# A BIZOTTSÁG 121/2008/EK RENDELETE

**(2008. február 11.)**

**az állatok etetésére szolgáló készítmények (KN-kód: 2309) keményítőtartalmának meghatározására szolgáló analitikai módszer megállapításáról**

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a vám- és a statisztikai nómenklatúráról, valamint a Közös Vámtarifáról szóló, 1987. július 23-i 2658/87/EGK tanácsi rendeletre [1] és különösen annak 9. cikke (1) bekezdésének a) pontjára,

mivel:

(1) Annak érdekében, hogy az állatok etetésére szolgáló készítmények (KN-kód: 2309) behozatalkor egységes bánásmódban részesüljenek az egész Közösségben, az analitikai módszerek meghatározásakor figyelembe kell venni a módszerek tudományos és technológiai fejlődését.

(2) A takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról szóló, 1972. április 27-i 72/199/EGK harmadik bizottsági irányelvvel [2] összhangban az állatok etetésére szolgáló készítmények keményítőtartalmának meghatározására az irányelv I. mellékletének 1. pontjában leírt polarimetriás módszert (más néven: a módosított Ewers-módszert) kell alkalmazni.

(3) A tagállamok vámlaboratóriumainak szakértői által végzett vizsgálatok fényében rendelkezni kell arról, hogy ha a 72/199/EGK irányelvben meghatározott polarimetriás módszer nem alkalmazható az említett készítmények keményítőtartalmának meghatározására, akkor enzimes analitikai módszert kell használni. Ezért indokolt részletezni az enzimes módszer végrehajtásának módját.

(4) Az e rendeletben előírt intézkedések összhangban vannak a Vámkódexbizottság vám- és statisztikai nómenklatúrával foglalkozó részlegének véleményével,

ELFOGADTA EZT A RENDELETET:

*1. cikk*

A 72/199/EGK irányelv 1. cikkétől eltérve, a 2309 KN-kód szerinti, az állatok etetésére szolgáló készítmények tömegszázalékban kifejezett keményítőtartalmát az e rendelet mellékletében megállapított enzimes analitikai módszerrel kell meghatározni az alábbi takarmány-alapanyagok nagy mennyiségű jelenléte esetében:

a) (cukor)répakészítmények, pl. (cukor)répapép, (cukor)répamelasz, (cukor)répapép-melasz, (cukor)répaseprő, (répa)cukor;

b) citruspép;

c) lenmag; sajtolás után visszamaradt lenmagpogácsa, kivonás után visszamaradt lenmagpogácsa;

d) repcemag; sajtolás után visszamaradt repcemagpogácsa; kivonás után visszamaradt repcemagpogácsa; repcemaghéj;

e) napraforgómag; kivonás után visszamaradt napraforgómagpogácsa, kivonás után visszamaradt részlegesen hántolt napraforgómag-pogácsa;

f) sajtolás után visszamaradt koprapogácsa; kivonás után visszamaradt koprapogácsa;

g) burgonyapép;

h) szárított élesztő;

i) inulinban gazdag termékek (pl. csicsókaszeletek és csicsókaliszt);

j) töpörtyű.

*2. cikk*

Ez a rendelet az *Európai Unió Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő huszadik napon lép hatályba.

[1] HL L 256., 1987.9.7., 1. o. A legutóbb az 1352/2007/EK bizottsági rendelettel (HL L 303., 2007.11.21., 3. o.) módosított rendelet.

[2] HL L 123., 1972.5.29., 6. o. A legutóbb az 1999/79/EK irányelvvel (HL L 209., 1999.8.7., 23. o.) módosított irányelv.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

Kelt Brüsszelben, 2008. február 11-én.

*a Bizottság részéről*
László KOVÁCS
*a Bizottság tagja*

*MELLÉKLET*

## ENZIMES MÓDSZER AZ ÁLLATOK ETETÉSÉRE SZOLGÁLÓ KÉSZÍTMÉNYEK KEMÉNYÍTŐTARTALMÁNAK NAGYNYOMÁSÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA (HPLC) HASZNÁLATÁVAL TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSÁHOZ

1. **Alkalmazási terület**

Ez a módszer az állati eledelek keményítőtartalmának enzimes meghatározását írja le. A keményítőtartalom a szőlőcukor mennyiségének meghatározása révén állapítható meg, miután a jelen lévő keményítőt enzimekkel szőlőcukorrá bontják. A mért szőlőcukor-mennyiség teljes egészét a mintában található keményítőből származónak tekintik.

