

**DECISION**

**du Comité de Ministres de l'Union économique Benelux  
concernant l'application de méthodes d'analyses de référence Benelux  
en matière de lait en poudre**

**M (73) 11**

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu l'article 1<sup>er</sup> du Protocole du 29 avril 1969 relatif à la suppression des contrôles et formalités aux frontières intérieures du Benelux et à la suppression des entraves à la libre circulation,

Vu la Recommandation du Comité de Ministres du 25 octobre 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 équivalentes,

Considérant qu'il y a lieu de remplacer la Recommandation du Comité de Ministres du 11 décembre 1968, concernant l'application de méthodes d'analyse de référence Benelux en matière de lait en poudre, M (68) 51, par une Décision qui tienne compte de l'évolution en ce domaine, notamment sur le plan international,

A pris la présente décision :

*Article 1<sup>er</sup>*

Les Gouvernements des trois pays du Benelux prendront, avant le 1<sup>er</sup> octobre 1973, les mesures nécessaires afin d'introduire dans leurs législations comme seules méthodes d'analyse de référence Benelux valable les méthodes d'analyse ci-annexées relatives au lait en poudre.

*Article 2*

La Recommandation du Comité de Ministres du 11 décembre 1968 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, est abrogée.

FAIT à Bruxelles, le 17 juillet 1973.

Le Président du Comité de Ministres,

L.J. BRINKHORST

**METHODES D'ANALYSE**  
**concernant le lait en poudre****M (73) 11, Annexe****1. — Préparation de l'échantillon****1.1. — Echantillon destiné à une analyse chimique.**

Transvaser le lait en poudre dans un récipient propre et sec, pourvu d'un bouchon étanche, d'une contenance correspondant à environ deux fois le volume de la poudre. Fermer immédiatement le récipient et mélanger intimement le lait en poudre par agitation et renversements successifs. Pendant la préparation de l'échantillon, il faut éviter dans toute la mesure du possible d'exposer le lait en poudre à l'air atmosphérique de manière à réduire au minimum l'absorption d'eau.

**1.2. — Echantillon destiné à une analyse microbiologique (\*)****2. — Teneur en eau**

Appareils et matières auxiliaires

Balance analytique

Capsules de préférence en aluminium, nickel, acier inoxydable ou en verre. Les capsules doivent être munies de couvercles s'adaptant convenablement mais pouvant être ôtés aisément. Les dimensions convenant le mieux sont : diamètre 6 à 8 cm, profondeur 2,5 cm environ.

Étuve bien ventilée et contrôlée par thermostat (température réglée à  $102 \pm 2^\circ \text{C}$ ). Il importe que la température soit uniforme dans l'ensemble de l'étuve.

Dessiccateur garni de gel de silice avec indicateur d'humidité.

**2.1. — Mode opératoire**

**2.1.1. —** Oter le couvercle de la capsule et la chauffer ainsi que son couvercle, pendant 1 h dans l'étuve. Replacer le couvercle, sur la capsule et la transférer dans le dessiccateur. Laisser refroidir à la température ambiante et peser à 0,1 mg près.

**2.1.2. —** Introduire environ 2 g de lait en poudre dans la capsule, replacer le couvercle sur la capsule et peser rapidement à 0,1 mg près.

**2.1.3. —** Découvrir la capsule et la chauffer, ainsi que son couvercle, pendant 2 h dans l'étuve.

---

(\*) Cette méthode fera l'objet d'un complément aux présentes méthodes d'analyse.

- 2.1.4. — Remettre le couvercle, transférer la capsule dans le dessiccateur et l'y laisser refroidir jusqu'à la température ambiante et peser à 0,1 mg près.
- 2.1.5. — Découvrir la capsule et la chauffer, ainsi que son couvercle, pendant 1 h dans l'étuve.
- 2.1.6. — Répéter l'opération 2.1.4.
- 2.1.7. — Répéter les opérations 2.1.5 et 2.1.6 jusqu'à ce que la diminution de masse entre deux pesées successives ne dépasse pas 0,5 mg ou que la masse augmente. Employer pour le calcul la pesée avec la masse la plus basse.
- 2.1.8. — Calculer la teneur en eau de l'échantillon, exprimée en pourcentage pondéral, par la formule :

$$\frac{M_1 - M_2}{S} \times 100$$

où :

$M_1$  = masse, en grammes, de la capsule après l'opération 2.1.2.

