

Journal officiel

des

Communautés européennes

15^e année n° L 123

29 mai 1972

Édition de langue française

Législation

Sommaire

I *Actes dont la publication est une condition de leur applicabilité*

.....

II *Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité*

Commission

72/195/CEE:

Décision de la Commission, du 21 avril 1972, autorisant la République française à exclure du traitement communautaire les jouets en bois et autres (à l'exception des moteurs et mécanismes d'animation pour les jouets et modèles réduits ainsi que leurs pièces détachées), de la position 97.03 A et ex B du tarif douanier commun, originaires du Japon et mis en libre pratique dans les autres États membres

1

72/196/CEE:

Décision de la Commission, du 21 avril 1972, autorisant la République française à exclure du traitement communautaire les lampes électriques portatives destinées à fonctionner au moyen de leur propre source d'énergie (à piles, à accumulateurs, électromagnétiques, etc.), de la position 85.10 B du tarif douanier commun, originaires de Hong Kong et mises en libre pratique dans les autres États membres....

3

72/197/CEE:

Décision de la Commission, du 24 avril 1972, autorisant la République italienne à exclure du traitement communautaire les propulseurs spéciaux du type hors-bord, de la position 84.06 B du tarif douanier commun, originaires du Japon et mis en libre pratique dans les autres États membres

4

72/198/CEE:

Décision de la Commission, du 26 avril 1972, fixant le montant maximum pour la troisième adjudication partielle de sucre blanc effectuée en vertu du règlement (CEE) n° 685/72

5

72/199/CEE:

Troisième directive de la Commission, du 27 avril 1972, portant fixation de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux ..

6

72/200/CEE:

Décision de la Commission, du 28 avril 1972, constatant que les conditions prévues pour la mobilisation de froment tendre destiné à une action nationale d'aide alimentaire sont remplies

35

Sommaire (suite)

72/201/CEE:

Décision de la Commission, du 28 avril 1972, constatant que les conditions prévues pour la mobilisation de froment tendre destiné à une action nationale d'aide alimentaire sont remplies 36

72/202/CEE:

Décision de la Commission, du 2 mai 1972, modifiant la décision, du 21 janvier 1972, relative à l'ouverture d'une adjudication pour l'exportation de 50 000 tonnes de froment tendre détenues par l'organisme d'intervention allemand 37

72/203/CEE:

Décision de la Commission, du 2 mai 1972, modifiant la décision, du 10 janvier 1972, relative à l'ouverture d'une adjudication pour l'exportation de 22 000 tonnes d'orge détenues par l'organisme d'intervention allemand 38

72/204/CEE:

Décision de la Commission, du 2 mai 1972, autorisant la République italienne à exclure du traitement communautaire les roulements de tous genres (à billes, à aiguilles, à galets ou à rouleaux de toute forme), de la position 84.62 du tarif douanier commun, originaires des pays de l'Est et mis en libre pratique dans les autres États membres 39

II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

COMMISSION

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 21 avril 1972

autorisant la République française à exclure du traitement communautaire les jouets en bois et autres (à l'exception des moteurs et mécanismes d'animation pour les jouets et modèles réduits ainsi que leurs pièces détachées), de la position 97.03 A et ex B du tarif douanier commun, originaires du Japon et mis en libre pratique dans les autres États membres

(Le texte en langue française est le seul faisant foi)

(72/195/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne, et notamment son article 115 premier alinéa,

vu le recours à l'article 115 premier alinéa du traité que le gouvernement français a introduit auprès de la Commission par télex de sa représentation permanente auprès des Communautés européennes, le 15 avril 1972, en vue d'être autorisé à exclure du traitement communautaire les jouets en bois et autres (à l'exception des moteurs et mécanismes d'animation pour les jouets et modèles réduits ainsi que leurs pièces détachées), de la position 97.03 A et ex B du tarif douanier commun, originaires du Japon et mis en libre pratique dans les autres États membres,

considérant que les disparités dans les mesures de politique commerciale appliquées pour ces produits à l'égard du Japon par la France, d'une part, et les autres États membres, d'autre part, provoquent des détournements de trafic ;

considérant que ces détournements de trafic empêchent l'exécution des mesures de politique commerciale adoptées par la France à l'égard du Japon ;

considérant qu'il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de mettre en œuvre les méthodes par lesquelles les autres États membres apporteraient la coopération nécessaire ;

considérant qu'il y a lieu d'autoriser, pour une période limitée, l'application de mesures de protection, au titre de l'article 115 premier alinéa, dans les conditions qui sont définies par la décision de la Commission du 12 mai 1971, notamment en son article 1^{er} (1) ;

considérant que, pour les produits en question, un régime uniforme d'importation pourrait être adopté dans le cadre d'une politique commerciale commune à l'égard du Japon et que la validité de ces mesures devrait être limitée à l'application d'un tel régime,

(1) JO n° L 121 du 3. 6. 1971.

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

dépôt des demandes de titres d'importation est postérieure au 4 avril 1972.

Article premier

La République française est autorisée à exclure du traitement communautaire les importations des produits suivants:

N° du tarif douanier commun	Désignation des produits
97.03	Autres jouets; modèles réduits pour le divertissement:
A	— en bois
ex B	— autres

originaires du Japon et mis en libre pratique dans les autres États membres, pour lesquelles la date de

Article 2

La validité de la présente décision est limitée à la mise en application d'un régime uniforme d'importation dans le cadre d'une politique commerciale commune à l'égard du Japon et au plus tard au 31 décembre 1972.

Article 3

La République française est destinataire de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 21 avril 1972.

Par la Commission

Le président

S. L. MANSHOLT

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 21 avril 1972

autorisant la République française à exclure du traitement communautaire les lampes électriques portatives destinées à fonctionner au moyen de leur propre source d'énergie (à piles, à accumulateurs, électromagnétiques, etc.), de la position 85.10 B du tarif douanier commun originaires de Hong Kong et mises en libre pratique dans les autres États membres

(Le texte en langue française est le seul faisant foi)

(72/196/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne, et notamment son article 115 premier alinéa,

vu le recours à l'article 115 premier alinéa du traité que le gouvernement français a introduit auprès de la Commission par télex de sa représentation permanente auprès des Communautés européennes, le 15 avril 1972, en vue d'être autorisé à exclure du traitement communautaire les lampes électriques portatives destinées à fonctionner au moyen de leur propre source d'énergie (à piles, à accumulateurs, électromagnétiques, etc.), de la position 85.10 B du tarif douanier commun, originaires de Hong Kong et mises en libre pratique dans les autres États membres,

considérant que les disparités dans les mesures de politique commerciale appliquées pour ces produits à l'égard de Hong Kong par la France, d'une part, et les autres États membres, d'autre part, provoquent des détournements de trafic;

considérant que ces détournements de trafic empêchent l'exécution des mesures de politique commerciale adoptées par la France à l'égard de Hong Kong ;

considérant qu'il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de mettre en œuvre les méthodes par lesquelles les autres États membres apporteraient la coopération nécessaire;

considérant qu'il y a lieu d'autoriser, pour une période limitée, l'application des mesures de protection, au titre de l'article 115 premier alinéa, dans les conditions qui sont définies par la décision de la Commission du 12 mai 1971 notamment en son article 1^{er} ⁽¹⁾,

(1) JO n° L 121 du 3. 6. 1971.

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

La République française est autorisée à exclure du traitement communautaire les importations des produits suivants:

N° du tarif douanier commun	Désignation des produits
85.10 B	Lampes électriques portatives destinées à fonctionner au moyen de leur propre source d'énergie (à piles, à accumulateurs, électromagnétiques, etc.)

originaires de Hong Kong et mis en libre pratique dans les autres États membres, pour lesquelles la date de dépôt des demandes de titres d'importation est postérieure au 6 avril 1972.

Article 2

La présente décision est applicable jusqu'au 30 juin 1972.

Article 3

La République française est destinataire de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 21 avril 1972.

Par la Commission
Le président
S. L. MANSCHOLT

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 24 avril 1972

autorisant la République italienne à exclure du traitement communautaire les propulseurs spéciaux du type hors-bord, de la position 84.06 B du tarif douanier commun, originaires du Japon et mis en libre pratique dans les autres États membres

(Le texte en langue italienne est le seul faisant foi)

(72/197/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne, et notamment son article 115 premier alinéa,

vu le recours à l'article 115 premier alinéa du traité que le gouvernement italien a introduit auprès de la Commission par télex de sa représentation permanente auprès des Communautés européennes, le 18 avril 1972, en vue d'être autorisé à exclure du traitement communautaire les propulseurs spéciaux du type hors-bord, de la position 84.06 B du tarif douanier commun, originaires du Japon et mis en libre pratique dans les autres États membres,

considérant que les disparités dans les mesures de politique commerciale appliquées pour ces produits à l'égard du Japon par l'Italie, d'une part, et les autres États membres, d'autre part, provoquent des détournements de trafic;

considérant que ces détournements de trafic empêchent l'exécution des mesures de politique commerciale adoptées par l'Italie à l'égard du Japon;

considérant qu'il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de mettre en œuvre les méthodes par lesquelles les autres États membres apporteraient la coopération nécessaire ;

considérant qu'il y a lieu d'autoriser, pour une période limitée, l'application de mesures de protection, au titre de l'article 115 premier alinéa, dans les conditions qui sont définies par la décision de la Commission du 12 mai 1971 notamment en son article 1^{er} ⁽¹⁾ ;

considérant que, pour les produits en question, un régime uniforme d'importation pourrait être adopté dans le cadre d'une politique commerciale commune à l'égard du Japon et que la validité de ces mesures devrait être limitée à l'application d'un tel régime,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

La République italienne est autorisée à exclure du traitement communautaire les importations des produits suivants:

N° du tarif douanier commun	Désignation des produits
84.06 B	Propulseurs spéciaux du type hors-bord

originaires du Japon et mis en libre pratique dans les autres États membres, pour lesquelles la date de dépôt des demandes de titres d'importation est postérieure au 5 avril 1972.

Article 2

La validité de la présente décision est limitée à la mise en application d'un régime uniforme d'importation dans le cadre de la politique commerciale commune à l'égard du Japon et au plus tard au 31 octobre 1972.

Article 3

La République italienne est destinataire de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 24 avril 1972.

Par la Commission
Le président
S. L. MANSOLT

⁽¹⁾ JO n° L 121 du 3. 6. 1971.

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 26 avril 1972

fixant le montant maximum de la restitution pour la troisième adjudication partielle de sucre blanc effectuée en vertu du règlement (CEE) n° 685/72

(72/198/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,vu le traité instituant la Communauté économique
européenne,vu le règlement n° 1009/67/CEE du Conseil, du
18 décembre 1967, portant organisation commune
des marchés dans le secteur du sucre ⁽¹⁾, modifié en
dernier lieu par le règlement (CEE) n° 607/72 ⁽²⁾, et
notamment son article 17 paragraphe 4,considérant que, en vertu du règlement (CEE) n° 685/72
de la Commission, du 4 avril 1972, concernant une
adjudication permanente pour la détermination de la
restitution à l'exportation pour le sucre blanc ⁽³⁾, les
États membres procèdent à des adjudications partielles
pour l'exportation de ce sucre ;considérant que, selon les dispositions de l'article 4
paragraphe 3 du règlement (CEE) n° 766/68 du Con-
seil, du 18 juin 1968, établissant les règles générales
concernant l'octroi des restitutions à l'exportation de
sucre ⁽⁴⁾, modifié en dernier lieu par le règlement
(CEE) n° 433/72 ⁽⁵⁾, un montant maximum de la
restitution est fixé pour l'adjudication partielle en
cause dans un délai de trois jours ouvrables suivant
l'expiration du délai de présentation des offres ;considérant que, pour le calcul du montant maximum,
il est tenu compte de la situation de la Communauté
en matière d'approvisionnement et de prix, des prix
et des possibilités d'écoulement sur le marché mon-
dial, ainsi que des frais afférents à l'exportation de
sucre ;considérant qu'après examen des offres il convient
d'arrêter, pour la troisième adjudication partielle, les
dispositions visées à l'article 1^{er} ;considérant que les mesures prévues à la présente dé-
cision sont conformes à l'avis du Comité de gestion
du sucre,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION :

*Article premier*Pour la troisième adjudication partielle de sucre blanc
effectuée en vertu du règlement (CEE) n° 685/72, le
montant maximum de la restitution à l'exportation
est fixé à 2,380 unités de compte par 100 kilogram-
mes.*Article 2*Les États membres sont destinataires de la présente
décision.

Fait à Bruxelles, le 26 avril 1972.

⁽¹⁾ JO n° 308 du 18. 12. 1967, p. 1.⁽²⁾ JO n° L 75 du 28. 3. 1972, p. 4.⁽³⁾ JO n° L 81 du 5. 4. 1972, p. 13.⁽⁴⁾ JO n° L 143 du 25. 6. 1968, p. 6.⁽⁵⁾ JO n° L 53 du 2. 3. 1972, p. 1.

