KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 121/2008

av den 11 februari 2008

om fastställande av analysmetoder för fastställande av stärkelsehalten i beredningar av sådana slag som används vid utfodring av djur (KN-nummer 2309)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets förordning (EEG) nr 2658/87 av den 23 juli 1987 om tulltaxe- och statistiknomenklaturen och om Gemensamma tulltaxan [1], särskilt artikel 9.1 a, och

av följande skäl:

(1) För att se till att beredningar av sådana slag som används vid utfodring av djur (KN-nummer 2309) behandlas på ett enhetligt sätt vid import till gemenskapen, är det nödvändigt att ta hänsyn till den vetenskapliga och tekniska utvecklingen när man fastställer analysmetoder.

(2) I enlighet med kommissionens tredje direktiv 72/199/EEG av den 27 april 1972 om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen [2] ska, vid fastställande av stärkelsehalten i beredningar av sådana slag som används vid utfodring av djur, den polarimetriska metod (även kallad Ewers modifierade metod), som beskrivs i punkt 1 i bilaga I till det direktivet, användas.

(3) Mot bakgrund av de undersökningar som utförts av experter vid tullaboratorierna i medlemsstaterna bör en enzymatisk analysmetod användas i de fall den polarimetriska metod som fastställs i direktiv 72/199/EEG inte kan användas för att fastställa stärkelsehalten i de nämnda beredningarna. Det är därför lämpligt att specificera hur den enzymatiska metoden ska utföras.

(4) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från tullkodexkommittén, sektionen för tulltaxe- och statistiknomenklatur.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Genom undantag från artikel 1 i direktiv 72/199/EEG ska stärkelsehalten i viktprocent i beredningar av sådana slag som används vid utfodring av djur i enlighet med KN-nummer 2309 fastställas med den enzymatiska analysmetoden i bilagan till den här förordningen om följande foderråvara uppträder i betydande mängder:

a) (socker)bet(s)produkter som socker(betmassa), melass av (socker)betor, melasserad betmassa, (socker)betvinass, (bet)-socker,

b) citruspulpa,

c) linfrön, linfröexpeller, extraherade linfrön,

d) rapsfrön, rapsfröexpeller, extraherade rapsfrön, rapsfröskal,

e) solrosfrön, extraherade solrosfrön, delvis skalade extraherade solrosfrön,

f) kopraexpeller, extraherat kopra,

g) potatispulpa,

h) vattenfri jäst,

i) inulinrika produkter (t.ex. snitsel och mjöl av jordärtskockor),

j) fettgrevar.

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den tjugonde dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

[1] EGT L 256, 7.9.1987, s. 1. Förordningen senast ändrad genom kommissionens förordning (EG) nr 1352/2007 (EUT L 303, 21.11.2007, s. 3).

[2] EGT L 123, 29.5.1972, s. 6. Direktivet senast ändrat genom direktiv 1999/79/EG (EGT L 209, 7.8.1999, s. 23).

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 11 februari 2008.

På kommissionens vägnar
László KOVÁCS
Ledamot av kommissionen

BILAGA

ENZYMATISK METOD FÖR FASTSTÄLLANDE AV STÄRKELSEHALTEN I BEREDNINGAR AV SÅDANA SLAG SOM ANVÄNDS VID UTFODRING AV DJUR MED HJÄLP AV HÖGUPPLÖSANDE VÄTSKEKROMATOGRAFI (HPLC)

1. **Tillämpningsområde**

Följande metod används för ett enzymatiskt fastställande av stärkelsehalten i djurfoder. Stärkelsehalten härleds genom en kvantitativ beräkning av mängden glukos efter en enzymatisk nedbrytning av den befintliga stärkelsen till glukos. All uppmätt glukos anses komma från den stärkelse som finns i provet.

2. **Definitioner**

Med hjälp av denna metod fastställs halten av stärkelse och dess högmolekylära nedbrytningsprodukter som är olösliga i 40 % etanol. Stärkelsehalten uttrycks i % (m/m).

3. **Princip**

Proven homogeniseras med hjälp av malning. Provet tvättas med 40 % etanol för att avlägsna lösligt socker och lösliga produkter från nedbrytning av stärkelse.

Det värmebeständiga enzymet alfaamylas tillsätts suspensionen. Detta enzym bryter ned stärkelsen vid 100 °C i mindre kedjor, oavsett om stärkelsen lösts upp helt.

Stora klumpar av stärkelse bryts ned väldigt långsamt. Därför måste proven vara helt upplösta eller föreligga i form av suspensioner som innehåller mycket små partiklar.

Därefter tillsätts det andra enzymet amyloglukosidas, som hydrolyserar de nedbrutna glukoskedjorna till glukos vid 60 °C.

Efter klarning av vätskan, varvid proteiner, fetter och restämnen sorteras bort efter filtrering, erhålls en klar vätska som kan användas för HPLC.

Separering av sockerarterna sker med HPLC.

4. **Reagenser och andra material**

Använd reagenser av för analytiska ändamål godkänd klass och avmineraliserat vatten.

