KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 121/2008

af 11. februar 2008

om en analysemetode til bestemmelse af stivelsesindholdet i tilberedninger af den art, der anvendes som dyrefoder (KN-kode 2309)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 2658/87 af 23. juli 1987 om told- og statistiknomenklaturen og den fælles toldtarif ([1]), særlig artikel 9, stk. 1, litra a), og

ud fra følgende betragtninger:

(1) For at sikre, at tilberedninger af den art, der anvendes som dyrefoder (KN 2309), behandles ens ved import overalt i Fællesskabet, er det påkrævet, at der ved fastsættelsen af analysemetoder tages højde for den videnskabelige og teknologiske udvikling inden for sådanne metoder.

(2) Ifølge Kommissionens tredje direktiv 72/199/EØF af 27. april 1972 om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til officiel kontrol af foderstoffer ([2]) foreskrives den polarimetriske metode (også kaldet modificeret Ewers metode), som er beskrevet i punkt 1 i bilag I til direktivet, til bestemmelse af stivelsesindholdet i tilberedninger af den art, der anvendes som dyrefoder.

(3) På baggrund af undersøgelser, som eksperter fra medlemsstaternes toldlaboratorier har foretaget, er det påkrævet at fastsætte, at der bør anvendes en enzymatisk metode til bestemmelse af stivelsesindholdet i de nævnte tilberedninger, når den polarimetriske metode, der er fastsat i direktiv 72/199/EØF, ikke kan anvendes. Derfor bør det præciseres, hvordan den enzymatiske metode udføres.

(4) De i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Gruppen for Told- og Statistiknomenklaturen under Toldkodeksudvalget —

([1]) EFT L 256 af 7.9.1987, s. 1. Senest ændret ved Kommissionens forordning (EF) nr. 1352/2007 (EUT L 303 af 21.11.2007, s. 3).
([2]) EFT L 123 af 29.5.1972, s. 6. Senest ændret ved direktiv 1999/79/EF (EFT L 209 af 7.8.1999, s. 23).

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

Uanset artikel 1 i direktiv 72/199/EØF bestemmes stivelsesindholdet i tilberedninger af den art, der anvendes som dyrefoder, jf. KN-kode 2309, med den enzymatiske analysemetode, der er beskrevet i bilaget til denne forordning, i de tilfælde, hvor følgende fodermidler er til stede i større mængde:

a) (sukker)roeprodukter såsom: (sukker)roesnitter, (sukker)roemelasse, (sukker)roesnitter ekstraherede og tilsat melasse, (sukker)roevinasse, (roe)sukker

b) citruskvas

c) hørfrø, hørfrøkage, hørfrøskrå

d) rapsfrø, rapskage, rapsskrå, rapsskaller

e) solsikkefrø, solsikkeskrå, solsikkeskrå delvis afskallet

f) kokoskage, kokosskrå

g) kartoffelkvas

h) tørret gær

i) produkter med stort inulinindhold (fx snitter og skrå af jordskokker)

j) grever.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 11. februar 2008.

På Kommissionens vegne
László KOVÁCS
Medlem af Kommissionen

BILAG

ENZYMATISK METODE TIL BESTEMMELSE AF STIVELSESINDHOLDET I TILBEREDENINGER AF DEN ART, DER ANVENDES SOM DYREFODER, VED HØJTRYKSVÆSKEKROMATOGRAFI (HPLC)

1. **Anvendelsesområde**

Metoden går ud på enzymatisk bestemmelse af stivelsesindholdet i foder. Stivelsesindholdet beregnes ved kvantitativ bestemmelse af glucose efter enzymatisk nedbrydning af den tilstedeværende stivelse til glucose. Alt målt glucose anses for at stamme fra den stivelse, der er til stede i prøven.

2. **Definitioner**

Ved metoden bestemmes indholdet af stivelse og de af dens højmolekylære nedbrydningsprodukter, der er uopløselige i 40 % ethanol. Stivelsesindholdet udtrykkes i % (m/m).

