

1048

RECOMMANDATION

**du Comité de Ministres de l'Union Economique Benelux
concernant l'application de méthodes d'analyse de référence
Benelux se rapportant à la recommandation M (65) 6, relative
à l'harmonisation des législations en matière
de lait concentré sucré ou non**

M (68) 50

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu les articles 3, 6 et 7 du Traité d'Union,

Vu l'article 9 de la Convention transitoire,

Vu la Recommandation du Comité de Ministres du 25 octobre 1965, relative à l'harmonisation des législations en matière de lait concentré sucré ou non, M (65) 6,

Considérant qu'il y a lieu d'éviter des contestations nées de l'application de techniques d'analyse différentes ou de l'emploi de normes différentes,

Considérant qu'en particulier l'harmonisation du contrôle des denrées alimentaires exige la mise en œuvre de techniques identiques ou équivalentes et l'emploi de modes d'expression semblables et le recours à des normes identiques ou équivalentes,

Recommande :

Article unique

Les Gouvernements des trois pays du Benelux sont invités à introduire, avant le 1^{er} juillet 1969 dans leurs législations comme seules méthodes de références valables, les méthodes d'analyse ci-annexées relatives au lait concentré sucré ou non.

Fait à Bruxelles, le 11 décembre 1968.

Le Président du Comité de Ministres,

P. GREGOIRE

1049

**Méthodes d'analyse
afférentes au règlement M (65) 6 concernant
le lait concentré sucré ou non**

M (68) 50, Annexe

1. Préparation des échantillons**1.1. Lait concentré**

Après l'avoir vivement agité, ouvrir l'emballage au bord du couvercle et verser lentement son contenu dans un bécher. Mélanger le contenu en le transvasant à plusieurs reprises. Amener dans le bécher le lait ou la graisse qui adhère à l'emballage. Chauffer l'échantillon, dans le bécher couvert, jusqu'à 40° C et mélanger intimement en remuant. Laisser refroidir.

1.2. Lait concentré sucré

Après l'avoir vivement agité, ouvrir l'emballage au bord du couvercle ; mélanger intimement son contenu. Amener dans l'échantillon le lait ou la graisse adhérant au couvercle. Chauffer jusqu'à 40° C tout en raclant la paroi et en remuant de bas en haut avec une cuillère. Laisser refroidir.

Pour les emballages en tube : les ouvrir et transférer leur contenu dans un bécher. Fendre le tube et racler la matière qui y adhère. La transférer également dans le bécher et homogénéiser.

2. Matière sèche**Réactif :**

Sable : sable lavé à l'acide chlorhydrique et séché.

2.1. Placer environ 25 g de sable et une baguette de verre dans un pèse-filtre en métal inoxydable, d'un diamètre de 7,5 cm et d'une hauteur de 2,5 cm à fond plat, doté d'un couvercle fermant hermétiquement.

2.2. Sécher le pèse-filtre, son contenu et le couvercle non fixé pendant 2 heures à 98 - 100° C. Fixer le couvercle, laisser refroidir dans un exsiccateur jusqu'à température ambiante et peser.

2.3. Faire glisser le sable sur un côté du pèse-filtre et, dans la partie dégagée, peser exactement environ 3 g de la denrée préparée selon 1.1. ou 1,5 g de la denrée préparée selon 1.2. Ajouter à la denrée 3 ml d'eau distillée dans le premier cas ou 5 ml d'eau distillée dans le 2ème cas et mélanger. A l'aide de la baguette de verre, mélanger d'abord puis incorporer le sable. Placer le pèse-filtre au bain-marie pendant 20 minutes en remuant de temps à autre.

1050

2.4. Sécher le pèse-filtre sans le couvercle pendant 1 1/2 heure à 98 - 100° C. Fixer le couvercle, laisser refroidir dans un exsiccateur jusqu'à température ambiante et peser.

2.5. Sécher une nouvelle fois pendant une heure, refroidir et peser. Répéter cette opération jusqu'à ce que la différence entre deux pesées successives n'excède plus 0,5 mg.

2.6. La teneur en matière sèche en % =

$$\frac{100 \times \text{le poids après séchage}}{\text{le poids avant séchage}}$$

3. Graisse

Réactifs :

- Ammoniaque, 25 % poids
- Ethanol, 96 % volume
- Ether diéthylique, exempt de peroxyde
- Ether de pétrole, P.E. 40 - 60° C

Appareillage :

Tubes à extraction suivant Mojonnier : voir figure page 1063.

3.1. Dans le tube d'extraction, déposer 4 à 5 g, pesés à 1 mg près, de la denrée préparée selon 1. Ajouter 7,0 ml d'eau et, tout en portant la température à 40 - 50° C au bain-marie, agiter jusqu'à ce que la denrée soit complètement dispersée.