$M_2$  = masse, en grammes, de la capsule après l'opération 2.1.6 ou 2.1.7.

S = masse, en grammes, de la prise d'essai utilisée.

### 3. — Teneur en matière grasse

#### Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique et ne doivent pas laisser à l'évaporation de résidu plus important que celui prévu pour l'essai à blanc (3.1). Le cas échéant, les réactifs pourront être distillés à nouveau en présence d'environ 1 g de graisse de beurre pour 100 ml de solvant.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau d'une pureté au moins égale à celle de l'eau distillée.

Solution d'ammoniaque, environ 25 % (m/m) de  $\text{NH}_3$  (densité à 20° C, environ 0,91 g/ml), ou solution plus concentrée de concentration connue.

Ethanol à 96 ± 2 % (v/v) ou, à défaut, éthanol dénaturé avec du méthanol, de l'éthyl-méthyl-cétone, du benzène ou de l'éther de pétrole.

Oxyde diéthylique (éther diéthylique) exempt de peroxydes.

#### Note

S'assurer que l'oxyde diéthylique est exempt de peroxydes comme indiqué ci-après. Introduire, dans une fiole conique avec bouchon rodé et rincée préalablement au dioxyde de carbone, 50 ml de l'oxyde diéthylique. Rincer à nouveau au dioxyde de carbone et

introduire rapidement 15 ml d'acide acétique glacial et 1 ml d'une solution à 20 % d'iodure de potassium et boucher la fiole immédiatement. Agiter la fiole sans mouiller le bouchon et laisser reposer la fiole pendant 5 min à l'abri de la lumière. Ajouter 75 ml d'eau, mélanger et ajouter 5 ml d'une solution d'amidon. L'oxyde diéthylique est exempt de peroxydes si aucune coloration n'apparaît.

Ether de pétrole distillant entre 30 et 60° C.

Mélange de solvants préparé peu de temps avant l'emploi par le mélange de volumes égaux d'oxyde diéthylique et d'éther de pétrole (on pourra remplacer le mélange de solvants, là où son utilisation est prescrite, par de l'oxyde diéthylique ou par l'éther de pétrole).

Appareils et matières auxiliaires

Balance analytique

Tubes d'extraction d'après Mojonier (voir croquis page 14) pourvus de bouchons en verre rodé, de bouchons en liège ou d'autres fermetures insensibles à l'action de solvants utilisés.

On traitera les bouchons en liège de bonne qualité par épuisement avec de l'oxyde diéthylique, puis avec de l'éther de pétrole. Les bouchons ainsi traités seront maintenus au moins 20 min dans de l'eau à 60° C au minimum, puis refroidis dans l'eau afin d'en être imprégnés au moment de l'emploi.

Flacons à fond plat et à paroi mince, de 150 à 250 ml.

Étuve à dessiccation bien ventilée et contrôlée par thermostat (température réglée à  $102 \pm 2^\circ$  C) ou étuve à vide (température 70-75° C, pression inférieure à 50 mm de Hg).

Matériaux destinés à faciliter l'ébullition, exempts de matière grasse, non poreux et non friables, par exemple perles de verre ou morceaux carbure de silicium (l'emploi de ces matériaux est facultatif, voir à ce sujet alinéa 3.2.1).

Bain-marie à 60-70° C.

### 3.1. — Essai à blanc

En même temps que la détermination de la teneur en matière grasse de l'échantillon, effectuer un essai à blanc avec 10 ml d'eau distillée en suivant le mode opératoire décrit ci-après à l'exclusion de l'alinéa 3.2.2. Si la valeur de l'essai à blanc dépasse 0,5 mg, il conviendra de vérifier les réactifs et de purifier ou remplacer le ou les réactifs impurs.

