REGULAMENTUL (UE) NR. 118/2010 AL COMISIEI

din 9 februarie 2010

de modificare a Regulamentului (CE) nr. 900/2008 de stabilire a metodelor de analiză și a altor dispoziții tehnice necesare pentru punerea în aplicare a regimului de import al anumitor mărfuri rezultate din prelucrarea produselor agricole

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Regulamentul (CEE) nr. 2658/87 al Consiliului din 23 iulie 1987 privind Nomenclatura tarifară și statistică și Tariful vamal comun [1], în special articolul 9,

întrucât:

(1) Regulamentul (CE) nr. 900/2008 al Comisiei [2] stabilește formulele, procedurile și metodele de utilizat pentru determinarea amidonului/glucozei, în scopul aplicării anexelor II și III la Regulamentul (CE) nr. 1460/96 al Comisiei din 25 iulie 1996 de stabilire a normelor detaliate de punere în aplicare a regimurilor comerciale preferențiale aplicabile anumitor mărfuri rezultate din transformarea produselor agricole, în conformitate cu dispozițiile articolului 7 din Regulamentul (CE) nr. 3448/93 al Consiliului [3].

(2) Regulamentul (CE) nr. 900/2008 a fost examinat de către un grup de experți, pentru a evalua dacă respectivul regulament ține cont de evoluția științifică și tehnologică a metodelor stabilite în respectivul regulament. Studiile și încercările efectuate în cadrul respectivei examinări indică faptul că determinarea conținutului de amidon/glucoză prin solubilizare, prin intermediul hidroxidului de sodiu (înaintea degradării enzimatice pentru a obține glucoza) și măsurarea conținutului total de glucoză utilizând metoda enzimatică cu spectrofotometrie, astfel cum este prescris, în prezent, pentru majoritatea mărfurilor nu mai corespund cerințelor tehnice actuale și, prin urmare, trebuie să fie actualizate.

(3) Prin urmare, este necesar să se prevadă că degradarea amidonului/glucozei trebuie să se realizeze în mod enzimatic cu amilază și amiloglucozidază și că determinarea conținutului total de glucoză trebuie să se realizeze folosind cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) și să se specifice cum urmează să se realizeze metoda enzimatică.

(4) Prin urmare, Regulamentul (CE) nr. 900/2008 ar trebui modificat în consecință.

(5) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului Codului vamal,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Anexa I la Regulamentul (CE) nr. 900/2008 se înlocuiește cu textul prevăzut în anexa la prezentul regulament.

Articolul 2

Prezentul regulament intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 9 februarie 2010.

Pentru Comisie

Președintele

José Manuel BARROSO

---

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

ANEXĂ

„ANEXA I

Determinarea enzimatică a amidonului și a produșilor săi de degradare, inclusiv glucoza, din produsele alimentare, utilizând cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC)

1. **Domeniul de aplicare**

Această metodă descrie determinarea conținutului de amidon și a produșilor săi de degradare, inclusiv glucoza, din produsele alimentare pentru consumul uman, denumite în continuare «amidon». Conținutul de amidon se determină prin analiza cantitativă a glucozei utilizând cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), după conversia enzimatică a amidonului și a produșilor săi de degradare în glucoză.

2. **Definiția conținutului total de glucoză și a conținutului total de glucoză exprimat ca amidon**

Prin conținut total de glucoză, se înțelege valoarea Z astfel cum a fost calculată la punctul 7.2.1 din prezenta anexă. Aceasta reprezintă conținutul de amidon și a tuturor produșilor săi de degradare, inclusiv glucoza.

Conținutul de amidon/glucoză, astfel cum a fost definit în anexa III la Regulamentul (CE) nr. 1460/96, se calculează pe baza conținutului total de glucoză Z și astfel cum s-a stabilit la articolul 2 punctul 1 din prezentul regulament.

Conținutul de amidon (sau dextrină), astfel cum a fost menționat în coloana 3 din anexa IV la Regulamentul (CE) nr. 1043/2005 al Comisiei ([1]), se calculează pe baza conținutului total de glucoză Z, astfel cum s-a stabilit la articolul 2 punctul 2.1 din Regulamentul (CE) nr. 904/2008 al Comisiei ([2]).

