RÈGLEMENT (CE) Nº 121/2008 DE LA COMMISSION

du 11 février 2008

définissant la méthode d'analyse pour la détermination de la teneur en amidon des préparations des types utilisés pour l'alimentation des animaux (code NC 2309)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu le règlement (CEE) nº 2658/87 du Conseil du 23 juillet 1987 relatif à la nomenclature tarifaire et statistique et au tarif douanier commun [1], et notamment son article 9, paragraphe 1, point a),

considérant ce qui suit:

(1) Afin que les préparations des types utilisés pour l'alimentation des animaux (code NC 2309) bénéficient d'un même traitement à l'importation dans toute la Communauté, il importe, au moment de définir les méthodes d'analyse, de tenir compte de l'évolution scientifique et technologique de ces méthodes.

(2) Conformément à la 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 [2], il convient, pour déterminer la teneur en amidon des préparations des types utilisés pour l'alimentation des animaux, d'appliquer la méthode polarimétrique (également appelée méthode polarimétrique Ewers modifiée), décrite au point 1 de l'annexe I de ladite directive.

(3) À la lumière des études menées par les experts des laboratoires des douanes des États membres, il y a lieu de prévoir que lorsque la méthode polarimétrique décrite à la directive 72/199/CEE ne peut être appliquée aux fins de la détermination de la teneur en amidon des préparations mentionnées, il convient d'appliquer une méthode d'analyse enzymatique. Il importe dès lors de préciser la façon dont la méthode enzymatique doit être mise en œuvre.

(4) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité du code des douanes, section de la nomenclature tarifaire et statistique,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Par dérogation à l'article 1er de la directive 72/199/CEE, la teneur en poids d'amidon des préparations des types utilisés dans l'alimentation des animaux au sens du code NC 2309 est déterminée par la méthode d'analyse enzymatique établie à l'annexe du présent règlement lorsque les matières premières des aliments pour animaux suivantes sont présentes dans des proportions significatives:

a) sous-produits de betterave (sucrière) tels que la pulpe de betterave (sucrière), la mélasse de betterave (sucrière), la pulpe de betterave (sucrière) mélassée, la vinasse de betterave (sucrière), le sucre de betterave;

b) pulpe d'agrumes,

c) graines de lin; tourteau de pression de graines de lin; tourteau d'extraction de graines de lin;

d) graine de colza; tourteau de pression de colza; tourteau d'extraction de colza; pellicules de colza;

e) graines de tournesol; tourteau d'extraction de tournesol; tourteau d'extraction de tournesol partiellement décortiqué;

f) tourteau de pression de coprah; tourteau d'extraction de coprah;

g) pulpe de pommes de terre;

h) levures déshydratées;

i) produits riches en inuline (par exemple, cossettes et farine de topinambour);

j) cretons.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

[1] JO L 256 du 7.9.1987, p. 1. Règlement modifié en dernier lieu par le règlement (CE) nº 1352/2007 de la Commission (JO L 303 du 21.11.2007, p. 3).

[2] JO L 123 du 29.5.1972, p. 6. Directive modifiée en dernier lieu par la directive 1999/79/CE (JO L 209 du 7.8.1999, p. 23).

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 11 février 2008.

Par la Commission
László KOVÁCS
Membre de la Commission

ANNEXE

MÉTHODE ENZYMATIQUE DE DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN AMIDON DES PRÉPARATIONS POUR L'ALIMENTATION DES ANIMAUX UTILISANT LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

1. **Champ d'application**

Cette méthode décrit la détermination enzymatique de la teneur en amidon des aliments pour animaux. Cette teneur découle de la détermination quantitative du glucose après la dégradation enzymatique de l'amidon présent en glucose. Tout le glucose mesuré est censé provenir de l'amidon présent dans l'échantillon.

2. **Définitions**

Cette méthode permet de déterminer la teneur en amidon et les produits de sa dégradation, qui ont une masse moléculaire élevée et qui sont insolubles dans de l'éthanol à 40 %. La teneur en amidon est exprimée en % (m/m).

