

**UREDBA KOMISIJE (ES) št. 121/2008****z dne 11. februarja 2008****o določitvi analitske metode za določanje vsebnosti škroba v izdelkih, ki se uporabljajo kot krma za živali (oznaka KN 2309)**

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

**Člen 1**

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

Z odstopanjem od člena 1 Direktive 72/199/EGS se vsebnost škroba glede na maso v izdelkih, ki se uporabljajo kot krma za živali v smislu oznake KN 2309, določi z encimsko analitsko metodo iz Priloge k tej uredbi, in sicer v primerih, ko so v znatnih količinah prisotna naslednja posamična krmila:

ob upoštevanju Uredbe Sveta (EGS) št. 2658/87 z dne 23. julija 1987 o tarifni in statistični nomenklaturi ter skupni carinski tarifi <sup>(1)</sup> in zlasti člena 9(1)(a) te uredbe,

(a) proizvodi iz (sladkorne) pese, kot so pulpa (sladkorne) pese, melasa iz (sladkorne) pese, melasirana pulpa (sladkorne) pese, usedlina pri destilaciji melase iz (sladkorne) pese, (pesni) sladkor;

ob upoštevanju naslednjega:

(b) pulpa agrumov;

(1) Za zagotovitev, da so izdelki, ki se uporabljajo kot krma za živali (KN 2309), pri uvozu deležni enotnega obravnavanja v vsej Skupnosti, je treba pri določitvi analitskih metod upoštevati znanstveni in tehnološki razvoj teh metod.

(c) laneno seme; oljna pogača iz lanenih semen; ekstrahirano laneno seme;

(2) V skladu s Tretjo Direktivo Komisije 72/199/EGS z dne 27. aprila 1972 o določitvi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme <sup>(2)</sup> je za določanje vsebnosti škroba v izdelkih, ki se uporabljajo kot krma za živali, treba uporabiti polarimetrično metodo (imenovano tudi: modificirana Ewersova metoda), opisano v točki 1 Priloge I k navedeni direktivi.

(d) seme oljne repice; oljna pogača iz semen oljne repice; ekstrahirano seme oljne repice; luščine oljne repice;

(3) Glede na študije, ki so jih izvedli strokovnjaki carinskih laboratorijev držav članic, je treba zagotoviti uporabo encimske analitske metode, kadar za določanje vsebnosti škroba v navedenih izdelkih ni mogoče uporabiti polarimetrične metode iz Direktive 72/199/EGS. Zato je primerno opredeliti način izvajanja navedene encimske metode.

(e) sončnično seme; ekstrahirano sončnično seme; ekstrahirano sončnično seme iz delno oluščenih semen;

(4) Ukrepi, predvideni s to uredbo, so v skladu z mnenjem Oddelka za tarifno in statistično nomenklaturu Odbora za carinski zakonik –

(f) pogača iz kopre; ekstrahirana kopra;

(g) krompirjeva pulpa;

(h) suhi kvas;

(i) proizvodi z visoko vsebnostjo inulina (npr. čips in moka topinamburja);

(j) ocvirki.

**Člen 2**

Ta uredba začne veljati dvajseti dan po objavi v Uradnem listu Evropske unije.

<sup>(1)</sup> UL L 256, 7.9.1987, str. 1. Uredba, kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo Komisije (ES) št. 1352/2007 (UL L 303, 21.11.2007, str. 3).

<sup>(2)</sup> UL L 123, 29.5.1972, str. 6. Direktiva, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 1999/79/ES (UL L 209, 7.8.1999, str. 23).

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 11. februarja 2008

*Za Komisijo*  
László KOVÁCS  
*Član Komisije*

---

## PRILOGA

**ENCIMSKA METODA ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI ŠKROBA V IZDELKIH, KI SE UPORABLJAJO KOT KRMA ZA ŽIVALI, Z UPORABO TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)****1. Področje uporabe**

Ta metoda opisuje encimsko kvantitativno določitev vsebnosti škroba v krmi za živali. Vsebnost škroba je izpeljana iz kvantitativne določitve glukoze po encimski razgradnji prisotnega škroba v glukozo. Za vso izmerjeno glukozo se šteje, da izhaja iz škroba, prisotnega v vzorcu.

