KOMISJONI MÄÄRUS (EL) nr 118/2010,

9. veebruar 2010,

millega muudetakse määrust (EÜ) nr 900/2008, millega nähakse ette põllumajandustoodete töötlemisel saadud teatavate kaupade suhtes impordikorra rakendamiseks vajalikud analüüsimeetodid ja muud tehnilised sätted

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse nõukogu 23. juuli 1987. aasta määrust (EMÜ) nr 2658/87 tariifi- ja statistikanomenklatuuri ning ühise tollitariifistiku kohta, [1] eriti selle artiklit 9,

ning arvestades järgmist:

(1) Komisjoni määrusega (EÜ) nr 900/2008 [2] on sätestatud valemid, meetodid, ja menetlused, mida kasutatakse tärklise/glükoosi määramiseks, et kohaldada komisjoni 25. juuli 1996. aasta määruse (EÜ) nr 1460/96 (sooduskorra üksikasjalike rakenduseeskirjade kehtestamise kohta nõukogu määruse (EÜ) nr 3448/93 [3] artiklis 7 ettenähtud kauplemiseks põllumajandussaaduste töötlemisel saadud teatavate kaupadega) II ja III lisa.

(2) Ekspertide rühm uuris määrust (EÜ) nr 900/2008 sellest seisukohast, et hinnata, kas kõnealuse määrusega on võetud arvesse kõnealuses määruses sätestatud meetodite teaduslikku ja tehnilist arengut. Eespool nimetatud uurimisega seoses tehtud uuringud ja katsed näitavad, et tärklise/glükoosi sisalduse määramine solubilisatsioonil naatriumhüdroksiidi kasutamisega abiainena (enne ensümaatilist lagundamist glükoosiks) ja glükoosi kogusisalduse määramine ensüümmeetodil koos spektrofotomeetria kasutamisega, nagu see praegu on ette nähtud enamiku toodete puhul, ei vasta enam praegustele tehnilistele nõudmistele ja neid meetodeid peab ajakohastama.

(3) Seetõttu on asjakohane sätestada, et tärklist/glükoosi tuleb lagundada ensüümide amülaasi ja glükoamülaasi toimel ja glükoosi kogusisaldus tuleb määrata vedelikkromatograafia abil, ning täpsustada, kuidas ensüümmeetodit kasutada.

(4) Seepärast tuleks määrust (EÜ) nr 900/2008 vastavalt muuta.

(5) Käesoleva määrusega ettenähtud meetmed on kooskõlas tolliseadustiku komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Määruse (EÜ) nr 900/2008 I lisa asendatakse käesoleva määruse lisas oleva tekstiga.

Artikkel 2

Käesolev määrus jõustub kahekümnendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas.*

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 9. veebruar 2010

Komisjoni nimel
president
José Manuel BARROSO

[1] ELT L 256, 7.9.1987, lk 1.
[2] ELT L 248, 17.9.2008, lk 8.
[3] ELT L 187, 26.7.1996, lk 18.

LISA

„I LISA

Tärklise ja selle laguproduktide, sealhulgas glükoosi määramine toiduainetes ensüümmeetodil vedelikkromatograafia abil

1. **Reguleerimisala**

Meetodiga määratakse inimtarbimiseks ettenähtud toiduainetes leiduva tärklise ja selle laguproduktide (edaspidi „tärklis"), sealhulgas glükoosi sisaldust. Tärklise sisaldus määratakse ensüümidega glükoosiks töödeldud tärklise ja selle laguproduktide analüüsimisel vedelikkromatograafiga.

2. **Glükoosi kogusisalduse ja tärklisena väljendatud glükoosi kogusisalduse määratlus**

Glükoosi kogusisalduse all mõistetakse käesoleva lisa punkti 7.2.1 järgi arvutatud suuruse Z väärtust. See kujutab endast tärklise ja selle kõikide laguproduktide, sealhulgas glükoosi sisaldust.

Tärklise/glükoosi sisaldus, mis on määratletud määruse (EÜ) nr 1460/96 III lisas, arvutatakse glükoosi kogusisalduse Z järgi ja nii, nagu sätestatud selle määruse artikli 2 punktis 1.

Komisjoni määruse (EÜ) nr 1043/2005 ([1]) IV lisa 3. veerus osutatud tärklise (või dekstriini) sisaldus arvutatakse glükoosi kogusisalduse Z järgi ja nii, nagu sätestatud komisjoni määruse (EÜ) nr 904/2008 ([2]) artikli 2 punktis 2.1.

Käesoleva lisa punktis 1 osutatud tärklise sisalduse all mõistetakse käesoleva lisa punkti 7.2.2 järgi arvutatud suuruse E väärtust. Seda väljendatakse massiprotsentides. See on võrdväärne glükoosi kogusisaldusega Z, mis on väljendatud tärklisena. Suurus E ei mõjuta eespool nimetatud arvutusi.