3. **Principe**

Les échantillons sont homogénéisés par mouture. Ils sont lavés avec de l'éthanol à 40 %, ce qui permet d'éliminer les sucres solubles et les produits solubles résultant de la décomposition de l'amidon.

Une enzyme (alpha-amylase thermostable) est ajoutée à la suspension. Elle décompose l'amidon à 100 °C en plus petites chaînes, que l'amidon soit entièrement en solution ou non. Les gros morceaux d'amidon se dégradent très lentement. Il faut donc que les échantillons soient entièrement dissous ou soient présents sous forme d'une suspension contenant de très petites parties solides.

Ensuite, une deuxième enzyme (amyloglucosidase) est ajoutée, qui hydrolyse les chaînes de glucose dégradées en glucose à 60 °C.

Après clarification du liquide, lors de laquelle les protéines, graisses et résidus présents sont éliminés par filtration, on obtient une solution claire pouvant être utilisée pour la CLHP.

Les sucres présents sont séparés par la CLHP.

4. **Réactifs et autres matériels**

Il importe d'utiliser des réactifs dont la qualité analytique est reconnue et de l'eau déminéralisée.

4.1. Éthanol à 40 % dans de l'eau

4.2. Glucose, min. 99 %

4.3. Solution d'amyloglucosidase (1,4-alpha-D-Glucane glucohydrolase) de l'Aspergillus niger (activité enzymatique > 5 000 U/ml). Stockage à environ 4 °C

De l'amyloglucosidase en poudre peut également être utilisée.

4.4. Alpha-amylase thermostable (1,4-alpha-D-Glucane-glucanohydrolase). Stockage à environ 4 °C

4.5. Acétate de zinc dihydraté, p.a.

4.6. Hexacyanoferrate de potassium (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), extra pur

4.7. Acétate de sodium anhydre, p.a.

4.8. Acide acétique glacial, 100 % (v/v)

4.9. Tampon d'acétate de sodium (0,2 mol/l)

Peser 16,4 grammes d'acétate de sodium (4.7) dans un bécher. Les dissoudre dans de l'eau et les transvaser avec les eaux de rinçage dans une fiole jaugée de 1 000 ml. Porter au volume avec de l'eau et ajuster le pH à 4,7 à l'aide d'acide acétique [au moyen d'un pH-mètre (5.11)]. Cette solution peut être utilisée au maximum pendant six mois si elle est stockée à 4 °C.

4.10. Solution d'amyloglucosidase (activité enzymatique > 250 U/ml)

Préparer une solution de 5 ml à base d'amyloglucosidase en solution (4.3) ou de 660 mg d'amyloglucosidase en poudre dans un volume final de 100 ml au moyen d'un tampon d'acétate de sodium (4.9). À préparer instantanément.

4.11. Solution de référence

Préparer des solutions de glucose dans de l'eau, telles qu'elles sont utilisées conventionnellement pour l'analyse CLHP.

4.12. Réactif pour la clarification (Carrez I)

Dans un bécher, dissoudre 219,5 grammes d'acétate de zinc (4.5) dans de l'eau. Les transvaser avec les eaux de rinçage dans une fiole jaugée de 1 000 ml et ajouter 30 ml d'acide acétique (4.8). Bien mélanger et porter au volume avec de l'eau. Cette solution peut être utilisée au maximum pendant six mois si elle est stockée à température ambiante.

D'autres réactifs de clarification équivalant à la solution de Carrez peuvent être utilisés.

4.13. Réactif pour la clarification (Carrez II)

Dans un bécher, dissoudre 106,0 grammes d'hexacyanoferrate de potassium (II) (4.6) dans de l'eau. Les transvaser avec les eaux de rinçage dans une fiole jaugée de 1 000 ml. Bien mélanger et porter au volume avec de l'eau. Cette solution peut être utilisée au maximum pendant six mois si elle est stockée à température ambiante.

D'autres réactifs de clarification équivalant à la solution de Carrez peuvent être utilisés.