### 3.2. — Mode opératoire

3.2.1. — Sécher le flacon (éventuellement après y avoir déposé des matériaux facilitant une ébullition modérée au cours de l'évaporation des solvants) dans l'étuve pendant 1/2 h à 1 h. Laisser refroidir le flacon jusqu'à la température de la salle des balances et peser le flacon une fois refroidi à 0,1 mg près.

- 3.2.2. — Peser dans le tube d'extraction, à 1 mg près, soit directement soit par différence, environ 1 g de lait entier en poudre ou environ 1,5 g de lait partiellement écrémé en poudre ou de lait écrémé en poudre. Ajouter 10 ml d'eau et agiter jusqu'à dispersion totale de la poudre de lait.
- 3.2.3. — Ajouter 1,5 ml de solution d'ammoniaque 25 % ou un volume équivalent d'une solution plus concentrée et chauffer au bain-marie pendant 15 min à 60-70° C, en agitant de temps à autre.  
Refroidir ensuite, par exemple à l'eau courante.
- 3.2.4. — Ajouter 10 ml d'éthanol et mélanger les liquides doucement mais soigneusement dans le tube d'extraction maintenu ouvert.
- 3.2.5. — Ajouter 25 ml d'oxyde diéthylique, fermer le tube d'extraction, l'agiter énergiquement et le retourner à plusieurs reprises pendant 1 min. Refroidir au besoin le tube d'extraction sous l'eau courante.
- 3.2.6. — Enlever le bouchon avec précaution et ajouter 25 ml d'éther de pétrole en utilisant les premiers millilitres pour rincer le bouchon et l'intérieur du col du tube d'extraction.  
Remettre le bouchon en place, agiter et renverser le tube d'extraction à plusieurs reprises pendant 30 sec. Si l'on ne prévoit pas de centrifugation lors de l'opération décrite à l'alinéa 3.2.7, ne pas agiter trop énergiquement.
- 3.2.7. — Laisser le tube d'extraction en repos jusqu'à ce que la couche liquide supérieure devienne limpide et se sépare nettement de la phase aqueuse. On peut également effectuer la séparation à l'aide d'une centrifugeuse appropriée ne produisant pas d'étincelles.
- 3.2.8. — Enlever le bouchon et le rincer ainsi que l'intérieur du col du tube d'extraction avec quelques millilitres du mélange de solvants ; laisser les liquides de rinçage couler dans le tube d'extraction. Transvaser avec soin aussi complètement que possible la couche supérieure dans le flacon (3.2.1.) par décantation. Ajouter si nécessaire, un peu d'eau pour rehausser l'interface des deux couches afin de faciliter la décantation.
- 3.2.9. — Rincer l'extérieur et l'intérieur du col du tube d'extraction avec quelques millilitres du mélange de solvants. Laisser les liquides de rinçage de l'extérieur du tube d'extraction couler dans le flacon et ceux de l'intérieur du col couler dans le tube d'extraction.
- 3.2.10. — Procéder à une deuxième extraction en répétant les opérations décrites aux alinéas 3.2.5 à 3.2.9 inclus mais en utilisant seulement 15 ml d'oxyde diéthylique et 15 ml d'éther de pétrole.

3.2.11. — Effectuer une troisième extraction en procédant comme indiqué à l'alinéa 3.2.10 mais en omettant le rinçage final (3.2.9).

**Remarque**

S'il s'agit de poudre de lait écrémé, la troisième extraction n'est pas nécessaire.

3.2.12. — Eliminer avec soin par évaporation ou distillation le maximum de solvants (y compris l'éthanol). Si le flacon est de petite capacité, il faudra éliminer un peu de solvant de la manière précitée après chaque extraction.

3.2.13. — Quand il ne subsiste plus aucune odeur de solvant, chauffer le flacon, couché, pendant 1 h dans l'étuve.

3.2.14. — Laisser le flacon refroidir jusqu'à la température de la salle des balances comme indiqué plus haut (3.2.1) et peser à 0,1 mg près.

3.2.15. — Répéter les opérations 3.2.13 et 3.2.14 en chauffant par périodes de 30 à 60 min. jusqu'à masse constante.

3.2.16. — Ajouter 15 à 25 ml d'éther de pétrole pour vérifier que la matière extraite est entièrement soluble. Chauffer légèrement et agiter par un mouvement rotatoire jusqu'à ce que toute la matière grasse soit en solution.