3. **Põhimõte**

Proovid homogeniseeritakse ja suspendeeritakse vees. Proovides sisalduv tärklis ja selle laguproduktid töödeldakse ensüümidega glükoosiks kahes järgus.

1) Tärklis ja selle laguproduktid muudetakse osaliselt temperatuuril 90 °C termostabiilse α-amülaasiga lahustuvateks glükoosiahelateks. Töötlemise tõhustamiseks tuleb proovid täielikult lahustada või suspendeerida väga väikeste tahkete osakestega suspensiooniks.

2) Lahustuvad glükoosiahelad muudetakse temperatuuril 60 °C glükoamülaasi toimel glükoosiks.

Suure valkude või rasvade sisaldusega tooted selitatakse ja filtreeritakse.

Suhkrute määramine toimub vedelikkromatograafiga.

Kuna ensüümide toimel võib toimuda sahharoosi osaline inversioon, määratakse vedelikkromatograafiga ka vabade suhkrute sisaldus, et selle alusel korrigeerida glükoosi sisaldust.

4. **Reaktiivid ja muud materjalid**

Kasutatakse analüütiliselt puhtaid tunnustatud reaktiive ja demineraliseeritud vett.

4.1 Glükoos sisaldusega vähemalt 99 %.

4.2. Fruktoos sisaldusega vähemalt 99 %.

4.3 Sahharoos sisaldusega vähemalt 99 %.

4.4. Maltoosmonohüdraat sisaldusega vähemalt 99 %.

4.5. Laktoosmonohüdraat sisaldusega vähemalt 99 %.

4.6. Termostabiilse α-amülaasi (1,4-α-D-glükaan-glükaanhüdrolaas) lahus aktiivsusega ligikaudu 31 000 U/ml (aktiivsus on 1 U, kui temperatuuril 20 °C ja pH 6,9 korral tekib tärklisest 3 minutiga 1,0 mg maltoosi). Selles ensüümis võib olla vähesel määral lisandeid (nt glükoosi või sahharoosi) või muid segavaid ensüüme. Säilitatakse temperatuuril ligikaudu 4 °C. Võib kasutada muid α-amülaasi allikaid, mis annavad lõpptulemusena samasuguse aktiivsusega ensüümiga lahuse.

([1]) ELT L 172, 5.7.2005, lk 24.
([2]) ELT L 249, 18.9.2008, lk 9.

4.7. *Aspergillus nigeri* toimel saadud glükoamülaas (1,4-α-D-glükaan- glükohüdrolaas), pulber aktiivsusega ligikaudu 120 U/mg või ligikaudu 70 U/mg (aktiivsus on 1U, kui temperatuuril 60 °C ja pH 4,8 korral tekib tärklisest 1 mikromool glükoosi minutis). Selles ensüümis võib olla vähesel määral lisandeid (nt glükoosi või sahharoosi) või muid segavaid ensüüme (nt invertaasi). Säilitatakse temperatuuril ligikaudu 4 °C. Võib kasutada muid glükoamülaasi allikaid, mis annavad lõpptulemusena samasuguse aktiivsusega ensüümiga lahuse.

4.8. Analüütiliselt puhas tsinkatsetaatdihüdraat.

4.9. Eriti puhas kaaliumheksatsüanoferraat (II) ($K_4[Fe(CN)]_6 \cdot 3H_2O$).

4.10. Analüütiliselt puhas veevaba naatriumatsetaat.

4.11. Jää-äädikhape (vähemalt 96 mahuprotsenti).

4.12. Naatriumatsetaatpuhverlahus (0,2 mol/l). 16,4 g naatriumatsetaati (punkt 4.10) kaalutakse keeduklaasi. Lahustatakse vees ja kantakse üle 1 000 ml mõõtekolbi. Lahjendatakse veega kuni märgini ning lisatakse äädikhapet, kuni pH on 4,7; kasutada pH-meetrit (punkt 5.7). 4 °C juures säilitamisel on lahus kasutamiskõlblik kuni kuus kuud.

4.13. Glükoamülaasi lahus. Glükoamülaasi pulbrist (punkt 4.7) ja naatriumatsetaatpuhverlahusest (punkt 4.12) valmistatakse lahus. Ensüüm peab olema piisava aktiivsusega ja vastama tärklise sisaldusele proovis (nt aktiivsus 600 U/ml saadakse, kui 0,5 g glükoamülaasi pulbrit aktiivsusega 120 U/mg (punkt 4.7) lahustatakse lõppmahus 100 ml 1 g tärklise kohta analüüsitavas proovis). Valmistada vahetult enne kasutamist.

