VERORDENING (EG) Nr. 121/2008 VAN DE COMMISSIE

van 11 februari 2008

tot vaststelling van een analysemethode ter bepaling van het zetmeelgehalte in bereidingen van de soort gebruikt voor het voederen van dieren (GN-code 2309)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Gemeenschap,

Gelet op Verordening (EEG) nr. 2658/87 van de Raad van 23 juli 1987 met betrekking tot de statistiek- en tariefnomenclatuur en het gemeenschappelijk douanetarief [1], met name op artikel 9, lid 1, onder a),

Overwegende hetgeen volgt:

(1) Om ervoor te zorgen dat bereidingen van de soort gebruikt voor het voederen van dieren (GN-code 2309) bij invoer in de Gemeenschap op eenvormige wijze worden behandeld, moet, bij het vaststellen van analysemethoden, rekening worden gehouden met de wetenschappelijke en technische ontwikkeling van deze methoden.

(2) Overeenkomstig de derde richtlijn van de Commissie 72/199/EEG van 27 april 1972 betreffende de vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van veevoeders [2] moet voor de vaststelling van het zetmeelgehalte in bereidingen van de soort gebruikt voor het voederen van dieren de polarimetrische methode (ook „gewijzigde Ewers-methode" genoemd) worden gebruikt, zoals beschreven in punt 1 van bijlage I bij die richtlijn.

(3) Gezien de studies die zijn uitgevoerd door deskundigen van de douanelaboratoria van de lidstaten moet worden bepaald dat wanneer de in Richtlijn 72/199/EEG beschreven polarimetrische methode niet kan worden toegepast voor de bepaling van het zetmeelgehalte van bedoelde bereidingen, een enzymatische analysemethode moet worden toegepast. Daarom moet worden vastgesteld hoe die enzymatische methode moet worden toegepast.

(4) De bepalingen van deze verordening zijn in overeenstemming met het advies van de Afdeling Tarief- en Statistieknomenclatuur van het Comité Douanewetboek,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

In afwijking van artikel 1 van Richtlijn 72/199/EEG wordt het zetmeelgehalte, uitgedrukt in gewichtspercenten, van bereidingen van de soort gebruikt voor het voederen van dieren in de zin van GN-code 2309 vastgesteld door de in de bijlage bij onderhavige verordening beschreven enzymatische analysemethode wanneer de volgende voedingsstoffen in aanzienlijke hoeveelheden aanwezig zijn:

a) producten van (suiker)bieten, zoals (suiker)bietenpulp, (suiker)bietenmelasse, (suiker)bietenpulp-gemelasseerd, (suiker)bietvinasse, (biet)suiker;

b) citruspulp;

c) lijnzaad; lijnzaadschilfers; lijnzaadschroot;

d) kool- en raapzaad; kool- en raapzaadschilfers; kool- en raapzaadschroot; kool- en raapzaadschillen;

e) zonnebloemzaad; zonnebloemzaadschroot; zonnebloemzaadschroot van gedeeltelijk ontdopt zaad;

f) kokosschilfers; kokosschroot;

g) aardappelpulp;

h) gedroogde gist;

i) producten met een hoog gehalte aan inuline (bv. chips en meel van aardperen);

j) kanen.

Artikel 2

Deze verordening treedt in werking op de twintigste dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

[1] PB L 256 van 7.9.1987, blz. 1. Verordening laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 1352/2007 van de Commissie (PB L 303 van 21.11.2007, blz. 3).

[2] PB L 123 van 29.5.1972, blz. 6. Richtlijn laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 1999/79/EG (PB L 209 van 7.8.1999, blz. 23).

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke lidstaat.

Gedaan te Brussel, 11 februari 2008.

Voor de Commissie
László KOVÁCS
Lid van de Commissie

BIJLAGE

ENZYMATISCHE METHODE VOOR DE BEPALING VAN HET ZETMEELGEHALTE IN BEREIDINGEN VAN DE SOORT GEBRUIKT VOOR HET VOEDEREN VAN DIEREN MET BEHULP VAN HOGEDRUKVLOEISTOFCHROMATOGRAFIE OF HPLC (HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

1. **Toepassingsgebied**

Beschreven wordt de enzymatische bepaling van het zetmeelgehalte van diervoeders. Het zetmeelgehalte wordt afgeleid uit de kwantitatieve bepaling van glucose na de enzymatische ontleding van het aanwezige zetmeel tot glucose. Alle gemeten glucose wordt geacht afkomstig te zijn van het in het monster aanwezige zetmeel.