3.2. Ajouter 1,5 ml d'ammoniaque et agiter énergiquement.

3.3. Ajouter 10 ml d'éthanol et agiter lentement mais complètement.

3.4. Ajouter 25 ml d'éther diéthylique, fermer le tube et agiter énergiquement pendant une minute. Refroidir au besoin sous l'eau courante.

3.5. Enlever prudemment le bouchon, ajouter 25 ml d'éther de pétrole et utiliser les premiers millilitres pour rincer le bouchon et le col du tube à extraction. Fermer le tube à extraction et agiter, pas trop énergiquement, pendant 30 secondes.

3.6. Laisser reposer le tube à extraction bouché en position verticale jusqu'à ce que la couche supérieure soit limpide et bien séparée de la phase aqueuse. La séparation peut également s'obtenir par centrifugation dans une centrifugeuse appropriée (non explosive).

3.7. Retirer le bouchon et laver celui-ci ainsi que le col du tube à extraction à l'aide d'un mélange à parts égales d'éther diéthylique et d'éther de pétrole.

Transférer prudemment le plus possible du liquide surnageant dans un ballon séché et taré de 250 ml à fond plat, contenant quelques grains de pierre ponce.

1051

3.8. Laver les parois intérieures et extérieures du col du tube à extraction à l'aide d'un mélange à parts égales d'éther diéthylique et d'éther de pétrole. Recueillir le liquide de lavage de la paroi extérieure dans le ballon de 250 ml.

3.9. Répéter deux fois les opérations de 3.4 à 3.8, mais en n'utilisant que 15 ml d'éther diéthylique et 15 ml d'éther de pétrole en y ajoutant, pour la première de ces réextractions, 5 ml d'éthanol.

3.10. Evaporer prudemment, le mieux possible, le solvant du ballon.

3.11. Sécher le ballon et le résidu pendant 1 heure à $102 \pm 2^\circ \text{C}$, le ballon étant couché sur le côté dans l'étuve. Laisser refroidir jusqu'à température ambiante et peser à 0,1 mg près.

3.12. Répéter cette opération en séchant chaque fois pendant 30 minutes jusqu'à poids constant du ballon.

3.13. Le poids du résidu exprimé sur 100 g de la denrée est la teneur en graisse.

4. Acide lactique (applicable uniquement aux laits non sucrés)

Réactifs :

— Solution de sulfate de cuivre I : dissoudre 5 g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau distillée et diluer jusqu'à 100 ml.

— Solution de sulfate de cuivre II : dissoudre 250 mg de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau distillée et diluer jusqu'à 1.000 ml.

— Suspension d'hydroxyde calcique : triturer 300 g d'hydroxyde calcique ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) en présence de 900 ml d'eau distillée. Conserver la suspension obtenue dans un flacon bien bouché.

— Acide sulfurique, 95,5 - 97 %.

— Solution acide sulfurique-sulfate de cuivre : ajouter 0,5 ml de sol. I de sulfate de cuivre à 60 ml d'acide sulfurique et mélanger.

— Réactif au p-hydroxydiphényle : dissoudre en chauffant et en agitant 1,5 g de p-hydroxydiphényle dans 10 ml d'une solution de NaOH 5 %. Conserver cette solution en flacon en verre brun et à l'abri de la lumière. Le réactif ne se conserve pas plus de 4 semaines.

— Solution étalon d'acide lactique : dissoudre immédiatement avant l'emploi 0,1067 g de lactate de lithium dans de l'eau distillée et diluer jusqu'à 1.000 ml. Cette solution contient 0,1 mg d'acide lactique par ml.

870

4.1. Peser à 0,1 g près ——— g de l'échantillon
a — 8,7

(a représentant la teneur en matière sèche dégraissée de l'échantillon). Dissoudre cette quantité dans 100 ml d'eau.

1052

4.2. Pipeter 5 ml de la solution ainsi obtenue dans un ballon jaugé de 50 ml et diluer avec de l'eau distillée jusqu'à env. 35 ml. Pour le blanc introduire env. 35 ml d'eau dans un deuxième ballon jaugé de 50 ml. Traiter les deux ballons comme indiqué en 4.3.

4.3. Ajouter 0,5 ml de la solution sulfate de cuivre I, mélanger et chauffer à $46 \pm 1^\circ \text{C}$ le contenu des ballons plongés dans un bain-marie à env. 90°C . Mélanger en chauffant.

Ajouter sous agitation continue 5 ml de solution de sulfate de cuivre II, plonger les ballons dans un bain-marie à $46 \pm 1^\circ \text{C}$ et les y maintenir pendant 10 minutes.

