32010R0118

10.2.2010. SLUŽBENI LIST EUROPSKE UNIJE L 37/21

UREDBA KOMISIJE (EU) br. 118/2010

od 9. veljače 2010.

o izmjeni Uredbe (EZ) br. 900/2008 o utvrđivanju metoda analize i drugih tehničkih odredaba potrebnih za primjenu aranžmana za uvoz određene robe dobivene preradom poljoprivrednih proizvoda

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Uredbu Vijeća (EEZ) br. 2658/87 od 23. srpnja 1987. o tarifnoj i statističkoj nomenklaturi i o Zajedničkoj carinskoj tarifi ([1]), a posebno njezin članak 9.;

budući da:

(1) Uredba Komisije (EZ) br. 900/2008 ([2]) utvrđuje formule, postupke i metode koji se koriste za određivanje škroba/glukoze za primjenu priloga II. i III. Uredbi Komisije (EZ) br. 1460/96 od 25. srpnja 1996. o utvrđivanju detaljnih pravila za provedbu povlaštenih trgovinskih dogovora koji se odnose na određenu robu dobivenu preradom poljoprivrednih proizvoda, kako je predviđeno u članku 7. Uredbe Vijeća (EZ) br. 3448/93 ([3]).

(2) Uredbu (EZ) br. 900/2008 pregledala je skupina stručnjaka s ciljem ocjenjivanja uzima li navedena Uredba u obzir znanstvenu i tehnološku evoluciju metoda utvrđenih u toj Uredbi. Studije i testovi provedeni u okviru toga pregleda navode da određivanje sadržaja škroba/glukoze rastapanjem pomoću natrijevog hidroksida (prije enzimatske razgradnje u glukozu) i mjerenjem ukupnog sadržaja glukoze uporabom enzimatske metode sa spektrofotometrijom kako je sad propisano za većinu robe, više ne udovoljava tekućim tehničkim zahtjevima i stoga je treba ažurirati.

(3) Stoga je primjereno utvrditi da razgradnju škroba/glukoze treba izvršiti na enzimatski način amilazom i amiloglukozidazom i da ukupan sadržaj glukoze treba odrediti uporabom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) i odrediti kako treba izvesti enzimatsku metodu.

(4) Uredbu (EZ) br. 900/2008 treba stoga na odgovarajući način izmijeniti.

(5) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Odbora za Carinski zakonik,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Prilog I. Uredbi (EZ) br. 900/2008 zamjenjuje se tekstom određenim u Prilogu ovoj Uredbi.

Članak 2.

Ova Uredba stupa na snagu dvadesetog dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 9. veljače 2010.

Za Komisiju

Predsjednik

José Manuel BARROSO

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

PRILOG

„PRILOG I.

Enzimatsko određivanje škroba i njegovih produkata razgradnje, uključujući i glukozu, u prehrambenim proizvodima uporabom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC)

1. **Područje primjene**

Ova metoda opisuje određivanje sadržaja škroba i njegovih produkata razgradnje uključujući glukozu u prehrambenim proizvodima za prehranu ljudi, dalje u tekstu ‚škrob'. Sadržaj škroba određuje se iz kvantitativne analize glukoze visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) nakon nakon enzimatskog pretvaranja škroba i njegovih produkata razgradnje u glukozu.

2. **Određivanje ukupnog sadržaja glukoze i ukupnog sadržaja glukoze izražene kao škrob**

Ukupan sadržaj glukoze znači vrijednost Z kako je izračunano u točki 7.2.1. ovog Priloga predstavlja sadržaj škroba i svih njegovih produkata razgradnje, uključujući glukozu.

Sadržaja škroba/glukoze, kako je određeno u Prilogu III. Uredbi (EZ) br. 1460/96 izračunava se na temelju ukupnog sadržaja glukoze Z i kako je određeno u članku 2. točki 1. ove Uredbe.

Sadržaj škroba (ili dekstrina) kako je navedeno u stupcu 3. Priloga IV. Uredbi Komisije (EZ) br. 1043/2005 ([1]) izračunava se na temelju ukupnog sadržaja glukoze Z kako je određeno u članku 2. točki 2.1. Uredbe Komisije (EZ) br. 904/2008 ([2]).

