

RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2018/150 DE LA COMMISSION**du 30 janvier 2018****modifiant le règlement d'exécution (UE) 2016/1240 en ce qui concerne les méthodes à utiliser pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers admissibles à l'intervention publique et au bénéfice de l'aide au stockage privé**

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (UE) n° 1306/2013 du Parlement européen et du Conseil du 17 décembre 2013 relatif au financement, à la gestion et au suivi de la politique agricole commune et abrogeant les règlements (CEE) n° 352/78, (CE) n° 165/94, (CE) n° 2799/98, (CE) n° 814/2000, (CE) n° 1290/2005 et (CE) n° 485/2008 du Conseil ⁽¹⁾, et notamment son article 62, paragraphe 2, point i),

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement délégué (UE) 2016/1238 de la Commission ⁽²⁾ et le règlement d'exécution (UE) 2016/1240 de la Commission ⁽³⁾ prévoient les règles concernant l'intervention publique et l'aide au stockage privé. Le règlement (CE) n° 273/2008 de la Commission ⁽⁴⁾ définit les méthodes à appliquer pour déterminer si le lait et les produits laitiers satisfont aux conditions d'admissibilité fixées dans ces règlements en ce qui concerne l'intervention publique et l'aide au stockage privé.
- (2) À la lumière du progrès technique dans les méthodes utilisées pour l'analyse et l'évaluation de la qualité du lait et des produits laitiers, il convient d'apporter des modifications substantielles à la réglementation en vigueur afin de simplifier et de prévoir une mise à jour des références aux normes ISO. Par souci de clarté et d'efficacité, et compte tenu de l'ampleur et du caractère technique des modifications à apporter aux dispositions du règlement (CE) n° 273/2008, il convient d'intégrer les dispositions concernées dudit règlement dans le règlement d'exécution (UE) 2016/1240.
- (3) Afin d'assurer un respect uniforme des nouvelles normes et méthodes dans l'ensemble des États membres, il importe que les laboratoires disposent d'un laps de temps suffisant pour examiner les procédures et appliquer les méthodes actualisées.
- (4) Il convient, dès lors, de modifier le règlement d'exécution (UE) 2016/1240 en conséquence.
- (5) Par souci de sécurité juridique, il convient d'abroger le règlement (CE) n° 273/2008.
- (6) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité de l'organisation commune des marchés agricoles,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Le règlement d'exécution (UE) 2016/1240 est modifié comme suit:

- 1) l'article 4 est modifié comme suit:
 - a) le paragraphe 1 est modifié comme suit:
 - i) le point d) est remplacé par le texte suivant:

«d) pour le beurre: à l'annexe IV, parties I et I bis, du présent règlement.»;
 - ii) le point e) est remplacé par le texte suivant:

«e) pour le lait écrémé en poudre: à l'annexe V, parties I et I bis, du présent règlement.»;

⁽¹⁾ JO L 347 du 20.12.2013, p. 549.

⁽²⁾ Règlement délégué (UE) 2016/1238 de la Commission du 18 mai 2016 complétant le règlement (UE) n° 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne l'intervention publique et l'aide au stockage privé (JO L 206 du 30.7.2016, p. 15).

⁽³⁾ Règlement d'exécution (UE) 2016/1240 de la Commission du 18 mai 2016 portant modalités d'application du règlement (UE) n° 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne l'intervention publique et l'aide au stockage privé (JO L 206 du 30.7.2016, p. 71).

⁽⁴⁾ Règlement (CE) n° 273/2008 de la Commission du 5 mars 2008 portant modalités d'application du règlement (CE) n° 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 (JO L 88 du 29.3.2008, p. 1).

b) le paragraphe 2 est remplacé par le texte suivant:

«2. Les méthodes à utiliser pour déterminer la qualité des céréales, du beurre et du lait écrémé en poudre destinés à l'intervention publique visées respectivement aux annexes I, IV et V sont celles établies par les dernières versions des normes européennes ou internationales pertinentes, selon le cas, qui sont en vigueur depuis au moins 6 mois avant le premier jour de la période d'intervention publique établie à l'article 12 du règlement (UE) n° 1308/2013.»;

2) l'article 60 bis suivant est inséré:

«Article 60 bis

Dispositions spécifiques concernant les contrôles relatifs à l'intervention publique et à l'aide au stockage privé pour le lait et les produits laitiers

1. L'admissibilité du beurre, du lait écrémé en poudre et du fromage au bénéfice de l'aide au stockage privé est établie conformément aux méthodes énoncées respectivement aux annexes VI, VII et VIII.

