РЕГЛАМЕНТ (ЕС) № 118/2010 НА КОМИСИЯТА

от 9 февруари 2010 година

за изменение на Регламент (ЕО) № 900/2008 за определяне на методите за анализ и други технически разпоредби, необходими за прилагането на режима за внос на някои стоки, получени при преработката на селскостопански продукти

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

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 от него,

като има предвид, че:

(1) В Регламент (ЕО) № 900/2008 на Комисията [2] са определени формулите, процедурите и методите, които трябва да бъдат използвани за определянето на съдържанието на скорбяла/глюкоза, с цел прилагането на приложения II и III към Регламент (ЕО) № 1460/96 на Комисията от 25 юли 1996 г. относно установяване на подробни правила за прилагане на преференциални търговски режими, приложими към някои стоки, получени чрез преработка на селскостопански продукти, посочени в член 7 от Регламент (ЕО) № 3448/93 на Съвета [3].

(2) От група експерти беше направен преглед на Регламент (ЕО) № 900/2008 с оглед на това да бъде преценено дали посоченият регламент отчита научното и техническото развитие на методите, определени в регламента. Проучвания и тестове, направени в рамките на този преглед, показват, че определянето на съдържанието на скорбяла/глюкоза чрез разтваряне с използването на натриев хидроксид (преди ензимното разграждане до глюкоза) и измерването на общото съдържание на глюкоза чрез използването на ензимен метод със спектрофотометрия, както понастоящем се изисква за повечето стоки, вече не отговарят на съществуващите технически изисквания и следователно трябва да бъдат актуализирани.

(3) Следователно е целесъобразно да се предвиди, че разграждане на скорбяла/глюкоза трябва да се извършва по ензимен път с амилаза и амилоглюкозидаза и че общото съдържание на глюкоза трябва да се определя чрез използването на високоефективна течна хроматография (HPLC), както и да се конкретизира как да се прилага ензимният метод.

(4) Поради това Регламент (ЕО) № 900/2008 следва да бъде съответно изменен.

(5) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Комитета по Митническия кодекс,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

Член 1

Приложение I към Регламент (ЕО) № 900/2008 се заменя с текста в приложението към настоящия регламент.

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 9 февруари 2010 година.

За Комисията

Председател

José Manuel BARROSO

---

[1] ОВ L 256, 7.9.1987 г., стр. 1.
[2] ОВ L 248, 17.9.2008 г., стр. 8.
[3] ОВ L 187, 26.7.1996 г., стр. 18.

ПРИЛОЖЕНИЕ

„ПРИЛОЖЕНИЕ I

Ензимно определяне на съдържанието на скорбяла и на продуктите от нейното разграждане, включително глюкоза, в хранителни продукти чрез използването на високоефективна течна хроматография (HPLC)

1. **Обхват**

Този метод описва определянето на съдържанието на скорбяла и продуктите от нейното разграждане, включително глюкоза, в хранителни продукти за консумация от човека, наричани по-долу „скорбяла“. Съдържанието на скорбяла се определя посредством количествения анализ на глюкозата чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) след ензимно превръщане в глюкоза на скорбялата и продуктите от нейното разграждане.

2. **Определение за общото количество глюкоза и за общото количество глюкоза, изразено като скорбяла**

Общото количество глюкоза означава стойността Z, както е изчислена в точка 7.2.1 от настоящото приложение. То представлява количеството скорбяла и всичките продукти от нейното разграждане, включително глюкоза.

Количеството скорбяла/глюкоза, както е определено в приложение III към Регламент (ЕО) № 1460/96, се изчислява на базата на общото количество глюкоза Z и както е предвидено в член 2, точка 1 от настоящия регламент.

Количеството скорбяла (или декстрин), както е посочено в колона 3 от приложение IV към Регламент (ЕО) № 1043/2005 на Комисията ([1]), се изчислява на базата на общото количество глюкоза Z, както е предвидено в член 2.1 от Регламент (ЕО) № 904/2008 на Комисията ([2]).

