Ce document constitue un outil de documentation et n'engage pas la responsabilité des institutions

►**B**

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)

(JO L 123 du 29.5.1972, p. 6)

Modifiée par:

		Journal officiel		
		nº	page	date
►**M1**	Directive 81/680/CEE de la Commission du 30 juillet 1981	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Directive 84/4/CEE de la Commission du 20 décembre 1983	L 15	28	18.1.1984
►**M3**	Directive 93/28/CEE de la Commission du 4 juin 1993	L 179	8	22.7.1993

Rectifiée par:

►**C1** Rectificatif, JO L 320 du 27.11.1980, p. 43 (72/199/CEE)

▼B

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, concernant l'introduction de modes de prélèvement d'échantillons 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 dispositions 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 nº 71/250/CEE et nº 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 effectués 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 permanent 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 et l'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 directive.

▼M1

▼B

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 antibiotiques du groupe des tétracyclines ainsi qu'en ce qui concerne les teneurs des aliments en chlortétracycline, oxytétracycline, tétracycline, oléandomycine, tylosine, virginiamycine sont effectuées selon les méthodes décrites à l'annexe II de la présente directive.

▼M1

▼B

Article 3

Les États membres mettent en vigueur, le 1er juillet 1973 au plus tard, les dispositions législatives, réglementaires ou administratives nécessaires pour se conformer aux dispositions de la présente directive. Ils en informent immédiatement la Commission.

([1]) JO nº L 170 du 3. 8. 1970, p. 2.
([2]) JO nº L 155 du 12. 7. 1971, p. 13.
([3]) JO nº L 279 du 20. 12. 1971, p. 7.

▼B

Article 4

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

▼B

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 $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ 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 $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Compléter à 100 ml avec de l'eau.

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

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 ºC.

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

▼B

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 ºC. 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*

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

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 %

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

+ 185,9º: amidon de riz

▼C1

+ 185,4º: amidon de pommes de terre

▼B

+ 184,6º: amidon de maïs

+ 182,7º: amidon de froment

+ 181,5º: amidon d'orge

+ 181,3º: amidon d'avoine

+ 184,0º: autres types d'amidons, ainsi que mélanges d'amidons des aliments composés

6.2 *Mesures effectuées au saccharimètre*

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

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 100º saccharimétriques.

16,29 g pour les saccharimètres français,

26,00 g pour les saccharimètres allemands,

20,00 g pour les saccharimètres mixtes.

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

▼B

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 ºC. Laisser ensuite refroidir et poursuivre l'analyse comme indiqué en 5.3.

▼M3

2. DOSAGE DES PROTÉINES BRUTES

1. **Objet et domaines d'application**

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

2. **Principe**

L'échantillon est minéralisé à l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur. La solution acide est alcalinisée par une solution d'hydroxyde de sodium. L'ammoniac 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

3.2 Catalyseur: oxyde cuivrique CuO p.a. ou sulfate cuivrique $CuSO_4.5H_2O$ p.a.

3.3 Zinc en granulés

3.4 Acide sulfurique, ρ_{20} = 1,84 g/ml

3.5 Acide sulfurique c(½H_2SO_4) = 0,5 mol/l

3.6 Acide sulfurique c(½H_2SO_4) = 0,1 mol/l

3.7 Indicateur au rouge de méthyle: dissoudre 300 g de rouge de méthyl dans 100 ml d'éthanol, σ = 95-96 % (v/v)

3.8 Solution d'hydroxyde de sodium (utilisation possible de la qualité technique) β = 40 g/100 ml (m/v: 40 %)

3.9 Solution d'hydroxyde de sodium c = 0,25 mol/l

3.10 Solution d'hydroxyde de sodium c = 0,1 mol/l

3.11 Pierre ponce en grains, lavée à l'acide chlorhydrique et calcinée

3.12 Acétanilide (point de fusion = 114 ºC, N = 10,36 %)

3.13 Saccharose (exempt d'azote)

4. **Appareillage**

Appareils permettant de réaliser les opérations de minéralisation, de distillation et de titration selon Kjeldahl.

