KOMISIJAS REGULA (EK) Nr. 121/2008

(2008. gada 11. februāris)

ar kuru nosaka analīzes metodi cietes satura noteikšanai izstrādājumos, kas izmantojami dzīvnieku barībā (KN kods 2309)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1987. gada 23. jūlija Regulu (EEK) Nr. 2658/87 par tarifu un statistikas nomenklatūru un par kopējo muitas tarifu [1] un jo īpaši tās 9. panta 1. punkta a) apakšpunktu,

tā kā:

(1) Lai visā Kopienā nodrošinātu vienādu rīcību, importējot izstrādājumus, kas izmantojami dzīvnieku barībā (KN 2309), paredzot analītiskās metodes, ir jāņem vērā attiecīgo metožu zinātniskā un tehnoloģiskā attīstība.

(2) Saskaņā ar Trešo Komisijas 1972. gada 27. aprīļa Direktīvu 72/199/EEK, ar ko nosaka Kopienas analīžu metodes barības oficiālajai kontrolei [2], cietes satura noteikšanai izstrādājumos, kas izmantojami dzīvnieku barībā, ir jāizmanto polarimetriskā metode (saukta arī par modificēto Eversa metodi), kas izklāstīta minētās direktīvas I pielikuma 1. punktā.

(3) Ņemot vērā dalībvalstu muitas laboratorijās veiktos speciālistu pētījumus, ir jāparedz, ka tad, ja cietes satura noteikšanai minētajos izstrādājumos nevar izmantot Direktīvā 72/199/EEK paredzēto polarimetrisko metodi, ir jāizmanto fermentatīvā analītiskā metode. Tādēļ ir lietderīgi norādīt, kā jāveic minētā fermentatīvā metode.

(4) Šajā regulā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Muitas kodeksa komitejas Tarifu un statistikas nomenklatūras nodaļas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO REGULU.

1. pants

Atkāpjoties no Direktīvas 72/199/EEK 1. panta, izstrādājumos, kas izmantojami dzīvnieku barībā KN koda 2309 nozīmē, cietes saturu pēc svara nosaka ar šīs regulas pielikumā norādīto fermentatīvo analītisko metodi, ja izstrādājumos ievērojamā daudzumā ir šādas barības vielas:

a) tādi (cukur-)biešu produkti, kā (cukur-)biešu mīkstums, (cukur-)biešu melase, melasi saturošs (cukur-)biešu mīkstums, (cukur-)biešu vināze, (biešu) cukurs;

b) citrusaugļu mīkstums;

c) linsēklas; linsēklu rauši; linsēklu izvilkums;

d) rapša sēklas; rapša sēklu rauši, rapša sēklu izvilkums; rapša sēnalas;

e) saulespuķu sēklas; saulespuķu sēklu izvilkums; daļēji lobītu saulespuķu sēklu izvilkums;

f) kopras rauši; kopras izvilkums;

g) kartupeļu mīkstums;

h) sausais raugs;

i) produkti ar augstu inulīna saturu (piemēram, topinambūra čipsi un milti);

j) dradži.

2. pants

Šī regulas stājas spēkā divdesmitajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī*.

---

[1] OV L 256, 7.9.1987., 1. lpp. Regulā jaunākie grozījumi izdarīti ar Komisijas Regulu (EK) Nr. 1352/2007 (OV L 303, 21.11.2007., 3. lpp.).

[2] OV L 123, 29.5.1972., 6. lpp. Direktīvā jaunākie grozījumi izdarīti ar Direktīvu 1999/79/EK (OV L 209, 7.8.1999., 23. lpp.).

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

Briselē, 2008. gada 11. februārī

Komisijas vārdā —
Komisijas loceklis
László KOVÁCS

PIELIKUMS

FERMENTATĪVĀ METODE CIETES SATURA NOTEIKŠANAI IZSTRĀDĀJUMOS, KAS IZMANTOJAMI DZĪVNIEKU BARĪBĀ, IZMANTOJOT AUGSTAS IZŠĶIRTSPĒJAS ŠĶIDRUMHROMATOGRĀFIJU *(HPLC)*

1. **Darbības joma**

Šī metode raksturo cietes satura fermentatīvo noteikšanu dzīvnieku barībā. Cietes saturu iegūst, nosakot glikozes saturu, kas rodas pēc paraugā esošās cietes fermentatīvas sašķelšanas glikozē. Uzskata, ka visa mērījumos noteiktā glikoze ir iegūta no paraugā esošās cietes.