Par la Commission

Le vice-président

Carlo SCARASCIA MUGNOZZA

TROISIÈME DIRECTIVE DE LA COMMISSION

du 27 avril 1972

portant fixation de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux

(72/199/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,vu le traité instituant la Communauté économique
européenne,vu la directive du Conseil, du 20 juillet 1970, concer-
nant l'introduction de modes de prélèvement d'échan-
tillons et de méthodes d'analyse communautaires
pour le contrôle officiel des aliments des animaux ⁽¹⁾,
et notamment son article 2,considérant que la directive susvisée prévoit que
les contrôles officiels des aliments des animaux pour
constater si les conditions prescrites en vertu des dis-
positions législatives, réglementaires ou administratives
concernant la qualité et la composition des aliments
des animaux sont respectées, sont effectués selon des
modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes
d'analyse communautaires ;considérant que les directives n° 71/250/CEE et
n° 71/393/CEE de la Commission, du 15 juin 1971 ⁽²⁾
et du 18 novembre 1971 ⁽³⁾, ont déjà fixé un certain
nombre de méthodes d'analyse communautaires ; que,
compte tenu de l'état d'avancement des travaux effec-
tués depuis lors, il convient d'arrêter une troisième
série de méthodes ;considérant que les mesures prévues dans la présente
directive sont conformes à l'avis du Comité perman-
ent des aliments des animaux,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE :

*Article premier*Les États membres prescrivent que les analyses pour
les contrôles officiels des aliments des animaux en ce
qui concerne leurs teneurs en amidon, protéines brutes,
protéines brutes solubilisables par la pepsine etl'acide chlorhydrique et en gossypol libre et total
ainsi que l'activité de la pepsine, sont effectuées selon
les méthodes décrites à l'annexe I de la présente direc-
tive.Les dispositions générales figurant à la partie 1 (intro-
duction) de l'annexe de la première directive n° 71/
250/CEE de la Commission, du 15 juin 1971, por-
tant fixation de méthodes d'analyse communautaires
pour le contrôle officiel des aliments des animaux
sont applicables aux méthodes décrites à l'annexe I
de la présente directive.*Article 2*Les États membres prescrivent que les analyses pour
les contrôles officiels des aliments des animaux en
vue de la détection et de l'identification des antibio-
tiques du groupe des tétracyclines ainsi qu'en ce qui
concerne les teneurs des aliments en chlortétracy-
cline, oxytétracycline, tétracycline, oléandomycine,
tylosine, virginiamycine sont effectuées selon les mé-
thodes décrites à l'annexe II de la présente directive.Les dispositions générales figurant à la partie 1 (in-
troduction) de l'annexe de la première directive
n° 71/250/CEE de la Commission du 15 juin 1971,
à l'exception de la partie concernant la préparation
de l'échantillon à analyser, sont applicables aux mé-
thodes décrites à l'annexe II de la présente directive.*Article 3*Les États membres mettent en vigueur, le 1^{er} juillet
1973 au plus tard, les dispositions législatives, régle-
mentaires ou administratives nécessaires pour se con-
former aux dispositions de la présente directive. Ils
en informent immédiatement la Commission.*Article 4*Les États membres sont destinataires de la présente
directive.

Fait à Bruxelles, le 27 avril 1972.

Par la Commission
Le président
S. L. MANSOLT⁽¹⁾ JO n° L 170 du 3. 8. 1970, p. 2.⁽²⁾ JO n° L 155 du 12. 7. 1971, p. 13.⁽³⁾ JO n° L 279 du 20. 12. 1971, p. 7.

ANNEXE I

1. DOSAGE DE L'AMIDON

— Méthode polarimétrique —

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de déterminer la teneur en amidon et en produits de dégradation à haut poids moléculaire de l'amidon des aliments des animaux, à l'exception de ceux qui contiennent des cossettes, des pulpes, des feuilles ou des collets séchés de betteraves, des pulpes de pommes de terre, des levures déshydratées, des produits riches en inuline (par exemple, cossettes et farine de topinambours) ou des cretons.

2. Principe

La méthode comprend une double détermination. Dans la première, l'échantillon est traité à chaud par l'acide chlorhydrique dilué. Après défécation et filtration, on mesure par polarimétrie le pouvoir rotatoire de la solution.

Dans la seconde, l'échantillon est extrait par l'éthanol à 40 %. Après acidification du filtrat par l'acide chlorhydrique, défécation et filtration, on mesure le pouvoir rotatoire dans les mêmes conditions que lors de la première détermination.

La différence entre les deux multipliée par un facteur connu donne la teneur en amidon de l'échantillon.

3. Réactifs

3.1 Acide chlorhydrique à 25 % (p/p), d : 1,126.

3.2 Acide chlorhydrique à 1,128 % (p/v).

La concentration doit être vérifiée par titration à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N en présence de rouge de méthyle à 0,1 % (p/v) dans l'éthanol à 94 % (v/v).
10 ml = 30,94 ml de NaOH 0,1 N.

3.3 Solution de Carrez I: Dissoudre dans l'eau 21,9 g d'acétate de zinc $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 3 g d'acide acétique glacial. Compléter à 100 ml avec de l'eau.

3.4 Solution de Carrez II: Dissoudre dans l'eau 10,6 g de ferrocyanure de potassium $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Compléter à 100 ml avec de l'eau.

3.5 Éthanol à 40 % (v/v), d : 0,948 à 20 °C.

4. Appareillage

4.1 Erlenmeyer de 250 ml à rodage normalisé, avec réfrigérant à reflux.

4.2 Polarimètre ou saccharimètre.

5. Mode opératoire

5.1 Préparation de l'échantillon

Broyer l'échantillon de façon qu'il passe en totalité au travers d'un tamis à mailles rondes de 0,5 mm de diamètre.

5.2 Détermination du pouvoir rotatoire total (P ou S) (v. observation 7.1)

Peser, à 1 mg près, 2,5 g de l'échantillon broyé et les introduire dans un ballon jaugé de 100 ml. Ajouter 25 ml d'acide chlorhydrique (3.2), agiter pour obtenir une bonne répartition de la prise d'essai et ajouter à nouveau 25 ml d'acide chlorhydrique (3.2). Plonger le ballon dans un bain d'eau bouillante et, durant les 3 premières minutes qui suivent, agiter énergiquement et régulièrement pour éviter la formation d'agglomérats. La quantité d'eau du bain doit être suffisante pour permettre de maintenir le bain en ébullition lorsque le ballon y est plongé. Celui-ci ne peut être retiré du bain au cours de l'agitation. Après 15 minutes exactement, retirer le ballon du bain, y ajouter 30 ml d'eau froide et refroidir immédiatement jusqu'à 20 °C.

Ajouter 5 ml de solution de Carrez I (3.3) et agiter pendant une minute. Ajouter ensuite 5 ml de solution de Carrez II (3.4) et agiter à nouveau pendant une minute. Compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer. Si le filtrat n'est pas parfaitement limpide (ce qui est peu fréquent), recommencer l'analyse en utilisant une plus grande quantité des solutions de Carrez I et II, par exemple 10 ml.

Mesurer ensuite le pouvoir rotatoire de la solution dans un tube de 200 mm au polarimètre ou au saccharimètre.

5.3 Détermination du pouvoir rotatoire (P' ou S') des substances solubles dans l'éthanol à 40 %

Peser, à 1 mg près, 5 g de l'échantillon, les introduire dans un ballon jaugé de 100 ml et ajouter 80 ml environ d'éthanol (3.5) (v. observation 7.2). Laisser le ballon en attente durant 1 h à la température ambiante; au cours de ce laps de temps, procéder 6 fois à une agitation énergique de façon que la prise d'essai soit bien mélangée à l'éthanol. Porter ensuite au volume avec de l'éthanol (3.5), homogénéiser et filtrer.

Introduire à la pipette 50 ml du filtrat (= 2,5 g de l'échantillon) dans un erlenmeyer de 250 ml, ajouter 2,1 ml d'acide chlorhydrique (3.1) et agiter énergiquement. Ajuster un réfrigérant à reflux à l'erlenmeyer et plonger celui-ci dans un bain d'eau bouillante. Après 15 minutes exactement, retirer l'erlenmeyer du bain, transvaser son contenu dans un ballon jaugé de 100 ml, en rinçant avec un peu d'eau froide, et refroidir jusqu'à 20 °C. Déféquer ensuite à l'aide des solutions de Carrez I (3.3) et II (3.4), compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser, filtrer et mesurer le pouvoir rotatoire comme indiqué en 5.2, deuxième et troisième alinéas.

6. Calcul des résultats

La teneur en amidon pour cent d'échantillon est calculée comme suit:

6.1 Mesures effectuées au polarimètre

$$\text{pourcent d'amidon} = \frac{2000 (P - P')}{[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ}}$$

P = pouvoir rotatoire total en degrés d'arc

P' = pouvoir rotatoire en degrés d'arc donné par les substances solubles dans l'éthanol à 40 %

$[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ}$ = pouvoir rotatoire spécifique de l'amidon pur. Les valeurs conventionnellement admises pour ce facteur sont les suivantes:

- + 185,9°: amidon de riz
- + 195,4°: amidon de pommes de terre
- + 184,6°: amidon de maïs
- + 182,7°: amidon de froment
- + 181,5°: amidon d'orge
- + 181,3°: amidon d'avoine
- + 184,0°: autres types d'amidons, ainsi que mélanges d'amidons des aliments composés

6.2 Mesures effectuées au saccharimètre

$$\text{pourcent d'amidon} = \frac{2000}{[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ}} \cdot \frac{(2N \cdot 0,665) (S - S')}{100} = \frac{26,6 N (S - S')}{[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ}}$$

S = pouvoir rotatoire total en degrés saccharimétriques.

S' = pouvoir rotatoire en degrés saccharimétriques donné par les substances solubles dans l'éthanol à 40 %.

N = poids en g de saccharose dans 100 ml d'eau donnant sous une épaisseur de 200 mm un pouvoir rotatoire de 100° saccharimétriques.

16,29 g pour les saccharimètres français,

26,00 g pour les saccharimètres allemands,

20,00 g pour les saccharimètres mixtes.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ}$ = pouvoir rotatoire spécifique de l'amidon pur (v. 6.1).

6.3 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur un même échantillon ne doit pas dépasser 0,4 en valeur absolue pour les teneurs en amidon inférieures à 40 % 1,1 % en valeur relative pour les teneurs en amidon égales ou supérieures à 40 %.

7. Observations

7.1 Lorsque l'échantillon contient plus de 6 % de carbonates, calculés en carbonate de calcium, ceux-ci doivent être détruits par un traitement à l'aide d'une quantité exactement appropriée d'acide sulfurique dilué, avant la détermination du pouvoir rotatoire total.

7.2 Dans le cas des produits à forte teneur en lactose, tels que les poudres de lactosérum ou de lait écrémé, procéder comme suit après l'addition des 80 ml d'éthanol (3.5). Ajuster au ballon un réfrigérant à reflux, plonger le ballon durant 30 minutes dans un bain d'eau à 50 °C. Laisser ensuite refroidir et poursuivre l'analyse comme indiqué en 5.3.

2. DOSAGE DES PROTÉINES BRUTES

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de déterminer conventionnellement la teneur en protéines brutes des aliments des animaux à partir de la teneur en azote, dosée selon Kjeldahl.

2. Principe

L'échantillon est minéralisé par voie humide. La solution acide est alcalinisée par une solution d'hydroxyde de sodium. L'ammoniac libéré est entraîné par distillation et recueilli dans une quantité déterminée d'acide sulfurique dont l'excès est titré par une solution d'hydroxyde de sodium.

3. Réactifs

- 3.1 Sulfate de potassium p.a.
- 3.2 Catalyseur: oxyde cuivrique CuO p.a., ou sulfate cuivrique cristallisé $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ p.a., ou mercure, ou oxyde mercurique HgO p.a.
- 3.3 Zinc p.a., en granulés.
- 3.4 Acide sulfurique p.a., $d : 1,84$
- 3.5 Acide sulfurique 0,1 N.
- 3.6 Acide sulfurique 0,5 N.
- 3.7 Indicateur au rouge de méthyle: dissoudre 300 mg de rouge de méthyle dans 100 ml d'éthanol à 95—96 % (v/v).
- 3.8 Solution à 40 % (p/v) d'hydroxyde de sodium.
- 3.9 Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N.
- 3.10 Solution d'hydroxyde de sodium 0,25 N.
- 3.11. Solution saturée de sulfure de sodium p.a.
- 3.12 Solution à 8 % (p/v) de thiosulfate de sodium, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ p.a.
- 3.13 Pierre ponce en grains, lavée à l'acide chlorhydrique et calcinée.

4. Appareillage

Appareils à minéraliser et distiller selon Kjeldahl (v. observation 7.1).

5. Mode opératoire

5.1 Minéralisation

Peser, à 1 mg près, 1 g de l'échantillon et introduire la prise d'essai dans le ballon de l'appareil à minéraliser. Ajouter 10 g de sulfate de potassium (3.1), une quantité appropriée de catalyseur (3.2) (0,3 à 0,4 g d'oxyde cuivrique ou 0,9 à 1,2 g de sulfate cuivrique ou une goutte de mercure ou 0,6 à 0,7 g d'oxyde mercurique), 25 ml d'acide sulfurique (3.4) et quelques granulés de pierre ponce (3.13). Homogénéiser. Chauffer le ballon d'abord avec modération et en agitant de temps en temps jusqu'à carbonisation de la masse et disparition de l'écume; ensuite plus intensément jusqu'à ébullition régulière du liquide. Éviter la surchauffe des parois et l'adhérence de particules organiques. Lorsque la solution apparaît limpide et incolore (vert clair en présence de catalyseur à base de cuivre), maintenir l'ébullition durant 1 h encore. Laisser ensuite refroidir.

5.2 Distillation

Ajouter 250 à 350 ml d'eau, avec précaution et tout en agitant pour dissoudre complètement les sulfates; laisser refroidir.

Ajouter ensuite quelques granulés de zinc (3.3).

Introduire dans le flacon collecteur de l'appareil à distiller 25 ml exactement mesurés d'acide sulfurique 0,1 N (3.5) ou 0,5 N (3.6), selon la teneur présumée en azote (v. observation 7.2) et quelques gouttes d'indicateur au rouge de méthyle (3.7).

Connecter le ballon au réfrigérant de l'appareil à distiller et plonger l'extrémité de ce dernier sur une hauteur de 1 cm au moins dans le liquide du flacon collecteur (v. observation 7.3). Introduire lentement dans le ballon par l'entonnoir à robinet 100 ml de solution à 40 % d'hydroxyde de sodium (3.8). Si l'on a utilisé un catalyseur à base de mercure, introduire en outre dans le ballon soit 10 ml de solution de sulfure de sodium (3.11), soit 25 ml de solution de thiosulfate de sodium (3.12).

Chauffer le ballon de façon à distiller 150 ml environ de liquide en 30 minutes. Après ce laps de temps, vérifier la neutralité du distillat qui s'écoule au moyen de papier de tournesol. Si la réaction est alcaline, poursuivre la distillation. Arrêter celle-ci lorsque le distillat apparaît neutre au papier de tournesol. Au cours de la distillation, remuer de temps en temps le contenu du flacon collecteur et surveiller sa coloration. Si celle-ci vire au jaune, ajouter immédiatement un volume exactement mesuré d'acide sulfurique 0,1 N (3.5) ou 0,5 N (3.6).

