

To besedilo je zgolj informativne narave in nima pravnega učinka. Institucije Unije za njegovo vsebino ne prevzemajo nobene odgovornosti. Verodostojne različice zadevnih aktov, vključno z uvodnimi izjavami, so objavljene v Uradnem listu Evropske unije. Na voljo so na portalu EUR-Lex. Uradna besedila so neposredno dostopna prek povezav v tem dokumentu

► **B**

**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)**

(UL L 37, 12.2.2008, str. 3)

spremenjena z:

		Uradni list		
		št.	stran	datum
► <b>M1</b>	Izvedbena uredba Komisije (EU) 2017/68 z dne 9. januarja 2017	L 9	4	13.1.2017

**▼B****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)

*Člen 1*

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:

- (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;
- (b) pulpa agrumov;
- (c) laneno seme; oljna pogača iz lanenih semen; ekstrahirano laneno seme;
- (d) seme oljne repice; oljna pogača iz semen oljne repice; ekstrahirano seme oljne repice; luščine oljne repice;
- (e) sončnično seme; ekstrahirano sončnično seme; ekstrahirano sončnično seme iz delno oluščenih semen;
- (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;

**▼M1**

- (k) sojini proizvodi.

**▼B***Člen 2*

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

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



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 molekularno 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)

**▼B**

- 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

**▼ B**

- 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, nastavlјivim 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.

**▼B**

Tekoča faza se pazljivo izsese 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:* 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).

**▼ B**

## 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