2. **Definīcijas**

Ar šo metodi nosaka cietes saturu un 40 % etanolā nešķīstošu, lielas molekulmasas sadalīšanās produktu saturu. Cietes saturu izsaka % (m/m).

3. **Princips**

Paraugus homogenizē samaļot. Paraugu mazgā ar 40 % etanolu, lai aizvadītu šķīstošos cukurus un šķīstošos cietes sadalīšanās produktus.

Suspensijai pievieno termostabilo fermentu alfa amilāzi. Šis ferments 100 °C temperatūrā cieti sašķeļ mazākās virknēs neatkarīgi no tā, vai ciete ir pilnībā izšķīdusi. Lieli cietes gabali šķeļas ļoti lēni. Tāpēc paraugiem jābūt pilnīgi izšķīdinātiem vai arī suspensijā, kas satur ļoti mazas cietās daļiņas.

Pēc tam pievieno otru fermentu amilglikozidāzi, ar ko sašķeltās glikozes virknes 60 °C temperatūrā hidrolizē, iegūstot glikozi.

Pēc šķidruma dzidrināšanas, kuras gaitā filtrējot atdala šķidrumā esošās olbaltumvielas, taukus un atlikumus, iegūst dzidru šķīdumu, ko var izmantot *HPLC*.

Šķīdumā esošos cukurus atdala, izmantojot *HPLC*.

4. **Reaģenti un citi materiāli**

Izmanto atzītas analītiskas kvalitātes reaģentus un demineralizētu ūdeni.

4.1. Etanola šķīdums ūdenī, 40 tilp. %

4.2. Glikoze, vismaz 99 %

4.3. Amilglikozidāzes (1,4-alfa-D-glikānglikohidrolāze) no *Aspergillus niger* (fermenta aktivitāte > 5 000 U/ml) šķīdums. Uzglabā aptuveni 4 °C temperatūrā.

Kā alternatīvu var izmantot arī amilglikozidāzes pulveri.

4.4. Termostabila alfa amilāze (1,4-alfa-D-glikānglikānhidrolāze). Uzglabā aptuveni 4 °C temperatūrā.

4.5. Cinka acetāta dihidrāts, p. a.

4.6. Kālija heksaciānferāts (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), īpaši tīrs

4.7. Nātrija acetāts (bezūdens), p. a.

4.8. Ledus etiķskābe, 100 % (tilp./tilp.)

4.9. Nātrija acetāta buferšķīdums (0,2 mol/l)

Vārglāzē iesver 16,4 gramus nātrija acetāta (4.7. punkts). Izšķīdina ūdenī un ieskalo 1 000 ml mērkolbā. Uzpilda ar ūdeni līdz zīmei un, izmantojot etiķskābi, koriģē pH līmeni līdz 4,7 (izmantojot pH-metru (5.11. punkts)). Šo šķīdumu var izmantot ne ilgāk kā sešus mēnešus, ja to uzglabā 4 °C temperatūrā.

4.10. Amilglikozidāzes šķīdums (fermenta aktivitāte > 250 U/ml)

Izmantojot nātrija acetāta buferšķīdumu (4.9. punkts), no 5 ml amilglikozidāzes šķīduma (4.3. punkts) vai 660 mg amilglikozidāzes pulvera pagatavo šķīdumu ar beigu tilpumu 100 ml. Pagatavo tieši pirms lietošanas.

4.11. Standartšķīdums

Pagatavo glikozes šķīdumus ūdenī, kādus parasti izmanto *HPLC* analīzē.

4.12. Dzidrināšanas reaģents (I Karesa šķīdums)

Vārglāzē ūdenī izšķīdina 219,5 gramus cinka acetāta (4.5. punkts). Ieskalo 1 000 ml mērkolbā, pievieno 30 ml etiķskābes (4.8. punkts). Rūpīgi samaisa un uzpilda ar ūdeni. Šo šķīdumu var lietot ne ilgāk kā sešus mēnešus, ja to uzglabā istabas temperatūrā.

Var izmantot citus dzidrināšanas reaģentus, kas ir līdzvērtīgi Karesa šķīdumam.

4.13. Dzidrināšanas reaģents (II Karesa šķīdums)

Vārglāzē ūdenī izšķīdina 106,0 gramus kālija heksaciānferāta (II) (4.6. punkts). Ieskalo 1 000 ml mērkolbā. Rūpīgi samaisa un uzpilda ar ūdeni. Šo šķīdumu var lietot ne ilgāk kā sešus mēnešus, ja to uzglabā istabas temperatūrā.