2. **Definities**

Met deze methode wordt het gehalte aan zetmeel en de hoogmoleculaire afbraakproducten daarvan, die onoplosbaar zijn in 40 % ethanol, bepaald. Het zetmeelgehalte wordt uitgedrukt in % (m/m).

3. **Principe**

De monsters worden door malen gehomogeniseerd. Het monster wordt gewassen met 40 % ethanol om oplosbare suikers en oplosbare ontledingsproducten van zetmeel te verwijderen.

Het thermostabiele enzym alfa-amylase wordt aan de suspensie toegevoegd. Dit enzym breekt het zetmeel bij 100 °C af tot kortere ketens, ongeacht of het zetmeel al dan niet volledig in oplossing is.

Grote brokken zetmeel worden heel langzaam afgebroken. Daarom moeten de monsters volledig worden opgelost of aanwezig zijn in de vorm van een suspensie met heel kleine vaste deeltjes.

Vervolgens wordt het tweede enzym (amyloglucosidase) toegevoegd, dat de kortere glucoseketens bij 60 °C tot glucose hydrolyseert.

Na klaring van de vloeistof, waarbij de aanwezige eiwitten, vetten en residuen na filtratie worden verwijderd, wordt een heldere oplossing verkregen die voor HPLC kan worden gebruikt.

De scheiding van de aanwezige suikers geschiedt met behulp van HPLC.

4. **Reagentia en andere materialen**

Gebruik reagentia van p.a.-kwaliteit en gedemineraliseerd water.

4.1. Ethanol, 40 % (v/v) in water

4.2. Glucose, minimaal 99 %

4.3. Oplossing van amyloglucosidase (1,4-alfa-D-glucan-glucohydrolase) uit Aspergillus niger (enzymactiviteit > 5 000 U/ml). Bewaren bij ongeveer 4 °C

Ook kan amyloglucosidasepoeder worden gebruikt

4.4. Thermostabiele alfa-amylase (1,4-alfa-D-glucan-glucanohydrolase). Bewaren bij ongeveer 4 °C

4.5. Zinkacetaatdihydraat, p.a.

4.6. Kaliumhexacyanoferraat(II) ($K_4[Fe(CN)]_6$ $3H_2O$), extra zuiver

4.7. Natriumacetaat, watervrij, p.a.

4.8. IJsazijn, 100 % (v/v)

4.9. Natriumacetaat-buffer (0,2 mol/l)

Weeg 16,4 g natriumacetaat (4.7) af in een bekerglas. Los dit op in water en breng kwantitatief over in een maatkolf van 1 000 ml. Vul aan tot de maatstreep met water en breng de pH met azijnzuur op 4,7 (met behulp van een pH-meter (5.11)). Deze oplossing kan maximaal 6 maanden worden gebruikt, indien bewaard bij 4 °C.

4.10. Amyloglucosidase-oplossing (enzymactiviteit > 250 U/ml)

Bereid een oplossing van 5 ml amyloglucosidase-oplossing (4.3) of 660 mg amyloglucosidasepoeder in een volume van in totaal 100 ml met behulp van natriumacetaatbuffer (4.9). Onmiddellijk voor gebruik bereiden.

4.11. Referentieoplossing

Bereid oplossingen van glucose in water, zoals gangbaar bij gebruik voor HPLC-analyse.

4.12. Reagens voor klaring (Carrez I)

Los 219,5 g zinkacetaat (4.5) in een bekerglas op in water. Breng kwantitatief over in een maatkolf van 1 000 ml en voeg 30 ml azijnzuur toe (4.8). Meng grondig en vul aan met water. Deze oplossing kan maximaal 6 maanden worden gebruikt, indien bewaard bij kamertemperatuur.

Ook andere klaringsreagentia die gelijkwaardig zijn aan de Carrez-oplossing, kunnen worden gebruikt.

4.13. Reagens voor klaring (Carrez II)

Los 106,0 g kaliumhexacyanoferraat(II) (4.6) in een bekerglas op in water. Breng kwantitatief over in een maatkolf van 1 000 ml. Meng grondig en vul aan met water. Deze oplossing kan maximaal 6 maanden worden gebruikt, indien bewaard bij kamertemperatuur.