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 de minéralisation. Ajouter 15 g de sulfate de potassium (3.1), une quantité appropriée de catalyseur (3.2) [0,3 à 0,4 g d'oxyde cuivrique (p.a.) ou 0,9 à 1,2 g de sulfate cuivrique (p.a.)], 25 ml d'acide sulfurique (3.4) et quelques grains de pierre ponce (3.11) et

▼M3

mélanger. Chauffer le ballon d'abord avec modération et en agitant de temps en temps, si nécessaire, jusqu'à carbonisation de la masse et disparition de l'écume; ensuite plus intensément jusqu'à ébullition régulière du liquide. Le chauffage est approprié si l'acide en ébullition se condense sur la paroi du ballon. Éviter la surchauffe des parois et l'adhérence de particules organiques. Lorsque la solution apparaît limpide et vert clair, maintenir l'ébullition durant 2 h encore puis laisser refroidir.

5.2 *Distillation*

Ajouter avec précaution une quantité suffisante d'eau pour garantir une dissolution complète des sulfates. Laisser refroidir et ajouter quelques grains de zinc (3.3).

Introduire dans le flacon collecteur de l'appareil à distiller 25 ml exactement mesurés d'acide sulfurique (3.5) ou (3.6), selon la teneur présumée en azote. Introduire 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 *(cf.* observation 8.3). Verser lentement 100 ml de solution d'hydroxyde de sodium (3.8) dans le ballon de minéralisation sans provoquer de perte d'ammoniac *(cf.* observation 8.1).

Chauffer le ballon jusqu'à distillation complète de l'ammoniac.

5.3 *Titration*

Titrer dans le flacon collecteur l'excès d'acide sulfurique par la solution d'hydroxyde de sodium (3.9) ou (3.10) selon la normalité de l'acide sulfurique utilisé jusqu'à atteindre le point final.

5.4 *Essai à blanc*

Pour confirmer que les réactifs sont exempts d'azote, effectuer un essai à blanc (minéralisation, distillation et titration) en utilisant 1 g de saccharose (3.13) au lieu de l'échantillon.

6 **Calcul des résultats**

Calculer la teneur en protéines brutes à l'aide de la formule suivante:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

dans laquelle

V_0 = volume (ml) de NaOH (3.9 ou 3.10) utilisé dans l'essai à blanc

V_1 = volume (ml) de NaOH (3.9 ou 3.10) utilisé pour la titration de l'échantillon

c = normalité (mol/l) de l'hydroxyde de sodium (3.9 ou 3.10)

m = masse (g) d'échantillon.

7. **Vérification de la méthode**

7.1 *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 % par rapport au résultat le plus élevé, pour les teneurs en protéines brutes comprises entre 20 et 40 %,

— 0,4 % en valeur absolue pour les teneurs supérieures à 40 %.

7.2 *Exactitude*

Effectuer l'analyse (minéralisation, distillation et titration) à l'aide de 1,5 à 2,0 g d'acétanilide (3.12) en présence de 1 g de saccharose (3.13); 1 g d'acétanilide consomme 14,80 ml d'acide sulfurique (3.5). La récupération doit être de 99 % au moins.

▼M3

8. **Observations**

8.1 L'appareil peut être du type manuel, semi-automatique ou automatique. Si l'appareil nécessite un transfert entre les étapes de minéralisation et de digestion, ce transfert doit être effectué sans perte. Si le ballon de l'appareil à distiller n'est pas équipé d'un entonnoir à robinet, ajouter l'hydroxyde de sodium immédiatement avant la connexion du ballon au réfrigérant en versant lentement le liquide le long de la paroi.

8.2 Si le produit minéralisé se solidifie, recommencer la détermination en utilisant une plus grande quantité d'acide sulfurique (3.4) que celle indiquée ci-dessus.