4.14. Võrdluslahused. Valmistada glükoosi, fruktoosi, sahharoosi, maltoosi ja laktoosi vesilahused nagu tavaliselt suhkrute vedelikkromatograafia puhul.

4.15. Selitusreaktiiv (Carrez' lahus I). Keeduklaasis lahustatakse vees 219,5 g tsinkatsetaati (punkt 4.8). Kantakse üle 1 000 ml mõõtekolbi ja lisatakse 30 ml äädikhapet (punkt 4.11). Segatakse hoolikalt ja lahjendatakse veega kuni märgini. Toatemperatuuril säilitamisel on lahus kasutamiskõlblik kuni kuus kuud. Võib kasutada ka muid Carrez' lahusega analoogilisi selitusreaktiive.

4.16. Selitusreaktiiv (Carrez' lahus II). Keeduklaasis lahustatakse vees 106,0 g kaaliumheksatsüanoferraati (II) (punkt 4.9). Kantakse üle 1 000 ml mõõtekolbi. Segatakse hoolikalt ja lahjendatakse veega märgini. Toatemperatuuril säilitamisel on lahus kasutamiskõlblik kuni kuus kuud. Võib kasutada ka muid Carrez' lahusega analoogilisi selitusreaktiive.

4.17. Vedelikkromatograafia liikuv faas. Valmistatakse liikuv faas, mida tavaliselt kasutatakse suhkrute analüüsimisel vedelikkromatograafia abil. Aminopropüülsilikageeli kolonni kasutamisel näiteks kasutatakse liikuva faasina tavaliselt vedelikkromatograafia puhtusastmega vee ja atsetonitriili segu.

5. **Seadmed**

5.1. Tavalised klaasist laborinõud.

5.2. Kurdfiltrid, nt 185 mm.

5.3. Süstalfiltrid, 0,45 µm, vesilahuste jaoks.

5.4. Väikesed proovipudelid (viaalid), vedelikkromatograafia automaatproovivõtja (autosampleri) jaoks.

5.5. 100 ml mõõtekolvid.

5.6. Plastmass-süstlad, 10 ml.

5.7. pH-meeter.

5.8. Analüütilised kaalud.

5.9. Temperatuurile 60 °C ja 90 °C reguleeritav termostaadiga vesivann.

5.10. Vedelikkromatograaf, mis sobib suhkrute analüüsimiseks.

6. **Määramise käik**

6.1. *Proovi ettevalmistamine mitut liiki toodete puhul*

Toode homogeniseeritakse.

6.2. *Proovi suurus*

Proovi suurust hinnatakse toote koostise andmete ja vedelikkromatograafiga tehtava analüüsi tingimuste (glükoosi võrdluslahuse kontsentratsiooni) põhjal ning see ei tohi ületada:

$$\text{proovi mass (g)} = \frac{\text{mõõtekolvi maht (nt 100 ml)}}{\text{hinnanguline tärklisesisaldus (\%)}}.$$

Proov kaalutakse täpsusega 0,1 mg.

6.3. *Pimekatse*

Pimekatse puhul tehakse täielik analüüs (nagu kirjeldatud punktis 6.4), ilma proovi lisamata. Pimekatse tulemust kasutatakse tärklise sisalduse arvutamisel (punkt 7.2).

6.4 *Analüüs*

6.4.1. Proovide ettevalmistamine

Proovid homogeniseeritakse loksutamise või segamise teel. Valitud proovikogus (punkt 6.2) kaalutakse mõõtekolbi (punkt 5.5) ja lisatakse ligikaudu 70 ml sooja vett.

Pärast lahustamist või suspendeerimist lisatakse 50 mikroliitrit termostabiilset α-amülaasi (punkt 4.6) ja soojendatakse 90 °C juures 30 minutit vesivannis (punkt 5.9). Proovid jahutatakse vesivannis võimalikult kiiresti 60 °C-ni ja lisatakse 5 ml glükoamülaasi lahust (punkt 4.13). Proovide puhul, mis võivad muuta lahuse pH-d, tuleb pH-d kontrollida ja vajadusel seda muuta, et lahuse pH jääks vahemikku 4,6 kuni 4,8. Reaktsioonil lastakse temperatuuril 60 °C kulgeda 60 minutit. Proovid jahutatakse toatemperatuurini.

6.4.2. Selitamine

Suure valkude või rasvade sisaldusega proove tuleb selitada, lisades proovi lahusele 1 ml Carrez' I lahust (punkt 4.15). Pärast loksutamist lisatakse 1 ml Carrez' II lahust (punkt 4.16). Proovi loksutatakse uuesti.

