REGULAMENTUL (CE) NR. 121/2008 AL COMISIEI

din 11 februarie 2008

de stabilire a metodei de analiză pentru determinarea conținutului de amidon din preparatele de tipul celor utilizate pentru hrana animalelor (cod NC 2309)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Regulamentul (CEE) nr. 2658/87 al Consiliului din 23 iulie 1987 privind Nomenclatura tarifară și statistică și Tariful Vamal Comun [1], în special articolul 9 alineatul (1) litera (a),

întrucât:

(1) Pentru a asigura tratamentul uniform la import în spațiul comunitar al preparatelor de tipul celor utilizate pentru hrana animalelor (NC 2309), este necesar ca, la stabilirea metodelor analitice, să se ia în considerare evoluția științifică și tehnologică a acestor metode.

(2) În temeiul celei de-a treia Directive 72/199/CEE a Comisiei din 27 aprilie 1972 privind metodele de analiză comunitare pentru controlul oficial al furajelor [2], pentru determinarea conținutului de amidon din preparatele de tipul celor utilizate pentru hrana animalelor se va aplica metoda polarimetrică (denumită și metoda Ewers modificată), descrisă la punctul 1 din anexa I a directivei în cauză.

(3) În lumina studiilor efectuate de experții din laboratoarele vamale ale statelor membre, este necesar să se aplice metoda analitică enzimatică atunci când nu se poate aplica metoda polarimetrică stabilită în Directiva 72/199/CEE, pentru stabilirea conținutului de amidon din preparatele respective. Prin urmare, este necesar să se precizeze modalitatea de aplicare a metodei enzimatice.

(4) Măsurile prevăzute de prezentul regulament sunt conforme cu avizul Secțiunii Nomenclatură tarifară și statistică a Comitetului Codului Vamal,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Prin derogare de la articolul 1 al Directivei 72/199/CEE, conținutul de amidon în greutate al produselor similare utilizate pentru hrana animalelor în sensul codului NC 2309 se determină prin metoda analitică enzimatică stabilită în anexa la prezentul regulament în cazurile în care următoarele materii furajere sunt prezente în cantități semnificative:

(a) subproduse din sfeclă (de zahăr), precum pulpă de sfeclă (de zahăr), melasă de sfeclă (de zahăr), pulpă melasată de sfeclă (de zahăr), borhot de sfeclă (de zahăr), zahăr (de sfeclă);

(b) pulpă de citrice;

(c) semințe de in; turte de in obținute prin presarea semințelor de in; turte de semințe de in rezultate după extracție;

(d) semințe de rapiță; turte de semințe de rapiță obținute prin presare; turte de semințe de rapiță rezultate după extracție; coji sau păstăi de semințe de rapiță;

(e) semințe de floarea-soarelui; turte de semințe de floarea-soarelui rezultate după extracție; semințe de floarea-soarelui parțial decorticate, extrase;

(f) turte de copra obținute prin presare; turte de copra rezultate după extracție;

(g) pulpă de cartof;

(h) drojdie deshidratată;

(i) produse bogate în inulină (de exemplu, tăiței și făină de topinambur);

(j) jumări.

Articolul 2

Prezentul regulament intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

[1] JO L 256, 7.9.1987, p. 1. Regulament modificat ultima dată prin Regulamentul (CE) nr. 1352/2007 al Comisiei (JO L 303, 21.11.2007, p. 3).

[2] JO L 123, 29.5.1972, p. 6. Directivă modificată ultima dată prin Directiva 1999/79/CE (JO L 209, 7.8.1999, p. 23).

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 11 februarie 2008.

Pentru Comisie
László KOVÁCS
Membru al Comisiei

ANEXĂ

METODA ENZIMATICĂ DE DETERMINARE A CONȚINUTULUI DE AMIDON DIN PREPARATELE UTILIZATE PENTRU HRANA ANIMALELOR PRIN CROMATOGRAFIE LICHIDĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)

1. **Domeniul de aplicare**

Această metodă realizează determinarea enzimatică a conținutului de amidon din furaje. Conținutul de amidon rezultă din determinarea cantitativă a glucozei după descompunerea enzimatică a amidonului în glucoză. Se consideră că toată glucoza măsurată provine din amidonul prezent în eșantion.

