KOMISSION ASETUS (EU) N:o 118/2010,

annettu 9 päivänä helmikuuta 2010,

tiettyjä maataloustuotteista valmistettuja tavaroita koskevan tuontijärjestelmän soveltamiseksi tarvittavista määritysmenetelmistä ja muista teknisistä säännöksistä annetun asetuksen (EY) N:o 900/2008 muuttamisesta

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon tariffi- ja tilastonimikkeistöstä ja yhteisestä tullitariffista 23 päivänä heinäkuuta 1987 annetun neuvoston asetuksen (ETY) N:o 2658/87 ([1]) ja erityisesti sen 9 artiklan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Komission asetuksessa (EY) N:o 900/2008 ([2]) vahvistetaan tärkkelys-/glukoosipitoisuuden määrittämiseen käytettävät kaavat, menettelyt ja määritelmät, jotta voidaan soveltaa neuvoston asetuksen (EY) N:o 3448/93 ([3]) 7 artiklassa tarkoitettuihin tiettyihin maataloustuotteiden valmistuksessa tuotettuihin tavaroihin sovellettavien kaupan suosituimmuusjärjestelmien soveltamista koskevista yksityiskohtaisista säännöistä 25 päivänä heinäkuuta 1996 annetun komission asetuksen (EY) N:o 1460/96 liitteitä II ja III.

(2) Asetusta (EY) N:o 900/2008 on tarkastellut joukko asiantuntijoita tarkoituksenaan arvioida, otetaanko asetuksessa huomioon siinä vahvistettujen menetelmien tieteellinen ja tekninen kehitys. Tarkastelun aikana suoritetut tutkimukset ja testit viittaavat siihen, että tärkkelys-/glukoosipitoisuuden määrittäminen natriumhydroksidilla tehdyn liuottamisen avulla (ennen entsymaattista hajottamista glukoosiksi) ja glukoosin kokonaispitoisuuden mittaaminen käyttämällä entsymaattista menetelmää ja spektrofotometriaa, kuten useimpien tavaroiden osalta nykyisin on määrätty, eivät ole teknisten nykyvaatimusten mukaisia ja on siksi saatettava ajan tasalle.

(3) Tämän vuoksi on aiheellista säätää, että tärkkelyksen/glukoosin hajottaminen tehdään entsymaattisesti amylaasin ja amyloglukosidaasin avulla ja että glukoosin kokonaispitoisuus määritetään käyttämällä suuren erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC), ja täsmentää, miten entsymaattinen menetelmä on toteutettava.

(4) Sen vuoksi asetusta (EY) N:o 900/2008 olisi muutettava.

(5) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat tullikoodeksikomitean lausunnon mukaiset,

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Korvataan asetuksen (EY) N:o 900/2008 liite I tämän asetuksen liitteenä olevalla tekstillä.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kahdentenakymmenentenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 9 päivänä helmikuuta 2010.

Komission puolesta
José Manuel BARROSO
Puheenjohtaja

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

LIITE

"LIITE I

Tärkkelyspitoisuuden ja tärkkelyksen hajoamistuotteiden, glukoosi mukaan luettuna, entsymaattinen määritys elintarvikkeissa käyttäen suuren erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC)

1. **Soveltamisala**

Tässä menetelmässä selostetaan tärkkelyspitoisuuden ja tärkkelyksen hajoamistuotteiden pitoisuuden, glukoosi mukaan luettuna, määritys ihmisravinnoksi tarkoitetuissa elintarvikkeissa, jäljempänä 'tärkkelys'. Tärkkelyspitoisuus lasketaan glukoosista, joka määritetään kvantitatiivisesti käyttäen suuren erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC), kun tärkkelys ja sen hajoamistuotteet on entsymaattisesti muunnettu glukoosiksi.

