REGOLAMENTO (UE) N. 118/2010 DELLA COMMISSIONE

del 9 febbraio 2010

che modifica il regolamento (CE) n. 900/2008 che definisce i metodi di analisi e altre disposizioni di carattere tecnico necessarie per l'applicazione del regime d'importazione di talune merci risultanti dalla trasformazione di prodotti agricoli

LA COMMISIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (CEE) n. 2658/87 del Consiglio, del 23 luglio 1987, relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune [1], in particolare l'articolo 9,

considerando quanto segue:

(1) Il regolamento (CE) n. 900/2008 della Commissione [2] stabilisce le formule, i procedimenti e i metodi da utilizzare per la definizione del tenore in amido/glucosio in applicazione degli allegati II e III del regolamento (CE) n. 1460/96 della Commissione, del 25 luglio 1996, che stabilisce le modalità di applicazione dei regimi di scambi preferenziali per talune merci risultanti dalla trasformazione di prodotti agricoli di cui all'articolo 7 del regolamento (CE) n. 3448/93 del Consiglio [3].

(2) Il regolamento (CE) n. 900/2008 è stato esaminato da un gruppo di esperti allo scopo di valutare se tiene conto dell'evoluzione scientifica e tecnica dei metodi in esso stabiliti. Gli studi e le prove realizzati nel quadro di tale esame indicano che la determinazione del tenore di amido/glucosio tramite solubilizzazione con idrossido di sodio (prima della degradazione enzimatica che produce glucosio) e la misurazione del tenore totale di glucosio applicando il metodo enzimatico con spettrofotometria, conformemente a quanto prescritto per la maggior parte dei prodotti, non soddisfano più le attuali esigenze tecniche e vanno di conseguenza aggiornate.

(3) È opportuno di conseguenza disporre che la degradazione dell'amido/glucosio sia realizzata con un processo enzimatico, mediante amilasi e amiloglucosidasi, e che il tenore totale di glucosio sia determinato utilizzando la cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni (HPLC), nonché precisare in che modo vada applicato il metodo enzimatico.

(4) Occorre pertanto modificare di conseguenza il regolamento (CE) n. 900/2008.

(5) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato del codice doganale,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

L'allegato I del regolamento (CE) n. 900/2008 è sostituito dall'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 9 febbraio 2010.

Per la Commissione
Il presidente
José Manuel BARROSO

[1] GU L 256 del 7.9.1987, pag. 1.
[2] GU L 248 del 17.9.2008, pag. 8.
[3] GU L 187 del 26.7.1996, pag. 18.

ALLEGATO

«ALLEGATO I

Determinazione enzimatica dell'amido e dei suoi prodotti di degradazione, compreso il glucosio, nei prodotti alimentari mediante cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni (HPLC)

1. **Campo di applicazione**

Questo metodo descrive la determinazione del tenore in peso di amido e dei relativi prodotti di degradazione compreso il glucosio nei prodotti alimentari destinati al consumo umano, di seguito denominato "amido". Il tenore di amido è ricavato mediante determinazione quantitativa del glucosio per mezzo della cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) dopo idrolisi enzimatica dell'amido e dei suoi prodotti di degradazione in glucosio.

2. **Definizione del tenore totale di glucosio e del tenore totale di glucosio espresso in amido**

Per tenore totale di glucosio si intende il valore Z calcolato secondo quanto indicato al punto 7.2.1 del presente allegato. Rappresenta il tenore in peso di amido e di tutti i suoi prodotti di degradazione compreso il glucosio.

Il tenore di amido/glucosio di cui all'allegato III del regolamento (CE) n. 1460/96 è calcolato sulla base del tenore totale di glucosio Z e conformemente all'articolo 2, punto 1, del presente regolamento.

Il tenore di amido (o destrine) di cui alla colonna 3 dell'allegato IV del regolamento (CE) n. 1043/2005 della Commissione [1] è calcolato sulla base del tenore totale di glucosio Z e conformemente all'articolo 2, punto 2.1, del regolamento (CE) n. 904/2008 della Commissione [2].

Per tenore di amido di cui al punto 1 del presente allegato si intende il valore E quale definito al punto 7.2.2 del presente allegato. È espresso in percentuale (m/m) ed equivale al tenore totale di glucosio Z espresso in amido. Tale valore E non interferisce nei calcoli summenzionati.