Sadržaj škroba iz točke 1. ovog Priloga znači vrijednost E, kako je izračunano u točki točka 7.2.2. ovog Priloga. Izražen je u % (m/m). Jednak je ukupnom sadržaju glukoze Z, izražene kao škrob. Ova vrijednost E ne miješa se u gore navedene izračune.

3. **Načelo**

Uzorci se homogeniziraju i suspendiraju u vodi. Škrob i njegovi produkti razgradnje, prisutni u uzorcima, enzimatski se pretvaraju u glukozu u dva koraka:

1. Škrob i njegovi produkti razgradnje djelomično se pretvaraju u topive lance glukoze uporabom termostabilne alfa-amilaze pri 90 °C. Za učinkovitu pretvorbu neophodno je da uzorci trebaju biti u potpunosti otopljeni ili trebaju biti prisutni u obliku suspenzije koja sadrži vrlo male krute dijelove.

2. Topivi lanci glukoze pretvaraju se u glukozu uporabom amiloglukozidaze pri 60 °C.

Proizvodi koji imaju visok sadržaj bjelančevina ili masti bistre se i filtriraju.

Određivanje šećera vrši se HPLC analizom.

Pošto bi moglo doći do djelomične inverzije saharoze tijekom enzimatske obrade, određivanje slobodnih šećera također se vrši HPLC analizom za izračunavanje ispravljenog sadržaja glukoze.

4. **Reagensi i ostali materijali**

Koristiti reagense priznatog analitičkog razreda i deminaliziranu vodu.

4.1. Glukoza, najmanje 99 %.

4.2. Fruktoza, najmanje 99 %.

4.3. Saharoza, najmanje 99 %.

4.4. Maltoza-monohidrat, najmanje 99 %.

4.5. Laktoza-monohidrat, najmanje 99 %.

4.6. Otopina termostabilne alfa-amilaze (1,4-alfa-D-Glukan-glukanohidrolaza), s aktivnošću oko 31 000 U/ml (1U oslobađa 1,0 mg maltoze iz škroba u 3 minute pri pH 6,9 i 20 °C). Ovaj enzim može sadržavati manju količinu nečistoća (npr. glukozu ili saharozu) i ostale ometajuće enzime. Skladištenje na oko 4 °C. Alternativno, ostali izvori alfa-amilaze mogu se koristiti za konačnu otopinu s usporedivom aktivnošću enzima.

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

4.7. Amiloglukozidaza (1,4-alfa-D-Glukan glukohidrolaza) iz *Aspergillus nigera*, praha s aktivnošću oko 120 U/ml ili oko 70 U/ml (1U oslobodit će 1 mikromol glukoze iz škroba po minuti pri pH 4,8 i 60 °C). Ovaj enzim može sadržavati manju količinu nečistoća (npr. glukozu ili saharozu) i ostale ometajuće enzime (npr. Invertase). Skladištenje na oko 4 °C. Alternativno, ostali izvori alfa-amilaze mogu se koristiti za konačnu otopinu s usporedivom aktivnošću enzima.

4.8. Cinkov acetat dihidrat, p.a..

4.9. Kalijev heksacijanoferat (II) ($K4[Fe(CN)]_6.3H2O$), ekstra čist.

4.10. Natrijev acetat, bezvodni, p.a..

4.11. Ledena octena kiselina, 96 % (v/v) (najmanje).

4.12. Puferska otopina natrijevog acetata (0,2 mol/l). Izvagati 16,4 grama natrijevog acetata (točka 4.10) u čašu. Rastopiti u vodi i isprati u volumetrijsku tikvicu od 1 000 ml. Razrijediti do oznake s vodom i prilagoditi pH to 4,7 s octenom kiselinom (uporabom pH-metra (točka 5.7.)). Ova se otopina može koristiti najviše šest mjeseci uz skladištenje na 4 °C.

4.13. Otopina amiloglukozidaze. Pripremiti otopinu amiloglukozidaze u prahu (točka 4.7.) uporabom pufera natrijevog acetata (točka 4.12.). Aktivnost enzima mora biti dostatna i u skladu s sadržajem škroba u količini uzorka (na primjer, aktivnost oko 600 U/ml dobiva se od 0,5 g amiloglukozidaze u prahu 120 U/mg (točka 4.7.) u konačnom obujmu od 100 ml za 1 g škroba u količini uzorka). Pripremiti neposredno prije uporabe.