Var izmantot citus dzidrināšanas reaģentus, kas ir līdzvērtīgi Karesa šķīdumam.

4.14. Kustīgā fāze

Sagatavo kustīgo fāzi, ko parasti lieto *HPLC* analīzē cukuru noteikšanai. Ja izmanto aminopropilsilikagela kolonnu, parastā kustīgā fāze ir, piemēram, *HPLC* vajadzībām piemērota ūdens un acetonitrila maisījums.

5. **Aprīkojums**

5.1. Laboratorijas stikla trauki (standarta)

5.2. Centrifūga ar centrbēdzes spēku 1 000 g vai vairāk (aprēķina mēģenes vidū)

5.3. Centrifūgas stikla mēģenes, 100 ml

5.4. Magnētiskais maisītājs

5.5. Magnētiskie stienīši

5.6. Kroku filtri, piemēram, 185 mm

5.7. Šļirces filtri, 0,45 μm, piemēroti ūdens šķīdumiem

5.8. Paraugu stobriņi, piemēroti HPLC automātiskās paraugu ievadīšanas iekārtai

5.9. 100 ml mērkolbas

5.10. Plastmasas šļirces, 5 un 10 ml

5.11. pH-metrs

5.12. Ūdens vanna ar termostatu, iespējams iestatīt 60 °C un 100 °C temperatūru

5.13. Sildītāji ar magnētiskajiem maisītājiem

5.14. *HPLC* aparatūra

5.14.1. Bezpulsāciju sūknis

5.14.2. Automātiskās paraugu ievadīšanas iekārta

5.14.3. Kolonna un priekškolonna, piemērota cukuru analīzei

5.14.4. Kolonnu krāsns, temperatūras diapazons no istabas temperatūras līdz 40 °C

5.14.5. Detektors, piemērots cukuru analīzei, piemēram, refrakcijas indeksa detektors

5.14.6. Integrēšanas sistēma.

6. **Darba norise**

6.1. Vispārīgi norādījumi

Paraugus analizē pa vienam.

6.2. Dažādu veidu produktu paraugu sagatavošana

Produktu homogenizē samaļot.

6.3. Parauga porcija

Cietes saturu novērtē, izmantojot norādījumus par sastāvdaļām. Parauga lielumu (nosvērts ar precizitāti līdz 0,1 mg) var aprēķināt šādi:

$$\text{parauga lielums (g)} = \frac{\text{mērkolbas tilpums (100 ml)}}{\text{novērtētais cietes saturs (\%)}}$$

6.4. Tukšā analīze

Veic pilnīgu tukšo analīzi (kā aprakstīts 6.5. punktā) bez parauga. Tukšās analīzes rezultātu izmanto cietes satura aprēķināšanai (7.1. punkts).

6.5. Analīze

6.5.1. Paraugu sagatavošana

Paraugu sajauc sakratot vai samaisot. Izvēlēto porciju (6.3. punkts) iesver centrifūgas mēģenē (5.3. punkts) un pievieno 50 ml 40 % etanola (4.1. punkts). Maisa magnētiskajā maisītājā 20 minūtes istabas temperatūrā. Magnētisko stienīti atstāj mēģenē un centrifugē piecas minūtes. Uzmanīgi nosūc un aizvada šķidro fāzi (piemēram, ar Pastēra pipeti). Šo ekstrakcijas procedūru atkārto divas reizes, izmantojot 25 ml etanola (4.1. punkts). Atlikumu pārnes 100 ml mērkolbā (5.9. punkts), kurā ir aptuveni 70 ml ūdens. Pēc izšķīdināšanas vai suspendēšanas pievieno 100 mikrolitrus termostabilas alfa amilāzes (4.4. punkts) un 1 stundu silda 100 °C temperatūrā, piemēram, ūdens vannā (5.12. punkts). Atdzesē ūdens vannā līdz 60 °C un pievieno 5 ml amilglikozidāzes šķīduma (4.10. punkts). Mērkolbu uz 30 minūtēm ievieto ūdens vannā 60 °C temperatūrā. Atdzesē līdz istabas temperatūrai, dzidrina paraugu, pievienojot 1 ml I Karesa šķīduma (4.12. punkts), sakrata un pēc tam pievieno 1 ml II Karesa šķīduma (4.13. punkts). I un II Karesa šķīdumu var pievienot pirms vai pēc atdzesēšanas. Uzpilda ar ūdeni līdz zīmei, homogenizē un filtrē šķīdumu caur kroku filtru (5.6. punkts). Savāc parauga ekstraktu.

