KOMISIJOS REGLAMENTAS (ES) Nr. 118/2010

2010 m. vasario 9 d.

iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 900/2008, nustatantį analizės metodus ir kitas technines nuostatas, būtinas importo tvarkai, taikomai tam tikroms prekėms, gautoms perdirbant žemės ūkio produktus, įgyvendinti

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 1987 m. liepos 23 d. Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 2658/87 dėl tarifų ir statistinės nomenklatūros bei dėl Bendrojo muitų tarifo [1], ypač į jo 9 straipsnį,

kadangi:

(1) Komisijos reglamentu (EB) Nr. 900/2008 [2] nustatytos formulės, procedūros ir metodai, kuriuos reikia naudoti krakmolui ir (arba) gliukozei nustatyti, siekiant taikyti 1996 m. liepos 25 d. Komisijos reglamento (EB) Nr. 1460/96, nustatančio Tarybos reglamento (EB) Nr. 3448/93 7 straipsnyje numatytos lengvatinės prekybos tvarkos, taikytinos tam tikroms iš perdirbtų žemės ūkio produktų pagamintoms prekėms, išsamias įgyvendinimo taisykles, II ir III priedus [3].

(2) Reglamentą (EB) Nr. 900/2008 išnagrinėjo ekspertų grupė, siekdama įvertinti, ar tame reglamente atsižvelgta į mokslinę bei technologinę tuo reglamentu nustatytų metodų raidą. Per nagrinėjimą atliktais tyrimais ir bandymais nustatyta, kad krakmolo ir (arba) gliukozės kiekio nustatymas atliekant hidrolizę natrio hidroksidu (prieš fermentinį skaidymą iki gliukozės) ir bendro gliukozės kiekio matavimą taikant fermentų metodą kartu su spektrofotometrija, kurie šiuo metu nurodyti atlikti su dauguma prekių, nebeatitinka dabartinių techninių reikalavimų, ir dėl to turi būti atnaujinti.

(3) Todėl tikslinga nustatyti, kad krakmolo ir (arba) gliukozės skaidymas būtų atliekamas taikant fermentų metodą paveikiant amilaze ir amilogliukozidaze, o bendras gliukozės kiekis būtų nustatomas taikant didelio slėgio skysčių chromatografiją (HPLC), ir nurodyti, kaip taikyti fermentų metodą.

(4) Todėl Reglamentas (EB) Nr. 900/2008 turėtų būti atitinkamai iš dalies pakeistas.

(5) Šiame reglamente numatytos priemonės atitinka Muitinės kodekso komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Reglamento (EB) Nr. 900/2008 I priedas pakeičiamas šio reglamento priede pateiktu tekstu.

2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja dvidešimtą dieną nuo jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas yra privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2010 m. vasario 9 d.

Komisijos vardu

Pirmininkas

José Manuel BARROSO

---

[1] OL L 256, 1987 9 7, p. 1.
[2] OL L 248, 2008 9 17, p. 8.
[3] OL L 187, 1996 7 26, p. 18.

PRIEDAS

„I PRIEDAS

Fermentinis krakmolo ir jo skilimo produktų, įskaitant gliukozę, nustatymas maisto produktuose taikant didelio efektyvumo skysčių chromatografiją (HPLC)

1. **Taikymo sritis**

Šiuo metodu apibrėžiamas krakmolo ir jo skilimo produktų, įskaitant gliukozę, toliau vadinamo krakmolu, kiekio nustatymas žmonėms vartoti skirtuose maisto produktuose. Krakmolo kiekis nustatomas atliekant kiekybinį gliukozės tyrimą taikant didelio efektyvumo skysčių chromatografiją (HPLC) po fermentinio krakmolo ir jo skilimo produktų konversijos iki gliukozės.

2. **Bendro gliukozės kiekio apibrėžtis ir bendras gliukozės kiekis, išreikštas krakmolu**

Bendras gliukozės kiekis išreiškiamas dydžiu Z, kaip nurodyta šio priedo 7.2.1 punkte. Šiuo dydžiu išreiškiamas krakmolo ir visų jo skilimo produktų, įskaitant gliukozę, kiekis.

Krakmolo ir (arba) gliukozės kiekis, kaip nurodyta Reglamento (EB) Nr. 1460/96 III priede, turi būti skaičiuojamas pagal bendrą gliukozės kiekį Z ir kaip nustatyta šio reglamento 2 straipsnio 1 punkte.

Krakmolo (arba dekstrino) kiekis, kaip nurodyta Komisijos reglamento (EB) Nr. 1043/2005 ([1]) IV priedo 3 skiltyje, turi būti skaičiuojamas pagal bendrą gliukozės kiekį Z, kaip nustatyta Komisijos reglamento (EB) Nr. 904/2008 2 straipsnio 2.1 punkte ([2]).