8.3 Pour les produits à faible teneur en azote, le volume d'acide sulfurique (3.6) à mettre dans le ballon collecteur peut être réduit si nécessaire à 10 ou à 15 ml et porté à 25 ml par addition d'eau.

▼B

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 ºC 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 ºC ± 1 ºC.

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 ºC. 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 ºC, 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

▼B

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 ºC).

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 µmole 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 (Na_2WO_4. $2H_2O$), 25 g de molybdate de sodium (Na_2MoO_4. $2H_2O$) et 700 ml d'eau dans un ballon à fond rond de 2 l à rodage normalisé.

▼B

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 (Li_2SO_4. $2H_2O$), 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 ºC ± 0,1 ºC 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 ± 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 ºC 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 ºC 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 ºC, 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.

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 ºC dans le bain d'eau (4.1), ajouter 10,0 ml de solution d'acide trichloracétique (3.4) préalablement portée à 25 ºC, homogénéiser et ajouter ensuite 1,0 ml de la solution de pepsine obtenue

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

▼B

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 ºC. 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 µmoles. 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 µmole, correspondant à la densité optique de la solution colorée, corrigée de l'essai à blanc.

L'activité de la pepsine, en µmole de tyrosine, par mg et par minute, à 25 ºC, est donnée par la formule:

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

dans laquelle:

a = quantité de tyrosine, en µmole, 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 ± 0,035.

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

36 400 unités commerciales/g (µmole de tyrosine/g en 10 min à 35,5 ºC).

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-l-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-l-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-l-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

▼B

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 ºC.

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.

▼B

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:

gossypol libre: $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 625$

gossypol total: $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 600$

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

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

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).

▼B

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.

▼B

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 Rf 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 Na_2HPO_4 2 H_2O 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 Na_2HPO_4. 2 H_2O 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 nº 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

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

▼B

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 ºC.

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 desvolumes 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 µg/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).

▼B

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 ºC. 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 Rf 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 CHLORTÉTRACYCLINE, DE L'OXYTÉTRACYCLINE 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 prélémanges. 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 nº 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 ºC 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 ºC, 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

▼B

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 ºC.

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 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 Na_2HPO_4. 2 H_2O 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 Na_2HPO_4. 2 H_2O 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

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-HCl par ml Cette solution se conserve une semaine en réfrigérateur.

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

▼B

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 µg/ml

S_2 0,05 µg/ml

S_1 0,025 µg/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 µg/ml

S_2 0,4 µg/ml

S_1 0,2 µg/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 µg/ml

S_2 0,25 µg/ml

S_1 0,125 µg/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).

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 µg/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.

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

▼B

(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 ºC 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 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 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 ºC.

6. **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 × activité relative.

▼B

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 ºC. 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 ºC. 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 ºC, jusqu'à ce que la croissance de la souche entre dans sa phase logarithmique (1 h 30 à 2 h).

4. **Milieux de culture et réactifs**

4.1 *Milieu de base du dosage* ([2])

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

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

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

▼B

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:

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 µg 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 CTT-HCl (µg/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 µg/ml. Introduire 1 ml de cette solution dans 2 tubes et 0,75 ml (= 0,09 µg) dans 2 autres tubes. Compléter le volume des 2 derniers tubes à 1 ml par le tampon phosphate (4.2).

▼B

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 µg 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 OCT-HCl ou TC-HCl (µg/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 µg/ml. Introduire 1 ml de cette solution dans 2 tubes et 0,5 ml (= 0,24 µg) 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 ºC ± 0,1 ºC 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.

▼B

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 ºC 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 ºC, 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 ºC.

4. **Milieux de culture et réactifs**

4.1 *Milieu d'entretien de la souche* ([2])

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 le pH à 6,5 au moment de l'emploi

4.2 *Milieu de base du dosage* ([2])

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.

([1]) Souche isolée par la LUFA à Kiel.
([2]) Tout milieu de culture commercial de composition analogue et donnant les mêmes résultats peut être utilisé.