3. **Princip**

Prøverne homogeniseres ved formaling. Prøven vaskes med ethanol (40 % vol.) for at fjerne opløseligt sukker og opløselige nedbrydningsprodukter fra stivelsen.

Det tilsættes et enzym, varmestabil alpha-amylase, til opslæmningen. Enzymet nedbryder ved 100 °C stivelsen til kortere kæder, uanset om al stivelsen er gået i opløsning.

Større stivelsesklumper nedbrydes meget langsomt. Derfor er det nødvendigt, at prøverne er helt opløst eller foreligger som en opslæmning, der kun indeholder meget små faste bestanddele.

Derefter tilsættes det andet enzym amyloglucosidase, som ved 60 °C hydrolyserer de spaltede glucosekæder til glucose.

Når proteiner, fedtstoffer og restprodukter er fjernet ved filtrering, fremkommer der en klar opløsning, der kan undersøges ved HPLC.

De tilstedeværende sukkerarter adskilles ved HPLC.

4. **Reagenser og andre materialer**

Alle reagenser skal være af anerkendt analysekvalitet, og vand skal være demineraliseret.

4.1. Ethanol i vand, 40 % vol.

4.2. Glucose, min 99 %

4.3. Opløsning af amyloglucosidase (1,4-alpha-D-glucan-glucohydrolase) fra Aspergillus niger (enzymaktivitet > 5 000 U/ml). Opbevares ved ca. 4 °C.

Alternativt kan også amyloglucosidasepulver anvendes.

4.4. Varmestabil alpha-amylase (1,4-alpha-D-glucan-glucanohydrolase). Opbevares ved ca. 4 °C.

4.5. Zinkacetatdihydrat, p.a.

4.6. Kalimhexacyanoferrat(II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), ekstra rent

4.7. Natriumacetat, vandfrit, p.a.

4.8. Iseddike, 100 % (v/v)

4.9. Natriumacetatbuffer (0,2 mol/l)

I et bægerglas afvejes der 16,4 g natriumacetat (4.7), som opløses i vand og overføres til en 1 000 ml målekolbe. Der fyldes op til mærket med vand, og pH indstilles til 4,7 med eddikesyre (brug pH-meter (5.11)). Denne opløsning er holdbar i op til seks måneder ved opbevaring ved 4 °C.

4.10. Amyloglucosidaseopløsning (enzymaktivitet > 250 U/ml).

Der fremstilles 100 ml af en opløsning af 5 ml amyloglucosidaseopløsning (4.3) eller 660 mg amyloglucosidasepulver i natriumacetatbuffer (4.9). Opløsningen fremstilles umiddelbart før brug.

4.11. Referenceopløsning

Der fremstilles opløsninger af glucose i vand som dem, der sædvanligvis benyttes ved HPLC-analyse.

4.12. Klaringsreagens (Carrez I)

I et bægerglas opløses 219,5 gram zinkacetat (4.5) i vand. Opløsningen overføres til en 1 000 ml målekolbe, og der tilsættes 30 ml eddikesyre (4.8). Efter omhyggelig blanding fyldes der op til mærket med vand. Denne opløsning er holdbar i op til seks måneder ved opbevaring ved rumtemperatur.

Der kan anvendes andre klaringsreagenser svarende til Carrez-opløsningen.

4.13. Klaringsreagens (Carrez II)

I et bægerglas opløses 106,0 gram kaliumhexacyanoferrat(II) (4.6) i vand. Opløsningen overføres til en 1 000 ml målekolbe. Efter omhyggelig blanding fyldes der op til mærket med vand. Denne opløsning er holdbar i op til seks måneder ved opbevaring ved rumtemperatur.

Der kan anvendes andre klaringsreagenser svarende til Carrez-opløsningen.