4.14. Phase mobile

Préparer une phase mobile qui est conventionnellement utilisée pour l'analyse des sucres par la CLHP. Si on utilise une colonne de gel de silice aminopropyl, par exemple, un mélange d'eau et d'acétonitrile est une phase mobile courante.

5. **Appareils**

5.1. Verrerie de laboratoire standard

5.2. Centrifugeuse ayant une accélération minimale de 1 000 xg (calculée au milieu du tube)

5.3. Tubes à centrifuger en verre de 100 ml

5.4. Agitateur magnétique

5.5. Barreaux magnétiques

5.6. Filtres plissés, par exemple 185 mm

5.7. Filtres à seringues, 0,45 µm, convenant pour les solutions aqueuses

5.8. Tubes à échantillon convenant au passeur d'échantillons utilisé dans le cadre de la CLHP

5.9. Fioles jaugées de 100 ml

5.10. Seringues en plastique, de 5 et 10 ml

5.11. pH-mètre

5.12. Bain-marie avec thermostat, réglable à 60 °C et 100 °C

5.13. Un agitateur magnétique chauffant

5.14. Appareil à CLHP

5.14.1. Pompe pouvant fonctionner sans pulsation

5.14.2. Passeur d'échantillons

5.14.3. Colonne et précolonne, convenant pour l'analyse des sucres

5.14.4. Four à colonne, dont la température peut aller de la température ambiante à 40 °C

5.14.5. Détecteur convenant pour l'analyse des sucres, par exemple un détecteur réfractiométrique

5.14.6. Système d'intégration

6. **Procédure**

6.1. Généralités

Les échantillons sont analysés individuellement.

6.2. Préparation de l'échantillon pour plusieurs types de produits

Le produit est homogénéisé par mouture.

6.3. Portion de l'échantillon

Estimer la teneur en amidon à l'aide de la déclaration des ingrédients. La quantité de l'échantillon (déterminée avec une précision de 0,1 mg) peut être estimée comme suit:

$$\text{quantité de l'échantillon (g)} = \frac{\text{volume de la fiole jaugée (100 ml)}}{\text{teneur en amidon estimée (\%)}}$$

6.4. Essai à blanc

L'essai à blanc consiste à accomplir une analyse complète (décrite au point 6.5) sans ajouter l'échantillon. Son résultat est utilisé pour calculer la teneur en amidon (7.1).

6.5. Analyse

6.5.1. Préparation des échantillons

Mélanger l'échantillon en le secouant ou en le remuant. Peser la prise d'essai choisie (6.3) dans un tube à centrifuger (5.3) et ajouter 50 ml d'éthanol à 40 % (4.1). Mélanger avec un agitateur magnétique pendant 20 minutes à température ambiante. Laisser les barreaux magnétiques dans le tube et centrifuger pendant 5 minutes. Aspirer soigneusement et retirer la phase liquide (par exemple avec une pipette Pasteur). Répéter cette procédure d'extraction avec deux fois 25 ml d'éthanol (4.1). Transvaser les résidus dans une fiole jaugée de 100 ml (5.9) avec environ 70 ml d'eau.

Après dissolution ou suspension, ajouter 100 microlitres d'alpha-amylase thermostable (4.4) et chauffer à 100 °C pendant une heure, par exemple dans un bain-marie (5.12). Refroidir à 60 °C dans un bain-marie et ajouter 5 ml d'une solution d'amyloglucosidase (4.10). Placer la fiole pendant 30 minutes dans un bain-marie à 60 °C. Laisser refroidir à température ambiante, clarifier l'échantillon en ajoutant 1 ml de Carrez I (4.12), secouer, puis ajouter 1 ml de Carrez II (4.13). Les Carrez I et II peuvent être ajoutés avant ou après refroidissement. Porter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer la solution à l'aide d'un filtre plissé (5.6). Collecter l'extrait d'échantillon.

6.5.2. Traitement des extraits d'échantillons

Filtrer les extraits au moyen d'un filtre à disques (5.7) avec une seringue (5.10) qui a fait l'objet d'un lavage préalable à l'aide de l'extrait. Collecter le filtrat dans des tubes (5.8).

