

REGOLAMENTO (CE) N. 121/2008 DELLA COMMISSIONE

dell'11 febbraio 2008

che fissa il metodo di analisi per la determinazione del tenore di amido nelle preparazioni dei tipi utilizzati per l'alimentazione degli animali (codice NC 2309)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CEE) n. 2658/87 del Consiglio, del 23 luglio 1987, relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 9, paragrafo 1, lettera a),

considerando quanto segue:

- (1) Per garantire che le preparazioni dei tipi utilizzati per l'alimentazione degli animali (codice NC 2309) ricevano un trattamento uniforme all'atto dell'importazione nel territorio comunitario, occorre tenere conto, al momento di fissare i metodi di analisi, dell'evoluzione scientifica e tecnologica di tali metodi.
- (2) In conformità della terza direttiva 72/199/CEE della Commissione, del 27 aprile 1972, che fissa i metodi di analisi comunitari per i controlli degli alimenti per gli animali ⁽²⁾, per determinare il tenore di amido nelle preparazioni dei tipi utilizzati per l'alimentazione degli animali va utilizzato il metodo polarimetrico (detto anche metodo Ewers modificato), di cui all'allegato I, punto 1, della suddetta direttiva.
- (3) Sulla scorta degli studi effettuati dagli esperti dei laboratori doganali degli Stati membri, è necessario provvedere affinché, laddove il metodo polarimetrico di cui alla direttiva 72/199/CEE non possa essere applicato per determinare il tenore di amido nelle preparazioni summenzionate, si ricorra ad un metodo di analisi enzimatico. Occorre pertanto precisare in che modo effettuare l'analisi secondo tale metodo.
- (4) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere della sezione «Nomenclatura tariffaria e statistica» del comitato del codice doganale,

Articolo 1

In deroga all'articolo 1 della direttiva 72/199/CEE, il tenore, in peso, di amido nelle preparazioni dei tipi utilizzati per l'alimentazione degli animali ai sensi del codice NC 2309 è determinato utilizzando il metodo di analisi enzimatico di cui all'allegato del presente regolamento, qualora siano presenti in quantità significative le seguenti materie prime per mangimi:

- a) prodotti della barbabietola (da zucchero), come polpa di barbabietola (da zucchero), melasse di barbabietola (da zucchero), polpa di barbabietola (da zucchero) melassata, borslanda di barbabietola (da zucchero), zucchero di barbabietola;
- b) pastazzo di agrumi;
- c) semi di lino; pannello di lino; farina di estrazione di lino;
- d) semi di colza; pannello di colza; farina di estrazione di colza; cortecchia di colza;
- e) semi di girasole; farina di estrazione di girasole; farina di estrazione di girasole, parzialmente decorticato;
- f) pannello di copra; farina di estrazione di copra;
- g) polpa di patate;
- h) lievito disidratato;
- i) prodotti ricchi di inulina (ad esempio fettucce e farina di topinambur);
- j) ciccioli.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

⁽¹⁾ GU L 256 del 7.9.1987, pag. 1. Regolamento modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 1352/2007 della Commissione (GU L 303 del 21.11.2007, pag. 3).

⁽²⁾ GU L 123 del 29.5.1972, pag. 6. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 1999/79/CE (GU L 209 del 7.8.1999, pag. 23).

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, l'11 febbraio 2008.

Per la Commissione
László KOVÁCS
Membro della Commissione

ALLEGATO

METODO ENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE (HPLC) DEL TENORE DI AMIDO NELLE PREPARAZIONI UTILIZZATE NELL'ALIMENTAZIONE DEGLI ANIMALI**1. Campo d'applicazione**

Tale metodo descrive il procedimento per la determinazione enzimatica del tenore di amido negli alimenti per animali. Il contenuto di amido è ricavato mediante determinazione quantitativa del glucosio ottenuto dall'idrolisi enzimatica dell'amido presente nel campione. Il tenore di glucosio si ritiene interamente derivato dall'amido contenuto nel campione.

2. Definizioni

Il metodo permette di determinare il tenore di amido e dei relativi prodotti di degradazione ad elevato peso molecolare, non solubili in etanolo al 40 %. Il tenore di amido è espresso in percentuale (m/m).