4.14. Referentne otopine. Pripremiti otopine glukoze, fruktoze, saharoze, maltoze i laktoze u vodi, kako se konvencionalno koristi u HPLC analizi šećera.

4.15. Reagens za bistrenje (Carrez I). U čaši u vodi rastopiti 219,5 grama cinkovog acetata (točka 4.8). Isprati u volumetrijsku tikvicu od 1 000 ml i dodati 30 ml octene kiseline (točka 4.11). Temeljito miješati i razrijediti do oznake s vodom. Ova se otopina može koristiti najviše šest mjeseci ako se čuva na sobnoj temperaturi. Mogu se koristiti ostali reagensi za bistrenje, jednaki otopini Carrez.

4.16. Reagens za bistrenje (Carrez II). U čaši u vodi rastopiti 106,0 grama kalijevog heksacijanoferata (II) (točka 4.9). Isprati u volumetrijsku tikvicu od 1000 ml. Temeljito miješati i razrijediti do oznake s vodom. Ova se otopina može koristiti najviše šest mjeseci ako se čuva na sobnoj temperaturi. Mogu se koristiti ostali reagensi za bistrenje, jednaki otopini Carrez.

4.17. Mobilna faza HPLC. Pripremiti mobilnu fazu koja se konvencionalno koristi u HPLC analizi šećera. U slučaju uporabe aminopropil silikagel kolone, npr., obična mobilna faza je mješavina vode primjerene za HPLC i acetonitrila.

5. **Uređaji**

5.1. Standardne laboratorijske staklene posude.

5.2. Naborani filtrirni papiri, npr., 185 mm.

5.3. Filteri za štrcaljke, 0,45 µm, pogodne za vodene otopine.

5.4. Uzorci posuda pogodnih za HPLC autouzorkivač.

5.5. Volumetrijske tikvice, 100 ml.

5.6. Plastične štrcaljke, 10 ml.

5.7. pH-metar.

5.8. Analitička vaga.

5.9. Vodena kupka s termostatom, prilagodljiva na 60 °C i 90 °C.

5.10. Oprema HPLC pogodna za analizu šećera.

6. **Postupak**

6.1. *Priprema uzorka za nekoliko vrsta proizvoda*

Proizvod se homogenizira.

6.2. *Količina uzorka*

količina uzorka procjenjuje se na temelju deklaracije o sastojcima i uvjeta HPLC analize (koncentracija referentne otopine s glukozom) i ne prelazi:

$$\text{količina uzorka (g)} = \frac{\text{obujam volumenske posude (npr. 100ml)}}{\text{procijenjena sadržina škroba (\%)}}$$

Izvažite uzorak do 0,1 mg točnosti.

6.3. *Slijepa proba*

Slijepo se određuje izvedbom potpune analize (kako je opisano u točki 6.4.), bez dodavanja uzorka. Rezultat slijepog određivanja koristi se u izračunu sadržaja škroba (točka 7.2.).

6.4. *Analiza*

6.4.1. Priprema uzoraka

Homogenizirati uzorak protresanjem ili miješanjem. Odabrana količina za analizu (točka 6.2.) važe se u volumetrijsku tikvicu (točka 5.5.) i dodaje se oko 70 ml tople vode.

Nakon rastapanja ili suspendiranja, dodati 50 mikrolitara termostabilne alfa-amilaze (točka 4.6.) i ugrijati na 90 °C u trajanju od 30 min u vodenoj kupki (točka 5.9.). Ohladi što je moguće prije na 60 °C u vodenoj kupki, i dodati 5 ml otopine amiloglukozidaze (točka 4.13.). Za uzorke koji bi mogli utjecati na pH reakcijske otopine, kontrolirati pH i prilagoditi ga na 4,6 to 4,8, ako je potrebno. Dopustiti da reagira 60 min pri 60 °C. Ohladiti uzorke na sobnu temperature.

6.4.2. Bistrenje

Za uzorke s visokim sadržajem bjelančevina ili masti, bistrenje je potrebno dodavanjem 1 ml Carrez I (točka 4.15.) uzorka otopine. Nakon protresanja dodaje se 1 ml Carrez II (točka 4.16.). Ponovno protresti uzorak.

