VERORDNUNG (EG) Nr. 121/2008 DER KOMMISSION

vom 11. Februar 2008

zur Festlegung der Analysemethode zur Bestimmung des Stärkegehalts in Zubereitungen von der zur Fütterung verwendeten Art (KN-Code 2309)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung (EWG) Nr. 2658/87 des Rates vom 23. Juli 1987 über die zolltarifliche und statistische Nomenklatur sowie den Gemeinsamen Zolltarif [1], insbesondere auf Artikel 9 Absatz 1 Buchstabe a,

in Erwägung nachstehender Gründe:

(1) Um sicherzustellen, dass Zubereitungen von der zur Fütterung verwendeten Art (KN-Code 2309) bei der Einfuhr in die Gemeinschaft einheitlich behandelt werden, muss bei der Festlegung der Analysemethoden die wissenschaftlich-technische Entwicklung der Analysemethoden berücksichtigt werden.

(2) Nach der Dritten Richtlinie der Kommission 72/199/EWG vom 27. April 1972 zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln [2] wird der Stärkegehalt in Zubereitungen von der zur Fütterung verwendeten Art nach dem in Anhang 1 Nummer 1 der genannten Richtlinie beschriebenen polarimetrischen Verfahren (auch „abgewandelte Ewers-Methode“ genannt) bestimmt.

(3) Angesichts der Ergebnisse von Studien, die von den Sachverständigen der Zolllabors der Mitgliedstaaten durchgeführt wurden, ist vorzusehen, dass in den Fällen, in denen das in der Richtlinie 72/199/EWG festgelegte polarimetrische Verfahren zur Bestimmung des Stärkegehalts in den genannten Zubereitungen nicht angewandt werden kann, eine enzymatische Analysemethode anzuwenden ist. Daher ist festzulegen, wie diese enzymatische Methode durchzuführen ist.

(4) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ausschusses für den Zollkodex, Fachbereich zolltarifliche und statistische Nomenklatur —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Abweichend von Artikel 1 der Richtlinie 72/199/EWG wird der Stärkegehalt von Zubereitungen von der zur Fütterung verwendeten Art im Sinne des KN-Codes 2309 nach der im Anhang dieser Verordnung festgelegten enzymatischen Analysemethode bestimmt, wenn die folgenden Futtermittel in bedeutenden Mengen vorliegen:

a) (Zucker-)Rübenerzeugnisse wie z. B. (Zucker-)Rübenpülpe, (Zucker-)Rübenmelasse, (Zucker-)Rübenpülpe-melassiert, (Zucker-)Rübenvinasse, (Rüben-)Zucker;

b) Zitruspülpe;

c) Lein; Leinkuchen; Leinextraktionsschrot;

d) Rapssaat; Rapskuchen; Rapsextraktionsschrot; Rapsschalen;

e) Sonnenblumensaat; Sonnenblumenextraktionsschrot; Sonnenblumenextraktionsschrot aus teilgeschälter Saat;

f) Kokoskuchen; Kokosextraktionsschrot;

g) Kartoffelpülpe;

h) Trockenhefe;

i) Erzeugnisse mit hohem Inulingehalt (z. B. Topinambur-Chips und Mehl);

j) Grieben.

Artikel 2

Diese Richtlinie tritt am zwanzigsten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Union* in Kraft.

[1] ABL. L 256 vom 7.9.1987, S. 1. Verordnung zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1352/2007 (ABl. L 303 vom 21.11.2007, S. 3).

[2] ABl. L 123 vom 29.5.1972, S. 6. Richtlinie zuletzt geändert durch die Richtlinie 1999/79/EG (ABl. L 209 vom 7.8.1999, S. 23).

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 11. Februar 2008

Für die Kommission
László KOVÁCS
Mitglied der Kommission

ANHANG

ENZYMATISCHE METHODE ZUR BESTIMMUNG DES STÄRKEGEHALTS IN ZUBEREITUNGEN VON DER ZUR FÜTTERUNG VERWENDETEN ART MITTELS HOCHDRUCKFLÜSSIGCHROMATOGRAFIE (HPLC)

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Methode ermöglicht die enzymatische Bestimmung des Stärkegehalts in Futtermitteln. Der Stärkegehalt wird durch quantitative Bestimmung der Glucose nach enzymatischem Abbau der Stärke zu Glucose bestimmt. Die gesamte gemessene Glucose stammt von der in der Probe enthaltenen Stärke.

