UREDBA KOMISIJE (EU) št. 118/2010

z dne 9. februarja 2010

o spremembi Uredbe (ES) št. 900/2008 o določitvi analiznih metod in drugih tehničnih določb, potrebnih za izvajanje uvoznih režimov za nekatero blago, pridobljeno s predelavo kmetijskih proizvodov

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Uredbe Sveta (EGS) št. 2658/87 z dne 23. julija 1987 o tarifni in statistični nomenklaturi ter skupni carinski tarifi [1] in zlasti člena 9 Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

(1) Uredba Komisije (ES) št. 900/2008 [2] določa formule, postopke in metode, ki se uporabljajo za določitev škroba/glukoze za izvajanje Prilog II in III k Uredbi Komisije (ES) št. 1460/96 z dne 25. julija 1996 o oblikovanju podrobnih pravil za izvajanje preferencialnih trgovinskih režimov, ki se uporabljajo za nekatero blago, ki je rezultat predelave kmetijskih proizvodov, kakor je določeno v členu 7 Uredbe Sveta (ES) št. 3448/93 [3].

(2) Uredbo (ES) št. 900/2008 je preučila skupina strokovnjakov, da bi ocenila, če navedena uredba upošteva znanstveni in tehnološki razvoj metod, ki jih določa. Študije in preskusi, ki so bili izvedeni v okviru navedene preiskave, kažejo, da določanje vsebnosti škroba/glukoze z raztapljanjem z natrijevim hidroksidom (pred encimsko razgradnjo v glukozo) in merjenje celotne vsebnosti glukoze z uporabo encimske metode s spektrofotometrijo, kakor je zdaj predpisano za večino blaga, ne ustrezata več sedanjim tehničnim zahtevam in ju je treba zato posodobiti.

(3) Zato je primerno določiti, da je treba razgradnjo škroba/glukoze izvajati na encimski način z amilazo in amilazo glukozidazo in celotno vsebnost glukoze določati z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), ter opredeliti, kako naj se encimska metoda izvaja.

(4) Uredbo (ES) št. 900/2008 je zato treba ustrezno spremeniti.

(5) Ukrepi, predvideni s to uredbo, so v skladu z mnenjem Odbora za carinski zakonik –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

Priloga I k Uredbi (ES) št. 900/2008 se nadomesti z besedilom iz Priloge k tej uredbi.

Člen 2

Ta uredba začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 9. februarja 2010

Za Komisijo

Predsednik

José Manuel BARROSO

---

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

PRILOGA

„PRILOGA I

Encimsko določanje škroba in produktov njegove razgradnje, vključno z glukozo, v prehrambenih proizvodih z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)

1. **Področje uporabe**

Ta metoda opisuje določanje vsebnosti škroba in produktov njegove razgradnje, vključno z glukozo, v proizvodih za prehrano ljudi (v nadaljnjem besedilu: škrob). Vsebnost škroba se določa z uporabo kvantitativne analize glukoze s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) po encimski pretvorbi škroba in produktov njegove razgradnje v glukozo.

2. **Opredelitev celotne vsebnosti glukoze in celotne vsebnosti glukoze, izražene s škrobom**

Celotna vsebnost glukoze pomeni vrednost Z, kot je izračunana v točki 7.2.1 te priloge. Predstavlja vsebnost škroba in vseh produktov njegove razgradnje, vključno z glukozo.

Vsebnost škroba/glukoze, kot je opredeljena v Prilogi III k Uredbi (ES) št. 1460/96, se izračuna na podlagi celotne vsebnosti glukoze Z in v skladu z opredelitvijo iz člena 2(1) te uredbe.

Vsebnost škroba (ali dekstrina), kot je opredeljena v stolpcu 3 Priloge IV k Uredbi Komisije (ES) št. 1043/2005 ([1]), se izračuna na podlagi celotne vsebnosti glukoze Z v skladu z opredelitvijo iz točke 2.1 člena 2 Uredbe Komisije (ES) št. 904/2008 ([2]).

