

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 121/2008**z dnia 11 lutego 2008 r.****określające metodę analizy do oznaczania zawartości skrobi w preparatach w rodzaju stosowanych do karmienia zwierząt (kod CN 2309)**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

Artykuł 1

uwzględniając rozporządzenie Rady (EWG) nr 2658/87 z dnia 23 lipca 1987 r. w sprawie nomenklatury taryfowej i statystycznej oraz w sprawie Wspólnej Taryfy Celnej⁽¹⁾, w szczególności jego art. 9 ust. 1 lit. a),

W drodze odstępstwa od art. 1 dyrektywy 72/199/EWG zawartość skrobi w masie preparatów w rodzaju stosowanych do karmienia zwierząt w rozumieniu kodu CN 2309 oznaczana jest enzymatyczną metodą analityczną określoną w załączniku do niniejszego rozporządzenia, w przypadkach gdy następujące materiały paszowe występują w znacznych ilościach:

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W celu zapewnienia jednolitego traktowania w imporcie w całej Wspólnocie preparatów w rodzaju stosowanych do karmienia zwierząt (CN 2309), konieczne jest, by ustanawiając metody analityczne, uwzględnić ewolucję naukową i techniczną w zakresie tych metod.
- (2) Zgodnie z trzecią dyrektywą Komisji 72/199/EWG z dnia 27 kwietnia 1972 r. ustalającą wspólnotowe metody analityczne do celów urzędowej kontroli pasz⁽²⁾ w celu oznaczania zawartości skrobi w preparatach w rodzaju stosowanych do karmienia zwierząt należy stosować metodę polarymetryczną (zwaną również zmodyfikowaną metodą Ewersa) określoną w pkt 1 załącznika I do wspomnianej dyrektywy.
- (3) W świetle badań przeprowadzonych przez specjalistów w laboratoriach celnych państw członkowskich konieczne jest ustanowienie, że jeżeli metoda polarymetryczna określona w dyrektywie 72/199/EWG nie może być stosowana do oznaczenia zawartości skrobi we wspomnianych preparatach, w celu dokonania analizy należy stosować metodę enzymatyczną. W związku z tym właściwe jest określenie, w jaki sposób powinna być przeprowadzana analiza metodą enzymatyczną.
- (4) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Sekcji Nomenklatury Taryfowej i Statystycznej Komitetu Kodeksu Celnego,

- a) produkty z buraków (cukrowych), takie jak wysłodki buraczane (z buraków cukrowych), melasa z buraków (cukrowych), wysłodki buraczane melasowane (z buraków cukrowych), wywar melasowy (z buraków cukrowych), cukier (z buraków cukrowych);
- b) pulpa cytrusowa;
- c) nasiona lnu; makuch lniany; śruta poekstrakcyjna lniana;
- d) nasiona rzepaku; makuch rzepakowy; śruta poekstrakcyjna rzepakowa; łuski nasion rzepaku;
- e) nasiona słonecznika; śruta poekstrakcyjna słonecznikowa; śruta poekstrakcyjna słonecznikowa z częściowo obłuszczonego nasion słonecznika;
- f) makuch z kopry; śruta poekstrakcyjna z kopry;
- g) pulpa ziemniaczana;
- h) drożdże odwodnione;
- i) produkty bogate w inulinę (np. chipsy i mączka z topinambura);
- j) skwarki.

⁽¹⁾ Dz.U. L 256 z 7.9.1987, s. 1. Rozporządzenie ostatnio zmienione rozporządzeniem Komisji (WE) nr 1352/2007 (Dz.U. L 303 z 21.11.2007, s. 3).

⁽²⁾ Dz.U. L 123 z 29.5.1972, s. 6. Dyrektywa ostatnio zmieniona dyrektywą 1999/79/WE (Dz.U. L 209 z 7.8.1999, s. 23).

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 11 lutego 2008 r.

W imieniu Komisji

László KOVÁCS

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK

ENZYMATYCZNA METODA OZNACZANIA ZAWARTOŚCI SKROBI W PREPARATACH STOSOWANYCH DO KARMIEŃIA ZWIERZĄT PRZY UŻYCIU WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)**1. Zakres**

Niniejsza metoda opisuje enzymatyczne oznaczanie zawartości skrobi w paszy dla zwierząt. Zawartość skrobi oznacza się na podstawie ilościowego oznaczenia glukozy po enzymatycznym rozkładzie zawartej w próbce skrobi na glukozę. Przyjmuje się, że cała oznaczona ilość glukozy pochodzi ze skrobi zawartej w próbce.