2. **Definitionen**

Mit diesem Verfahren werden der Gehalt an Stärke und ihre in Ethanol 40 % unlöslichen hochmolekularen Abbauprodukte bestimmt. Der Stärkegehalt wird in % (m/m) ausgedrückt.

3. **Prinzip**

Die Proben werden durch Mahlen homogenisiert. Die Probe wird mit Ethanol 40 % gewaschen, um lösliche Zucker und lösliche Produkte des Stärkeabbaus zu eliminieren.

Das thermostabile Enzym alpha-Amylase wird zur Suspension zugegeben. Das Enzym spaltet die Stärke bei 100 °C in kürzere Ketten auf, unabhängig davon, ob die Stärke vollständig gelöst ist. Größere Stärkestücke werden sehr langsam aufgespalten. Daher müssen die Proben völlig gelöst sein oder in Form einer Suspension mit sehr kleinen Feststoffteilchen vorliegen.

Dann wird das zweite Enzym Amyloglucosidase zugegeben, das die abgebauten Glucoseketten bei 60 °C zu Glucose hydrolysiert.

Nach Klären der Flüssigkeit, wobei die vorhandenen Proteine, Fette und Rückstände nach Filtration verworfen werden, bleibt eine klare Lösung zurück, die mittels HPLC untersucht werden kann.

Die Trennung der vorhandenen Zucker erfolgt mittels HPLC.

4. **Reagenzien und andere Materialien**

Es sind Reagenzien mit anerkanntem analytischen Gehalt und entmineralisiertes Wasser zu verwenden.

4.1. Ethanol 40 Vol.-% in Wasser

4.2. Glucose, mindestens 99 %

4.3. Amyloglucosidaselösung (1,4-alpha-D-Glucan-glucohydrolase) aus Aspergillus niger (Enzymaktivität > 5 000 U/ml). Lagerung bei ca. 4 °C.

Alternativ kann auch Amyloglucosidasepulver verwendet werden.

4.4. Thermostabile alpha-Amylase (1,4-alpha-D-Glucan-glucanohydrolase). Lagerung bei ca. 4 °C.

4.5. Zinkacetatdihydrat, p.a.

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

4.7. Natriumacetat, wasserfrei, p.a.

4.8. Essigsäure, 100 % (v/v)

4.9. Natriumacetatpuffer (0,2 mol/l)

16,4 g Natriumacetat (4.7) in ein Becherglas einwiegen, in Wasser auflösen und in einen 1 000-ml-Messkolben gießen. Bis zur Marke mit Wasser auffüllen und den pH-Wert mit Essigsäure (mithilfe eines pH-Meters (5.11)) auf 4,7 einstellen. Diese Lösung ist bei 4 °C bis zu 6 Monate haltbar.

4.10. Amyloglucosidaselösung (Enzymaktivität > 250 U/ml)

5 ml Amyloglucosidaselösung (4.3) oder 660 mg Amyloglucosidasepulver mithilfe des Natriumacetatpuffers (4.9) auf 100 ml auffüllen. Die Lösung muss immer frisch angesetzt werden.

4.11. Referenzlösung

Eine für die HPLC-Analyse übliche Standardlösung von Glucose in Wasser zubereiten.

4.12. Klärungsreagenz (Carrez I)

219,5 g Zinkacetat (4.5) in einem Becherglas in Wasser auflösen, in einen 1 000-ml-Messkolben gießen, 30 ml Essigsäure (4.8) zugeben, gründlich mischen und mit Wasser auffüllen. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur bis zu 6 Monate haltbar.

Es können auch andere, der Carrez-Lösung äquivalente Klärungsreagenzien verwendet werden.

4.13. Klärungsreagenz (Carrez II)

106,0 g Kaliumhexacyanoferrat (II) (4.6) in einem Becherglas in Wasser auflösen, in einen 1 000-ml-Messkolben gießen, gründlich mischen und mit Wasser auffüllen. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur bis zu 6 Monate haltbar.

Es können auch andere, der Carrez-Lösung äquivalente Klärungsreagenzien verwendet werden.