Количеството скорбяла, посочено в точка 1 от настоящото приложение, означава стойността E, както е изчислена в точка 7.2.2 от настоящото приложение. То се изразява в % (m/m). Еквивалентно е на общото количество глюкоза Z, изразено като скорбяла. Тази стойност E не влияе на горепосочените изчисления.

3. **Принцип**

Пробите се хомогенизират и смесват с вода. Скорбялата и продуктите от нейното разграждане, присъстващи в пробите, се превръщат чрез ензимна реакция в глюкоза на две стъпки:

1. Скорбялата и продуктите от нейното разграждане се превръщат частично в разтворими глюкозни вериги чрез използването на термоустойчива алфа-амилаза при 90 °C. За постигането на ефективно превръщане е необходимо пробата да е изцяло разтворена или да е под формата на суспензия, съдържаща много малки твърди частици.

2. Разтворимите глюкозни вериги се превръщат в глюкоза чрез използването на амилоглюкозидаза при 60 °C.

Продуктите с високо съдържание на протеини или мазнини се избистрят и филтруват.

Определянето на съдържанието на захарите се извършва чрез HPLC анализ.

Тъй като по време на ензимната обработка може да настъпи частична хидролиза на захарозата, чрез HPLC анализ се извършва също и определяне на съдържанието на свободните захари, за да се изчисли коригираното съдържание на глюкоза.

4. **Реактиви и други материали**

Да се използват реактиви с доказано аналитично качество и деминерализирана вода.

4.1. Глюкоза, мин. 99 %.

4.2. Фруктоза, мин. 99 %.

4.3. Захароза, мин. 99 %.

4.4. Малтоза монохидрат, мин. 99 %.

4.5. Лактоза монохидрат, мин. 99 %.

4.6. Разтвор от термоустойчива алфа-амилаза (1,4-алфа-D-глюкан-глюканохидролаза) с активност от около 31 000 U/ml (1 U ще освободи 1,0 mg малтоза от скорбяла за 3 минути при pH 6,9 и 20 °C). Този ензим може да съдържа малко количество примеси (напр. глюкоза или захароза) и други пречещи ензими. Съхранява се при около 4 °C. Също така могат да бъдат използвани и други източници на алфа-амилаза, от които се получава краен разтвор със сравнима ензимна активност.

([1]) ОВ L 172, 5.7.2005 г., стр. 24.
([2]) ОВ L 249, 18.9.2008 г., стр. 9.

4.7. Амилоглюкозидаза (1,4-алфа-D-глюкан-глюканохидролаза) от *Aspergillus niger*, прах с активност около 120 U/mg или около 70 U/mg (1 U ще освободи 1 микромол глюкоза от скорбяла на минута при pH 4,8 и 60 °C). Този ензим може да има ниско съдържание на примеси (напр. глюкоза или захароза) и други пречещи ензими (напр. инвертаза). Съхранява се при около 4 °C. Също така могат да бъдат използвани и други източници на амилоглюкозидаза, от които се получава краен разтвор със сравнима ензимна активност.

4.8. Цинков ацетат дихидрат, чист за анализ.

4.9. Калиев хексацианоферат (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), свръхчист.

4.10. Натриев ацетат, безводен, чист за анализ.

4.11. Ледена оцетна киселина, 96 % (v/v) (минимум).

4.12. Буферен разтвор на натриев ацетат (0,2 mol/l). Претеглете 16,4 грама натриев ацетат (точка 4.10) в бехерова чаша. Разтворете във вода и прехвърлете в мерителна колба от 1 000 ml. Разредете с вода до марката и регулирайте pH на 4,7 с оцетна киселина (като използвате pH-метър (точка 5.7). Този разтвор може да се използва в рамките на 6 месеца, като се съхранява при температура 4 °C.