3.2.16.1. — Si la matière extraite est entièrement soluble dans l'éther de pétrole, la masse de la matière grasse est représentée par la différence entre la pesée 3.2.1 et la pesée 3.2.15.

3.2.16.2. — S'il n'en est pas ainsi, ou en cas de doute et toujours en cas de différend, extraire complètement la matière grasse contenue dans le flacon par des lavages répétés à l'éther de pétrole chaud, en laissant se déposer la matière non dissoute avant chaque décantation. Rincer 3 fois l'extérieur du col du flacon.

Chauffer le flacon, couché, pendant 1 h à l'étuve et le laisser refroidir jusqu'à la température de la salle des balances comme indiqué plus haut (3.2.1) et peser à 0,1 mg près.

La masse de la matière grasse est représentée par la différence entre la pesée (3.2.15) et cette pesée finale.

3.2.17. — Calculer la teneur en matière grasse de l'échantillon, exprimée en pourcentage pondéral, par la formule :

$$\frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

où :

$M_1$  = masse, en grammes, du flacon avec la matière grasse après l'opération 3.2.15.

$M_2$  = masse, en grammes, du flacon après l'opération 3.2.1. ou dans le cas où des matières insolubles sont présentes, voir 3.2.16.2, après l'opération 3.2.16.2.

$B_1$  = masse, en grammes, du flacon de l'essai à blanc après l'opération 3.2.15.

$B_2$  = masse, en grammes, du flacon de l'essai à blanc après l'opération 3.2.1 ou, dans le cas où des matières insolubles sont présentes voir 3.2.16.2 après l'opération 3.2.16.2.

S = masse, en grammes, de la prise d'essai utilisée.

#### 4. — Teneur en acide lactique

##### Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau d'une pureté au moins égale à celle de l'eau distillée.

Solution de sulfate de cuivre : dissoudre 250 g de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) dans de l'eau et compléter à 1.000 ml.

Suspension d'hydroxyde de calcium : broyer 300 g d'hydroxyde de calcium ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) dans un mortier avec de l'eau ; utiliser au total 900 ml.

Conserver la suspension obtenue dans un flacon bien bouché.

Acide sulfurique : 95,5 à 97,0 % (m/m) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Solution acide sulfurique-sulfate de cuivre : ajouter 0,5 ml de la solution de sulfate de cuivre à 300 ml d'acide sulfurique et mélanger.

Solution de p.hydroxydiphényl : dissoudre en agitant, et en chauffant légèrement, 1,5 g de p.hydroxydiphényl ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ) dans 10 ml d'une solution aqueuse de NaOH à 5 %.

Compléter à 100 ml avec de l'eau.

Conserver la solution dans un flacon en verre brun à l'abri de la lumière. La durée de conservation est limitée à 4 semaines.

Solution étalon d'acide lactique : dissoudre peu de temps avant l'emploi, 0,1067 g de lactate de lithium ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOLi}$ ) dans de l'eau et compléter à 1.000 ml ; 1 ml de cette solution correspond à 0,1 mg d'acide lactique.

Appareils et matières auxiliaires

Balance analytique

Spectrophotomètre ou photocolorimètre permettant de faire la lecture à une longueur d'onde de 570 nm.

Bain-marie de 30 ± 2° C.

Bain-marie bouillant

Tubes à essai (dimensions 25 × 160 mm).

## 4.1. — Mode opératoire

870

4.1.1. — Peser à 0,1 g près  $\frac{\quad}{a}$  g de l'échantillon  
a — 8,7

(a représentant le pourcentage en matières sèches dégraissées du lait de l'échantillon)

Dissoudre cette quantité dans 100 ml d'eau.

4.1.2. — Pipeter 5 ml de la solution ainsi obtenue dans un ballon jaugé de 50 ml et diluer avec de l'eau jusqu'à environ 35 ml. Pour le blanc introduire environ 35 ml d'eau dans un deuxième ballon jaugé de 50 ml. Traiter les deux ballons comme indiqué en 4.1.3.