2. **Fogalommeghatározások**

A módszerrel a keményítőtartalom és 40 %-os etanolban nem oldódó, nagy molekulatömegű bomlástermékei határozhatók meg. A keményítőtartalmat tömegszázalékban fejezik ki (m/m).

3. **Alapelv**

A mintákat őrléssel homogenizálják. A mintát az oldódó cukrok és a keményítő oldódó bomlástermékeinek eltávolítása érdekében 40 %-os etanollal mossák.

A szuszpenzióhoz hőstabil alfa-amiláz enzimet adnak. Az enzim 100 °C-on kisebb láncokra bontja a keményítőt függetlenül attól, hogy annak oldódása tökéletes volt-e. A nagyobb keményítődarabok nagyon lassan bomlanak le. Ezért a mintát tökéletesen fel kell oldani, vagy nagyon kicsi szilárd darabokat tartalmazó szuszpenzió formájában kell használni.

Ezután hozzáadják a második, amiloglükozidáz enzimet, amely a lebontott szőlőcukorláncokat 60 °C-on szőlőcukorrá hidrolizálja.

A folyadék derítése után, amelynek során a jelen lévő fehérjéket, zsírokat és maradékanyagokat szűréssel eltávolítják, HPLC-elemzésre alkalmas, tiszta oldatot kapnak.

A jelen lévő cukrok elválasztását HPLC-vel végzik.

4. **Reagensek és egyéb anyagok**

Minden reagensnek analitikai tisztaságúnak, a víznek pedig ioncseréltnek kell lennie.

4.1. 40 %-os (v/v) etanol, vízben

4.2. Szőlőcukor, legalább 99 %-os

4.3. Aspergillus nigerből származó amiloglükozidáz oldata (1,4-alfa-D-glükán glükohidroláz) (enzimaktivitás > 5 000 U/ml). Tárolás kb. 4 °C-on.

Alternatív megoldásként amiloglükozidáz por is használható.

4.4. Hőstabil alfa-amiláz (1,4-alfa-D-glükán glükohidroláz). Tárolás kb. 4 C-on.

4.5. Cink-acetát-dihidrát, analitikai tisztaságú (p.a.)

4.6. Kálium-hexacianoferrát (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), extra tisztaságú

4.7. Vízmentes nátrium-acetát, analitikai tisztaságú (p.a.)

4.8. 100 %-os (v/v) jégecet

4.9. Nátrium-acetát puffer (0,2 mol/l)

Mérjünk ki 16,4 gramm nátrium-acetátot (4.7.) egy főzőpohárba. Oldjuk fel vízben, és öntsük bele egy 1 000 ml-es mérőlombikba. A jelzésig hígítsuk vízzel, és a pH-értéket ecetsav alkalmazásával (pH-mérő [5.11.] segítségével) állítsuk be 4,7-re. Az oldat 4 °C-on tárolva legfeljebb hat hónapig használható fel.

4.10. Amiglükozidáz-oldat (enzimaktivitás > 250 U/ml)

5 ml amiloglükozidáz-oldatból (4.3.) vagy 660 mg amiloglükozidáz-porból nátrium-acetát puffer (4.9.) használatával oldatot készítünk, amelynek végső térfogata 100 ml. Azonnal készítsük el.

4.11. Referenciaoldat

Készítsünk a HPLC-elemzésben hagyományos módon használt oldatot vízben feloldott szőlőcukorból.

4.12. Reagens a derítéshez (Carrez I)

Oldjunk fel egy főzőpohárban 219,5 gramm cink-acetátot (4.5.) vízben. Öntsük át egy 1 000 ml-es mérőlombikba, és adjunk hozzá 30 ml ecetsavat (4.8.). Alaposan keverjük össze, és töltsük fel vízzel. Az oldat szobahőmérsékleten tartva legfeljebb hat hónapig használható fel.

Más, a Carrez oldattal egyenértékű derítő reagens is használható.

4.13. Reagens a derítéshez (Carrez II)

Oldjunk fel egy főzőpohárban 106,0 gramm kálium-hexacianoferrátot (II) (4.6.) vízben. Öntsük egy 1 000 ml-es mérőlombikba. Alaposan keverjük össze, és öntsük fel vízzel. Az oldat szobahőmérsékleten tárolva legfeljebb hat hónapig használható fel.

Más, a Carrez oldattal egyenértékű derítő reagens is használható.

4.14. Mozgó fázis

Készítsük el a cukrok HPLC-elemzése során hagyományosan használt mozgó fázist. Amennyiben aminopropil szilikagél-oszlopot használunk, az általánosan használt mozgó fázis például HPLC-tisztaságú víz és acetonitril elegye.

