

1057

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) 7, relative
à l'harmonisation des législations en matière de lait en poudre**

M (68) 51

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 31 mars 1965,
relative à l'harmonisation des législations en matière de lait
en poudre, M (65) 7,

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 équiva-
lentes,

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 référence valables, les méthodes
d'analyse ci-annexées relatives au lait en poudre.

Fait à Bruxelles, le 11 décembre 1968.

Le Président du Comité de Ministres,

P. GREGOIRE

1058

Méthode d'analyse pour le lait en poudre**M (68) 51, Annexe****1. Préparation de l'échantillon**

Travailler avec un échantillon bien homogénéisé. Eviter le plus possible lors de l'homogénéisation, que l'échantillon prenne ou cède de l'humidité.

2. Humidité

2.1. Peser rapidement à 1 mg près 2 g de la denrée dans un creuset métallique (en aluminium ou nickel) d'un diamètre d'environ 4 cm et pourvu d'un couvercle bien hermétique.

2.2. D dessécher dans un courant d'air sec pendant 2 h à $99 \pm 1^\circ \text{C}$.

2.3. Couvrir la capsule avec le couvercle, laisser refroidir en exsiccateur jusqu'à température ordinaire et peser.

2.4. Répéter les dessiccations chaque fois pendant 1 h jusqu'à ce que la perte de poids entre 2 pesées consécutives ne dépasse plus 2 mg.

2.5. La perte de poids, calculée sur 100 g de la denrée, constitue la teneur en humidité.

3. Graisse**Réactifs :**

- Ammoniaque 25 % en poids
- Ethanol 96 % en vol.
- Ether diéthylique, exempt de peroxyde
- Ether de pétrole, point d'ébullition 40 - 60° C.

Appareillage

— Tubes d'extraction d'après Mojonner : voir croquis page 1063.

3.1. Introduire env. 1,0000 g de l'échantillon dans le tube d'extraction et ajouter 9 ml d'eau. Si nécessaire chauffer au bain-marie à env. 65° C, en agitant prudemment et régulièrement jusqu'à ce que l'échantillon soit réparti uniformément.

3.2. Ajouter 2 ml d'ammoniaque. Tenir le tube d'extraction verticalement, chauffer durant 15 min. au bain-marie à 65° C en mélangeant soigneusement le contenu du tube. Refroidir jusqu'à env. 20° C.

3.3. Ajouter 10 ml d'éthanol et mélanger les liquides en inclinant à plusieurs reprises le tube de la position verticale à une position presque horizontale.

1059

3.4. Ajouter 25 ml d'éther diéthylique et boucher le tube au moyen d'un bouchon en liège humidifié. Agiter le tube d'extraction énergiquement pendant 1 minute en tenant le tube horizontal de telle façon que le liquide se trouve dans la partie large du tube.

3.5. Ouvrir le tube et ajouter 25 ml d'éther de pétrole. Fermer le tube et l'agiter pendant 30 sec. comme indiqué plus haut mais pas trop énergiquement.

3.6. Laisser reposer le tube d'extraction avec la fermeture au-dessus (au moins 30 min.) ou le centrifuger à 500/600 tours par minute (au moins 1 min.) jusqu'à ce que la couche supérieure soit entièrement limpide et se soit complètement séparée de la couche aqueuse.

3.7. Verser prudemment le plus possible de la couche étherée dans un ballon à fond plat préalablement séché et pesé dans lequel se trouvent quelques grains de pierre-ponce. Rincer le bouchon et l'extérieur du col du tube en récupérant les liquides de rinçage dans le même ballon. Tenir le tube d'extraction verticalement et rincer l'intérieur du col avec un peu d'éther de pétrole. Répéter l'extraction encore deux fois, les deux fois avec 25 ml d'éther diéthylique et 25 ml d'éther de pétrole. Verser les liquides d'extraction et de rinçage dans le même ballon où se trouve le liquide de la première extraction.