2. Definicje

Metoda ta polega na oznaczeniu zawartości skrobi i produktów jej rozkładu o dużej masie cząsteczkowej, nierozpuszczalnych w 40 % etanolu. Zawartość skrobi jest wyrażona w % (m/m).

3. Zasada

Próbki homogenizuje się przez zmielenie. Próbkę przemywa się 40 % etanolem, aby usunąć cukry rozpuszczalne i rozpuszczalne produkty rozkładu skrobi.

Do zawiesiny dodaje się enzym – termostabilną alfa-amylazę. Enzym ten powoduje rozkład skrobi w temperaturze 100 °C na mniejsze łańcuchy, nawet jeśli skrobia nie jest całkowicie rozpuszczona. Większe grudki skrobi rozkładają się bardzo powoli. Dlatego też próbki powinny być dokładnie rozpuszczone lub mieć postać zawiesiny zawierającej bardzo małe cząstki stałe.

Następnie dodaje się drugi enzym, amyloglukozydazę, która powoduje hydrolizę zdegradowanych łańcuchów glukozowych do glukozy w temperaturze 60 °C.

Po odstaniu cieczy i oddzieleniu za pomocą filtracji obecnych w próbce białek, tłuszczów i pozostałości otrzymuje się klarowny roztwór, który może być użyty do analizy metodą HPLC.

Rozdział cukrów zawartych w próbce przeprowadza się za pomocą HPLC.

4. Odczynniki i inne materiały

Należy stosować odczynniki cz.d.a. oraz wodę demineralizowaną.

4.1. Etanol, 40 % obj. roztwór wodny

4.2. Glukoza, min. 99 %

4.3. Roztwór amyloglukozydazy (1,4-alfa-D-glukanoglukohydrolaza) z *Aspergillus niger* (aktywność enzymu > 5 000 U/ml). Przechowywać w temperaturze około 4 °C.

Zamiennie można zastosować również amyloglukozydazę sproszkowaną.

4.4. Termostabilna alfa-amylaza (1,4-alfa-D-glukano-glukanohydrolaza). Przechowywać w temperaturze około 4 °C.

4.5. Octan cynku dihydrat, cz.d.a.

4.6. Heksacyjanożelazian(II) potasu ($K_4[Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$), ekstra czysty

4.7. Octan sodu bezwodny, cz.d.a.

4.8. Kwas octowy lodowaty, 100 % (v/v)

4.9. Octan sodu – bufor (0,2 mol/l)

Odważyć 16,4 g octanu sodu (pkt 4.7) i przenieść do zlewki. Rozpuścić w wodzie i przenieść do kolby miarowej o pojemności 1 000 ml. Rozcieńczyć do kreski wodą i doprowadzić pH do 4,7 za pomocą kwasu octowego (wykorzystując pehametr (pkt 5.11)). Roztwór ten nadaje się do użytku maksymalnie przez 6 miesięcy, przy czym należy go przechowywać w temperaturze 4 °C.

4.10. Roztwór amyloglukozydazy (aktywność enzymu > 250 U/ml)

Sporządzić roztwór z 5 ml roztworu amyloglukozydazy (pkt 4.3) lub 660 mg amyloglukozydazy sproszkowanej do objętości końcowej 100 ml przy użyciu octanu sodu – buforu (pkt 4.9). Sporządzać na bieżąco.

4.11. Roztwór porównawczy

Sporządzić roztwory glukozy w wodzie w sposób stosowany w analizie metodą HPLC.

4.12. Odczynnik do klarowania (Carrez I)

Rozpuścić 219,5 g octanu cynku (pkt 4.5) w wodzie, w zlewce. Przenieść roztwór do kolby miarowej o pojemności 1 000 ml, dodać 30 ml kwasu octowego (pkt 4.8). Dokładnie wymieszać i dopełnić wodą. Roztwór ten nadaje się do użytku maksymalnie przez 6 miesięcy, przy czym należy go przechowywać w temperaturze otoczenia.

Można też stosować inne odczynniki klarujące równoważne płynowi Carreza.

4.13. Odczynnik do klarowania (Carrez II)

Rozpuścić 106,0 g heksacyanożelazianu(II) potasu (pkt 4.6) w wodzie, w zlewce. Przenieść roztwór do kolby miarowej o pojemności 1 000 ml. Dokładnie wymieszać i dopełnić wodą. Roztwór ten nadaje się do użytku maksymalnie przez 6 miesięcy, przy czym należy go przechowywać w temperaturze otoczenia.

