KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 121/2008

2008 m. vasario 11 d.

nustatantis tyrimo metodą krakmolo kiekiui produktuose, naudojamuose gyvūnų pašarams, nustatyti (KN kodas 2309)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1987 m. liepos 23 d. Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 2658/87 dėl tarifų ir statistinės nomenklatūros bei dėl Bendrojo muitų tarifo [1], ypač į jo 9 straipsnio 1 dalies a punktą,

kadangi:

(1) Siekiant užtikrinti, kad produktams, naudojamiems gyvūnų pašarams (KN kodas 2309), visoje Bendrijoje būtų taikomos vienodos importo sąlygos, nustatant tyrimo metodus būtina atsižvelgti į mokslinę bei techninę šių metodų raidą.

(2) Pagal 1972 m. balandžio 27 d. trečiąją Komisijos direktyvą 72/199/EEB, nustatančią oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus [2], krakmolo kiekiui gyvūnų pašarams naudojamuose produktuose nustatyti turi būti taikomas poliarimetrinis metodas (dar vadinamas modifikuotas Everso metodas), aprašytas tos Direktyvos I priedo 1 punkte.

(3) Atsižvelgiant į valstybių narių muitinių laboratorijų ekspertų atliktus tyrimus reikia nustatyti, kad tais atvejais, kai negali būti taikomas poliarimetrinis metodas, nustatytas Direktyvoje 72/199/EEB, krakmolo kiekiui minėtuose produktuose nustatyti, turėtų būti taikomas fermentinis tyrimo metodas. Todėl tikslinga nurodyti, kaip tas fermentinis metodas turi būti atliekamas.

(4) Šiame reglamente nustatytos priemonės atitinka Muitinės kodekso komiteto Tarifų ir statistinės nomenklatūros pakomitečio nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Nukrypstant nuo Direktyvos 72/199/EEB 1 straipsnio, krakmolo kiekis pagal masę gyvūnų pašarams naudojamuose produktuose (KN kodas 2309) nustatomas fermentiniu tyrimo metodu, nustatytu šio reglamento priede tais atvejais, kai yra reikšmingi šių pašarinių medžiagų kiekiai:

a) (cukrinių) runkelių produktai, pavyzdžiui, (cukrinių) runkelių masė, (cukrinių) runkelių melasa, (cukrinių) runkelių masė su melasa, (cukrinių) runkelių žlaugtai, (runkelių) cukrus;

b) citrusinių vaisių minkštimas;

c) linų sėmenys; linų sėmenų išspaudos; ekstrahuoti linų sėmenys;

d) rapsų sėklos; rapsų sėklų išspaudos; ekstrahuotos rapsų sėklos; rapsų sėklų lukštai;

e) saulėgrąžų sėklos; ekstrahuotos saulėgrąžų sėklos; ekstrahuotos iš dalies išlukštentos saulėgrąžų sėklos;

f) kopros išspaudos; ekstrahuota kopra;

g) bulvių tyrė;

h) džiovintos mielės;

i) produktai, turintys daug inulino (pavyzdžiui, topinambų rupiniai ir miltai);

j) spirgučiai.

2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja dvidešimtą dieną nuo jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

[1] OL L 256, 1987 9 7, p. 1. Reglamentas su paskutiniais pakeitimais, padarytais Komisijos reglamentu (EB) Nr. 1352/2007 (OL L 303, 2007 11 21, p. 3).

[2] OL L 123, 1972 5 29, p. 6. Direktyva su paskutiniais pakeitimais, padarytais Direktyva 1999/79/EB (OL L 209, 1999 8 7, p. 23).

Šis reglamentas yra privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje, 2008 m. vasario 11 d.

Komisijos vardu
László KOVÁCS
Komisijos narys

PRIEDAS

FERMENTINIS METODAS KRAKMOLO KIEKIUI GYVŪNŲ PAŠARAMS NAUDOJAMUOSE PRODUKTUOSE NUSTATYTI TAIKANT AUKŠTO SLĖGIO SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJĄ (HPLC)

1. **Taikymo sritis**

Šis metodas aprašo fermentinį krakmolo kiekio gyvūnų pašaruose nustatymą. Krakmolo kiekis gaunamas iš kiekybinio gliukozės nustatymo duomenų, atlikus fermentinį esamo krakmolo skaidymą iki gliukozės. Laikoma, kad visa nustatyta gliukozė yra gauta iš mėginyje esančio krakmolo.