5.3 Titration

Titrer dans le flacon collecteur l'excès d'acide sulfurique par la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N (3.9) ou 0,25 N (3.10), selon la normalité de l'acide sulfurique utilisé, jusqu'à virage de la coloration au jaune clair.

5.4 Contrôle de la méthode

Pour contrôler que les réactifs sont exempts d'azote, effectuer un essai à blanc (distillation et titration), en l'absence d'échantillon à analyser. Pour contrôler l'exactitude de la méthode, effectuer l'analyse (minéralisation, distillation et titration) sur 1,5 à 2,0 g d'acétanilide p.a. (P.F. 114° C; % N : 10,36) en présence de 1 g de saccharose, exempt d'azote; 1 g d'acétanilide consomme 14,80 ml d'acide sulfurique 0,5 N.

6. Calcul des résultats

Déterminer le volume d'acide sulfurique consommé, 1 ml d'acide sulfurique 0,1 N correspond à 1,4 mg d'azote. Multiplier la quantité d'azote par le facteur 6,25. Exprimer le résultat en pour cent de l'échantillon.

Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur un même échantillon ne doit pas dépasser:

- 0,2 en valeur absolue pour les teneurs en protéines brutes inférieures à 20 %;
- 1,0 % en valeur relative pour les teneurs comprises entre 20 et 40 %;
- 0,4 en valeur absolue pour les teneurs supérieures à 40 %.

7. Observations

- 7.1 Certains appareils, qui exigent un transvasement entre minéralisation et distillation, peuvent être utilisés. Dans ce cas, le transvasement doit être effectué sans perte.
- 7.2 Pour les produits pauvres en matières azotées, le volume d'acide sulfurique 0,1 N à introduire dans le flacon collecteur peut être réduit, si nécessaire, à 10 ou 15 ml et complété à 25 ml par de l'eau.
- 7.3 Si le ballon de l'appareil à distiller n'est pas muni d'un entonnoir à robinet, ajouter la solution d'hydroxyde de sodium immédiatement avant de connecter le ballon au réfrigérant et en laissant couler le liquide lentement le long des parois de façon à éviter qu'il se mélange à la solution acide.

3. DOSAGE DES PROTÉINES BRUTES SOLUBILISÉES PAR LA PEPSINE ET L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de déterminer la fraction des protéines brutes solubilisées par la pepsine et l'acide chlorhydrique dans des conditions déterminées. Elle est applicable à tous les aliments.

2. Principe

L'échantillon est soumis à un traitement de 48 h à 40 °C par une solution chlorhydrique de pepsine. La suspension est filtrée et la teneur en azote du filtrat est déterminée selon la méthode décrite pour le dosage des protéines brutes.

3. Réactifs

- 3.1 Acide chlorhydrique, d : 1,125
- 3.2 Acide chlorhydrique 0,075 N.
- 3.3 Pepsine à 2,0 U/mg; cette activité est définie et doit être contrôlée selon la méthode faisant l'objet de la partie 4 de la présente annexe.
- 3.4 Solution fraîchement préparée à environ 0,02 % (p/v) de pepsine dans l'acide chlorhydrique (3.2); activité: 400 U/l.
- 3.5 Émulsion d'antimousse (silicone par exemple).
- 3.6 Tous les réactifs indiqués sous le point 3 de la méthode de dosage des protéines brutes.

4. Appareillage

- 4.1 Bain d'eau ou étuve à incubation, réglé à 40 °C $\pm$ 1 °C.
- 4.2 Appareils à minéraliser et à distiller selon Kjeldahl.

5. Mode opératoire

5.1 Mise en solution (v. observation 7.2)

Peser, à 1 mg près, 2 g de l'échantillon. Introduire la prise d'essai dans un ballon jaugé de 500 ml et ajouter 450 ml de solution chlorhydrique de pepsine (3.4) préalablement portée à 40 °C. Agiter de façon à éviter la formation d'agglomérats. Vérifier que le pH de la suspension est inférieur à 1,7. Porter le ballon dans le bain d'eau ou l'étuve à incubation (4.1) et l'y maintenir durant 48 h. Agiter après 8, 24 et 32 h. Après 48 h, ajouter 15 ml d'acide chlorhydrique (3.1), refroidir jusqu'à 20 °C, compléter au volume avec de l'eau et filtrer.

5.2 Minéralisation

Prélever 250 ml du filtrat et les introduire dans le ballon de l'appareil à distiller (4.2). Ajouter les réactifs nécessaires à la minéralisation comme indiqué dans la méthode de dosage des protéines brutes, au point 5.1, deuxième phrase.

Homogénéiser et chauffer à ébullition. S'il y a formation de mousse, ajouter quelques gouttes d'émulsion d'antimousse (3.5). Maintenir une ébullition vive jusqu'à évaporation presque complète de l'eau. Éliminer les dernières traces d'eau avec précaution, en réduisant l'intensité du chauffage. Lorsque la solution apparaît limpide et incolore (vert clair en présence de catalyseur à base de cuivre), poursuivre l'ébullition durant 1 h encore. Laisser ensuite refroidir.

5.3 Distillation et titration

Procéder comme indiqué dans la méthode de dosage des protéines brutes, points 5.2 et 5.3.

5.4 Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc en appliquant le mode opératoire en l'absence d'échantillon à analyser.

6. Calcul des résultats

Déduire le volume d'acide sulfurique consommé par l'essai à blanc de celui consommé par la prise d'essai. 1 ml d'acide sulfurique 0,1 N correspond à 1,4 mg d'azote.

Multiplier la quantité d'azote par le facteur 6,25. Exprimer le résultat en pour cent de l'échantillon.

Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur un même échantillon ne doit pas dépasser:

- 0,4 en valeur absolue, pour les teneurs inférieures à 20 % ;
- 2,0 %, en valeur relative, pour les teneurs comprises entre 20 et 40 % ;
- 0,8, en valeur absolue, pour les teneurs supérieures à 40 %.

7. Observations

7.1 Les valeurs obtenues par la présente méthode n'ont pas de lien direct avec la digestibilité *in vivo*.

7.2 Les produits dont la teneur en matières grasses dépasse 10 % doivent être préalablement dégraissés par extraction à l'éther de pétrole (éb. 40—60 °C).

4. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA PEPSINE

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de contrôler l'activité de la pepsine utilisée pour le dosage des protéines brutes solubilisées par la pepsine et l'acide chlorhydrique.

2. Principe

L'hémoglobine est traitée dans des conditions définies par la pepsine en milieu chlorhydrique. La fraction non hydrolysée des protéines est précipitée par l'acide trichloracétique. Le filtrat est additionné d'hydroxyde de sodium et du réactif selon Folin-Ciocalteu. La densité optique de cette solution est mesurée à 750 nm et la quantité de tyrosine qui y correspond est lue sur une courbe d'étalonnage.

Définition: L'unité de pepsine est définie comme étant la quantité de cette enzyme qui libère, par minute, dans les conditions de la méthode, une quantité de groupements hydroxyaryl dont la coloration par le réactif selon Folin-Ciocalteu a une densité optique correspondant à celle d'une μ mole de tyrosine, dans les mêmes conditions.

3. Réactifs

- 3.1 Acide chlorhydrique 0,2 N.
- 3.2 Acide chlorhydrique 0,06 N.
- 3.3 Acide chlorhydrique 0,025 N.
- 3.4 Solution à 5 % (p/v) d'acide trichloracétique.
- 3.5 Solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N.
- 3.6 Réactif selon Folin-Ciocalteu. Introduire 100 g de tungstate de sodium ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g de molybdate de sodium ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 700 ml d'eau dans un ballon à fond rond de 2 l à rodage normalisé. Ajouter 50 ml d'acide phosphorique (d : 1,71) et 100 ml d'acide chlorhydrique concentré (d : 1,19), ajuster au ballon un réfrigérant à reflux, chauffer à ébullition et maintenir la solution en ébullition douce durant 10 h. Laisser refroidir, détacher le réfrigérant à reflux, ajouter 175 g de sulfate de lithium ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 50 ml d'eau et 1 ml de brome. Faire bouillir durant 15 minutes pour éliminer l'excès de brome.

Laisser refroidir, transvaser la solution dans un ballon jauge de 1 l, compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer. Il ne peut subsister de coloration verdâtre. Avant l'emploi, diluer 1 volume du réactif par 2 volumes d'eau.
- 3.7 Solution d'hémoglobine: Peser une quantité d'hémoglobine, substrat protéique d'après Anson, (2 g environ) correspondant à 354 mg d'azote⁽¹⁾ et l'introduire dans un ballon de 200 ml à rodage normalisé. Ajouter quelques ml d'acide chlorhydrique (3.2), relier le ballon à la pompe à vide et agiter jusqu'à dissolution complète de l'hémoglobine. Couper le vide et ajouter tout en agitant de l'acide chlorhydrique (3.2) pour compléter à 100 ml. *Préparer immédiatement avant l'emploi.*
- 3.8 Solution étalon de tyrosine: Dissoudre 181,2 mg de tyrosine dans l'acide chlorhydrique (3.1) et compléter à 1 l avec le même acide (solution mère). Prélever 20,0 ml et diluer à 100 ml par l'acide chlorhydrique (3.1). 1 ml de cette solution contient 0,2 μmole de tyrosine.

4. Appareillage

- 4.1 Bain d'eau, réglé à $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ par l'ultrathermostat.
- 4.2 Spectrophotomètre.
- 4.3 Chronomètre, précision: 1 seconde.
- 4.4 pH-mètre.

5. Mode opératoire

5.1 Préparation de la solution (v. observation 7.1)

Dissoudre 150 mg de pepsine dans 100 ml d'acide chlorhydrique (3.2). Prélever à la pipette 2 ml de la solution, les introduire dans un ballon jaugé de 50 ml et compléter au volume par de l'acide chlorhydrique (3.3). Le pH, contrôlé au pH-mètre, doit être de $1,6 \pm 0,1$. Plonger le ballon dans le bain d'eau (4.1).

5.2 Hydrolyse

Introduire à la pipette dans un tube à essai 5,0 ml de solution d'hémoglobine (3.7), porter à 25°C dans le bain d'eau (4.1), ajouter 1,0 ml de la solution de pepsine obtenue en 5.1 et mélanger à l'aide d'une tige de verre, épaissie à une extrémité, par environ 10 mouvements de va-et-vient. Maintenir le tube à essai dans le bain d'eau à 25°C durant 10 minutes exactement, comptées à partir de l'addition de la solution de pepsine (la durée et la température doivent être parfaitement respectées). Ajouter ensuite 10,0 ml de solution d'acide trichloracétique (3.4), préalablement portée à 25°C , homogénéiser et filtrer sur un filtre sec.

5.3 Développement de la coloration et mesure de la densité optique

Prélever à la pipette 5,0 ml du filtrat, les introduire dans un erlenmeyer de 50 ml, ajouter 10,0 ml de solution d'hydroxyde de sodium (3.5) et, en agitant constamment, 3,0 ml du réactif dilué de Folin-Ciocalteu (3.6). Après 5 à 10 minutes, déterminer la densité optique de la solution au spectrophotomètre à 750 nm dans des cuvettes de 1 cm d'épaisseur, par comparaison avec de l'eau.

⁽¹⁾ Déterminer la teneur en azote par un semi-microkjeldahl (teneur théorique: 17,7 % d'azote).

5.4 Essai à blanc

Pour chaque détermination, procéder à un essai à blanc comme indiqué ci-après.

Introduire à la pipette dans un tube à essai 5,0 ml de solution d'hémoglobine (3.7), porter à 25 °C dans le bain d'eau (4.1), ajouter 10,0 ml de solution d'acide trichloracétique (3.4) préalablement portée à 25 °C, homogénéiser et ajouter ensuite 1,0 ml de la solution de pepsine obtenue en 5.1. Mélanger à l'aide d'une tige de verre et maintenir le tube à essai 10 minutes exactement dans le bain d'eau (4.1) à 25 °C. Homogénéiser et filtrer sur un filtre sec. Poursuivre le mode opératoire comme indiqué en 5.3.

5.5 Courbe d'étalonnage

Introduire dans des erlenmeyers de 50 ml des volumes de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 et 5,0 ml de solution étalon de tyrosine (3.8), correspondant respectivement à des quantités de tyrosine de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 et 1,0 μ moles. Compléter la série par un témoin exempt de tyrosine. Porter les volumes à 5,0 ml à l'aide d'acide chlorhydrique (3.1). Ajouter 10,0 ml de solution d'hydroxyde de sodium (3.5) et, en agitant constamment, 3,0 ml du réactif dilué de Folin-Ciocalteu (3.6). Mesurer la densité optique comme indiqué en 5.3, dernière phrase. Tracer la courbe d'étalonnage en portant les densités optiques en regard des quantités de tyrosine.

6. Calcul des résultats

Lire sur la courbe d'étalonnage la quantité de tyrosine, en μ mole, correspondant à la densité optique de la solution colorée, corrigée de l'essai à blanc.

L'activité de la pepsine, en μ mole de tyrosine, par mg et par minute, à 25 °C, est donnée par la formule:

$$\text{Unités par mg (U/mg)} = \frac{0,32 \cdot a}{p}$$

dans laquelle:

a = quantité de tyrosine, en μ mole, lue sur la courbe d'étalonnage;

p = poids en mg de la quantité de pepsine ajoutée en 5.2.

7. Observations

7.1 La quantité de pepsine à mettre en solution doit être choisie de façon à obtenir, lors de la mesure photométrique finale, une densité optique de $0,35 \pm 0,035$.

7.2 Deux unités par mg obtenues par la présente méthode correspondent à: 3,64 milliunités Anson/mg (μ mole de tyrosine/mg min à 35,5 °C) ou

36 400 unités commerciales/g (μ mole de tyrosine/g en 10 min à 35,5 °C).