Ces méthodes sont établies par référence aux dernières versions des normes européennes ou internationales pertinentes, selon le cas, qui sont en vigueur depuis au moins 6 mois avant le premier jour de la période d'intervention publique établie à l'article 12 du règlement (UE) n° 1308/2013.

2. Les résultats des contrôles effectués en appliquant les méthodes exposées dans le présent règlement sont évalués conformément à l'annexe IX.»;

3) les annexes sont modifiées conformément à l'annexe du présent règlement.

Article 2

Le règlement (CE) n° 273/2008 est abrogé.

Article 3

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

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

Fait à Bruxelles, le 30 janvier 2018.

Par la Commission
Le président
Jean-Claude JUNCKER

ANNEXE

Les annexes du règlement d'exécution (UE) 2016/1240 sont modifiées comme suit:

1) L'annexe IV est modifiée comme suit:

a) à la partie I, point 2, le deuxième alinéa est remplacé par le texte suivant:

«Chaque échantillon doit être évalué individuellement. Aucun rééchantillonnage ni aucune réévaluation ne sont autorisés.»;

b) la partie I bis suivante est insérée:

«PARTIE I BIS

Méthodes d'analyse du beurre non salé destiné à l'intervention publique

Paramètre	Méthode
Matières grasses ⁽¹⁾	ISO 17189 ou ISO 3727 partie 3
Eau	ISO 3727 partie 1
Matières sèches non grasses	ISO 3727 partie 2
Acides gras	ISO 1740
Indice de peroxyde	ISO 3976
Matières grasses non lactiques	ISO 17678
Caractéristiques sensorielles	ISO 22935, parties 2 et 3, et grille d'évaluation ci-après.

⁽¹⁾ La méthode à appliquer est agréée par l'organisme payeur.

Grille d'évaluation

Apparence		Consistance		Odeur et goût	
Points	Commentaires	Points	Commentaires	Points	Commentaires
5	<i>Très bonne</i> Type idéal Qualité la plus élevée (taux d'humidité uniforme)	5	<i>Très bonne</i> Type idéal Qualité la plus élevée (parfaite tartinabilité)	5	<i>Très bons</i> Type idéal Qualité la plus élevée (odeur pur beurre très fin)
4	<i>Bonne</i> (pas de défauts apparents)	4	<i>Bonne</i> (pas de défauts apparents)	4	<i>Bons</i> (pas de défauts apparents)
1, 2 ou 3	Tout défaut	1, 2 ou 3	Tout défaut	1, 2 ou 3	Tout défaut»

2) À l'annexe V, la partie I bis suivante est insérée:

«PARTIE I BIS

Méthodes d'analyse du lait écrémé en poudre destiné à l'intervention publique

Paramètre	Méthode
Protéines	ISO 8968 partie 1
Matières grasses	ISO 1736
Eau	ISO 5537
Acidité	ISO 6091
Lactates	ISO 8069
Test de la phosphatase	ISO 11816 partie 1
Indice d'insolubilité	ISO 8156
Particules brûlées ⁽¹⁾	ADPI
Micro-organismes	ISO 4833 partie 1
Babeurre	Appendice I
Lactosérum présure ⁽²⁾	Appendices II et III
Lactosérum acide ⁽³⁾	ISO 8069 ou inspections sur place
Contrôles organoleptiques ⁽⁴⁾	ISO 22935 parties 2 et 3.

⁽¹⁾ Des analyses des particules brûlées peuvent être menées de manière systématique. Toutefois, ces analyses doivent toujours être menées si aucun contrôle organoleptique n'est effectué.

⁽²⁾ La méthode à appliquer est agréée par l'organisme payeur (une ou les deux méthodes).

⁽³⁾ La méthode à appliquer est agréée par l'organisme payeur.

⁽⁴⁾ Les contrôles organoleptiques sont effectués lorsque cela est jugé nécessaire à la suite d'une analyse de risque approuvée par l'organisme payeur.

