

I

(Actos cuya publicación es una condición para su aplicabilidad)

REGLAMENTO (CEE) Nº 1822/86 DE LA COMISIÓN

de 30 de mayo de 1986

por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 1061/69 relativo a los métodos de análisis para la determinación del almidón en los concentrados de proteínas de soja así como en las mercancías que contengan tales productos

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Visto el Reglamento (CEE) nº 97/69 del Consejo, de 16 de enero de 1969, relativo a las medidas que se deben adoptar para la aplicación uniforme de la nomenclatura del arancel aduanero común ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 2055/84 ⁽²⁾, y, en particular, su artículo 3,

Considerando que el artículo 1 del Reglamento (CEE) nº 1061/69 de la Comisión ⁽³⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 419/77 ⁽⁴⁾, define los métodos de análisis para la aplicación del Reglamento (CEE) nº 3033/80 del Consejo, de 11 de noviembre de 1980, por el que se determina el régimen de intercambios aplicable a ciertas mercancías resultantes de la transformación de productos agrícolas ⁽⁵⁾;

Considerando que, como consecuencia de los estudios realizados y para determinar el contenido en almidón de los concentrados de proteínas de soja, así como de las mercancías que contengan tales productos, es necesario sustituir el método de análisis establecido por un método más adecuado;

Considerando que el método que figura en el Anexo del presente Reglamento ofrece mejores garantías;

Considerando que es oportuno modificar determinadas denominaciones químicas;

Considerando que las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de nomenclatura del arancel aduanero común,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El Reglamento (CEE) nº 1061/69 queda modificado como sigue.

1. El texto del artículo 1 queda sustituido por el siguiente texto:

⁽¹⁾ DO nº L 14 de 21. 1. 1969, p. 1.

⁽²⁾ DO nº L 191 de 19. 7. 1984, p. 1.

⁽³⁾ DO nº L 141 de 12. 6. 1969, p. 24.

⁽⁴⁾ DO nº L 56 de 1. 3. 1977, p. 46.

⁽⁵⁾ DO nº L 323 de 29. 11. 1980, p. 1.

« Artículo 1

1. Cuando la clasificación en una de las subpartidas del arancel aduanero común, de una mercancía contemplada en el artículo 1 del Reglamento (CEE) nº 3033/80, dependa de su contenido en peso de almidón o de fécula, este contenido se determinará en función de la cantidad de almidón o fécula en estado anhidro contenido en dicha mercancía.

2. El contenido en peso de almidón de concentrados de proteínas de soja, así como de las mercancías que contengan tales productos, se determinará por el método enzimático que figura en el Anexo V.

3. El contenido en peso de almidón o de fécula de mercancías distintas de las contempladas en el anterior apartado 2 se determinará por el método EWERS modificado, tal como se define en el capítulo 1 del Anexo I de la tercera Directiva 72/199/CEE de la Comisión ⁽¹⁾.

No obstante, cuando la mercancía considerada contenga almidones o féculas distintos de los originarios, sin contener al mismo tiempo sacarosa o azúcar invertido, el contenido en peso de almidón o fécula de dicha mercancía se determinará por el método de sacarificación definido en el Anexo I.

Para la aplicación de las disposiciones del presente apartado, las destrinas se considerarán como almidones o féculas distintos de los originarios.

⁽¹⁾ DO nº L 123 de 29. 5. 1972, p. 6. »

2. El texto del artículo 4 queda sustituido por el siguiente texto:

« Artículo 4

La proporción de D-manitol contenida en las mercancías de las subpartidas 29.04 C III y 38.19 T del arancel aduanero común, calculada sobre su contenido en D-glucitol (sorbitol), se determinará por el método definido en el Anexo IV. »

3. El Anexo IV quedará modificado del siguiente modo :

a) el título se sustituye por el siguiente título :

**« DETERMINACIÓN DE D-MANITOL
CONTENIDO EN LAS MERCANCÍAS DE
LAS SUBPARTIDAS 29.04 C III Y 38.19 T
DEL ARANCEL ADUANERO COMÚN,
CALCULADA SOBRE EL CONTENIDO DE
D-GLUCITOL » ;**

b) el texto del apartado 1 queda sustituido por el siguiente texto :

« I. Principio

Para determinar la proporción de D-manitol contenido en las mercancías de las subpartidas 29.04 C III y 38.19 T del arancel aduanero común, calculada sobre el contenido de D-glucitol, se utiliza la cromatografía en fase gaseosa. Para ello, es necesario transformar previamente los productos no volátiles en sus derivados acetilados » ;

c) el texto de la letra b) del apartado III se sustituye por el siguiente texto :

« b) Condiciones operativas de la cromatografía :

Temperatura de inyección : 300 °C ;

Temperatura de la columna : 210 °C ;

Flujo del gas portador (por ejemplo, nitrógeno) :
25 ml/minuto ;

Flujo de hidrógeno : 25 ml/minuto ;

Cantidad inyectada : 1 microlitro.