4.13. Разтвор на амилоглюкозидаза. Пригответе разтвор от амилоглюкозидаза на прах (точка 4.7), като използвате буферен разтвор на натриев ацетат (4.12). Ензимната активност трябва да е достатъчна и в съответствие със съдържанието на скорбяла в количеството проба (например активност около 600 U/ml се получава от 0,5 g амилоглюкозидаза на прах 120 U/mg (точка 4.7) в краен обем от 100 ml на 1 g скорбяла в количеството на пробата). Пригответе непосредствено преди анализа.

4.14. Стандартни разтвори. Пригответе разтвори на глюкоза, фруктоза, захароза, малтоза и лактоза във вода, такива каквито се използват стандартно при анализ HPLC на захари.

4.15. Реактив за избистряне (Карез I). Разтворете 219,5 грама цинков ацетат (точка 4.8) с вода в бехерова чаша. Прехвърлете в мерителна колба от 1 000 ml и добавете 30 ml оцетна киселина (точка 4.11). Смесете добре и долейте с вода до марката. 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.

4.16. Реактив за избистряне (Карез II). Разтворете 106,0 грама калиев хексацианоферат (II) (точка 4.9) с вода в бехерова чаша. Прехвърлете в мерителна колба от 1 000 ml. Смесете добре и долейте с вода до марката. 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.

4.17. Подвижна фаза HPLC. Подгответе подвижна фаза, която се използва стандартно при HPLC анализа на захари. В случай че се използва например колона с аминопропил силикагел, обичайната подвижна фаза е смес от вода с качество за HPLC и ацетонитрил.

5. **Уреди**

5.1. Стандартна лабораторна стъклария.

5.2. Нагънати филтри, например 185 mm.

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

5.4. Стъклени шишенца за проби, подходящи за HPLC с аутосемплер.

5.5. Мерителни колби от 100 ml.

5.6. Пластмасови спринцовки, 10 ml.

5.7. pH-метър.

5.8. Аналитична везна.

5.9. Водна баня с термостат, регулируем на 60 °C и 90 °C.

5.10. Уред за HPLC, подходящ за анализ на захари.

6. **Процедура**

6.1. *Подготвяне на проба за няколко вида продукти*

Продуктът се хомогенизира.

6.2. *Тестова порция*

Количеството на пробата се изчислява от декларацията за съдържание и условията на HPLC анализа (концентрация на стандартния разтвор на глюкозата) и не надвишава:

$$\text{количество проба(g)} = \frac{\text{обем на мерителната колба (напр. 100 ml)}}{\text{приблизително съдържание на скорбяла(\%)}}$$

Претеглете пробата с точност до 0,1 mg.

6.3. *Определяне на празна проба*

Празната проба се определя чрез извършване на цялостен анализ (както е описано в точка 6.4) без прибавяне на проба. Резултатът от измерването на празна проба се използва за изчисляване на съдържанието на скорбяла (точка 7.2).

6.4. *Анализ*

6.4.1. Подготовка на пробите

Хомогенизирайте пробата чрез разклащане или разбъркване. Избраната тестова порция (точка 6.2) се претегля в мерителната колба (точка 5.5) и се добавят около 70 ml топла вода.

След смесването с вода добавете 50 микролитра термоустойчива алфа-амилаза (точка 4.6) и загрейте до 90 °C за 30 минути на водна баня (точка 5.9). Охладете възможно най-бързо до 60 °C във водната баня и добавете 5 ml разтвор на амилоглюкозидаза (точка 4.13). При проби, които могат да повлияят на pH на разтвора, контролирайте pH и го коригирайте на 4,6 до 4,8, ако е необходимо. Оставете реакцията да протече в продължение на 60 минути при 60 °C. Охладете пробите до стайна температура.

6.4.2. Избистряне

При проби с високо съдържание на протеини или мазнини се налага избистряне чрез добавянето на 1 ml Карез I (точка 4.15) към изпитвания разтвор. След разклащане се добавя 1 ml Карез II (точка 4.16). Разклатете пробата отново.