Appendice I

LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE: DOSAGE DE LA PHOSPHATIDYLSÉRINE ET DE LA PHOSPHATIDYLÉTHANOLAMINE**Méthode: CLHP en phase inverse**

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La 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-phthaldialdéhyde (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 de référence: PEDP, d'une pureté minimale de 99 %**

Note: le matériel de référence 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-phthaldialdéhyde**

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-phthaldialdéhyde (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 au 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. **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 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 bars*
 - 5.13.2. *Autoéchantillonneur avec possibilité de dérivation*
 - 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 LiChrospher® — 100 (250 × 4,6 mm) ou une colonne équivalente garnie d'octadécylsilane (C 18) d'une granulométrie de 5 µm*

6. ÉCHANTILLONNAGE

L'échantillonnage doit être effectué 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 jusqu'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 jusqu'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 jusqu'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 jusqu'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 dérivation

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

7.5. Dosage par CLHP**7.5.1. Solvants d'éluion (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'éluion 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

Note: le degré d'éluion peut obliger à une légère modification en vue d'obtenir la résolution indiquée au schéma 1.

Température de la colonne: 30 °C.

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

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 éluee sous forme de 2 pics en partie non résolus précédés d'un pic mineur. La PE est éluee 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

A₁ = aire du pic de PEDP de la solution d'échantillon étalon (7.3)

A₂ = aire du pic de PS ou de PE de la solution d'échantillon d'essai (7.2)

T₁ = aire du pic de la tryptamine de la solution d'échantillon étalon (7.3)

T₂ = 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 (*).

9.1. Répétabilité

L'écart type relatif de 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.

9.2. Reproductibilité

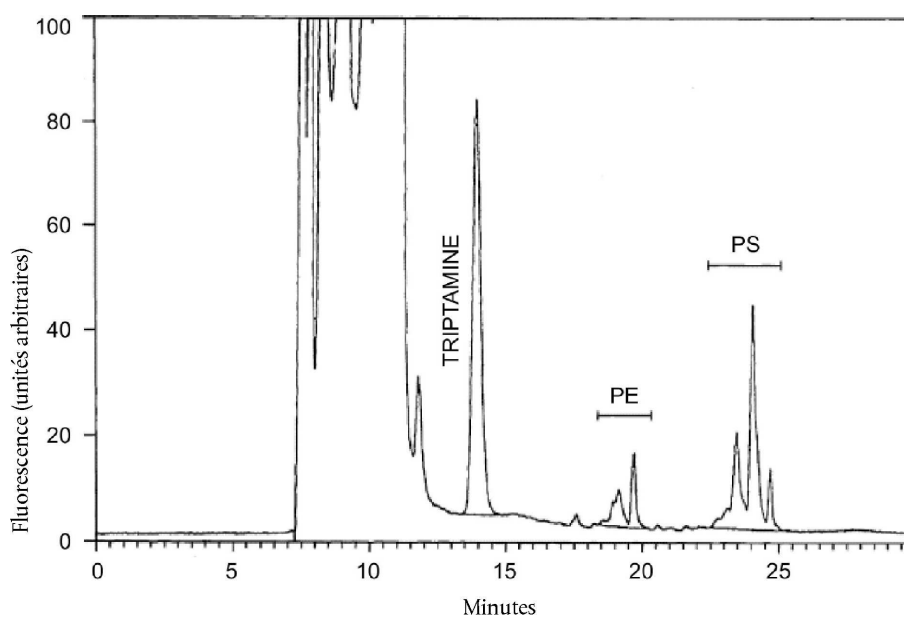
Si deux résultats sont obtenus par des opérateurs travaillant dans des laboratoires différents et utilisant des appareillages différents dans des conditions différentes pour l'analyse du même échantillon d'essai, la différence relative entre les deux résultats ne devrait pas dépasser 11 % de la moyenne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

10. RÉFÉRENCES

- 10.1. Resmini P., Pellegrino L., Hogenboom J.A., Sadini V., Rampilli M., "Detection of buttermilk solids in skim milk 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.



Appendice II

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

1. OBJET ET DOMAINE 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 caséinomacropéptides.

2. RÉFÉRENCE

Norme Internationale ISO 707 - Lait et produits laitiers - Lignes directrices relatives aux méthodes d'échantillonnage.

3. DÉFINITION

La teneur en lactosérum présure sec est définie comme le pourcentage (en masse) déterminé par la teneur en caséinomacropéptides 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 caséinomacropéptides (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 sont de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée est 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 1 000 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 jusqu'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 du présent règlement, soit [0]*

5.4.2. *Le même lait écrémé en poudre adulteré 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 selon la procédure prévue par la norme internationale ISO 707. Les États membres peuvent toutefois utiliser une autre méthode d'échantillonnage pour autant que cette dernière soit conforme aux principes de la norme précitée
 - 7.2. Conserver l'échantillon dans des conditions telles qu'aucune détérioration ou modification de composition ne puisse intervenir
8. MODE OPÉRATOIRE
 - 8.1. **Préparation de l'échantillon 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: 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 influencer 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,
 $A_{III}[0]$ and $A_{III}[5]$ = 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 \geq 1,000 quand la teneur en lactosérum est \leq 5 %.