2. **Apibrėžtys**

Taikant šį metodą nustatomas krakmolo ir didelės molekulinės masės jo skilimo produktų, netirpių 40 % etanolyje, kiekis. Krakmolo kiekis išreiškiamas % (m/m).

3. **Principas**

Mėginiai homogenizuojami malant. Mėginys plaunamas 40 % etanoliu tirpiesiems cukrums ir tirpiesiems krakmolo skaidymo produktams pašalinti.

Į suspensiją dedama termostabilios alfa-amilazės. Šis fermentas skaido krakmolą 100 °C temperatūroje į trumpesnes grandines, nepriklausomai nuo to, ar krakmolas yra visiškai ištirpęs, ar neištirpęs. Dideli krakmolo gabalai skaidomi labai lėtai.

Todėl būtina, kad mėginiai būtų visiškai ištirpinti arba būtų mažų kietų dalelių suspensijos, pavidalo.

Tada dedama kito fermento – amilogliukozidazės, kuri 60 °C temperatūroje hidrolizuoja sutrumpėjusias gliukozės grandines iki gliukozės.

Skystį nuskaidrinus ir esamus baltymus, riebalus ir likučius pašalinus filtruojant, gaunamas skaidrus tirpalas, kurį galima tirti HPLC.

Esamų cukrų atskyrimas atliekamas HPLC.

4. **Reagentai ir kitos medžiagos**

Naudojami patvirtinto analizinio grynumo reagentai ir demineralizuotas vanduo.

4.1. Etanolio 40 % tūrio tirpalas vandenyje

4.2. Gliukozė, ne mažiau kaip 99 % grynumo

4.3. Amilogliukozidazės (1,4-α-D-gliukangliukohidrolazė) iš *Aspergillus niger* (fermentinis aktyvumas > 5 000 U/ml) tirpalas. Saugoma apie 4 °C temperatūroje

Kaip alternatyva gali būti naudojami ir amilogliukozidazės milteliai

4.4. Termostabili alfa-amilazė (1,4-alfa-D-gliukan-gliukanohidrolazė). Saugoma apie 4 °C temperatūroje

4.5. Cinko acetato dihidratas, a. g.

4.6. Kalio heksacianoferatas (II) ($K_4[Fe(CN)]_6 \cdot 3H_2O$), ypač grynas

4.7. Natrio acetatas bevandenis, a. g.

4.8. Ledinė acto rūgštis, 100 %

4.9. Natrio acetato buferinis tirpalas (0,2 mol/l)

Cheminėje stiklinėje pasveriama 16,4 g natrio acetato (4.7). Ištirpinama vandenyje ir supilama į 1 000 ml matavimo kolbą. Praskiedžiama iki žymos vandeniu ir acto rūgštimi pakoreguojamas pH iki 4,7 (naudojant pH-metrą (5.11)). Šį tirpalą galima naudoti ne ilgiau kaip 6 mėnesius, laikant 4 °C temperatūroje.

4.10. Amilogliukozidazės tirpalas (fermentinis aktyvumas > 250 U/ml)

Paruošiamas tirpalas iš 5 ml amilogliukozidazės tirpalo (4.3) arba 660 mg amilogliukozidazės miltelių, pripilant iki 100 ml galutinio tūrio natrio acetato buferinio tirpalo (4.9). Ruošiama prieš pat naudojimą.

4.11. Etaloninis tirpalas

Paruošiami vandeniniai gliukozės tirpalai, kurie paprastai naudojami atliekant HPLC tyrimą.

4.12. Nuskaidrinimo reagentas (Carrez I)

Cheminėje stiklinėje vandenyje ištirpinama 219,5 g cinko acetato (4.5). Supilama į 1 000 ml matavimo kolbą, įpilama 30 ml acto rūgšties (4.8). Gerai sumaišoma ir skiedžiama vandeniu iki žymos. Šį tirpalą galima naudoti ne ilgiau kaip 6 mėnesius, laikant kambario temperatūroje.

Galima naudoti kitus lygiaverčius Carrez tirpalui nuskaidrinimo reagentus.

4.13. Nuskaidrinimo reagentas (Carrez II)

Cheminėje stiklinėje vandenyje ištirpinama 106,0 g kalio heksacianoferato (II) (4.6). Supilama į 1 000 ml matavimo kolbą. Gerai sumaišoma ir skiedžiama vandeniu iki žymos. Šį tirpalą galima naudoti ne ilgiau kaip 6 mėnesius, laikant kambario temperatūroje.

