NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 121/2008

z 11. februára 2008,

ktorým sa stanovuje analytická metóda na stanovenie obsahu škrobu v prípravkoch používaných ako krmivo pre zvieratá (kód KN 2309)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na nariadenie Rady (EHS) č. 2658/87 z 23. júla 1987 o colnej a štatistickej nomenklatúre a o Spoločnom colnom sadzobníku [1] a najmä na jeho článok 9 ods. 1 písm. a),

keďže:

(1) S cieľom zabezpečiť jednotné zaobchádzanie s prípravkami používanými ako krmivo pre zvieratá (KN 2309) pri ich dovoze v rámci Spoločenstva, je pri stanovovaní analytických metód potrebné vziať do úvahy vedecký a technologický vývoj takýchto metód.

(2) V súlade s treťou smernicou Komisie 72/199/EHS z 27. apríla 1972, stanovujúcou analytické metódy Spoločenstva na úradnú kontrolu krmív [2], sa na stanovenie škrobu bude používať polarimetrická metóda (známa aj ako modifikovaná Ewersova metóda), ktorá sa uvádza v bode 1 prílohy I k tejto smernici.

(3) Zo štúdií vykonaných odborníkmi v colných laboratóriách členských štátov vyplýva, že je potrebné, aby tam, kde na stanovenie obsahu škrobu v uvedených prípravkoch nemôže byť použitá polarimetrická metóda stanovená smernicou 72/199/EHS, bola použitá enzymatická analytická metóda. Z tohto dôvodu je nutné určiť, ako sa bude enzymatická metóda vykonávať.

(4) Keďže opatrenia uvedené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Sekcie pre colnú a štatistickú nomenklatúru Výboru pre colný kódex,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Odchylne od článku 1 smernice 72/199/EHS sa hmotnostný obsah škrobu v prípravkoch používaných ako krmivo pre zvieratá v zmysle kódu KN 2309 stanoví enzymatickou analytickou metódou, ktorá je uvedená v prílohe k tomuto nariadeniu v prípadoch, keď sú vo významnom množstve prítomné tieto krmné suroviny:

a) výrobky z (cukrovej) repy, ako sú vylúhované rezky z (cukrovej) repy, melasa z (cukrovej) repy, vylúhované rezky z (cukrovej) repy s melasou, výpalky z (cukrovej) repy, (repný) cukor;

b) citrusová dužina;

c) ľanové semeno; ľanové výlisky; ľanový šrot extrahovaný;

d) repkové semeno; repkové výlisky; repkový šrot extrahovaný; šupky repkového semena;

e) slnečnicové semeno; slnečnicový šrot extrahovaný; čiastočne lúpané, extrahované slnečnicové semeno;

f) výlisky z kopry; kokosový šrot extrahovaný;

g) zemiaková dužina;

h) sušené kvasnice;

i) produkty bohaté na inulín (napríklad rezky a múčka zo slnečnice hľuznatej topinambur);

j) oškvarky.

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť dvadsiatym dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

[1] Ú. v. ES L 256, 7.9.1987, s. 1. Nariadenie naposledy zmenené a doplnené nariadením Komisie (ES) č. 1352/2007 (Ú. v. EÚ L 303, 21.11.2007, s. 3).

[2] Ú. v. ES L 123, 29.5.1972, s. 6. Smernica naposledy zmenená a doplnená smernicou 1999/79/ES (Ú. v. ES L 209, 7.8.1999, s. 23).

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 11. februára 2008

Za Komisiu
László KOVÁCS
člen Komisie

PRÍLOHA

ENZYMATICKÁ METÓDA NA STANOVENIE OBSAHU ŠKROBU V PRÍPRAVKOCH POUŽÍVANÝCH AKO KRMIVO PRE ZVIERATÁ POUŽITÍM VYSOKOTLAKOVEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

1. **Rozsah**

Táto metóda opisuje enzymatické stanovenie obsahu škrobu v krmive pre zvieratá. Obsah škrobu sa určí z kvantitatívneho stanovenia glukózy po enzymatickom rozklade prítomného škrobu na glukózu. Predpokladá sa, že celková nameraná glukóza pochádza zo škrobu prítomného vo vzorke.

