KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 121/2008,

11. veebruar 2008,

millega sätestatakse loomasöödana kasutatavate toodete (valmististe) (CN-kood 2309) tärklisesisalduse määramisemeetod

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 23. juuli 1987. aasta määrust (EMÜ) nr 2658/87 tariifi- ja statistikanomenklatuuri ning ühise tollitariifistiku kohta, [1] eriti selle artikli 9 lõike 1 punkti a,

ning arvestades järgmist:

(1) Loomasöödana kasutatavate toodete (valmististe) (CN-kood 2309) ühetaolise kohtlemise tagamiseks ühendusse importimisel on vaja, et analüüsimeetodite sätestamisel võetakse arvesse nende meetodite teaduslikku ja tehnilist arengut.

(2) Vastavalt komisjoni 27. aprilli 1972. aasta kolmandale direktiivile 72/199/EMÜ, millega kehtestatakse loomasööda ametlikuks kontrolliks vajalikud ühenduse analüüsimeetodid, [2] kohaldatakse loomasöödana kasutatavate toodete (valmististe) tärklisesisalduse määramisel kõnealuse direktiivi I lisa punktis 1 kirjeldatud polarimeetrilist meetodit (tuntud ka kui modifitseeritud Ewersi meetod).

(3) Silmas pidades liikmesriikide tollilaborite ekspertide teostatud uuringuid, on vaja sätestada, et juhul kui nimetatud toodete tärklisesisalduse määramiseks ei ole võimalik kohaldada direktiivis 72/199/EMÜ sätestatud polarimeetrilist meetodit, siis tuleks kohaldada ensümaatilist analüüsimeetodit. Seepärast on asjakohane täpsustada, kuidas ensümaatilist meetodit kasutatakse.

(4) Käesoleva määrusega ettenähtud meetmed on kooskõlas tolliseadustiku komitee tariifi- ja statistikanomenklatuuri osakonna arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Erandina direktiivi 72/199/EMÜ artiklist 1 kasutatakse loomasöödana kasutatavate toodete (valmististe) tärklisesisalduse määramiseks CN-koodi 2309 tähenduses käesoleva määruse lisas sätestatud ensümaatilist analüüsimeetodit juhul, kui järgmisi söötasid on märkimisväärses koguses:

a) (suhkru)peedisaadused, näiteks (suhkru)peedipulp, (suhkru)-peedimelass, melasseeritud (suhkru)peedipulp, (suhkru)peedimelassi raba, (peedi)suhkur;

b) tsitruspulp;

c) linaseemned; linakook; linasrott;

d) rapsiseemned; rapsikook; rapsisrott; rapsiseemnekestad;

e) päevalilleseemned; päevalillesrott; päevalillesrott osaliselt kooritud päevalilleseemnetest;

f) koprakook; koprasrott;

g) kartulipulp;

h) kuivpärm;

i) inuliinirikkad tooted (nt maapirniliistakud ja -jahu);

j) kõrned.

Artikkel 2

Käesolev määrus jõustub kahekümnendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

[1] EÜT L 256, 7.9.1987, lk 1. Määrust on viimati muudetud komisjoni määrusega (EÜ) nr 1352/2007 (ELT L 303, 21.11.2007, lk 3).

[2] EÜT L 123, 29.5.1972, lk 6. Direktiivi on viimati muudetud direktiiviga 1999/79/EÜ (EÜT L 209, 7.8.1999, lk 23).

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 11. veebruar 2008

Komisjoni nimel
komisjoni liige
László KOVÁCS

LISA

LOOMASÖÖDANA KASUTATAVATE TOODETE (VALMISTISTE) TÄRKLISESISALDUSE MÄÄRAMISE ENSÜMAATILINE MEETOD KÕRGRÕHUVEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) KASUTAMISEGA

1. **Rakendusala**

Kõnealune meetod kirjeldab loomasööda tärklisesisalduse ensümaatilist määramist. Pärast olemasoleva tärklise ensümaatilist lagundamist glükoosiks määratakse tärklisesisaldus glükoosi koguse järgi. Eeldatakse, et kogu mõõdetud glükoosi hulk on saadud proovis sisaldunud tärklisest.