3. **Principio**

Il campione è omogeneizzato e sospeso in acqua. L'amido e i suoi prodotti di degradazione presenti nel campione sono idrolizzati enzimaticamente in glucosio in due fasi:

1. l'amido e i suoi prodotti di degradazione sono parzialmente idrolizzati, a 90 °C, in catene di glucosio solubili mediante alfa-amilasi termostabile. Per una idrolisi completa è necessario che i campioni siano interamente solubilizzati o si presentino sotto forma di sospensione di piccolissime particelle solide;

2. le catene di glucosio solubili sono idrolizzate in glucosio mediante amiloglucosidasi a 60 °C.

I prodotti con un elevato tenore di proteine o materie grasse sono sottoposti a chiarificazione e filtrazione.

La determinazione degli zuccheri è effettuata mediante un'analisi HPLC.

Dato che durante il trattamento enzimatico può verificarsi una inversione parziale del saccarosio, si effettua anche la determinazione degli zuccheri liberi, mediante analisi HPLC, al fine di calcolare il tenore di glucosio corretto.

4. **Reattivi e altri materiali**

Si raccomanda di utilizzare dei reattivi di grado analitico riconosciuto e acqua demineralizzata.

4.1. Glucosio, min. 99 %.

4.2. Fruttosio, min. 99 %.

4.3. Saccarosio, min. 99 %.

4.4. Maltosio monoidrato, min. 99 %.

4.5. Lattosio monoidrato, min. 99 %.

4.6. Soluzione di alfa-amilasi termostabile (1,4-alfa-D-Glucan glucanoidrolasi), con un'attività di circa 31 000 U/ml (1 U libera 1,0 mg di maltosio dall'amido in 3 minuti a paragrafo 6,9 e 20 °C). Tale enzima può contenere una piccola quantità di impurezze (ad esempio glucosio o saccarosio) ed altri enzimi interferenti. Temperatura di conservazione: circa 4 °C. In alternativa può essere utilizzata un'altra fonte di alfa-amilasi che consenta di ottenere una soluzione finale con un'attività enzimatica comparabile.

[1] GU L 172 del 5.7.2005, pag. 24.
[2] GU L 249 del 18.9.2008, pag. 9.

4.7. Amiloglucosidasi (1,4-alfa-D-Glucan glucoidrolasi) da *Aspergillus niger*, in polvere, con un'attività di circa 120 U/mg o circa 70 U/mg (1 U libera dall'amido 1 micromole di glucosio al minuto a paragrafo 4,8 e 60 °C). Tale enzima contiene una piccola quantità di impurezze (ad esempio glucosio o saccarosio) e altri enzimi interferenti (ad esempio invertasi). Temperatura di conservazione: circa 4 °C. In alternativa si può utilizzare un'altra fonte di alfa-amilasi che consenta di ottenere una soluzione finale con un'attività enzimatica comparabile.

4.8. Acetato di zinco diidrato, p.a.

4.9. Esacianoferrato di potassio (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), extra puro.

4.10. Acetato di sodio anidro, p.a.

4.11. Acido acetico glaciale, 96 % (v/v) (minimo).

4.12. Tampone di acetato di sodio (0,2 moli/l). Pesare 16,4 grammi di acetato di sodio (punto 4.10) in un becher, scioglierli in acqua e versare la soluzione ottenuta e l'acqua di risciacquo in un matraccio tarato da 1 000 ml. Portare a volume con acqua e aggiustare il pH a 4,7 mediante aggiunta di acido acetico [servirsi di un pH-metro (punto 5.7)]. La soluzione così ottenuta può essere utilizzata fino a sei mesi, se conservata a 4 °C.

4.13. Soluzione di amiloglucosidasi. Preparare una soluzione di amiloglucosidasi in polvere (punto 4.7) utilizzando il tampone di acetato di sodio (punto 4.12). L'attività enzimatica deve essere sufficiente e rapportata al contenuto di amido dell'aliquota di campione [ad esempio un'attività di circa 600 U/ml si ottiene da 0,5 amiloglucosidasi in polvere 120 U/mg (punto 4.7) in un volume finale di 100 ml e per 1 g di amido nell'aliquota di campione]. La soluzione deve essere preparata al momento.

