

Tämä asiakirja on ainoastaan dokumentoinnin apuväline eikä sillä ole oikeudellista vaikutusta. Unionin toimielimet eivät vastaa sen sisällöstä. Säädösten todistusvoimaiset versiot on johdanto-osineen julkaistu Euroopan unionin virallisessa lehdessä ja ne ovat saatavana EUR-Lexissä. Näihin virallisiin teksteihin pääsee suoraan tästä asiakirjasta siihen upotettujen linkkien kautta.

► **B**

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

annettu 11 päivänä helmikuuta 2008,

eläinten ruokintaan käytettävien valmisteiden (CN-koodi 2309) tarkkelyspitoisuuden määrittämisestä

(EUVL L 37, 12.2.2008, s. 3)

sellaisena kuin se on muutettuna seuraavilla:

virallinen lehti

N:o sivu päivämäärä

► **M1** Komission täytäntöönpanoasetus (EU) 2017/68, annettu 9 päivänä tammikuuta 2017 L 9 4 13.1.2017

▼B

**KOMISSIION ASETUS (EY) N:o 121/2008,
annettu 11 päivänä helmikuuta 2008,
eläinten ruokintaan käytettävien valmisteiden (CN-koodi 2309)
tärkkelyspitoisuuden määrittämenetelmästä**

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 määrittämenetelmällä 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) rypsiensiemenet, rypsikakku, rypsirouhe, rypsiensiemmenten 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 valkuaisjäännös;

▼M1

- k) soijatuotteet.

▼B*2 artikla*

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

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



LIITE

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

1. Soveltamisala

Tässä menetelmässä selostetaan tärkkelyspitoisuuden entsyymaattinen määrittäminen rehuista. Tärkkelyspitoisuus lasketaan glukoosista, joka määritetään kvantitatiivisesti, kun tärkkelys on entsyymaattisesti hajotettu glukooksiksi. 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-prosenttisellä 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 liennut. Suuret tärkkelysmöykät hajoavat hyvin hitaasti. Näytteiden pitäisi siksi olla kokonaan liuenneina tai hyvin pieniä kiinteitä hiukkasia sisältävänä suspensiona.

Seuraavaksi lisätään toinen entsyymi, amyloglukosidaasi, joka hydrolysoi hajonneet glukookisijat glukookiksi 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 analyttistä 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), (K₄[Fe(CN)₆].3H₂O), extra pure laatua

4.7 Vedetön natriumasetaatti, analyysilaatua

4.8 Jäätikka, 100 % (v/v)

▼B**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 glukosin 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 aminopropyli-piuhappogeelipylvästä, tavanomainen liikkuva faasi on esim. HPLC-laatuinen vesi ja asetonitriiliin 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, vesiliuksille**

▼B

- 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 määrittäminen
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

▼B

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 liennut tai suspensiossa, lisätään 100 mikrolitraa lämpöstabiliia 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). Näyte otetaan talteen.

6.5.2 Näyteutteiden 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 tarkkelyksen 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 lämpöstabiliia 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 Tarkkelyspitoisuuden laskeminen

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

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

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.

▼B**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 tulilaboratoriot 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
Hyväksytyjen tulosten määrä	50	52	52	50	48
Keskimääräinen tarkkelyspitoisuus (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 tarkkelystä sisältävä kuiva kissanruoka (näyte 2)
- 4: lisättyä juurikasleikettä sisältävä kuiva kissanruoka (näyte 2)
- 5: kaupallinen lemmikkieläinten ruoka