2. **Glukoosin kokonaispitoisuuden ja tärkkelyksenä ilmaistun glukoosin kokonaispitoisuuden määrittely**

Glukoosin kokonaispitoisuus tarkoittaa arvoa Z, siten kuin se lasketaan tämän liitteen 7.2.1 kohdassa. Se edustaa tärkkelyksen ja kaikkien sen hajoamistuotteiden, glukoosi mukaan luettuna, pitoisuutta.

Asetuksen (EY) N:o 1460/96 liitteessä III määritelty tärkkelys-/glukoosipitoisuus lasketaan tämän asetuksen 2 artiklan 1 kohdassa esitetyn mukaisesti glukoosin kokonaispitoisuuden Z perusteella.

Komission asetuksen (EY) N:o 1043/2005 ([1]) liitteessä IV olevassa sarakkeessa 3 määritelty tärkkelys- (tai dekstriini-)pitoisuus lasketaan komission asetuksen (EY) N:o 904/2008 ([2]) 2 artiklan 2.1 kohdassa esitetyn mukaisesti glukoosin kokonaispitoisuuden Z perusteella.

Tämän liitteen 1 kohdassa tarkoitettu tärkkelyspitoisuus tarkoittaa arvoa E, siten kuin se lasketaan tämän liitteen 7.2.2. kohdassa. Se ilmaistaan massaprosentteina (%, m/m). Se vastaa glukoosin kokonaispitoisuutta Z tärkkelyksenä ilmaistuna. Arvo E ei vaikuta edellä mainittuihin laskelmiin.

3. **Periaate**

Näytteet homogenoidaan ja suspendoidaan veteen. Näytteessä oleva tärkkelys ja sen hajoamistuotteet muunnetaan entsymaattisesti glukoosiksi kahdessa vaiheessa:

1. Tärkkelys ja sen hajoamistuotteet muunnetaan osittain liukoisiksi glukoosiketjuiksi käyttäen lämpöstabiilia alfa-amylaasia 90 °C:ssa. Jotta muunnos olisi tehokas, on näytteiden oltava kokonaan liuenneina tai hyvin pieniä kiinteitä hiukkasia sisältävänä lietteenä.

2. Liukoiset glukoosiketjut muunnetaan glukoosiksi käyttäen amyloglukosidaasia 60 °C:ssa.

Tuotteet, joiden proteiini- tai rasvapitoisuus on suuri, selkeytetään ja suodatetaan.

Sokerien määritys tehdään HPLC:llä.

Koska sakkaroosi voi osittain invertoitua entsymaattisen käsittelyn aikana, vapaat sokerit määritetään myös HPLC:llä korjatun glukoosipitoisuuden laskemiseksi.

4. **Reagenssit ja muut tarvikkeet**

Käytetään analyyttistä laatua olevia reagensseja ja demineralisoitua vettä.

4.1 Glukoosi, väh. 99 %.

4.2 Fruktoosi, väh. 99 %.

4.3 Sakkaroosi, väh. 99 %.

4.4 Maltoosimonohydraatti, väh. 99 %.

4.5 Laktoosimonohydraatti, väh. 99 %.

4.6 Lämpöstabiilin alfa-amylaasin (1,4-alfa-D-glukaaniglukanohydrolaasi) liuos, jonka aktiivisuus on noin 31 000 U/ml (1 U vapauttaa 1,0 milligramman maltoosia tärkkelyksestä 3 minuutissa pH:n ollessa 6.9 ja lämpötilan 20 °C). Tämä entsyymi voi sisältää vain vähäisen määrän epäpuhtauksia (esim. glukoosia tai sakkaroosia) ja muita häiritseviä entsyymejä. Säilytyslämpötila on noin 4 °C. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muista lähteistä saatuja alfa-amylaasivalmisteita, jos ne tuottavat vastaavan entsyymiaktiivisuuden omaavan lopullisen liuoksen.