Prin conținutul de amidon menționat la punctul 1 din prezenta anexă se înțelege valoarea E, astfel cum a fost calculată la punctul 7.2.2 din prezenta anexă. Aceasta se exprimă în % (m/m) și este echivalentă cu conținutul total de glucoză Z, exprimat ca amidon. Această valoare E nu intervine în calculele menționate anterior.

3. **Principiu**

Eșantioanele sunt omogenizate și puse în suspensie în apă. Amidonul și produșii săi de degradare, prezenți în eșantion, sunt convertiți în mod enzimatic în glucoză în două etape:

1. Amidonul și produșii săi de degradare sunt parțial convertiți în lanțuri solubile de glucoză utilizând alfa-amilază termostabilă la 90 °C. Pentru o conversie eficace, este necesar ca eșantioanele să fie complet dizolvate sau prezente sub forma unei suspensii care conține părți solide foarte mici.

2. Lanțurile solubile de glucoză sunt convertite în glucoză utilizând amiloglucozidază la 60 °C.

Produsele care au un conținut ridicat de proteine sau de grăsimi sunt clarificate și filtrate.

Determinarea conținutului de zaharuri se realizează prin analiza HPLC.

Deoarece în timpul tratamentului enzimatic poate avea loc o inversie parțială a zaharozei, determinarea zaharurilor libere se realizează, de asemenea, prin analiza HPLC, pentru a calcula conținutul corectat de glucoză.

4. **Reactivi și alte materiale**

Se vor folosi reactivi cu grad analitic recunoscut și apă demineralizată.

4.1. Glucoză, minimum 99 %.

4.2. Fructoză, minimum 99 %.

4.3. Zaharoză, minimum 99 %.

4.4. Maltoză monohidrat, minimum 99 %.

4.5. Lactoză monohidrat, minimum 99 %.

4.6. Soluție de alfa-amilază termostabilă (1,4-alfa-D-glucan-glucanohidrolază), cu o activitate de aproximativ 31 000 U/ml (1U va elibera 1,0 mg de maltoză din amidon în 3 minute la pH 6,9 și 20 °C). Această enzimă poate conține o cantitate redusă de impurități (de exemplu, glucoză sau zaharoză) și alte enzime interferente. Se depozitează la aproximativ 4 °C. Se pot folosi alternativ alte surse de alfa-amilază care duc la o soluție finală cu o activitate enzimatică comparabilă.

([1]) JO L 172, 5.7.2005, p. 24.
([2]) JO L 249, 18.9.2008, p. 9.

4.7. Amiloglucozidază (1,4-alfa-D-glucan glucohidrolază) din *Aspergillus niger*, pulbere cu o activitate de aproximativ 120 U/mg sau aproximativ 70 U/mg (1U va elibera 1 micromol de glucoză din amidon pe minut la pH 4,8 și 60 °C). Această enzimă poate conține o cantitate redusă de impurități (de exemplu, glucoză sau zaharoză) și alte enzime interferente (de exemplu, invertază). Se depozitează la aproximativ 4 °C. Se pot folosi alternativ alte surse de amiloglucozidază care duc la o soluție finală cu o activitate enzimatică comparabilă.

4.8. Acetat de zinc dihidrat, p.a.

4.9. Hexacianoferat de potasiu (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), extra pur.

4.10. Acetat de sodiu anhidru, p.a.

4.11. Acid acetic glacial, 96 % (v/v) (minimum).

4.12. Tampon de acetat de sodiu (0,2 moli/l). Se cântăresc 16,4 grame de acetat de sodiu (punctul 4.10) într-un pahar Berzelius. Se dizolvă în apă și se clătește într-un balon gradat de 1 000 ml. Se diluează cu apă până la gradație și se ajustează pH-ul la 4,7 cu acid acetic [folosind un pH-metru (punctul 5.7)]. Această soluție poate fi folosită maximum 6 luni dacă este păstrată la 4 °C.

4.13. Soluție de amiloglucozidază. Preparați o soluție din pulbere de amiloglucozidază (punctul 4.7) folosind tamponul de acetat de sodiu (punctul 4.12). Activitatea enzimatică trebuie să fie suficientă și în conformitate cu conținutul de amidon în cantitatea de eșantion [de exemplu, se obține o activitate de aproximativ 600 U/ml din 0,5 g pulbere de amiloglucozidază 120 U/mg (punctul 4.7) într-un volum final de 100 ml pentru 1 g de amidon în cantitatea de eșantion]. Preparați imediat înainte de utilizare.