5. DOSAGE DU GOSSYPOL LIBRE ET TOTAL

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de doser le gossypol libre, le gossypol total et les substances chimiquement apparentées dans les graines, les farines et les tourteaux de coton ainsi que dans les aliments composés qui en contiennent. La limite inférieure du dosage est de 20 ppm.

2. Principe

Le gossypol est extrait en présence de 3-amino-1-propanol, soit par un mélange d'isopropanol et d'hexane pour le dosage du gossypol libre, soit par la diméthylformamide pour le dosage du gossypol total. Le gossypol est transformé au moyen d'aniline en gossypol-dianiline, dont la densité optique est mesurée à 440 nm.

3. Réactifs

- 3.1 Mélange isopropanol-hexane: mélanger 60 parts en volume d'isopropanol p.a. à 40 parts en volume d'hexane normal.
- 3.2 Solvant A: porter dans un ballon jaugé de 1 l, 500 ml environ du mélange isopropanol-hexane (3.1), 2 ml de 3-amino-1-propanol, 8 ml d'acide acétique glacial et 50 ml d'eau. Compléter au volume par le mélange isopropanol-hexane (3.1). Ce réactif est stable durant une semaine.
- 3.3 Solvant B: porter à la pipette dans un ballon jaugé de 100 ml, 2 ml de 3-amino-1-propanol et 10 ml d'acide acétique glacial. Refroidir à la température ambiante et compléter au volume par la N,N-diméthylformamide. Ce réactif est stable durant une semaine.
- 3.4 Aniline p.a.: si la densité optique de l'essai à blanc excède 0,022, distiller l'aniline sur poudre de zinc en éliminant les première et dernière fractions de 10 % du distillat. En flacon bouché de verre brun et au réfrigérateur, ce réactif se conserve plusieurs mois.
- 3.5 Solution étalon A de gossypol: Porter dans un ballon jaugé de 250 ml, 27,9 mg d'acétate de gossypol. Dissoudre et compléter au volume par le solvant A (3.2). Introduire à la pipette 50 ml de cette solution dans un ballon jaugé de 250 ml et compléter au volume par le solvant A. La concentration en gossypol de cette solution est de 0,02 mg/ml. Laisser reposer durant 1 h à la température ambiante, avant l'emploi.
- 3.6 Solution étalon B de gossypol: Porter dans un ballon jaugé de 50 ml, 27,9 mg d'acétate de gossypol. Dissoudre et compléter au volume par le solvant B (3.3). La concentration en gossypol de cette solution est de 0,5 mg/ml.

Conservées à l'abri de la lumière, les solutions étalon A et B de gossypol sont stables durant 24 h.

4. Appareillage

- 4.1 Mélangeur (culbuteur): environ 35 retournements par minute.
- 4.2 Spectrophotomètre.

5. Mode opératoire

5.1 Prise d'essai

La prise d'essai est en rapport avec la teneur présumée en gossypol de l'échantillon. Il est préférable d'opérer sur une petite prise d'essai et sur une partie aliquote du filtrat relativement importante, de façon à obtenir une quantité de gossypol suffisante pour effectuer une mesure photométrique précise. Pour le dosage du gossypol libre dans les graines, les farines et les tourteaux de coton, la prise d'essai ne doit pas excéder 1 g; pour les aliments composés elle pourra atteindre 5 g. Une partie aliquote de 10 ml de filtrat convient dans la plupart des cas; elle devra contenir de 50 à 100 µg de gossypol. Pour le dosage du gossypol total, la prise d'essai pourra varier de 0,5 à 5 g afin qu'une partie aliquote de 2 ml de filtrat contienne de 40 à 200 µg de gossypol.

L'analyse doit être effectuée à une température ambiante proche de 20 °C.

5.2 Dosage du gossypol libre

Introduire la prise d'essai dans un ballon à col rodé de 250 ml, dont le fond est recouvert de verre pilé. Ajouter à la pipette 50 ml de solvant A (3.2), boucher le ballon et mélanger durant 1 h dans le culbuteur. Filtrer sur filtre sec et recueillir le filtrat dans un petit ballon à col rodé. Au cours de la filtration, recouvrir l'entonnoir d'un verre de montre. Introduire à la pipette respectivement dans deux ballons jaugés de 25 ml (A et B) des parties aliquotes identiques de filtrat contenant de 50 à 100 µg de gossypol. Compléter éventuellement le volume à 10 ml à l'aide du solvant A (3.2). Compléter ensuite au volume le contenu du ballon (A) par le mélange isopropanol-hexane (3.1). Cette solution sera utilisée comme solution de référence pour la mesure de la solution de l'échantillon.

Introduire à la pipette 10 ml du solvant A (3.2) respectivement dans deux autres ballons jaugés de 25 ml (C et D). Compléter au volume le contenu du ballon (C) par le mélange isopropanol-hexane (3.1). Cette solution sera utilisée comme solution de référence pour la mesure de la solution de l'essai à blanc.

Ajouter 2 ml d'aniline (3.4) respectivement dans les ballons (D) et (B). Chauffer durant 30 minutes sur un bain d'eau bouillante pour développer la coloration. Refroidir à la température ambiante, compléter au volume par le mélange isopropanol-hexane (3.1), homogénéiser et laisser reposer durant 1 h.

Déterminer au spectrophotomètre à 440 nm, dans des cuvettes en verre de 1 cm, la densité optique de la solution de l'essai à blanc (D) par comparaison avec la solution de référence (C) et la densité optique de la solution de l'échantillon (B) par comparaison avec la solution de référence (A).

Soustraire la densité optique de la solution de l'essai à blanc de celle de la solution de l'échantillon (= densité optique corrigée). Calculer à partir de cette valeur la teneur en gossypol libre comme indiqué en 6.

5.3 Dosage du gossypol total

Introduire une prise d'essai contenant de 1 à 5 mg de gossypol dans un ballon jaugé de 50 ml et ajouter 10 ml de solvant B (3.3). Préparer simultanément un essai à blanc, en introduisant 10 ml de solvant B (3.3), dans un autre ballon jaugé de 50 ml. Chauffer les 2 ballons durant 30 minutes sur un bain d'eau bouillante. Refroidir à la température ambiante et compléter le contenu de chaque ballon au volume par le mélange isopropanol-hexane (3.1). Homogénéiser et laisser déposer pendant 10 à 15 minutes, filtrer ensuite et recueillir les filtrats dans des ballons à col rodé.

Porter à la pipette 2 ml du filtrat de l'échantillon respectivement dans deux ballons jaugés de 25 ml et 2 ml du filtrat de l'essai à blanc respectivement dans deux autres ballons de 25 ml. Prélever un ballon de chaque série et compléter les contenus respectifs à 25 ml par le mélange isopropanol-hexane (3.1). Ces solutions seront utilisées comme solutions de référence.

Ajouter 2 ml d'aniline (3.4) respectivement dans les deux autres ballons. Chauffer durant 30 minutes sur bain d'eau bouillante pour développer la coloration. Refroidir à la température ambiante, compléter à 25 ml par le mélange isopropanol-hexane (3.1), homogénéiser et laisser reposer durant 1 h.

Déterminer la densité optique comme indiqué en 5.2 pour le gossypol libre. Calculer à partir de cette valeur la teneur en gossypol total comme indiqué en 6.

6. Calcul des résultats

Le calcul des résultats peut se faire soit à partir de la densité optique spécifique (6.1), soit en se référant à une courbe d'étalonnage (6.2).

6.1 A partir de la densité optique spécifique

Dans les conditions décrites, les densités optiques spécifiques sont les suivantes:

$$\text{gossypol libre: } E_{1 \text{ cm}}^{1 \%} = 625$$

$$\text{gossypol total: } E_{1 \text{ cm}}^{1 \%} = 600$$

La teneur en gossypol libre ou total de l'échantillon est donnée par la formule suivante:

$$\text{gossypol \%} = \frac{E \cdot 1250}{E_{1 \text{ cm}}^{1 \%} \cdot p \cdot a}$$

dans laquelle:

E = densité optique corrigée, déterminée comme indiqué en 5.2,

p = prise d'essai en g,

a = partie aliquote du filtrat en ml.

6.2 A partir d'une courbe d'étalonnage

6.2.1 Gossypol libre

Préparer 2 séries de 5 ballons jaugés de 25 ml. Dans chaque série, introduire à la pipette dans les ballons des volumes respectifs de 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 et 10,0 ml de la solution étalon A de gossypol (3.5). Compléter les volumes à 10 ml à l'aide du solvant A (3.2). Compléter chaque série par un témoin constitué d'un ballon jaugé de 25 ml contenant uniquement 10 ml de solvant A (3.2).

Compléter à 25 ml le volume des ballons de la première série (y compris le témoin) par le mélange isopropanol-hexane (3.1) (série de référence).

Ajouter 2 ml d'aniline (3.4) dans chaque ballon de la seconde série (y compris le témoin). Chauffer durant 30 minutes sur un bain d'eau bouillante pour développer la coloration. Refroidir à la température ambiante, compléter au volume par le mélange isopropanol-hexane (3.1), homogénéiser et laisser reposer durant 1 h (série étalon).

Déterminer dans les conditions indiquées en 5.2 la densité optique des solutions de la série étalon par comparaison avec les solutions correspondantes de la série de référence. Tracer graphiquement la courbe d'étalonnage en portant les densités optiques en regard des quantités de gossypol (en μg).

6.2.2 *Gossypol total*

Préparer 6 ballons jaugés de 50 ml. Introduire dans le premier ballon 10 ml de solvant B (3.3) et dans les autres respectivement 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 et 10,0 ml de la solution étalon B de gossypol (3.6). Compléter le contenu de chaque ballon à 10 ml à l'aide du solvant B (3.3). Chauffer durant 30 minutes sur un bain d'eau bouillante. Refroidir à la température ambiante, compléter au volume par le mélange isopropanol-hexane (3.1) et homogénéiser.

Introduire 2,0 ml de ces solutions respectivement dans deux séries de 6 ballons jaugés de 25 ml. Compléter à 25 ml le contenu des ballons de la première série par le mélange isopropanol-hexane (3.1) (série de référence).

Ajouter 2 ml d'aniline (3.4) dans chaque ballon de la seconde série. Chauffer durant 30 minutes sur un bain d'eau bouillante. Refroidir à la température ambiante, compléter au volume par le mélange isopropanol-hexane (3.1), homogénéiser et laisser reposer durant 1 h (série étalon).

Déterminer dans les conditions indiquées en 5.2 la densité optique des solutions de la série étalon par comparaison avec les solutions correspondantes de la série de référence. Tracer graphiquement la courbe d'étalonnage en portant les densités optiques en regard des quantités de gossypol (en μg).

6.3 *Répétabilité*

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur un même échantillon ne doit pas dépasser:

- 15 %, en valeur relative, pour les teneurs en gossypol inférieures à 500 ppm,
- 75 ppm, en valeur absolue, pour les teneurs comprises entre 500 et 750 ppm,
- 10 %, en valeur relative, pour les teneurs supérieures à 750 ppm.

ANNEXE II

1. DÉTECTION ET IDENTIFICATION DES ANTIBIOTIQUES DU GROUPE DES TÉTRACYCLINES

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de déceler et d'identifier les antibiotiques du groupe des tétracyclines dans les aliments qui en contiennent au moins 0,1 ppm, les concentrats et les prémélanges.

2. Principe

L'échantillon est soumis à l'extraction par un mélange de méthanol et d'acide chlorhydrique. L'extrait est chromatographié sur papier par voie ascendante comparativement à des solutions de référence. Les antibiotiques sont décelés et identifiés par comparaison de leurs valeurs R_f avec celles des substances étalon, soit par fluorescence en lumière UV (fortes teneurs en antibiotiques), soit par bioautographie sur milieu gélosé inoculé avec *B. cereus*.

3. Réactifs et milieu de culture

3.1 Tampon, pH 3,5

Acide citrique monohydraté p.a.	10,256 g
Phosphate disodique $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a.	7,45 g
Acétone p.a.	300 ml
Eau distillée ad	1000 ml

3.2 Tampon phosphate, pH 5,5

Phosphate monopotassique KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Phosphate disodique $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a.	6,947 g
Eau distillée ad	1000 ml

3.3 Éluant I: Mélange nitrométhane pur/chloroforme pur/ α — dichlorhydrine: 20/10/1,5 en volume. Préparer au moment de l'emploi.

3.4 Éluant II: Mélange nitrométhane pur/chloroforme pur/ α -picoline: 20/10/3 en volume. Préparer au moment de l'emploi.

3.5 Mélange méthanol pur/acide chlorhydrique (d : 1,19) : 98/2 en volume.

3.6 Acide chlorhydrique 0,1 N.

3.7 Ammoniaque, d : 0,91.

3.8 Substances étalon: chlortétracycline, oxytétracycline, tétracycline dont l'activité est exprimée en chlorhydrate.

3.9 Microorganisme: *B. cereus* ATCC n° 11.778

Entretien de la souche, préparation de la suspension de spores et inoculation du milieu de culture: appliquer les prescriptions 3.1 et 3.2 de la méthode de dosage de la chlortétracycline, de l'oxytétracycline et de la tétracycline, par diffusion sur gélose, faisant l'objet de la partie 2 de la présente annexe.

3.10 Milieu de culture ⁽¹⁾

Glucose	1 g
Peptone trypsique	10 g
Extrait de viande	1,5 g
Extrait de levure	3 g
Gélose	20 g
Eau distillée ad	1000 ml
Ajuster le pH à 5,8 au moment de l'emploi.	

3.11 Solution à 0,1 % (p/v) de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium et 5 % (p/v) de glucose.

4. Appareillage

4.1 Appareillage pour chromatographie ascendante sur papier (hauteur du papier: 25 cm).
Papiers Schleicher et Schüll 2040 b ou 2043 b, ou équivalents.

4.2 Centrifugeuse.

4.3 Étuve à incubation, réglée à 30 °C.