Ook andere klaringsreagentia die gelijkwaardig zijn aan de Carrez-oplossing, kunnen worden gebruikt.

4.14. Mobiele fase

Bereid een mobiele fase die gangbaar is voor gebruik bij HPLC-analyse van suikers. Wanneer een aminopropyl-silicagelkolom wordt gebruikt, is een mengsel van water van HPLC-kwaliteit en acetonitril bijvoorbeeld een gangbare mobiele fase.

5. **Apparatuur**

5.1. Standaard-laboratoriumglaswerk

5.2. Centrifuge, 1 000 g of meer (berekend in het midden van de buis)

5.3. Glazen centrifugebuizen, 100 ml

5.4. Magneetroerder

5.5. Magneetstaafjes

5.6. Vouwfilters, bv. 185 mm

5.7. Spuitfilters, 0,45 µm, geschikt voor waterige oplossingen

5.8. Monsterflesjes, geschikt voor de HPLC-autosampler

5.9. Maatkolven, 100 ml

5.10. Plastic spuiten, 5 en 10 ml

5.11. pH-meter

5.12. Waterbad met thermostaat, instelbaar op 60 °C en 100 °C

5.13. Verwarmingsplaten met magneetroerders

5.14. HPLC-apparatuur:

5.14.1. Pomp, geschikt voor een pulsvrije vloeistofstroom

5.14.2. Autosampler

5.14.3. Kolom en voorkolom, geschikt voor de analyse van suikers

5.14.4. Kolomoven, temperatuurbereik tussen kamertemperatuur en 40 °C

5.14.5. Detector, geschikt voor de analyse van suikers, bv. refractie-index-detector

5.14.6. Integratiesysteem

6. **Procedure**

6.1. Algemeen

De monsters worden in enkelvoud geanalyseerd.

6.2. Voorbereiding van het monster voor bepaalde soorten producten

Het product wordt door malen gehomogeniseerd.

6.3. Monsterhoeveelheid

Raam op basis van de lijst van ingrediënten het zetmeelgehalte. De hoeveelheid monster (tot op 0,1 mg nauwkeurig afgewogen) kan als volgt worden geraamd:

$$\text{hoeveelheid monster (g)} = \frac{\text{volume van de maatkolf (100 ml)}}{\text{geraamd zetmeelgehalte (\%)}}$$

6.4. Blancobepaling

Het blancogehalte wordt bepaald door een volledige analyse (zoals beschreven onder 6.5) zonder toevoeging van een monster uit te voeren. Het resultaat van de blancobepaling wordt bij de berekening van het zetmeelgehalte (7.1) gebruikt.

6.5. Analyse

6.5.1. Monstervoorbereiding

Meng het monster door schudden of roeren. Weeg de gekozen monsterhoeveelheid (6.3) af in een centrifugebuis (5.3) en voeg 50 ml 40 % ethanol (4.1) toe. Roer gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur met een magneetroerder. Laat het magneetstaafje in de buis en centrifugeer gedurende 5 minuten. Verwijder de vloeistoffase door deze voorzichtig op te zuigen (bijvoorbeeld met een pasteurpipet). Herhaal deze extractieprocedure met twee keer 25 ml ethanol (4.1). Breng het residu met ongeveer 70 ml water over in een maatkolf van 100 ml (5.9).

Voeg na oplossen of suspenderen 100 µl thermostabiel alfa-amylase (4.4) toe en verwarm gedurende 1 uur bij 100 °C in een waterbad (5.12). Koel in een waterbad af tot 60 °C en voeg 5 ml amyloglucosidase-oplossing (4.10) toe. Zet de kolf gedurende 30 minuten in een waterbad van 60 °C. Koel af tot kamertemperatuur, klaar de oplossing door 1 ml Carrez I (4.12) toe te voegen, schud en voeg vervolgens 1 ml Carrez II (4.13) toe. Carrez I en Carrez II kunnen vóór of na het afkoelen worden toegevoegd. Vul aan tot de maatstreep met water, homogeniseer en filtreer de oplossing over een vouwfilter (5.6). Vang het extract van het monster op.

6.5.2. Verwerking van de monsterextracten

Filtreer de extracten over een spuitfilter (5.7) met een spuit (5.10) die vooraf met het extract is gespoeld. Vang het filtraat in flesjes (5.8) op.

