

РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 121/2008 НА КОМИСИЯТА

от 11 февруари 2008 година

за установяване на метода за анализ за определяне на съдържанието на нишесте в препарати от видовете, използвани за храна на животни (код по КН 2309)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

Член 1

като взе предвид Регламент (ЕИО) № 2658/87 на Съвета от 23 юли 1987 г. относно тарифната и статистическа номенклатура и Общата митническа тарифа ⁽¹⁾, и по-специално член 9, параграф 1, буква а) от него,

Чрез дерогация от член 1 от Директива 72/199/ЕИО тегловното съдържание на скорбяла или нишесте в препарати от видовете, използвани за храна на животни, по смисъла на код по КН 2309, се определя чрез ензимния аналитичен метод, описан в приложението към настоящия регламент, в случаите, когато са налице значителни количества от следните продукти за храна на животни:

като има предвид, че:

(1) За да се гарантира, че препаратите от видовете, използвани за храна на животни (код по КН 2309), се третира по един и същ начин при внос навсякъде в Общността, е необходимо при определяне на аналитичните методи да се вземе под внимание научната и технологичната еволюция на тези методи.

а) продукти от (захарно) цвекло, като резенки от (захарно) цвекло, меласа от (захарно) цвекло, резенки от (захарно) цвекло с прибавка на меласа, винаса от (захарно) цвекло, захар (от захарно цвекло);

(2) В съответствие с третата Директива 72/199/ЕИО на Комисията от 27 април 1972 г. за установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни ⁽²⁾ за определяне на съдържанието на скорбяла или нишесте в препарати от видовете, използвани за храна на животни, следва да се прилага поляриметричният метод (наричан още модифициран метод на Ewers), описан в точка I от приложение I към посочената директива.

б) пулп от цитрусови плодове;

в) ленено семе; кюспе от ленено семе; шрот от екстрахирано ленено семе;

(3) В контекста на проведените изследвания от експерти от митническите лаборатории на държавите-членки е необходимо да се посочи, че ако за определяне на съдържанието на скорбяла или нишесте в споменатите препарати не е възможно да се приложи поляриметричният метод, посочен в Директива 72/199/ЕИО, следва да се приложи ензимен аналитичен метод. Поради това е уместно да се уточни как трябва да се прилага този ензимен метод.

г) рапично семе; кюспе от рапично семе; шрот от екстрахирано рапично семе; обвивки на рапично семе;

(4) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на секция „Тарифна и статистическа номенклатура“ към Комитета по Митническия кодекс,

д) слънчогледово семе; шрот от екстрахирано слънчогледово семе; шрот от екстрахирано слънчогледово семе, частично обелено;

е) кюспе от копра; шрот от екстрахирана копра;

ж) пулп от картофи;

з) суха мая;

и) продукти, богати на инулин (например резенки и брашно от земни ябълки);

й) пръжки.

⁽¹⁾ ОВ L 256, 7.9.1987 г., стр. 1. Регламент, последно изменен с Регламент (ЕО) № 1352/2007 на Комисията (ОВ L 303, 21.11.2007 г., стр. 3).

⁽²⁾ ОВ L 123, 29.5.1972 г., стр. 6. Директива, последно изменена с Директива 1999/79/ЕО (ОВ L 209, 7.8.1999 г., стр. 23).

Член 2

Настоящият регламент влиза в сила на двадесетия ден след публикуването му в Официален вестник на Европейския съюз.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави-членки.

Съставено в Брюксел на 11 февруари 2008 година.

За Комисията
László KOVÁCS
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

ЕНЗИМЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА СКОРБЯЛА ИЛИ НИШЕСТЕ В ПРЕПАРАТИ ОТ ВИДОВЕТЕ, ИЗПОЛЗВАНИ ЗА ХРАНА НА ЖИВОТНИ, ЧРЕЗ ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ (HPLC)**1. Обхват**

Този метод описва ензимното определяне на съдържанието на скорбяла или нишесте в храната за животни. Количеството на скорбялата или нишестето се определя чрез количествено измерване на глюкозата след ензимно разпадане на наличните скорбяла или нишесте в глюкоза. Приема се, че цялото количество измерена глюкоза е извлечено от скорбялата или нишестето, съдържащи се в пробата.