6.4.3. Обработка за HPLC анализ

Пробата в мерителната колба се разрежда с вода до марката, хомогенизирана и филтрирана с нагънати филтри (точка 5.2). Съберете екстракта от пробата.

Филтрувайте екстрактите през филтър за спринцовки (точка 5.3) със спринцовка (точка 5.6), която е била предварително промита с екстракта. Съберете филтрата в шишенца за аутосемплер (точка 5.4).

6.5. *Хроматография*

HPLC се провежда както обикновено за анализ на захари. Ако HPLC анализът покаже следи от малтоза, това означава непълно превръщане на скорбялата, което води до твърде ниски нива на извличане на глюкоза.

7. **Изчисляване и изразяване на резултатите**

7.1. *Изчисляване на резултатите от HPLC*

За изчисляването на съдържанието на скорбялата са необходими резултатите от два HPLC анализа, а именно захарите, присъстващи в пробата преди ензимната обработка („свободни захари“) и след ензимната обработка (както е описано в настоящия метод). Трябва да се направи и празна проба, за да се извършат корекции във връзка със захарите, присъстващи в ензимите.

В HPLC анализа площта на пика се определя след интегриране, а концентрацията се изчислява след калибрирането с референтни разтвори (точка 4.14). От концентрацията на глюкоза (g/100 ml) след ензимната обработка се изважда концентрацията на глюкоза (g/100 ml) в празната проба. Накрая съдържанието на захари (g захар/100 g проба) се изчислява чрез претегленото количество на пробата, което води до:

1. HPLC анализът преди ензимната обработка показва съдържание на свободни захари (g/100 g):

   — глюкоза G

   — фруктоза F

   — захароза S

2. HPLC анализът след ензимната обработка показва съдържание на захари (g/100 g):

   — глюкоза след коригирането от празната проба ($G_{e\ cor}$)

   — фруктоза F_e

   — захароза S_e

7.2. *Изчисляване на съдържанието на скорбяла*

7.2.1. Изчисляване на общото количество глюкоза „Z“

Ако количеството на фруктоза след ензимната обработка (F_e) е по-високо от количеството на фруктоза преди ензимната обработка (F), тогава захарозата, присъстваща в пробата, е частично превърната във фруктоза и глюкоза. Това означава, че трябва да се извърши корекция за освободената глюкоза ($F_e - F$).

Z, окончателното съдържание на глюкоза след коригирането в g/100 g, се получава по следната формула:

$$Z = (G_{e\ cor}) - (F_e - F)$$

7.2.2. Изчисляване на общото съдържание на глюкоза, изразено като скорбяла

E, съдържанието на „скорбяла“ в g/100, се получава по следната формула:

$$E = [(G_{e\ cor}) - (F_e - F)] \times 0{,}9$$

8. **Прецизност**

Подробностите за междулабораторния тест относно прецизността на метода, извършен по отношение на 2 проби, са обобщени тук. Те отразяват изискванията за резултатите на метода, описани в настоящото приложение.

Резултати от междулабораторен тест (за информация)

През 2008 беше проведен междулабораторен тест с участието на европейските митнически лаборатории.

Оценката на прецизността на данните беше извършена в съответствие с „Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies“, W. Horwitz (IUPAC technical report), Pure & Appl.Chem., Vol. 67, Nº 2, стр. 331—343, 1995 г.

Данните относно прецизността са дадени в таблицата по-долу.

Изпитвани проби **1 : шоколадова бисквита** **2 : бисквита**	**Z** **Проба 1**	**Z** **Проба 2**
Брой на лабораториите	41	42
Брой лаборатории след елиминиране на отдалечените стойности	38	39
Средно съдържание (%, m/m)	29,8	55,0
Стандартно отклонение при повторяемост sr (%, m/m)	0,5	0,5
Стандартно отклонение при възпроизводимост sR (%, m/m)	1,5	2,3
Граница на повторяемост r (%, m/m)	1,4	1,4
Граница на възпроизводимост R (%, m/m)	4,2	6,6“