3. Principio

I campioni sono omogeneizzati mediante macinazione. Ogni campione è lavato con etanolo al 40 % per eliminare gli zuccheri e i prodotti di degradazione dell'amido solubili.

L'enzima alfa-amilasi termostabile è aggiunto alla sospensione del campione in acqua. Alla temperatura di 100 °C questo enzima scinde l'amido in catene di glucosio più corte. Considerando che i grossi grumi di amido si idrolizzano molto lentamente, è opportuno che i campioni siano interamente solubilizzati o siano in forma di sospensione contenente delle particelle solide di piccole dimensioni. Quindi si aggiunge il secondo enzima, l'amiloglucosidasi, che ad una temperatura di 60 °C idrolizza le catene di glucosio in molecole di glucosio.

Il liquido ottenuto è sottoposto a chiarificazione per eliminare, mediante filtrazione, le proteine, i lipidi e i residui presenti ed ottenere così una soluzione limpida all'analisi HPLC.

Gli zuccheri presenti sono separati mediante HPLC.

4. Reattivi e altri materiali

Si raccomanda di utilizzare dei reattivi di grado analitico, ove non altrimenti specificato, ed acqua demineralizzata o distillata, preferibilmente microfiltrata.

4.1. Etanolo 40 % vol. in acqua.

4.2. Glucosio, min. 99 %.

4.3. Soluzione di amiloglucosidasi (1,4-alfa-D-Glucan glucoidrolasi) da *Aspergillus niger* (attività enzimatica > 5 000 U/ml). Temperatura di conservazione: circa 4 °C.

In alternativa, si può utilizzare anche amiloglucosidasi in polvere.

4.4. Alfa-amilasi termostabile (1,4-alfa-D-Glucan glucanoidrolasi). Temperatura di conservazione: circa 4 °C.

4.5. Acetato di zinco diidrato, p.a.

4.6. Esacianoferrato di potassio (II) ($K_4[Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$) extra puro.

4.7. Acetato di sodio anidro, p.a.

4.8. Acido acetico glaciale, 100 % (v/v).

4.9. Tampone di acetato di sodio (0,2 moli/l).

Pesare 16,4 grammi di acetato di sodio (4.7) in un becher, scioglierli in acqua e versare la soluzione ottenuta, e l'acqua di risciacquo, in un matraccio tarato da 1 000 ml. Portare a volume con acqua ed aggiustare il pH a 4,7 mediante aggiunta di acido acetico (4.8), verificare il pH utilizzando il pH-metro (5.11). Questa soluzione può essere utilizzata per un periodo massimo di sei mesi, se conservata a 4 °C.

4.10. Soluzione di amiloglucosidasi (attività enzimatica > 250 U/ml).

Preparare tale soluzione portando al volume finale di 100 ml, 5 ml della soluzione di amiloglucosidasi (oppure 660 mg di amiloglucosidasi in polvere) (4.3), con il tampone di acetato di sodio (4.9). La soluzione deve essere preparata al momento.

4.11. Soluzioni di riferimento.

Preparare delle soluzioni acquose di glucosio (4.2).

4.12. Reattivo di chiarificazione (Carrez I).

Pesare 219,5 grammi di acetato di zinco (4.5) in un becher. Scioglierli in acqua, versare il liquido ottenuto e l'acqua di risciacquo in un matraccio tarato da 1 000 ml e aggiungervi 30 ml di acido acetico (4.8). Mescolare accuratamente e portare a volume con acqua. La soluzione ottenuta può essere usata per un periodo massimo di sei mesi, se conservata a temperatura ambiente.

Si possono eventualmente usare altri reattivi di chiarificazione equivalenti alla soluzione Carrez.

4.13. Reattivo di chiarificazione (Carrez II).

Pesare in un becher 106,0 grammi di esacianoferrato di potassio (II) (4.6). Versare il liquido ottenuto e l'acqua di risciacquo in un matraccio tarato da 1 000 ml. Mescolare accuratamente e portare a volume con acqua. La soluzione ottenuta può essere usata per un periodo massimo di sei mesi, se conservata a temperatura ambiente.

Si possono eventualmente usare altri reattivi di chiarificazione equivalenti alla soluzione Carrez.

