KOMISSION ASETUS (EY) N:o 121/2008,

annettu 11 päivänä helmikuuta 2008,

eläinten ruokintaan käytettävien valmisteiden (CN-koodi 2309) tärkkelyspitoisuuden määritysmenetelmästä

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon tariffi- ja tilastonimikkeistöstä ja yhteisestä tullitariffista 23 päivänä heinäkuuta 1987 annetun neuvoston asetuksen (ETY) N:o 2658/87 ([1]) ja erityisesti sen 9 artiklan 1 kohdan a alakohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Sen varmistamiseksi, että eläinten ruokintaan käytettäviä valmisteita (CN-koodi 2309) kohdellaan yhteisöön tuotaessa yhdenmukaisesti, on määritysmenetelmiä vahvistettaessa tarpeen ottaa huomioon näiden menetelmien tieteellinen ja tekninen kehitys.

(2) Yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 27 päivänä huhtikuuta 1972 annetun kolmannen komission direktiivin 72/199/ETY ([2]) mukaisesti on sovellettava kyseisen direktiivin liitteessä I olevassa 1 kohdassa kuvattua polarimetristä menetelmää, jota kutsutaan myös modifioiduksi Ewersin menetelmäksi, kun määritetään tärkkelyspitoisuutta valmisteissa, jollaisia käytetään eläinten ruokintaan.

(3) Jäsenvaltioiden tullilaboratorioiden asiantuntijoiden tutkimusten mukaan on tarpeen säätää, että niissä tapauksissa, joissa direktiivissä 72/199/ETY vahvistettua polarimetristä menetelmää ei voida soveltaa mainittujen valmisteiden tärkkelyspitoisuuden määritykseen, olisi käytettävä entsymaattista määritysmenetelmää. Sen vuoksi on aiheellista täsmentää, miten entsymaattinen määritys suoritetaan.

(4) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat tullikoodeksikomitean tariffi- ja tilastonimikkeistöjaoston lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Direktiivin 72/199/ETY 1 artiklasta poiketen CN-koodissa 2309 tarkoitettujen eläinten ruokintaan käytettävien valmisteiden tärkkelyspitoisuus painoyksikköinä määritetään tämän asetuksen liitteessä vahvistetulla entsymaattisella määritysmenetelmällä silloin, kun valmisteissa esiintyy merkittäviä määriä seuraavia rehuaineita:

a) (sokeri)juurikastuotteet, kuten (sokeri)juurikasleike, (sokeri)juurikasmelassi, melassoitu (sokeri)juurikasleike, (sokeri)juurikasrankki, (juurikas)sokeri;

b) sitrushedelmämassa;

c) pellavansiemenet, pellavansiemenkakku, pellavansiemenrouhe;

d) rypsinsiemenet, rypsikakku, rypsirouhe, rypsinsiementen kuoret;

e) auringonkukansiemenet, auringonkukkarouhe, auringonkukkarouhe osaksi kuorituista siemenistä;

f) kookoskakku, kookosrouhe;

g) perunapulppa;

h) kuivahiiva;

i) runsaasti inuliinia sisältävät tuotteet (esim. maa-artisokkaleike ja -jauho);

j) rasvan sulatuksessa muodostuva valkuaisjäänne.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kahdentenakymmenentenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

([1]) EYVL L 256, 7.9.1987, s. 1. Asetus sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission asetuksella (EY) N:o 1352/2007 (EUVL L 303, 21.11.2007, s. 3).

([2]) EYVL L 123, 29.5.1972, s. 6. Direktiivi sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna direktiivillä 1999/79/EY (EYVL L 209, 7.8.1999, s. 23).

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 11 päivänä helmikuuta 2008.

Komission puolesta

László KOVÁCS

Komission jäsen

LIITE

ELÄINTEN RUOKINTAAN KÄYTETTÄVIEN VALMISTEIDEN TÄRKKELYSPITOISUUDEN ENTSYMAATTINEN MÄÄRITYSMENETELMÄ SUUREN EROTUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIALLA (HPLC)

1. **Soveltamisala**

Tässä menetelmässä selostetaan tärkkelyspitoisuuden entsymaattinen määritys rehuista. Tärkkelyspitoisuus lasketaan glukoosista, joka määritetään kvantitatiivisesti, kun tärkkelys on entsymaattisesti hajotettu glukoosiksi. Kaiken mitatun glukoosin oletetaan olevan peräisin näytteen sisältämästä tärkkelyksestä.

