

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 121/2008

ze dne 11. února 2008,

kterým se stanoví metoda analýzy pro stanovení obsahu škrobu v přípravcích používaných k výživě zvířat (kód KN 2309)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na nařízení Rady (EHS) č. 2658/87 ze dne 23. července 1987 o celní a statistické nomenklatuře a o společném celním sazebníku ⁽¹⁾, a zejména na čl. 9 odst. 1 písm. a) uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Pro zajištění jednotného zacházení s přípravky používanými k výživě zvířat (KN 2309) při jejich dovozu do Společenství je při stanovení metod analýzy nutno zohlednit jejich vědecký a technologický vývoj.
- (2) V souladu s třetí směrnicí Komise 72/199/EHS ze dne 27. dubna 1972, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv ⁽²⁾, se ke stanovení obsahu škrobu v přípravcích používaných k výživě zvířat použije polarimetrická metoda (nazývaná též modifikovaná Ewersova metoda) popsaná v bodě 1 přílohy I uvedené směrnice.
- (3) Na základě studií provedených odborníky z celních laboratoří členských států je nutno stanovit, že nelze-li ke stanovení obsahu škrobu ve zmíněných přípravcích použít polarimetrickou metodu uvedenou ve směrnici 72/199/EHS, použije se enzymatická analytická metoda. Je proto vhodné upřesnit, jak se má enzymatická metoda provádět.
- (4) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Výboru pro celní kodex, sekce celní a statistické nomenklatury,

Odchylně od článku 1 směrnice 72/199/EHS se hmotnostní obsah škrobu v přípravcích používaných k výživě zvířat kódu KN 2309 stanoví enzymatickou analytickou metodou vymezenou v příloze tohoto nařízení v případech, jsou-li ve významném množství přítomny tyto krmné suroviny:

- a) výrobky z cukrové řepy, jako cukrová pulpa, cukrovková melasa, cukrovarské vyloužené řízky, cukrovková melasovaná pulpa, cukrovková vináza, řepa cukrová;
- b) citrusová pulpa;
- c) lněné semeno; lněné expelery; extrahované lněné semeno;
- d) řepkové semeno; řepkové expelery; extrahované řepkové semeno; řepkové slupky;
- e) slunečnicové semeno; extrahované slunečnicové semeno; slunečnicové semeno částečně loupané, extrahované;
- f) kokosové expelery; kokosový extrahovaný šrot;
- g) bramborová pulpa;
- h) sušené kvasnice;
- i) výrobky bohaté na inulín (např. řízky a moučka z topinambur);
- j) škvarky.

Článek 2

Toto nařízení vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v Úředním věstníku Evropské unie.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 256, 7.9.1987, s. 1. Nařízení naposledy pozměněné nařízením Komise (ES) č. 1352/2007 (Úř. věst. L 303, 21.11.2007, s. 3).

⁽²⁾ Úř. věst. L 123, 29.5.1972, s. 6. Směrnice naposledy pozměněná směrnicí 1999/79/ES (Úř. věst. L 209, 7.8.1999, s. 23).

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 11. února 2008.

Za Komisi
László KOVÁCS
člen Komise

PŘÍLOHA

ENZYMATICKÁ METODA PRO STANOVENÍ OBSAHU ŠKROBU V PŘÍPRAVČÍCH POUŽÍVANÝCH K VÝŽIVĚ ZVÍŘAT POMOCÍ VYSOKOTLAKÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC)**1. Oblast působnosti**

Tato metoda popisuje enzymatické stanovení obsahu škrobu v krmivu pro zvířata. Obsah škrobu je odvozen z kvantitativního stanovení glukózy po enzymatickém rozkladu přítomného škrobu na glukózu. Má se za to, že veškerá naměřená glukóza je získána ze škrobu, který je přítomen ve vzorku.

2. Definice

Při této metodě se stanoví obsah škrobu a produktů jeho štěpení o vysoké molekulární hmotnosti nerozpustných ve 40 % ethanolu. Obsah škrobu je vyjádřen v % (m/m).