4.14. Soluzioni di riferimento. Preparare delle soluzioni acquose di glucosio, fruttosio, maltosio e lattosio, del tipo solitamente utilizzato per l'analisi degli zuccheri mediante HPLC.

4.15. Reattivo di chiarificazione (Carrez I). Discioglière in acqua 219,5 grammi di acetato di zinco (punto 4.8) in un becher. Versare il liquido ottenuto e l'acqua di risciacquo in un matraccio tarato da 1 000 ml e aggiungere 30 ml di acido acetico (punto 4.11). Mescolare con cura e portare a volume con acqua. La soluzione ottenuta può essere utilizzata per un periodo massimo di sei mesi, se conservata a temperatura ambiente. Si possono eventualmente utilizzare altri reattivi di chiarificazione equivalenti alla soluzione Carrez.

4.16. Reattivo di chiarificazione (Carrez II). Discioglière in acqua 106,0 grammi di esacianoferrato di potassio (II) (punto 4.9) in un becher. Versare il liquido ottenuto e l'acqua di risciacquo in un matraccio tarato da 1 000 ml, mescolare con cura e portare a volume con acqua. La soluzione ottenuta può essere utilizzata per un periodo massimo di sei mesi, se conservata a temperatura ambiente. Si possono eventualmente utilizzare altri reattivi di chiarificazione equivalenti alla soluzione Carrez.

4.17. Fase mobile per HPLC. Preparare una fase mobile del tipo solitamente utilizzato nell'analisi degli zuccheri mediante HPLC. Qualora si impieghi, ad esempio, una colonna di gel di silice aminopropile, la fase mobile è normalmente costituita da una miscela di acqua e acetonitrile per HPLC.

5. **Apparecchiatura**

5.1. Comune vetreria di laboratorio.

5.2. Filtri di carta a pieghe, ad esempio filtri di 185 mm.

5.3. Filtri per siringhe da 0,45 µm per soluzioni acquose.

5.4. Vials per il campionatore automatico dell'HPLC.

5.5. Matracci tarati da 100 ml.

5.6. Siringhe di plastica da 10 ml.

5.7. pH-metro.

5.8. Bilancia analitica.

5.9. Bagno termostatico regolabile a 60 °C e 90 °C.

5.10. Apparecchiatura HPLC idonea all'analisi degli zuccheri.

6. **Procedimento**

6.1. *Preparazione del campione per tipologie diverse di prodotti*

Il prodotto è omogeneizzato.

6.2. *Aliquota di campione per l'analisi*

La quantità di campione è stimata in base agli ingredienti dichiarati e alle condizioni dell'analisi HPLC (concentrazione delle soluzioni di glucosio di riferimento) e non deve superare:

$$\text{quantità del campione (g)} = \frac{\text{volume del matraccio (ad esempio 100 ml)}}{\text{tenore stimato di amido (\%)}}$$

Indicare il peso del campione con una precisione di 0,1 mg.

6.3. *Determinazione del bianco*

Il valore del bianco è determinato mediante un'analisi completa (condotta secondo le modalità descritte al punto 6.4), in assenza di campione. Il risultato di tale determinazione serve per il calcolo del tenore di amido (punto 7.2).

6.4. *Analisi*

6.4.1. Preparazione dei campioni

Il campione è omogeneizzato mediante agitazione o mescolamento. All'aliquota scelta per l'analisi (punto 6.2), pesata in un matraccio tarato (punto 5.5), vanno aggiunti 70 ml di acqua tiepida.

Portare in sospensione (o, se solubile, solubilizzare), aggiungere 50 microlitri di alfa-amilasi termostabile (punto 4.6) e riscaldare a 90 °C per 30 minuti, utilizzando il bagno termostatico (punto 5.9). Raffreddare, il più velocemente possibile, a 60 °C immergendo il matraccio nel bagno termostatico e aggiungere 5 ml della soluzione di amiloglucosidasi (punto 4.13). Per campioni che possono influire sul pH della soluzione di reazione, controllare il pH e aggiustarlo, all'occorrenza, a un valore compreso fra 4,6 e 4,8. Lasciare agire per 60 minuti a 60 °C. Raffreddare il campione a temperatura ambiente.

6.4.2. Chiarificazione

Per campioni con un elevato tenore di proteine o di materie grasse è necessario procedere alla chiarificazione aggiungendo 1 ml di Carrez I (punto 4.15) alla soluzione del campione. Agitare e aggiungere successivamente 1 ml di Carrez II (4.16) Agitare nuovamente il campione.