2. **Definiții**

Prin această metodă se determină conținutul de amidon și de produse de descompunere a acestuia cu masă moleculară ridicată și care sunt insolubile în etanol de concentrație 40 %. Conținutul de amidon se exprimă în procente (m/m).

3. **Principiu**

Se omogenizează eșantioanele prin măcinare. Se spală eșantionul cu etanol de 40 % pentru a elimina zaharurile solubile și produsele solubile rezultate din descompunerea amidonului.

La suspensie se adaugă enzima alfa-amilază termostabilă. Enzima descompune amidonul la 100 °C în lanțuri mai mici, indiferent dacă amidonul este sau nu în întregime în soluție.

Amidonul în bucăți mari se descompune foarte încet. De aceea, eșantioanele trebuie dizolvate complet sau trebuie să fie prezente sub forma unei suspensii care conține părți solide foarte mici.

Apoi se adaugă a doua enzimă, amiloglucozidaza, care hidrolizează lanțurile degradate de glucoză în glucoză la 60 °C.

După limpezirea lichidului cu ajutorul proteinelor prezente, grăsimile și reziduurile sunt îndepărtate prin filtrare și se obține o soluție limpede, care poate fi folosită pentru HPLC.

Zaharurile prezente sunt separate prin HPLC.

4. **Reactivi și alte materii**

Se vor folosi reactivi cu grad analitic recunoscut și apă demineralizată.

4.1. Etanol 40 % vol în apă

4.2. Glucoză, minimum 99 %.

4.3. Soluție de amiloglucozidază (1,4-alfa-D-glucan glucohidrolază) din *Aspergillus niger* (activitate enzimatică > 5 000 U/ml). Se depozitează la aproximativ 4 °C.

Se poate folosi alternativ și amiloglucozidază sub formă de pudră.

4.4. Alfa-amilază termostabilă (1,4-alfa-D-Glucan-glucanohidrolază). Se depozitează la aproximativ 4 °C.

4.5. Acetat de zinc dihidratat, p.a.

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

4.7. Acetat de sodiu anhidru, p.a.

4.8. Acid acetic glacial, 100 % (v/v)

4.9. Soluție tampon de acetat de sodiu (0,2 mol/l)

Se cântăresc 16,4 grame de acetat de sodiu (4.7) într-un vas gradat. Se dizolvă în apă și se transferă cantitativ într-un balon volumetric de 1 000 ml. Se diluează cu apă până la gradație și se corectează pH-ul la valoarea 4,7 cu acid acetic [folosind un pH-metru (5.11)]. Această soluție poate fi folosită maximum 6 luni dacă este păstrată la 4 °C.

4.10. Soluție de amiloglucozidază (activitate enzimatică > 250 U/ml)

Preparați o soluție din 5 ml soluție de amiloglucozidază (4.3) sau 660 mg amiloglucozidază sub formă de pudră, într-un volum final de 100 ml folosind soluție tampon de acetat de sodiu (4.9). Preparați pe loc.

4.11. Soluție de referință

Preparați soluții de glucoză în apă, folosite convențional în analiza HPLC.

4.12. Reactiv de clarificare (Carrez I).

Dizolvați 219,5 grame de acetat de zinc (4.5) în apă într-un vas gradat. Transferați cantitativ într-un balon volumetric de 1 000 ml, adăugați 30 ml acid acetic (4.8). Amestecați bine și aduceți la semn cu apă. Această soluție se poate folosi maximum 6 luni dacă este păstrată la temperatura camerei.

Pot fi folosiți și alți reactivi de clarificare echivalenți cu soluția Carrez.

4.13. Reactiv de clarificare (Carrez II).

Dizolvați 106,0 grame de hexacianoferat de potasiu (II) (4.6) în apă într-un vas gradat. Transferați cantitativ într-un balon volumetric de 1 000 ml. Amestecați bine și aduceți la semn cu apă. Această soluție se poate folosi maximum 6 luni dacă este păstrată la temperatura camerei.

