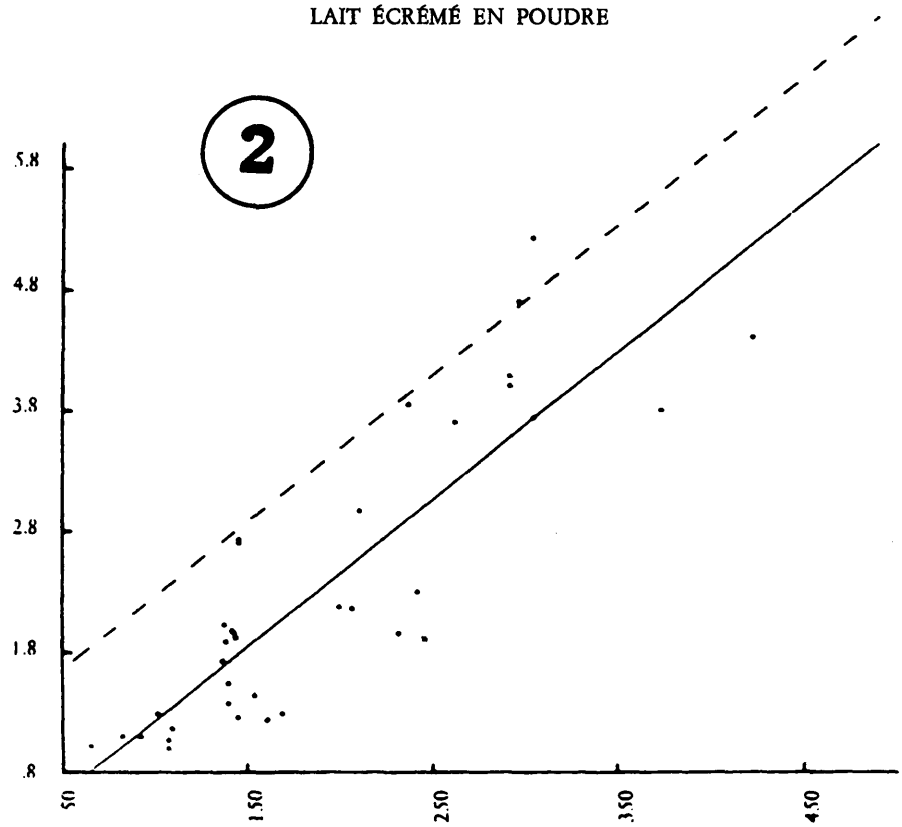
LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE



Pic III

% teneur en matières protéiques totales

LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE



Pic III

Pic II

ANNEXE VI

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

MÉTHODE CLHT À PHASES INVERSÉES

1. Objet et domaine d'application

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

2. Définition

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

3. Principe

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

4. Réactifs

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

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

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

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

4.2.1. Méthanol de qualité CLHP

4.2.2. Chloroforme de qualité CLHP

4.2.3. Monohydrochlorure de tryptamine

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

4.3.1. Hydroxyde de sodium, solution aqueuse à 12 M

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

4.3.3. 2-mercaptoéthanol

4.3.4. o-phthaldialdéhyde (OPA)

4.4. *Solvants d'élution pour CLHP*
Préparer les solvants d'élution à l'aide de réactifs de qualité CLHP

4.4.1. Eau de qualité CLHP

4.4.2. Méthanol d'une pureté fluorimétrique testée

4.4.3. Tétrahydrofurane

4.4.4. Phosphate de sodium dihydrogéné

4.4.5. Acétate de sodium

4.4.6. Acide acétique

5. Appareillage

5.1. *Balance analytique*

5.2. *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 permettant de délivrer 0,2, 0,5 et 5 ml*

5.6. *Ballons jaugés d'une capacité de 10, 50 et 100 ml*

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

5.8. *Bain ultrasonique*

5.9. *Centrifugeuse opérant à 27 000 × g*

5.10 *Fioles de verre, d'une capacité d'environ 5 ml*

5.11. *Tube gradué d'une capacité de 25 ml*

5.12. *pH-mètre*

5.13. *Équipement CLHP*

5.13.1. Système de pompage réglable, capable de fonctionner à un débit de 1,0 ml/min sous 200 bar

5.13.2. Autoéchantillonneur avec possibilité de dérivatisation

5.13.3. Réchauffeur de colonne réglé à 30 °C.

5.13.4. Détecteur de fluorescence réglé à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm et à une longueur d'onde d'émission de 440 nm