6.4.3. Trattamento per l'analisi HPLC

Il campione, nel matraccio tarato, si porta a volume con acqua, quindi si omogenizza e si filtra attraverso un filtro di carta a pieghe (punto 5.2). Raccogliere la soluzione filtrata.

Filtrare ulteriormente la soluzione, attraverso un filtro per siringhe (punto 5.3), con una siringa (punto 5.6) preventivamente avvinata con la stessa soluzione. Raccogliere il filtrato nei vials (punto 5.4).

6.5. *Cromatografia*

L'analisi HPLC è effettuata secondo le modalità normalmente utilizzate per l'analisi degli zuccheri. Qualora dall'analisi HPLC risultino tracce di maltosio, significa che l'idrolisi dell'amido è stata incompleta, il che determina un recupero troppo basso di glucosio.

7. **Calcolo e espressione dei risultati**

7.1. *Calcolo dei risultati dell'HPLC*

Per calcolare il tenore di amido occorrono i risultati di due analisi HPLC, specificamente per determinare gli zuccheri presenti nel campione prima ("zuccheri liberi") e dopo il trattamento enzimatico (come descritto in tale metodo). Occorre inoltre effettuare un'analisi del bianco per poter tenere conto, nel calcolo, degli zuccheri presenti negli enzimi utilizzati.

Nelle analisi HPLC l'area del picco è determinata per integrazione e la concentrazione è calcolata mediante calibrazione con le soluzioni di riferimento (punto 4.14). Dalla concentrazione di glucosio (g/100 ml) riscontrata dopo il trattamento enzimatico si sottrae la concentrazione di glucosio (g/100 ml) dei bianchi. Infine il tenore (g zucchero/100 g campione) di zuccheri è calcolato in riferimento alla quantità di campione pesata, mediante:

1. un'analisi HPLC prima del trattamento enzimatico, da cui risulta il tenore (g/100 g) di zuccheri liberi:
   — glucosio G
   — fruttosio F
   — saccarosio S
2. un'analisi HPLC dopo il trattamento enzimatico, da cui risulta il tenore di zuccheri (g/100 g):
   — glucosio corretto del valore del bianco ($G_{e\ cor}$)
   — fruttosio F_e
   — saccarosio S_e

7.2. *Calcolo del tenore di amido*

7.2.1. Calcolo del glucosio totale "Z"

Se la quantità di fruttosio dopo il trattamento enzimatico (F_e) è maggiore della quantità di fruttosio prima del trattamento enzimatico (F), significa che il saccarosio presente nel campione si è parzialmente idrolizzato in fruttosio e glucosio. Ne consegue che occorre procedere a una correzione per il glucosio liberato ($F_e - F$).

Z, tenore finale di glucosio dopo la correzione in g/100 g:

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

7.2.2. Calcolo del tenore totale di glucosio espresso in amido

E, tenore di "amido", in g/100 g:

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

8. **Precisione**

In questo punto sono riportati i risultati di un test interlaboratorio e i relativi dati di precisione del metodo applicato a due campioni. Tali dati riflettono i requisiti di efficienza del metodo descritto nel presente allegato.

Risultati di un test interlaboratorio (a titolo informativo)

Nel 2008 è stata condotto un test interlaboratorio a cui hanno partecipato i laboratori doganali europei.

La valutazione dei dati di precisione è stata effettuata conformemente al "Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies", W. Horwitz, (IUPAC technical report), Pure & Appl. Chem., Vol. 67, n.º2, pagg. 331-343, 1995.

I dati di precisione sono riportati nella tabella che segue.

Campioni **1 : barretta di cioccolato e biscotto** **2 : biscotto**	**Z** **Campione 1**	**Z** **Campione 2**
Numero di laboratori	41	42
Numero di laboratori dopo l'eliminazione dei dati aberranti	38	39
Tenore medio (%, m/m)	29,8	55,0
Deviazione standard della ripetibilità sR (%, m/m)	0,5	0,5
Deviazione standard della riproducibilità sR (%, m/m)	1,5	2,3
Limite di ripetibilità r (%, m/m)	1,4	1,4
Limite di riproducibilità R (%, m/m)	4,2	6,6»