4.14. Mobile Phase

Es wird eine mobile Phase zubereitet, wie sie üblicherweise bei der HPLC-Analyse von Zuckern verwendet wird. Bei Verwendung einer Aminopropyl-Kieselgelsäule z. B. eine Mischung aus HPLC-Wasser und Acetonitril.

5. **Geräte**

5.1. Übliche Laborglasgefäße

5.2. Zentrifuge mit mindestens 1 000 g (berechnet auf Mitte Zentrifugenrohr)

5.3. Glasröhrchen für die Zentrifuge, 100 ml

5.4. Magnetrührwerk

5.5. Magnetrührstäbchen

5.6. Faltenfilter, z. B. 185 mm

5.7. Spritzenfilter, 0,45 µm, für wässrige Lösungen geeignet

5.8. Probengläschen, geeignet für HPLC-Probengeber

5.9. Messkolben, 100 ml

5.10. Kunststoffspritzen, 5 und 10 ml

5.11. pH-Meter

5.12. Wasserbad mit Thermostat, einstellbar auf 60 °C und 100 °C

5.13. Heizplatten mit Magnetrührgerät

5.14. HPLC-Apparat

5.14.1. Pumpe, pulsationsfrei

5.14.2. Probengeber

5.14.3. Säule und Vorsäule, für Zuckeranalyse geeignet

5.14.4. Säulenofen, Temperaturbereich zwischen Raumtemperatur und 40 °C

5.14.5. Detektor, zur Zuckeranalyse geeignet, z. B. Refraktionsindexdetektor

5.14.6. Integrationssystem

6. **Verfahren**

6.1. Allgemeines

Die Analyse der Proben erfolgt als Einfachbestimmung.

6.2. Vorbereitung der Probe für verschiedene Produktarten

Das Produkt wird durch Mahlen homogenisiert.

6.3. Probenmenge

Der Stärkegehalt wird anhand der Inhaltsstoffe geschätzt. Die Einwaage der Probe (auf 0,1 mg genau) kann nach folgender Formel abgeschätzt werden:

$$\text{Masse der Probe (g)} = \frac{\text{Volumen des Messkolbens (100 ml)}}{\text{geschätzter Stärkegehalt (\%)}}$$

6.4. Blindversuch

Für den Blindversuch wird eine vollständige Analyse (wie unter Ziffer 6.5 beschrieben) ohne Zugabe einer Probe durchgeführt. Das Ergebnis des Blindversuchs wird zur Berechnung des Stärkegehalts verwendet (7.1).

6.5. Analyse

6.5.1. Probenvorbereitung

Die Proben durch Schütteln oder Rühren mischen. Die Probenmenge (6.3) wird in ein Zentrifugenröhrchen (5.3) eingewogen, mit 50 ml Ethanol 40 % aufgefüllt und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur mittels Magnetrührer gerührt. Das Magnetrührstäbchen wird im Zentrifugenröhrchen belassen und es wird 5 Minuten zentrifugiert. Die flüssige Phase sorgfältig absaugen (z. B. mit einer Pasteurpipette). Dieses Extraktionsverfahren mit zweimal 25 ml Ethanol (4.1) wiederholen. Den Rückstand in einen 100-ml-Messkolben (5.9) überführen und mit ca. 70 ml Wasser auffüllen.

Zu der Suspension 100 Mikroliter thermostabile alpha-Amylase (4.4) zugeben und eine Stunde bei 100 °C im Wasserbad (5.12) erhitzen. Die Lösung auf 60 °C abkühlen und 5 ml Amyloglucosidaselösung (4.10) zugeben. Den Messkolben 30 Minuten in ein Wasserbad bei 60 °C stellen und anschließend auf Raumtemperatur abkühlen. 1 ml Carrez I (4.12) zugeben, schütteln und danach 1 ml Carrez II (4.13) zugeben. Carrez I und II können vor oder nach dem Abkühlen zugegeben werden. Der Messkolben wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt, geschüttelt und die Lösung durch ein Faltenfilter (5.6) filtriert. Das Filtrat (Probenextrakt) wird aufgefangen.

6.5.2. Behandlung der Probenextrakte

Die Extrakte mit einer Spritze (5.10), die mit dem Extrakt vorgespült wurde, durch ein Spritzenfilter filtrieren. Die Filtrate in Probengläschen (5.8) auffangen.