4.1 Etanol 40 % vol. i vatten.

4.2 Glukos, minst 99 %.

4.3 Lösning av amyloglukosidas (1,4-alfa-D-glukanglukohydrolas) från Aspergillus niger (enzymaktivitet > 5 000 U/ml). Lagring vid ca 4 °C.

Alternativt kan också amyloglukosidaspulver användas.

4.4 Värmebeständigt alfaamylas (1,4-alpha-D-glukan-glukanohydrolas). Lagring vid ca 4 °C.

4.5 Zinkacetatdihydrat, p.a.

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

4.7 Natriumacetat, vattenfri, p.a.

4.8 Isättika, 100 % (v/v).

4.9. Natriumacetatbuffert (0,2 mol/l).

Väg upp 16,4 gram natriumacetat (4.7) i en glasbägare. Lös upp i vatten och för över i en mätkolv med volymen 1 000 ml. Späd till märket med vatten och justera pH-värdet till 4,7 med hjälp av ättiksyra (genom att använda en pH-mätare [5.11]). Denna lösning kan användas upp till sex månader om den lagras vid 4 °C.

4.10 Amyloglukosidaslösning (enzymaktivitet > 250 U/ml).

Bered en lösning av 5 ml amyloglukosidaslösning (4.3) eller 660 mg amyloglukosidaspulver i en slutvolym av 100 ml genom att använda en natriumacetatbuffert (4.9). Bered lösningen omedelbart.

4.11 Referenslösning.

Bered lösningar av glukos i vatten, sådana som vanligtvis används i en HPLC-analys.

4.12 Reagens för klarning (Carrez I).

Lös upp 219,5 gram zinkacetat (4.5) i vatten i en glasbägare. För över i en mätkolv med volymen 1 000 ml, tillsätt 30 ml ättika (4.8). Blanda noggrant och fyll på med vatten. Denna lösning kan användas upp till sex månader om den lagras vid rumstemperatur.

Andra reagenser för klarning som är likvärdiga med Carrezlösningen kan användas.

4.13 Reagens för klarning (Carrez II).

Lös upp 106,0 gram kaliumhexacyanoferrat II (4.6) i vatten i en glasbägare. För över i en mätkolv med volymen 1 000 ml. Blanda noggrant och fyll på med vatten. Denna lösning kan användas upp till sex månader om den lagras vid rumstemperatur.

Andra reagenser för klarning som är likvärdiga med Carrezlösningen kan användas.

4.14 Rörlig fas.

En rörlig fas, en sådan som vanligtvis används i en HPLC-analys av socker, bereds. Om exempelvis en aminopropyl-kiselgelkolonn används, är en blandning av vatten av HPLC-kvalitet och acetonitril en vanlig rörlig fas.

5. **Utrustning**

5.1 Standardmässiga laboratorieglas.

5.2 Centrifug för minst 1 000 g (beräknat vid rörets mitt).

5.3 Glascentrifugrör med volymen 100 ml.

5.4 Magnetomrörare.

5.5 Magnetstång.

5.6 Veckade filter, t.ex. 185 mm.

5.7 Sprutfilter, 0,45 µm, lämpliga för vattenlösningar.

5.8 Provbehållare lämpliga för HPLC-autosampler.

5.9 Mätkolvar med volymen 100 ml.

5.10 Injektionssprutor av plast, 5 och 10 ml.

5.11 pH-mätare.

5.12 Vattenbad med termostat, justerbart till 60 °C och 100 °C

5.13 Värmeplattor med magnetomrörare.

5.14 Redskap för HPLC.

5.14.1 Pump, anpassad för pulsfritt flöde.

5.14.2 Autosampler.

5.14.3 Kolonn och förkolonn, lämpliga för analys av socker.

5.14.4 Kolonnugn, med ett temperaturintervall mellan rumstemperatur och 40 °C.

5.14.5 Detektor, lämplig för analys av socker, t.ex. refraktionsindexdetektor.

5.14.6 Integreringssystem.

6. **Förfarande**

6.1 Allmänt

Proven analyseras ett och ett.

6.2 Beredning av provet för flera typer av produkter

Produkten homogeniseras med hjälp av malning.

6.3 Provmängd

Uppskatta stärkelsehalten med hjälp av innehållsdeklarationen. Provmängden (med en noggrannhet på 0,1 mg) kan uppskattas med hjälp av följande formel:

$$\text{Provmängd (g)} = \frac{\text{Mätkolvens volym (100 ml)}}{\text{Uppskattad stärkelsehalt (\%)}}$$

6.4 Bestämning av blankprov

Blankprovet bestäms genom en fullständig analys (enligt beskrivningen i 6.5) utan tillsats av ett prov. Resultatet av blankprovet används för att beräkna stärkelsehalten (7.1).