Vsebnost škroba iz točke 1 te priloge pomeni vrednost E, kot je izračunana v točki 7.2.2 te priloge. Izražena je v % (m/m) in enaka celotni vsebnosti glukoze Z, izražene s škrobom. Ta vrednost E ni v nasprotju z zgoraj omenjenimi izračuni.

3. **Princip**

Vzorci se homogenizirajo in dispergirajo v vodi. Škrob in produkti njegove razgradnje, prisotni v vzorcih, se encimsko pretvorijo v glukozo v dveh korakih:

1. Škrob in produkti njegove razgradnje se delno pretvorijo v topne glukozne verige z uporabo termostabilne alfa-amilaze pri 90 °C. Za učinkovito pretvorbo morajo biti vzorci popolnoma raztopljeni ali v obliki suspenzije z zelo malimi trdnimi delci.

2. Topne glukozne verige se pretvorijo v glukozo z uporabo amilaze glukozidaze pri 60 °C.

Proizvodi z visoko vsebnostjo beljakovin ali maščob se zbistrijo in prefiltrirajo.

Določanje sladkorjev se izvaja z analizo HPLC.

Ker lahko med encimsko obdelavo pride do delne inverzije saharoze, se določanje prostih sladkorjev izvaja prav tako z analizo HPLC, da se izračuna pravilna vsebnost glukoze.

4. **Reagenti in druge snovi**

Uporabijo se reagenti s priznano analitsko čistostjo in demineralizirana voda.

4.1 Glukoza, vsaj 99 %.

4.2 Fruktoza, vsaj 99 %.

4.3 Saharoza, vsaj 99 %.

4.4 Monohidrat maltoze, vsaj 99 %.

4.5 Monohidrat laktoze, vsaj 99 %.

4.6 Raztopina termostabilne alfa-amilaze (1,4-alfa-D-glukan-glukanohidrolaza) z aktivnostjo približno 31 000 U/ml (1 U bo sprostil 1,0 mg maltoze iz škroba v 3 minutah pri pH 6,9 in 20 °C). Ta encim lahko vsebuje majhno količino nečistoč (npr. glukoze ali saharoze) in drugih motečih encimov. Shranjevanje pri okoli 4 °C. Uporabijo se lahko tudi drugi viri alfa-alimaze za končno raztopino s primerljivo encimsko aktivnostjo.

([1]) UL L 172, 5.7.2005, str. 24.
([2]) UL L 249, 18.9.2008, str. 9.

4.7 Amiloglukozidaza (1,4-alfa-D-glukan glukohidrolaza) iz Aspergillus niger, prašek z aktivnostjo približno 120 U/mg ali približno 70 U/mg (1 U bo sprostil 1 mikromol glukoze iz škroba na minuto pri pH 4,8 in 60 °C). Ta encim lahko vsebuje majhno količino nečistoč (npr. glukoze ali saharoze) in drugih motečih encimov (npr. invertaze). Shranjevanje pri okoli 4 °C. Uporabijo se lahko tudi drugi viri amiloglukozidaze za končno raztopino s primerljivo encimsko aktivnostjo.

4.8 Cinkov acetat dihidrat, p.a.

4.9 Kalijev heksacianoferat (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), posebno čist.

4.10 Natrijev acetat, brezvodni, p.a.

4.11 Ledocetna kislina, 96 % (v/v) (najmanj).

4.12 Natrijev acetat, pufer (0,2 mol/l). V čašo se natehta 16,4 grama natrijevega acetata (točka 4.10). Raztopi se v vodi in nato izpere v 1 000-mililitrsko merilno bučko. Razredči se z vodo do oznake; pH se uravna z ocetno kislino na 4,7 (z uporabo pH-metra (točka 5.7)). Ta raztopina se lahko uporablja največ šest mesecev in se hrani pri 4 °C.

4.13 Raztopina amiloglukozidaze. Pripravi se raztopina amiloglukozidaze v prahu (točka 4.7) z uporabo pufra natrijevega acetata (točka 4.12). Encimska aktivnost mora biti zadostna in v skladu z vsebnostjo škroba v količini vzorca (npr. aktivnost približno 600 U/ml se dobi iz 0,5 g praška amiloglukozidaze 120 U/mg (točka 4.7) v končni prostornini 100 ml za 1 g škroba v količini vzorca). Pripravi se za takojšnjo uporabo.