4.1.3. — Ajouter sous agitation continue 5 ml de solution de sulfate de cuivre et maintenir les ballons pendant 10 min. à la température ambiante.

Ensuite ajouter de la même façon 5 ml de suspension d'hydroxyde de calcium et maintenir les ballons pendant 10 min. à la température ambiante. Ajuster avec de l'eau jusqu'à 50 ml, agiter énergiquement jusqu'à ce que le contenu des ballons soit homogène, filtrer ; rejeter les premières gouttes du filtrat.

4.1.4. — Pipeter dans un tube à essai 1 ml du filtrat obtenu sous 4.1.3, et dans un tube identique 1 ml du filtrat obtenu lors du traitement de l'eau 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 min. dans un bain-marie bouillant les tubes fermés d'une manière lâche et refroidir jusqu'à température ambiante.

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  $30 \pm 2^\circ$  C, les y maintenir pendant 15 min. et agiter de temps en temps.

Réchauffer le contenu des tubes légèrement fermés, pendant 90 sec. dans un bain-marie bouillant et refroidir rapidement jusqu'à température ambiante.

4.1.5. — Mesurer la différence d'extinction des deux liquides à la longueur d'onde de 570 nm.

Convertir au moyen de la droite d'étalonnage (4.2.) la différence d'extinction en pourcentage d'acide lactique dans le lait reconstitué obtenu selon le procédé décrit sous 4.1.1.

Si le pourcentage en acide lactique dans le lait reconstitué est supérieure à 0,010 % répéter l'essai avec une dilution adéquate du filtrat obtenu sous 4.1.3.



#### 4.2. — Droite d'étalonnage

Introduire dans 5 ballons jaugés de 50 ml respectivement 5 ml de lait reconstitué à partir d'une poudre de lait comme décrit sous 4.1.1. Cette poudre de lait doit être de bonne qualité et préparée à partir d'un lait ne contenant pas ou presque pas d'acide lactique d'acidification.

Introduire dans ces ballons respectivement 0-1-2-3 et 4 ml de la solution étalon d'acide lactique et compléter avec de l'eau jusqu'à environ 35 ml. On obtient ainsi une série avec des teneurs en acide lactique ajouté au lait reconstitué de 0 - 0,002 - 0,004 - 0,006 et 0,008 %.

Continuer comme décrit sous 4.1.3 et 4.1.4 et mesurer l'extinction par rapport à l'eau. Porter sur un diagramme les extinctions présentées par les éléments de la gamme d'étalonnage en fonction du pourcentage d'acide lactique additionné. Joindre les points par la droite la plus appropriée et la déplacer parallèlement à elle-même de façon à la faire passer par l'origine. Les points de la gamme d'étalonnage doivent se situer sur une droite.

#### 4.3. — Interprétation du résultat

L'acide lactique est considéré n'être présent qu'en traces si la teneur obtenue selon 4.1.5 n'atteint pas plus que 0,020 %.

### 5. — Phosphatase

Effectuer l'essai de la phosphatase comme indiqué sous 5.1. Confirmer un résultat positif avec le mode opératoire décrit sous 5.2.

#### 5.1. — Phosphatase ; qualitatif

##### Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau d'une pureté au moins égale à celle de l'eau distillée.

Solution substrat : dissoudre 0,11 g de phénylphosphate disodique ( $C_6H_5OPO_3Na_2 \cdot 2H_2O$ ) dans 80 à 90 ml d'eau, ajouter 3 ml de solution de carbonate sodique 0,25 M (2,65 g carbonate sodique anhydre par 100 ml) et compléter à 100 ml.

Cette solution doit être préparée journellement.

Réactif B.Q.C. : dissoudre 23 mg de 2,6-dibromoquinone-4-chloroimide ( $O=C_6H_2Br_2=NCl$ ) dans 5 ml d'éthanol 96 % (v/v). Conserver cette solution au frais et à l'obscurité pendant maximum 4 semaines.

Alcool isoamylique ; neutre par rapport au bleu de bromothymol. Neutraliser éventuellement avec une solution 0,1 n d'hydroxyde de sodium.