6.5. Analys

6.5.1 Beredning av proverna

Blanda provet genom att skaka eller röra om. Den valda provmängden (6.3) vägs upp i ett centrifugrör (5.3) och 50 ml 40 % etanol (4.1) tillsätts. Rör om med magnetomrörare i 20 minuter vid rumstemperatur. Lämna magnetstången i röret och centrifugera i 5 minuter. Sug försiktigt och avlägsna vätskefasen (t.ex. med en pasteurpipett). Upprepa denna extraktion två gånger med 25 ml etanol (4.1). För över restämnena till en mätkolv med volymen 100 ml (5.9) som innehåller ca 70 ml vatten. Tillsätt, efter upplösning eller suspendering, 100 mikroliter värmebeständigt alfaamylas (4.4) och värm vid 100 °C under en timme, exempelvis i ett vattenbad (5.12). Kyl ned till 60 °C i ett vattenbad och tillsätt 5 ml amyloglukosidaslösning (4.10). Låt kolven vara under 30 minuter i ett vattenbad vid 60 °C. Kyl ner till rumstemperatur, klara provet genom att tillsätta 1 ml Carrez I (4.12), skaka om och tillsätt sedan 1 ml Carrez II (4.13). Carrez I och II kan tillsättas före eller efter kylning. Späd till märket med vatten, homogenisera och filtrera lösningen genom ett veckat filter (5.6). Samla upp provextraktet.

6.5.2 Bearbetning av provextrakt

Filtrera extraktet genom ett skivfilter (5.7) med en spruta (5.10) som har försköljts med extraktet. Samla upp filtraten i provbehållare (5.8).

Obs.: Skivfiltret kan användas flera gånger. Det bör sköljas med nästa extrakt för att förhindra förorening från det föregående extraktet.

6.6. Kromatografi

HPLC utförs som normalt vid analys av socker. Eftersom proverna extraheras med etanol/vatten, är glukos den viktigaste sockerart som ska analyseras. Om HPLC-analysen visar spår av maltos kan detta tyda på att stärkelsen inte omvandlats helt.

7. **Kalkyl och resultat**

7.1 Beräkning av HPLC-resultaten

Resultaten av HPLC-analysen ligger till grund för beräkningen av glukoshalten (%, m/m). Den enzymatiska lösningen av amyloglukosidas (4.3) stabiliseras med glukos. Dessutom stabiliseras värmebeständigt alfaamylas (4.4) med sackaros, som delvis kan omvandlas till glukos genom invertasaktivitet hos amyloglukosidas. Den uppmätta glukoskoncentrationen (%, m/v) ska därför korrigeras för glukoskoncentrationen (%, m/v) i blankprovet. Glukoshalten (%, m/m) korrigerad för blankprovet beräknas därefter utifrån den korrigerade glukoskoncentrationen, provets vikt och kalibreringen med referenslösningar (4.11).

7.2 Beräkning av stärkelsehalten

Stärkelsehalten (%, m/m) beräknas utifrån glukoshalten (%, m/m) efter korrigering för blankprovet.

$$\text{Stärkelsehalt} = 0{,}9 * \text{glukos-korrigerad}$$

8. **Precision**

8.1 Jämförelse mellan laboratorier

Uppgifter om en jämförelse mellan laboratorier avseende metodens precision sammanfattas i punkt 8.4.

8.2 Repeterbarhet

Den absoluta skillnaden mellan två oberoende enskilda provresultat, som erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i samma laboratorium av samma person med användning av samma utrustning inom en kort tidsintervall, får inte överskrida repeterbarhetsgränsen på 1,1 % (m/m) i mer än 5 % av fallen. Repeterbarhetsgränsen har härletts från de sammanslagna resultaten av en jämförelse mellan laboratorier (se punkt 8.4).

8.3 Reproducerbarhet

Den absoluta skillnaden mellan två enskilda provresultat, som erhållits med samma metod på identiska provmaterial i olika laboratorier av olika personer som inte använder samma utrustning, får inte överskrida reproducerbarhetsgränsen på 3,7 % (m/m) i mer än 5 % av fallen. Repeterbarhetsgränsen har härletts från de sammanslagna resultaten av en jämförelse mellan laboratorier (se punkt 8.4).

8.4 Resultat av jämförelsen mellan laboratorier

Under 2005 och 2006 utfördes jämförelser mellan laboratorier med deltagande från EU:s tullaboratorier. Jämförelsen utfördes i enlighet med ISO 5725 och IUPAC-protokollet (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, vol. 67, 1995, s. 331–343). Precisionsdata återges i nedanstående tabell.

Statistiska resultat av jämförelsen mellan laboratorier

	Prov				
	1	2	3	4	5
Antal laboratorier efter eliminering av sådana med avvikande mätvärden	25	26	26	25	24
Antal godkända resultat	50	52	52	50	48
Genomsnittlig stärkelsehalt (%, m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Standardavvvikelse, repeterbarhet s_r (%, m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Repeterbarhetsgräns r (%, m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Standardavvvikelse, reproducerbarhet s_R (%, m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Reproducerbarhetsgräns R (%, m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Prov

1: torrfoder för hundar
2: torrfoder för katter
3: torrfoder för katter (prov 2) med tillsats av stärkelse
4: torrfoder för katter (prov 2) med tillsats av betmassa
5: kommersiellt foder för husdjur