4.14 Referenčne raztopine. Pripravijo se vodne raztopine glukoze, fruktoze, saharoze, maltoze in laktoze, ki se praviloma uporabljajo v analizi sladkorjev HPLC.

4.15 Reagent za bistrenje (carrez I). V čaši se v vodi raztopi 219,5 grama cinkovega acetata (točka 4.8). Spere se v 1 000-mililitrsko merilno bučko in doda 30 ml ocetne kisline (točka 4.11). Temeljito se zmeša in razredči z vodo do oznake. Ta raztopina se lahko uporablja največ šest mesecev in se hrani pri sobni temperaturi. Za bistrenje se lahko uporabijo drugi reagenti, enakovredni raztopini carrez.

4.16 Reagent za bistrenje (carrez II). V čaši se v vodi raztopi 106,0 grama kalijevega heksacianoferata (II) (točka 4.9). Spere se v 1 000-mililitrsko merilno bučko. Temeljito se zmeša in razredči z vodo do oznake. Ta raztopina se lahko uporablja največ šest mesecev in se hrani pri sobni temperaturi. Za bistrenje se lahko uporabijo drugi reagenti, enakovredni raztopini carrez.

4.17 Mobilna faza HPLC. Pripravi se mobilna faza, ki se praviloma uporablja v analizi sladkorjev HPLC. Pri uporabi aminopropil silikagel kolone je npr. običajna mobilna faza zmes vode, primerne za HPLC, in acetonitrila.

5. **Oprema**

5.1 Standardne laboratorijske steklene posode.

5.2 Nagubani filtri, npr. 185 mm.

5.3 Filtri za brizgalke, 0,45 µm, primerni za vodne raztopine.

5.4 Stekleničke za vzorce, primerne za avtomatski vzorčevalnik HPLC.

5.5 Merilne bučke, 100 ml.

5.6 Plastične brizgalke, 10 ml.

5.7 pH-meter.

5.8 Analitska tehtnica.

5.9 Vodna kopel s termostatom, nastavljivim na 60 °C in 90 °C.

5.10 Oprema HPLC, primerna za analizo sladkorjev.

6. **Postopek**

6.1 *Priprava vzorca za več vrst proizvodov*

Proizvod se homogenizira.

6.2 *Količina vzorca*

Količina vzorca se oceni na podlagi navedbe sestavin in pogojev za analizo HPLC (koncentracija referenčne raztopine z glukozo) in ne presega:

$$\text{količina vzorca (g)} = \frac{\text{prostornina merilne bučke (npr. 100 ml)}}{\text{ocenjena vsebnost škroba (\%)}}$$

Vzorec se natehta z natančnostjo 0,1 mg.

6.3 *Slepi preskus*

Za slepi preskus se izvede popolna analiza (kakor je opisana v točki 6.4) brez dodajanja vzorca. Rezultat slepega preskusa se uporabi za izračun vsebnosti škroba (točka 7.2).

6.4 *Analiza*

6.4.1 Priprava vzorcev

Vzorec se homogenizira s stresanjem ali mešanjem. Izbrana količina za analizo (točka 6.2) se natehta v merilno bučko (točka 5.5), nato se doda približno 70 ml tople vode.

Po raztapljanju ali suspendiranju se doda 50 mikrolitrov termostabilne alfa-amilaze (točka 4.6) in 30 min segreva pri 90 °C, npr. v vodni kopeli (točka 5.9). V vodni kopeli se nato čim hitreje ohladi na 60 °C in doda 5 ml raztopine amiloglukozidaze (točka 4.13). Pri vzorcih, ki bi lahko vplivali na pH reakcijske raztopine, se pH nadzoruje in po potrebi prilagodi na 4,6 do 4,8. Pustimo reagirati 60 min pri 60 °C. Vzorci se ohladijo na sobno temperaturo.

6.4.2 Bistrenje

Vzorce z visoko vsebnostjo beljakovin ali maščob je treba zbistriti z dodajanjem 1 ml carrez I (točka 4.15) vzorčni raztopini. Po stresanju se doda 1 ml carrez II (točka 4.16). Vzorec se ponovno strese.