4.4 Lampe UV pour détection de la fluorescence.

4.5 Plaques de verre de 20×30 cm environ, permettant le montage d'une boîte plate pour la bioautographie.

5. Solutions étalon

5.1 Solutions-mère

Préparer, à partir des substances étalon (3.8) et à l'aide d'acide chlorhydrique (3.6), des solutions dont la concentration correspond respectivement à 500 µg de chlortétracycline-HCl, d'oxytétracycline-HCl et de tétracycline-HCl par ml.

5.2 Solutions de référence pour la détection en lumière UV

Diluer les solutions (5.1) par le tampon phosphate (3.2) pour obtenir des solutions dont la concentration correspond à 100 µg de chlortétracycline-HCl, d'oxytétracycline-HCl et de tétracycline-HCl par ml.

5.3 Solutions de référence pour la détection par bioautographie

Diluer les solutions (5.1) par le tampon phosphate (3.2) pour obtenir des solutions dont la concentration correspond à 5 µg de chlortétracycline-HCl, d'oxytétracycline-HCl et de tétracycline-HCl par ml.

6. Extraction

Lorsque la teneur présumée en antibiotique est inférieure à 10 ppm, on peut utiliser soit l'échantillon homogénéisé, soit la fraction la plus fine séparée par tamisage, étant donné que les antibiotiques se trouvent de préférence dans cette fraction.

Mettre l'échantillon en suspension dans le mélange (3.5) et centrifuger. Recueillir le liquide surnageant pour l'utiliser tel quel ou le diluer, si nécessaire, par le mélange (3.5) pour obtenir des concentrations en antibiotique de 100 µg (6.1) et 5 µg (6.2) environ par ml.

7. Détection et identification

7.1 Chromatographie

Plonger le papier dans la solution tampon, pH 3,5 (3.1). Éliminer l'excès de liquide en comprimant le papier entre des feuilles de papier filtre sec. Déposer ensuite sur le papier des

⁽¹⁾ Tout milieu de culture commercial de composition analogue et donnant les mêmes résultats peut être utilisé

volumes de 0,01 ml des solutions de référence (5.2 et 5.3) et de l'extrait (6.1 et 6.2). Pour obtenir une bonne séparation, la teneur appropriée en humidité du papier est déterminante; le cas échéant, laisser sécher légèrement.

Développer par chromatographie ascendante. Utiliser l'éluant I (3.3) pour la détection par bioautographie, l'éluant II (3.4) pour la détection en lumière UV. Lorsque le front de solvant atteint 15 à 20 cm de haut (environ 1 h 30), interrompre la chromatographie et sécher le papier.

7.2 Détection en lumière UV

Lorsque la teneur en antibiotique est supérieure à $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, on perçoit des taches fluorescentes jaune or par irradiation sous la lampe UV (4.4) après traitement du chromatogramme par des vapeurs ammoniacales (3.7).

7.3 Détection par bioautographie

Verser le milieu de culture (3.10), préalablement inoculé par *B. cereus* (3.9), sur des plaques de verre (4.5) et poser le papier sur le milieu de culture. Après 5 minutes de contact, détacher le papier et poser celui-ci sur un autre endroit du milieu de culture, où il sera maintenu durant la période d'incubation. Incuber ensuite durant une nuit à l'étuve à 30°C . La présence d'un antibiotique du groupe des tétracyclines se marque par des zones d'inhibition claires dans le milieu de culture trouble.

Pour fixer le chromatogramme, on vaporise la solution (3.11) sur le papier, après incubation.

7.4 Identification

Les valeurs R_f relatives des antibiotiques du groupe des tétracyclines sont données ci-après. Ces valeurs peuvent varier légèrement selon la qualité du papier et sa teneur en humidité.

Chlortétracycline (CTC)	0,60
Tétracycline (TC)	0,40
Oxytétracycline (OTC)	0,20
4-épi-CTC	0,15
4-épi-TC	0,13
4-épi-OTC	0,10

Les composés « épi » ont une activité antibiotique inférieure à celle des composés normaux.

2. DOSAGE DE LA CHLORTÉTTRACYCLINE, DE L'OXYTÉTTRACYCLINE ET DE LA TÉTRACYCLINE

A. PAR DIFFUSION SUR GÉLOSE

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de doser la chlortétracycline (CTC), l'oxytétracycline (OTC) et la tétracycline (TC) dans les aliments, les concentrats et les prélemanges. La limite inférieure du dosage est de 5 ppm. Les teneurs inférieures à 5 ppm peuvent être estimées par interpolation graphique.

2. Principe

Pour les teneurs égales ou inférieures à 50 ppm, l'échantillon est soumis à l'extraction par la formamide diluée. Pour les teneurs supérieures à 50 ppm, il est soumis à l'extraction par un mélange d'acétone, d'eau et d'acide chlorhydrique pour le dosage de la CTC et par un mélange de méthanol et d'acide chlorhydrique pour le dosage de l'OTC et de la TC.

Les extraits sont ensuite dilués et leur activité antibiotique est déterminée par la mesure de la diffusion de la CTC, de l'OTC ou de la TC dans un milieu gélosé ensemencé avec *B. cereus*. La diffusion est indiquée par la formation de zones d'inhibition en présence du microorganisme. Le diamètre de ces zones est directement proportionnel au logarithme de la concentration de l'antibiotique.

3. Microorganisme: *B. cereus* ATCC n° 11.778

3.1 Entretien de la souche

Inoculer *B. cereus* sur gélose inclinée en tube constituée par le milieu de culture (4.1), exempt de bleu de méthylène et d'acide borique. Incuber durant une nuit à 30 °C environ. Conserver la culture en réfrigérateur et repiquer tous les 14 jours sur gélose inclinée.

3.2 Préparation de la suspension de spores

Récolter les germes d'un tube de gélose inclinée (3.1) à l'aide de 2 à 3 ml de sérum physiologique (4.5). Ensemencer avec cette suspension un flacon de Roux contenant 300 ml du milieu de culture (4.1), exempt de bleu de méthylène et d'acide borique, dont la concentration en gélose est de 3 à 4 %. Incuber 3 à 5 jours à 28-30 °C, récolter ensuite les spores dans 15 ml d'éthanol (4.6), après avoir vérifié la sporulation sous le microscope, et homogénéiser. Cette suspension peut être conservée en réfrigérateur durant 5 mois au moins.

Par des essais préliminaires sur plaques avec le milieu de base du dosage (4.1), déterminer la quantité d'inoculum permettant d'obtenir pour les différentes concentrations d'antibiotique utilisées, des zones d'inhibition aussi étendues que possible et qui soient encore nettes. Cette quantité est généralement de 0,2 à 0,3 ml/1000 ml. L'inoculation du milieu de culture se fait entre 50 et 60 °C.

4. Milieux de culture et réactifs

4.1 Milieu de base du dosage ⁽¹⁾

Glucose	1 g
Peptone tryptique	10 g
Extrait de viande	1,5 g
Extrait de levure	3 g
Gélose, selon la quantité	10 à 20 g
Tween 80	1 ml
Tampon phosphate, pH 5,5 (4.2)	10 ml
Solution à 5 % (p/v) d'acide borique	15 ml
Solution éthanolique à 0,5 % de bleu de méthylène	4 ml
Eau distillée ad	1000 ml

Ajuster à pH 5,8 avant l'emploi

4.2 Tampon phosphate, pH 5,5

Phosphate monopotassique KH_2PO_4 p.a.	130,86 g
Phosphate disodique $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a.	6,947 g
Eau distillée ad	1000 ml

4.3 Tampon phosphate, pH 5,5, dilué à 1/10

4.4 Tampon phosphate, pH 8

Phosphate monopotassique KH_2PO_4 p.a.	1,407 g
Phosphate disodique $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a.	57,539 g
Eau distillée ad	1000 ml

4.5 Sérum physiologique stérile

4.6 Éthanol à 20 % (v/v)

4.7 Acide chlorhydrique 0,1 N

⁽¹⁾ Tout milieu de culture commercial de composition analogue et donnant les mêmes résultats peut être utilisé.

- 4.8 Formamide à 70 % (v/v): préparer fraîchement avant l'emploi et ajuster le pH 4,5 à l'aide d'acide sulfurique 2 N environ.
- 4.9 Mélange acétone pur/eau/acide chlorhydrique (d : 1,19) : 65/33/2 en volume.
- 4.10 Mélange méthanol pur/acide chlorhydrique (d : 1,19) : 98/2 en volume.
- 4.11 Substances étalon: CTC, OTC, TC dont l'activité est exprimée en chlorhydrate.

5. Solutions étalon

5.1 Chlortétracycline

Préparer, à partir de la substance étalon (4.11) et à l'aide d'acide chlorhydrique (4.7), une solution-mère dont la concentration correspond à 500 μg de chlortétracycline-HCl¹ par ml. Cette solution se conserve une semaine en réfrigérateur.

A partir de cette solution-mère, préparer une solution étalon de travail S_8 dont la concentration correspond à 0,2 μg de chlortétracycline-HCl par ml. La dilution est faite à l'aide du tampon phosphate, pH 5,5 dilué à 1/10 (4.3), additionné de 0,01 % de noir amido⁽¹⁾.

Préparer ensuite par dilutions successives (1+1) à l'aide du tampon (4.3), les concentrations suivantes:

S_4	0,1	$\mu\text{g/ml}$
S_2	0,05	$\mu\text{g/ml}$
S_1	0,025	$\mu\text{g/ml}$

5.2 Oxytétracycline

En procédant comme indiqué en 5.1, préparer, à partir d'une solution-mère dont la concentration correspond à 400 μg d'oxytétracycline-HCl par ml, une solution étalon de travail S_8 à 1,6 μg d'oxytétracycline-HCl par ml et les concentrations suivantes:

S_4	0,8	$\mu\text{g/ml}$
S_2	0,4	$\mu\text{g/ml}$
S_1	0,2	$\mu\text{g/ml}$

5.2 Tétracycline

En procédant comme indiqué en 5.1, préparer, à partir d'une solution-mère dont la concentration correspond à 500 μg de tétracycline-HCl par ml, une solution étalon de travail S_8 à 1,0 μg de tétracycline-HCl par ml et les concentrations suivantes:

S_4	0,5	$\mu\text{g/ml}$
S_2	0,25	$\mu\text{g/ml}$
S_1	0,125	$\mu\text{g/ml}$

6. Extraction

6.1 Teneurs égales ou inférieures à 50 ppm

Traiter la prise d'essai par la formamide (4.8), selon les indications données dans le tableau ci-dessous. Agiter durant 30 minutes sur table à secousses. Diluer immédiatement après à l'aide du tampon phosphate (4.3), selon les indications données dans le tableau ci-dessous, pour obtenir la concentration U_8 . La concentration en formamide de cette solution ne doit pas dépasser 40 %. Centrifuger ou laisser décanter de manière à obtenir une solution limpide.

Préparer ensuite les concentrations U_4 , U_2 et U_1 par dilutions successives (1+1) à l'aide du tampon phosphate (4.3).

⁽¹⁾ Le noir amido sert à caractériser les zones d'inhibition des solutions étalon (anneaux bleus).

Antibiotique	CTC		OTC		TC	
Teneur présumée en ppm	10	50	10	50	10	50
Prise d'essai en g	10	10	24	9,6	20	10
ml de formamide (4.8)	100	100	80	100	80	100
ml de tampon phosphate (4.3)	dil. 1 : 5 (a)	dil. 1 : 25 (b)	70	200	120	dil. 1 : 5 (a)
Concentration U_8 en $\mu\text{g/ml}$	0,2	0,2	1,6	1,6	1,0	1,0

(a) Prélever 20 ml d'extrait et compléter à 100 ml par le tampon dans un ballon jaugé.

(b) Prélever 4 ml d'extrait et compléter à 100 ml par le tampon dans un ballon jaugé.

6.2 Teneurs supérieures à 50 ppm

6.2.1 Chlortétracycline

Traiter, selon la teneur présumée en antibiotique de l'échantillon ou sa garantie de fabrication, une prise d'essai de 2 à 10 g par 20 fois son volume de mélange (4.9). Agiter durant 30 minutes sur table à secousses. Vérifier que le pH reste inférieur à 3 au cours de l'extraction; si nécessaire, ajuster à pH 3 (pour les composés minéraux, à l'aide d'acide acétique à 10%). Prélever une partie aliquote de l'extrait et ajuster le pH à 5,5 à l'aide du tampon phosphate, pH 8 (4.4) en présence de vert de bromocrésol (virage du jaune au bleu). Diluer à l'aide du tampon phosphate, pH 5,5 dilué à 1/10 (4.3) pour obtenir la concentration U_8 (v. 6.1).

Préparer ensuite les concentrations U_4 , U_2 et U_1 par dilutions successives (1+1) à l'aide du tampon phosphate (4.3).

6.2.2 Oxytétracycline et tétracycline

Procéder comme indiqué en 6.2.1 en remplaçant le mélange (4.9) par le mélange (4.10).

7. Modalités du dosage

7.1 Inoculation du milieu de culture

Inoculer à 50-60 °C le milieu de base du dosage (4.1) par la suspension de spores (3.2).

7.2 Préparation des boîtes

La diffusion sur gélose s'effectue dans des boîtes avec les 4 concentrations de la solution étalon (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) et les 4 concentrations de l'extrait (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Chaque boîte doit recevoir les 4 concentrations de l'étalon et de l'extrait.

A cet effet, choisir les dimensions des boîtes de telle sorte qu'on puisse pratiquer dans le milieu gélosé au moins 8 cavités de 10 à 13 mm de diamètre. Calculer la quantité de milieu de culture inoculé (7.1) à utiliser de façon à obtenir un recouvrement uniforme de 2 mm environ d'épaisseur. Il est préférable d'utiliser comme boîtes des plaques de verre planes munies d'un anneau d'aluminium ou de matière plastique parfaitement plan de 200 mm de diamètre et 20 mm de hauteur.

Introduire à la pipette dans les cavités des quantités exactement mesurées de solution d'antibiotique comprises entre 0,10 et 0,15 ml, selon le diamètre.

Pour chaque échantillon, faire au moins 4 répétitions de diffusion avec chaque concentration, de sorte que chaque dosage fasse l'objet d'une évaluation de 32 zones d'inhibition.