▼B

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 S_8 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 (= U_8). Préparer ensuite les concentrations U_4, U_2 et U_1 par dilutions successives (1 + 1) à l'aide de la solution (4.6).

7. **Modalités du dosage**

7.1 *Inoculation du milieu de culture*

Inoculer à 60 ºC 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 ºC.

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

▼B

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 × 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 ºC, 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 gélosé ensemencé 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 nº 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 ºC 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 ºC, 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'inocolum 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 ºC.

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

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

▼B

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 $K_2H\ PO_4$ 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 $K_2H\ PO_4$ 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.

5. **Solutions étalon**

Sécher la substance étalon (4.8) durant 3 h à 60 ºC 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 S_8 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 ºC, 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 (= U_8). Préparer ensuite les concentrations U_4, U_2 et U_1 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 ºC 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 ºC le milieu de base du dosage (4.1), ajusté à pH 8,0, par la suspension de germes (3.2).

▼B

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 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 ºC.

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 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 × 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.

▼M2

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 et les prémélanges. La limite inférieure du dosage est de 2 mg/kg (2 ppm) ([1]).

2. **Principe**

L'échantillon est soumis à une extraction par une solution méthanolique de Tween 80. L'extrait est décanté ou centrifugé, puis dilué. Son activité antibiotique est déterminée par mesure de la diffusion de la virginiamycine dans un milieu gélosé, ensemencé avec *Micrococcus luteus*. La diffusion se révèle par la formation de zones d'inhibition du micro-organisme. Le diamètre de ces zones est considéré comme étant directement proportionnel au logarithme de la concentration en antibiotique pour la gamme des concentrations utilisées.

([1]) 1 mg de virginiamycine équivaut à 1 000 unités «UK».

▼M2

3. **Micro-organisme: «Micrococcus luteus» ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)**

3.1. *Entretien de la souche*

Ensemencer le milieu de culture (4.1), en tubes inclinés, par *Micrococcus luteus*. Incuber pendant vingt-quatre heures à 30 ºC, conserver en réfrigérateur à 4 ºC environ et renouveler l'ensemencement tous les quinze jours.

3.2. *Préparation de la suspension bactérienne* ([a])

Récolter les germes d'un tube de gélose (3.1), de préparation récente, à l'aide de 2 à 3 ml de solution de chlorure de sodium (4.3). Ensemencer avec cette suspension 250 ml du milieu de culture (4.1) dans une fiole de Roux et incuber pendant dix-huit à vingt heures à 30 ºC. Récolter les germes dans 25 ml de solution de chlorure de sodium (4.3) et homogénéiser.

Diluer la suspension à 1/10 à l'aide de la solution de chlorure de sodium (4.3). La transmission lumineuse de la suspension, mesurée à 650 nm sous une épaisseur de 1 cm par comparaison avec la solution de chlorure de sodium (4.3), doit être de 75 % environ. Cette suspension peut être conservée une semaine à 4 ºC environ.

4. **Milieux de culture et réactifs**

4.1. *Milieu d'entretien de la souche et de base du dosage* ([b])

Peptone de viande	6,0 g
Tryptone	4,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Extrait de viande	1,5 g
Glucose	1,0 g
Gélose	10,0 à 20,0 g
Eau	1 000 ml
pH 6,5 (après stérilisation)	

4.2. *Tampon phosphate, pH 6*

Hydrogenophosphate de potassium, K_2HPO_4	2,0 g
Dihydrogenophosphate de potassium, KH_2PO_4	8,0 g
Eau jusqu'à	1 000 ml

4.3. Solution à 0,8 % (p/v) de chlorure de sodium: dissoudre dans l'eau 8 g de chlorure de sodium, diluer à 1 000 ml et stériliser.

4.4. Méthanol.

4.5. Mélange de tampon phosphate (4.2) et de méthanol (4.4): 80/20 (v/v).

4.6. Solution méthanolique à 0,5 % (p/v) de Tween 80: dissoudre 5 g de Tween 80 dans du méthanol (4.4) et diluer à 1 000 ml avec du méthanol.