3. Princip

Vzorky jsou homogenizovány rozemletím. K odstranění rozpustných cukrů a produktů štěpení škrobu se vzorek vypere 40 % ethanolom.

Do suspenze se přidá tepelně stálý enzym alfa-amyláza. Tento enzym při teplotě 100 °C štěpí škrob na menší řetězce bez ohledu na to, zda je škrob zcela rozpuštěný. Velké kusy škrobu se štěpí velmi pomalu. Proto je nutné, aby vzorky byly zcela rozpuštěny, nebo aby byly ve formě suspenze, která obsahuje velmi malé pevné částice.

Poté se přidá druhý enzym amyloglukosidáza, který při teplotě 60 °C hydrolyzuje rozštěpené řetězce glukózy na glukózu.

Po vyčerení kapaliny, kdy jsou po filtraci odstraněny přítomné bílkoviny, tuky a rezidua, je získán čirý roztok, který lze použít k HPLC.

Oddělení přítomných cukrů se provádí pomocí HPLC.

4. Činidla a ostatní materiály

Použijte činidla čistoty p.a. a demineralizovanou vodu.

4.1 40 % vodný roztok ethanolu.

4.2 Glukóza, min. 99 %.

4.3 Roztok amyloglukosidázy (1,4-alfa-D-glukan-glukohydroláza) z *Aspergillus niger* (aktivita enzymu > 5 000 U/ml). Skladování při teplotě cca. 4 °C.

Alternativně lze použít rovněž amyloglukosidázu ve formě prášku.

4.4 Tepelně stálá alfa-amyláza (1,4-alfa-D-glukan-glukanohydroláza). Skladování při teplotě cca. 4 °C.

4.5 Dihydrát octanu zinečnatého, p.a.

4.6 Hexakynoželesnatan draselný (II) ($K_4[Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$), extra čistý.

4.7 Bezvodý octan sodný, p.a.

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

4.9 Pufr octanu sodného (0,2 mol/l).

Do skleněné kádinky odvažte 16,4 g octanu sodného (4.7). Rozpusťte ve vodě a vlijte do odměrné baňky o objemu 1 000 ml. Zřeďte po značku vodou a kyselinou octovou upravte pH na 4,7 (pomocí pH metru (5.11)). Tento roztok lze při skladování při teplotě 4 °C používat po dobu nejvýše 6 měsíců.

4.10 Roztok amyloglukosidázy (aktivita enzymu > 250 U/ml).

Připravte roztok z 5 ml roztoku amyloglukosidázy (Sigma, 4.3) nebo 660 mg amyloglukosidázy ve formě prášku o konečném objemu 100 ml pomocí pufru octanu sodného (4.9). Roztok připravte okamžitě.

4.11 Referenční roztok.

Připravte roztoky glukózy ve vodě, jak se běžně používají při analýze HPLC.

4.12 Činidlo k vyčerení (Carrezovo činidlo I).

Ve skleněné kádince rozpusťte 219,5 g octanu zinečnatého (4.5) ve vodě. Vlijte do odměrné baňky o objemu 1 000 ml, přidejte 30 ml kyseliny octové (4.8). Důkladně promíchejte a doplňte vodou. Tento roztok lze při skladování při teplotě okolí používat po dobu nejvýše 6 měsíců.

Lze použít jiná činidla k vyčerení rovnocenná Carrezovu činidlu.

4.13 Činidlo k vyčerení (Carrezovo činidlo II).

Ve skleněné kádince rozpusťte 106,0 g hexakynoželesnatanu draselného (II) (4.6) ve vodě. Vlijte do odměrné baňky o objemu 1 000 ml. Důkladně promíchejte a doplňte vodou. Tento roztok lze při skladování při teplotě okolí používat po dobu nejvýše 6 měsíců.

Lze použít jiná činidla k vyčerení rovnocenná Carrezovu činidlu.

4.14 Mobilní fáze.

Připraví se mobilní fáze, která se běžně používá v HPLC analýze cukrů. Při použití kolony aminopropyl-silikagelu je např. obvyklou mobilní fází směs vody čistoty HPLC a acetonitrilu.