Une marge d'erreur de $\pm 0,002$ 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 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 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. Reproductibilité

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

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 $\leq 2,0 + (S_{III}[0] - 0,9)$,

où:

2,0	= la valeur maximale autorisée pour l'aire relative du pic III compte tenu de l'aire moyenne 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, $S_{II} [E] \leq 160$, 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, $S_{II} [E] \leq 160$, 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 adulterés, 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 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 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.

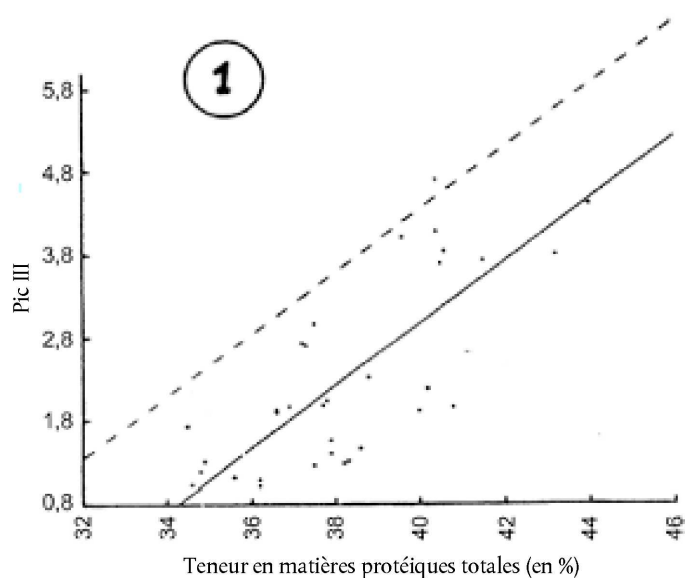
Si T_1 et/ou T_2 sont supérieurs à zéro, l'échantillon contient du lactosérum présure.

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

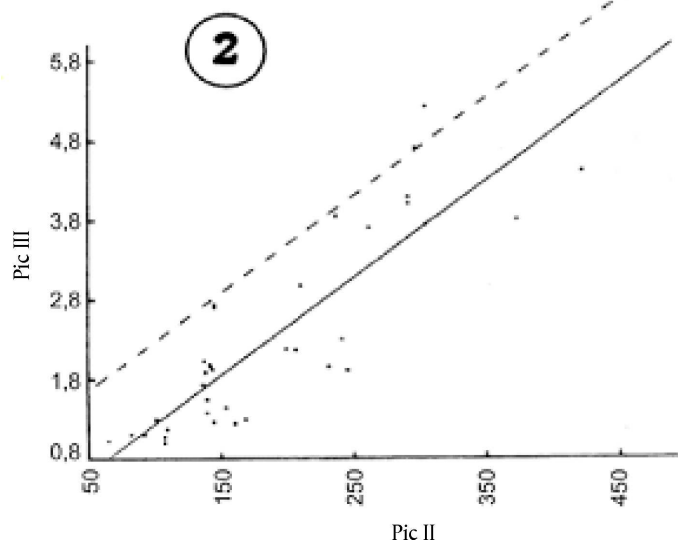
où:

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



Appendice III

DÉTERMINATION DU LACTOSÉRUM PRÉSURE SEC DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE

1. OBJECTIF: DÉTECTION D'ADDITION DE LACTOSÉRUM PRÉSURE SEC DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE

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 caséinomacropéptides par la procédure décrite.

4. PRINCIPE

Les échantillons sont analysés pour détecter les caséinomacropéptides A par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (méthode CLHP). L'évaluation du résultat est obtenue par référence aux échantillons étalons constitués de lait écrémé en poudre avec et sans addition de lactosérum en poudre. Des résultats supérieurs à 1 % (m/m) indiquent la présence de lactosérum présure sec.

5. RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée est 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.

5.1. **Solution d'acide trichloracétique**

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

5.2. **Éluants A et B**

Éluent A: introduire, dans une fiole jaugée de 1 000 ml, 150 ml d'acétonitrile (CH_3CN), 20 ml d'isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$), et 1,00 ml d'acide trifluoracétique (TFA, CF_3COOH). Compléter jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau.