5.13.5. Intégrateur ou logiciel de traitement de données capable de mesurer une surface de pic

5.13.6. Colonne ichrosphère — 100 (250 × 4,6 mm) ou une colonne équivalente garnie d'octadécylsilane (C18) d'une granulométrie de 5 µm

6. Échantillonnage

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

7. Mode opératoire

7.1. *Préparation de la solution de référence interne*

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

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

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

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

7.3. *Préparation de la solution de référence externe*

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

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

7.4. *Préparation du réactif de dérivatisation*

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

NB: Conserver le réactif de 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 (réglée à un pH de 6,5 à l'aide d'acide acétique) : de méthanol : de tétrahydrofurane = 558 : 440 : 2 (v/v/v)

Solvant B:

méthanol

7.5.2. Degré d'élution préconisé:

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

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

Température de la colonne: 30 °C

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

7.5.4. Colonne d'équilibrage

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

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

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

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

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

7.6. *Mode d'intégration*

7.6.1. Pic PEDP

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

7.6.2. Pic de tryptamine

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

7.6.3. Groupes de pics de PS et PE

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

8. **Calcul et expression des résultats**

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

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

formule dans laquelle :

C = la teneur en PS ou PE (mg/100 g de poudre de l'échantillon à doser)

A_1 = surface de pic de PEDP de la solution de l'échantillon de référence (7.3)

A_2 = surface de pic de PS ou PE de la solution de l'échantillon à doser (7.2)

T_1 = surface de pic de la tryptamine de la solution de l'échantillon de référence (7.3)

T_2 = surface de pic de la tryptamine de la solution de l'échantillon à doser (7.2).

9. **Précision**

NB: Les valeurs relatives à la répétabilité ont été calculées conformément à la norme internationale IDF (1). La limite de reproductibilité provisoire a été calculée conformément aux «lignes directrices pour l'interprétation des résultats d'analyse et l'évaluation concernant le lait et les produits laitiers régis par l'organisation commune des marchés» (document de la Commission VI/2721/95).