7.3 Incubation

Incuber les boîtes durant 18 h environ à 28-30 °C.

6. Évaluation

Mesurer le diamètre des zones d'inhibition, de préférence par projection. Incrire les mesures sur papier semi-logarithmique, en portant le logarithme des concentrations en regard des diamètres des zones d'inhibition. Tracer les droites de la solution étalon et de l'extrait. En l'absence d'interférences, les deux droites doivent être parallèles.

Le logarithme de l'activité relative est calculé par la formule suivante:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Activité réelle = activité présumée $\times$ activité relative.

9. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon ne doit pas dépasser 10 %, en valeur relative.

B. PAR TURBIDIMÉTRIE

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de doser la chlortétracycline (CTC), l'oxytétracycline (OTC) et la tétracycline (TC) aux concentrations supérieures à 1 g/kg, dans la mesure où aucune autre substance n'interfère en donnant lieu à des extraits troubles. Cette méthode est plus rapide que la méthode par diffusion sur gélose.

2. Principe

L'échantillon est soumis à l'extraction par un mélange d'acétone, d'eau et d'acide chlorhydrique pour le dosage de la CTC et par un mélange de méthanol et d'acide chlorhydrique pour le dosage de l'OTC et de la TC.

Les extraits sont ensuite dilués et leur effet antibiotique est déterminé par la mesure de la transmission lumineuse d'un milieu de culture ensemencé avec *Staphylococcus aureus* et additionné de l'antibiotique. La transmission lumineuse est fonction de la concentration de l'antibiotique.

3. Microorganisme: *Staphylococcus aureus* K 141 ⁽¹⁾

3.1 Entretien de la souche

Inoculer *S. aureus* sur gélose inclinée en tube constituée par le milieu de culture (4.1), additionné de 1,5 à 3 % de gélose (selon la qualité). Incuber durant une nuit à 37 °C. Conserver la culture en réfrigérateur et repiquer toutes les 4 semaines sur gélose inclinée. Préparer simultanément des sous-cultures pour l'usage de laboratoire.

3.2 Préparation de l'inoculum

24 h avant son utilisation, repiquer une sous-culture sur gélose inclinée et incuber durant une nuit à 37 °C. Mettre en suspension la totalité de la culture d'un tube de gélose dans 2 ml environ du milieu de base (4.1) et transvaser ensuite la suspension dans des conditions stériles dans 100 ml environ du même milieu de base (4.1). Incuber au bain d'eau à 37 °C, jusqu'à ce que la croissance de la souche entre dans sa phase logarithmique (1 h 30 à 2 h).

⁽¹⁾ Cette souche, isolée par la LUFA à Kiel, accuse une croissance plus rapide que *S. aureus* ATCC 6538 P.

4. Milieux de culture et réactifs

4.1 Milieu de base du dosage ⁽¹⁾

Peptone	5 g
Extrait de levure	1,5 g
Extrait de viande	1,5 g
Chlorure de sodium	3,5 g
Glucose	1,0 g
Phosphate monopotassique KH_2PO_4 p.a.	1,32 g
Phosphate bipotassique K_2HPO_4 p.a.	3,68 g
Eau distillée ad	1000 ml
pH après stérilisation: 6,8 à 7,0	

4.2 Tampon phosphate, pH 4,5

Phosphate monopotassique KH_2PO_4 p.a.	13,6 g
Eau distillée ad	1000 ml

4.3 Acide chlorhydrique 0,1 N

4.4 Mélange acétone pur/eau/acide chlorhydrique (d: 1,19): 65/33/2 en volume.

4.5 Mélange méthanol pur/acide chlorhydrique (d: 1,19) : 98/2 en volume.

4.6 Solution à 10 % environ (p/v) de formaldéhyde.

4.7 Substances étalon: OTC, OTC, TC dont l'activité est exprimée en chlorhydrate.

5. Solution étalon

Préparer, à partir de la substance étalon (4.7) et à l'aide d'acide chlorhydrique (4.3) une solution-mère dont la concentration correspond à 400 à 500 μg de CTC-HCl, OTC-HCl ou TC-HCl par ml. Cette solution se conserve une semaine en réfrigérateur.

6. Extraction

6.1 Chlortétracycline

Introduire dans un ballon jaugé de 200 ou 250 ml une prise d'essai de 1 à 2 g. Ajouter 100 ml environ du mélange (4.4) et agiter durant 30 minutes sur table à secousses. Compléter au volume par le tampon phosphate, pH 4,5 (4.2). Homogénéiser et laisser déposer.

6.2 Oxytétracycline et tétracycline

Introduire dans un ballon jaugé de 200 ou 250 ml une prise d'essai de 1 à 2 g. Ajouter 100 ml environ du mélange (4.5) et agiter durant 30 minutes sur table à secousses. Compléter au volume par le tampon phosphate, pH 4,5 (4.2). Homogénéiser et laisser déposer.

7. Modalités du dosage

7.1 Préparation de séries étalon et de l'extrait

Diluer de façon appropriée à l'aide du tampon phosphate, pH 4,5 (4.2) la solution étalon (5) et l'extrait (6) de manière à obtenir une série de concentrations qui permette d'établir, pour chaque dosage, une courbe d'étalonnage et l'interpolation sur cette courbe d'au moins deux valeurs relatives à l'extrait. Les dilutions doivent être choisies en fonction des conditions de croissance de la souche, qui peuvent varier d'un laboratoire à l'autre. On procède généralement comme suit:

⁽¹⁾ Tout milieu de culture commercial de composition analogue et donnant les mêmes résultats peut être utilisé.

7.1.1 *Chlortétracycline*

Diluer la solution étalon (5) à l'aide du tampon phosphate (4.2) pour obtenir une solution étalon de travail dont la concentration corresponde à $0,2 \mu\text{g}$ de CTC-HCl par ml. Préparer ensuite à l'aide du tampon phosphate (4.2), comme indiqué ci-après et dans des tubes destinés au dosage, 6 dilutions avec une répétition de chaque dilution.

ml de solution étalon de travail	ml de tampon phosphate (4.2)	Concentration en CTC-HCl ($\mu\text{g/ml}$)
0,7	0,3	0,14
0,6	0,4	0,12
0,55	0,45	0,11
0,45	0,55	0,09
0,4	0,6	0,08
0,3	0,7	0,06

Diluer l'extrait (6.1) à l'aide du tampon phosphate (4.2) pour obtenir une concentration présumée en CTC-HCl de $0,12 \mu\text{g/ml}$. Introduire 1 ml de cette solution dans 2 tubes et $0,75 \text{ ml}$ ($= 0,09 \mu\text{g}$) dans 2 autres tubes. Compléter le volume des 2 derniers tubes à 1 ml par le tampon phosphate (4.2).

7.1.2 *Oxytétracycline et tétracycline*

Diluer la solution étalon (5) à l'aide du tampon phosphate (4.2) pour obtenir une solution étalon de travail dont la concentration corresponde à $0,6 \mu\text{g}$ d'OTC-HCl ou de TC-HCl par ml. Préparer ensuite à l'aide du tampon phosphate (4.2) comme indiqué ci-après et dans des tubes destinés au dosage, 7 dilutions avec une répétition de chaque dilution.

ml de solution étalon de travail	ml de tampon phosphate (4.2)	Concentration en OTC-HCl ou TC-HCl ($\mu\text{g/ml}$)
0,9	0,1	0,54
0,8	0,2	0,48
0,7	0,3	0,42
0,6	0,4	0,36
0,4	0,6	0,24
0,3	0,7	0,18
0,2	0,8	0,12

Diluer l'extrait (6.2) par le tampon phosphate (4.2) pour obtenir une concentration présumée en OTC-HCl ou TC-HCl de $0,48 \mu\text{g/ml}$. Introduire 1 ml de cette solution dans 2 tubes et $0,5 \text{ ml}$ ($= 0,24 \mu\text{g}$) dans 2 autres tubes. Compléter le volume des 2 derniers tubes à 1 ml par le tampon phosphate (4.2).

7.2 *Inoculation du milieu de culture*

Inoculer le milieu de base du dosage (4.1) par l'inoculum (3.2) de manière à obtenir au photomètre à 590 nm une transmission lumineuse de 85 % dans une cuvette de 5 cm ou de 92 % dans une cuvette de 2 cm, l'appareil étant réglé à 100 % de transmission sur le milieu de base (4.1) non inoculé.

7.3 *Ensemencement*

Introduire dans chaque tube (7.1.1 ou 7.1.2) 9 ml du milieu de culture inoculé (7.2). Le remplissage des tubes doit se faire proprement, mais pas nécessairement dans des conditions stériles.

7.4 *Incubation*

L'incubation doit se faire obligatoirement dans un bain d'eau dont la température est maintenue homogène à $37^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ par agitation. Le temps d'incubation doit être choisi de manière à pouvoir tracer des courbes de transmission dont la pente est appropriée à des mesures précises (généralement 2 h 30 à 3 h). Bloquer ensuite la croissance en injectant rapidement 1 ml de solution de formaldéhyde (4.6) dans chaque tube.

7.5 Mesure de la croissance

Mesurer les transmissions au photomètre à 590 nm, en réglant l'appareil à 100 % de transmission sur la solution étalon la plus limpide (correspondant à la teneur la plus élevée en antibiotique). En raison des faibles différences de turbidité présentées par les différents tubes, il est recommandé d'utiliser des cuvettes de 2 cm au moins et, de préférence, de 5 cm.

8. Calcul des résultats

Tracer graphiquement la courbe d'étalonnage sur papier millimétré en portant les transmissions photométriques en regard des concentrations en antibiotique. Interpoler sur la courbe les transmissions relatives à l'extrait. Calculer la teneur en antibiotique de l'échantillon.

9. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon ne doit pas dépasser 10 %, en valeur relative.

3. DOSAGE DE L'OLÉANDOMYCINE

— par diffusion sur gélose —

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de doser l'oléandomycine dans les aliments, les concentrats et les prémélanges, même en présence de tétracyclines. La limite inférieure du dosage est de 0,5 ppm.

2. Principe

L'échantillon est soumis à l'extraction par une solution méthanolique diluée de tris (hydroxyméthyl) aminométhane. Après centrifugation, l'extrait est dilué et son activité antibiotique est déterminée par la mesure de la diffusion de l'oléandomycine dans un milieu gélosé ensemencé avec *B. cereus*. La diffusion est indiquée par la formation de zones d'inhibition en présence du microorganisme. Le diamètre de ces zones est directement proportionnel au logarithme de la concentration de l'antibiotique.

3. Microorganisme: *B. cereus* K 250 TR ⁽¹⁾ (résistant aux tétracyclines)

3.1 Entretien de la souche

Inoculer *B. cereus* sur gélose inclinée en tube constituée par le milieu de culture (4.1) et additionnée de 100 µg d'oxytétracycline par 5 ml. Incuber durant une nuit à 30 °C environ. Conserver la culture en réfrigérateur et repiquer toutes les 4 semaines sur gélose inclinée.

3.2 Préparation de la suspension de spores

Récolter les germes d'un tube de gélose inclinée (3.1) à l'aide de 3 ml environ du sérum physiologique (4.3). Ensemencer avec cette suspension un flacon de Roux contenant 300 ml du milieu de culture (4.1) dont la concentration en gélose est de 3 à 4 %. Incuber 3 à 5 jours à 28-30 °C, récolter ensuite les spores dans 15 ml d'éthanol (4.4), après avoir vérifié la sporulation sous le microscope, et homogénéiser. Cette suspension peut être conservée en réfrigérateur durant 5 mois au moins.

Par des essais préliminaires sur plaques avec le milieu de base du dosage (4.2), déterminer la quantité d'inoculum permettant d'obtenir pour les différentes concentrations d'oléandomycine utilisées, des zones d'inhibition aussi étendues que possible et qui soient encore nettes. Cette quantité est généralement de 0,1 à 0,2 ml/1000 ml. L'inoculation du milieu de culture se fait à 60 °C.

⁽¹⁾ Souche isolée par la LUFA à Kiel.

4. Milieux de culture et réactifs

4.1 Milieu d'entretien de la souche ⁽¹⁾

Glucose	1 g
Peptone tryptique	10 g
Extrait de viande	1,5 g
Extrait de levure	3 g
Gélose, selon la qualité	10 à 20 g
Eau distillée ad	1000 ml
Ajuster le pH à 6,5 au moment de l'emploi	

4.2 Milieu de base du dosage ⁽¹⁾

Milieu (4.1) ajusté à pH 8,8

4.3 Sérum physiologique stérile

4.4 Éthanol à 20 % (v/v)

4.5 Méthanol, pur

4.6 Solution à 0,5 % (p/v) de tris (hydroxyméthyl) amino-méthane p.a.

4.7 Solution d'extraction

Méthanol, pur	50 ml
Eau distillée	50 ml
Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane p.a.	0,5 g

4.8 Substance étalon: oléandomycine d'activité connue.

5. Solution étalon

Dissoudre de la substance étalon (4.8) dans 5 ml de méthanol (4.5) et diluer par la solution (4.6) pour obtenir une concentration en oléandomycine de 100 µg/ml.

A partir de cette solution-mère, préparer en diluant par la solution (4.6) une solution étalon de travail S₈ contenant 0,1 µg d'oléandomycine par ml. Préparer ensuite par dilutions successives (1+1) à l'aide de la solution (4.6) les concentrations suivantes:

S ₄	0,05	µg/ml
S ₂	0,025	µg/ml
S ₁	0,0125	µg/ml

6. Extraction

Prélever, selon la teneur présumée en oléandomycine de l'échantillon, une prise d'essai de 2 à 10 g, ajouter 100 ml de la solution (4.7) et agiter durant 30 minutes sur table à secousses.

Centrifuger, prélever une partie aliquote de l'extrait et diluer par la solution (4.6) pour obtenir une concentration présumée en oléandomycine de 0,1 µg/ml (= U₈). Préparer ensuite les concentrations U₄, U₂ et U₁ par dilutions successives (1+1) à l'aide de la solution (4.6).

⁽¹⁾ Tout milieu de culture commercial de composition analogue et donnant les mêmes résultats peut être utilisé.

