

Este texto es exclusivamente un instrumento de documentación y no surte efecto jurídico. Las instituciones de la UE no asumen responsabilidad alguna por su contenido. Las versiones auténticas de los actos pertinentes, incluidos sus preámbulos, son las publicadas en el Diario Oficial de la Unión Europea, que pueden consultarse a través de EUR-Lex. Los textos oficiales son accesibles directamente mediante los enlaces integrados en este documento

► **B**

REGLAMENTO (CE) N° 121/2008 DE LA COMISIÓN

de 11 de febrero de 2008

por el que se establece el método de análisis para la determinación del contenido de almidón en las preparaciones del tipo de las utilizadas para la alimentación de los animales (código NC 2309)

(DO L 37 de 12.2.2008, p. 3)

Modificado por:

		Diario Oficial		
		n°	página	fecha
► <u>M1</u>	Reglamento de Ejecución (UE) 2017/68 de la Comisión de 9 de enero de 2017	L 9	4	13.1.2017

▼B**REGLAMENTO (CE) N° 121/2008 DE LA COMISIÓN****de 11 de febrero de 2008****por el que se establece el método de análisis para la determinación del contenido de almidón en las preparaciones del tipo de las utilizadas para la alimentación de los animales (código NC 2309)***Artículo 1*

No obstante lo dispuesto en el artículo 1 de la Directiva 72/199/CEE, el contenido en peso de almidón en las preparaciones del tipo de las utilizadas para la alimentación de los animales correspondientes al código NC 2309 se determinará mediante el método analítico enzimático establecido en el anexo del presente Reglamento en los casos en que estén presentes en cantidades significativas las siguientes materias primas:

- a) productos de la remolacha (azucarera) como la pulpa de remolacha (azucarera), la melaza de remolacha (azucarera), la pulpa de remolacha (azucarera) melazada, la vinaza de remolacha (azucarera), el azúcar (de remolacha);
 - b) pulpa de cítricos;
 - c) linaza, torta de presión de linaza, extracto de linaza;
 - d) semillas de colza, torta de presión de semillas de colza, extracto de semillas de colza, cáscaras de semillas de colza;
 - e) semillas de girasol, extracto de semillas de girasol, extracto de semillas de girasol parcialmente peladas;
 - f) torta de presión de copra, extracto de copra;
 - g) pulpa de patata;
 - h) levadura deshidratada;
 - i) productos ricos en inulina (por ejemplo, rodajas y harina de patacas);
 - j) chicharrones;
- ▼M1**
- k) productos de soja.

▼B*Artículo 2*

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.



ANEXO

MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ALMIDÓN EN LAS PREPARACIONES UTILIZADAS PARA LA ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**1. Ámbito**

El presente método describe la determinación enzimática del contenido de almidón en piensos para animales. Este parámetro se obtiene a partir de la determinación cuantitativa de la glucosa obtenida tras haber hidrolizado enzimáticamente hasta glucosa el almidón presente. Se considera que toda la glucosa medida procede del almidón presente en la muestra.

2. Definiciones

Con este método se determina el contenido de almidón y de sus productos de degradación de elevado peso molecular, insolubles en etanol al 40 %. El contenido de almidón se expresa en % (m/m).

3. Principio

Las muestras se trituran para homogeneizarlas y se lavan con etanol al 40 % para eliminar los azúcares solubles y los productos solubles de degradación del almidón.

Se añade a la suspensión la enzima α -amilasa termoestable. Esta enzima degrada el almidón a 100 °C hasta cadenas más cortas, tanto si el almidón está totalmente disuelto como si no.

Los grumos grandes de almidón se degradan muy lentamente, por lo que es necesario que las muestras se disuelvan completamente o se presenten en forma de suspensión con partículas sólidas muy pequeñas.

Después se añade la segunda enzima, la amiloglicosidasa, que a 60 °C hidroliza hasta glucosa las cadenas de glucosa degradadas.

Tras la clarificación del líquido, proceso mediante el que se eliminan por filtración las proteínas, grasas y residuos presentes, se obtiene una solución clara que pueda utilizarse para HPLC.

La separación de los azúcares presentes se hace mediante HPLC.

4. Reactivos y otros materiales

Deben utilizarse reactivos con pureza reconocida de grado analítico y agua desmineralizada.

4.1. Etanol al 40 % en agua

4.2. Glucosa, con una pureza mínima del 99 %

4.3. Solución de amiloglicosidasa (1,4- α -D-glucano glucohidrolasa) de *Aspergillus niger* (actividad enzimática > 5 000 U/ml). Se conserva a unos 4 °C

También puede utilizarse amiloglicosidasa en polvo.