2. **Määritelmät**

Tällä menetelmällä määritetään tärkkelyksen ja sen 40-prosenttiseen etanoliin liukenemattomien suurimolekyylisten hajoamistuotteiden pitoisuus. Tärkkelyspitoisuus ilmaistaan massaprosentteina (m/m).

3. **Periaate**

Näytteet homogenoidaan jauhamalla. Näytettä pestään 40-prosenttisella etanolilla liukoisten sokerien ja tärkkelyksen liukoisten hajoamistuotteiden poistamiseksi.

Suspensioon lisätään lämpöstabiilia alfa-amylaasientsyymiä. Entsyymi hajottaa tärkkelyksen 100 °C:ssa pienemmiksi ketjuiksi riippumatta siitä, onko tärkkelys kokonaan liuennut. Suuret tärkkelysmöykyt hajoavat hyvin hitaasti. Näytteiden pitäisi siksi olla kokonaan liuenneina tai hyvin pieniä kiinteitä hiukkasia sisältävänä suspensiona.

Seuraavaksi lisätään toinen entsyymi, amyloglukosidaasi, joka hydrolysoi hajonneet glukoosiketjut glukoosiksi 60 °C:n lämpötilassa.

Liuoksesta poistetaan suodattamalla proteiinit, rasvat ja muut jäämät. Kirkas liuos voidaan käyttää HPLC-analyysiin (suuren erotuskyvyn nestekromatografia).

Liuoksessa olevat sokerit erotetaan HPLC:llä.

4. **Reagenssit ja muut aineet**

Käytetään analyyttistä laatua olevia reagensseja ja demineralisoitua vettä.

4.1 Etanoli, 40 %, vesiliuos

4.2. Glukoosi, väh. 99 %

4.3 *Aspergillus nigeristä* saadun amyloglukosidaasin (1,4-alfa-D-glukaaniglukohydrolaasi) liuos (entsyymiaktiivisuus > 5 000 U/ml). Varastointilämpötila noin 4 °C.

Amyloglukosidaasia voidaan käyttää myös jauheena.

4.4 Lämpöstabiili alfa-amylaasi (1,4-alfa-D-glukaaniglukanohydrolaasi). Varastointilämpötila noin 4 °C

4.5 Sinkkiasetaattidihydraatti, analyysilaatua

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

4.7 Vedetön natriumasetaatti, analyysilaatua

4.8 Jääetikka, 100 % (v/v)

4.9 Natriumasetaattipuskuriliuos, 0,2 mol/l

Punnitaan dekanterilasiin 16,4 g natriumasetaattia (4.7). Liuotetaan veteen ja huuhdellaan 1 000 ml:n mittapulloon. Laimennetaan merkkiin vedellä ja säädetään pH natriumasetaatin arvoon etikkahapolla (käytä pH-mittaria (5.11)). Liuos on käyttökelpoinen enintään 6 kuukautta varastoituna 4 °C:ssa.

4.10 Amyloglukosidaasiliuos (entsyymiaktiivisuus > 250 U/ml)

Valmistetaan liuos, jossa on 5 ml amyloglukosidaasiliuosta (4.3) tai 660 mg amyloglukosidaasijauhetta 100 ml:ssä natriumasetaattipuskuria (4.9). Valmistetaan juuri ennen käyttöä..

4.11 Vertailuliuos

Valmistetaan HPLC-analyysissä tavallisesti käytettävät glukoosin vesiliuokset.

4.12 Selkeytysreagenssi (Carrez I)

Liuotetaan 219,5 g sinkkiasetaattia (4.5) veteen dekanterilasissa. Siirretään huuhtelemalla 1 000 ml:n mittapulloon ja lisätään 30 ml etikkahappoa (4.8). Sekoitetaan hyvin ja täytetään vedellä merkkiin. Liuos on käyttökelpoinen enintään 6 kuukautta varastoituna ympäristön lämpötilassa.

Saa käyttää myös muita Carrez'n liuosta vastaavia selkeytysliuoksia.

4.13 Selkeytysreagenssi (Carrez II)

Liuotetaan 106,0 g kaliumheksasyanoferraattia (II) (4.6) veteen dekanterilasissa. Siirretään huuhtelemalla 1 000 ml:n mittapulloon. Sekoitetaan hyvin ja täytetään vedellä merkkiin. Liuos on käyttökelpoinen enintään 6 kuukautta varastoituna ympäristön lämpötilassa.

Saa käyttää myös muita Carrez'n liuosta vastaavia selkeytysliuoksia.