4.14. Fase mobile.

Preparare una fase mobile del tipo solitamente usato nell'analisi degli zuccheri mediante HPLC. Qualora si utilizzi, ad esempio, una colonna di gel di silice aminopropile, la fase mobile è normalmente costituita da una miscela di acqua e acetonitrile per HPLC.

5. **Apparecchiatura**

5.1. Comune vetreria da laboratorio di classe A

5.2. Centrifuga a 1 000 g o più (calcolati al centro della provetta)

5.3. Provette in vetro da centrifuga da 100 ml

5.4. Agitatore magnetico

5.5. Ancorette magnetiche

5.6. Filtri di carta a pieghe, quali ad es. i filtri di 185 mm

5.7. Filtri a disco per siringhe da 0,45 µm per soluzioni acquose

5.8. Fiale per campionatore automatico HPLC

5.9. Matracci da 100 ml

5.10. Siringhe di plastica da 5 e 10 ml

5.11. pH-metro

5.12. Bagno termostatico regolabile a 60 °C e 100 °C

5.13. Piastre riscaldanti dotate di agitatori magnetici

5.14. Apparecchio HPLC

5.14.1. Pompa per HPLC (esente da pulsazioni)

5.14.2. Eventuale campionatore automatico

5.14.3. Colonna e precolonna per l'analisi di zuccheri

5.14.4. Forno per colonne HPLC; con temperatura regolabile tra la temperatura ambiente ed almeno 40 °C

5.14.5. Rilevatore per analisi di zuccheri, quale ad es. un rivelatore a indice di rifrazione (RI)

5.14.6. Sistema d'integrazione

6. **Procedimento**

6.1. Generalità

I campioni sono analizzati singolarmente.

6.2. Preparazione del campione per tipologie diverse di prodotti

Il prodotto è omogeneizzato mediante macinazione.

6.3. Quantità di campione per l'analisi

Il tenore di amido è stimato in base agli ingredienti dichiarati. La quantità di campione da utilizzare per ogni singola determinazione (pesata con una precisione di 0,1 mg) è ricavata utilizzando la seguente formula:

$$\text{quantità del campione (g)} = \frac{\text{volume del matraccio (100 ml)}}{\text{tenore stimato di amido (g/100ml)}}$$

6.4. Determinazione del bianco

Il valore del bianco è determinato mediante un'analisi completa (condotta secondo le modalità descritte al punto 6.5), senza aggiungere il campione. Il risultato di tale analisi serve per il calcolo del tenore di amido (7.1).

6.5. Analisi

6.5.1. Preparazione dei campioni

Mescolare accuratamente il campione preventivamente macinato. Alla porzione da analizzare (6.3), pesata in una provetta da centrifuga (5.3), aggiungere 50 ml di etanolo al 40 % (4.1). Miscelare per 20 minuti con un agitatore magnetico, a temperatura ambiente. Lasciando l'ancoretta magnetica nella provetta, centrifugare per 5 minuti. Rimuovere la fase liquida (servendosi, ad esempio, di una pipetta Pasteur) aspirando con cautela. Ripetere due volte il procedimento d'estrazione descritto utilizzando ogni volta 25 ml di etanolo (4.1). Versare il residuo solido in un matraccio tarato da 100 ml (5.9) aiutandosi con circa 70 ml di acqua.

Portare in sospensione (o, se solubile, solubilizzare) il residuo, aggiungere 100 microlitri di alfa-amilasi termostabile (4.4) e riscaldare a 100 °C per un'ora, utilizzando il bagno termostatico (5.12). Raffreddare a 60 °C immergendo il matraccio nel bagno termostatico e aggiungere 5 ml di soluzione di amiloglicosidasi (4.10). Dopo l'aggiunta tenere il matraccio per 30 minuti nel bagno termostatico a 60 °C. Raffreddare a temperatura ambiente, procedere alla chiarificazione del campione aggiungendo 1 ml di Carrez I (4.12), agitare e successivamente aggiungere 1 ml di Carrez II (4.13). Il Carrez I e il Carrez II possono essere aggiunti indifferentemente prima o dopo il raffreddamento. Diluire il campione portando a volume con acqua, mescolare e quindi filtrare la soluzione attraverso il filtro a pieghe (5.6). Raccogliere la soluzione filtrata.

