NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 118/2010

z 9. februára 2010,

ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie Komisie (ES) č. 900/2008, ktorým sa ustanovujú metódy analýzy a iné technické ustanovenia nevyhnutné na vykonávanie dovozného režimu pre niektoré tovary vznikajúce spracovaním poľnohospodárskych výrobkov

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Rady (EHS) č. 2658/87 z 23. júla 1987 o colnej a štatistickej nomenklatúre a o Spoločnom colnom sadzobníku ([1]), a najmä na jeho článok 9,

keďže:

(1) V nariadení Komisie (ES) č. 900/2008 ([2]) sa ustanovujú vzorce, postupy a metódy, ktoré sa použijú na stanovenie obsahu škrobu/glukózy na účely uplatňovania príloh II a III k nariadeniu Komisie (ES) č. 1460/96 z 25. júla 1996 ustanovujúcemu podrobné pravidlá vykonávania preferenčných obchodných opatrení, ktoré sa uplatňujú na určitý tovar vznikajúci spracovaním poľnohospodárskych výrobkov, ako je stanovené v článku 7 nariadenia Rady (ES) č. 3448/93 ([3]).

(2) Nariadenie (ES) č. 900/2008 preskúmala skupina expertov s cieľom posúdiť, či nariadenie zohľadňuje vedecký a technologický vývoj metód v ňom ustanovených. Zo štúdií a analýz vykonaných v rámci tohto preskúmania vyplýva, že stanovenie obsahu škrobu/glukózy rozpustením pomocou hydroxidu sodného (pred enzymatickým rozkladom na glukózu) a meranie celkového obsahu glukózy pomocou enzymatickej metódy so spektrofotometriou, v súčasnosti predpísané pre väčšinu tovaru, už nespĺňajú súčasné technické požiadavky a preto ich treba aktualizovať.

(3) Z tohto dôvodu je vhodné zabezpečiť, aby sa rozklad škrobu/glukózy vykonal enzymaticky pomocou amylázy a amyloglukozidázy a aby sa celkový obsah glukózy stanovil vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) a spresniť, akým spôsobom enzymatickú metódu používať.

(4) Nariadenie (ES) č. 900/2009 by sa preto malo zodpovedajúcim spôsobom zmeniť a doplniť.

(5) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Výboru pre colný kódex,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Príloha I k nariadeniu (ES) č. 900/2008 sa nahrádza prílohou k tomuto nariadeniu.

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť dvadsiatym dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 9. februára 2010

Za Komisiu

predseda

José Manuel BARROSO

([1]) Ú. v. ES L 256, 7.9.1987, s. 1.
([2]) Ú. v. EÚ L 248, 17.9.2008, s. 8.
([3]) Ú. v. ES L 187, 26.7.1996, s. 18.

PRÍLOHA

„PRÍLOHA I

Enzymatické stanovenie škrobu a produktov jeho rozkladu vrátane glukózy v potravinách pomocou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC)

1. **Účel a oblasť použitia**

Táto metóda opisuje stanovenie obsahu škrobu a produktov jeho rozkladu vrátane glukózy (ďalej len ako „škrob“) v potravinách na ľudskú spotrebu. Obsah škrobu sa stanoví kvantitatívnou analýzou glukózy vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou po enzymatickej premene škrobu a produktov jeho rozkladu na glukózu.

2. **Vymedzenie celkového obsahu glukózy a celkového obsahu glukózy vyjadreného ako škrob**

Celkový obsah glukózy znamená hodnotu Z vypočítanú podľa bodu 7.2.1 tejto prílohy. Predstavuje obsah škrobu a všetkých jeho produktov rozkladu vrátane glukózy.

Obsah škrobu/glukózy definovaný v prílohe III k nariadeniu (ES) č. 1460/96 sa vypočíta na základe celkového obsahu glukózy Z a podľa článku 2 bodu 1 tohto nariadenia.

Obsah škrobu (alebo dextrínu) uvedený v stĺpci 3 prílohy IV k nariadeniu Komisie (ES) č. 1043/2005 ([1]) sa vypočíta na základe celkového obsahu glukózy Z podľa článku 2 bodu 2.1 nariadenia Komisie (ES) č. 904/2008 ([2]).