3.8. Rincer l'intérieur du col du ballon avec un peu d'éther de pétrole. Distiller prudemment la fraction volatile.

3.9. Sécher le ballon avec son contenu pendant 1 h à $102 \pm 2^\circ \text{C}$; pendant cette dessiccation maintenir le ballon horizontalement dans l'étuve. Laisser refroidir jusqu'à température ordinaire et peser.

3.10. Répéter cette dessiccation chaque fois pendant 30 minutes, jusqu'à ce que le poids du ballon ne diminue plus. Le poids du résidu, calculé sur 100 g de denrée, constitue la teneur en graisse.

4. Acide lactique

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 g 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 %.

1060

— 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.

4.1. Peser à 0,1 g près $\frac{870}{a - 8,7}$ g de l'échantillon (a représentant

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

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 au 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 ; refroidir jusqu'à température ordinaire. Ajouter 2 gouttes de réactif au p-hydroxydiphényl 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

1061

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. Prendre autant que possible une poudre du même type que l'échantillon à examiner.

Introduire dans ces ballons respectivement 0, 1, 2 et 4 ml de la solution étalon 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-dibromoquinonechlorimide dans 5 ml d'éthanol 96 %. Conserver la solution au frais et à l'obscurité pendant maximum 4 semaines.

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.

1062

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

5.2. Pipeter dans chacun de 2 tubes à essais 0,5 ml de la denrée à examiner. 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.

5.6. Technique améliorée de la réaction. En cas de doute ajouter aux deux tubes 2 ml de butanol primaire 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.

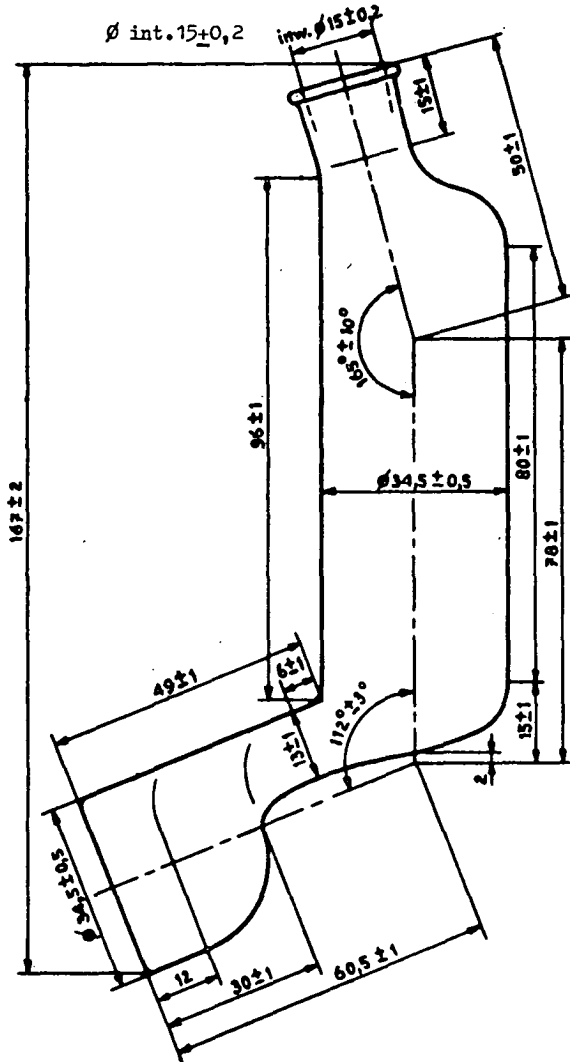
6. Examen microbiologique

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

Mesures en mm

Maten in mm

Tube à extraction suivant Mojonnier
 Extractiebuis volgens Mojonnier
 hals inw. conisch 1:10
 conicité intérieure du col 1:10



inhoud van het voetje $21,5 \pm 0,5$ ml
 glasdikte $1,25 \pm 0,25$ mm
 contenu du pied $21,5 \pm 0,5$ ml
 épaisseur du verre $1,25 \pm 0,25$ mm