Anmerkung: Das Spritzenfilter kann mehrmals verwendet werden. Es muss mit dem jeweils folgenden Extrakt gespült werden, um Verunreinigung durch den vorhergehenden Extrakt auszuschließen.

6.6. Chromatografie

Die HPLC wird wie bei der Analyse von Zuckern üblich durchgeführt. Da die Proben mit Ethanol/Wasser extrahiert werden, ist Glucose der wichtigste zu analysierende Zucker. Ergibt die HPLC Spuren von Maltose, deutet dies auf eine unvollständige Stärkekonversion hin.

7. **Berechnung und Darstellung der Ergebnisse**

7.1. Berechnung der HPLC-Ergebnisse

Der Glucosegehalt (%, m/m) wird aus den Ergebnissen der HPLC-Analyse berechnet.

Die Amyloglucosidaselösung (4.3) wird mit Glucose stabilisiert. Außerdem wird die thermostabile alpha-Amylase (4.4) mit Saccharose stabilisiert, die durch Invertase-Aktivität der Amyloglucosidase teilweise zu Glucose umgewandelt werden kann. Daher ist die gemessene Glucosekonzentration (%, m/v) um die Glucosekonzentration (%, m/v) im Blindversuch zu berichtigen. Der berichtigte Glucosegehalt (%, m/m) wird dann ausgehend von der berichtigten Glucosekonzentration, der Masse der Probe und der Kalibrierung mit Referenzlösungen (4.11) berechnet.

7.2. Berechnung des Stärkegehalts

Der Stärkegehalt (%, m/m) wird aus dem berichtigten Glucosegehalt (%, m/m) berechnet.

$$\text{Stärkegehalt} = 0{,}9 * \text{Glucose berichtigt}$$

8. **Genauigkeit**

8.1. Laborvergleichsstudie

Nähere Angaben zu der im Rahmen der Laborvergleichsstudie ermittelten Genauigkeit der Methode sind unter Ziffer 8.4 zusammengefasst.

8.2. Wiederholbarkeit

Die absolute Differenz zwischen zwei unabhängigen Einzeltestergebnissen, die in einer kurzen Zeitspanne mit derselben Methode an identischem Testmaterial in demselben Labor von demselben Prüfer unter Verwendung derselben Ausrüstung erzielt wurden, darf in höchstens 5 % der Fälle die Wiederholgrenze von 1,1 % (m/m) übersteigen. Die Wiederholgrenze wurde aus den zusammengefassten Ergebnissen der Laborvergleichsstudie abgeleitet (siehe Ziffer 8.4).

8.3. Reproduzierbarkeit

Die absolute Differenz zwischen zwei Einzeltestergebnissen, die mit derselben Methode an identischem Testmaterial in unterschiedlichen Labors von unterschiedlichen Prüfern unter Verwendung unterschiedlicher Ausrüstung erzielt wurden, darf in höchstens 5 % der Fälle die Vergleichsgrenze von 3,7 % (m/m) übersteigen. Die Vergleichsgrenze wurde aus den zusammengefassten Ergebnissen einer Laborvergleichsstudie abgeleitet (siehe Ziffer 8.4).

8.4. Ergebnisse der Laborvergleichsstudie

2005 und 2006 wurde eine Laborvergleichsstudie durchgeführt, an der die europäischen Zolllabore teilnahmen. Sie wurde nach ISO 5725 und dem IUPAC-Protokoll (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, vol. 67, 1995, p. 331-343) durchgeführt. Die Genauigkeitsdaten sind in der nachstehenden Tabelle angegeben.

Statistische Ergebnisse der Laborvergleichsstudie

	Probe				
	1	2	3	4	5
Anzahl der nach Ausschluss der Ausreißer berücksichtigten Labors	25	26	26	25	24
Anzahl berücksichtigter Ergebnisse	50	52	52	50	48
Mittlerer Stärkegehalt (%, m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Wiederholbarkeit Standardabweichung s_r (%, m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Wiederholgrenze r (%, m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Reproduzierbarkeit Standardabweichung s_R (%, m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Vergleichsgrenze R (%, m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Muster

1: Hundetrockenfutter
2: Katzentrockenfutter
3: Katzentrockenfutter (Probe 2) mit Stärkezusatz
4: Katzentrockenfutter (Probe 2) mit Zusatz von Rübenschnitzeln
5: handelsübliches Heimtierfutter