Obsah škrobu uvedený v bode 1 tejto prílohy znamená hodnotu E, vypočítanú podľa bodu 7.2.2 tejto prílohy. Je vyjadrený v % (m/m). Je zhodný s celkovým obsahom glukózy Z, vyjadreným ako škrob. Táto hodnota E nie je v rozpore s vyššie uvedenými výpočtami.

3. **Princíp**

Vzorky sa homogenizujú a rozpustia vo vode. Škrob a produkty jeho rozkladu prítomné vo vzorkách sa enzymaticky premenia na glukózu v dvoch krokoch:

1. Škrob a produkty jeho rozkladu sa čiastočne premenia na rozpustné reťazce glukózy pomocou termostabilnej alfa-amylázy pri teplote 90 °C. Pre účinnú premenu je nevyhnutné, aby boli vzorky úplne rozpustené alebo aby boli vo forme suspenzie s veľmi malými pevnými časticami.

2. Rozpustné reťazce glukózy sa premenia na glukózu pomocou amyloglukozidázy pri teplote 60 °C.

Výrobky obsahujúce vysoký obsah proteínov alebo tuku sa vyčíria a prefiltrujú.

Stanovenie cukrov sa vykoná HPLC analýzou.

Keďže počas enzymatickej úpravy môže dôjsť k čiastočnej inverzii sacharózy, stanovenie voľných cukrov sa takisto vykoná HPLC analýzou, aby sa vypočítal upravený obsah glukózy.

4. **Činidlá a ďalšie materiály**

Používajte činidlá uznaných analytických tried čistoty a demineralizovanú vodu.

4.1. Glukóza, min. 99 %.

4.2. Fruktóza, min. 99 %.

4.3. Sacharóza, min. 99 %.

4.4. Maltóza, monohydrát, min. 99 %.

4.5. Laktóza, monohydrát, min. 99 %.

4.6. Roztok termostabilnej alfa-amylázy (1,4-alfa-D-glukán-glukanohydroláza) s aktivitou asi 31 000 U/ml (1U uvoľní 1,0 mg maltózy zo škrobu za 3 minúty pri pH 6,9 a teplote 20 °C). Tento enzým môže obsahovať malé množstvo nečistôt (napr. glukózy alebo sacharózy) a iných interferujúcich enzýmov. Skladujte pri teplote približne 4 °C. Je možné použiť aj iné zdroje alfa-amylázy, ak bude konečný roztok s porovnateľnou aktivitou enzýmu.

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

4.7. Amyloglukozidázy (1,4-alfa-D-glukán-glukohydroláza) z Aspergillus niger, prášok s aktivitou približne 120 U/mg alebo približne 70 U/mg (1 U uvoľní 1 mikromol glukózy zo škrobu za minútu pri pH 4,8 a teplote 60 °C). Tento enzým môže obsahovať malé množstvo nečistôt (napr. glukózy alebo sacharózy) a iných interferujúcich enzýmov (napr. invertázy). Skladujte pri teplote asi 4 °C. Je možné použiť aj iné zdroje glukoamylázy, ak bude konečný roztok s porovnateľnou aktivitou enzýmu.

4.8. Dihydrát octanu zinočnatého, p.a.

4.9. Hexakyanoželeznatan draselný (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), extra čistý.

4.10. Octan sodný bezvodý, p.a.

4.11. Ľadová kyselina octová, 96 % (v/v).

4.12. Tlmivý roztok octanu sodného (0,2 mol/l). Do sklenenej kadičky odvážte 16,4 gramu octanu sodného (bod 4.10). Rozpustite vo vode a vlejte do odmernej banky s obsahom 1 000 ml. Doplňte po značku vodou a kyselinou octovou upravte pH na 4.7 použitím pH-metra (5.7). Tento roztok sa môže používať maximálne 6 mesiacov, ak sa skladuje pri teplote 4 °C.

4.13. Roztok amyloglukozidázy. Pripravte roztok z amyloglukozidázy vo forme prášku (bod 4.7) pomocou tlmivého roztoku octanu sodného (bod 4.12). Aktivita enzýmu musí byť dostatočná a musí zodpovedať obsahu škrobu v množstve vzorky (napríklad, aktivita približne 600 U/ml sa dosiahne použitím 0,5 g amyloglukozidázy vo forme prášku s aktivitou 120 U/mg (bod 4.7) v konečnom objeme 100 ml na 1 g škrobu v množstve vzorky). Roztok pripravte okamžite pred použitím.

