

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 118/2010**z dnia 9 lutego 2010 r.****zmieniające rozporządzenie (WE) nr 900/2008 ustanawiające metody analizy i inne przepisy techniczne niezbędne do stosowania systemu przywozu niektórych towarów pochodzących z przetwórstwa produktów rolnych**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie Rady (EWG) nr 2658/87 z dnia 23 lipca 1987 r. w sprawie nomenklatury taryfowej i statystycznej oraz w sprawie Wspólnej Taryfy Celnej⁽¹⁾, w szczególności jego art. 9,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W rozporządzeniu Komisji (WE) nr 900/2008⁽²⁾ ustanowiono wzory, procedury i metody stosowane do oznaczania zawartości skrobi/glukozy w celu stosowania załączników II i III do rozporządzenia Komisji (WE) nr 1460/96 z dnia 25 lipca 1996 r. ustanawiającego szczegółowe zasady wprowadzania w życie preferencyjnych zasad handlu mających zastosowanie do niektórych towarów pochodzących z przetwórstwa produktów rolnych, jak przewidziano w art. 7 rozporządzenia Rady (WE) nr 3448/93⁽³⁾.
- (2) Grupa ekspertów przeanalizowała rozporządzenie (WE) nr 900/2008 w celu stwierdzenia, czy uwzględnia ono postęp naukowy i techniczny w odniesieniu do metod ustanowionych w tym rozporządzeniu. Przeprowadzone w ramach tej analizy badania i testy wykazują, że zalecane obecnie w przypadku większości towarów oznaczanie zawartości skrobi/glukozy poprzez solubilizację przy użyciu wodorotlenku sodu (poprzedzające enzymatyczną degradację do glukozy) oraz pomiar całkowitej

zawartości glukozy przy użyciu metody enzymatycznej z wykorzystaniem spektrofotometrii nie spełniają najnowszych wymogów technicznych i w związku z tym powinny zostać uaktualnione.

- (3) Właściwe jest zatem ustalenie, że degradację skrobi/glukozy należy przeprowadzać metodą enzymatyczną poprzez zastosowanie amylazy i amyloglukozydazy, a całkowitą zawartość glukozy należy oznaczać z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz należy określić sposób stosowania metody enzymatycznej.
- (4) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (WE) nr 900/2008.
- (5) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Komitetu Kodeksu Celnego,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

Załącznik I do rozporządzenia (WE) nr 900/2008 zastępuje się tekstem załącznika do niniejszego rozporządzenia.

*Artykuł 2*Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 9 lutego 2010 r.

W imieniu Komisji
José Manuel BARROSO
Przewodniczący

⁽¹⁾ Dz.U. L 256 z 7.9.1987, s. 1.⁽²⁾ Dz.U. L 248 z 17.9.2008, s. 8.⁽³⁾ Dz.U. L 187 z 26.7.1996, s. 18.

ZAŁĄCZNIK
„ZAŁĄCZNIK I

Enzymatyczne oznaczanie zawartości skrobi i produktów jej degradacji, włącznie z glukozą, w produktach żywnościowych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

1. Zakres

Metoda opisuje oznaczanie zawartości skrobi i produktów jej degradacji, włącznie z glukozą w produktach żywnościowych przeznaczonych do spożycia przez ludzi, zwanych dalej »skrobią«. Zawartość skrobi oznacza się na podstawie ilościowej analizy glukozy z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) po enzymatycznej konwersji skrobi i produktów jej degradacji w glukozę.

2. Definicja całkowitej zawartości glukozy oraz całkowitej zawartości glukozy wyrażonej jako skrobia

Całkowita zawartość glukozy oznacza wartość Z zgodnie z obliczeniem w pkt 7.2.1 niniejszego załącznika. Odpowiada ona zawartości skrobi i wszystkich produktów jej degradacji włącznie z glukozą.

Zawartość skrobi/glukozy, zgodnie z definicją w załączniku III do rozporządzenia (WE) nr 1460/96, oblicza się na podstawie całkowitej zawartości glukozy Z oraz zgodnie z art. 2 pkt 1 niniejszego rozporządzenia.

Zawartość skrobi (lub dekstryny), o której mowa w kolumnie 3 załącznika IV do rozporządzenia Komisji (WE) nr 1043/2005 ⁽¹⁾, oblicza się na podstawie całkowitej zawartości glukozy Z oraz zgodnie z art. 2 pkt 2.1 rozporządzenia Komisji (WE) nr 904/2008 ⁽²⁾.

Zawartość skrobi wymienionej w pkt 1 niniejszego załącznika oznacza wartość E, obliczoną zgodnie z pkt 7.2.2 niniejszego załącznika. Zawartość skrobi podaje się w procentach % (m/m). Odpowiada ona całkowitej zawartości glukozy Z, wyrażonej jako skrobia. Wartość E nie ma wpływu na powyższe obliczenia.