**2. Opredelitev pojmov**

S to metodo se ugotavlja vsebnost škroba in njegovih produktov razgradnje z višjo molekulsko maso, netopnih v 40-odstotnem etanolu. Vsebnost škroba je izražena v % (m/m).

**3. Princip**

Vzorci se homogenizirajo z mletjem. Vzorec se spere s 40-odstotnim etanolom, da se odstranijo topni sladkorji in topni produkti razgradnje škroba.

Suspenziji se doda termostabilni encim alfaamilaza. Ta encim pri 100 °C razgradi škrob na krajše verige, in sicer neodvisno od tega, ali je škrob povsem raztopljen v raztopini ali ne. Če je škrob v večjih grudicah, razgradnja poteka zelo počasi. Zato je treba vzorce povsem raztopiti ali pa morajo biti v obliki suspenzije, ki vsebuje zelo majhne trdne delce.

Nato se doda drugi encim amiloglukozidaza, ki pri 60 °C hidrolizira razgrajene glukozne verige v glukozo.

Po zbistritvi tekočine, pri čemer se s filtriranjem izločijo prisotne beljakovine, maščobe in ostanki, se pridobi bistra raztopina, ki se lahko uporabi za HPLC.

Ločitev prisotnih sladkorjev se izvede s HPLC.

**4. Reagenti in druge snovi**

Uporabijo se reagenti s priznano analitsko čistostjo in demineralizirana voda.

4.1 Etanol 40 vol. % v vodi

4.2 Glukoza, vsaj 99 %

4.3 Raztopina amiloglukozidaze (1,4- alfa-D-glukan glukohidrolaze) iz *aspergillus niger* (encimska aktivnost > 5 000 U/ml). Hranjenje pri pribl. 4 °C

Namesto tega se lahko uporabi tudi amiloglukozidaza v prahu.

4.4 Termostabilna alfa-amilaza (1,4-alfa-D-glukan glukohidrolaza). Hranjenje pri pribl. 4 °C

4.5 Cinkov acetat dihidrat p.a.

4.6 Kalijev heksacianoferat (II) ( $K_4[Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$ ), posebno čist.

4.7 Natrijev acetat, brezvodni, p.a.

4.8 Ledocetna kislina, 100 % (v/v)

4.9 Natrijev acetatni pufer (0,2 mol/l)

V čašo se natehta 16,4 grama natrijevega acetata (4.7). Raztopi se v vodi in nato izpere v 1 000-mililitrsko merilno bučko. Z vodo se razredči do oznake in pH uravna z očetno kislino (z uporabo pH-metra (5.11) na 4,7)). Ta raztopina se lahko uporablja največ šest mesecev in se hrani pri 4 °C.

4.10 Raztopina amiloglukozidaze (encimska aktivnost > 250 U/ml)

Iz 5 ml raztopine amiloglukozidaze (4.3) ali 660 mg amiloglukozidaze v prahu se z uporabo pufra natrijevega acetata (4.9) pripravi 100 ml raztopine. Pripravi se za takojšnjo uporabo.

4.11 Referenčna raztopina

Pripravi se vodna raztopina glukoze, ki se praviloma uporablja v analizi HPLC.

#### 4.12 Reagent za bistrenje (carrez I)

V čaši se v vodi raztopi 219,5 grama cinkovega acetata (4.5). Spere se v 1 000-mililitrsko merilno bučko in doda 30 ml očetne kisline (4.8). Temeljito se zmeša in dopolni z vodo do oznake. Ta raztopina se lahko uporablja največ šest mesecev in se hrani pri sobni temperaturi.

Za bistrenje se lahko uporabijo drugi reagenti, enakovredni raztopini carrez.

#### 4.13 Reagent za bistrenje (carrez II)

V čaši se v vodi raztopi 106,0 grama kalijevega heksacianoferata (II) (4.6). Spere se v 1 000-mililitrsko merilno bučko. Temeljito se zmeša in dopolni z vodo do oznake. Ta raztopina se lahko uporablja največ šest mesecev in se hrani pri sobni temperaturi.

Za bistrenje se lahko uporabijo drugi reagenti, enakovredni raztopini carrez.