4.14. Referenčné roztoky. Pripravte roztoky glukózy, fruktózy, sacharózy, maltózy a laktózy vo vode tak, ako sa bežne používajú pri analýzach cukrov metódou HPLC.

4.15. Činidlo na čírenie (Carrezovo činidlo I). V sklenenej kadičke rozpustite 219,5 gramu octanu zinočnatého (bod 4.8) vo vode. Vlejte do odmernej banky s obsahom 1 000 ml a pridajte 30 ml kyseliny octovej (bod 4.11). Dôkladne premiešajte a doplňte po značku vodou. Tento roztok sa môže používať maximálne 6 mesiacov, ak sa skladuje pri laboratórnej teplote. Na čírenie sa môžu použiť aj iné činidlá rovnocenné s Carrezovým.

4.16. Činidlo na čírenie (Carrezovo činidlo II). V sklenej kadičke rozpustite 106,0 gramov hexakyanoželeznatanu draselného (II) (bod 4.9) vo vode. Vlejte do odmernej banky s obsahom 1 000 ml. Dôkladne premiešajte a doplňte po značku vodou. Tento roztok sa môže používať maximálne 6 mesiacov, ak sa skladuje pri laboratórnej teplote. Na čírenie sa môžu použiť aj iné činidlá rovnocenné s Carrezovým.

4.17. Mobilná fáza HPLC. Pripravte mobilnú fázu, ktorá sa bežne používa pri analýzach cukru metódou HPLC. V prípade použitia aminopropylovej silikagélovej kolóny je obvykle mobilnou fázou napr. zmes vody čistoty HPLC a acetonitrilu.

5. **Zariadenie**

5.1. Bežné laboratórne sklo.

5.2. Skladané filtre, napríklad 185 mm.

5.3. Injekčné filtre, 0,45 µm, vhodné pre vodné roztoky.

5.4. Vzorkovacie ampulky vhodné pre HPLC automatický dávkovač vzoriek.

5.5. 100 ml odmerné banky.

5.6. Plastové injekčné striekačky, 10 ml.

5.7. pH-meter.

5.8. Analytické váhy.

5.9. Vodný kúpeľ s termostatom, s nastaviteľnou teplotou na 60 °C a 90 °C.

5.10. Zariadenie na HPLC vhodné na analýzu cukrov.

6. **Postup**

6.1. *Príprava vzorky pre niekoľko typov výrobkov*

Výrobok sa homogenizuje.

6.2. *Dávka vzorky*

Množstvo vzorky sa odhadne z deklarovaného zloženia a podmienok analýzy HPLC (koncentrácia referenčného roztoku glukózy) a nepresiahne:

$$\text{množstvo vzorky (g)} = \frac{\text{objem odmernej banky (napr. 100 ml)}}{\text{odhadnutý obsah škrobu (\%)}}$$

Vzorku odvážte s presnosťou na 0,1 mg.

6.3. *Slepý pokus*

Slepý pokus sa vykoná pomocou úplnej analýzy (ako je opísaná v bode 6.4), bez pridania vzorky. Výsledok slepého pokusu sa použije pri výpočte obsahu škrobu (bod 7.2).

6.4. *Analýza*

6.4.1. Príprava vzoriek

Vzorka sa homogenizuje trepaním alebo miešaním. Vybranú skúšobnú dávku (bod 6.2) navážte do odmernej banky (bod 5.5) a pridajte približne 70 ml teplej vody.

Po rozpustení alebo vytvorení suspenzie, pridajte 50 mikrolitrov termostabilnej alfa-amylázy (bod 4.6) a zahrievajte 30 minút vo vodnom kúpeli pri teplote 90 °C (bod 5.9). Ochlaďte čo najrýchlejšie na teplotu 60 °C vo vodnom kúpeli a pridajte 5 ml roztoku amyloglukozidázy (bod 4.13). Pri vzorkách, ktoré by mohli ovplyvniť pH reakčného roztoku skontrolujte pH a v prípade potreby upravte na 4,6 až 4,8. Nechajte reagovať 60 minút pri teplote 60 °C. Vzorky sa schlaďte na laboratórnu teplotu.

