# NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 118/2010

## ze dne 9. února 2010,

## kterým se mění nařízení (ES) č. 900/2008, kterým se stanoví metody analýzy a jiná technická ustanovení nezbytná k provádění dovozního režimu pro určité zboží vzniklé zpracováním zemědělských produktů

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na nařízení Rady (EHS) č. 2658/87 ze dne 23. července 1987 o celní a statistické nomenklatuře a o společném celním sazebníku ([1]), a zejména na článek 9 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Nařízení Komise (ES) č. 900/2008 ([2]) stanoví vzorce, postupy a metody pro stanovení obsahu škrobu/glukózy pro účely provádění příloh II a III nařízení Komise (ES) č. 1460/96 ze dne 25. července 1996, kterým se stanoví prováděcí pravidla pro preferenční právní úpravu obchodování s některým zbožím vzniklým zpracováním zemědělských produktů podle článku 7 nařízení Rady (ES) č. 3448/93 ([3]).

(2) Nařízení (ES) č. 900/2008 zkoumala skupina odborníků, aby posoudila, zda je v uvedeném nařízení přihlédnuto k vědeckému a technologickému vývoji metod stanovených v uvedeném nařízení. Ze studií a analýz provedených v rámci zmíněného zkoumání vyplývá, že stanovení obsahu škrobu/glukózy rozpuštěním s použitím hydroxidu sodného (před enzymatickým rozkladem na glukózu) a měření celkového obsahu glukózy s použitím enzymatické metody se spektrofotometrií, jak je nyní předepsáno pro většinu zboží, již nesplňují stávající technické požadavky, a proto je třeba je aktualizovat.

(3) Proto je vhodné stanovit, aby se rozklad škrobu/glukózy prováděl enzymatickou cestou s použitím amylázy a amyloglukosidázy a aby se celkový obsah glukózy stanovil s použitím vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC), a určit, jak má být enzymatická metoda provedena.

(4) Nařízení (ES) č. 900/2008 by proto mělo být odpovídajícím způsobem změněno.

(5) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Výboru pro celní kodex,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

*Článek 1*

Příloha I nařízení (ES) č. 900/2008 se nahrazuje zněním uvedeným v příloze tohoto nařízení.

*Článek 2*

Toto nařízení vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 9. února 2010.

*Za Komisi*

José Manuel BARROSO

*předseda*

([1]) Úř. věst. L 256, 7.9.1987, s. 1.
([2]) Úř. věst. L 248, 17.9.2008, s. 8.
([3]) Úř. věst. L 187, 26.7.1996, s. 18.

*PŘÍLOHA*

*„PŘÍLOHA I*

**Enzymatické stanovení obsahu škrobu a jeho rozkladných produktů včetně glukózy v potravinách s použitím vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC)**

1. **Předmět**

Tato metoda popisuje stanovení obsahu škrobu a jeho rozkladných produktů včetně glukózy v potravinách pro lidskou spotřebu, dále jen „škrob“. Obsah škrobu se stanoví kvantitativní analýzou glukózy vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) po enzymatické přeměně škrobu a jeho rozkladných produktů na glukózu.

2. **Definice celkového obsahu glukózy a celkového obsahu glukózy vyjádřeného jako škrob**

Celkovým obsahem glukózy se rozumí hodnota Z vypočítaná podle bodu 7.2.1 této přílohy. Představuje obsah škrobu a všech jeho rozkladných produktů včetně glukózy.

Obsah škrobu/glukózy podle definice v příloze III nařízení (ES) č. 1460/96 se vypočítá na základě celkového obsahu glukózy Z a jak je stanoveno v čl. 2 bodě 1 tohoto nařízení.

Obsah škrobů (nebo dextrinů), jak je uvedeno ve sloupci 3 přílohy IV nařízení Komise (ES) č. 1043/2005 ([1]), se vypočítá na základě celkového obsahu glukózy Z, jak je stanoveno v čl. 2 bodě 2.1 nařízení Komise (ES) č. 904/2008 ([2]).

Obsahem škrobu uvedeným v bodě 1 této přílohy se rozumí hodnota E vypočítaná podle bodu 7.2.2 této přílohy. Je vyjádřena v % (hm). Odpovídá celkovému obsahu glukózy Z vyjádřenému jako škrob. Tato hodnota E není v rozporu s výše uvedenými výpočty.