2. **Määratlused**

Kõnealuse meetodiga määratakse tärklise ja selle 40 % etanoolis mittelahustuvate kõrgmolekulaarsete lagunemissaaduste sisaldus. Tärklisesisaldust väljendatakse protsentides massist (m/m).

3. **Põhimõte**

Proovid homogeenitakse jahvatamisega. Lahustuva suhkru ja tärklise lahustuvate lagunemissaaduste eemaldamiseks pestakse proovi 40 % etanooliga.

Suspensioonile lisatakse termostabiilne ensüüm alfa-amülaas. Kõnealune ensüüm lagundab tärklise 100 °C juures väiksemateks süsivesinikahelateks, olenemata sellest, kas tärklis on täielikult lahustunud või mitte.

Suuremad tärklisetükid lagunevad väga aeglaselt. Seepärast on vajalik, et proovid oleksid kas täielikult lahustunud või väga väikesi tahkeid osakesi sisaldava suspensioonina.

Seejärel lisatakse teine ensüüm amüloglükosidaas, millega lagundatud glükoosiahelad 60 °C juures hüdrolüüsitakse glükoosiks.

Pärast vedeliku selitamist, mille käigus filtritakse välja valgud, rasvad ja jäägid ning visatakse ära, saadakse selge lahus, mida saab analüüsida HPLC meetodiga.

Olemasolevate suhkrute eraldamine toimub HPLC meetodiga.

4. **Reaktiivid ja muud materjalid**

Kasutatakse tunnustatud analüütiliselt puhtaid reaktiive ja demineraliseeritud vett.

4.1. 40-mahuprotsendiline etanool vees

4.2. Glükoos, sisaldus vähemalt 99 %

4.3. *Aspergillus niger*'ist saadud amüloglükosidaasi (1,4-alfa-D-glükaani glükohüdrolaas) lahus (ensüümi aktiivsus > 5 000 U/ml). Säilitatakse 4 °C juures.

Teise võimalusena võib kasutada amüloglükosidaasi pulbrit.

4.4. Termostabiilne alfa-amülaas (1,4-alfa-D-glükaaniglükanohüdrolaas). Säilitatakse 4 °C juures.

4.5. Tsinkatsetaatdihüdraat, analüütiliselt puhas

4.6. Kaaliumheksatsüanoferraat (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), eriti puhas

4.7. Veevaba naatriumatsetaat, analüütiliselt puhas

4.8. Jää-äädikhape 100 % (v/v)

4.9. Naatriumatsetaatpuhverlahus (0,2 mol/l)

16,4 g naatriumatsetaati (4.7) kaaluda keeduklaasi. Lahustada vees ja kanda üle 1 000 ml mõõtekolbi. Lahjendada veega kuni märgini ning viia pH väärtus äädikhappega 4,7-ni (kasutades pH-meetrit (5.11)). 4 °C juures säilitades on lahus kasutamiskõlblik kuni kuus kuud.

4.10. Amüloglükosidaasi lahus (ensüümi aktiivsus > 250 U/ml)

Naatriumatsetaatpuhverlahuse (4.9) kasutamisega valmistada ensüümi lahus lõppmahuga 100 ml, lahustades selleks 5 ml amüloglükosidaasi lahust (4.3) või 660 mg amüloglükosidaasi pulbrit. Valmistada vahetult enne kasutamist.

4.11. Võrdluslahus

Valmistada glükoosi vesilahused nagu tavaliselt HPLC analüüsi puhul.

4.12. Selitusreaktiiv (Carrezi lahus I)

Lahustada 219,5 g tsinkatsetaati (4.5) vees keeduklaasis. Kanda üle 1 000 ml mõõtekolbi, lisada 30 ml äädikhapet (4.8). Segada hoolikalt ja täita veega kuni märgini. Toatemperatuuril säilitamisel on lahus kasutamiskõlblik kuni kuus kuud.

Võib kasutada ka muid Carrezi lahusega analoogilisi selitusreaktiive.

4.13. Selitusreaktiiv (Carrezi lahus II)

Lahustada 106,0 g kaaliumheksatsüanoferraati (II) (4.6) vees keeduklaasis. Kanda üle 1 000 ml mõõtekolbi. Segada hoolikalt ja täita veega kuni märgini. Toatemperatuuril säilitamisel on lahus kasutamiskõlblik kuni kuus kuud.