El pico del D-manitol aparecerá antes que el del D-glucitol.

Para determinar la proporción de D-manitol contenida en las mercancías analizadas, calculada sobre el contenido de D-glucitol, basta hacer la relación de las áreas de los dos picos correspondientes. »

4. El texto del Anexo del presente Reglamento se añade al Reglamento (CEE) nº 1061/69 como Anexo V.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo primer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 30 de mayo de 1986.

Por la Comisión

COCKFIELD

Vicepresidente

ANEXO

« ANEXO V »

1. Objeto y ámbito de aplicación

El método permite determinar el contenido en peso de almidón o fécula de los concentrados de proteínas de soja, así como de las mercancías que lo contengan.

2. Definición

Se entiende por « contenido en almidón o fécula » de las mercancías recogidas en el punto 1, el valor T, tal y como se calcula en el punto 7 del presente método.

3. Principio

Se lava la muestra con etanol al 40 % en volumen para eliminar los azúcares solubles y los productos solubles de degradación del almidón. Se descompone el residuo con hidróxido de sodio y se escinde el almidón en unidades de glucosa con amiloglucosidasa. La dosificación de la glucosa se efectúa por vía enzimática.

4. Reactivos

Se utilizará agua bidestilada.

4.1. Etanol al 40 % en volumen.**4.2. Disolución de hidróxido de sodio 0,5 N (0,5 mol/l).****4.3. Ácido acético (glacial) al 96 %, como mínimo.****4.4. Disolución de la amiloglucosidasa :**

Inmediatamente antes de la utilización, se disuelven aproximadamente 10 mg de amiloglucosidasa, (EC 3.2.1.3) (6 U/mg) en 1 ml de agua (1).

4.5. Tampón trietanolamina :

Se disuelven 14,0 g de clorhidrato de trietanolamina cloruro de tris (2-hidroxiethyl) amonio y 0,25 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) en 80 ml de agua ; se le añadirán aproximadamente 5 ml de disolución de hidróxido de sodio 5 N (5 mol/l) y se ajustan a pH 7,6 mediante una disolución de hidróxido de sodio 1 N (1 mol/l). Se completa hasta 100 ml con agua bidestilada. Dicho tampón se conservará a + 4 °C durante 4 semanas, como mínimo.

4.6. Disolución de NADP (Nicotinamida Adenina Dinucleotida fosfato, sal disódica) :

Se disuelven 60 mg de NADP en 6 ml de agua. Esta disolución se conservará a + 4 °C durante 4 semanas, como mínimo.

4.7. Disolución de ATP (Adenosina-5'-trifosfato, sal disódica) :

Se disuelven 300 mg de $ATP \cdot 3H_2O$ y 300 mg de hidrogenocarbonato de sodio ($NaHCO_3$) en 6 ml de agua. Esta disolución se conservará a + 4 °C durante 4 semanas, como mínimo.

4.8. Suspensión de HK/G6P-DH (Hexokinasa-EC 2.7.1.1) y de glicosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) :

Se ponen en suspensión 280 U de HK y 140 U de G6P-DH en 1 ml de disolución de sulfato de amonio ($c = 3,2$ mol/l). Esta suspensión se conservará a + 4 °C durante un año, como mínimo.

5. Equipo**5.1. Centrífuga con aceleración mínima $1\ 000 \times g$ (calculada en el centro del tubo).****5.2. Tubos de vidrio de centrífuga de 100 ml.****5.3. Agitador magnético con baño maría a 60 °C.****5.4. Barrillas magnéticas.****5.5. Espectrofotómetro UV provisto de cubetas de 1 cm.****5.6. Pipetas para el análisis enzimático.**

(1) U es la unidad internacional de la actividad enzimática.