6.4.3. Vedelikkromatograafilise analüüsi ettevalmistamine

Mõõtekolvis olev proov lahjendatakse veega kuni märgini, homogeniseeritakse ja filtreeritakse läbi kurdfiltri (punkt 5.2). Proovi ekstrakt kogutakse.

Ekstraktid filtreeritakse läbi süstalfiltri (punkt 5.3) süstlaga (punkt 5.6), mida on eelnevalt ekstraktiga loputatud. Filtraadid kogutakse väikestesse proovipudelitesse (punkt 5.4).

6.5. *Kromatograafia*

Vedelikkromatograafiga tehakse analüüs nii, nagu tavaliselt suhkrute analüüsimisel. Kui vedelikkromatograafiga tehtud analüüsis leidub maltoosi jälgi, ei ole tärklise hüdrolüüs olnud täielik, mistõttu määratud glükoosi sisaldus on väiksem.

7. **Arvutuskäik ja tulemuste esitamine**

7.1. *Vedelikkromatograafiga saadud tulemuste töötlemine*

Tärklise sisalduse arvutamiseks tuleb teha kaks analüüsi vedelikkromatograafiga, nimelt tuleb määrata suhkrute sisaldus enne (nn vabad suhkrud) ja pärast ensüümiga töötlemist (käesolevas kirjeldatud meetodil). Lisaks tuleb teha pimekatse, et teha korrektsioon ensüümides leiduvate suhkrute osas.

Vedelikkromatograafiga tehtavas analüüsis määratakse piigi pindala integreerimise teel ning kontsentratsioon arvutatakse pärast võrdluslahusega kalibreerimist (punkt 4.14). Glükoosi kontsentratsioonist (g 100 ml kohta) pärast ensüümi toimimist lahutatakse pimekatsest määratud glükoosi kontsentratsioon (g 100 ml kohta). Seejärel arvutatakse suhkrute kontsentratsioon (g suhkrut 100 g proovi kohta) kaalutud proovikoguses järgmiselt:

1) vedelikkromatograafilise analüüsiga enne ensüümi toimimist saadakse vabade suhkrute sisaldus (g 100 g kohta):

— glükoos G;

— fruktoos F;

— sahharoos S;

2) vedelikkromatograafilise analüüsiga pärast ensüümi toimimist saadakse suhkrute sisaldus (g 100 g kohta):

— glükoos pärast korrigeerimist pimekatse tulemusega ($G_{e\ cor}$);

— fruktoos F_e;

— sahharoos S_e.

7.2. *Tärklisesisalduse arvutamine*

7.2.1. Glükoosi kogusisalduse Z arvutamine

Kui pärast ensüümi toimimist on fruktoosi kogus (F_e) suurem kui enne ensüümi toimimist (F), on osa proovis leidunud sahharoosist muudetud fruktoosiks ja glükoosiks. See tähendab, et tulemust tuleb korrigeerida vabanenud glükoosi (F_e – F) võrra.

Z – lõplik glükoosi sisaldus (g 100 g kohta) pärast korrigeerimist:

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

7.2.2. Arvutatud glükoosi kogusisaldus, väljendatud tärklisena:

E – tärklisesisaldus (g 100 g kohta):

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

8. **Täpsus**

Siin esitatakse andmed, mis on saadud kahe prooviga tehtud laboritevahelisel katsel määramistäpsuse kindlakstegemiseks. Need andmed selgitavad käesolevas lisas kirjeldatud meetodi tulemuslikkuse nõudeid.

Laboritevahelise katse tulemused (teadmiseks)

Euroopa tollilaborite osalusega laboritevaheline katse tehti 2008. aastal.

Täpsuse andmeid hinnati IUPACi tehnilises aruandes esitatud meetodi tulemuslikkuse uuringute kavandamise, läbiviimise ja tõlgendamise eeskirja („Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies", W. Horwitz, (IUPAC technical report), Pure & Appl. Chem., Vol. 67, Nº 2, PP.331-343, 1995) alusel.

Järgnevas tabelis on esitatud andmed täpsuse kohta.

Proovide arv **1 : šokolaadi-küpsisetahvel** **2 : küpsis**	**Z** **Proov 1**	**Z** **Proov 2**
Laborite arv	41	42
Laborite arv pärast võõrväärtuste kõrvalejätmist	38	39
Keskmine sisaldus (massiprotsentides)	29,8	55,0
Korratavuse standardhälve sr (massiprotsentides)	0,5	0,5
Reprodutseeritavuse standardhälve sR (massiprotsentides)	1,5	2,3
Korratavuse piirnorm r (massiprotsentides)	1,4	1,4
Reprodutseeritavuse piirnorm R (massiprotsentides)	4,2	6,6"