4.14. Mobil fase

Der fremstilles en mobil fase som dem, der sædvanligvis benyttes ved HPLC-analyse af sukker. Hvis der f.eks. anvendes en aminopropylsilicagelkolonne benyttes almindeligvis en blanding af vand af HPLC-kvalitet og acetonitril som mobil fase.

5. **Apparatur**

5.1. Standardlaboratorieglasudstyr

5.2. Centrifuge, der yder mindst 1 000 g (beregnet midt i centrifugeglasset).

5.3. Centrifugeglas af glas, 100 ml

5.4. Magnetomrører

5.5. Magnetpinde

5.6. Foldefiltre, f.eks. 185 mm

5.7. Sprøjtefiltre, 0,45 µm, til vandige opløsninger

5.8. Prøveglas, der passer til HPLC-autosampleren.

5.9. 100 ml målekolber

5.10. Injektionssprøjter af plast, 5 og 10 ml

5.11. pH-meter

5.12. Vandbad med termostat, temperaturinterval 60 °C – 100 °C

5.13. Varmeplader med magnetomrører

5.14. HPLC-apparatur

5.14.1. Pumpe, der kan levere pulsfrit flow.

5.14.2. Autosampler

5.14.3. Kolonne og forkolonne, der er egnet til sukkeranalyse.

5.14.4. Kolonneovn, temperaturinterval fra rumtemperatur til 40 °C

5.14.5. Detektor, der er egnet til sukkeranalyse, f.eks. brydningsindeksdetektor.

5.14.6. Integrationssystem

6. **Fremgangsmåde**

6.1. Generelt

Der foretages ikke dobbeltbestemmelse ved analysen af prøverne.

6.2. Prøveforberedelse for mange produkttyper

Prøverne homogeniseres ved formaling.

6.3. Prøvemængde

Stivelsesindholdet skønnes ud fra varedeklarationen. Prøvemængden (der skal afvejes med en nøjagtighed på 0,1 mg) skønnes ved hjælp af udtrykket:

$$\text{Prøvemængde (g)} = \frac{\text{Målekolbens rumfang (100 ml)}}{\text{skønnet stivelsesindhold (\%)}}$$

6.4. Blindprøve

Der foretages en blindbestemmelse i form af en fuldstændig analyse (som beskrevet i 6.5) uden tilsætning af prøve. Resultatet af blindbestemmelsen bruges ved beregningen af stivelsesindholdet (7.1).

6.5. Analyse

6.5.1. Prøveforberedelse

Prøven blandes ved rystning eller omrøring. Den valgte prøvemængde (6.3) afvejes i et centrifugeglas (5.3), og der tilsættes 50 ml 40 % ethanol (4.1). Der omrøres med magnetomrører i 20 min. ved stuetemperatur. Med magnetpinden stadig i glasset centrifugeres der i 5 min. Væskefasen fjernes ved forsigtig sugning (f.eks. med en pasteurpipette). Denne ekstraktion gentages to gange, hver gang med 25 ml ethanol (4.1). Bundfaldet overføres til en 100 ml målekolbe (5.9) med ca. 70 ml vand. Efter opløsning eller opslæmning tilsættes der 100 µl varmestabil alpha-amylase (4.4), og der opvarmes til 100 °C i 1 time, f.eks. på vandbad (5.12). Der afkøles til 60 °C på vandbad og tilsættes 5 ml amyloglucosidaseopløsning (4.10). Kolben anbringes i 30 min. på vandbad ved 60 °C. Prøven afkøles til rumtemperatur, klares ved tilsætning af 1 ml Carrez I-opløsning (4.12) og omrystes, hvorefter der tilsættes 1 ml Carrez II-opløsning (4.13). De to Carrez-opløsninger kan tilsættes før eller efter afkøling. Der fyldes op til mærket med vand og omrystes, og opløsningen filtreres gennem et foldefilter (5.6). Prøveekstraktet opsamles.