6.5.2. Paraugu ekstraktu apstrāde

Ekstraktus filtrē caur diska filtru (5.7. punkts) ar šļirci (5.10. punkts), kas iepriekš izskalota ar ekstraktu. Filtrātus savāc stobriņos (5.8. punkts).

Piezīme. Diska filtru var izmantot vairākas reizes. Tas jāizskalo ar nākamo ekstraktu, lai novērstu kontamināciju ar iepriekšējo ekstraktu.

6.6. Hromatogrāfija

HPLC veic kā parasti cukuru analīzei. Tā kā paraugi tiek ekstrahēti ar etanolu/ūdeni, glikoze ir galvenais analizējamais cukurs. Ja *HPLC* analīzē konstatē maltozes piejaukumu, tas var liecināt par cietes nepilnīgu pārveidošanos.

7. **Rezultātu aprēķināšana un izteikšana**

7.1. *HPLC* rezultātu aprēķināšana

No *HPLC* analīzes rezultātiem aprēķina glikozes saturu (%, m/m). Amilglikozidāzes fermenta šķīdumu (4.3. punkts) stabilizē ar glikozi. Turklāt termostabilo alfa amilāzi (4.4. punkts) stabilizē ar saharozi, kas var daļēji pārvērsties glikozē, amilglikozidāzei iedarbojoties kā invertāzei. Tāpēc izmērītā glikozes koncentrācija (%, m/tilp.) ir jākoriģē, ņemot vērā glikozes koncentrāciju (%, m/tilp.) tukšajā analīzē. Glikozes saturu (%, m/m), kas koriģēts, ņemot vērā tukšo analīzi, pēc tam aprēķina, ņemot vērā glikozes koriģēto koncentrāciju, parauga svaru un kalibrēšanu ar standartšķīdumiem (4.11. punkts).

7.2. Cietes satura aprēķināšana

Cietes saturu (%, m/m) aprēķina no glikozes satura (%, m/m), kas koriģēts, ņemot vērā tukšo analīzi.

$$\text{Cietes saturs} = 0{,}9 * \text{koriģētā glikoze}$$

8. **Precizitāte**

8.1. Starplaboratoriju salīdzinošā testēšana

Ziņas par starplaboratoriju salīdzinošo testēšanu metodes precizitātes noteikšanai ir apkopotas 8.4. punktā.

8.2. Atkārtojamība

Absolūtā starpība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot to pašu metodi un identisku testa materiālu, tajā pašā laboratorijā, tam pašam operatoram izmantojot to pašu iekārtu neilgā laika posmā, ne vairāk kā 5 % gadījumu pārsniegs atkārtojamības robežu 1,1 % (m/m). Atkārtojamības robeža iegūta, ņemot vērā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā apkopotos rezultātus (skatīt 8.4. punktu).

8.3. Reproducējamība

Absolūtā starpība starp diviem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot to pašu metodi un identisku testa materiālu, dažādās laboratorijās, dažādiem operatoriem izmantojot dažādas iekārtas, ne vairāk kā 5 % gadījumu pārsniegs reproducējamības robežu 3,7 % (m/m). Reproducējamības robeža iegūta, ņemot vērā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā apkopotos rezultātus (skatīt 8.4. punktu).

8.4. Starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultāti

Starplaboratoriju salīdzinošo testēšanu veica 2005. un 2006. gadā, piedaloties Eiropas Muitas laboratorijām. To veica saskaņā ar *ISO 5725 un IUPAC* protokolu (*W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, vol.* 67, 1995., 331.–343. lpp.). Precizitātes dati sniegti tālāk tabulā.

Starplaboratoriju pētījuma statistiskie rezultāti

	Paraugs				
	1	2	3	4	5
Laboratoriju skaits pēc netipisko datu izslēgšanas	25	26	26	25	24
Akceptēto rezultātu skaits	50	52	52	50	48
Vidējais cietes saturs (%, m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Atkārtojamības standartnovirze s_r (%, m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Atkārtojamības robeža r (%, m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Reproducējamības standartnovirze s_R (%, m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Reproducējamības robeža R (%, m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Paraugi

1: sausā suņu barība
2: sausā kaķu barība
3: sausā kaķu barība (2. paraugs) ar cietes piedevu
4: sausā kaķu barība (2. paraugs) ar biešu mīkstuma piedevu
5: komerciālā mājdzīvnieku barība