#### 4.14 Mobilna faza

Pripravi se mobilna faza, ki se praviloma uporablja v analizi sladkorjev HPLC. Pri uporabi aminopropil silikagel kolone je npr. običajna mobilna faza zmes vode, primerne za HPLC in acetonitrila.

### 5. **Oprema**

#### 5.1 Standardne laboratorijske steklene posode

#### 5.2 Centrifuga s 1 000 g ali več (računano v središču epruvete)

#### 5.3 Steklene 100-mililitrske centrifugirke

#### 5.4 Magnetno mešalo

#### 5.5 Magnetki

#### 5.6 Nagubani filtri, npr. 185 mm

#### 5.7 Filtri za brizgalke, 0,45 µm, primerni za vodne raztopine

#### 5.8 Viale za vzorce, primerne za avtomatski vzorčevalnik HPLC

#### 5.9 Merilne bučke, 100 ml

#### 5.10 Plastične brizgalke, 5 in 10 ml

#### 5.11 pH-meter

#### 5.12 Vodna kopel s termostatom, nastavljivim na 60 °C in 100 °C

#### 5.13 Grelne plošče z magnetnimi mešali

#### 5.14 Instrument HPLC

##### 5.14.1 Črpalka, brez pulziranja

##### 5.14.2 Avtomatski vzorčevalnik

##### 5.14.3 Kolona in predkolona, primerni za analizo sladkorjev

##### 5.14.4 Grelnik za kolono s temperaturnim razponom od sobne temperature do 40 °C

##### 5.14.5 Detektor, primeren za analizo sladkorjev, npr. detektor na principu lomnega količnika

##### 5.14.6 Integracijski sistem

### 6. **Postopek**

#### 6.1 Splošno

Vzorci se analizirajo posamično.

#### 6.2 Priprava vzorca za več vrst proizvodov

Proizvod se homogenizira z mletjem.

### 6.3 Količina vzorca

Vsebnost škroba se oceni na podlagi navedbe sestavin. Množina vzorca (merjeno na 0,1 mg natančno) se lahko oceni na naslednji način:

$$\text{množina vzorca (g)} = \frac{\text{prostornina merilne bučke (100 ml)}}{\text{ocenjena vsebnost škroba (\%)}}$$

### 6.4 Slepi preskus

Za slepi preskus se izvede popolna analiza (kakor je opisana v 6.5), brez dodajanja vzorca. Rezultat slepega preskusa se uporabi za izračun vsebnosti škroba (7.1).

### 6.5 Analiza

#### 6.5.1 Priprava vzorcev

Vzorec se zmeša s stresanjem ali mešanjem. Ocenjena količina za analizo (6.3) se natehta v centrifugirko (5.3), nato pa se doda 50 ml 40-odstotnega etanola (4.1). Z magnetnim mešalom se pri sobni temperaturi meša 20 minut. Magnet naj ostane v centrifugirki in se pet minut centrifugira. Tekoča faza se pazljivo izsesa in odstrani (npr. s Pasteurjevo pipeto). Ta postopek ekstrakcije se dvakrat ponovi s po 25 ml etanola (4.1). Preostanek se prenese v 100-mililitrsko merilno bučko (5.9) s približno 70 ml vode.

Po raztapljanju ali suspendiranju se doda 100 mikrolitrov termostabilne alfaamilaze (4.4) in eno uro segreva pri 100 °C, npr. v vodni kopeli (5.12). V vodni kopeli se nato ohladi na 60 °C in doda 5 ml raztopine amiloglukozidaze (4.10). Bučka se za 30 minut postavi v vodno kopel pri 60 °C. Ohladi se na sobno temperaturo, vzorec se zbistri z dodatkom 1 ml carrez I (4.12), se stresa in nato doda 1 ml raztopine carrez II (4.13). Carrez I in II se lahko dodata pred ohlajanjem ali po ohlajanju. Do oznake se razredči z vodo, raztopina se homogenizira in filtrira skozi nagubani filter (5.6). Zbere se ekstrakt vzorca.

#### 6.5.2 Postopek z ekstrakti vzorcev

Ekstrakti se z brizgalko (5.10), predhodno sprano z ekstraktom, filtrirajo skozi filtrirni disk (5.7). Filtrati se zberejo v vialah (5.8).