Pot fi folosiți și alți reactivi de clarificare echivalenți cu soluția Carrez.

4.14. Fază mobilă

Se prepară o fază mobilă folosită de obicei în analiza HPLC a zaharurilor. În cazul în care se folosește, de exemplu, o coloană de silicagel aminopropil, o fază mobilă comună este un amestec de apă gradată HPLC și acetonitril.

5. **Aparatură**

5.1. Vase obișnuite de laborator

5.2. Centrifugă cu accelerația de minimum 1 000 g (calculată la centrul tubului)

5.3. Eprubete de sticlă de 100 ml pentru centrifugă

5.4. Agitator magnetic

5.5. Baghete magnetice

5.6. Filtre cutate, de exemplu, 185 mm

5.7. Filtre cu seringă, 0,45 μm, pentru soluții apoase

5.8. Fiole pentru probă pentru dispozitivul HPLC de prelevare automată a probelor

5.9. Baloane gradate de 100 ml

5.10. Seringi de plastic, 5 și 10 ml

5.11. pH-metru

5.12. Baie de apă cu termostat, ajustabil la 60 °C și 100 °C

5.13. Plăci pentru încălzire cu agitatoare magnetice

5.14. Aparatură HPLC

5.14.1. Pompă pentru pulsație zero

5.14.2. Dispozitiv de prelevare automată a probelor

5.14.3. Coloană și precoloană pentru analizarea zaharurilor

5.14.4. Cuptor de coloană, cu gradul de încălzire între temperatura camerei și 40 °C

5.14.5. Detector pentru analizarea zaharurilor, de exemplu detector indice de refracție

5.14.6. Sistem de integrare

6. **Procedură**

6.1. Generalități

Eșantioanele se analizează separat.

6.2. Prepararea eșantionului pentru mai multe tipuri de produse

Se omogenizează produsul prin măcinare.

6.3. Cantitatea de eșantion

Conținutul de amidon se estimează prin intermediul declarării cantitative a ingredientelor. Cantitatea de eșantion (cântărită cu precizia de 0,1 mg) poate fi estimată pornind de la:

$$\text{cantitatea de eșantion (g)} = \frac{\text{volumul balonului volumetric (100 ml)}}{\text{conținutul estimat de amidon (\%)}}$$

6.4. Determinare martor

Martorul este determinat prin efectuarea unei analize complete (conform descrierii de la punctul 6.5), fără adăugarea eșantionului. Rezultatul determinării martor este folosit la calcularea conținutului de amidon (7.1).

6.5. Analiza

6.5.1. Pregătirea eșantioanelor

Amestecați eșantionul prin scuturare sau agitare. Cantitatea aleasă pentru probă (6.3) se cântărește într-o eprubetă pentru centrifugă (5.3) și se adaugă 50 ml de etanol 40 % (4.1). Amestecați într-un agitator magnetic timp de 20 minute la temperatura camerei. Lăsați bagheta magnetică în eprubetă și centrifugați timp de cinci minute. Aspirați cu grijă și înlăturați faza lichidă (de exemplu, cu o pipetă Pasteur). Repetați această procedură de extracție cu două părți de 25 ml etanol (4.1). Transferați reziduul într-un balon volumetric de 100 ml (5.9) cu circa 70 ml apă. După dizolvare sau suspensie, adăugați 100 microlitri de alfa-amilază termostabilă (4.4) și încălziți la 100 °C timp de 1 oră, de exemplu, în baie de apă (5.12). Răciți la 60 °C în baie de apă și adăugați 5 ml dintr-o soluție de amiloglucozidază (4.10). Așezați balonul timp de 30 minute în baie de apă la 60 °C. Răciți până la temperatura camerei, limpeziți eșantionul adăugând 1 ml Carrez I (4.12), agitați și apoi adăugați 1 ml Carrez II (4.13). Carrez I și II pot fi adăugate înainte sau după răcire. Diluați până la gradație cu apă, omogenizați și filtrați soluția printr-un filtru cutat (5.6). Prelevați extractul de eșantion.