3. **Princip**

Vzorky se homogenizují a rozpustí ve vodě. Škrob a jeho rozkladné produkty přítomné ve vzorcích se enzymatickou cestou přemění na glukózu ve dvou krocích:

1) Škrob a jeho rozkladné produkty se částečně přemění na rozpustné řetězce glukózy s použitím tepelně stálé alfa-amylázy při teplotě 90 °C. Pro účinnou přeměnu je nezbytné, aby byly vzorky zcela rozpuštěné nebo aby byly ve formě suspenze s velmi malými pevnými částicemi.

2) Rozpustné řetězce glukózy se přemění na glukózu s použitím amyloglukosidázy při teplotě 60 °C.

Produkty s vysokým obsahem bílkovin nebo tuku se vyčeří a přefiltrují.

Stanovení cukrů se provádí analýzou HPLC.

Jelikož během enzymatické úpravy může dojít k částečné inverzi sacharózy, provádí se stanovení volných cukrů rovněž analýzou HPLC, aby se vypočítal opravený obsah glukózy.

4. **Činidla a další materiály**

Použijí se činidla uznané analytické třídy a destilovaná voda.

4.1 Glukóza, min. 99 %.

4.2 Fruktóza, min. 99 %.

4.3 Sacharóza, min. 99 %.

4.4 Maltóza monohydrát, min. 99 %.

4.5 Laktóza monohydrát, min. 99 %.

4.6 Roztok tepelně stálé alfa-amylázy (1,4-alfa-D-glukan-glukanohydrolázy) s aktivitou asi 31 000 U/ml (1U uvolní 1,0 mg maltózy ze škrobu za 3 minuty při pH 6,9 a teplotě 20 °C). Tento enzym může obsahovat malé množství nečistot (např. glukózy nebo sacharózy) a jiných rušivých enzymů. Skladování při teplotě asi 4 °C. Případně lze použít jiné zdroje alfa-amylázy, pokud poskytne výsledný roztok se srovnatelnou aktivitou enzymu.

([1]) Úř. věst. L 172, 5.7.2005, s. 24.
([2]) Úř. věst. L 249, 18.9.2008, s. 9.

4.7 Amyloglukosidáza (1,4-alfa-D-glukan-glukohydroláza) z *aspergillus niger*, prášek s aktivitou asi 120 U/mg nebo asi 70 U/mg (1U uvolní 1 mikromol glukózy ze škrobu za minutu při pH 4,8 a teplotě 60 °C). Tento enzym může obsahovat malé množství nečistot (např. glukózy nebo sacharózy) a jiných rušivých enzymů (např. invertázy). Skladování při teplotě asi 4 °C. Případně lze použít jiné zdroje amyloglukosidázy, pokud poskytne výsledný roztok se srovnatelnou aktivitou enzymu.

4.8 Dihydrát octanu zinečnatého, p.a.

4.9 Hexakyanoželeznatan draselný ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), extra čistý.

4.10 Octan sodný bezvodý, p.a.

4.11 Ledová kyselina octová, minimálně 96 % (obj.).

4.12 Tlumivý roztok octanu sodného (0,2 mol/l). 16,4 gramu octanu sodného (bod 4.10) se naváží do skleněné kádinky. Rozpustí se ve vodě a přelije do odměrné baňky o objemu 1 000 ml. Dolije se po značku vodou a pH se upraví na 4,7 pomocí kyseliny octové (s použitím pH metru (bod 5.7)). Tento roztok lze uchovávat při teplotě 4 °C po dobu maximálně 6 měsíců.

4.13 Roztok amyloglukosidázy. Připraví se roztok z práškové amyloglukosidázy (bod 4.7) s použitím tlumivého roztoku octanu sodného (bod 4.12). Aktivita enzymu musí být dostatečná a musí odpovídat obsahu škrobu ve vzorku (například aktivity asi 600 U/ml je dosaženo použitím 0,5 g práškové amyloglukosidázy s aktivitou 120 U/mg (bod 4.7) v konečném objemu 100 ml na 1 g škrobu ve vzorku). Roztok se připraví bezprostředně před použitím.