4.4. α -amilasa termoestable (1,4- α -D-glucano glucanohidrolasa). Se conserva a unos 4 °C

4.5. Acetato de zinc dihidrato, p. a.

4.6. Hexacianoferrato (II) de potasio ($K_4[Fe(CN)]_6 \cdot 3H_2O$), extra puro

4.7. Acetato de sodio anhidro, p. a.

4.8. Ácido acético glacial, 100 % (v/v)

▼B

- 4.9. Solución amortiguadora de acetato de sodio (0,2 mol/l)
- Se pesan 16,4 g de acetato de sodio (4.7) en un vaso de precipitados. Se disuelven en agua y se pasan, enjuagando el vaso, a un matraz aforado de 1 000 ml. Se enrasa con agua y se ajusta el pH a 4,7 con ácido acético utilizando un pH-metro (5.11). Esta solución puede conservarse durante un máximo de 6 meses a 4 °C.
- 4.10. Solución de amiloglucosidasa (actividad enzimática > 250 U/ml)
- Se prepara una solución con 5 ml de solución de amiloglucosidasa (4.3) o con 660 mg de amiloglucosidasa en polvo en un volumen final de 100 ml utilizando solución amortiguadora de acetato de sodio (4.9). La preparación se hace en el momento.
- 4.11. Soluciones de referencia
- Se preparan soluciones de glucosa en agua, como las utilizadas normalmente en el análisis con HPLC.
- 4.12. Reactivo de clarificación (Carrez I)
- Se disuelven 219,5 g de acetato de zinc (4.5) en agua, en un vaso de precipitados. Se pasan, enjuagando el vaso, a un matraz aforado de 1 000 ml; se añaden 30 ml de ácido acético (4.8); se mezcla bien y se enrasa con agua. Esta solución puede conservarse un máximo de 6 meses a temperatura ambiente.
- Es posible utilizar otros reactivos de clarificación, equivalentes a la solución de Carrez.
- 4.13. Reactivo de clarificación (Carrez II)
- Se disuelven 106,0 g de hexacianoferrato (II) de potasio (4.6) en agua, en un vaso de precipitados. Se pasan, enjuagando el vaso, a un matraz aforado de 1 000 ml; se mezcla bien y se enrasa con agua. Esta solución puede conservarse un máximo de 6 meses a temperatura ambiente.
- Es posible utilizar otros reactivos de clarificación, equivalentes a la solución de Carrez.
- 4.14. Fase móvil
- Se prepara una fase móvil que se utilice normalmente en el análisis de azúcares por HPLC. En caso de empleo de una columna de gel de sílice aminopropilada, puede citarse como ejemplo común de fase móvil una mezcla de acetonitrilo y agua de grado HPLC.
5. **Equipo**
- 5.1. Material de vidrio normal de laboratorio
- 5.2. Centrifuga de 1 000 g como mínimo (aceleración calculada en el centro del tubo)
- 5.3. Tubos de centrifuga de vidrio de 100 ml
- 5.4. Agitador magnético
- 5.5. Varillas magnéticas
- 5.6. Filtros de pliegues, por ejemplo de 185 mm
- 5.7. Filtros de jeringa, de 0,45 µm, adecuados para soluciones acuosas

▼B

- 5.8. Frascos de muestra adecuados para el automuestreador de HPLC
- 5.9. Matraces aforados de 100 ml
- 5.10. Jeringas de plástico, de 5 y 10 ml
- 5.11. pH-metro
- 5.12. Baño María con termostato, regulable a 60 °C y a 100 °C
- 5.13. Placas de calefacción con agitadores magnéticos
- 5.14. Equipo de HPLC
 - 5.14.1. Bomba sin pulsaciones
 - 5.14.2. Automuestreador
 - 5.14.3. Columna y precolumna, adecuadas para el análisis de azúcares
 - 5.14.4. Horno de columna, con temperaturas entre la ambiente y 40 °C
 - 5.14.5. Detector adecuado para el análisis de azúcares, como, por ejemplo, un detector de índice de refracción
 - 5.14.6. Sistema de integración

6. Procedimiento**6.1. Generalidades**

Las muestras se analizan en un solo ejemplar, no por duplicado.

6.2. Preparación de la muestra de varios tipos de productos

Las muestras se trituran para homogeneizarlas.

6.3. Porción de muestra

Se estima el contenido de almidón con ayuda de la declaración de ingredientes. Para calcular la cantidad de muestra (pesada con una precisión de 0,1 mg), puede utilizarse la fórmula siguiente:

$$\text{cantidad de muestra (g)} = \frac{\text{volumen del matraz aforado (100 ml)}}{\text{contenido estimado de almidón (\%)}}$$

6.4. Prueba en blanco

El blanco se determina efectuando un análisis completo (como se describe en 6.5) sin añadir muestra. El resultado de la prueba en blanco se utiliza para calcular el contenido de almidón (7.1).