#### 5.1.1. — Mode opératoire

- 5.1.1.1. — Préparer, à partir de l'échantillon, avec de l'eau, sans chauffer, une solution telle que la concentration en matières sèches dégraissées du lait corresponde environ à celle du lait écrémé.
- 5.1.1.2. — Pipeter dans chacun des 2 tubes à essai 0,5 ml de la solution ainsi obtenue. Placer un des tubes au bain-marie bouillant pendant 5 min. et refroidir ensuite jusqu'à température ambiante.
- 5.1.1.3. — Ajouter aux 2 tubes à essai avec une pipette jaugée 5 ml de la solution substrat et les conserver bouchés à une température comprise entre 30 et 35° C pendant 1 h.
- 5.1.1.4. — Ajouter 6 gouttes de réactif B.Q.C. et mélanger. Comparer après 5 min. la coloration des deux tubes.
- 5.1.1.5. — Si le contenu du tube avec le lait chauffé est moins coloré que celui de l'autre tube la réaction est considérée comme positive.
- 5.1.1.6. — Ajouter en cas de doute aux deux tubes 2 ml d'alcool isoamylique. Ensuite retourner prudemment les tubes 8 fois, en attendant chaque fois que les couches se soient séparées. La coloration bleue ou bleu-verte éventuellement formée se dissout dans la couche limpide supérieure ; la comparaison des colorations est ainsi notablement améliorée.

### 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.

### 5.2. — Phosphatase ; quantitatif

#### Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau d'une pureté au moins égale à celle de l'eau distillée et fraîchement bouillie. Tampon borate de baryum, pH 10,6 ± 0,1.

Eviter un contact intensif entre le tampon et l'air afin d'éviter la formation non souhaitée de carbonate.

Dissoudre en chauffant 25,0 g d'hydroxyde de baryum ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ), exempt de carbonate, dans l'eau, refroidir à la température ambiante et compléter à 500 ml.

Dissoudre 11,0 g d'acide borique ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) dans l'eau et compléter à 500 ml.

Chauffer les deux solutions jusqu'à 50° C, les mélanger. Refroidir le mélange jusqu'à la température ambiante. Ajuster le pH si

nécessaire à  $10,6 \pm 0,1$  à l'aide de la solution d'hydroxyde de baryum et filtrer rapidement. Conserver la solution dans un récipient bouché hermétiquement.

Diluer la solution avant l'emploi avec un volume égal d'eau.

Solution de métaborate de sodium : dissoudre 6,0 g de métaborate de sodium anhydre ( $\text{NaBO}_2$ ), ou 12,6 g de métaborate de sodium ( $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), et 20,0 g de chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) dans l'eau et compléter à 1.000 ml.

Solution substrat tamponnée : dissoudre 0,5 g de phénylphosphate disodique ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OPO}_3\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dans 4,5 ml de la solution de métaborate de sodium.

Extraire si nécessaire le phénol libre de cette solution. Ajouter à cette fin une goutte du réactif B.Q.C. et laisser reposer pendant 30 min. Extraire la couleur formée avec 2,5 ml de butanol-1 et jeter la couche de butanol-1. Répéter si nécessaire cette extraction jusqu'à ce que la couche de butanol-1 reste incolore.

Cette solution peut être conservée pendant quelques jours dans un réfrigérateur. Développer et extraire la couleur journalièrement avant l'emploi.

Pour préparer la solution de substrat tamponnée, pipeter 1 ml de la solution précédente dans un ballon jaugé de 100 ml et compléter avec le tampon borate de baryum. Préparer la solution de substrat tamponnée immédiatement avant l'emploi.

Réactif sulfate de zinc et de cuivre : dissoudre 3,0 g de sulfate de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) et 0,6 g de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) dans l'eau et compléter à 100 ml.

Réactif B.Q.C. : dissoudre 0,040 g de 2,6-dibromoquinone-4-chloroimide ( $\text{O}=\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2=\text{NCl}$ ) dans 10 ml d'éthanol à 96 % (v/v).

Conserver la solution dans un flacon en verre foncé dans le réfrigérateur.

Solution de dilution : diluer 10 ml de solution de métaborate de sodium jusqu'à 100 ml avec de l'eau.