5. **Přístroje**

5.1 Běžné laboratorní sklo.

5.2 Odstředivka pro 1 000 g nebo více (vypočteno ve středu odstředivkové zkumavky).

5.3 Skleněné odstředivkové zkumavky o obsahu 100 ml.

5.4 Magnetické míchadlo.

5.5 Magnetická míchadla.

5.6 Skládání filtry, např. 185 mm.

5.7 Injekční filtry, 0,45 µm, vhodné pro vodné roztoky.

5.8 Vzorkovací lahvičky vhodné pro HPLC automatický vzorkovač.

5.9 Odměrné baňky o objemu 100 ml.

5.10 Plastové injekční stříkačky, 5 a 10 ml.

5.11 pH metr.

5.12 Vodní lázeň s regulátorem teploty, nastavitelná na 60 °C a 100 °C.

5.13 Topné ploténky s magnetickými míchadly.

5.14 Přístroj HPLC.

5.14.1 Vývěva, vhodná pro nulovou pulzaci.

5.14.2 Automatický vzorkovač.

5.14.3 Kolona a předkolona, vhodné pro analýzu cukrů.

5.14.4 Ohřívač kolony, teplotní rozsah mezi teplotou okolí a 40 °C.

5.14.5 Detektor, vhodný pro analýzu cukrů, např. refraktometr.

5.14.6 Integrační systém.

6. **Postup**

6.1 Obecně.

Vzorky jsou analyzovány jednotlivě.

6.2 Příprava vzorku pro několik druhů výrobků.

Výrobek je homogenizován rozemletím.

6.3 Dávka vzorku.

Obsah škrobu se odhaduje pomocí údajů o přísadách. Množství vzorku (odvážené s přesností na 0,1 mg) lze odhadnout ze vzorce:

$$\text{množství vzorku (g)} = \frac{\text{objem odměrné baňky (100 ml)}}{\text{odhadovaný obsah škrobu (\%)}}$$

6.4 Slepé stanovení.

Slepá zkouška se provede pomocí celé analýzy (jak je popsána v bodě 6.5) bez přidání vzorku. Výsledek slepého stanovení se použije při výpočtu obsahu škrobu (7.1).

6.5 Analýza.**6.5.1 Příprava vzorků.**

Promíchejte vzorek protřepáním nebo rozmícháním. Zvolená zkušební dávka (6.3) se odváží do odstředivkové zkumavky (5.3) a přidá se 50 ml 40 % ethanolu (4.1). Míchejte magnetickým míchadlem po dobu 20 minut při teplotě okolí. Ponechte magnetické míchadlo ve zkumavce a odstředivce po dobu pěti minut. Opatrně odsajte a odstraňte kapalnou fázi (např. Pasteurovou pipetou). Tento extrakční postup opakujte dvakrát s 25 ml ethanolu (4.1). Zbytek přeneste do odměrné baňky o objemu 100 ml (5.9) s přibližně 70 ml vody.

Po rozpuštění nebo vytvoření suspenze přidejte 100 mikrolitrů tepelně stálé alfa-amylázy (4.4) a zahřívejte při teplotě 100 °C po dobu 1 hodiny např. ve vodní lázni (5.12). Ve vodní lázni ochlaďte na 60 °C a přidejte 5 ml roztoku amyloglukosidázy (4.10). Uložte baňku na dobu 30 min do vodní lázně o teplotě 60 °C. Zchlaďte na teplotu okolí, vzorek vyčerte přidáním 1 ml Carrezova činidla I (4.12), protřepejte a poté přidejte 1 ml Carrezova činidla II (4.13). Carrezovo činidlo I a II lze přidat před ochlazením nebo posléze. Po značku rozřeďte vodou, homogenizujte a přefiltrujte roztok přes skládaný filtr (5.6). Extrakt vzorku jímejte.