2. **Vymedzenie pojmov**

Touto metódou sa stanovuje obsah škrobu a produktov jeho rozkladu s vysokou molekulovou hmotnosťou, ktoré sú nerozpustné v 40 % etanole. Obsah škrobu je vyjadrený v % (m/m).

3. **Princíp**

Vzorky sa zhomogenizujú mletím. Vzorka sa premýva 40 % etanolom, aby sa odstránili rozpustné cukry a rozpustné produkty rozkladu škrobu.

Do suspenzie sa pridá tepelne stabilný enzým alfa-amyláza. Tento enzým štiepi škrob pri teplote 100 °C na menšie reťazce bez ohľadu na to, či škrob je, alebo nie je úplne rozpustený. Veľké kusy škrobu sa štiepia veľmi pomaly. Preto je potrebné, aby vzorky boli úplne rozpustené alebo aby boli vo forme suspenzie, ktorá obsahuje veľmi malé pevné čiastočky.

Potom sa pridá druhý enzým amyloglukozidáza, ktorým sa pri teplote 60 °C hydrolyzujú rozštiepené glukózové reťazce na glukózu.

Po vyčírení kvapaliny, pomocou ktorej sa prítomné bielkoviny, tuky a zvyšky odfiltrujú, sa získa čistý roztok, ktorý sa môže použiť pre HPLC.

Separácia prítomných cukrov sa vykoná pomocou HPLC.

4. **Činidlá a ďalšie látky**

Používajte činidlá s rešpektovanou analytickou čistotou a demineralizovanú vodu.

4.1. 40-percentný vodný roztok etanolu

4.2. Glukóza s čistotou min. 99 %

4.3. Roztok amyloglukozidázy (α-1,4-D-glykánglukohydroláza) z Aspergillus niger (enzymatická aktivita > 5 000 U/ml). Skladovať pri teplote približne 4 °C.

Prípadne sa môže použiť prášok amyloglukozidázy

4.4. Tepelne stabilná alfa-amyláza (α-1,4-D-glykánglukohydroláza). Skladovať pri teplote približne 4 °C.

4.5. Dihydrát octanu zinočnatého, p.a.

4.6. Hexakyanoželeznatan draselný trihydrát (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), extra čistý

4.7. Octan sodný bezvodý, p.a.

4.8. Ľadová kyselina octová, 100 % (v/v)

4.9. Tlmivý roztok octanu sodného (0,2 mol/l)

Do sklenenej kadičky odvážte 16,4 gramu octanu sodného (4.7). Rozpustite vo vode a prelejte do 1 000 ml odmernej banky. Zrieďte vodou po značku a upravte pH kyselinou octovou na 4,7 [použitím pH-metra (5.11)]. Tento roztok môže byť používaný maximálne 6 mesiacov, ak sa skladuje pri teplote 4 °C.

4.10. Roztok amyloglukozidázy (enzymatická aktivita > 250 U/ml)

Pripravte roztok z 5 ml roztoku amyloglukozidázy (4.3) alebo 660 mg prášku amyloglukozidázy v konečnom objeme 100 ml použitím tlmivého roztoku octanu sodného (4.9). Roztok pripravte vždy pred analýzou.

4.11. Referenčný roztok

Pripravte roztoky glukózy vo vode tak, ako sa zvyčajne používajú pri analýzach HPLC.

4.12. Číracie činidlá (Carrezovo činidlo I)

V sklenenej kadičke rozpustite 219,5 gramu octanu zinočnatého (4.5) vo vode. Prelejte do 1 000 ml odmernej banky, pridajte 30 ml kyseliny octovej (4.8). Dôkladne premiešajte a doplňte vodou. Tento roztok môže byť používaný maximálne 6 mesiacov, ak sa skladuje pri laboratórnej teplote.

Na čírenie sa môžu použiť ďalšie číriace činidlá, ktoré sú ekvivalentné s Carrezovym roztokom .

4.13. Číriace činidlá (Carrezovo činidlo II)

V sklenenej kadičke rozpustite vo vode 106,0 gramu hexakyanoželeznatanu tetradraselného trihydrátu (II) (4.6). Prelejte do 1 000 ml odmernej banky. Dôkladne premiešajte a doplňte vodou. Tento roztok môže byť používaný maximálne 6 mesiacov, ak sa skladuje pri laboratórnej teplote.