Ensuite ajouter de la même façon 5 ml de suspension d'hydroxyde calcique, plonger les ballons à nouveau dans le bain-marie à $46 \pm 1^\circ \text{C}$ et les y maintenir encore une fois pendant 10 minutes.

Refroidir à température ordinaire, ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 50 ml, agiter énergiquement jusqu'à ce que le contenu des ballons soit homogène, filtrer.

4.4. Pipeter dans un tube en verre 1 ml du filtrat obtenu sous 4.3. et dans un tube identique 1 ml du filtrat obtenu lors du traitement de l'eau distillée avec les liquides défécants.

Traiter les deux tubes comme suit : ajouter 6,0 ml de solution d'acide sulfurique-sulfate de cuivre et mélanger. Chauffer pendant 5 minutes dans un bain-marie bouillant les tubes fermés d'une manière lâche au moyen d'un bouchon en caoutchouc et refroidir jusqu'à température ordinaire. Ajouter 2 gouttes de réactif au p-hydroxydiphényle et agiter énergiquement afin de bien répartir le réactif dans le liquide.

Mettre les tubes au bain-marie à $30 \pm 2^\circ \text{C}$, les y maintenir pendant 15 minutes et agiter de temps en temps.

Réchauffer le contenu des tubes légèrement fermés au moyen d'un bouchon en caoutchouc, pendant 90 sec. dans un bain-marie bouillant et refroidir rapidement jusqu'à 20°C dans l'eau froide. Mesurer la différence d'extinction des deux liquides à la longueur d'onde de 570 nm. Déterminer le pourcentage d'acide lactique dans le lait reconstitué obtenu selon le procédé décrit sous 4.1. au moyen de la droite d'étalonnage obtenue comme décrite sous 4.5.

Si le pourcentage en acide lactique dans le lait reconstitué est supérieur à 0,010 % répéter l'essai avec une dilution adéquate du filtrat, obtenu sous 4.3.

4.5. Etablir la droite d'étalonnage comme suit :

dans 4 ballons jaugés de 50 ml introduire respectivement 5 ml de lait reconstitué à partir d'une poudre de lait comme décrit sous 4.1. Cette poudre de lait doit être de bonne qualité et préparée à partir d'un lait ne contenant pas d'acide lactique d'acidification.

1053

Introduire dans ces ballons respectivement 0, 1, 2 et 4 ml de la solution standard d'acide lactique et compléter avec de l'eau distillée jusqu'à env. 35 ml. Continuer comme décrit sous 4.3. et 4.4. et mesurer la différence d'extinction avec le blanc comme indiqué en 4.2.

Porter sur un diagramme les différences d'extinction présentées par les éléments de la gamme d'étalonnage en fonction du pourcentage d'acide lactique additionné. Joindre les points qui doivent se placer sur une droite. Déplacer la droite parallèlement à elle-même de façon à la faire passer par l'origine.

4.6. L'acide lactique est considéré n'être présent qu'en traces si la teneur obtenue selon 4.4. n'atteint pas plus que 0,02 %.

5. Phosphatase

Réactifs :

— solution d'hydroxyde sodique 0,5 n.

— Réactif phosphatase A.

Dissoudre 0,11 g de phénylphosphate disodique dans 80 à 90 ml d'eau, ajouter 3 ml de solution de carbonate sodique 0,25 molaire (2,65 g carbonate sodique anhydre par 100 ml) et compléter à 100 ml.

Préparer une solution fraîche lors de chaque examen.

— Réactif phosphatase B.

Dissoudre 23 mg de 2,6-dibromoquinone chlorimide dans 5 ml d'éthanol 96 %. Conserver la solution au frais et à l'obscurité pendant 4 semaines au maximum.

5.1. Au moyen de la poudre de lait préparer avec de l'eau sans chauffer, une solution telle que la concentration en matières sèches dégraissées corresponde environ à celle du lait écrémé.

Si nécessaire neutraliser au papier de tournesol au moyen d'une solution d'hydroxyde sodique 0,5 n.

5.2. Pipeter dans chacun des 2 tubes à essais 0,5 ml de la denrée à examiner sans mouiller les parois. Placer un des tubes au bain-marie à 85° C pendant 5 min. et refroidir ensuite jusqu'à température ordinaire.

5.3. Ajouter aux 2 tubes à essais avec une pipette jaugée 5 ml de réactif phosphatase A ; boucher les tubes avec un bouchon en caoutchouc et les conserver à une température comprise entre 30 et 35° C.

5.4. Après 1 h ajouter 6 gouttes de réactif phosphatase B et mélanger. Comparer après 5 minutes la coloration des deux tubes.