Solution de sulfate de cuivre : dissoudre 0,05 g de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) dans l'eau et compléter à 100 ml.

Solution standard à 200  $\mu\text{g}$  de phénol par ml : dissoudre 0,200  $\pm$  0,001 g de phénol cristallin et incolore dans l'eau et compléter à 100 ml. Cette solution peut être conservée pendant quelques mois dans le réfrigérateur.

Diluer 10 ml de cette solution à 100 ml avec de l'eau.

Purifier le phénol par distillation s'il n'est pas incolore ou cristallin.

Appareils et matières auxiliaires.

Balance permettant d'effectuer les pesées jusqu'à 1 mg près.

Spectrophotomètre permettant une lecture à une longueur d'onde de 610 nm, avec cuvettes appropriées.

Bain-marie, avec thermostat, réglé à une température de  $37 \pm 1^\circ \text{C}$ .

Tubes à essai, diamètre intérieure de 16 à 18 mm.

Papier filtre, pour analyse quantitative, à filtration lente pour précipités fins.

#### Précautions

Ne pas effectuer la détermination à la lumière solaire directe, mais à la lumière diffuse ou à la lumière artificielle.

Nettoyer la verrerie soigneusement et la rincer avec de l'eau distillée et bouillie ou la passer à la vapeur. Ne pas employer des produits de nettoyage ou de désinfection contenant des phénols.

Ne pas boucher la verrerie avec des bouchons en matière plastique, ceux-ci pouvant contenir des phénols.

Eviter lors du pipetage la contamination des liquides par la salive ; celle-ci contient de la phosphatase.

#### 5.2.1. — Mode opératoire

870

5.2.1.1. — Peser à 0,1 g près  $\frac{870}{a}$  g de l'échantillon  
a — 8,7

(a représentant le pourcentage en matières sèches dégraissées du lait de l'échantillon).

Dissoudre cette quantité dans 100 ml d'eau. La température ne doit pas dépasser  $35^\circ \text{C}$  lors de la mise en solution.

5.2.1.2. — Pipeter dans 2 tubes à essai 1 ml du lait reconstitué d'après 5.2.1.1.

5.2.1.3. — Chauffer l'un des tubes dans l'eau bouillante pendant 2 min. et refroidir ensuite jusqu'à la température ambiante. Ce tube servira pour l'essai à blanc.

Traiter, à partir de ce point, les deux tubes comme indiqué ci-dessous.

5.2.1.4. — Ajouter 10 ml de la solution substrat tamponnée, mélanger et placer les tubes dans le bain-marie à  $37 \pm 1^\circ \text{C}$ .

5.2.1.5. — Laisser les tubes pendant 60 min. dans le bain-marie et les agiter de temps en temps.

5.2.1.6. — Chauffer aussitôt les tubes au bain-marie bouillant pendant 1 min. et refroidir rapidement jusqu'à la température ambiante.

5.2.1.7. — Ajouter 1 ml du réactif sulfate de zinc et de cuivre, mélanger et filtrer sur papier filtre sec. Jeter les premières gouttes du filtrat. Il importe que le filtrat soit complètement limpide ; repasser le filtrat éventuellement sur le même filtre.

5.2.1.8. — Introduire 5 ml du filtrat dans un tube à essai, ajouter 5 ml de la solution de métaborate de sodium et 0,1 ml du réactif B.Q.C. Laisser reposer à la température ambiante pendant 30 min.

5.2.1.9. — Mesurer, à une longueur d'onde de 610 nm l'extinction du liquide provenant de l'échantillon par rapport au liquide provenant de l'essai à blanc.

5.2.1.10. — Répéter la détermination s'il s'avère que l'extinction du lait reconstitué dépasse celle correspondant à 20 µg de phénol de la solution d'étalonnage. Diluer dans ce cas un volume approprié du lait reconstitué obtenu d'après 5.2.1.1. avec un volume approprié de ce lait dans lequel la phosphatase a été inactivée comme indiqué sous 5.2.1.3.

5.2.2. — Droite d'étalonnage.

5.2.2.1. — Pipeter dans des ballons jaugés de 100 ml respectivement 2,5-5-7,5 et 10 ml de la solution standard de phénol et compléter avec de l'eau.