Na čírenie sa môžu použiť ďalšie číriace činidlá, ktoré sú ekvivalentné s Carrezovým roztokom .

4.14. Mobilná fáza

Pripravte mobilnú fázu, ktorá sa zvyčajne používa pri analýzach cukrov metódou HPLC. V prípade použitia kolóny aminopropyl silikagél je napr. obvyklou mobilnou fázou zmes vody čistoty HPLC a acetonitrilu.

5. **Prístroje**

5.1. Bežné laboratórne sklo

5.2. Odstredivka pre 1 000 g alebo viac (výpočet v strede skúmavky)

5.3. Sklené odstredivkové skúmavky s objemom 100 ml

5.4. Magnetický miešadlo

5.5. Magnetické tyčinky

5.6. Skladané filtre, napríklad 185 mm

5.7. Injekčné filtre, 0,45 μm, vhodné pre vodné roztoky

5.8. Vzorkovacie ampulky vhodné pre HPLC automatický vzorkovač

5.9. 100 ml odmerné banky

5.10. 5 a 10 ml plastové injekčné striekačky

5.11. pH-meter

5.12. Vodný kúpeľ s termostatom s nastaviteľnou teplotou na 60 °C a 100 °C

5.13. Výhrevné dosky s magnetickými miešadlami

5.14. Prístroj HPLC

5.14.1. Pumpa vhodná pre nulovú pulzáciu

5.14.2. Automatický vzorkovač

5.14.3. Kolóna a predkolóna, ktoré sú vhodné na analýzu cukrov

5.14.4. Ohrievač kolóny s teplotným rozsahom od laboratórnej teploty do 40 °C

5.14.5. Detektor vhodný na analýzy cukrov, napríklad refraktometer

5.14.6. Integračný systém

6. **Postup**

6.1. Všeobecne

Vzorky sa analyzujú jednotlivo.

6.2. Príprava vzoriek na niekoľko typov produktov

Produkt sa homogenizuje mletím.

6.3. Dávka vzorky

Obsah škrobu sa odhadne pomocou údajov o prísadách. Množstvo vzorky (vážené s presnosťou na 0,1 mg) sa môže vypočítať podľa:

$$\text{množstvo vzorky (g)} = \frac{\text{objem odmernej banky (100 ml)}}{\text{odhadovaný objem škrobu (\%)}}$$

6.4. Slepý pokus

Slepý pokus, bez pridania vzorky, sa vykoná kompletnou analýzou (uvedenou v 6.5). Výsledok slepého pokusu sa použije pri výpočte obsahu škrobu (7.1).

6.5. Analýza

6.5.1. Príprava vzoriek

Vzorku premiešajte trepaním alebo miešaním. Vybranú analyzovanú dávku (6.3) odvážte do odstredivkovej skúmavky (5.3) a pridajte 50 ml 40 % etanolu (4.1). Pri laboratórnej teplote miešajte v magnetickom miešadle po dobu 20 minút. Magnetickú tyčinku nechajte v skúmavke a odstreďujte po dobu 5 minút. Opatrne odsajte a odstráňte kvapalnú fázu (napríklad Pasteurovou pipetou). Tento extrakčný postup opakujte dvakrát s 25 ml etanolu (4.1). Zvyšok preneste do 100 ml odmernej banky (5.9) s približne 70 ml vody.

Po rozpustení alebo vytvorení suspenzie pridajte 100 mikrolitrov tepelne stabilnej alfa-amylázy (4.4) a po dobu jednej hodiny zahrievajte pri teplote 100 °C, napríklad vo vodnom kúpeli (5.12). Ochlaďte na teplotu 60 °C vo vodnom kúpeli a pridajte 5 ml roztoku amyloglukozidázy (4.10). Banku ponorte na 30 minút do vodného kúpeľa s teplotou 60 °C. Ochlaďte na laboratórnu teplotu, vzorku vyčírte pridaním 1 ml Carrezovho činidla I (4.12), pretrepte a potom pridajte 1 ml Carrezovho činidla II (4.13). Carrezove činidlá I a II môžu byť pridané pred alebo po ochladení. Zrieďte vodou po značku, zhomogenizujte a roztok prefiltrujte cez skladaný filter (5.6). Odoberte extrakt vzorky.