Éluent B: introduire, dans une fiole jaugée de 1 000 ml, 550 ml d'acétonitrile, 20 ml d'isopropanol et 1,00 ml de TFA. Compléter jusqu'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'éluent 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].*

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 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 $25 \pm 0,5$ °C**
- 6.11. **Équipement CLHP comprenant:**
 - 6.11.1. *Pompe à gradient binaire*
 - 6.11.2. *Injecteur, manuel ou automatique, de 100 microlitres (μ l) 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 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 selon la procédure prévue par la norme internationale ISO 707. Les États membres peuvent toutefois utiliser une autre méthode d'échantillonnage pour autant que cette dernière soit conforme aux principes de la norme précitée.**
- 7.2. **Conserver l'échantillon dans des conditions telles qu'aucune détérioration ou modification de composition ne puisse intervenir**

8. MODE OPÉRATOIRE

8.1. Préparation de l'échantillon 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 $2,00 \pm 0,001$ 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 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. La méthode CLHP en phase inverse exclut la possibilité de résultats faux positifs dus à la présence de babeurre acide en poudre.
- 8.4.2. Avant de mettre en œuvre l'analyse CLHP en phase inverse, il faut optimiser les conditions de gradient. Un temps de rétention de 26 minutes \pm 2 minutes pour les 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 μ l 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'optimisation 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 $\% B = 10 - 2,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26) / 6) * 30 / 27$ $\% B = 7,5 + (13,5 + (RT_{CMP_A} - 26) / 6) * 1,11$

où:

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

Note 1: le temps de rétention des CMP_A doit être de 26 minutes \pm 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 doivent également être 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 (voir 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 µl 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 utilisé pour les échantillons.*

9. EXPRESSION DES RÉSULTATS

9.1. **Mode de calcul et formules**

- 9.1.1. *Calcul du coefficient de réponse R:*

$$\text{pic de } CMP_A: R = W/H$$

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.

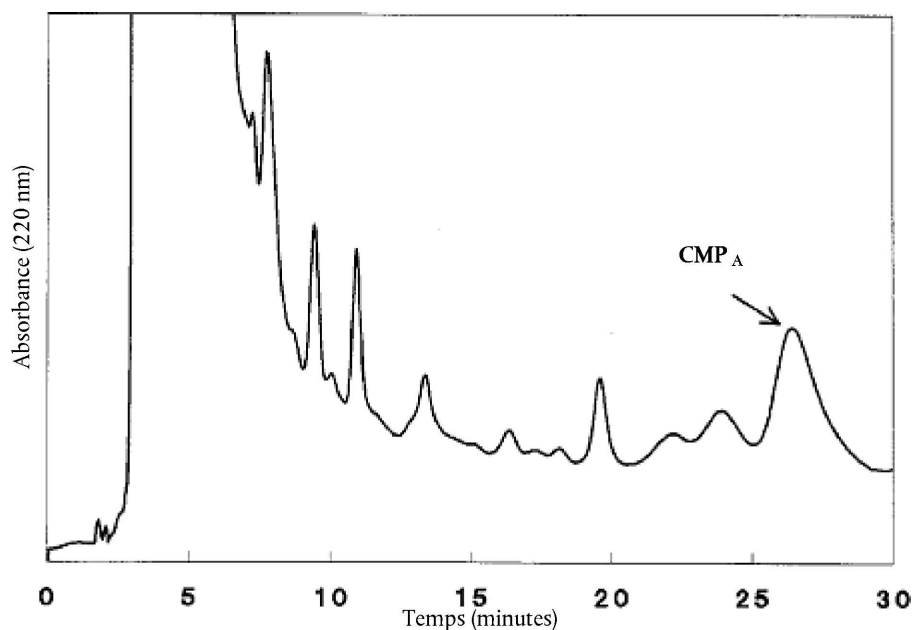
9.3.3. Linéarité

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 % tient compte d'une marge d'erreur due à la reproductibilité.

Figure 1
Étalon Ni-4.6



(*) Norme FIL internationale 135B/1991. Lait et produits laitiers. Caractéristiques de fidélité des méthodes d'analyse. Schéma d'une méthode d'étude en collaboration.»

3) Les annexes suivantes sont ajoutées:

«ANNEXE VI

Méthodes d'analyse du beurre en stockage privé

Paramètre	Méthode
Matières grasses ⁽¹⁾	ISO 17189 ou ISO 3727 partie 3
Eau	ISO 3727 partie 1
Matières sèches non grasses (à l'exclusion du sel)	ISO 3727 partie 2
Sel	ISO 15648

(1) La méthode à appliquer est agréée par l'organisme payeur.