4.14 Referenční roztoky. Připraví se vodné roztoky glukózy, fruktózy, sacharózy, maltózy a laktózy, které se běžně používají při analýze cukrů metodou HPLC.

4.15 Činidlo k vyčeření (Carrezovo činidlo I). Ve skleněné kádince se rozpustí 219,5 gramu octanu zinečnatého (bod 4.8) ve vodě. Přelije se do odměrné baňky o objemu 1 000 ml a přidá se 30 ml kyseliny octové (4.11). Důkladně se zamíchá a doplní po značku vodou. Tento roztok lze při skladování při laboratorní teplotě používat po dobu nejvýše 6 měsíců. K vyčeření lze použít i jiná činidla rovnocenná Carrezovu činidlu.

4.16 Činidlo k vyčeření (Carrezovo činidlo II). Ve skleněné kádince se rozpustí 106,0 gramu hexakyanoželeznatanu draselného (II) (bod 4.9) ve vodě. Přelije se do odměrné baňky o objemu 1 000 ml. Důkladně se zamíchá a doplní po značku vodou. Tento roztok lze při skladování při laboratorní teplotě používat po dobu nejvýše 6 měsíců. K vyčeření lze použít i jiná činidla rovnocenná Carrezovu činidlu.

4.17 Mobilní fáze HPLC. Připraví se mobilní fáze, která se běžně používá při analýze cukrů metodou HPLC. Při použití kolony s aminopropyl-silikagelem je např. obvyklou mobilní fází směs vody a acetonitrilu (pro HPLC).

5. **Přístroje a pomůcky**

5.1 Běžné laboratorní sklo.

5.2 Skládané filtry, např. 185 mm.

5.3 Injekční filtry 0,45 µm, vhodné pro vodné roztoky.

5.4 Vzorkovací lahvičky vhodné pro automatický vzorkovač HPLC.

5.5 Odměrné baňky o objemu 100 ml.

5.6 Plastové injekční stříkačky, 10 ml.

5.7 pH metr.

5.8 Analytické váhy.

5.9 Vodní lázeň s termostatem s nastavitelnou teplotou 60 °C a 90 °C.

5.10 Přístroj HPLC vhodný pro analýzu cukrů.

6. **Postup**

6.1 *Příprava vzorku pro několik druhů produktů*

Produkt se homogenizuje.

6.2 *Dávka vzorku*

Množství vzorku se odhadne podle údajů o přísadách a podle podmínek analýzy HPLC (koncentrace referenčního roztoku glukózy) a nepřesáhne:

$$\text{množství vzorku (g)} = \frac{\text{objem odměrné baňky (např.100ml)}}{\text{odhadovaný obsah škrobu (\%)}}$$

Vzorek se naváží s přesností na 0,1 mg.

6.3 *Slepé stanovení*

Slepá zkouška se provede pomocí úplné analýzy (podle bodu 6.4) bez přidání vzorku. Výsledek slepého stanovení se použije při výpočtu obsahu škrobu (bod 7.2).

6.4 *Analýza*

6.4.1 Příprava vzorků

Vzorek se homogenizuje protřepáním nebo promícháním. Zvolená zkušební dávka (bod 6.2) se naváží do odměrné baňky (bod 5.5) a přidá se asi 70 ml teplé vody.

Po rozpuštění nebo vytvoření suspenze se přidá 50 mikrolitrů tepelně stálé alfa-amylázy (bod 4.6) a po dobu 30 minut se zahřívá na teplotu 90 °C ve vodní lázni (bod 5.9). Ve vodní lázni se co nejrychleji ochladí na teplotu 60 °C a přidá se 5 ml roztoku amyloglukosidázy (bod 4.13). U vzorků, které by mohly ovlivnit pH reakčního roztoku, se kontroluje pH a v případě potřeby se upraví na 4,6 až 4,8. Nechá se reagovat po dobu 60 minut při teplotě 60 °C. Vzorky se zchladí na laboratorní teplotu.

6.4.2 Vyčeření

Vzorky s vysokým obsahem bílkovin nebo tuku je nutné vyčeřit přidáním 1 ml Carrezova činidla I (bod 4.15) do roztoku vzorku. Protřepe se a přidá se 1 ml Carrezova činidla II (bod 4.16). Vzorek se znovu protřepe.