3. Zasada

Próbki homogenizuje się i tworzy zawiesinę w wodzie. Obecne w próbkach skrobia i produkty jej degradacji zostają w dwóch etapach enzymatycznie przekształcone w glukozę:

- 1) skrobia i produkty jej degradacji zostają częściowo przekształcone w rozpuszczalne łańcuchy glukozowe z użyciem termostabilnej alfa-amylazy w temperaturze 90 °C. Dla osiągnięcia skutecznej konwersji próbki muszą być całkowicie rozpuszczone lub mieć postać zawiesiny zawierającej bardzo małe cząstki stałe;
- 2) rozpuszczalne łańcuchy glukozowe są przekształcane w glukozę z użyciem amyloglukozydazy w temperaturze 60 °C.

Produkty zawierające znaczną ilość białek lub tłuszczu są klarowane i filtrowane.

Oznaczenie cukrów przeprowadza się za pomocą analizy HPLC.

Ponieważ w czasie poddania działaniu enzymów może dojść do częściowej inwersji sacharozy, do oznaczenia cukrów prostych także stosuje się analizę HPLC w celu obliczenia skorygowanej zawartości glukozy.

4. Odczynniki i inne materiały

Należy stosować odczynniki o uznanej klasie analitycznej i wodę demineralizowaną.

- 4.1. Glukoza, min. 99 %.
- 4.2. Fruktaza, min. 99 %.
- 4.3. Sacharoza, min. 99 %.
- 4.4. Monohydrat maltozy, min. 99 %.
- 4.5. Monohydrat laktozy, min. 99 %.
- 4.6. Roztwór termostabilnej alfa-amylazy (1,4-alfa-D-Glukan-glukanohydrolaza), aktywność około 31 000 U/ml (1 U uwalnia ze skrobi 1.0 mg maltozy w czasie 3 minut przy pH 6,9 i 20 °C). Enzym może zawierać małą ilość zanieczyszczeń (np. glukozy lub sacharozy) i innych przeszkadzających enzymów. Przechowywać w temperaturze ok. 4 °C. Alternatywnie stosowane mogą być inne źródła alfa-amylazy pozwalające uzyskać ostateczny roztwór o porównywalnej aktywności enzymatycznej.

⁽¹⁾ Dz.U. L 172 z 5.7.2005, s. 24.

⁽²⁾ Dz.U. L 249 z 18.9.2008, s. 9.

- 4.7. Amyloglukozydaza (1,4-alfa-D-Glukan-glukanohydrolaza) z *Aspergillus niger*, w postaci proszku, aktywność około 120 U/mg lub około 70 U/mg (1 U uwalnia ze skrobi 1 mikromol glukozy w czasie 1 minuty przy pH 4,8 i 60 °C). Enzym może zawierać małą ilość zanieczyszczeń (np. glukozy lub sacharozy) i innych przeszkadzających enzymów (np. inwertazy). Przechowywać w temperaturze ok. 4 °C. Alternatywnie stosowane mogą być inne źródła amyloglukozydazy pozwalające uzyskać ostateczny roztwór o porównywalnej aktywności enzymatycznej.
- 4.8. Octan cynku diwodzian, cz.d.a.
- 4.9. Heksacyjanożelazian(II) potasu ($K_4[Fe(CN)]_6 \cdot 3H_2O$), ekstracysty.
- 4.10. Octan sodu bezwodny, cz.d.a.
- 4.11. Kwas octowy lodowaty, 96 % (v/v) (minimum).
- 4.12. Octan sodu – bufor (0,2 mol/l). Odważyć 16,4 g octanu sodu (pkt 4.10) i przenieść do szklanej zlewki. Rozpuścić w wodzie i przenieść do kolby pomiarowej o pojemności 1 000 ml. Rozcieńczyć do kreski wodą i doprowadzić pH do wartości 4,7 za pomocą kwasu octowego korzystając z pehametru (pkt 5.7). Roztwór nadaje się do użytku maksymalnie przez 6 miesięcy i powinien być przechowywany w temperaturze 4 °C.
- 4.13. Roztwór amyloglukozydazy. Sporządzić roztwór sproszkowanej amyloglukozydazy (pkt 4.7) przy użyciu buforu octanu sodu (pkt 4.12). Aktywność enzymatyczna musi być wystarczająca i odpowiednia do zawartości skrobi w próbce (na przykład aktywność około 600 U/ml otrzymywana jest z 0,5 g sproszkowanej amyloglukozydazy 120 U/mg (pkt 4.7) w przypadku objętości końcowej wynoszącej 100 ml na 1 g skrobi w próbce). Sporządzać bezpośrednio przed użyciem.
- 4.14. Roztwory porównawcze. Sporządzić roztwory glukozy, fruktozy, sacharozy, maltozy i laktozy w wodzie w sposób stosowany w analizie cukrów metodą HPLC.
- 4.15. Odczynnik do klarowania (Carrez I). Rozpuścić 219,5 g octanu cynku (pkt 4.8) w wodzie, w szklanej zlewce. Przenieść roztwór do kolby pomiarowej o pojemności 1 000 ml, dodać 30 ml kwasu octowego (pkt 4.11). Dokładnie wymieszać i rozcieńczyć do kreski wodą. Roztwór można wykorzystywać maksymalnie przez 6 miesięcy jeżeli jest on przechowywany w temperaturze pokojowej. Można też stosować inne odczynniki klarujące równoważne płynowi Carreza.
- 4.16. Odczynnik do klarowania (Carrez II). Rozpuścić 106,0 g heksacyjanożelazianu (II) potasu (pkt 4.9) w wodzie, w szklanej zlewce. Przenieść roztwór do kolby pomiarowej o pojemności 1 000 ml. Dokładnie wymieszać i rozcieńczyć do kreski wodą. Roztwór można wykorzystywać maksymalnie przez 6 miesięcy, jeżeli jest on przechowywany w temperaturze pokojowej. Można też stosować inne odczynniki klarujące równoważne płynowi Carreza.
- 4.17. Faza ruchoma chromatografii cieczowej HPLC. Przygotować fazę ruchomą, która jest standardowo stosowana w analizie HPLC cukrów. W przypadku stosowania kolumny z żelazem krzemionkowym modyfikowanym grupami aminopropylowymi fazą ruchomą jest na przykład mieszanina wody o czystości HPLC i acetonitrylu.