ANNEXE VII

Méthodes d'analyse du lait écrémé en poudre en stockage privé

Paramètre	Méthode
Matières grasses	ISO 1736
Protéines	ISO 8968 partie 1
Eau	ISO 5537

ANNEXE VIII

Méthodes d'analyse des fromages en stockage privé

1. La méthode d'analyse figurant à l'appendice est appliquée pour garantir l'absence de caséine de lait de vache dans les fromages produits 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'appendice.

2. Les méthodes 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 l'appendice s'appliquent si une seule des exigences susmentionnées n'est pas satisfaite.

Appendice

MÉTHODE 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 $265 \times 125 \times 0,25$ 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, compléter jusqu'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 sont 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 $5 \mu\text{S}$, il faut déioniser en mélangeant avec 2 g d'Amberlite MB-3 pendant 30 min, ensuite filtrer à travers une membrane de $0,45 \mu\text{m}$.

4.1.2. *Solution de gel*

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

9,0 ml de solution mère de gel

24 mg de β -alanine

500 μ l d'ampholyte pH 3,5-9,5

250 μ l d'ampholyte pH 5-7

250 μ l d'ampholyte pH 6-8

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 compléter jusqu'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 éthylènediaminotétracétique (EDTA, 1,46 g/100 ml) à l'aide d'une solution de carbonate d'ammonium à 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml d'eau) contenant 0,05 mol/l d'EDTA.

4.7.2. Plasmine bovine (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 μ l 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

Mélanger 500 ml de méthanol et 200 ml d'acide acétique glacial avec 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 % (v/v).

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 ($\geq 2,5$ kV) ou appareil automatique d'électrophorèse**
- 5.5. **Cryostat à circulation, maintenu à la température de $12 \pm 0,5$ °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. **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 ultrasonique**
- 5.15. **Appareil de soudure des feuilles**
- 5.16. **Pipettes graduées en microlitres (25 μ l)**
- 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 $\lambda = 634$ 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 minutes, 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, 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 min en utilisant, par exemple, le traitement ultrasonique. Chauffer à 40 °C puis ajouter 10 μ l de plasmine (4.7.2), mélanger et laisser incubé une heure à 40 °C sous agitation continue. Pour inhiber l'enzyme, ajouter 20 μ l 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 min), récupérer en même temps le gel polymérisé sur la feuille de support du gel ainsi que sur l'autre feuille en écartant les deux plaques de verre. Nettoyer soigneusement le dos de la feuille de support des restes de gel et de l'urée. Souder entre eux les bords du "sandwich de gel" dans le sens de la longueur, on obtient ainsi un tube que l'on peut conserver au réfrigérateur (six semaines au maximum).

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 $5,0 \times 4,5$ cm): placer les électrodes sans bande directement sur le gel

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

Placer l'applicateur d'échantillons à l'étape 2 à 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); laisser reposer 15 min en agitant continuellement.

6.4.2. Lavage et coloration de la plaque de gel

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

6.4.3. Décoloration de la plaque de gel

Décarter 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 min avec 200 ml de solution de décoloration et répéter l'étape de décoloration au moins deux à trois fois jusqu'à ce que le fond devienne clair et perde sa coloration. Laver ensuite la plaque de gel avec de l'eau distillée (deux fois 2 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 de lait de brebis, de chèvre et/ou de bufflonne (voir " γ_2 E,G,B" et " γ_3 E, G, B" 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" dans les figures 4a, b et 5) avec celles des échantillons de référence à 0 et 1 % (brebis, chèvre) ou des échantillons intermédiaires 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 de lait de vache dans l'échantillon de référence à 1 % mais non dans l'échantillon de référence à 0 %. Dans le cas contraire, optimiser la procédure en suivant soigneusement les instructions de la méthode.

Un échantillon est jugé positif si les deux caséines γ_2 et γ_3 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

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).

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).

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).

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).

Radola B.J.: Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μ m polyacrylamide gels on silanised glass plates or polyester films. *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