6.4.3. Postupak za HPLC analizu

Uzorak u volumetrijskoj tikvici is razrijedi se do oznake s vodom, homogenizira i filtrira kroz naborani filtrirni papir (točka 5.2.). Prikupiti ekstrakt uzorka.

Filtrirati uzorke kroz filter štrcaljke (točka 5.3.) sa štrcaljkom (točka 5.6.) koja je prethodno isprana ekstraktom. Prikupiti filtrate u staklene posude (točka 5.4.).

6.5. *Kromatografija*

HPLC se vrši konvencionalno za analizu šećera. Ako HPLC analiza pokaže tragove maltoze, onda se škrob ne pretvara u potpunosti, što prouzrokuje premalo dobivenu glukozu.

7. **Izračun i izražavanje rezultata**

7.1. *Izračun HPLC rezultata*

Za izračun sadržaja škroba potrebni su rezultati dviju HPLC analiza, i to šećeri prisutni u uzorku prije („slobodni šećeri") i nakon enzimatske obrade (kako je opisano u ovoj metodi). Također se mora obaviti i slijepo određivanje kako bi se mogli popraviti rezultati za šećere prisutne u enzimima.

U HPLC analizi, površina vrhova određuje se nakon integracije, a koncentracija se izračunava nakon kalibracije s referentnim otopinama (točka 4.14.). Iz koncentracije glukoze (g/100 ml) nakon enzimatske obrade, koncentracija glukoze (g/100 ml) u slijepoj probi oduzima se. Eventualno sadržaj (g šećera/100 g uzorka) šećera is izračunava se uporabom vagane količine uzorka, iz čega proizlazi:

1. HPLC analiza prije enzimatske obrade, navodeći sadržaj (g/100 g) slobodnih šećera:

— glukoze G

— fruktoze F

— saharoze S

2. HPLC analiza nakon enzimatske obrade, navodeći sadržaj (g/100 g) šećera:

— glukoze nakon ispravka za slijepu probu ($G_{e\ cor}$)

— fruktoze F_e

— saharoze S_e

7.2. *Izračun sadržaja škroba*

7.2.1. Izračun ukupne glukoze „Z”

Ako je količina fruktoze nakon enzimatske obrade (F_e) veća od iznosa fruktoze prije enzimatske obrade (F), onda se saharoza, prisutna u uzorku, djelomično pretvara u fruktozu i glukozu. To znači da je za oslobođenu glukozu potreban ispravak ($F_e - F$).

Z, konačni sadržaj glukoze nakon korekcije u g/100g:

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

7.2.2. Izračun ukupnog sadržaja glukoze izražen kao škrob

E, sadržaj „škroba” u g/100 g:

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

8. **Preciznost**

Detalji o međulaboratorijskom testu koji se odnosu na podatke o preciznosti metode upotrijebljene na 2 uzorka naveden isu u ovoj točki. Oni odražavaju zahtjeve u pogledu izvedbe metode opisane u ovom Prilogu.

Rezultati međulaboratorijskog testa (Informativni)

Međulaboratorijski test proveden je 2008. uz sudjelovanje Europskih carinskih laboratorija.

Procjena podataka o preciznosti izvršena je u skladu s „Protokolom za dizajn, provođenje i tumačenje studija izvođenja metode” (Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies), W. Horwitz, (IUPAC technical report), Pure & Appl. Chem., svezak 67., br. 2, str. 331.-343., 1995.

Podaci o preciznosti navedeni su u donjoj tablici.

Uzorci **1: čokolada i keks pločica** **2: keks**	**Z** **uzorak 1**	**Z** **uzorak 2**
Broj laboratorija	41	42
Broj laboratorija nakon eliminiranja netipičnih vrijednosti	38	39
Srednja vrijednost (%, m/m)	29,8	55,0
Standardna devijacija ponovljivosti sr (%, m/m)	0,5	0,5
Standardna devijacija obnovljivosti sR (%, m/m)	1,5	2,3
Granica ponovljivosti r (%, m/m)	1,4	1,4
Granica obnovljivosti R (%, m/m)	4,2	6,6”