7. Modalités du dosage

7.1 Inoculation du milieu de culture

Inoculer à 60 °C le milieu de base du dosage (4.2) par la suspension de spores (3.2).

7.2 Préparation des boîtes

La diffusion sur gélose s'effectue dans des boîtes avec les 4 concentrations de la solution étalon (S_8, S_4, S_2, S_1) et les 4 concentrations de l'extrait (U_8, U_4, U_2, U_1). Chaque boîte doit recevoir nécessairement les 4 concentrations de l'étalon et de l'extrait.

A cet effet, choisir les dimensions des boîtes de telle sorte qu'on puisse pratiquer dans le milieu gélosé au moins 8 cavités de 10 à 13 mm de diamètre. Calculer la quantité du milieu de culture inoculé (7.1) à utiliser de façon à obtenir un recouvrement uniforme de 2 mm environ d'épaisseur. Il est préférable d'utiliser comme boîtes des plaques de verre planes munies d'un anneau d'aluminium ou de matière plastique parfaitement plan de 200 mm de diamètre et 20 mm de hauteur.

Introduire à la pipette dans les cavités des quantités exactement mesurées de solution d'antibiotique comprises entre 0,10 et 0,15 ml, selon le diamètre.

Pour chaque échantillon, faire au moins 4 répétitions de diffusion avec chaque concentration, de sorte que chaque dosage fasse l'objet d'une évaluation de 32 zones d'inhibition.

7.3 Incubation

Incuber les boîtes durant 18 h environ à 28-30 °C.

8. Évaluation

Mesurer le diamètre des zones d'inhibition, de préférence, par projection. Inscrire les mesures sur papier semi-logarithmique, en portant le logarithme des concentrations en regard des diamètres des zones d'inhibition. Tracer les droites de la solution étalon et de l'extrait. En l'absence d'interférences, les deux droites doivent être parallèles.

Le logarithme de l'activité relative est calculé par la formule suivante:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Activité réelle = activité présumée $\times$ activité relative.

9. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon ne doit pas dépasser 10 % m, en valeur relative.

4. DOSAGE DE LA TYLOSINE

— par diffusion sur gélose —

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de doser la tylosine dans les aliments, les concentrats et les prémélanges. La limite inférieure du dosage est de 2 ppm.

2. Principe

L'échantillon est traité par une solution tampon phosphate à pH 8, préalablement portée à 80 °C, et soumis ensuite à l'extraction par le méthanol. Après centrifugation, l'extrait est dilué et son activité antibiotique est déterminée par la mesure de la diffusion de la tylosine dans un milieu géloséensemencé avec *Sarcina lutea*. La diffusion est indiquée par la formation de zones d'inhibition en présence du microorganisme. Le diamètre de ces zones est directement proportionnel au logarithme de la concentration de l'antibiotique.

3. Microorganisme: *Sarcina lutea* ATCC n° 9341

3.1 Entretien de la souche

Inoculer *Sarcina lutea* sur gélose inclinée en tube constituée par le milieu de culture (4.1), ajusté à pH 7,0. Incuber durant une nuit à 35 °C environ. Conserver la culture en réfrigérateur et repiquer tous les mois sur gélose inclinée.

3.2 Préparation de la suspension de germes

Récolter les germes d'un tube de gélose inclinée (3.1) de préparation récente, par 2 à 3 ml de sérum physiologique (4.4). Ensemencer avec cette suspension un flacon de Roux contenant 250 ml du milieu de culture (4.1), ajusté à pH 7,0. Incuber durant 24 h à 35 °C, récolter les germes à l'aide de 25 ml de sérum physiologique (4.4). Homogénéiser et diluer cette suspension pour obtenir une transmission lumineuse de 75 % environ à 650 nm.

Conservée en réfrigérateur, cette suspension est utilisable durant une semaine.

Par des essais préliminaires sur plaques avec le milieu de base du dosage (4.1), déterminer la quantité d'inoculum permettant d'obtenir pour les différentes concentrations de tylosine utilisée des zones d'inhibition aussi étendues que possible et qui soient encore nettes. L'inoculation du milieu de culture se fait à 48—50 °C.

4. Milieux de culture et réactifs

4.1 Milieu de base du dosage ⁽¹⁾

Glucose	1 g
Peptone trypsique	10 g
Extrait de viande	1,5 g
Extrait de levure	3 g
Gélose, selon la qualité	10 à 20 g
Eau distillée ad	1000 ml

Ajuster au moment de l'emploi à pH 7,0 pour l'entretien de la souche et la préparation de la suspension de germes et à pH 2,0 pour le dosage.

4.2 Tampon phosphate, pH 8

Phosphate monopotassique KH_2PO_4 p.a.	0,523 g
Phosphate bipotassique K_2HPO_4 p.a.	16,730 g
Eau distillée ad	1000 ml

4.3 Tampon phosphate, pH 7

Phosphate monopotassique KH_2PO_4 p.a.	5,5 g
Phosphate bipotassique K_2HPO_4 p.a.	13,6 g
Eau distillée ad	1000 ml

4.4 Sérum physiologique stérile

4.5 Méthanol, pur

4.6 Méthanol à 10 % (v/v)

4.7 Mélange tampon phosphate (4.2)/méthanol pur: 60/40 en volume.

4.8 Substance étalon: tylosine connue.

⁽¹⁾ Tout milieu de culture commercial de composition analogue et donnant les mêmes résultats peut être utilisé.

5. Solutions étalon

Sécher la substance étalon (4.8) durant 3 h à 60 °C dans une étuve à vide (5 mm de mercure). Peser 10 à 50 mg dans un ballon jaugé, les dissoudre dans 5 ml de méthanol (4.5) et diluer la solution par le tampon phosphate, pH 7 (4.3) pour obtenir une concentration en tylosine-base de 1000 µg/ml.

A partir de cette solution-mère, préparer en diluant par le mélange (4.7) une solution étalon de travail S₈ contenant 2 µg de tylosine-base par ml.

Préparer ensuite par dilutions successives (1 + 1) à l'aide du mélange (4.7), les concentrations suivantes:

S ₄	1	µg/ml
S ₂	0,5	µg/ml
S ₁	0,25	µg/ml

6. Extraction

Prélever pour les concentrats une prise d'essai de 10 g; pour les prémélanges et les aliments une prise d'essai de 20 g. Ajouter 60 ml de tampon phosphate, pH 8 (4.2), préalablement portés à 80 °C, et homogénéiser durant 2 minutes (appareil ménager, Ultra-turrax, etc.).

Laisser ensuite reposer 10 minutes, ajouter 40 ml de méthanol (4.5) et homogénéiser durant 5 minutes. Centrifuger, prélever une partie aliquote de l'extrait et diluer par le mélange (4.7) pour obtenir une concentration présumée en tylosine de 2 µg/ml (= U₈). Préparer ensuite les concentrations U₄, U₂ et U₁ par dilutions successives (1 + 1) à l'aide du mélange (4.7).

Pour les teneurs inférieures à 10 ppm, évaporer l'extrait à sec dans un évaporateur rotatif à 35 °C et reprendre le résidu par du méthanol à 40 % (4.6).

7. Modalités du dosage

7.1 Inoculation du milieu de culture

Inoculer à 48—50 °C le milieu de base du dosage (4.1), ajusté à pH 8,0, par la suspension de germes (3.2).

7.2 Préparation des boîtes

La diffusion sur gélose s'effectue dans des boîtes avec les 4 concentrations de la solution étalon (S₈, S₄, S₂, S₁) et les 4 concentrations de l'extrait (U₈, U₄, U₂, U₁). Chaque boîte doit recevoir nécessairement les 4 concentrations de l'étalon et de l'extrait.

A cet effet, choisir les dimensions des boîtes de telle sorte qu'on puisse pratiquer dans le milieu gélosé au moins 8 cavités de 10 à 13 mm de diamètre. Calculer la quantité du milieu de culture inoculé (7.1) à utiliser de façon à obtenir un recouvrement uniforme de 2 mm environ d'épaisseur. Il est préférable d'utiliser comme boîtes des plaques de verre planes munies d'un anneau d'aluminium ou de matière plastique parfaitement plan de 200 mm de diamètre et 20 mm de hauteur.

Introduire à la pipette dans les cavités des quantités exactement mesurées de solution d'antibiotique comprise entre 0,10 et 0,15 ml, selon le diamètre.

Pour chaque échantillon, faire au moins 4 répétitions de diffusion avec chaque concentration, de sorte que chaque dosage fasse l'objet d'une évaluation de 32 zones d'inhibition.

7.3 Incubation

Incuber les boîtes durant une nuit à 35—37 °C.

8. Évaluation

Mesurer le diamètre des zones d'inhibition, de préférence, par projection. Inscire les mesures sur papier semi-logarithmique, en portant le logarithme des concentrations en regard des diamètres de zones d'inhibition. Tracer les droites de la solution étalon et de l'extrait. En l'absence d'interférences, les deux droites doivent être parallèles.

Le logarithme de l'activité relative est calculé par la formule suivante:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Activité réelle = activité présumée x activité relative.

9. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon ne doit pas dépasser 10 %, en valeur relative.

5. DOSAGE DE LA VIRGINIAMYCINE

— par diffusion sur gélose —

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet de doser la virginiamycine dans les aliments, les concentrats et les pré-mélanges. La limite inférieure du dosage est de 2 ppm.

2. Principe

L'échantillon est soumis à l'extraction par une solution méthanolique de Tween 80. Après centrifugation ou filtration, l'extrait est dilué et son activité antibiotique est déterminée par la mesure de la diffusion de la virginiamycine dans un milieu gélosé ensemencé avec *Sarcina lutea*. La diffusion est indiquée par la formation de zones d'inhibition en présence du micro-organisme. Le diamètre de ces zones est directement proportionnel au logarithme de la concentration de l'antibiotique.

3. Microorganisme: *Sarcina lutea* ATCC n° 9341

3.1 *Entreprise de la souche*

Inoculer *S. lutea* sur gélose inclinée en tube constituée par le milieu de culture (4.1). Incuber durant une nuit à 35 °C environ. Conserver la culture en réfrigérateur et repiquer tous les 14 jours sur gélose inclinée.

3.2 *Préparation de la suspension de germes*

Récolter les germes d'un tube de gélose inclinée (3.1), de préparation récente, par 2 à 3 ml de sérum physiologique (4.3). Ensemencer avec cette suspension un flacon de Roux contenant 250 ml du milieu de culture (4.1). Incuber durant 24 h à 35 °C, récolter les germes à l'aide de 25 ml de sérum physiologique (4.3). Homogénéiser et diluer cette suspension pour obtenir une transmission lumineuse de 75 % environ à 650 nm. Conservée en réfrigérateur, cette suspension est utilisable durant une semaine.

Par des essais préliminaires sur plaques avec le milieu de base du dosage (4.1), déterminer la quantité d'inoculum permettant d'obtenir pour les différentes concentrations de virginiamycine utilisées des zones d'inhibition aussi étendues que possible et qui soient encore nettes. L'inoculation du milieu de culture se fait à 48—50 °C.

4. Milieux de culture et réactifs

4.1 *Milieu de base du dosage* ⁽¹⁾

Glucose	1 g
Peptone tryptique	10 g
Extrait de viande	1,5 g
Extrait de levure	3 g
Gélose, selon la qualité	10 à 20 g
Eau distillée ad	1000 ml
Ajuster le pH à 6,5 avant l'emploi	

⁽¹⁾ Tout milieu de culture commercial de composition analogue et donnant les mêmes résultats peut être utilisé.

4.2 Tampon phosphate, pH 6

Phosphate monopotassique KH_2PO_4 p.a.	8,0 g
Phosphate bipotassique K_2HPO_4 p.a.	2,0 g
Eau distillée ad	1000 ml

4.3 Sérum physiologique stérile

4.4 Méthanol, pur

4.5 Mélange tampon phosphate (4.2)/méthanol pur : 80/20 en volume.

4.6 Solution méthanolique à 0,5 % (p/v) de Tween 80.

4.7 Substance étalon: virginiamycine d'activité connue.

5. Solution étalon

Préparer une solution méthanolique de substance étalon (4.7) à 800 μg de virginiamycine par ml. À partir de cette solution-mère, préparer en diluant par le mélange (4.5) une solution étalon de travail S_8 contenant 1 μg de virginiamycine par ml. Préparer ensuite par dilutions successives (1 + 1) à l'aide du mélange (4.5), les concentrations suivantes:

S_4	0,5 $\mu\text{g/ml}$
S_2	0,25 $\mu\text{g/ml}$
S_1	0,125 $\mu\text{g/ml}$

6. Extraction

6.1 Produits dont la teneur en virginiamycine est égale ou inférieure à 50 ppm

Prélever une prise d'essai de 10 à 20 g, ajouter 100 ml de la solution (4.6) et agiter durant 30 minutes sur table à secousses. Centrifuger ou filtrer, prélever 20 ml de la solution limpide et les évaporer à sec dans un évaporateur rotatif. Reprendre le résidu par 20 ml ou plus du mélange (4.5) pour obtenir une concentration présumée en virginiamycine de 1 $\mu\text{g/ml}$ ($= U_8$). Préparer ensuite les concentrations U_4 , U_2 et U_1 par dilutions successives (1 + 1) à l'aide du mélange (4.5).

6.2 Produits dont la teneur en virginiamycine est supérieure à 50 ppm

Prélever une prise d'essai de 1 à 10 g, ajouter 100 ml de la solution (4.6) et agiter durant 30 minutes sur table à secousses. Centrifuger ou filtrer et diluer ensuite par le mélange (4.5) pour obtenir une concentration présumée en virginiamycine de 1 $\mu\text{g/ml}$ ($= U_8$). Préparer ensuite les concentrations U_4 , U_2 et U_1 comme indiqué en 6.1.

7. Modalités de dosage

7.1 Inoculation du milieu de culture

Inoculer à 48—50 °C le milieu de base du dosage (4.1) par la suspension de germes (3.2).