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

4.7 Jauheena oleva *Aspergillus nigeristä* saatu amyloglukosidaasi (1,4-alfa-D-glukaaniglukohydrolaasi), jonka aktiivisuus on noin 120 U/mg tai noin 70 U/mg (1 U vapauttaa 1 mikromoolin glukoosia tärkkelyksestä minuutissa pH:n ollessa 4.8 ja lämpötilan 60 °C). Tämä entsyymi voi sisältää vain vähäisen määrän epäpuhtauksia (esim. glukoosia tai sakkaroosia) ja muita häiritseviä entsyymejä (esim. invertaasia). Säilytyslämpötila on noin 4 °C. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muista lähteistä saatuja alfa-amylaasivalmisteita, jos ne tuottavat vastaavan entsyymiaktiivisuuden omaavan lopullisen liuoksen.

4.8 Sinkkiasetaattidihydraatti, p.a.

4.9 Kaliumheksasyanoferraatti(II), ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), extra pure –laatua.

4.10 Vedetön natriumasetaatti, analyysilaatua.

4.11 Jääetikka, 96 % (v/v).

4.12 Natriumasetaattipuskuri (0,2 mol/l). Punnitaan dekanterilasiin 16,4 g natriumasetaattia (4.10 kohta). Liuotetaan veteen ja huuhdellaan 1 000 ml:n mittapulloon. Laimennetaan merkkiin vedellä ja säädetään pH arvoon 4.7 etikkahapolla (käytetään pH-mittaria (5.7 kohta)). Liuos on käyttökelpoinen enintään 6 kk säilytettynä 4 °C:ssa.

4.13 Amyloglukosidaasiliuos. Valmistetaan liuos amyloglukosidaasijauheesta (4.7 kohta) käyttäen natriumasetaattipuskuria (4.12 kohta). Entsyymiaktiivisuuden on oltava riittävä ja näytteessä olevaa tärkkelyspitoisuutta vastaava (esimerkiksi noin 600 U/ml:n aktiivisuus saadaan, kun 0,5 g amyloglukosidaasijauhetta, jonka aktiivisuus on 120 U/mg (4.7 kohta), liuotetaan 100 ml:an lopputilavuuteen 1 g näytteen tärkkelysmäärää kohti). Valmistetaan välittömästi ennen käyttöä.

4.14 Vertailuliuokset. Valmistetaan sokerien HPLC-analyysissä tavallisesti käytettävät glukoosin, fruktoosin, sakkaroosin, maltoosin ja laktoosin vesiliuokset.

4.15 Selkeytysreagenssi (Carrez I). Liuotetaan 219,5 g sinkkiasetaattia (4.8 kohta) veteen dekanterilasissa. Siirretään huuhtelemalla 1 000 ml:n mittapulloon ja lisätään 30 ml etikkahappoa (4.11 kohta). Sekoitetaan hyvin ja täytetään vedellä merkkiin. Liuos on käyttökelpoinen enintään 6 kuukautta huoneenlämmössä säilytettynä. Myös muita Carrez'n liuosta vastaavia selkeytysliuoksia voidaan käyttää.

4.16 Selkeytysreagenssi (Carrez II). Liuotetaan 106,0 g kaliumheksasyanoferraattia(II) (4.9 kohta) veteen dekanterilasissa. Siirretään huuhtelemalla 1 000 ml:n mittapulloon. Sekoitetaan hyvin ja täytetään vedellä merkkiin. Liuos on käyttökelpoinen enintään 6 kuukautta huoneenlämmössä säilytettynä. Myös muita Carrez'n liuosta vastaavia selkeytysliuoksia voidaan käyttää.

4.17 HPLC:n liikkuva faasi. Valmistetaan sokerien HPLC-analyysissä tavanomaisesti käytetty liikkuva faasi. Jos käytetään aminopropyyli-piihappogeelipylvästä, tavanomainen liikkuva faasi on esim. HPLC-laatuisen veden ja asetonitriilin seos.