6.5.2 Zpracování extraktů vzorků.

Pomocí injekční stříkačky (5.10) přefiltrujte extrakty přes kotoučový filtr (5.7), který byl předem vypláchnut extraktem. Filtrát jímejte do lahvíček (5.8).

Poznámka: Kotoučový filtr lze použít několikrát. Je nutno jej propláchnout dalším extraktem, aby se zamezilo kontaminaci vyvolané předchozím extraktem.

6.6 Chromatografie.

HPLC se provádí způsobem obvyklým při analýze cukrů. Jelikož vzorky jsou extrahovány pomocí ethanolu/vody, je hlavním cukrem, který se analyzuje, glukóza. Jestliže HPLC analýza vykazuje stopy maltózy, může to naznačovat neúplný rozklad škrobu.

7. Výpočet a vyjádření výsledků**7.1 Výpočet výsledků HPLC.**

Z výsledků HPLC analýzy se vypočte obsah glukózy (% m/m).

Enzymatický roztok amyloglukosidázy (4.3) se stabilizuje glukózou. Tepelně stálá alfa-amyláza (4.4) se stabilizuje pomocí sacharózy, kterou lze částečně přeměnit na glukózu aktivitou invertázy amyloglukosidázy. Proto je nutno naměřenou koncentraci glukózy (% m/v) opravit o koncentraci glukózy (% m/v) zjištěnou při slepé zkoušce. Obsah glukózy (% m/m) opravený podle výsledku slepé zkoušky se poté vypočte pomocí přepočtené koncentrace glukózy, hmotnosti vzorku a porovnání s referenčními roztoky (4.11).

7.2 Výpočet obsahu škrobu.

Obsah škrobu (% m/m) se vypočte z obsahu glukózy (% m/m) po opravě o výsledek slepé zkoušky.

$$\text{Obsah škrobu} = 0,9 * \text{přepočtená koncentrace glukózy}$$

8. Přesnost**8.1 Mezilaboratorní zkouška.**

Podrobnosti mezilaboratorní zkoušky týkající se přesnosti metody jsou shrnuty v bodě 8.4.

8.2 Opakovatelnost.

Absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou samostatných stanovení získaných stejnou metodou u totožného zkušebního materiálu v téže laboratoři týměž pracovníkem pomocí stejného vybavení krátce po sobě není u více než 5 % případů vyšší než mez opakovatelnosti 1,1 % (m/m). Mez opakovatelnosti byla odvozena z úhrnných výsledků mezilaboratorní zkoušky (viz bod 8.4).

8.3 Reprodukovatelnost.

Absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou samostatných stanovení získaných stejnou metodou u totožného zkušebního materiálu v různých laboratořích jinými pracovníky pomocí jiného vybavení není u více než 5 % případů vyšší než mez reprodukovatelnosti 3,7 % (m/m). Mez reprodukovatelnosti byla odvozena z úhrnných výsledků mezilaboratorní zkoušky (viz bod 8.4).

8.4 Výsledky mezilaboratorní zkoušky.

Mezilaboratorní zkouška byla provedena v letech 2005 a 2006 za účasti evropských celních laboratoří. Tato zkouška byla provedena v souladu s normou ISO 5725 a protokolem IUPAC (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, sv. 67, 1995, s. 331–343). Údaje o přesnosti jsou uvedeny v tabulce.

Statistické výsledky mezilaboratorní studie

	Vzorek				
	1	2	3	4	5
Počet laboratoří po vyloučení odchylek	25	26	26	25	24
Počet uznaných výsledků	50	52	52	50	48
Střední obsah škrobu (% m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Směrodatná odchylka opakovatelnosti s_r (% m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Mez opakovatelnosti r (% m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti s_R (% m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Mez reprodukovatelnosti R (% m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Vzorky

- 1: suché krmivo pro psy
- 2: suché krmivo pro kočky
- 3: suché krmivo pro kočky (vzorek 2) s přísávkem škrobu
- 4: suché krmivo pro kočky (vzorek 2) s přísávkem řepných řízků
- 5: komerční krmivo pro domácí zvířata