Šio priedo 1 punkte nurodytas krakmolo kiekis reiškia dydį E, kaip apskaičiuota šio priedo 7.2.2 punkte Šis kiekis išreiškiamas % (m/m). Jis atitinka bendrą gliukozės kiekį Z, išreikštą krakmolu. Dydis E nenaudojamas minėtuose skaičiavimuose.

3. **Metodo esmė**

Mėginiai homogenizuojami ir suspenduojami vandenyje. Mėginyje esantis krakmolas ir jo skilimo produktai veikiant fermentais paverčiami gliukoze dviem etapais:

1) Krakmolas ir jo skilimo produktai iš dalies paverčiami tirpiomis gliukozės grandinėmis naudojant termiškai patvarią alfa amilazę 90 °C temperatūroje. Kad virtimas būtų veiksmingas, mėginius būtina visiškai ištirpinti, arba jie turi būti suspensijos, kurioje yra labai mažų kietų dalelių, pavidalo;

2) Tirpios gliukozės grandinės paverčiamos gliukoze naudojant amilogliukozidazę 60 °C temperatūroje.

Produktai, kuriuose yra didelis baltymų arba riebalų kiekis, skaidrinami ir filtruojami.

Cukrūs nustatomi tiriant HPLC metodu.

Kadangi veikiant fermentais gali įvykti dalinė sacharozės inversija, pakoreguotam gliukozės kiekiui apskaičiuoti HPLC metodu taip pat nustatomi laisvieji cukrūs.

4. **Reagentai ir kitos medžiagos**

Naudojami patvirtinto analizinio grynumo reagentai ir gėlintas vanduo.

4.1. Gliukozė, ne mažiau kaip 99 % grynumo.

4.2. Fruktozė, ne mažiau kaip 99 % grynumol.

4.3. Sacharozė, ne mažiau kaip 99 % grynumo.

4.4. Maltozės monohidratas, ne mažiau kaip 99 % grynumo.

4.5. Laktozės monohidratas, ne mažiau kaip 99 % grynumo.

4.6. Termiškai patvarios alfa amilazės (1,4-alfa-D-gliukan-gliukanohidrolazė), kurios aktyvumas apytikriai 31 000 U/ml (1U išskiria 1,0 mg maltozės iš krakmolo per 3 minutes, kai pH 6,9 ir temperatūra yra 20 °C), tirpalas. Šio fermento sudėtyje gali būti mažas priemaišų (pvz., gliukozės arba sacharozės) ar kitų galinčių trukdyti fermentų kiekis. Laikyti apytikriai 4 °C temperatūroje. Kitu atveju gali būti naudojami kiti alfa amilazės šaltiniai, kuriuos naudojant gaunamas panašaus fermentų aktyvumo galutinis tirpalas.

([1]) OL L 172, 2005 7 5, p. 24.
([2]) OL L 249, 2008 9 18, p. 9.

4.7 Amilogliukozidazės (1,4-alfa-D-gliukangliukohidrolazė) iš *Aspergillus niger* milteliai, kurių aktyvumas apytikriai 120 U/mg arba apytikriai 70 U/mg (1U atpalaiduoja 1 mikro molį gliukozės iš krakmolo per 1 minutę, kai pH 4,8 ir temperatūra yra 60 °C). Šio fermento sudėtyje gali būti mažas priemaišų (pvz., gliukozės arba sacharozės) ar kitų galinčių trukdyti fermentų (pvz., sacharazės) kiekis. Laikyti apytikriai 4 °C temperatūroje. Kitu atveju gali būti naudojami kiti amilogliukozidazės šaltiniai, kuriuos naudojant gaunamas panašaus fermentinio aktyvumo galutinis tirpalas.

4.8. Cinko acetato dihidratas, a. g..

4.9. Kalio heksacianoferatas (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), ypač grynas.

4.10. Natrio acetatas bevandenis, a. g.

4.11. Ledinė acto rūgštis, 96 % (v/v)(mažiausiai).

4.12. Natrio acetato buferinis tirpalas (0,2 mol/l). Cheminėje stiklinėje pasveriama 16,4 g natrio acetato (4.10 punktas). Ištirpinama vandenyje ir supilama į 1 000 ml matavimo kolbą. Praskiedžiama iki žymos vandeniu ir su acto rūgštimi pH pakoreguojamas iki 4,7 (naudojant pH-metrą (5.7 punktas)). Šį tirpalą galima naudoti ne ilgiau kaip 6 mėnesius, laikant 4 °C temperatūroje.