4.14 Liikkuva faasi

Valmistetaan liikkuva faasi, jota käytetään tavanomaisesti sokerien HPLC-analyysissä. Jos käytetään aminopropyylipiihappogeelipylvästä, tavanomainen liikkuva faasi on esim. HPLC-laatuisen veden ja asetonitriilin sekoitus.

5. **Välineistö**

5.1 Tavanomaisia laboratorion lasiastioita

5.2 Sentrifugi, jolla saadaan vähintään 1 000 g:tä (laskettuna putken keskikohdalle)

5.3 100 ml:n lasisia sentrifugiputkia

5.4 Magneettisekoitin

5.5 Magneettisekoitussauvoja

5.6 Laskostettuja suodattimia, esim. 185 mm

5.7 Ruiskusuodattimia, 0,45 µm, vesiliuoksille

5.8 HPLC-laitteen näytteenkäsittelylaitteeseen sopivia näyteampulleja

5.9 100 ml:n mittapulloja

5.10 Muoviruiskuja, 5 ja 10 ml

5.11 pH-mittari

5.12 Termostaattisäätöinen vesihaude, joka voidaan säätää välillä 60–100 °C

5.13 Lämpölevyjä, joissa magneettisekoitin

5.14 HPLC-laitteisto

5.14.1 Pumppu, joka voi toimia pulssittomasti

5.14.2 Automaattinen näytteenkäsittelylaite

5.14.3 Pylväs ja esipylväs, jotka sopivat sokerianalyysiin

5.14.4 Pylväsuuni, jonka lämpötila-alue on ympäristön lämpötilan ja 40 °C:n välillä

5.14.5 Sokerianalyysiin sopiva detektori, esim. taitekerroindetektori

5.14.6 Integrointijärjestelmä

6. **Menettely**

6.1 Yleistä

Näytteet analysoidaan yksittäin.

6.2 Näytteen valmistus erityyppisistä tuotteista

Tuote homogenoidaan jauhamalla.

6.3 Näytteen määrä

Tärkkelyspitoisuus arvioidaan ilmoitettujen ainesosien määrien avulla. Näytteen määrä (punnittuna 0,1 mg:n tarkkuudella) arvioidaan seuraavasta kaavasta:

$$\text{näytteen määrä (g)} = \frac{\text{mittapullon tilavuus (100 ml)}}{\text{arvioitu tärkkelyspitoisuus (\%)}}$$

6.4 Nolla-arvon määritys

Nolla-arvo määritetään tekemällä täydellinen analyysi (6.5 kohdan mukaisesti) ilman näytettä. Nolla-arvoa käytetään tärkkelyspitoisuuden laskemisessa (7.1).

6.5 Analyysi

6.5.1 Näytteiden valmistelu

Näyte sekoitetaan ravistamalla tai sekoittamalla. Valittu näytemäärä (6.3) punnitaan sentrifugiputkeen (5.3) ja lisätään 50 ml 40-prosenttista etanolia (4.1). Sekoitetaan magneettisekoittimella 20 minuuttia ympäröivässä lämpötilassa. Jätetään magneettisekoitussauva putkeen ja sentrifugoidaan 5 minuuttia. Nestefaasi imetään varovasti pois (esim. Pasteur-pipetillä). Uutto toistetaan kahdesti 25 ml:lla etanolia (4.1). Jäännös siirretään 100 ml:n mittapulloon (5.9) n. 70 ml:lla vettä.

Kun aine on liuennut tai suspensiossa, lisätään 100 mikrolitraa lämpöstabiilia alfa-amylaasia (4.4) ja kuumennetaan 100 °C:ssa 1 tunti esim. vesihauteessa (5.12). Jäähdytetään 60 asteeseen vesihauteessa ja lisätään 5 ml amyloglukosidaasiliuosta (4.10). Mittapullo asetetaan 30 minuutiksi 60 asteen vesihauteeseen. Jäähdytetään ympäristön lämpötilaan, näyte selkeytetään lisäämällä 1 ml Carrez I liuosta (4.12), ravistetaan ja lisätään 1 ml Carrez II liuosta (4.13). Carrez I ja II liuokset voidaan lisätä joko ennen jäähdytystä tai sen jälkeen. Laimennetaan merkkiin vedellä, homogenoidaan ja suodatetaan liuos laskostetun suodattimen läpi (5.6). Näyteuute otetaan talteen.