Galima naudoti kitus lygiaverčius Carrez tirpalui nuskaidrinimo reagentus.

4.14. Mobili fazė

Paruošiama mobili fazė, kuri paprastai naudojama atliekant cukrų HPLC tyrimą. Naudojant aminopropilsilikagelio kolonėlę, mobilia faze dažniausiai naudojamas, pavyzdžiui, HPLC grynumo vandens ir acetonitrilo mišinys.

5. **Įranga**

5.1. Standartiniai laboratoriniai stikliniai indai

5.2. Centrifuga, ne mažesnė kaip 1 000 g (vertinama mėgintuvėlio centre)

5.3. Stikliniai 100 ml tūrio centrifugavimo mėgintuvėliai

5.4. Magnetinė maišyklė

5.5. Magnetiniai maišikliai

5.6. Gofruoti filtrai, pavyzdžiui, 185 mm

5.7. Filtrai švirkštams, 0,45 μm, tinkami vandeniniams tirpalams

5.8. Mėginių buteliukai, pritaikyti HPLC automatiniam mėginių įvedimo įrenginiui

5.9. 100 ml matavimo kolbos

5.10. Plastikiniai švirkštai, 5 ir 10 ml

5.11. pH-metras

5.12. Vandens vonia su termostatu, reguliuojama nuo 60 °C iki 100 °C

5.13. Kaitinamos magnetinės maišyklės

5.14. HPLC aparatas

5.14.1. Siurblys, nepulsuojantis

5.14.2. Automatinis mėginių įvedimo įrenginys

5.14.3. Kolonėlė ir prieškolonėlė, tinkamos cukrų tyrimui

5.14.4. Kolonėlės krosnis, temperatūros intervalas – nuo kambario iki 40 °C temperatūros

5.14.5. Detektorius, tinkamas cukrų tyrimui, pavyzdžiui, refrakcinio indekso detektorius

5.14.6. Duomenų apdorojimo sistema

6. **Procedūra**

6.1. Bendrosios nuostatos

Mėginiai tiriami po vieną kartą.

6.2. Kelių tipų produktų mėginio ruošimas

Produktas homogenizuojamas malant.

6.3. Mėginio tiriamoji dalis

Krakmolo kiekis įvertinamas pagal deklaruojamą ingredientų kiekį. Mėginio (pasverto 0,1 mg tikslumu) kiekis gali būti įvertintas pagal formulę:

$$\text{mėginio kiekis (g)} = \frac{\text{matavimo kolbos tūris (100 ml)}}{\text{įvertintas krakmolo kiekis (\%)}}$$

6.4. Tuščiasis tyrimas

Tuščiojo tyrimo rezultatas gaunamas atliekant visą tyrimą (kaip aprašyta 6.5), bet be pridėto mėginio. Tuščiojo tyrimo rezultatas naudojamas krakmolo kiekiui apskaičiuoti (7.1).

6.5. Tyrimas

6.5.1. Mėginių paruošimas

Mėginys sumaišomas purtant arba kratant. Pasirinkta tiriamoji dalis (6.3) pasveriama centrifugavimo mėgintuvėlyje (5.3), į kurį įpilama 50 ml 40 % etanolio (4.1). Maišoma magnetine maišykle 20 min. kambario temperatūroje. Magnetinis maišiklis paliekamas mėgintuvėlyje ir centrifuguojama penkias minutes. Atsargiai nusiurbiama ir pašalinama skystoji fazė (pavyzdžiui, Pastero pipete). Ši ekstrahavimo procedūra kartojama du kartus, naudojant po 25 ml etanolio (4.1). Likutis suplaunamas į 100 ml matavimo kolbą (5.9), naudojant apie 70 ml vandens. Likutis ištirpinamas arba suspenduojamas, įpilama 100 mikrolitrų termostabilios alfa-amilazės (4.4) ir kaitinama 100 °C temperatūroje 1 val., pvz., vandens vonioje (5.12). Atvėsinama vandens vonioje iki 60 °C ir įpilama 5 ml amilogliukozidazės tirpalo (4.10). Kolba įstatoma 30 min. į 60 °C vandens vonią. Atvėsinama iki kambario temperatūros, mėginys nuskaidrinamas, įpilant 1 ml Carrez I (4.12) tirpalo, supurtant ir įpilant 1 ml Carrez II (4.13) tirpalo. Carrez I ir II galima įpilti prieš atvėsinant arba atvėsinus. Atskiedžiama vandeniu iki žymos, tirpalas sumaišomas ir filtruojamas per gofruotą filtrą (5.6). Mėginio ekstraktas surenkamas.