6.5.2. Spracovanie extraktov vzoriek

Pomocou striekačky (5.10) prefiltrujte extrakty cez diskový filter (5.7), ktorý bol prepláchnutý extraktom. Oboberte filtráty do ampuliek (5.8).

Poznámka: Diskový filter sa môže použiť niekoľkokrát. Filter by sa mal prepláchnuť nasledujúcim extraktom, aby sa predišlo kontaminácii s predchádzajúcim extraktom.

6.6. Chromatografia

HPLC sa vykonáva spôsobom obvyklým pri analýze cukrov. Nakoľko vzorky sú extrahované etanolom/vodou, glukóza je hlavný cukor, ktorý sa analyzuje. Ak analýzy HPLC vykazujú stopy maltózy, môže to indikovať neúplnú premenu škrobu.

7. **Výpočet a vyjadrenie výsledkov**

7.1. Výpočet výsledkov HPLC

Z výsledkov analýz HPLC sa vypočíta obsah glukózy (%, m/m).

Enzymatický roztok amyloglukozidázy (4.3) sa stabilizuje glukózou. Okrem toho, tepelne stabilná alfa-amyláza (4.4) sa stabilizuje sacharózou, ktorá môže byť čiastočne premenená na glukózu invertáznou aktivitou amyloglukozidázy. Preto nameraná koncentrácia glukózy (%, m/v) by sa mala upraviť o koncentráciu glukózy stanovenú v slepom pokuse (%, m/v). Obsah glukózy (%, m/m) upravený o slepý pokus sa potom vypočíta z prepočítanej koncentrácie glukózy, hmotnosti vzorky a kalibrácie s referenčnými roztokmi (4.11).

7.2. Výpočet obsahu škrobu

Obsah škrobu (%, m/m) sa vypočíta z obsahu glukózy (%, m/m) po korekcii slepým pokusom.

$$\text{Obsah škrobu} = 0{,}9 * \text{glukóza po korekcii}$$

8. **Presnosť**

8.1. Medzilaboratórny test

Podrobnosti medzilaboratórneho testu týkajúce sa presnosti metódy sú zhrnuté v bode 8.4.

8.2. Opakovateľnosť

Absolútna hodnota rozdielu medzi výsledkami dvoch nezávislých individuálnych testov získaných použitím tej istej metódy na rovnakých testovacích materiáloch v tom istom laboratóriu tým istým pracovníkom pri použití toho istého zariadenia počas krátkeho časového obdobia nebude vo viac ako 5 % prípadov väčšia ako limit opakovateľnosti 1,1 % (m/m). Limit opakovateľnosti bol odvodený zo súhrnných výsledkov medzilaboratórneho testu (pozri bod 8.4).

8.3. Reprodukovateľnosť

Absolútna hodnota rozdielu medzi výsledkami dvoch individuálnych testov získaných použitím tej istej metódy na rovnakých testovacích materiáloch v rôznych laboratóriách rôznymi pracovníkmi pri použití rôznych zariadení nebude vo viac ako 5 % prípadov väčšia ako limit reprodukovateľnosti 3,7 % (m/m). Limit reprodukovateľnosti bol odvodený zo súhrnných výsledkov medzilaboratórneho testu (pozri bod 8.4).

8.4. Výsledky medzilaboratórneho testu

Európske colné laboratóriá vykonali medzilaboratórny test v rokoch 2005 a 2006. Tento test bol vykonaný v súlade s normou ISO 5725 a protokolom IUPAC (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, vol. 67, 1995, p. 331-343). Údaje o presnosti sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Štatistické výsledky medzilaboratórnej štúdie

	Vzorka				
	1	2	3	4	5
Počet laboratórií po vylúčení odľahlých výsledkov	25	26	26	25	24
Počet uznaných výsledkov	50	52	52	50	48
Priemerný obsah škrobu (%, m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Štandardná odchýlka opakovateľnosti s_r (%, m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Limit opakovateľnosti r (%, m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti S_R (%, m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Limit reprodukovateľnosti R (%, m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Vzorky

1: suché krmivo pre psov
2: suché krmivo pre mačky
3: suché krmivo pre mačky (vzorka 2) s prídavkom škrobu
4: suché krmivo pre mačky (vzorka 2) s prídavkom repných rezkov
5: obchodné krmivo pre domáce zvieratá