Võib kasutada ka muid Carrezi lahusega analoogilisi selitusreaktiive.

4.14. Liikuv faas

Valmistatakse liikuv faas, mida tavaliselt kasutatakse suhkrute HPLC-analüüsi puhul. Aminopropüülsilikageeli kolonni kasutamisel näiteks kasutatakse liikuva faasina tavaliselt HPLC-puhtusastmega vee ja atsetonitriili segu.

5. **Seadmed**

5.1. Tavalised klaasist laborinõud

5.2. Tsentrifuug, millega saadakse vähemalt 1 000 g kiirendus (arvutatuna tsentrifuugitopsi keskelt)

5.3. 100-milliliitrised klaasist tsentrifuugitopsid

5.4. Magnetsegisti

5.5. Magnetpulgad

5.6. Kurdfiltrid, nt 185 mm

5.7. Süstalfiltrid, 0,45 µm, vesilahuste jaoks

5.8. Väikesed proovipudelid (viaalid), HPLC-automaatproovivõtja (autosampleri) jaoks

5.9. 100 ml mõõtekolvid

5.10. Plastsüstlad, 5 ml ja 10 ml

5.11. pH-meeter

5.12. Temperatuurile 60 °C ja 100 °C reguleeritav termostaadiga vesivann

5.13. Magnetsegistiga kuumutusplaadid

5.14. HPLC-seadmed

5.14.1. Pulsatsioonivaba pump

5.14.2. Automaatproovivõtja (autosampler)

5.14.3. Kolonn ja eelkolonn, suhkru analüüsiks

5.14.4. Kolonnahi, mille temperatuuri saab reguleerida toatemperatuurist kuni 40 °C-ni

5.14.5. Detektor suhkruanalüüsiks, nt refraktomeeter

5.14.6. Integreeriv süsteem.

6. **Menetlus**

6.1. Üldosa

Iga proovi analüüsitakse üks kord.

6.2. Proovi ettevalmistamine mitut liiki toodete puhul

Toode homogeniseeritakse jahvatamisega.

6.3. Proovi suurus

Toote koostise andmete põhjal hinnatakse tärklisesisaldus. Prooviks vajalik kogus (kaalutakse 0,1 mg täpsusega) hinnatakse järgmise valemi järgi:

$$\text{proovi mass (g)} = \frac{\text{mõõtekolvi maht (100 ml)}}{\text{hinnanguline tärklisesisaldus (\%)}}$$

6.4. Pimekatse

Pimekatse puhul tehakse täielik analüüs (nagu kirjeldatud 6.5), ilma proovi lisamata. Pimekatse tulemust arvestatakse tärklisesisalduse arvutamisel (7.1).

6.5. Analüüs

6.5.1. Proovide ettevalmistamine

Proovi loksutada või segada. Valitud proovikogus (6.3) kaalutakse tsentrifuugitopsi (5.3) ja lisatakse 50 ml 40-mahuprotsendilist etanooli (4.1). Segada magnetsegistiga toatemperatuuril 20 minutit. Magnetpulk jätta topsi ja tsentrifuugida viis minutit. Ettevaatlikult eemaldada vedelfaas imemise teel (nt Pasteuri pipetiga). Korrata ekstraheerimist kaks korda 25 ml etanooliga (4.1). Jääk kanda üle 100 ml mõõtekolbi (5.9) ja täita ligikaudu 70 ml veega.

Pärast lahustamist või suspendeerimist lisada 100 mikroliitrit termostabiilset alfa-amülaasi (4.4) ja soojendada 100 °C juures tund aega, nt vesivannis (5.12). Jahutada vesivannis 60 °C-ni ja lisada 5 ml amüloglükosidaasi lahust (4.10). Kolb panna 30 minutiks 60 °C veetemperatuuriga vesivanni. Jahutada toatemperatuurini, proov selitada 1 ml Carrezi lahuse I (4.12) lisamisega, loksutada ja seejärel lisada Carrezi lahus II (4.13). Carrezi lahused I ja II võib lisada enne või pärast jahutamist. Lahjendada veega kuni märgini, homogeniseerida ja saadud lahus filtreerida läbi kurdfiltri (5.6). Proovi ekstrakt koguda.