6.5.2. Behandling af prøveekstrakterne

Ekstrakterne filtreres gennem et filter (5.7) med en injektionssprøjte (5.10), der først er skyllet med ekstraktet. Filtratet omsamles i glas (5.8).

Anm.: Sprøjtefilteret kan benyttes flere gange. Det skylles med det næste ekstrakt, så forurening med det foregående ekstrakt undgås.

6.6. Kromatografi

HPLC-analysen gennemføres som normalt for sukker. Da prøverne er ekstraheret med ethanol/vand, er glucose den vigtigste sukkerart, der skal analyseres for. Spor af maltose ved HPLC-analysen kan være tegn på, at stivelsen ikke er fuldstændigt omdannet.

7. **Beregning og angivelse af resultater**

7.1. Beregning af HPLC-resultaterne

Glucoseindholdet (%, m/m) beregnes ud fra resultaterne af HPLC-analysen. Opløsningen af enzymet amyloglucosidase (4.3) er stabiliseret med glucose. Desuden er den varmestabile alpha-amylase (4.4) stabiliseret med saccharose, som delvis kan omdannes til glucose via amyloglucosidasens invertaseaktivitet. Derfor skal den målte glucosekoncentration (% m/v) korrigeres for blindprøvens glucosekoncentration (%, m/v). Glucoseindholdet (%, m/m), korrigeret for blindprøven, beregnes dernæst ved hjælp af den korrigerede glucosekoncentration, prøvens vægt og kalibreringen med referenceopløsninger (4.11).

7.2. Beregning af stivelsesindholdet

Stivelsesindholdet (%, m/m) beregnes ud fra glucoseindholdet (%, m/m) efter korrektion for blindprøven.

$$\text{stivelsesindhold} = 0{,}9 * \text{glucose korrigeret}$$

8. **Præcision**

8.1. Ringtest

Resultaterne af en ringtest af metodens præcision er sammenfattet i 8.4.

8.2. Repeterbarhed

Den absolutte forskel mellem to uafhængige enkeltresultater, der er opnået med den samme metode på identisk testmateriale på det samme laboratorium af den samme person med det samme udstyr inden for et kort tidsinterval, bliver i højst 5 % af tilfældene større end repeterbarhedsgrænsen på 1,1 % (m/m). Repeterbarhedsgrænsen er udledt af de samlede resultater af en ringtest (se 8.4).

8.3. Reproducerbarhed

Den absolutte forskel mellem to enkeltresultater, der er opnået med den samme metode på identisk testmateriale på forskellige laboratorier af forskellige personer med forskelligt udstyr, bliver i højst 5 % af tilfældene større end reproducerbarhedsgrænsen på 3,7 % (m/m). Reproducerbarhedsgrænsen er udledt af de samlede resultater af en ringtest (se 8.4).

8.4. Resultater af ringtesten

Der er i 2005 og 2006 udført en ringtest med deltagelse af de europæiske toldmyndigheders laboratorier. Testen er gennemført ifølge ISO 5725 og IUPAC-protokollen (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, vol. 67, 1995, p. 331-343). Præcisionsdataene er vist i nedenstående tabel.

Statistiske resultater af ringtesten

	Prøve				
	1	2	3	4	5
Antal laboratorier efter eliminering af outliers	25	26	26	25	24
Antal accepterede resultater	50	52	52	50	48
Gennemsnitligt stivelsesindhold (% m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Standardafvigelse på repeterbarhed, s_r (% m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Repeterbarhedsgrænse, r (% m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Standardafvigelse på reproducerbarhed, s_R (% m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Reproducerbarhedsgrænse, R (% m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Prøver

1: tørfoder til hunde
2: tørfoder til katte
3: tørfoder til katte (prøve 2) tilsat stivelse
4: tørfoder til katte (prøve 2) tilsat roesnitter
5: foder til selskabsdyr (handelsvare)