5. Aparatura

- 5.1. Standardowe szkło laboratoryjne.
- 5.2. Sączki karbowane, np. 185 mm.
- 5.3. Filtry strzykawkowe, 0,45 µm do roztworów wodnych.
- 5.4. Fiolki na próbki odpowiednie do aparatu do automatycznego pobierania próbek dla HPLC.
- 5.5. Kolby pomiarowe o pojemności 100 ml.
- 5.6. Strzykawki z tworzywa sztucznego o pojemności 10 ml.
- 5.7. Pehametr.
- 5.8. Waga analityczna.
- 5.9. Łaźnia wodna z termostatem, zakres regulacji 60–90 °C.
- 5.10. Aparatura HPLC odpowiednia do analizy cukrów.

6. Procedura

6.1. Przygotowanie próbki dla kilku rodzajów produktów

Produkt jest homogenizowany.

6.2. Wielkość próbki

Wielkość próbki szacowana jest na podstawie deklarowanego składu surowcowego oraz warunków analizy metodą HPLC (stężenie glukozy w roztworach porównawczych) i nie może przekraczać:

$$\text{masa próbki (g)} = \frac{\text{objętość kolby pomiarowej (np. 100 ml)}}{\text{szacowana zawartość skrobi (\%)}}$$

Ważyc próbkę z dokładnością do 0,1 mg.

6.3. Oznaczenie próby ślepej

Próbę ślepą oznacza się wykonując pełną analizę (jak opisano w pkt 6.4) bez dodawania próbki. Wynik oznaczenia próby ślepej wykorzystuje się przy obliczaniu zawartości skrobi (pkt 7.2).

6.4. Analiza

6.4.1. Przygotowanie próbek

Przeprowadzić homogenizację próbki za pomocą wytrząsania lub mieszania. Wybraną wielkość próbki (pkt 6.2) odważyć do kolby pomiarowej (pkt 5.5) i dodać około 70 ml ciepłej wody.

Po rozpuszczeniu osadu lub uzyskaniu zawiesiny dodać 50 mikrolitrów termostabilnej alfa-amylazy (pkt 4.6) i ogrzewać w temperaturze 90 °C przez 30 minut w łaźni wodnej (pkt 5.9). Ciecz jak najszybciej schłodzić do 60 °C w łaźni wodnej i dodać 5 ml roztworu amyloglukozydazy (pkt 4.13). W przypadku próbek, które mogłyby zmienić pH roztworu reakcyjnego, należy kontrolować pH i w miarę potrzeby dostosować pH do wartości wynoszącej 4,6–4,8. Prowadzić reakcję przez 60 minut w temperaturze 60 °C. Schłodzić próbkę do temperatury pokojowej.