6.5.2. Prelucrarea extractelor de eșantion

Filtrați extractele printr-un filtru disc (5.7) cu o seringă (5.10) înmuiată în prealabil în extract. Colectați filtratele în fiole (5.8).

Notă: Filtrul disc poate fi folosit de mai multe ori. Trebuie înmuiat în extractul următor pentru a evita contaminarea extractului anterior.

6.6. Cromatografie

HPLC se efectuează ca de obicei pentru analiza zaharurilor. Deoarece eșantioanele sunt extrase cu etanol/apă, glucoza este principalul zahar care trebuie analizat. Dacă la analiza HPLC se detectează urme de maltoză, aceasta poate indica conversia incompletă a amidonului.

7. **Calcularea și exprimarea rezultatelor**

7.1. Calcularea rezultatelor HPLC

Conținutul (%, m/m) de glucoză se calculează pornind de la rezultatele analizei HPLC. Soluția enzimatică de amiloglucozidază (4.3) se stabilizează cu glucoză. În plus, alfa-amilaza termostabilă (4.4) se stabilizează cu zaharoză, care poate fi convertită parțial în glucoză prin activitatea de invertază a amiloglucozidazei. Prin urmare, concentrația de glucoză (%, m/v) măsurată trebuie corectată cu concentrația de glucoză (%, m/v) din martor. Conținutul de glucoză (%, m/m) corectat conform martorului se calculează apoi pornind de la concentrația de glucoză corectată, greutatea eșantionului și calibrarea cu soluțiile de referință (4.11).

7.2. Calcularea conținutului de amidon

Conținutul de amidon (%, m/m) se calculează cu ajutorul conținutului de glucoză (%, m/m) după corectarea conform martorului.

$$\text{Conținut amidon} = 0{,}9 * \text{glucoză corectată}$$

8. **Gradul de precizie**

8.1. Test între laboratoare

Detaliile unui test între laboratoare privind gradul de precizie al metodei sunt rezumate la punctul 8.4.

8.2. Repetabilitatea

Diferența absolută dintre două rezultate independente ale aceluiași test, obținute prin utilizarea aceleiași metode asupra unor materii identice în același laborator de către același operator folosind același echipament la un interval scurt de timp nu depășește, în maximum 5 % din cazuri, limita de repetabilitate de 1,1 % (m/m). Limita de repetabilitate a fost calculată pe baza rezultatelor unui test între laboratoare (a se vedea 8.4).

8.3. Reproductibilitatea

Diferența absolută dintre două rezultate ale aceluiași test obținute prin aceeași metodă pe material de probă identic în laboratoare diferite de către operatori diferiți care folosesc echipamente diferite nu depășește, în maximum 5 % din cazuri, limita de reproductibilitate de 3,7 % (m/m). Limita de reproductibilitate a fost calculată pe baza rezultatelor unui test între laboratoare (vezi 8.4).

8.4. Rezultatele testului între laboratoare

S-a efectuat un test între laboratoare în anii 2005 și 2006 cu participarea laboratoarelor vamale europene. Testul s-a desfășurat în conformitate cu ISO 5725 și cu protocolul IUPAC (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, vol. 67, 1995, p. 331-343). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul următor:

Rezultate statistice ale studiului între laboratoare

	Eșantion				
	1	2	3	4	5
Număr de laboratoare după eliminarea valorilor atipice	25	26	26	25	24
Numărul de rezultate acceptate	50	52	52	50	48
Conținutul mediu de amidon (%, m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Deviația standard s_r a repetabilității (%, m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Limita de repetabilitate r (%, m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Deviația standard s_R a reproductibilității (%, m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Limita de reproductibilitate R (%, m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Eșantioane

1: hrană uscată pentru câini
2: hrană uscată pentru pisici
3: hrană uscată pentru pisici (eșantionul 2) cu adaos de amidon
4: hrană uscată pentru pisici (eșantionul 2) cu adaos de pulpă de sfeclă
5: hrană comercială pentru animale