6.4.3 Postopek za analizo HPLC

Vzorec v merilni bučki se razredči z vodo do oznake, nato se homogenizira in prefiltrira skozi nagubani filter (točka 5.2). Zbere se ekstrakt vzorca.

Ekstrakti se z brizgalko (točka 5.6), predhodno sprano z ekstraktom, prefiltrirajo skozi filter za brizgalke (točka 5.3). Filtrati se zberejo v stekleničkah (točka 5.4).

6.5 *Kromatografija*

HPLC se izvede tako, kot se praviloma izvaja pri analizi sladkorjev. Če analiza HPLC pokaže sledove maltoze, je to znak nepopolne pretvorbe škroba, kar povzroči premalo pridobljene glukoze.

7. **Izračun in navajanje rezultatov**

7.1 *Izračun rezultatov HPLC*

Za izračun vsebnosti škroba so potrebni rezultati dveh analiz HPLC, in sicer prisotnosti sladkorjev v vzorcu pred („prosti sladkorji“) in po encimski obdelavi (kot je opisano za to metodo). Izvesti je treba tudi slepi preskus, da se lahko popravi rezultate za sladkorje, prisotne v encimih.

V analizi HPLC se površina vrha določi po integraciji, koncentracija pa se izračuna po umeritvi z referenčno raztopino (točka 4.14). Od koncentracije glukoze (g/100 ml) po encimski obdelavi se odšteje koncentracija glukoze (g/100 ml) v slepem poskusu. Vsebnost (g sladkorja/100 g vzorca) sladkorjev se nato izračuna z uporabo natehtanih količin vzorca, iz česar sledi:

1. analiza HPLC pred encimsko obdelavo, ki pokaže vsebnost (g/100 g) prostih sladkorjev:

   — glukoze G,

   — fruktoze F,

   — saharoze S.

2. analiza HPLC po encimski obdelavi, ki pokaže vsebnost (g/100 g) sladkorjev:

   — glukoze po popravku za slepi poskus ($G_{e\ cor}$),

   — fruktoze F_e,

   — saharoze S_e.

7.2 *Izračun vsebnosti škroba*

7.2.1 Izračun celotne glukoze ‚Z'

Če je količina fruktoze po encimski obdelavi (F_e) višja od količine fruktoze pred encimsko obdelavo (F), se saharoza, ki je prisotna v vzorcu, delno pretvori v fruktozo in glukozo. To pomeni, da je za glukozo, ki se sprosti, potreben popravek ($F_e - F$).

Z, končna vsebnosti glukoze po popravku, v g/100 g:

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

7.2.2 Izračun celotne vsebnosti glukoze, izražene s škrobom

E, vsebnost ‚škroba' v g/100 g:

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

8. **Natančnost**

V tej točki so navedene podrobnosti medlaboratorijskega preskusa glede podatkov o natančnosti metode, uporabljene na dveh vzorcih. Te podrobnosti odražajo zahteve glede izvajanja metode, opisane v tej prilogi.

Rezultati medlaboratorijskega preskusa (informativni podatki)

Medlaboratorijski preskus je bil opravljen leta 2008 v sodelovanju z evropskimi carinskimi laboratoriji.

Ocena podatkov o natančnosti je bila izvedena v skladu s Protokolom za načrtovanje, izvajanje in razlago študij izvajanja metode (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.

Podatki o natančnosti so zbrani v spodnji preglednici.

Vzorci **1 : čokoladni piškot v ploščici** **2 : piškot**	**Z** **vzorec 1**	**Z** **vzorec 2**
Število laboratorijev	41	42
Število laboratorijev po izločitvi odstopanj	38	39
Povprečna vsebnost (%, m/m)	29,8	55,0
Standardni odklon ponovljivosti sr (%, m/m)	0,5	0,5
Standardni odklon obnovljivosti sR (%, m/m)	1,5	2,3
Meja ponovljivosti r (%, m/m)	1,4	1,4
Meja obnovljivosti R (%, m/m)	4,2	6,6“