6.4.2. Klarowanie

W przypadku próbek z wysoką zawartością białek lub tłuszczu niezbędne jest klarowanie poprzez dodanie 1 ml płynu Carreza I (pkt 4.15) do roztworu próbki. Po wstrząśnięciu dodaje się 1 ml płynu Carreza II (pkt 4.16). Należy powtórnie wstrząsnąć próbkę.

6.4.3. Przeprowadzenie analizy metodą HPLC

Próbkę w kolbie pomiarowej należy rozcieńczyć wodą do kreski, zhomogenizować i przesączyć przez sączek karbowany (pkt 5.2). Zebrać ekstrakt próbki.

Ekstrakty należy przesączyć przez filtr strzykawkowy (pkt 5.3) za pomocą strzykawki (pkt 5.6), którą uprzednio przemyto ekstraktem. Przesącze zebrać do fiolek (pkt 5.4).

6.5. Chromatografia

Analizę metodą HPLC przeprowadza się w sposób typowy dla analizy cukrów. Jeśli analiza metodą HPLC wykazuje ślady maltozy, oznacza to niecałkowite przekształcenie skrobi, czego wynikiem jest zbyt niskie odzyskanie glukozy.

7. Obliczanie i przedstawianie wyników

7.1. Obliczanie wyników analizy HPLC

W celu obliczenia zawartości skrobi niezbędne jest uzyskanie wyników dwóch analiz HPLC, a mianowicie: cukrów obecnych w próbce przed poddaniem działaniu enzymów («cukry wolne») oraz po poddaniu działaniu enzymów (zgodnie z opisaną metodą). W celu wprowadzenia poprawki na cukry obecne w enzymach należy wykonać także oznaczenie próby ślepej.

W analizie HPLC powierzchnię pików określa się poprzez całkowanie, a stężenie oblicza się po kalibracji przy użyciu roztworów porównawczych (pkt 4.14). Stężenie glukozy (g/100 ml) w próbce ślepej wydzielone zostaje ze stężenia glukozy (g/100 ml) po poddaniu działaniu enzymów. Ostatecznie zawartość cukrów (g cukru/100 g próbki) obliczana jest przy użyciu odważonej ilości próbki, czego wynikiem jest:

1) analiza HPLC przed poddaniem działaniu enzymów, określająca zawartość cukrów wolnych (g/100 g):

- glukozy G,
- fruktozy F,
- sacharozy S;

2) analiza HPLC po poddaniu działaniu enzymów, określająca zawartość cukrów (g/100 g):

- glukoza po wprowadzeniu poprawki na próbę ślepą ($G_{e\text{ cor}}$),
- fruktoza F_e ,
- sacharoza S_e .

7.2 Obliczanie zawartości skrobi

7.2.1. Obliczanie całkowitej zawartości glukozy »Z«

Jeżeli ilość fruktozy po poddaniu działaniu enzymów (F_e) jest wyższa niż ilość fruktozy przed poddaniem działaniu enzymów (F), oznacza to, że sacharoza obecna w próbce została częściowo przekształcona w fruktozę i glukozę. Wskazuje to, że należy wprowadzić poprawkę na uwolnioną glukozę ($F_e - F$).

Z, ostateczna zawartość glukozy po wprowadzeniu poprawki w g/100 g:

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

7.2.2. Obliczanie całkowitej zawartości glukozy wyrażonej jako skrobia

E, zawartość »skrobi« w g/100 g:

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

8. Precyzja

Niniejszy punkt zawiera szczegóły dotyczące międzylaboratoryjnego testu odnośnie do danych dotyczących precyzji metody stosowanej do 2 próbek. Odpowiadają one wymogom w odniesieniu do metody opisanej w niniejszym załączniku.

Wyniki badania międzylaboratoryjnego (dla celów informacyjnych)

Badania międzylaboratoryjne przeprowadzono w 2008 r. z udziałem europejskich laboratoriów celnych.

Ocena danych dotyczących precyzji metody została przeprowadzona zgodnie z protokołem dotyczącym zaprojektowania, przeprowadzenia i interpretacji studium wykonania metody (»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).

Dane dotyczące precyzji zostały podane w poniższej tabeli.

Próbki 1 : baton czekoladowy z herbatnikiem 2 : herbatnik	Z próbka 1	Z próbka 2
Liczba laboratoriów	41	42
Liczba laboratoriów po wyeliminowaniu wyników krańcowych	38	39
Średnia (% m/m)	29,8	55,0
Odchylenie standardowe powtarzalności sr (% m/m)	0,5	0,5
Odchylenie standardowe odtwarzalności sR (% m/m)	1,5	2,3
Granica powtarzalności r (% m/m)	1,4	1,4
Granica odtwarzalności R (% m/m)	4,2	6,6"