4.7. Substance étalon: virginiamycine d'activité connue.

5. **Solutions étalons**

Dissoudre une quantité exactement pesée de la substance étalon (4.7) dans le méthanol (4.4) et diluer avec du méthanol (4.4) pour obtenir une solution mère à 1 000 µg de virginiamycine/ml. Conservée en flacon bouché à 4 ºC, cette solution est stable pendant cinq jours.

([a]) D'autres méthodes peuvent être utilisées dans la mesure où il est prouvé qu'elles produisent des suspensions bactériennes analogues.

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

▼**M2**

Préparer à partir de cette solution et par dilutions successives à l'aide du mélange (4.5) les solutions suivantes:

S_8	1	µg/ml
S_4	0,5	µg/ml
S_2	0,25	µg/ml
S_1	0,125	µg/ml

6. **Préparation de l'extrait et des solutions**

6.1. *Extraction*

6.1.1. *Produits dont la teneur en virginiamycine ne dépasse pas 100 mg/kg*

Peser une quantité d'échantillon de 50,0 g. Ajouter 200 ml de solution (4.6), agiter durant trente minutes, puis laisser déposer ou centrifuger. Prélever 20 ml de la solution surnageante et évaporer jusqu'à 5 ml dans un évaporateur rotatif à une température ne dépassant pas 40 ºC. Diluer le résidu à l'aide du mélange (4.5) pour obtenir une concentration présumée en virginiamycine de 1 µg/ml (= U_8).

6.1.2. *Produits dont la teneur en virginiamycine est supérieure à 100 mg/kg*

Peser une quantité d'échantillon ne dépassant pas 10,0 g et contenant de 1 à 50 mg de virginiamycine. Ajouter 100 ml de solution (4.6), agiter durant trente minutes, puis laisser déposer ou centrifuger. Diluer la solution surnageante à l'aide du mélange (4.5) pour obtenir une concentration en virginiamycine de 1 µg/ml (= U_8).

6.2. *Solutions de l'extrait*

Préparer à partir de la solution U_8 et par dilutions successives (1 + 1) à l'aide du mélange (4.5) les solutions U_4 (concentration présumée: 0,5 µg/ml), U_2 (concentration présumée: 0,25 µg/ml) et U_1 (concentration présumée: 0,125 µg/ml.)

7. **Modalités du dosage**

7.1. *Inoculation du milieu de culture*

Ensemencer à 50 ºC environ le milieu de base du dosage (4.1) par la suspension bactérienne (3.2). Par des essais préliminaires sur plaques avec le milieu (4.1), déterminer la quantité de suspension bactérienne permettant d'obtenir pour les différentes concentrations en virginiamycine des zones d'inhibition aussi étendues que possible et qui soient encore nettes.

7.2. *Préparation des boîtes*

La diffusion sur gélose s'effectue dans des boîtes avec les quatre concentrations de la solution étalon (S_8, S_4, S_2, S_1) et les quatre concentrations de l'extrait (U_8, U_4, U_2, U_1). Chaque boîte doit nécessairement recevoir les quatre concentrations de l'étalon et de l'extrait. À cet effet, choisir la dimension des boîtes de telle sorte qu'on puisse creuser dans le milieu gélosé au moins huit cavités de 10 à 13 mm de diamètre, dont les centres ne sont pas distants de moins de 30 mm. On peut utiliser comme boîtes des plaques de verre planes, surmontées d'un anneau d'aluminium ou de matière plastique de 200 mm de diamètre et 20 mm de hauteur.

Introduire dans les boîtes une quantité du milieu (4.1), ensemencé comme indiqué en 7.1, permettant d'obtenir une couche de 2 mm environ d'épaisseur (60 ml pour une boîte de 200 mm de diamètre). Laisser solidifier, creuser les cavités et y déposer des volumes exactement mesurés des solutions de l'étalon et de l'extrait (0,10 à 0,15 ml par cavité, selon le diamètre). Faire au moins quatre répétitions de chaque concentration de façon que chaque détermination fasse l'objet d'une évaluation de 32 zones d'inhibition.