6.5.2 Näyteuutteiden käsittely

Uutteet suodatetaan levysuodattimen (5.7) läpi ruiskulla (5.10), joka on huuhdeltu uutteella. Suodokset kerätään ampulleihin (5.8).

Huomautus: Levysuodatinta voi käyttää monta kertaa. Se olisi huuhdeltava seuraavaksi suodatettavalla näytteellä näytteiden kontaminaation estämiseksi.

6.6 Kromatografia

HPLC suoritetaan sokerianalyysille tavanomaiseen tapaan. Koska näytteet on uutettu etanoli-vesiseoksella, glukoosi on tärkein analysoitava sokeri. Jos HPLC-analyysi osoittaa maltoosin jäämiä, se voi olla merkki tärkkelyksen epätäydellisestä muuntumisesta.

7. Tulosten laskeminen ja ilmaiseminen

7.1 HPLC-tulosten laskeminen

Glukoosipitoisuus (massaprosenttia) lasketaan HPLC-analyysin tuloksista. Glukoosi stabiloi amyloglukosidaasiliuoksen (4.3). Sukroosi stabiloi lisäksi lämpöstabiilia alfa-amylaasia (4.4). Amyloglukosidaasin invertaasiaktiivisuus voi muuntaa sukroosin osittain glukoosiksi. Mitattu glukoosikonsentraatio (%, massa/tilavuus) olisi sen vuoksi oikaistava nollanäytteen antaman glukoosikonsentraation (%, massa/tilavuus) suhteen. Nollanäytteen suhteen oikaistu glukoosipitoisuus (massaprosenttia) lasketaan sen jälkeen oikaistun glukoosikonsentraation, näytteen painon ja vertailuliuosten kanssa tehdyn kalibroinnin avulla (4.11).

7.2 Tärkkelyspitoisuuden laskeminen

Tärkkelyspitoisuus (massaprosenttia) lasketaan glukoosipitoisuudesta (massaprosenttia) nollakorjauksen jälkeen..

$$\text{Tärkkelyspitoisuus} = 0{,}9 * \text{oikaistu glukoosi}$$

8. Tarkkuus

8.1 Monilaboratoriotesti

Kohdassa 8.4 esitetään yhteenveto menetelmän tarkkuutta koskevasta monilaboratoriotestistä.

8.2. Toistettavuus

Absoluuttinen ero kahden riippumattoman yksittäisen testituloksen välillä, kun sama henkilö on käyttänyt samaa menetelmää samalla välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille samassa laboratoriossa lyhyen ajan kuluessa, saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin 1,1 massaprosentin toistettavuusraja. Toistettavuusraja on saatu monilaboratoriotestin (ks. 8.4) yhdistetyistä tuloksista.

8.3 Uusittavuus

Absoluuttinen ero kahden yksittäisen testituloksen välillä, kun eri henkilöt ovat käyttäneet samaa menetelmää eri välineistöllä täysin samanlaiselle testimateriaalille eri laboratorioissa, saa korkeintaan 5 prosentissa tapauksista olla suurempi kuin 3,7 massaprosentin uusittavuusraja. Uusittavuusraja on saatu monilaboratoriotestin (ks. 8.4) yhdistetyistä tuloksista.

8.4 Monilaboratoriotestin tulokset

Vuosina 2005 ja 2006 tehtiin monilaboratoriotesti, johon Euroopan tullilaboratoriot osallistuivat. Testi tehtiin ISO 5725 standardin ja IUPACin protokollan (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, vol. 67, 1995, s. 331–343) mukaisesti. Jäljempänä oleva taulukko sisältää tarkkuutta koskevat tiedot.

Tilasto monilaboratoriotestin tuloksista

	Näyte				
	1	2	3	4	5
Laboratorioiden määrä harha-arvojen eliminoinnin jälkeen	25	26	26	25	24
Hyväksyttyjen tulosten määrä	50	52	52	50	48
Keskimääräinen tärkkelyspitoisuus (massaprosenttia)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Toistettavuuden keskihajoama s_r (massaprosenttia)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Toistettavuusraja r (massaprosenttia)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Uusittavuuden keskihajoama s_R (massaprosenttia)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Uusittavuusraja R (massaprosenttia)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Näytteet

1: kuiva koiranruoka
2: kuiva kissanruoka
3: lisättyä tärkkelystä sisältävä kuiva kissanruoka (näyte 2)
4: lisättyä juurikasleikettä sisältävä kuiva kissanruoka (näyte 2)
5: kaupallinen lemmikkieläinten ruoka