

DIRECTIVE 93/28/CEE DE LA COMMISSION

du 4 juin 1993

modifiant l'annexe I de la troisième directive 72/199/CEE portant fixation de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu la directive 70/373/CEE 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⁾, modifiée en dernier lieu par l'acte d'adhésion de l'Espagne et du Portugal⁽²⁾, et notamment son article 2,considérant que la troisième directive 72/199/CEE de la Commission, du 27 avril 1972, portant fixation de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle officiel des aliments des animaux⁽³⁾, modifiée en dernier lieu par la directive 84/4/CEE⁽⁴⁾, prescrit la méthode à utiliser pour le dosage de la protéine brute ;considérant qu'il y a lieu d'adapter cette méthode à l'évolution des connaissances scientifiques et techniques ; qu'il convient, en particulier, de tenir compte des dispositions de la directive 80/1107/CEE du Conseil, du 27 novembre 1980, concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à une exposition à des agents chimiques, physiques et biologiques pendant le travail⁽⁵⁾, modifiée par la directive 88/642/CEE⁽⁶⁾, et en particulier des mesures prises pour prévenir l'exposition au mercure et à ses composés ;

considérant qu'il est dès lors nécessaire de supprimer le mercure et l'oxyde mercurique de la liste des catalyseurs pouvant être utilisés lors de l'application de la méthode de dosage de la protéine brute ;

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

L'annexe I de la directive 72/199/CEE est modifiée conformément à l'annexe de la présente directive.

*Article 2*Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires ou administratives nécessaires pour se conformer aux dispositions de l'article 1^{er}, au plus tard, le 1^{er} juillet 1994. Ils en informent immédiatement la Commission.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence lors de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont arrêtées par les États membres.

Article 3

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 4 juin 1993.

Par la Commission

René STEICHEN

Membre de la Commission⁽¹⁾ JO n° L 170 du 3. 8. 1970, p. 2.⁽²⁾ JO n° L 302 du 15. 11. 1985, p. 23.⁽³⁾ JO n° L 123 du 29. 5. 1972, p. 6.⁽⁴⁾ JO n° L 15 du 18. 1. 1984, p. 28.⁽⁵⁾ JO n° L 327 du 3. 12. 1980, p. 8.⁽⁶⁾ JO n° L 356 du 24. 12. 1988, p. 74.

ANNEXE

Le texte de l'annexe I section 2 « DOSAGE DES PROTÉINES BRUTES » est remplacé par le texte suivant :

« 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 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ p.a.
- 3.3. Zinc en granulés
- 3.4. Acide sulfurique, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml
- 3.5. Acide sulfurique $c(\frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5$ mol/l
- 3.6. Acide sulfurique $c(\frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1$ mol/l
- 3.7. Indicateur au rouge de méthyle : dissoudre 300 g de rouge de méthyle dans 100 ml d'éthanol, $\sigma = 95-96\%$ (v/v)
- 3.8. Solution d'hydroxyde de sodium (utilisation possible de la qualité technique) $\delta = 40$ 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 °C, 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 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.

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.