5. **Felszerelés**

5.1. Normál laboratóriumi üvegedények

5.2. 1 000 g értékű vagy erősebb centrifuga (a cső közepén mérve)

5.3. 100 ml-es üveg centrifugacsövek

5.4. Mágneses keverő

5.5. Mágneses rudak

5.6. Redős szűrők, pl. 185 mm-es

5.7. Fecskendőszűrők, 0,45 μm, vizes oldatokhoz megfelelő

5.8. Mintatartó ampullák a HPLC automata mintavevőhöz

5.9. 100 ml-es mérőlombikok

5.10. 5 és 10 ml-es műanyag fecskendők

5.11. pH-mérő

5.12. 60 °C-ra és 100 °C-ra beállítható, hőfokszabályzóval ellátott vízfürdő

5.13. Melegítőlapok mágneses keverőkkel

5.14. HPLC-eszközök

5.14.1. Pumpa, pulzálásmentes

5.14.2. Automatikus mintavevő

5.14.3. Oszlop és előoszlop, a cukrok elemzéséhez

5.14.4. Oszlopszárító, szobahőmérséklet és 40 °C közötti hőmérsékleti skálával

5.14.5. Cukrok elemzéséhez használható detektor, pl. refraktív index detektor

5.14.6. Integráló rendszer

6. **Az eljárás**

6.1. Általános

A mintákat egy példányban kell elemezni.

6.2. Különböző terméktípusok mintáinak előkészítése

A terméket őrléssel homogenizálják.

6.3. A minta mennyisége

A keményítőtartalmat az alapanyag-felsorolás segítségével becsüljük meg. A minta mennyiségét (0,1 mg-os pontossággal mérve) az alábbiak szerint becsülhetjük meg:

$$\text{minta mennyisége (g)} = \frac{\text{mérőlombik térfogata (100 ml)}}{\text{becsült keményítőtartalom (\%)}}$$

6.4. Vakpróba

A vakpróba elvégzéséhez a teljes elemzést végrehajtjuk (a 6.5. szerint) a minta hozzáadása nélkül. A vakpróba eredményét felhasználjuk a keményítőtartalom számításánál (7.1.).

6.5. Elemzés

6.5.1. A minták előkészítése

Rázogatással vagy keveréssel összekeverjük a mintát. A vizsgálati minta kiválasztott mennyiségét (6.3.) bemérjük a centrifugacsőbe (5.3.), és hozzáadunk 50 ml 40 %-os etanolt (4.1.). Mágneses keverőben szobahőmérsékleten 20 percig keverjük. Hagyjuk a mágneses rudat a csőben, és centrifugáljuk a mintát öt percig. A folyadékfázist óvatosan szívjuk fel és távolítsuk el (pl. Pasteur-pipettával). Ismételjük meg az extrahálást két alkalommal 25 ml etanollal (4.1.). A maradék anyagot öntsük át egy 100 ml-es (5.9.), kb. 70 ml vizet tartalmazó mérőlombikba.

Feloldódás vagy szuszpendálás után adjunk hozzá 100 mikroliter hőstabil alfa-amilázt (4.4.), és pl. vízfürdőben (5.12.) melegítsük egy órán keresztül 100 °C-on. Hűtsük le vízfürdőben 60 °C-ra, és adjunk hozzá 5 ml amiloglükozidáz-oldatot (4.10.). Helyezzük a mérőlombikot 60 °C-os vízfürdőbe. Hűtsük le szobahőmérsékletre, derítsük a mintát 1 ml Carrez I (4.12.) hozzáadásával, rázzuk össze, majd adjunk hozzá 1 ml Carrez II-t (4.13.). A Carrez I-et és II-t hűtés előtt és után is hozzáadhatjuk. Hígítsuk a jelzésig vízzel, homogenizáljuk, és egy redős szűrővel (5.6.) szűrjük le az oldatot. Fogjuk fel a mintakivonatot.

6.5.2. A mintakivonatok feldolgozása

A kivonatokat átszűrjük az előzőleg az extraktummal átmosott fecskendővel (5.10.) felszerelt tárcsás szűrőn (5.7.). A szűrletet ampullákban gyűjtsük (5.8.).

*Megjegyzés:* A tárcsás szűrőt többször is használhatjuk. Az előző kivonat általi szennyeződés elkerülése érdekében a szűrőt a következő kivonattal át kell öblíteni.