4.14. Soluții de referință. Preparați soluții de glucoză, fructoză, zaharoză, maltoză și lactoză în apă, astfel cum sunt folosite convențional în analiza HPLC a zaharurilor.

4.15. Reactiv de clarificare (Carrez I). Dizolvați 219,5 grame de acetat de zinc (punctul 4.8) în apă într-un pahar Berzelius. Clătiți într-un balon gradat de 1 000 ml și adăugați 30 ml acid acetic (punctul 4.11). Amestecați bine și diluați cu apă până la gradație. Această soluție se poate folosi maximum 6 luni dacă este păstrată la temperatura camerei. Pot fi folosiți și alți reactivi de clarificare echivalenți cu soluția Carrez.

4.16. Reactiv de clarificare (Carrez II). Dizolvați 106,0 grame de hexacianoferat de potasiu (II) (punctul 4.9) în apă într-un pahar Berzelius. Clătiți într-un balon gradat de 1 000 ml. Amestecați bine și diluați cu apă până la gradație. Această soluție se poate folosi maximum 6 luni dacă este păstrată la temperatura camerei. Pot fi folosiți și alți reactivi de clarificare echivalenți cu soluția Carrez.

4.17. Faza mobilă HPLC. Preparați o fază mobilă care se folosește convențional în analiza HPLC a zaharurilor. În cazul în care se folosește, de exemplu, o coloană de silicagel aminopropil, o fază mobilă comună este un amestec de apă de puritate HPLC și acetonitril.

5. **Aparatură**

5.1. Vase obișnuite de laborator.

5.2. Filtre cutate, de exemplu, 185 mm.

5.3. Filtre cu seringă, 0,45 µm, adecvate pentru soluții apoase.

5.4. Fiole pentru probă adecvate pentru dispozitivul HPLC de prelevare automată a probelor.

5.5. Baloane gradate de 100 ml.

5.6. Seringi de plastic, 10 ml.

5.7. pH-metru.

5.8. Balanță analitică.

5.9. Baie de apă cu termostat, ajustabil la 60 °C și 90 °C.

5.10. Aparatură HPLC adecvată pentru analiza zaharurilor.

6. **Procedură**

6.1. *Prepararea eșantionului pentru mai multe tipuri de produse*

Se omogenizează produsul.

6.2. *Porția de probă*

Cantitatea de probă este estimată pornind de la declararea ingredientelor și a condițiilor analizei HPLC (concentrația soluției de referință de glucoză) și nu depășește:

$$\text{cantitatea de eșantion (g)} = \frac{\text{volumul balonului gradat (de exemplu, 100 ml)}}{\text{conținutul estimat de amidon (\%)}}$$

Se cântărește eșantionul cu precizia de 0,1 mg.

6.3. *Determinare martor*

Martorul este determinat prin efectuarea unei analize complete (conform descrierii de la punctul 6.4), fără adăugarea eșantionului. Rezultatul determinării martor este folosit la calcularea conținutului de amidon (punctul 7.2).

6.4. *Analiza*

6.4.1. Prepararea eșantioanelor

Omogenizați eșantionul prin scuturare sau agitare. Porția aleasă pentru probă (punctul 6.2) se cântărește într-un balon gradat (punctul 5.5) și se adaugă aproximativ 70 ml de apă caldă.

După dizolvare sau suspensie, adăugați 50 microlitri de alfa-amilază termostabilă (punctul 4.6) și încălziți la 90 °C timp de 30 de minute într-o baie de apă (punctul 5.9). Răciți cât mai repede posibil la 60 °C într-o baie de apă și adăugați 5 ml dintr-o soluție de amiloglucozidază (punctul 4.13). Pentru eșantioanele care ar putea influența pH-ul soluției de reacție, controlați pH-ul și ajustați-l la 4,6-4,8, dacă este necesar. Lăsați să reacționeze timp de 60 de minute la 60 °C. Răciți eșantioanele până la temperatura camerei.