4.13. Amilogliukozidazės tirpalas. Paruošiamas tirpalas iš amilogliukozidazės miltelių (4.7 punktas) naudojant natrio acetato buferinį tirpalą (4.12 punktas). Fermentų aktyvumas turi būti pakankamas ir atitikti krakmolo kiekį mėginio dalyje (pvz., 600 U/ml aktyvumas gaunamas iš 120 U/mg (4.7 punktas) 0,5 g amilogliukozidazės miltelių 100 ml galutinio tirpalo 1 g krakmolo mėginio dalyje). Ruošiama prieš pat naudojimą.

4.14. Etaloniniai tirpalai. Paruošiami gliukozės, fruktozės, sacharozės, maltozės ir laktozės tirpalai vandenyje, kurie, kaip įprasta, naudojami cukrums tirti HPLC metodu.

4.15. Cheminis skaidrinimo reagentas (*Carrez I*). Cheminėje stiklinėje vandenyje ištirpinama 219,5 gramai cinko acetato (4.8 punktas). Supilama į 1 000 ml matavimo kolbą, įpilama 30 ml acto rūgšties (4.11 punktas). Gerai sumaišoma ir skiedžiama vandeniu iki žymos. Šį tirpalą galima naudoti ne ilgiau kaip 6 mėnesius laikant kambario temperatūroje. Galima naudoti kitus *Carrez* tirpalui lygiaverčius cheminius skaidrinimo reagentus.

4.16. Cheminis skaidrinimo reagentas (*Carrez II*). Cheminėje stiklinėje vandenyje ištirpinama 106,0 gramai kalio heksacianoferato (II) (4.9 punktas). Supilama į 1 000 ml matavimo kolbą. Gerai sumaišoma ir skiedžiama vandeniu iki žymos. Šį tirpalą galima naudoti ne ilgiau kaip 6 mėnesius laikant kambario temperatūroje. Galima naudoti kitus *Carrez* tirpalui lygiaverčius cheminius skaidrinimo reagentus.

4.17. Judančioji HPLC fazė. Paruošiama judančioji fazė, kuri, kaip įprasta, naudojama cukrums tirti HPLC metodu. Naudojant pvz., aminopropilsilikagelio kolonėlę, dažniausiai naudojama judančioji fazė yra HPLC grynumo vandens ir acetonitrilo mišinys.

5. **Įranga**

5.1. Standartiniai laboratoriniai stikliniai indai.

5.2. Rievėtieji filtrai, pvz., 185 mm.

5.3. Švirkštų filtrai, 0,45 µm, tinkami vandeniniams tirpalams.

5.4. Ėminių buteliukai, pritaikyti HPLC automatiniam mėginių įvedimo įrenginiui.

5.5. 100 ml matavimo kolbos.

5.6. Plastikiniai švirkštai, 10 ml

5.7. pH-metras

5.8. Analizinės svarstyklės

5.9. Vandens vonia su termostatu, reguliuojama nuo 60 °C iki 100 °C

5.10. HPLC įrenginys, tinkamas cukrums tirti.

6. **Procedūra**

6.1. *Mėginio paruošimas kelių tipų produktams*

Produktas homogenizuojamas.

6.2. *Mėginio dalis*

Mėginio kiekis nustatomas pagal deklaruojamas sudedamąsias dalis ir HPLC tyrimo sąlygas (gliukozės etaloninio tirpalo koncentraciją) ir turi neviršyti:

$$\text{mėginio kiekis (g)} = \frac{\text{matavimo kolbos tūris (pvz., 100 ml)}}{\text{įvertintas krakmolo kiekis (\%)}}$$

Mėginys pasveriamas 0,1 mg tikslumu.

6.3. *Tuščiasis tyrimas*

Tuščiojo tyrimo rezultatas gaunamas atliekant visą tyrimą (kaip aprašyta 6.4 punkte), bet be pridėto mėginio. Tuščiojo tyrimo rezultatas naudojamas krakmolo kiekiui apskaičiuoti (7.2 punktas).

6.4. *Tyrimas*

6.4.1. Mėginių paruošimas

Mėginys homogenizuojamas kratant arba maišant. Pasirinkta tiriamoji dalis (6.2 punktas) pasveriama ir dedama į matavimo kolbą (5.5 punktas), į kurią įpilama apytikriai 70 ml šilto vandens.

Ištirpinus arba suspendavus, pripilama 50 mikrolitrų termiškai patvarios alfa amilazės (4.6 punktas) ir 90 °C temperatūroje 30 minučių kaitinama vandens vonioje (5.9 punktas). Kuo greičiau vandens vonioje atvėsinama iki 60 °C temperatūros ir įpilami 5 ml amilogliukozidazės tirpalo (4.13 punktas). Mėginių, galinčių turėti įtakos reakcijos tirpalo pH, pH kontroliuojamas ir pakoreguojamas, jei reikia, iki 4,6–4,8. 60 min. leidžiama vykti reakcijai 60 °C temperatūroje. Mėginiai atvėsinami iki kambario temperatūros.