7.2 Préparation des boîtes

La diffusion sur gélose s'effectue dans des boîtes avec les 4 concentrations de la solution étalon (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) et les 4 concentrations de l'extrait (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Chaque boîte doit recevoir nécessairement les 4 concentrations de l'étalon et de l'extrait.

À cet effet, choisir les dimensions des boîtes de telle sorte qu'on puisse pratiquer dans le milieu gélosé au moins 8 cavités de 10 à 13 mm de diamètre. Calculer la quantité du milieu de culture inoculé (7.1) à utiliser, de façon à obtenir un recouvrement uniforme de 2 mm environ d'épaisseur. Il est préférable d'utiliser comme boîtes des plaques de verre planes munies d'un anneau d'aluminium ou de matière plastique parfaitement plan de 200 mm de diamètre et 20 mm de hauteur.

Introduire à la pipette dans les cavités des quantités exactement mesurées de solution d'antibiotique comprises entre 0,10 et 0,15 ml, selon le diamètre.

Pour chaque échantillon, faire au moins 4 répétitions de diffusion avec chaque concentration, de sorte que chaque dosage fasse l'objet d'une évaluation de 32 zones d'inhibition.

7.3 Incubation

Incuber les boîtes durant 18 h environ à 28—30 °C.

8. Évaluation

Mesurer le diamètre des zones d'inhibition, de préférence, par projection. Inscrire les mesures sur papier semi-logarithmique, en portant le logarithme des concentrations en regard des diamètres des zones d'inhibition. Tracer les droites de la solution étalon et de l'extrait. En l'absence d'interférences, les deux droites doivent être parallèles.

Le logarithme de l'activité relative est calculé par la formule suivante:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Activité réelle = activité présumée x activité relative.

9. Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur le même échantillon ne doit pas dépasser 10 %, en valeur relative.

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 28 avril 1972

constatant que les conditions prévues pour la mobilisation de froment tendre destiné à une action nationale d'aide alimentaire sont remplies

(Le texte en langue italienne est le seul faisant foi)

(72/200/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu le règlement n° 120/67/CEE du Conseil, du 13 juin 1967, portant organisation commune des marchés dans le secteur des céréales ⁽¹⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2727/71 ⁽²⁾,

vu le règlement (CEE) n° 290/69 du Conseil, du 17 février 1969, fixant les critères de mobilisation des céréales destinées à l'aide alimentaire ⁽³⁾, modifié par le règlement (CEE) n° 832/69 ⁽⁴⁾, reconduit par les règlements (CEE) n° 2338/69 ⁽⁵⁾ et (CEE) n° 2046/70 ⁽⁶⁾, et notamment son article 4 paragraphe 1,

vu la communication de la République italienne, du 7 avril 1972, informant la Commission de son intention de réaliser une opération d'aide alimentaire à destination de la République tunisienne dans le cadre d'une action nationale au titre du programme d'aide alimentaire en céréales pour l'année 1970/1971 et de mobiliser à cette fin 30 000 tonnes de froment tendre provenant des stocks de l'Azienda di Stato per gli interventi nel Mercato Agricolo (AIMA),

considérant que l'organisme d'intervention italien détient des stocks de froment tendre provenant de la campagne précédente ;

considérant que les mesures prévues à la présente décision sont conformes à l'avis du Comité de gestion des céréales,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION :

Article premier

Il est constaté que les conditions prévues à l'article 2 paragraphe 2 du règlement (CEE) n° 290/69 sont remplies pour l'action nationale d'aide alimentaire que la République italienne compte entreprendre au cours des mois d'avril à septembre 1972, avec embarquements aux ports de la mer Adriatique et Tyrrhénienne, cette action portant sur la fourniture de 30 000 tonnes de froment tendre à mobiliser sur les stocks détenus par l'organisme d'intervention italien (AIMA).

Article 2

La République italienne est destinataire de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 28 avril 1972.

Par la Commission
Le président
S. L. MANSHOLT

⁽¹⁾ JO n° 117 du 19. 6. 1967, p. 2269/67.

⁽²⁾ JO n° L 282 du 23. 12. 1971, p. 8.

⁽³⁾ JO n° L 41 du 18. 2. 1969, p. 2.

⁽⁴⁾ JO n° L 107 du 6. 5. 1969, p. 3.

⁽⁵⁾ JO n° L 298 du 25. 11. 1969, p. 8.

⁽⁶⁾ JO n° L 228 du 15. 10. 1970, p. 1.

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 28 avril 1972

constatant que les conditions prévues pour la mobilisation de froment tendre destiné
à une action nationale d'aide alimentaire sont remplies

(Le texte en langue italienne est le seul faisant foi)

(72/201/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique
européenne,

vu le règlement n° 120/67/CEE du Conseil, du 13
juin 1967, portant organisation commune des mar-
chés dans le secteur des céréales ⁽¹⁾, modifié en der-
nier lieu par le règlement (CEE) n° 2727/71 ⁽²⁾,

vu le règlement (CEE) n° 290/69 du Conseil, du 17
février 1969, fixant les critères de mobilisation des
céréales destinées à l'aide alimentaire ⁽³⁾, modifié par
le règlement (CEE) n° 832/69 ⁽⁴⁾, reconduit par les
règlements (CEE) n° 2338/69 ⁽⁵⁾ et (CEE) n° 2046/
70 ⁽⁶⁾, et notamment son article 4 paragraphe 1,

vu la communication de la République italienne, du
13 avril 1972, informant la Commission de son in-
tention de réaliser une opération d'aide alimentaire
à destination de la République arabe égyptienne sous
forme de farine dans le cadre d'une action nationale
au titre du programme d'aide alimentaire en céréa-
les pour l'année 1970/1971 et de mobiliser à cette
fin 35 000 tonnes de froment tendre provenant des
stocks de l'Azienda di Stato per gli interventi nel Mer-
cato Agricolo (AIMA),

considérant que l'organisme d'intervention italien
détient des stocks de froment tendre provenant de la
campagne précédente;

considérant que les mesures prévues à la présente
décision sont conformes à l'avis du Comité de ges-
tion des céréales,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

Il est constaté que les conditions prévues à l'article 2
paragraphe 2 du règlement (CEE) n° 290/69 sont
remplies pour l'action nationale d'aide alimentaire
que la République italienne compte entreprendre au
cours des mois d'avril à juin 1972, avec embarque-
ments aux ports de la mer Adriatique et Tyrrhé-
nienne, cette action portant sur la fourniture de fa-
rine provenant de la transformation de 35 000 tonnes
de froment tendre à mobiliser sur les stocks détenus
par l'organisme d'intervention italien (AIMA).

Article 2

La République italienne est destinataire de la pré-
sente décision.

Fait à Bruxelles, le 28 avril 1972.

Par la Commission
Le président
S. L. MANSCHOLT

⁽¹⁾ JO n° 117 du 19. 6. 1967, p. 2269/67.

⁽²⁾ JO n° L 282 du 23. 12. 1971, p. 8.

⁽³⁾ JO n° L 41 du 18. 2. 1969, p. 2.

⁽⁴⁾ JO n° L 107 du 6. 5. 1969, p. 3.

⁽⁵⁾ JO n° L 298 du 25. 11. 1969, p. 8.

⁽⁶⁾ JO n° L 228 du 15. 10. 1970, p. 1.

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 2 mai 1972

modifiant la décision, du 21 janvier 1972, relative à l'ouverture d'une adjudication pour l'exportation de 50 000 tonnes de froment tendre détenues par l'organisme d'intervention allemand

(Le texte en langue allemande est le seul faisant foi)

(72/202/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu le règlement n° 120/67/CEE du Conseil, du 13 juin 1967, portant organisation commune des marchés dans le secteur des céréales ⁽¹⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2727/71 ⁽²⁾, et notamment son article 7 paragraphe 5,

vu le règlement (CEE) n° 376/70 de la Commission, du 27 février 1970, fixant les procédures et conditions de la mise en vente des céréales détenues par les organismes d'intervention ⁽³⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2647/70 ⁽⁴⁾, et notamment son article 5 paragraphes 1 et 7,

considérant que, par décision du 21 janvier 1972 ⁽⁵⁾, la Commission a décidé l'ouverture d'une adjudication permanente pour l'exportation de 50 000 tonnes de froment tendre détenues par l'organisme d'intervention allemand; que la dernière date à laquelle les offres peuvent être déposées a été fixée au 25 avril 1972;

considérant que les offres déposées jusqu'ici ont conduit à la vente d'environ 15 000 tonnes de froment tendre; que pour le solde, selon une information de la république fédérale d'Allemagne, des possibilités de vente existent pour les mois à venir;

considérant que les conditions ayant conduit à la décision du 21 janvier 1972 ne sont pas modifiées; qu'il est dès lors justifié de prolonger la date prévue pour la soumission des offres au 15 juillet 1972;

considérant que les mesures prévues à la présente décision sont conformes à l'avis du Comité de gestion des céréales,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

A l'article 4 de la décision de la Commission du 21 janvier 1972 les mots « 25 avril 1972 » sont remplacés par : « 15 juillet 1972 ».

Article 2

La république fédérale d'Allemagne est destinataire de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 2 mai 1972.

Par la Commission

Le président

S. L. MANSCHOLT

⁽¹⁾ JO n° 117 du 19. 6. 1967, p. 2269/67.

⁽²⁾ JO n° L 282 du 23. 12. 1971, p. 8.

⁽³⁾ JO n° L 47 du 28. 2. 1970, p. 49.

⁽⁴⁾ JO n° L 283 du 29. 12. 1970, p. 51.

⁽⁵⁾ JO n° L 33 du 7. 2. 1972, p. 19.

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 2 mai 1972

modifiant la décision, du 10 janvier 1972, relative à l'ouverture d'une adjudication pour l'exportation de 22 000 tonnes d'orge détenues par l'organisme d'intervention allemand

(Le texte en langue allemande est le seul faisant foi)

(72/203/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu le règlement n° 120/67/CEE du Conseil, du 13 juin 1967, portant organisation commune des marchés dans le secteur des céréales ⁽¹⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2727/71 ⁽²⁾, et notamment son article 7 paragraphe 5,

vu le règlement (CEE) n° 376/70 de la Commission, du 27 février 1970, fixant les procédures et conditions de la mise en vente des céréales détenues par les organismes d'intervention ⁽³⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2647/70 ⁽⁴⁾, et notamment son article 5 paragraphes 1 et 7,

considérant que, par décision du 10 janvier 1972 ⁽⁵⁾, la Commission a décidé l'ouverture d'une adjudication permanente pour l'exportation de 22 000 tonnes d'orge détenues par l'organisme d'intervention allemand; que la dernière date à laquelle les offres peuvent être déposées a été fixée au 26 avril 1972;

considérant que les offres déposées jusqu'ici n'ont pas encore conduit à la vente d'orge mise en adjudi-

cation; que, selon une information de la république fédérale d'Allemagne, des possibilités de vente existent pour les mois à venir;

considérant que les conditions ayant conduit à la décision du 10 janvier 1972 ne sont pas modifiées; qu'il est dès lors justifié de prolonger la date prévue pour la soumission des offres au 15 juillet 1972;

considérant que les mesures prévues à la présente décision sont conformes à l'avis du Comité de gestion des céréales,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

A l'article 4 de la décision de la Commission du 10 janvier 1972 les mots « 26 avril 1972 » sont remplacés par : « 15 juillet 1972 ».

Article 2

La république fédérale d'Allemagne est destinataire de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 2 mai 1972.

Par la Commission
Le président
S. L. MANSOLT

⁽¹⁾ JO n° 117 du 19. 6. 1967, p. 2269/67.

⁽²⁾ JO n° L 282 du 23. 12. 1971, p. 8.

⁽³⁾ JO n° L 47 du 28. 2. 1970, p. 49.

⁽⁴⁾ JO n° L 283 du 29. 12. 1970, p. 51.

⁽⁵⁾ JO n° L 26 du 31. 1. 1972, p. 20.

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 2 mai 1972

autorisant la République italienne à exclure du traitement communautaire les roulements de tous genres (à billes, à aiguilles, à galets ou à rouleaux de toute forme), de la position 84.62 du tarif douanier commun, originaires des pays de l'Est et mis en libre pratique dans les autres États membres

(Le texte en langue italienne est le seul faisant foi)

(72/204/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne et notamment son article 115 premier alinéa,

vu le recours à l'article 115 premier alinéa du traité que le gouvernement italien a introduit auprès de la Commission par télex de sa représentation permanente auprès des Communautés européennes, le 27 avril 1972, en vue d'être autorisé à exclure du traitement communautaire les roulements de tous genres (à billes, à aiguilles, à galets ou à rouleaux de toute forme), de la position 84.62 du tarif douanier commun, originaires des pays de l'Est et mis en libre pratique dans les autres États membres,

considérant que les disparités dans les mesures de politique commerciale appliquées pour ces produits à l'égard des pays de l'Est par l'Italie, d'une part, et les autres États membres, d'autre part, provoquent des détournements de trafic;

considérant que ces détournements de trafic empêchent l'exécution des mesures de politique commerciale adoptées par l'Italie à l'égard des pays de l'Est;

considérant qu'il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de mettre en œuvre les méthodes par lesquelles les autres États membres apporteraient la coopération nécessaire;

considérant qu'il y a lieu d'autoriser, pour une période limitée, l'application de mesures de protection, au titre de l'article 115 premier alinéa, dans les conditions qui sont définies par la décision de la Commission du 12 mai 1971 notamment en son article 1^{er} ⁽¹⁾,

(1) JO n° L 121 du 3. 6. 1971.

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

La République italienne est autorisée à exclure du traitement communautaire les importations des produits suivants:

N° du tarif douanier commun	Désignation des produits
84.62	Roulements de tous genres (à billes, à aiguilles, à galets ou à rouleaux de toute forme)

originaires des pays de l'Est et mis en libre pratique dans les autres États membres, pour lesquelles la date de dépôt des demandes de titres d'importation est postérieure au 16 avril 1972.

Article 2

La présente décision est applicable jusqu'au 31 décembre 1972.

Article 3

La République italienne est destinataire de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 2 mai 1972.

Par la Commission
Le président
S. L. MANSHOLT