6.4.3 Zpracování pro analýzu HPLC

Vzorek v odměrné baňce se zředí po značku vodou, homogenizuje se a přefiltruje přes skládaný filtr (bod 5.2). Extrakt vzorku se jímá.

Extrakty se přefiltrují přes injekční filtr (bod 5.3) pomocí injekční stříkačky (bod 5.6) předem propláchnuté extraktem. Filtráty se jímají do lahviček (bod 5.4).

6.5 *Chromatografie*

HPLC se provádí způsobem obvyklým pro analýzu cukrů. Jestliže HPLC analýza vykazuje stopy maltózy, rozklad škrobu nebyl úplný a výsledkem je příliš nízká výtěžnost pro glukózu.

7. **Výpočet a vyjádření výsledků**

7.1 *Výpočet výsledků HPLC*

Pro výpočet obsahu škrobu jsou zapotřebí výsledky dvou analýz HPLC, tj. cukry přítomné ve vzorku před enzymatickou úpravou („volné cukry“) a po enzymatické úpravě (jak je popsáno v této metodě). Je třeba provést i slepé stanovení, aby bylo možné provést opravu o cukry přítomné v enzymech.

Při analýze HPLC se plocha píku stanoví po integraci a koncentrace se vypočítá po kalibraci s referenčními roztoky (bod 4.14). Od koncentrace glukózy (g/100 ml) po enzymatické úpravě se odečte koncentrace glukózy (g/100 ml) zjištěná při slepé zkoušce. Nakonec se vypočte obsah cukrů (g cukru/100 g vzorku) s použitím navážky vzorku a výsledkem je:

1) Analýza HPLC před enzymatickou úpravou udávající obsah volných cukrů (g/100 g):

— glukóza G

— fruktóza F

— sacharóza S

2) Analýza HPLC po enzymatické úpravě udávající obsah cukrů (g/100 g):

— glukóza po opravě o výsledek slepé zkoušky ($G_{e\ cor}$)

— fruktóza $F_e$

— sacharóza $S_e$

7.2 *Výpočet obsahu škrobu*

7.2.1 Výpočet celkového obsahu glukózy „Z“

Pokud je obsah fruktózy po enzymatické úpravě ($F_e$) vyšší než obsah fruktózy před enzymatickou úpravou (F), znamená to, že sacharóza přítomná ve vzorku se částečně rozložila na fruktózu a glukózu. To znamená, že se provede oprava o uvolněnou glukózu ($F_e - F$).

Z, konečný obsah glukózy po opravě v g/100 g:

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

7.2.2 Výpočet celkového obsahu glukózy vyjádřeného jako škrob

E, obsah „škrobu“ v g/100 g:

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

8. **Přesnost**

V tomto bodě jsou uvedeny podrobnosti mezilaboratorní zkoušky týkající se údajů o přesnosti metody provedené na 2 vzorcích. Uvádějí požadavky na účinnost metody popsané v této příloze.

Výsledky mezilaboratorní zkoušky (orientační)

Mezilaboratorní zkouška byla provedena v roce 2008 za účasti evropských celních laboratoří.

Hodnocení údajů o přesnosti bylo provedeno podle Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies (Protokol pro koncepci, provádění a interpretaci studií účinnosti metod), W. Horwitz, (technická zpráva IUPAC), Pure & Appl. Chem., Vol. 67, Nº 2, s. 331–343, 1995.

Údaje o přesnosti jsou uvedeny v tabulce.

| **Vzorky**<br>**1 : čokoládová tyčinka se sušenkou**<br>**2 : sušenka** | **Z**<br>**vzorek 1** | **Z**<br>**vzorek 2** |
|---|---|---|
| Počet laboratoří | 41 | 42 |
| Počet laboratoří po vyloučení odlehlých hodnot | 38 | 39 |
| Průměr (%, m/m) | 29,8 | 55,0 |
| Směrodatná odchylka opakovatelnosti sr (%, m/m) | 0,5 | 0,5 |
| Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti sR (%, m/m) | 1,5 | 2,3 |
| Mez opakovatelnosti r (%, m/m) | 1,4 | 1,4 |
| Mez reprodukovatelnosti R (%, m/m) | 4,2 | 6,6“ |