5.5. Si la teinte bleue du tube contenant le lait chauffé est inférieure à celle de l'autre tube, l'échantillon est considéré comme contenant des phosphatases.

1054

5.6. Technique améliorée de la réaction. En cas de doute ajouter aux deux tubes 2 ml de butanol normal. Ensuite retourner prudemment les tubes 8 fois, en attendant chaque fois que les couches se soient séparées. Le colorant bleu ou bleu-vert éventuellement formé se dissout dans la couche limpide supérieure ; la comparaison des colorations est ainsi notablement améliorée.

5.7. Remarque :

Il y a lieu d'exiger une grande propreté des tubes, pipettes, bouchons, etc., car la moindre souillure par des phénols ou des substances apparentées peut donner une réaction positive. Ensuite il y a lieu de tenir compte du fait que la salive contient des phosphatases.

6. Stabilisateurs

Cette méthode fera l'objet d'un complément à la présente Recommandation.

7. Saccharose

Réactifs :

— Solution d'acétate de zinc : dissoudre 21,9 g de $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 3 ml d'acide acétique glacial dans de l'eau distillée et diluer jusqu'à 100 ml.

— Solution d'hexacyanoferrate (II) de potassium : dissoudre 10,6 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau distillée et diluer jusqu'à 100 ml.

— Acide chlorhydrique 6,35 $\pm$ 0,20 n (20 — 22 %).

— Acide acétique 2,0 $\pm$ 0,2 n (12 %).

— Ammoniaque 2,0 $\pm$ 0,2 n (3,5 %).

Instruments :

Polarimètre à lampe à vapeur de sodium

Tubes pour polarimètre d'une longueur de 2 dm exactement.

7.1. Dans un bécher de 100 ml, peser à 10 mg près 40 g de la denrée préparée selon 1. Ajouter 50 ml d'eau distillée chaude (80 - 90° C) et mélanger intimement. Transférer quantitativement le contenu du bécher dans un ballon jaugé de 200 ml. Laver le bécher par 100 ml au total d'eau distillée à 60° C et transférer également ce liquide de lavage dans le ballon jaugé. Refroidir à la température ambiante.

7.2. Ajouter 5 ml d'ammoniaque dilué. Bien agiter et laisser reposer le ballon jaugé pendant 15 minutes.

7.3. Neutraliser l'ammoniaque en ajoutant une quantité équivalente d'acide acétique dilué (déterminer préalablement le nombre exact de millilitres en titrant l'ammoniaque en présence de bleu de bromothymol comme indicateur). Mélanger par agitation.

1055

7.4. Tout en mélangeant par rotation du ballon jaugé, ajouter 12,5 ml de solution d'acétate de zinc.

7.5. Tout en mélangeant par rotation du ballon jaugé, ajouter 12,5 ml de la solution d'hexacyanoferrate (II) de potassium.

7.6. Porter le contenu du ballon jaugé à 20° C et compléter jusqu'au trait par de l'eau distillée à 20° C. Fermer le ballon jaugé à l'aide d'un bouchon sec et mélanger le contenu en agitant énergiquement.

7.7. Laisser reposer pendant quelques minutes. Filtrer ensuite sur filtre plissé sec en rejetant les 25 premiers millilitres du filtrat.

7.8. Déterminer le pouvoir rotatoire du filtrat à 20° ± 2° C.

7.9. Dans un ballon jaugé de 50 ml, pipeter 40 ml de la solution obtenue selon 7.7. Ajouter 6 ml d'acide chlorhydrique 6,35 n. Placer le ballon jaugé pendant 15 minutes au bain-marie à 60° C. Au cours des cinq premières minutes, mélanger par rotation du ballon jaugé. Pendant ce temps, le contenu doit avoir atteint la température du bain. Refroidir jusqu'à 20° C et compléter jusqu'au trait par de l'eau distillée à 20° C. Mélanger en agitant énergiquement et laisser reposer le ballon jaugé pendant 1 heure.

7.10. Déterminer la rotation de la solution invertie à 20° ± 2° C dans le même tube que celui utilisé sous 7.8.

7.11. Calculer comme suit la teneur en saccharose :

$$S = (D - \frac{5}{4} I) (2,833 - 0,00612F - 0,00878P) \\ [1 + 0,0037 (t - 20)]$$

où :

S = teneur en saccharose

D = lecture du polarimètre avant inversion

I = lecture du polarimètre après inversion

F = teneur en graisse de la denrée

P = teneur en protéines de la denrée (N x 6,38)

t = température de la solution à 0,2° C près.

8. Examen microbiologique

Cette méthode fera l'objet d'un complément à la présente Recommandation.