Można też stosować inne odczynniki klarujące równoważne płynowi Carreza.

4.14. Faza ruchoma

Faza ruchoma jest przygotowywana w sposób stosowany w analizie cukrów metodą HPLC. W przypadku stosowania kolumny z żelazem krzemionkowym modyfikowanym grupami aminopropylowymi, fazą ruchomą jest na przykład mieszanina wody o czystości HPLC i acetonitrylu.

5. **Aparatura**

5.1. Standardowe szkło laboratoryjne

5.2. Wirówka o przyspieszeniu co najmniej 1 000 g (obliczonym dla środka próbki)

5.3. Szklane próbki wirówkowe o pojemności 100 ml

5.4. Mieszadło magnetyczne

5.5. Magnetyczne elementy mieszające

5.6. Sączki karbowane, np. 185 mm

5.7. Filtry strzykawkowe, 0,45 µm odpowiednie do roztworów wodnych

5.8. Fiolki na próbki odpowiednie do aparatu do automatycznego pobierania próbek dla HPLC

5.9. Kolby miarowe o pojemności 100 ml

5.10. Strzykawki z tworzywa sztucznego, 5 i 10 ml

5.11. Pełhametr

5.12. Łaźnia wodna z termostatem, zakres regulacji od 60 °C do 100 °C

5.13. Płytki grzewcze z mieszadłami magnetycznymi

5.14. Aparatura HPLC

5.14.1. Pompa, przystosowana do pulsacji zerowej

5.14.2. Aparat do automatycznego pobierania próbek

5.14.3. Kolumna i kolumna wstępna odpowiednie do analizy cukrów

5.14.4. Ogrzewacz kolumny, zakres temperatury – od temperatury otoczenia do 40 °C

5.14.5. Detektor odpowiedni do analizy cukrów, np. refraktometr

5.14.6. Układ całujący

6. **Procedura**

6.1. Informacje ogólne

Próbki analizowane są pojedynczo.

6.2. Przygotowanie próbki dla kilku rodzajów produktów

Produkt homogenizuje się przez zmielenie.

6.3. Wielkość próbki

Zawartość skrobi szacowana jest na podstawie deklaracji nt. składu surowcowego. Wielkość próbki (ważona z dokładnością do 0,1 mg) można oszacować ze wzoru:

$$\text{masa próbki (g)} = \frac{\text{objętość kolby miarowej (100 ml)}}{\text{szacowana zawartość skrobi (\%)}}$$

6.4. Próba ślepa

Próbę ślepa określa się wykonując pełną analizę (jak opisano w pkt 6.5) bez dodawania próbki. Wynik otrzymany dla próby ślepej wykorzystuje się przy obliczaniu zawartości skrobi (pkt 7.1).

6.5. Analiza

6.5.1. Przygotowanie próbek

Wymieszać próbkę za pomocą wstrząsania lub mieszania. Wybraną wielkość próbki (pkt 6.3) odważyć do probówki wirówkowej (pkt 5.3) i dodać 50 ml 40 % etanolu (pkt 4.1). Zawartość mieszać, stosując mieszadło magnetyczne przez 20 minut w temperaturze otoczenia. Pozostawić element mieszający się w probówce i wirować przez pięć minut. Ostrożnie zasysać i usuwać fazę ciekłą (np. przy użyciu pipety Pasteura). Proces ekstrakcji powtarzać dodając dwa razy po 25 ml etanolu (pkt 4.1). Pozostałość przenieść do kolby miarowej o pojemności 100 ml (pkt 5.9) przy użyciu około 70 ml wody.

Po rozpuszczeniu osadu lub uzyskaniu zawiesiny dodać 100 mikrolitrów termostabilnej alfa-amylazy (pkt 4.4) i ogrzewać w 100 °C przez 1 godzinę np. w łaźni wodnej (pkt 5.12). Ciecz schłodzić do 60 °C w łaźni wodnej i dodać 5 ml roztworu amyloglukozydazy (pkt 4.10). Kolbę umieścić na 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 60 °C. Ciecz schłodzić do temperatury otoczenia i klarować próbkę przez dodanie 1 ml płynu Carreza I (pkt 4.12), wstrząsnąć i dodać następnie 1 ml płynu Carreza II (pkt 4.13). Płyn Carreza I i II mogą być dodane przed lub po schłodzeniu. Zawartość rozcieńczyć wodą do kreski, zhomogenizować, a roztwór przesączyć przez sączek karbowany (pkt 5.6). Zebrać ekstrakt próbki.