Noot: Het spuitfilter kan verschillende keren worden gebruikt. Het dient dan wel vooraf met het volgende extract te worden gespoeld om verontreiniging met het voorgaande extract te voorkomen.

6.6. Chromatografie

HPLC wordt zoals gebruikelijk voor de analyse van suikers uitgevoerd. Omdat de monsters met ethanol/water worden geëxtraheerd, is glucose de belangrijkste suiker die wordt bepaald. Als uit de HPLC-analyse blijkt dat er sporen van maltose aanwezig zijn, kan dit erop wijzen dat het zetmeel niet volledig is omgezet.

7. **Berekening en uitdrukking van de resultaten**

7.1. Berekening van de HPLC-resultaten

Uit de resultaten van de HPLC-analyse wordt het glucosegehalte (%, m/m) berekend.

De enzymatische amyloglucosidase-oplossing (4.3) wordt met glucose gestabiliseerd. Daarnaast wordt de thermostabiele alfa-amylase (4.4) met sacharose gestabiliseerd, dat door de invertase-activiteit van amyloglucosidase gedeeltelijk in glucose kan worden omgezet. Daarom moet de gemeten glucose-concentratie (%, m/v) worden gecorrigeerd voor de glucose-concentratie (%, m/v) in de blanco-oplossing. Vervolgens wordt het voor de blancobepaling gecorrigeerde glucosegehalte (%, m/m) berekend op basis van de gecorrigeerde glucoseconcentratie, het gewicht van het monster en de kalibratie met de referentieoplossingen (4.11).

7.2. Berekening van het zetmeelgehalte

Het zetmeelgehalte (%, m/m) wordt berekend op basis van het glucosegehalte (%, m/m) na correctie voor de blancobepaling.

$$\text{Zetmeelgehalte} = 0{,}9 * \text{glucose gecorrigeerd.}$$

8. **Precisie**

8.1. Ringonderzoek

Nadere gegevens over een ringonderzoek naar de precisie van de methode zijn te vinden in 8.4.

8.2. Herhaalbaarheid

Het absolute verschil tussen twee onafhankelijke afzonderlijke testresultaten, met dezelfde methode en identiek testmateriaal in hetzelfde laboratorium door dezelfde laboratoriummedewerker met dezelfde apparatuur met een korte tussenpoos verkregen, zal in niet meer dan 5 % van de gevallen groter zijn dan de herhaalbaarheidsgrens van 1,1 % (m/m). De herhaalbaarheidsgrens is afgeleid van de gecombineerde resultaten van een ringonderzoek (zie 8.4).

8.3. Reproduceerbaarheid

Het absolute verschil tussen twee afzonderlijke testresultaten, met dezelfde methode en identiek testmateriaal in verschillende laboratoria door verschillende laboratoriummedewerkers met verschillende apparatuur verkregen, zal in niet meer dan 5 % van de gevallen groter zijn dan de reproduceerbaarheidsgrens van 3,7 % (m/m). De reproduceerbaarheidsgrens is afgeleid van de gecombineerde resultaten van een ringonderzoek (zie 8.4).

8.4. Resultaten van het ringonderzoek

In 2005 en 2006 vond een ringonderzoek plaats waaraan de Europese douanelaboratoria deelnamen. Dit onderzoek werd uitgevoerd overeenkomstig ISO 5725 en het IUPAC-protocol (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, vol. 67, 1995, blz. 331-343). De precisiegegevens zijn in onderstaande tabel weergegeven.

Statistische resultaten van het ringonderzoek

	Monster				
	1	2	3	4	5
Aantal overgebleven laboratoria na eliminatie van uitschieters	25	26	26	25	24
Aantal geaccepteerde resultaten	50	52	52	50	48
Gemiddeld zetmeelgehalte (%, m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Standaardafwijking herhaalbaarheid s_r (%, m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Herhaalbaarheidgrens r (%, m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Standaardafwijking reproduceerbaarheid s_R (%, m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Reproduceerbaarheidsgrens r (%, m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Monsters

1: droog hondenvoer
2: droog kattenvoer
3: droog kattenvoer (monster 2) met toevoeging van zetmeel
4: droog kattenvoer (monster 2) met toevoeging van bietenpulp
5: commercieel voer voor huisdieren