6.6. Kromatográfia

A HPLC-t a cukrok elemzésénél szokásos módon végezzük el. Mivel a mintákat etanollal/vízzel extraháljuk, a szőlőcukor az elsőszámú elemezendő cukor. Ha a HPLC-elemzés nyomokban malátacukrot mutat, előfordulhat, hogy a keményítő nem alakult át teljesen.

## 7. **Számítás és az eredmények kifejezése**

7.1. A HPLC-eredmények kiszámítása

A HPLC-elemzés eredményeiből számítható ki a szőlőcukor-tartalom (%, m/m).

Az amiloglükozidáz enzimes oldatát (4.3.) szőlőcukorral stabilizáljuk. A hőstabil alfa-amiláz (4.4.) stabilizálására szacharózt használunk, amely az amiloglükozidáz invertáz-aktivitása révén részben szőlőcukorrá alakulhat. Ezért a mért szőlőcukor-koncentrációt (%, m/v) a vakpróba glükóz-koncentrációjához (%, m/v) viszonyítva korrigálni kell. A vakminta alapján korrigált szőlőcukortartalmat (%, m/m) a szőlőcukor korrigált koncentrációjából, a minta tömegéből, és a referenciaoldatokkal (4.11.) elvégzett kalibrálási adatokból számítjuk ki.

7.2. A keményítőtartalom kiszámítása

A keményítőtartalmat (%, m/m) a szőlőcukor-tartalomból (%, m/m) számítják a vakpróba alapján elvégzett korrekciók után.

$$\text{Keményítőtartalom} = 0{,}9 * \text{korrigált szőlőcukor}$$

## 8. **Precízió**

8.1. Laboratóriumi körtesztek

A módszer pontosságát vizsgáló laboratóriumi körtesztek részleteit a 8.4. pont foglalja össze.

8.2. Megismételhetőség

Az ugyanazon módszerrel ugyanazon tesztmintán, ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon kezelőszemély által, ugyanazon berendezésen, és a két teszt elvégzése között eltelt rövid idő alatt kapott két független egyedi teszteredmény közötti abszolút különbség az esetek nem több mint 5 %-ban lesz nagyobb az 1,1 %-os (m/m) megismételhetőségi határértéknél. A megismételhetőségi határértéket a laboratóriumok közötti tesztek összesített eredményéből állapítják meg (lásd 8.4. pont).

8.3. Reprodukálhatóság

Az ugyanazon módszerrel ugyanazon tesztmintán, különböző laboratóriumokban, különböző kezelőszemélyzet által, különböző berendezésen kapott két független egyedi teszteredmény közötti abszolút különbség az esetek nem több mint 5 %-ban lesz nagyobb az 3,7 %-os (m/m) reprodukálhatósági határértéknél. A reprodukálhatósági határértéket a laboratóriumok közötti tesztek összesített eredményéből állapítják meg (lásd 8.4. pont).

8.4. A körvizsgálatok eredményei

Az európai vámlaboratóriumok részvételével laboratóriumi körvizsgálatot hajtottak végre 2005-ben és 2006-ban. Ezt a tesztet az ISO 5725 szabvánnyal és az IUPAC protokollal (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, 67. évfolyam 1995, 331–343. o.) összhangban hajtották végre. A pontossági adatokat az alábbi táblázat mutatja.

*A laboratóriumközi vizsgálat statisztikai eredményei*

| | Minta | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Laboratóriumok száma a kiugró adatok eltávolítása után | 25 | 26 | 26 | 25 | 24 |
| Elfogadott eredmények száma | 50 | 52 | 52 | 50 | 48 |
| Közepes keményítőtartalom (%, m/m) | 31,2 | 14,4 | 25,1 | 12,9 | 27,8 |
| Ismételhetőség szórása $s_r$ (%, m/m) | 0,4 | 0,3 | 0,6 | 0,2 | 0,3 |
| Ismételhetőség határértéke r (%, m/m) | 1,1 | 0,8 | 1,7 | 0,7 | 0,9 |
| Reprodukálhatóság szórása $s_R$ (%, m/m) | 1,7 | 0,8 | 1,7 | 0,9 | 1,3 |
| Reprodukálhatóság határértéke R (%, m/m) | 4,8 | 2,2 | 4,7 | 2,5 | 3,7 |

***Minta***

1: száraz kutyaeledel
2: száraz macskaeledel
3: száraz macskaeledel (2. minta) keményítő hozzáadásával
4: száraz macskaeledel (2. minta) répapép hozzáadásával
5: kereskedelemben szokásos kisállateledel