Figure 1

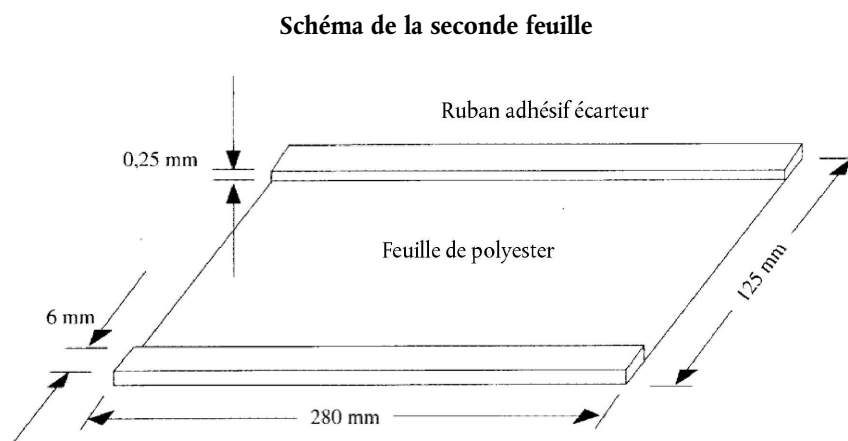


Figure 2

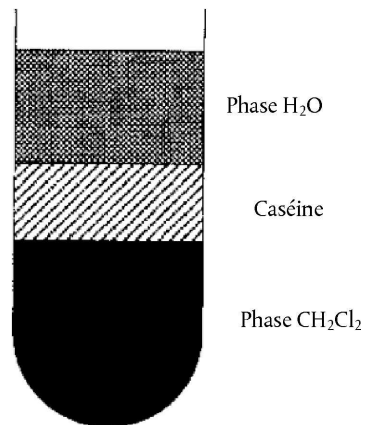
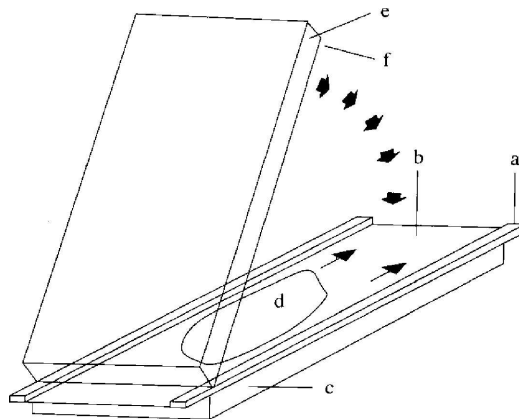
Couche de caséine en flottaison entre les phases aqueuse et organique après centrifugation