6.4.2. Clarificarea

Pentru eșantioanele cu un conținut ridicat de proteine sau de grăsime, clarificarea este necesară adăugând 1 ml de Carrez I (punctul 4.15) la soluția eșantionului. După agitare, se adaugă 1 ml de Carrez II (punctul 4.16). Agitați eșantionul din nou.

6.4.3. Prelucrarea pentru analiza HPLC

Eșantionul din balonul gradat se diluează cu apă până la gradație, se omogenizează și se filtrează printr-un filtru cutat (punctul 5.2). Colectați extractul de eșantion.

Filtrați extractele printr-un filtru cu seringă (punctul 5.3) cu o seringă (punctul 5.6) care a fost clătită în prealabil cu extract. Colectați filtratele în fiole (punctul 5.4).

6.5. *Cromatografia*

HPLC se efectuează convențional pentru analiza zaharurilor. Dacă la analiza HPLC se detectează urme de maltoză, atunci amidonul este convertit incomplet, ceea ce are drept rezultat o recuperare prea redusă pentru glucoză.

7. **Calcularea și exprimarea rezultatelor**

7.1. *Calcularea rezultatelor HPLC*

Pentru calcularea conținutului de amidon, sunt necesare rezultatele a două analize HPLC, și anume zaharurile prezente în eșantion înainte (denumite în continuare «zaharuri libere») și după tratamentul enzimatic (astfel cum este descris în această metodă). De asemenea, trebuie efectuată o determinare martor pentru a se putea corecta zaharurile prezente în enzime.

În analiza HPLC, suprafața vârfului se determină după integrare, concentrația calculându-se după calibrarea cu soluțiile de referință (punctul 4.14). Din concentrația de glucoză (g/100 ml) după tratamentul enzimatic se scade concentrația de glucoză (g/100 ml) din determinarea martor. În cele din urmă, conținutul (g de zahăr/100 g de eșantion) de zaharuri se calculează utilizând cantitatea de eșantion cântărită, ceea ce are drept rezultat:

1. analiza HPLC înainte de tratamentul enzimatic, furnizând conținutul (g/100 g) de zaharuri libere:

   — glucoză G

   — fructoză F

   — zaharoză S

2. analiza HPLC după tratamentul enzimatic, furnizând conținutul (g/100 g) de zaharuri:

   — glucoză după corectarea pentru determinarea martor ($G_{e\ cor}$)

   — fructoză F_e

   — zaharoză S_e

7.2. *Calcularea conținutului de amidon*

7.2.1. Calcularea glucozei totale «Z»

În cazul în care cantitatea de fructoză după tratamentul enzimatic (F_e) este mai ridicată decât cantitatea de fructoză înainte de tratamentul enzimatic (F), atunci zaharoza, prezentă în eșantion, este convertită parțial în fructoză și glucoză. Aceasta înseamnă că se efectuează o corecție pentru glucoza eliberată (F_e – F).

Z, conținut final de glucoză după corectare în g/100 g:

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

7.2.2. Calcularea conținutului total de glucoză exprimat ca amidon

E, conținut de «amidon» în g/100 g:

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

8. **Precizie**

Detaliile unui test între laboratoare privind precizia metodei aplicate asupra 2 eșantioane sunt rezumate la acest punct. Acestea reflectă cerințele de performanță pentru metoda descrisă în prezenta anexă.

Rezultatele unui test între laboratoare (cu caracter informativ)

În 2008, s-a efectuat un test între laboratoare cu participarea laboratoarelor vamale europene.

Evaluarea datelor referitoare la precizie s-a realizat în conformitate cu «Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies», W. Horwitz, (raportul tehnic al IUPAC), Pure & Appl. Chem., Vol. 67, Nº 2, PP.331-343, 1995.

Datele referitoare la precizie sunt prezentate în tabelul următor.

Probe **1 : baton de ciocolată cu biscuit** **2 : biscuit**	**Z** **proba 1**	**Z** **proba 2**
Număr de laboratoare	41	42
Număr de laboratoare după eliminarea valorilor aberante	38	39
Media (%, m/m)	29,8	55,0
Deviația standard sr a repetabilității (%, m/m)	0,5	0,5
Deviația standard sR a reproductibilității (%, m/m)	1,5	2,3
Limita de repetabilitate r (%, m/m)	1,4	1,4
Limita de reproductibilitate R (%, m/m)	4,2	6,6”