6.5.2. Postępowanie z ekstraktami próbek

Ekstrakty przesączyć przez filtr strzykawkowy (pkt 5.7) za pomocą strzykawki (pkt 5.10), którą uprzednio przemyto ekstraktem. Przesączone zebrać do fiolek (pkt 5.8).

Uwaga: Filtr strzykawkowy można wykorzystywać kilkakrotnie. Należy go przemyć kolejnym ekstraktem, aby zapobiec zanieczyszczeniu przez ekstrakt poprzedni.

6.6. Chromatografia

Analizę metodą HPLC przeprowadza się konwencjonalnie dla analizy cukrów. Ponieważ próbki ekstrahuje się roztworem etanolu w wodzie, głównym cukrem podlegającym analizie jest glukoza. Jeśli analiza metodą HPLC wykaże ślady maltozy, może to oznaczać niecałkowity rozkład skrobi.

7. Obliczanie i przedstawianie wyników

7.1. Obliczanie wyników analizy metodą HPLC

Zawartość glukozy (% m/m) oblicza się na podstawie wyników analizy metodą HPLC.

Roztwór enzymu amyloglukozydazy (pkt 4.3) jest stabilizowany glukozą. Ponadto termostabilna alfa-amylaza (pkt 4.4) stabilizowana sacharozą, która może zostać częściowo przekształcona w glukozę, w wyniku aktywności inwertazowej amyloglukozydazy. Dlatego też zmierzone stężenie glukozy (% m/v) powinno być skorygowane o stężenie glukozy (% m/v) w próbie ślepej. Zawartość glukozy (% m/m) skorygowaną względem próby ślepej, oblicza się następnie ze skorygowanego stężenia glukozy, masy próbki i kalibracji przy użyciu roztworów porównawczych (pkt 4.11).

7.2. Obliczanie zawartości skrobi

Zawartość skrobi (% m/m) oblicza się z zawartości glukozy (% m/m) po uwzględnieniu poprawki na próbę ślepa.

$$\text{Zawartość skrobi} = 0,9 * \text{glukoza skorygowana}$$

8. Precyzja

8.1. Test międzylaboratoryjny

Szczegóły dotyczące międzylaboratoryjnego testu odnośnie do precyzji tej metody podano w pkt 8.4.

8.2. Powtarzalność

Bezwzględna różnica między dwoma niezależnymi pojedynczymi wynikami analiz otrzymanymi przy użyciu tej samej metody i materiału badawczego w tym samym laboratorium, przez tego samego laboranta na tym samym sprzęcie w zbliżonym czasie powinna być w nie więcej niż 5 % przypadków większa od granicy powtarzalności wynoszącej 1,1 % (m/m). Granica powtarzalności została wyznaczona w wyniku połączenia wyników testu międzylaboratoryjnego (zob. pkt 8.4).

8.3. Odtwarzalność

Bezwzględna różnica między dwoma niezależnymi pojedynczymi wynikami analiz otrzymanymi przy użyciu tej samej metody i materiału badawczego w różnych laboratoriach, przez różnych laborantów na różnym sprzęcie powinna być w nie więcej niż 5 % przypadków większa od granicy odtwarzalności wynoszącej 3,7 % (m/m). Granica odtwarzalności została wyznaczona na podstawie połączonych wyników testu międzylaboratoryjnego (zob. pkt 8.4).

8.4. Wyniki testu międzylaboratoryjnego

Test międzylaboratoryjny przeprowadzony został w latach 2005–2006 z udziałem europejskich laboratoriów celnych. Test przeprowadzono zgodnie z normą ISO 5725 oraz protokołem IUPAC (W. Horwitz, „Pure and Applied Chemistry”, tom 67, 1995, str. 331–343). Dane dotyczące precyzji zostały podane w poniższej tabeli.

Statystyczne wyniki badania międzylaboratoryjnego

	Próbka				
	1	2	3	4	5
Liczba laboratoriów po wyeliminowaniu wyników krańcowych	25	26	26	25	24
Liczba zaakceptowanych wyników	50	52	52	50	48
Średnia zawartość skrobi (% m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Odchylenie standardowe powtarzalności s_r (% m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Granica powtarzalności r (% m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Odchylenie standardowe odtwarzalności s_R (% m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Granica odtwarzalności R (% m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Próbki

- 1: sucha karma dla psów
- 2: sucha karma dla kotów
- 3: sucha karma dla kotów (próbka 2) z dodatkiem skrobi
- 4: sucha karma dla kotów (próbka 2) z dodatkiem wyśłodków buraczanych
- 5: handlowa karma dla zwierząt domowych