6.5.2. Proovi ekstraktide töötlemine

Ekstraktid viia sama ekstraktiga eelnevalt loputatud süstlaga (5.10) ketasfiltrile (5.7). Filtraadid koguda väikestesse proovipudelitesse (5.8).

Märkus: Ketasfiltrit võib kasutada mitu korda. Seda tuleb loputada järgmise ekstraktiga, et vältida saastumist eelmise ekstraktiga.

6.6. Kromatograafia

HPLC viiakse läbi suhkruanalüüsile tavapärasel viisil. Kuna proovid on ekstraheeritud etanooli/veega, siis on glükoos peamine analüüsitav suhkur. Kui HPLC analüüs näitab maltoosi jälgede olemasolu, siis võib oletada tärklise mittetäielikku muundumist.

7. **Tulemuste arvutamine ja esitamine**

7.1. HPLC-tulemuste arvutamine

Glükoosisisaldus (%, m/m) arvutatakse HPLC-analüüsi tulemuste põhjal. Ensüüm amüloglükosidaasi lahus (4.3) on stabiliseeritud glükoosiga. Lisaks sellele on termostabiilne alfa-amülaas (4.4) stabiliseeritud sahharoosiga, mis amüloglükosidaasi invertaasi aktiivsuse tõttu võib osaliselt muundada glükoosiks. Seepärast tuleb glükoosi mõõdetud sisaldust (%, m/v) korrigeerida pimekatses määratud glükoosisisalduse (%, m/v) võrra. Pimekatses määratud glükoosisisalduse (%, m/m) järgi korrigeeritud glükoosisisalduse kaudu arvutatakse seejärel tegelik glükoosisisaldus, proovi massi ja võrdluslahuste (4.11) alusel.

7.2. Tärklisesisalduse arvutamine

Tärklisesisaldus (%, m/m) arvutatakse pimekatses määratud glükoosisisalduse (%, m/m) võrra korrigeeritud glükoosisisaldusest.

$$\text{Tärklisesisaldus} = 0{,}9 * \text{korrigeeritud glükoos}$$

8. **Täpsus**

8.1. Laboritevaheline katse

Meetodi täpsuse kohta tehtud laboritevahelise katse üksikasjad on kokkuvõtlikult esitatud punktis 8.4.

8.2. Korratavus

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (teostatud lühikese ajavahemiku jooksul samal meetodil, identse katsematerjaliga, samas laboris, sama katse läbiviija poolt, samu katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel võib korratavuse 1,1 % (m/m) piirnormi ületada üksnes 5 % juhtudest. Korratavuse piirnorm on saadud laboritevahelise katse koondatud tulemustest (vt 8.4).

8.3. Reprodutseeritavus

Absoluutne erinevus kahe sõltumatu üksikkatse (teostatud samal meetodil, identse katsematerjaliga, erinevates laborites, erineva katse läbiviija poolt, erinevaid katseseadmeid kasutades) tulemuste vahel võib reprodutseeritavuse 3,7 % (m/m) piirnormi ületada üksnes 5 % juhtudest. Reprodutseeritavuse piirnorm on saadud laboritevahelise katse koondatud tulemustest (vt 8.4).

8.4. Laboritevahelise katse tulemused

Euroopa tollilaborite osalusega laboritevaheline katse tehti 2005. ja 2006. aastal. Katse teostati vastavalt ISO 5725 ja Rahvusvaheline Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liidu (IUPAC) protokollile (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, 67. köide, 1995, lk 331–343). Järgnevas tabelis on esitatud andmed täpsuse kohta.

Laboritevahelise katse statistilised tulemused

	Proov				
	1	2	3	4	5
Laborite arv pärast ilmsete vigade kõrvalejätmist	25	26	26	25	24
Arvessevõetavate tulemuste arv	50	52	52	50	48
Keskmine tärklisesisaldus (%, m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Korratavuse standardhälve s_r (%, m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Korratavuse piirnorm r (%, m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Reprodutseeritavuse standardhälve s_R (%, m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Reprodutseeritavuse piirnorm R (%, m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Proovid

1: kuiv koeratoit
2: kuiv kassitoit
3: kuiv kassitoit (proov 2) tärkliselisandiga
4: kuiv kassitoit (proov 2) peedilõikelisandiga
5: kaubanduslik lemmikloomatoit