Remarque: Le filtre à disques peut être utilisé plusieurs fois. Il doit être lavé avec l'extrait suivant pour éviter toute contamination avec l'extrait précédent.

6.6. Chromatographie

La CLHP est habituellement réalisée pour l'analyse des sucres. Les échantillons étant extraits grâce à de l'éthanol/eau, le glucose est le principal sucre qu'il y a lieu d'analyser. Si l'analyse CLHP révèle des traces de maltose, cela peut être un signe de la conversion incomplète de l'amidon.

7. **Calcul et expression des résultats**

7.1. Calcul des résultats de la CLHP

La teneur en glucose (%, m/m) est calculée sur la base des résultats de l'analyse CLHP.

La solution enzymatique d'amyloglucosidase (4.3) est stabilisée à l'aide de glucose. Par ailleurs, l'alpha-amylase thermostable (4.4) est stabilisée à l'aide de saccharose, qui peut être partiellement converti en glucose par activité invertase de l'amyloglucosidase. Par conséquent, la concentration en glucose (%, m/v) mesurée doit être corrigée de la concentration en glucose (%, m/v) de l'essai à blanc. La teneur en glucose (%, m/m) corrigée de l'essai à blanc est ensuite calculée à partir de la concentration en glucose corrigée, du poids de l'échantillon et de l'étalonnage par rapport aux solutions de référence (4.11).

7.2. Calcul de la teneur en amidon

La teneur en amidon (%, m/m) est calculée sur la base de la teneur en glucose (%, m/m) après correction pour tenir compte de l'essai à blanc.

$$\text{Teneur en amidon} = 0{,}9 * \text{Glucose corrigé}$$

8. **Précision**

8.1. Essai interlaboratoire

Les détails d'un essai interlaboratoire sur la précision de la méthode sont résumés au point 8.4.

8.2. Répétabilité

La différence absolue entre les résultats de deux tests individuels, obtenus selon la même méthode, sur du matériel d'essai identique, dans le même laboratoire, par un seul opérateur utilisant le même équipement et effectués dans l'intervalle de temps le plus bref possible sera supérieure, dans moins de 5 % des cas, à la limite de répétabilité de 1,1 % (m/m). Cette limite a été calculée sur la base des résultats d'un essai interlaboratoire (voir le point 8.4).

8.3. Reproductibilité

La différence absolue entre les résultats de deux tests individuels, obtenus selon la même méthode, sur du matériel d'essai identique, dans des laboratoires différents, par des opérateurs différents utilisant un équipement différent sera supérieure, dans moins de 5 % des cas, à la limite de reproductibilité de 3,7 % (m/m). Cette limite a été calculée sur la base des résultats d'un essai interlaboratoire (voir le point 8.4).

8.4. Résultats de l'essai interlaboratoire

Un essai interlaboratoire a été mené en 2005 et en 2006 avec la participation des laboratoires douaniers européens. Cet essai a été réalisé conformément à la norme ISO 5725 et au protocole de l'UICPA (W. Horwitz, *Pure and Applied Chemistry*, vol. 67, 1995, p. 331-343). Les valeurs de fidélité sont indiquées dans le tableau ci-dessous:

Résultats statistiques de l'étude interlaboratoire

	Échantillon				
	1	2	3	4	5
Nombre de laboratoires retenus après élimination des cas extrêmes	25	26	26	25	24
Nombre de résultats acceptés	50	52	52	50	48
Teneur moyenne en amidon (%, m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Écart type de répétabilité (s_r) (%, m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Limite de répétabilité (r) (%, m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Écart type de reproductibilité (s_R) (%, m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Limite de reproductibilité (R) (%, m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Échantillons

1: aliments secs pour chiens
2: aliments secs pour chats
3: aliments secs pour chats (échantillon nº 2) avec addition d'amidon
4: aliments secs pour chats (échantillon nº 2) avec addition de pulpe de betterave
5: aliments pour animaux de compagnie