6.5.2. Trattamento soluzione filtrata

Filtrare di nuovo la soluzione mediante un filtro a disco (5.7) posto su una siringa (5.10) precedentemente avvinata con la stessa soluzione. Raccogliere il filtrato in fiale (5.8).

Nota: I filtri a disco possono essere usati diverse volte. Debbono essere però ogni volta avvinati con la nuova soluzione per evitare la contaminazione con la soluzione precedente.

6.6. Cromatografia

L'analisi HPLC è effettuata secondo le modalità normalmente utilizzate per l'analisi degli zuccheri. Essendo i campioni lavati preventivamente con etanolo al 40 % (4.1), lo zucchero presente è essenzialmente il glucosio, derivante dall'idrolisi dell'amido. Qualora dall'analisi HPLC risultassero tracce di maltosio, la loro presenza potrebbe indicare una conversione incompleta dell'amido.

7. Calcolo ed espressione dei risultati

7.1. Calcolo dei risultati dell'HPLC

Sulla base dei risultati dell'analisi HPLC si calcola il tenore di glucosio (espresso in %, m/m).

La soluzione enzimatica di amiloglicosidasi (4.3) è stabilizzata con glucosio. Inoltre, l'alfa-amilasi termostabile (4.4) è stabilizzata con saccarosio, che può essere parzialmente trasformato in glucosio per effetto dell'attività d'invertasi propria dell'amiloglicosidasi. La concentrazione di glucosio (% m/v) misurata deve perciò essere corretta in base alla concentrazione (% m/v) di glucosio riscontrata nel bianco. Il tenore di glucosio (% m/m) è quindi calcolato tenendo conto della concentrazione corretta del glucosio, del peso del campione e della calibrazione con soluzioni di riferimento (4.11).

7.2. Calcolo del tenore di amido

Il tenore di amido (% m/m) è calcolato tenendo conto del tenore di glucosio (% m/m) riscontrato all'analisi corretto del valore del bianco.

$$\text{Tenore di amido} = 0,9 * \text{tenore corretto di glucosio}$$

8. Precisione

8.1. Verifica interlaboratorio

Al punto 8.4 è descritto uno studio interlaboratorio condotto per verificare l'accuratezza del metodo.

8.2. Ripetibilità

La differenza assoluta tra i risultati di due prove indipendenti, eseguite dallo stesso operatore entro un breve lasso di tempo, utilizzando la stessa attrezzatura e lo stesso metodo sul medesimo materiale di prova, nello stesso laboratorio, non eccede il limite di ripetibilità dell'1,1 % (m/m) in non più del 5 % dei casi. Il limite di ripetibilità è stato ricavato dai risultati aggregati di una sperimentazione interlaboratorio (cfr. 8.4).

8.3. Riproducibilità

La differenza assoluta tra i risultati di due prove indipendenti, eseguite da diversi operatori in diversi laboratori, utilizzando lo stesso metodo sul medesimo materiale di prova e attrezzature diverse, eccede il limite di riproducibilità del 3,7 % (m/m) in non più del 5 % dei casi. Il limite di riproducibilità è stato ricavato dai risultati aggregati di una sperimentazione interlaboratorio (cfr. 8.4).

8.4. Risultati della verifica interlaboratorio

Nel 2005 e nel 2006 è stata condotta una verifica interlaboratorio a cui hanno partecipato i laboratori doganali europei. La verifica è stata effettuata in conformità alla norma ISO 5725 e al protocollo IUPAC (W. Horwitz, *Pure and Applied Chemistry*, vol. 67, 1995, pagg. 331-343). I dati di precisione sono riportati nella tabella seguente:

Risultati statistici dello studio interlaboratorio

	Campione				
	1	2	3	4	5
Numero di laboratori dopo l'eliminazione degli aberranti	25	26	26	25	24
Numero di risultati accettati	50	52	52	50	48
Tenore medio di amido (% m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Deviazione standard della ripetibilità s_r (% m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Limite di ripetibilità r (% m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Deviazione standard della riproducibilità s_R (% m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Limite di riproducibilità R (% m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Campioni

1: alimenti secchi per cani

2: alimenti secchi per gatti

3: alimenti secchi per gatti (campione 2) con amido aggiunto

4: alimenti secchi per gatti (campione 2) con polpa di barbabietola aggiunta

5: alimenti industriali per animali domestici