2. Определения

Този метод измерва съдържанието на скорбяла или нишесте и на продуктите от неговото разпадане, които имат висока молекулна маса и са неразтворими в 40-процентен етанол. Съдържанието на скорбяла или нишесте се изразява в тегловни проценти (m/m).

3. Принцип

Пробите се хомогенизират посредством смилане. Пробата се промива с 40-процентен етанол, за да се отстранят разтворимите захари и разтворимите продукти от разпадането на скорбялата или нишестето.

Към суспензията се добавя ензимът термоустойчива алфа-амилаза. Този ензим разгражда скорбялата или нишестето на по-малки вериги при 100 °C, независимо от това дали скорбялата или нишестето са изцяло разтворени.

Големите бучки от скорбяла или нишесте се разпадат много бавно. Затова е необходимо пробата да е изцяло разтворена или да е под формата на суспензия, съдържаща много малки твърди частици.

След това се добавя вторият ензим — амилоглюкозидаза, който хидролизира разпадатите глюкозни вериги в глюкоза при 60 °C.

След избистряне на течността и филтруване се отстраняват наличните протеини, мазнини и утайки, при което се получава разтвор, който може да се използва за HPLC.

Разделянето на съдържащите се захари се извършва чрез HPLC.

4. Реактиви и други материали

Да се използват реактиви с доказани аналитични качества и деминерализирана вода.

4.1. Етанол 40 % vol воден разтвор**4.2. Глюкоза, мин. 99 %****4.3. Разтвор на амилоглюкозидаза (1,4-алфа-D-глюкан глюкохидролаза) от *Aspergillus niger* (ензимна активност > 5 000 U/ml). Да се съхранява при около 4 °C**

Като алтернатива може да се използва и амилоглюкозидаза на прах.

4.4. Термоустойчива алфа-амилаза (1,4-алфа-D-глюкан-глюканохидролаза). Да се съхранява при около 4 °C**4.5. Цинков ацетат дихидрат, чист за анализ****4.6. Калиев хексацианоферат (II) ($K_4[Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$), свръхчист****4.7. Натриев ацетат, безводен, чист за анализ****4.8. Ледена оцетна киселина, 100 % (v/v)****4.9. Буферен разтвор на натриев ацетат (0.2 mol/l)**

Измерете 16,4 грама натриев ацетат (4.7) в бехерова чаша. Разтворете във вода и прехвърлете количествено в мерителна колба от 1 000 мл. Разредете с вода до марката и регулирайте рН на 4,7 с оцетна киселина (като използвате рН-метър (5.11)). Този разтвор може да се използва в рамките на 6 месеца, като се съхранява при температура от 4 °C.

4.10. Разтвор на амилоглюкозидаза (ензимна активност > 250 U/ml)

Пригответе разтвор от 5 ml амилоглюкозидаза — разтвор (4.3), или 660 mg амилоглюкозидаза на прах до 100 ml, като използвате буферен разтвор на натриев ацетат (4.9). Пригответе непосредствено преди употреба.

4.11. Референтен разтвор

Пригответе разтвор на глюкоза във вода, такъв какъвто се използва стандартно при HPLC анализа.

4.12. Реактив за избистряне (Карез I)

Разтворете 219,5 грама цинков ацетат (4.5) с вода в бехерова чаша. Прехвърлете количеството в мерителна колба от 1 000 ml, добавете 30 ml оцетна киселина (4.8). Разбъркайте добре и долейте с вода. Този разтвор може да се използва в рамките на 6 месеца, като се съхранява при стайна температура.

Могат да се използват и други реактиви за избистряне, еквивалентни на Карез разтвор.