7.3. *Incubation*

Incuber les boîtes pendant seize à dix-huit heures à 30 ºC ± 2 ºC.

▼M2

8. **Évaluation**

Mesurer le diamètre des zones d'inhibition à 0,1 mm près. Pour chaque concentration, enregistrer les mesures moyennes sur papier semi-logarithmique en portant le logarithme des concentrations en regard des diamètres des zones d'inhibition. Tracer les droites les mieux ajustées pour la solution étalon et pour l'extrait en procédant, par exemple, comme suit:

Déterminer le point le plus approprié du niveau le plus bas de la solution étalon (SL) à l'aide de la formule:

$$\text{(a)}\quad SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Déterminer le point le plus approprié du niveau le plus élevé de la solution-étalon (SH) à l'aide de la formule:

$$\text{(b)}\quad SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Déterminer de la même façon les points les plus appropriés de l'extrait pour le niveau le plus bas (UL) et le niveau le plus élevé (UH) en remplaçant S_1, S_2, S_4 et S_8 dans les formules susmentionnées par U_1, U_2, U_4 et U_8.

Inscrire les valeurs SL et SH sur le même graphique. En joignant les deux points on obtient la droite la mieux ajustée pour la solution étalon. En procédant de la même façon pour UL et UH on obtient la droite la mieux ajustée pour l'extrait.

En l'absence de toute interférence, les droites devraient être parallèles. En pratique, on les considère comme étant parallèles lorsque (SH — SL) et (UH — UL) ne diffèrent pas de plus de 10 % de leur moyenne.

Si les droites ne sont pas parallèles, on peut éliminer soit U_1 et S_1, soit U_8 et S_8. Les valeurs SL, SH, UL et UH permettant d'obtenir les droites les mieux ajustées sont alors calculées à l'aide des formules suivantes:

$$\text{(a')}\quad SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{ou} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$\text{(b')}\quad SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{ou} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

et de formules analogues pour UL et UH. L'utilisation de cette alternative impose que les mêmes critères de parallélisme soient respectés.

L'obtention d'un résultat provenant de trois niveaux doit être mentionnée sur le bulletin d'analyse.

Lorsque les droites sont considérées comme étant parallèles, calculer le logarithme de l'activité relative (log. A) par l'une des formules ci-après, selon le nombre de niveaux (4 ou 3) utilisés pour l'évaluation du parallélisme.

Pour 4 niveaux:

$$\text{(c)}\quad \log. A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Pour 3 niveaux:

$$\text{(d)}\quad \log. A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

ou

$$\text{(d')}\quad \log. A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Activité de l'extrait de l'échantillon = activité de l'étalon correspondant × A:

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Si l'activité relative se trouve en dehors de la gamme des valeurs comprises entre 0,5 et 2,0, répéter la détermination en procédant à des ajustements appropriés des concentrations de l'extrait ou, éventuellement, des solutions étalons. Lorsque cette activité ne peut être ramenée dans la gamme des valeurs requises, le résultat doit être considéré comme approximatif et cette indication doit être notée sur le bulletin d'analyse.

▼**M2**

Lorsque les droites sont considérées comme n'étant pas parallèles, répéter la détermination. Si le parallélisme n'est toujours pas atteint, la détermination doit être considérée comme non satisfaisante.

Exprimer le résultat en milligrammes de virginiamycine par kilogramme d'aliment.

9. **Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées sur le même échantillon par le même analyste ne doit pas dépasser:

2 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs en virginiamycine inférieures à 10 mg/kg,

20 % du résultat le plus élevé pour les teneurs de 10 à 25 mg/kg,

5 mg/kg, en valeur absolue, pour les teneurs de 25 à 50 mg/kg,

10 % du résultat le plus élevé pour les teneurs supérieures à 50 mg/kg.