9.1. *Répétabilité*

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

9.2. *Reproductibilité*

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

10. **Bibliographie**

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

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

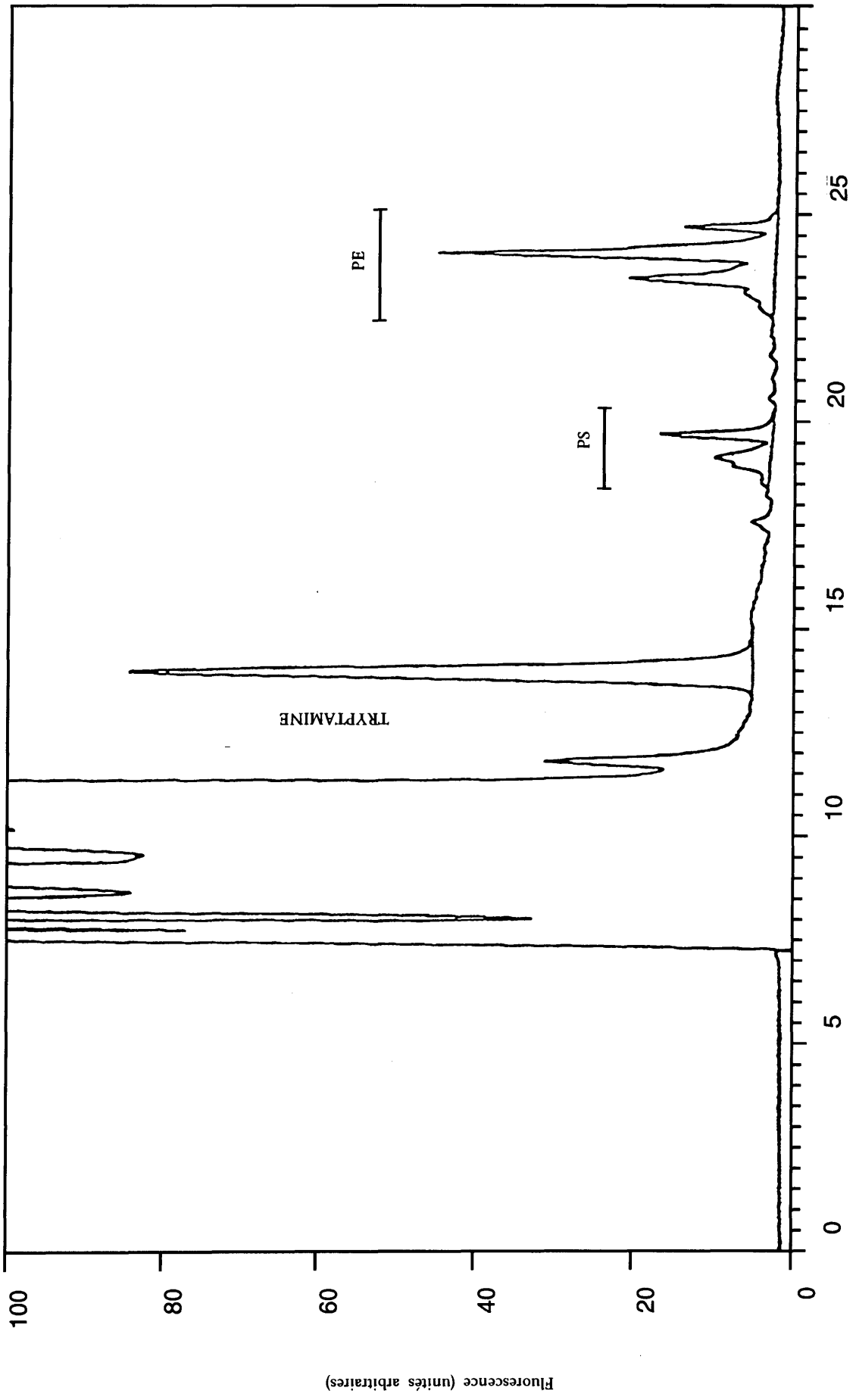


Schéma 1: Schéma CLHP des dérivés de l'OPA de la phosphatidylsérine (PS) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) contenus dans l'extrait méthanolé du lait écrémé en poudre reconstitué. Le mode d'intégration des pics de PS, PE et de la tryptamine (étalon interne) est indiqué.

ANNEXE VII

RECHERCHE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES ET DE SULFONAMIDES/DAPSON DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE

Un essai de dépistage d'un inhibiteur microbien à l'aide de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 en tant que micro-organisme d'essai, et d'une sensibilité suffisante pour déceler 4 µg de benzylpénicilline par litre de lait et 100 µg de sulfadimidine par litre de lait, est utilisé. Des nécessaires d'essai commerciaux sont disponibles et peuvent être utilisés s'ils présentent la sensibilité requise pour la benzylpénicilline et la sulfadimidine (1).

Pour l'essai, utiliser du lait écrémé en poudre reconstitué (1 g de poudre + 9 ml d'eau distillée). Effectuer l'essai conformément à la procédure IDF (bulletin n° 258/1991, section 1 chapitre 2) ou conformément aux instructions du fabricant du nécessaire d'essai.

Interpréter comme suit les résultats positifs:

1) répéter l'essai en ajoutant de la pénicillinase au système d'essai:
   — *résultat positif:* la substance inhibitrice n'est pas identifiable par cette procédure,
   — *résultat négatif:* la substance inhibitrice est un antibiotique ß-lactam;

2) répéter l'essai en ajoutant de l'acide p-aminobenzoïque au système d'essai:
   — *résultat positif:* la substance inhibitrice n'est pas identifiable par cette procédure,
   — *résultat négatif:* la substance inhibitrice est un sulfonamide/dapson;

3) répéter l'essai en ajoutant de la pénicillinase + de l'acide p-aminobenzoïque au système d'essai:
   — *résultat positif:* la substance inhibitrice n'est pas identifiable par cette procédure,
   — *résultat négatif:* les substances inhibitrices sont un antibiotique ß-lactam et un sulfonamide/dapson.

(1) *Note importante:* Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus à l'analyse du lait écrémé en poudre. C'est pourquoi il est important de vérifier que le système d'essai utilisé ne donne pas de tels résultats.