5.2.2.2. — Pipeter dans 5 tubes à essai respectivement 1 ml d'eau et 1 ml des solutions d'étalonnage (5.2.2.1) afin d'obtenir une gamme d'étalonnage avec respectivement 0 - 5 - 10 - 15 et 20 µg de phénol.

5.2.2.3. — Ajouter à chaque tube successivement 1 ml de la solution de sulfate de cuivre, 5 ml de la solution de dilution, 3 ml d'eau et 0,1 ml du réactif B.Q.C. ; mélanger. Laisser reposer à la température ambiante pendant 30 min.

5.2.2.4. — Mesurer, à une longueur d'onde de 610 nm l'extinction par rapport à l'eau des éléments de la gamme d'étalonnage.

5.2.2.5. — Porter sur un diagramme les extinctions mesurées en fonction de la teneur en phénol en µg comme indiqué sous 5.2.2.2. Joindre les points par la droite la plus appropriée, et la déplacer parallèlement à elle-même de façon à la faire passer par l'origine.

5.2.3. — Mode de calcul.

5.2.3.1. — Convertir, au moyen de la droite d'étalonnage ou au moyen d'un facteur déduit de cette droite d'étalonnage, l'extinction obtenue selon 5.2.1.9 en µg de phénol.

5.2.3.2. — L'activité phosphatasique, exprimée en µg de phénol par ml de lait reconstitué, est obtenue par la formule :

$$2,4 \times P$$

dans laquelle P = le nombre de µg de phénol obtenu selon 5.2.3.1.

5.2.3.3. — Multiplier le résultat obtenu selon 5.2.3.2. par le facteur de dilution si le lait reconstitué a été dilué comme décrit sous 5.2.1.10.

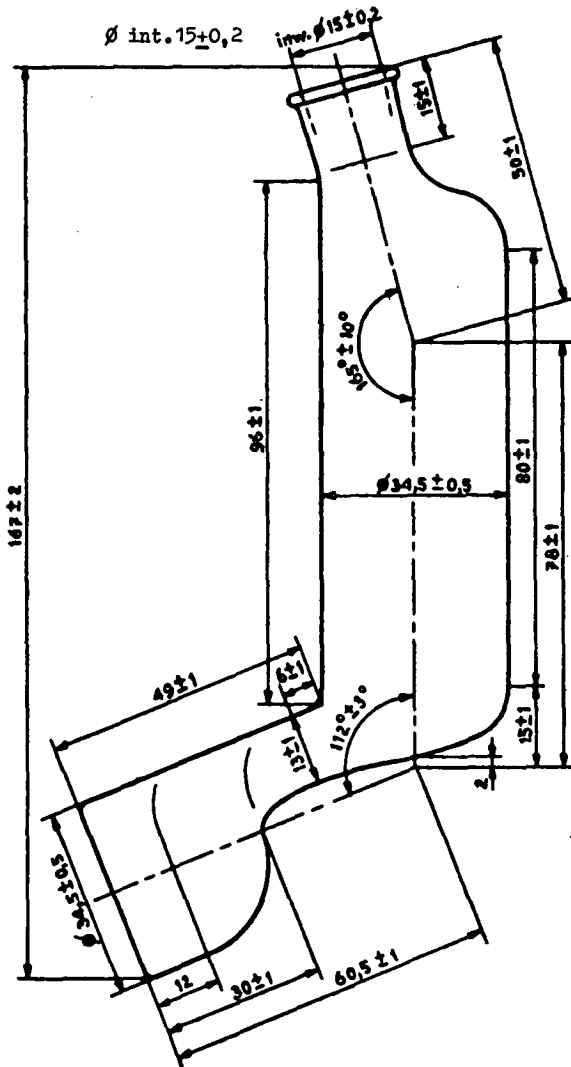
5.2.4. — Interprétation du résultat.

La phosphatase est considérée comme absente si l'activité phosphatasique est égale ou inférieure à 4  $\mu\text{g}$  de phénol par ml de lait reconstitué.

Mesures en mm  
Maten in mm

1624

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