6.4.2. Čírenie

Vzorky s vysokým obsahom bielkovín alebo tuku je potrebné vyčíriť pridaním 1 ml Carrezovho činidla I (bod 4.15) do roztoku vzorky. Po pretrepaní pridajte 1 ml Carrezovho činidla II (bod 4.16). Vzorku opäť pretrepte.

6.4.3. Spracovanie pre analýzu HPLC

Vzorka v odmernej banke sa zriedi po značku vodou, homogenizuje a prefiltruje cez skladaný filter (bod 5.2). Odoberte extrakt vzorky.

Prefiltrujte extrakty cez injekčný filter (bod 5.3) injekčnou striekačkou (bod 5.6), ktorá bola prepláchnutá extraktom. Odoberte filtráty do ampuliek (bod 5.4).

6.5. *Chromatografia*

HPLC sa vykonáva spôsobom obvyklým pre analýzu cukrov. Ak HPLC analýza ukazuje stopy maltózy, premena škrobu nie je kompletná a výsledkom je príliš nízka výťažnosť glukózy.

7. **Výpočty a vyjadrenie výsledkov**

7.1. *Výpočet výsledkov HPLC*

Na výpočet obsahu škrobu sú potrebné výsledky dvoch HPLC analýz, t. j. cukrov prítomných vo vzorke pred enzymatickou úpravou („voľných cukrov“) a po enzymatickej úprave (ako je opísané v tejto metóde). Je potrebné vykonať aj slepý pokus, aby bolo možné vykonať úpravu pokiaľ ide o cukry prítomné v enzýmoch.

Pri HPLC analýze sa plocha píku stanoví po integrácii a koncentrácia sa vypočíta po kalibrácii s referenčnými roztokmi (bod 4.14). Z koncentrácie glukózy (g/100 ml) po enzymatickej úprave sa odčíta koncentrácia glukózy (g/100 ml) zistená pri slepom pokuse. Nakoniec sa vypočíta obsah cukru (g cukru/100 g vzorky) pomocou naváženého množstva vzorky a výsledkom je:

1. HPLC analýza pred enzymatickou úpravou udáva obsah voľných cukrov (g/100 g):

   — glukóza G,

   — fruktóza F,

   — sacharóza S.

2. HPLC analýza po enzymatickej úprave udáva obsah cukrov (g/100 g):

   — glukóza po úprave o výsledok slepého pokusu ($G_{e\ cor}$),

   — fruktóza F_e,

   — sacharóza S_e.

7.2. *Výpočet obsahu škrobu*

7.2.1. Výpočet celkovej glukózy ‚Z'

Ak je obsah fruktózy po enzymatickej úprave (F_e) vyšší ako obsah fruktózy pred enzymatickou úpravou (F), znamená to, že sacharóza prítomná vo vzorke sa čiastočne premenila na fruktózu a glukózu. To znamená, že sa vykoná úprava pre uvoľnenú glukózu ($F_e - F$).

Z, konečný obsah glukózy po úprave v g/100 g:

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

7.2.2. Výpočet celkového obsahu glukózy vyjadreného ako škrob

E, obsah ‚škrobu' v g/100 g:

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

8. **Presnosť**

V tomto bode sú uvedené podrobnosti medzilaboratórnej skúšky týkajúcej sa údajov o presnosti metódy vykonanej na 2 vzorkách. Vzorky odrážajú požiadavky na účinnosť metódy opísané v tejto prílohe.

Výsledky medzilaboratórnej skúšky (informatívne)

Európske colné laboratóriá sa zúčastnili na vykonaní medzilaboratórnej skúšky v roku 2008.

Hodnotenie údajov o presnosti bolo vykonané podľa ‚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.

Údaje o presnosti sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

Vzorky **1 : čokoládová tyčinka so sušienkou** **2 : sušienka**	**Z** **vzorka 1**	**Z** **vzorka 2**
Počet laboratórií:	41	42
Počet laboratórií po eliminácii odľahlých hodnôt	38	39
Priemer (%, m/m)	29,8	55,0
Smerodajná odchýlka opakovateľnosti sr (%, m/m)	0,5	0,5
Smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti sR (%, m/m)	1,5	2,3
Limit opakovateľnosti r (%, m/m)	1,4	1,4
Limit reprodukovateľnosti R (%, m/m)	4,2	6,6“