6.5.2. Mėginio ekstraktų apdorojimas

Ekstraktai filtruojami per filtrą (5.7) švirkštu (5.10), kuris prieš tai buvo praplautas ekstraktu. Filtratai surenkami į buteliukus (5.8).

Pastaba. Filtrą galima naudoti kelis kartus. Jis turėtų būti plaunamas kitu ekstraktu, kad būtų išvengta užteršimo pirmesniuoju.

6.6. Chromatografija

HPLC atliekama, kaip tai įprastai daroma tiriant cukrus. Kadangi mėginiai apdoroti etanolio ir vandens mišiniu, gliukozė yra pagrindinis cukrus, kuris turi būti nustatomas. Jei HPLC tyrimas rodo maltozės pėdsakus, tai gali reikšti nepilną krakmolo hidrolizę.

7. **Rezultatų skaičiavimas ir pateikimas**

7.1. HPLC rezultatų apskaičiavimas

Fermentinis amilogliukozidazės tirpalas (4.3) stabilizuojamas gliukoze. Be to, termostabilialfa-amilazė (4.4) stabilizuojama sacharoze, kuri iš dalies gali virsti gliukoze dėl amilogliukozidazės invertazės aktyvumo. Todėl turėtų būti įvedama išmatuotos gliukozės koncentracijos (%, m/V) pataisa, atsižvelgus į tuščiojo tyrimo metu gautą gliukozės koncentraciją (%, m/V). Tuomet gliukozės koncentracija (%, m/m), įvertinus pataisą, apskaičiuojama iš gliukozės koncentracijos (%, m/V), įvertinus pataisą, mėginio masės ir kalibravimo etaloniniais tirpalais (4.11) duomenų.

7.2. Krakmolo kiekio apskaičiavimas

Krakmolo kiekis (%, m/m) apskaičiuojamas iš gliukozės kiekio (%, m/m) įvertinus pataisą.

Krakmolo kiekis = 0,9 * gliukozės kiekis, įvertinus pataisą

8. **Tikslumas**

8.1. Tarplaboratorinis tyrimas

Tarplaboratorinio tyrimo duomenys metodo glaudumui nustatyti yra apibendrinti 8.4 punkte.

8.2. Pakartojamumas

Dviejų nepriklausomų atskirų tyrimų rezultatų, gautų taikant tą patį metodą tokiai pačiai tiriamajai medžiagai toje pat laboratorijoje to paties darbuotojo ta pačia įranga per trumpą laiko tarpą, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų gali būti didesnis už pakartojamumo ribą 1,1 % (m/m). Pakartojamumo riba gauta apibendrinus tarplaboratorinio tyrimo rezultatus (žr. 8.4 punktą).

8.3. Atkuriamumas

Dviejų atskirų tyrimų rezultatų, gautų taikant tą patį metodą tokiai pačiai tiriamajai medžiagai skirtingose laboratorijose skirtingų darbuotojų skirtinga įranga, absoliutusis skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų gali būti didesnis už atkuriamumo ribą 3,7 % (m/m). Atkuriamumo riba gauta apibendrinus tarplaboratorinio tyrimo rezultatus (žr. 8.4 punktą).

8.4. Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai

Tarplaboratorinis tyrimas buvo atliktas 2005 ir 2006 metais dalyvaujant Europos muitinių laboratorijoms. Šis tyrimas buvo atliekamas pagal ISO 5725 ir IUPAC protokolą (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, vol 67, 1995, p. 331–343). Glaudumo duomenys pateikiami lentelėje.

Statistiniai tarplaboratorinio tyrimo duomenys

	Mėginys				
	1	2	3	4	5
Laboratorijų skaičius, atmetus riktus	25	26	26	25	24
Priimtų rezultatų skaičius	50	52	52	50	48
Krakmolo kiekio vidurkis (%, m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Pakartojamumo standartinis nuokrypis s_r (%, m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Pakartojamumo riba r (%, m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Atkuriamumo standartinis nuokrypis s_R (%, m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Atkuriamumo riba R (%, m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Mėginiai

1: sausas šunų ėdalas
2: sausas kačių ėdalas
3: sausas kačių ėdalas (2 mėginys) pridėjus krakmolo
4: sausas kačių ėdalas (2 mėginys) pridėjus runkelių išspaudų
5: prekybinis naminių gyvūnėlių ėdalas