*Opomba:* Filtrirni disk se lahko uporabi večkrat. Vsakokrat ga je treba sprati z naslednjim ekstraktom, da se tako prepreči kontaminacija s predhodnim ekstraktom.

### 6.6 Kromatografija

HPLC se izvede tako, kot se praviloma izvaja pri analizi sladkorjev. Ker se vzorci ekstrahirajo z etanolom/vodo, je glukoza glavni sladkor, ki ga je treba analizirati. Če analiza HPLC pokaže sledove maltoze, je to lahko znak nepopolne razgradnje škroba.

## 7. Izračun in navajanje rezultatov

### 7.1 Izračun rezultatov HPLC

Vsebnost glukoze (% m/m) se izračuna iz rezultatov analize HPLC.

Encimska raztopina amiloglukozidaze (4.3) je stabilizirana z glukozo. Poleg tega je termostabilna alfa-amilaza (4.4) stabilizirana s saharozo, ki se lahko delno zaradi invertazne aktivnosti amiloglukozidaze pretvori v glukozo. Zato je treba izmerjeno koncentracijo glukoze (% m/v) popraviti za koncentracijo glukoze (% m/v) iz slepega preskusa. Vsebnost glukoze (% m/m), popravljena za vrednost iz slepega preskusa, se nato izračuna iz popravljene koncentracije glukoze, mase vzorca in umerjanja z referenčnimi raztopinami (4.11).

### 7.2 Izračun vsebnosti škroba

Vsebnost škroba (% m/m) se izračuna iz vsebnosti glukoze (% m/m), popravljene za vrednost iz slepega preskusa.

$$\text{Vsebnost škroba} = 0,9 * \text{popravljena vsebnost glukoze}$$

## 8. Natančnost

### 8.1 Medlaboratorijski preskus

Podrobnosti medlaboratorijskega preskusa o natančnosti metode so povzete v 8.4.

## 8.2 Ponovljivost

Absolutna razlika med dvema neodvisnima posameznima rezultatoma analiz, ki ju v kratkem časovnem presledku z isto metodo na istovetnem preskusnem materialu v istem laboratoriju izvede isti izvajalec z uporabo iste opreme, ne sme biti v več kot 5 % primerov večja od meje ponovljivosti, ki znaša 1,1 % (m/m). Meja ponovljivosti je bila dobljena iz zbranih rezultatov medlaboratorijskih preskusov (glej 8.4).

## 8.3 Obnovljivost

Absolutna razlika med dvema neodvisnima posameznima rezultatoma analiz, ki ju z isto metodo na istovetnem preskusnem materialu v različnih laboratorijih izvedejo različni izvajalci z uporabo različne opreme, ne sme biti v več kot 5 % primerov večja od meje obnovljivosti, ki znaša 3,7 % (m/m). Meja obnovljivosti je bila dobljena iz skupnih rezultatov medlaboratorijskih preskusov (glej 8.4).

## 8.4 Rezultati medlaboratorijskega preskusa

Medlaboratorijski preskus je bil opravljen leta 2005 in 2006 s sodelovanjem evropskih carinskih laboratorijev. Preskus je bil opravljen v skladu z ISO 5725 in protokolom IUPAC (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, št. 67, 1995, str. 331–343). Podatki o natančnosti so zbrani v spodnji preglednici:

Statistični rezultati medlaboratorijske študije

	Vzorec				
	1	2	3	4	5
Število laboratorijev po izločitvi odstopanj	25	26	26	25	24
Število sprejetih rezultatov	50	52	52	50	48
Povprečna vsebnost škroba (% m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Standardni odklon ponovljivosti $s_r$ (% m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Meja ponovljivosti $r$ (% m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Standardni odklon obnovljivosti $s_R$ (% m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Meja obnovljivosti $R$ (% m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

**Vzorci**

- 1: suha hrana za pse
- 2: suha hrana za mačke
- 3: suha hrana za mačke (vzorec 2) z dodatkom škroba
- 4: suha hrana za mačke (vzorec 2) z dodatkom pesnih rezancev
- 5: komercialna hrana za hišne živali