6.5. Análisis**6.5.1. Preparación de la muestra**

La muestra se homogeneiza sacudiendo el recipiente o agitando con varilla. La porción de muestra elegida (6.3) se pesa en un tubo de centrifuga (5.3) y se añaden 50 ml de etanol al 40 % (4.1). Se agita durante 20 minutos a temperatura ambiente con un agitador magnético. Se deja la varilla magnética dentro del tubo y se centrifuga durante 5 minutos. Se aspira con cuidado para retirar la fase líquida (por ejemplo, con una pipeta Pasteur). Este procedimiento de extracción se repite dos veces con 25 ml de etanol (4.1). El residuo se pasa a un matraz aforado de 100 ml (5.9) con unos 70 ml de agua. Tras disolverlo o suspenderlo, se

▼B

añaden 100 µl de α -amilasa termoestable (4.4) y se calienta a 100 °C durante una hora, por ejemplo en un baño María (5.12). Se enfría a 60 °C en un baño María y se añaden 5 ml de una solución de amiloglucosidasa (4.10). Se pone el matraz durante 30 minutos al baño María a 60 °C, se enfría a temperatura ambiente, se clarifica añadiendo 1 ml de Carrez I (4.12), se sacude y a continuación se añade 1 ml de Carrez II (4.13). Las soluciones de Carrez I y II pueden añadirse antes o después de enfriar. Se enrasa con agua, se homogeneiza y se pasa la solución a través de un filtro de pliegues (5.6). Se recoge el extracto de la muestra.

6.5.2. Tratamiento de los extractos de la muestra

Se pasan los extractos a través de un filtro de disco (5.7) con una jeringa (5.10) que se ha purgado previamente con el extracto. Los filtrados se recogen en frascos (5.8).

Nota: El filtro de disco puede utilizarse varias veces. Debe purgarse con el extracto siguiente para evitar su contaminación por el extracto anterior.

6.6. Cromatografía

Se realiza una HPLC normal para análisis de azúcares. Como las muestras se han sometido a extracción con etanol/agua, el principal azúcar que se va a analizar es la glucosa. Si el análisis con HPLC revela trazas de maltosa, puede deberse a que la transformación del almidón ha sido incompleta.

7. Cálculo y presentación de los resultados

7.1. Cálculo de los resultados de la HPLC

El contenido de glucosa (% m/m) se calcula a partir de los resultados del análisis con HPLC. La solución enzimática de amiloglucosidasa (4.3) se estabiliza con glucosa. Por otra parte, la α -amilasa termoestable (4.4) se estabiliza con sacarosa, que puede transformarse parcialmente en glucosa mediante la actividad de invertasa de la amiloglucosidasa. Por tanto, la concentración de glucosa (% m/v) medida debe corregirse para tener en cuenta la concentración de glucosa (% m/v) en el blanco. El contenido de glucosa (% m/m) corregido en función del blanco se calcula a partir de la concentración corregida de glucosa, el peso de la muestra y la calibración con soluciones de referencia (4.11).

7.2. Cálculo del contenido de almidón

El contenido de almidón (% m/m) se calcula a partir del contenido de glucosa (% m/m), previamente corregido en función del blanco.

$$\text{Contenido de almidón} = 0,9 * \text{contenido de glucosa corregido}$$

8. Precisión

8.1. Prueba interlaboratorios

En 8.4 se resumen los datos de una prueba interlaboratorios sobre la precisión del método.

8.2. Repetibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados independientes y únicos de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material de prueba, en el mismo laboratorio, por el mismo operario, con el mismo equipo, dentro de un breve plazo, no superará en más del 5 % de los casos el límite de repetibilidad del 1,1 % (m/m). El límite de repetibilidad se ha obtenido a partir del conjunto de resultados de una prueba interlaboratorios (véase 8.4).

▼B

8.3. Reproducibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados únicos de una prueba, obtenidos utilizando el mismo método con el mismo material de prueba, en distintos laboratorios, por distintos operarios, con distintos equipos, no superará en más del 5 % de los casos el límite de reproducibilidad del 3,7 % (m/m). El límite de reproducibilidad se ha obtenido a partir del conjunto de resultados de una prueba interlaboratorios (véase 8.4).

8.4. Resultados de la prueba interlaboratorios

En 2005 y 2006 se efectuó una prueba interlaboratorios con participación de los laboratorios aduaneros europeos. La prueba se ajustó a la norma ISO 5725 y al protocolo de la IUPAC (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, vol. 67, 1995, p. 331-343). Los datos sobre la precisión se recogen en el cuadro siguiente:

Resultados estadísticos de la prueba interlaboratorios

	Muestra				
	1	2	3	4	5
Número de laboratorios tras la eliminación de los valores anómalos	25	26	26	25	24
Número de resultados aceptados	50	52	52	50	48
Contenido medio de almidón (% m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Desviación típica de la repetibilidad s_r (% m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Límite de la repetibilidad r (% m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Desviación típica de la reproducibilidad s_R (% m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Límite de la reproducibilidad R (% m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Muestras

1: comida seca para perros

2: comida seca para gatos

3: comida seca para gatos (muestra 2) con adición de almidón

4: comida seca para gatos (muestra 2) con adición de pulpa de remolacha

5: comida comercial para animales de compañía