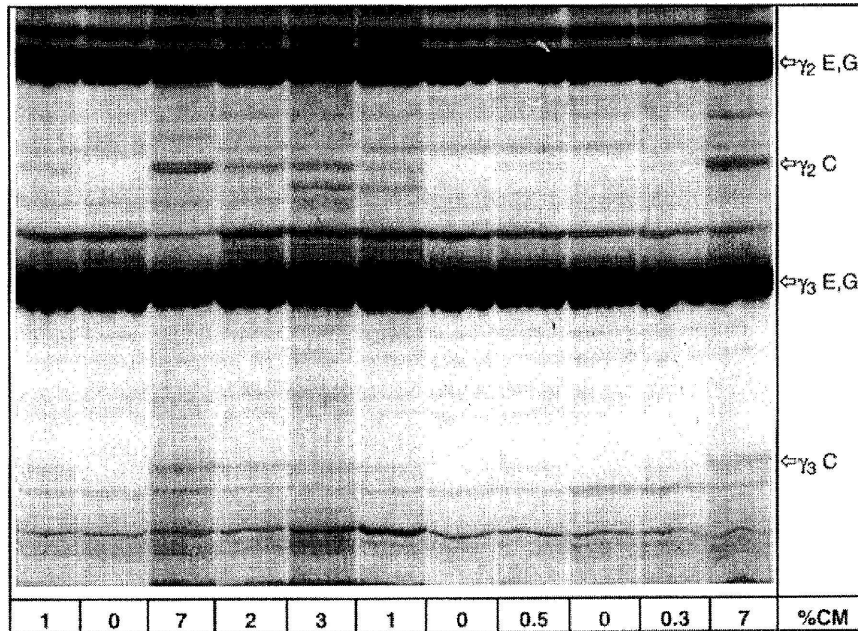
Figure 3

Technique de battement pour la coulée de gels de polyacrylamide ultraminesces

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 4 a

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

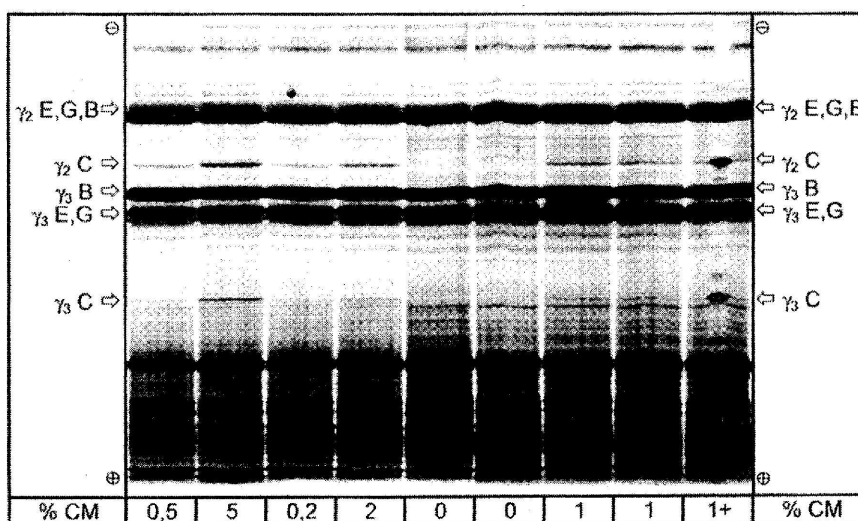


% CM = pourcentage de lait de vache, C = vache, E = brebis, G = chèvre.

La moitié supérieure du gel I.E.F. est indiquée.

Figure 4 b

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

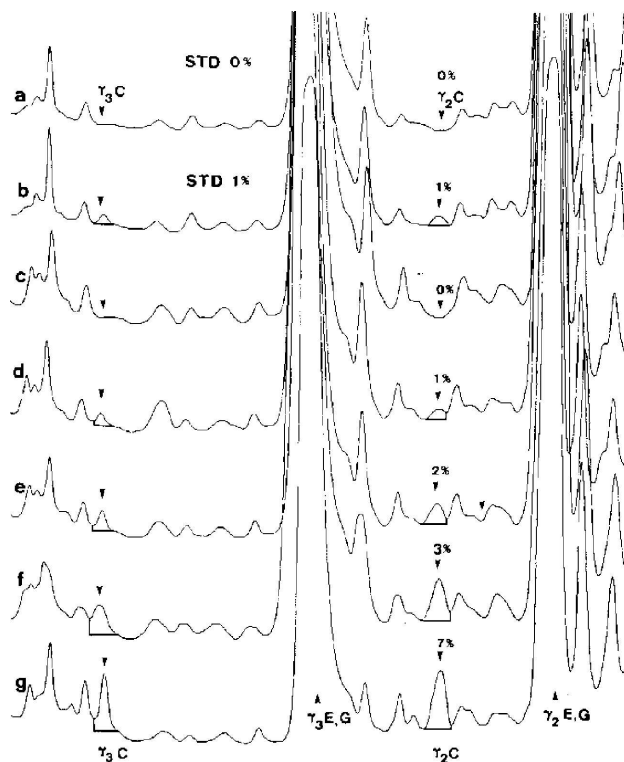


% CM = pourcentage de lait de vache; 1 + = échantillon contenant 1 % de lait de vache et dopé de caséine pure de lait de vache au milieu du trajet. C = vache, E = brebis, G = chèvre, B = bufflonne.

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 $\lambda = 634$ nm.

ANNEXE IX

Évaluation des analyses**1. Assurance de la qualité**

Les analyses sont effectuées par des laboratoires désignés conformément à l'article 12 du règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil (**), ou désignés par les autorités compétentes de l'État membre.

2. 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, Lait et produits laitiers — Lignes directrices relatives aux méthodes d'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'appendice.
3. Des échantillons doubles sont prélevés aux fins des analyses prévues par la réglementation de l'Union.
4. En cas de litige concernant les résultats, l'organisme payeur refait l'analyse nécessaire sur le produit en cause, et les coûts sont supportés par la partie perdante.

L'analyse susmentionnée est effectuée à condition que des échantillons doubles du produit soient disponibles sous scellés et aient été stockés dans des conditions appropriées auprès de l'autorité compétente. Le fabricant envoie une demande à l'organisme payeur afin qu'il effectue l'analyse dans les 7 jours ouvrables qui suivent la communication des résultats de la première analyse. La nouvelle analyse est effectuée par l'organisme payeur dans les 21 jours ouvrables après réception de la demande.

5. Le résultat ainsi obtenu est définitif.
6. 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.

Appendice

Évaluation de la conformité d'un lot avec la limite réglementaire**1. Principe**

Dans les cas où la réglementation relative à l'intervention publique et au stockage privé 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 σ_r 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 σ_r 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 $x = y_1/y_2$, 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 est 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 à suivre pour déterminer la conformité avec la limite réglementaire sont énoncées 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 le résultat évalué conformément au point 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.

(**) 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 (JO L 165 du 30.4.2004, p. 1).»