5. **Välineistö**

5.1 Tavanomaisia laboratoriolasiastioita.

5.2 Laskostettuja suodattimia, esim. 185 mm.

5.3 Ruiskusuodattimia, 0,45 µm, vesiliuoksille.

5.4 HPLC-laitteen näytteenkäsittelylaitteeseen sopivia näyteampulleja.

5.5 100 ml:n mittapulloja.

5.6 Muoviruiskuja, 10 ml.

5.7 pH-mittari.

5.8 Analyysivaaka.

5.9 Termostoitu vesihaude, joka voidaan säätää sekä 60 °C:een että 90 °C:een.

5.10 Sokerianalyysiin sopiva HPLC-laitteisto.

6. **Suoritus**

6.1 *Näytteen valmistus erityyppisistä tuotteista*

Tuote homogenoidaan.

6.2 *Näytteen määrä*

Näytteen määrä arvioidaan ilmoitettujen ainesosien määrien ja HPLC-analyysin olosuhteiden (glukoosin vertailuliuoksen pitoisuus) perusteella, ja se saa olla enintään

$$\text{näytteenmäärä(g)} = \frac{\text{mittapullontilavuus(esim.100ml)}}{\text{arvioitut rkkelyspitoisuus(\%)}}$$

Punnitaan näyte 0,1 mg:n tarkkuudella.

6.3 *Nollakokeen määritys*

Nollakoe määritetään tekemällä täydellinen analyysi (6.4 kohdan mukaisesti) ilman näytettä. Nollakoetta käytetään tärkkelyspitoisuuden laskemisessa (7.2 kohta).

6.4 *Analyysi*

6.4.1 Näytteiden valmistus

Homogenoidaan näyte ravistamalla tai sekoittamalla. Valittu näytemäärä (6.2 kohta) punnitaan mittapulloon (5.5 kohta), johon lisätään noin 70 ml lämmintä vettä.

Kun aine on liuennut tai lietteenä, lisätään 50 mikrolitraa lämpöstabiilia alfa-amylaasia (4.6 kohta) ja kuumennetaan 90 °C:ssa 30 minuuttia vesihauteessa (5.9 kohta). Jäähdytetään mahdollisimman nopeasti 60 asteeseen vesihauteessa ja lisätään 5 ml amyloglukosidaasiliuosta (4.13 kohta). Jos näyte voi vaikuttaa reaktioliuoksen pH-arvoon, pH-arvoa on säädettävä tarvittaessa välille 4.6–4.8. Annetaan reagoida 60 minuuttia 60 °C:ssa. Jäähdytetään näytteet huoneenlämpöisiksi.

6.4.2. Selkeyttäminen

Sellaiset näytteet, joiden proteiini- tai rasvapitoisuus on suuri, on tarpeen selkeyttää lisäämällä 1 ml Carrez I -liuosta (4.15 kohta) näyteliuokseen. Ravistamisen jälkeen lisätään 1 ml Carrez II -liuosta (4.16 kohta). Ravistetaan näytettä uudelleen.

6.4.3. Käsittely HPLC-analyysia varten

Mittapullossa oleva näyte laimennetaan merkkiin vedellä, homogenoidaan ja suodatetaan laskostetun suodattimen (5.2 kohta) läpi. Näyteuute otetaan talteen.

Uutteet suodatetaan ruiskusuodattimen (5.3 kohta) läpi ruiskulla (5.6 kohta), joka on huuhdeltu uutteella. Suodokset kerätään ampulleihin (5.4 kohta).

6.5 *Kromatografia*

HPLC suoritetaan sokerianalyysille tavanomaiseen tapaan. Jos HPLC-analyysi osoittaa maltoosijäämiä, tärkkelys ei ole muuntunut kokonaan, minkä seurauksena glukoosin saanto on liian pieni.