6.4.2. Skaidrinimas

Mėginius, kuriuose yra didelis baltymų arba riebalų kiekis, būtina skaidrinti įpilant į mėginio tirpalą 1 ml *Carrez* I (4.15 punktas). Sukračius įpilama 1 ml *Carrez* II (4.16 punktas). Mėginys dar kartą sukratomas.

6.4.3. Apdorojimas HPLC tyrimui

Mėginys matavimo kolboje iki žymos praskiedžiamas vandeniu, homogenizuojamas ir filtruojamas per rievėtąjį filtrą (5.2 punktas). Mėginio ekstraktas surenkamas.

Ekstraktai filtruojami per švirkštinį filtrą (5.3 punktas) švirkštu (5.6 punktas), kuris prieš tai buvo išplautas ekstraktu. Filtratai surenkami į buteliukus (5.4 punktas).

6.5. *Chromatografija*

HPLC tyrimas atliekamas taip, kaip įprasta tiriant cukrus. Jei atlikus HPLC tyrimą aptinkama maltozės pėdsakų, reiškia, krakmolas ne visiškai suskilo, todėl gaunama per maža gliukozės išgava.

7. **Rezultatų skaičiavimas ir pateikimas**

7.1. *HPLC rezultatų skaičiavimas*

Krakmolo kiekiui apskaičiuoti, reikia dviejų HPLC tyrimų rezultatų: mėginyje esančių cukrų prieš veikimą fermentais (laisvųjų cukrų) ir po veikimo fermentais (kaip aprašyta pagal šį metodą). Taip pat turi būti atliekamas tuščiasis tyrimas, kad būtų galima korekcija atsižvelgus į fermentuose esančius cukrus.

Atliekant HPLC tyrimą smailės plotas nustatomas suintegravus, o koncentracija apskaičiuojama po kalibravimo etaloniniais tirpalais (4.14 punktas). Iš gliukozės koncentracijos (g/100 ml) paveikus fermentais atimama tuščiojo tyrimo gliukozės koncentracija (g/100 ml). Galiausiai cukrų kiekis (gramai cukraus/100 gramų mėginio) apskaičiuojamas pagal pasverto mėginio kiekį taip:

1) HPLC tyrimas prieš paveikiant fermentais, pateikiant šį laisvųjų cukrų kiekį (g/100 g):

— gliukozės G

— fruktozės F

— sacharozės S

2) HPLC tyrimas paveikus fermentais, pateikiant šį laisvųjų cukrų kiekį (g/100 g):

— pagal tuščiąjį tyrimą pakoreguotas gliukozės kiekis ($G_{e\ cor}$)

— fruktozės F_e

— sacharozės S_e

7.2. *Krakmolo kiekio skaičiavimas*

7.2.1. Bendro gliukozės kiekio Z skaičiavimas

Jei fruktozės kiekis paveikus fermentais (F_e) yra didesnis nei fruktozės kiekis prieš paveikiant fermentais (F), tuomet mėginyje esanti sacharozė iš dalies skilo į fruktozę ir gliukozę. Tai rodo, kad išsiskyrusios gliukozės vertę būtina pakoreguoti ($F_e - F$).

Pakoreguotas galutinis gliukozės kiekis Z, skaičiuojant g/100 g:

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

7.2.2. Bendro gliukozės kiekio, išreikšto krakmolu, skaičiavimas

krakmolo kiekis E, skaičiuojant g/100 g:

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

8. **Glaudumas**

Čia pateikiami išsamūs tarplaboratorinio tyrimo, atlikto su dviem mėginiais, glaudumo duomenys. Šie duomenys atitinka šiame priede aprašyto metodo atlikimo reikalavimus.

Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai (informatyvūs)

Tarplaboratorinis tyrimas buvo atliktas 2008 m. dalyvaujant Europos muitinių laboratorijoms.

Glaudumo duomenų vertinimas atliktas remiantis „Metodo naudojimo charakteristikų tyrimo plano taikymo ir aiškinimo protokolu“ (angl. *„Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies“*), *W. Horwitz, (IUPAC techninė ataskaita), Pure & Appl. Chem., Nr. 67, Nº2, p. 331–343, 1995*.

Glaudumo duomenys pateikiami lentelėje.

Mėginiai **1 : batonėlis iš sausainio su šokoladu** **2 : sausainis**	**Z** **1 mėginys**	**Z** **2 mėginys**
Laboratorijų skaičius	41	42
Laboratorijų skaičius atmetus riktus	38	39
Vidurkis (%, m/m)	29,8	55,0
Pakartojamumo standartinis nuokrypis sr (%, m/m)	0,5	0,5
Atkuriamumo standartinis nuokrypis sR (%, m/m)	1,5	2,3
Pakartojamumo riba r (%, m/m)	1,4	1,4
Atkuriamumo riba R (%, m/m)	4,2	6,6“