4.13. Реактив за избистряне (Карез II)

Разтворете 106,0 грама калиев хексацианоферат (II) (4.6) с вода в бехерова чаша. Изсипете в мерителна колба от 1 000 ml. Смесете добре и долейте с вода. Този разтвор може да се използва в рамките на 6 месеца, като се съхранява при стайна температура.

Могат да се използват и други реактиви за избистряне, еквивалентни на Карез разтвор.

4.14. Мобилна фаза

Подготвя се мобилна фаза, която се използва стандартно при HPLC анализа на захари. В случай че се използва например колона с пълнеж от аминопропил силикагел, обичайната мобилна фаза е смес от вода и ацетонитрил.

5. **Апаратура**

5.1. Стандартна лабораторна стъклария

5.2. Центрофуга с вместимост от 1 000 g или повече (измерена в центъра на съдината)

5.3. Центрофужни стъклени епруветки от 100 ml

5.4. Магнитна бъркалка

5.5. Магнитни перки

5.6. Нагънати филтри, например 185 mm

5.7. Филтри за спринцовки, 0,45 µm, подходящи за водни разтвори

5.8. Шишенца за проби, подходящи за HPLC аутосамплер

5.9. 100 ml мерителни колби

5.10. Пластмасови спринцовки, 5 и 10 ml

5.11. рН-метър

5.12. Водна баня с термостат, регулируем на 60 °C и 100 °C

5.13. Котлони с магнитни бъркалки

5.14. HPLC апарат

5.14.1. Помпа, подходяща за нулева пулсация

5.14.2. Аутосамплер

5.14.3. Колона и предколона, подходяща за анализ на захари

5.14.4. Кожух за колоните, с температурен диапазон от стайна температура до 40 °C

5.14.5. Детектор, подходящ за анализ на захари, например детектор с рефрактивен индекс

5.14.6. Интегрираща система

6. **Процедура**

6.1. Основно правило

Пробите се анализират поотделно.

6.2. Подготвяне на проба за няколко вида продукти

Продуктът се хомогенизира чрез смилане.

6.3. Порция за изпитване

Съдържанието на скорбяла или нишесте се изчислява с помощта на декларацията за съдържание. Количеството на порцията за изпитване (измерено с точност до 0,1 mg) може да се изчисли по следната формула:

$$\text{количество проба (g)} = \frac{\text{Обем на мерителната колба (100 ml)}}{\text{приблизително съдържание на нишесте (\%)}}$$

6.4. Определяне на празна проба

Празна проба се определя чрез извършване на цялостен анализ (както е описано в 6.5), без прибавяне на порцията за изпитване. Резултатът от измерването на празна проба се използва за изчисляване на съдържанието на нишесте (7.1).

6.5. Анализ

6.5.1. Подготовка на пробите

Разбъркайте пробата чрез разклащане и разбъркване. Избраната порция за изпитване (6.3) се претегля в центрофужна епруетка (5.3) и се добавят 50 ml етанол 40 % (4.1). Разбъркайте с магнитна бъркалка за 20 минути при стайна температура. Оставете магнитната перка в епруетката и центрофугирайте за пет минути. Отпилетирайте внимателно да премахнете течната фаза (например с пипета „Пастьор“). Повторете процедурата на екстрахиране с два пъти по 25 ml етанол (4.1). Прехвърлете остатъка в мерителна колба 100 ml (5.9) с около 70 ml вода. След разтварянето или получаването на суспензия добавете 100 микролитра термоустойчива алфа-амилаза (4.4) и загрейте до 100 °C за 1 час, например на водна баня (5.12). Охладете до 60 °C във водната баня и добавете 5 ml разтвор на амилоглюкозидаза (4.10). Поставете колбата за 30 минути на водна баня при 60 °C. Охладете до стайна температура, избистрете пробата, като добавите 1 ml Карез I (4.12), разклатете и след това добавете 1 ml Карез II (4.13). Карез I и II могат да се добавят преди или след охлаждането. Допълнете с вода до марката, хомогенизирайте и филтрувайте разтвора през нагънат филтър (5.6). Съберете екстракта от пробата.