7 **Tulosten laskeminen ja ilmoittaminen**

7.1 *HPLC-tulosten laskeminen*

Tärkkelyspitoisuuden laskemiseksi tarvitaan kahden HPLC-analyysin tulokset: näytteessä ennen entsymaattista käsittelyä olevat sokerit (”vapaat sokerit”) ja entsymaattisen käsittelyn jälkeen olevat sokerit (kuten tässä menetelmässä kuvataan). Lisäksi on tehtävä nollakoemääritys, jotta tulos voidaan korjata entsyymeissä olevien sokerien osalta.

HPLC-analyysissä piikin pinta-ala määritetään integroimalla, ja pitoisuus lasketaan vertailuliuosten (4.14 kohta) kanssa tehdyn kalibroinnin avulla. Nollakokeessa oleva glukoosikonsentraatio (g/100 ml) vähennetään entsymaattisen käsittelyn jälkeen mitatusta glukoosikonsentraatiosta (g/100 ml). Lopuksi sokerien pitoisuus (g sokeria/100 g:ssa näytettä) lasketaan käyttäen näytteen punnittua määrää, mistä saadaan tulokseksi:

1) HPLC-analyysistä ennen entsymaattista käsittelyä saadaan vapaiden sokerien pitoisuus (g/100 g):

— glukoosi G

— fruktoosi F

— sakkaroosi S

2) HPLC-analyysistä entsymaattisen käsittelyn jälkeen saadaan sokerien pitoisuus (g/100 g):

— glukoosi nollakoekorjauksen jälkeen ($G_{e\ cor}$)

— fruktoosi F_e

— sakkaroosi S_e

7.2 *Tärkkelyspitoisuuden laskeminen*

7.2.1 Glukoosin kokonaispitoisuuden ”Z” laskeminen

Jos fruktoosin määrä entsymaattisen käsittelyn jälkeen (F_e) on suurempi kuin fruktoosin määrä ennen entsymaattista käsittelyä (F), on näytteessä ollut sakkaroosi osittain muuntunut fruktoosiksi ja glukoosiksi. Tämä tarkoittaa sitä, että on tehtävä korjaus vapautuneen glukoosin (F_e – F) osalta.

Z, lopullinen glukoosipitoisuus korjauksen jälkeen, ilmaistuna g/100 g:

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

7.2.2 Tärkkelyksenä ilmaistun glukoosin kokonaispitoisuuden laskeminen

E, ’tärkkelys’ pitoisuus ilmaistuna g/100 g:

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

8. **Tarkkuus**

Tässä kohdassa esitetään menetelmän tarkkuutta koskevan kahdella näytteellä toteutetun laboratorioidenvälisen testin tiedot. Ne kuvaavat tässä liitteessä selostettuun menetelmään kohdistettavia vaatimuksia.

Laboratorioidenvälisen testin tulokset (tiedoksi)

Vuonna 2008 tehtiin monilaboratoriotesti, johon Euroopan tullilaboratoriot osallistuivat.

Tarkkuutta koskevien tietojen arvioinnissa käytettiin teosta ’Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies’, W. Horwitz, (IUPAC technical report), Pure & Appl. Chem., Vol. 67, N°2, PP.331-343, 1995.

Jäljempänä oleva taulukko sisältää tarkkuutta koskevat tiedot.

Näytteet **1 : suklaakeksipatukka** **2 : keksi**	**Z** **näyte 1**	**Z** **näyte 2**
Laboratorioiden lukumäärä	41	42
Laboratorioiden määrä harha-arvojen eliminoinnin jälkeen	38	39
Keskiarvo (massaprosenttia)	29,8	55,0
Toistettavuuden keskihajonta sr (massaprosenttia)	0,5	0,5
Uusittavuuden keskihajonta sR (massaprosenttia)	1,5	2,3
Toistettavuusraja r (massaprosenttia)	1,4	1,4
Uusittavuusraja R (massaprosenttia)	4,2	6,6”