6.5.2. Обработване на екстракта от пробата

Филтрувайте през дисков филтър (5.7) със спринцовка (5.10), който е бил предварително промит с екстракта. Съберете филтрат в шишенца (5.8).

Забележка: Дисковият филтър може да се използва неколккратно. Трябва да се промива със следващия екстракт, за да се предотврати замърсяването на предишния.

6.6. Хроматография

HPLC се използва като конвенционален метод за анализ на захари. Тъй като пробите се извличат с етанол/вода, глюкозата е основната захар, която се изследва. Ако HPLC анализът покаже следи от малтоза, това може да означава непълно превръщане на нишестето.

7. Изчисляване и изразяване на резултатите

7.1. Изчисляване на резултатите от HPLC

Съдържанието на глюкоза (% m/m) се изчислява на базата на резултатите от HPLC анализа. Ензимният разтвор на амилоглюкозидаза (4.3) се стабилизира с глюкоза. Освен това термоустойчивата алфа-амилаза (4.4) се стабилизира със захароза, която може частично да се превърне в глюкоза чрез инвертазна активност на амилоглюкозидазата. Следователно измерената концентрация на глюкоза (% m/v) трябва да се коригира с концентрацията на глюкоза (% m/v) в празната проба. Съдържанието на глюкоза (% m/m), коригирана с празната проба, се изчислява от коригираната глюкозна концентрация, теглото на пробата и калибрирането с референтни разтвори (4.11).

7.2. Изчисляване на съдържанието на скорбяла или нишесте

Съдържанието на скорбяла или нишесте (% m/m) се изчислява от съдържанието на глюкоза (% m/m) след корекцията, която отчита контролното измерване.

$$\text{Съдържание на скорбяла или нишесте} = 0,9 * \text{коригирана глюкоза}$$

8. Прецизност

8.1. Междулабораторно изпитване

Данните от междулабораторното изпитване относно прецизността на метода са обобщени в 8.4.

8.2. Повторяемост

Абсолютната разлика между два независими единични тестови резултата, получени чрез използването на един и същ метод върху идентичен тестов материал, в една и съща лаборатория, от един и същ оператор, чрез използването на едно и също оборудване, в кратък интервал от време, не трябва да надвишава границата на повторяемост от 1,1 % (m/m) в повече от 5 % от случаите. Границата на повторяемост е определена на базата на обобщени резултати от междулабораторно изпитване (вж. 8.4).

8.3. Възпроизводимост

Абсолютната разлика между два независими единични тестови резултата, получени чрез използването на един и същ метод върху идентичен тестов материал, в различни лаборатории, от различни оператори, при използване на различно оборудване, не трябва да надвишава границата на възпроизводимост от 3,7 % (m/m) в повече от 5 % от случаите. Границата на възпроизводимост е определена на базата на обобщени резултати от междулабораторно изпитване (вж. 8.4).

8.4. Резултати от междулабораторно изпитване

През 2005 и 2006 г. беше проведено междулабораторно изпитване с участието на европейските митнически лаборатории. Този тест беше извършен в съответствие с ISO 5725 и протокола IUPAC (W. Horwitz, Pure and Applied Chemistry, том. 67, 1995 г., стр. 331—343). Данните относно прецизността са дадени в таблицата по-долу.

Статистически резултати от междулабораторно изследване

	Проба				
	1	2	3	4	5
Брой лаборатории след елиминиране на отдалечените стойности	25	26	26	25	24
Брой приети резултати	50	52	52	50	48
Средно съдържание на скорбяла или нишесте (% m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Стандартно отклонение при повторяемост s_r (% m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Граница на повторяемост r (% m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Стандартно отклонение при възпроизводимост s_R (% m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Граница на възпроизводимост R (% m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Проби

- 1: суха кучешка храна
- 2: суха котешка храна
- 3: суха котешка храна (проба 2) с добавено нишесте
- 4: суха котешка храна (проба 2) с добавени резенки от цвекло
- 5: фабрична храна за домашни животни