6. Método operativo

6.1. *Lavado con etanol, desagregación mediante hidróxido de sodio e hidrólisis enzimática del almidón:*

6.1.1. Según el presunto contenido de almidón, elijan las siguientes pesadas (el contenido en almidón no debería superar 0,4 g por pesada):

Presunto contenido de almidón del producto en 100 g	Pesada aproximativa (p) en g	Volumen del matraz aforado en ml	Factor de dilución hasta el litro (f)
> 70	0,35 — 0,4	500	2
20 — 70	max. 0,5	500	2
5 — 20	max. 1	250	4
< 5	max. 2	200	5

6.1.2. Se pesa (con una precisión de 0,1 mg) la muestra en un tubo (5.2) de centrífuga y se le añaden 50 ml de etanol al 40 % en volumen (4.1).

6.1.3. Se agita durante 20 minutos a temperatura ambiente sobre el agitador magnético.

6.1.4. Se deja la barrilla magnética dentro del tubo y se centrifuga durante 5 minutos.

6.1.5. Se aspira cuidadosamente y se elimina la fase líquida (bomba de agua o pipeta Pasteur).

6.1.6. Se lava el residuo, agitando cada vez con 25 ml de etanol al 40 % en volumen (4.1).

6.1.7. Se centrifuga, se aspira cuidadosamente y se elimina la fase líquida.

6.1.8. Realizar estas operaciones (6.1.6 y 6.1.7) por lo menos una vez más.

6.1.9. Al residuo se añaden 50 ml de disolución de hidróxido de sodio 0,5 N (4.2) y se mantiene bajo agitación continua durante 30 minutos en el baño maría del agitador magnético (5.3) a 60 °C.

6.1.10. Se ajusta a pH 4,6 a 4,8 con algunos ml de ácido acético concentrado (4.3).

6.1.11. Se coloca el tubo de centrífuga en el baño maría del agitador magnético (5.3), a 60 °C, se añade 1,0 ml de la disolución de la enzima (4.4) y se deja reaccionar durante 30 minutos, bajo agitación.

6.1.12. Después de enfriar, se transvasa al mencionado matraz aforado (6.1.1) y se rellena hasta la marca con agua.

6.1.13. En caso necesario se filtra a través de un filtro plegado.

6.2. *Dosificación de la glucosa:*

6.2.1. La disolución de ensayo debe contener de 100 a 1 000 mg de glucosa por litro, lo que corresponde a un ΔE_{340} que se sitúa entre 0,1-1,0.

La disolución de ensayo diluida en una proporción de 1 + 30 con el agua no debe presentar a 340 nm, una absorbancia superior a 0,4 (medida en comparación con el aire).

6.2.2. Se lleva el tampón (4.5) hasta la temperatura ambiente (20 °C).

6.2.3. La temperatura de la reacción y de la muestra deberá estar comprendida entre 20 y 25 °C.

6.2.4. Se mide la absorbancia a 340 nm en comparación con el aire (sin cubeta en el trayecto óptico de referencia).

6.2.5. Pipeteado según el esquema indicado a continuación :

Introducción en las cubetas	Referencia (ml)	Prueba (ml)
Tampón (reactivo 4.5)	1,00	1,00
NADP (reactivo 4.6)	0,10	0,10
ATP (reactivo 4.7)	0,10	0,10
Disolución de prueba (6.1.12 o 13)	—	0,10
Agua bidestilada	2,00	1,90

Se mezcla y al cabo de aproximadamente 3 min se mide la absorbancia de las disoluciones (E_1). Se provoca la reacción añadiendo :

HK/G6P-DH (reactivo 4.8)	0,02	0,02
--------------------------	------	------

Se mezcla, se espera que se termine la reacción (aproximadamente 15 minutos) y se mide la absorbancia de las disoluciones (E_2). Se tienen en cuenta posibles reacciones secundarias. Si la reacción no se ha terminado después de 15 minutos se continúa leyendo las absorbancias cada 5 minutos hasta que el aumento de la absorbancia sea constante en 5 minutos, y a continuación, se extrapola la absorbancia al tiempo de la adición de la suspensión 4.8.

6.2.6. Para la referencia de la prueba, se calcula la diferencia de absorbancia $E_2 - E_1$. Se sustrae la diferencia de absorbancia de la referencia de la de la prueba ($=\Delta E$) :

$$(\Delta E = \Delta \text{ prueba} - \Delta E \text{ referencia})$$

A partir de esta diferencia, se obtiene el contenido en glucosa de la disolución de prueba :

Contenido en glucosa, en g/l de disolución de prueba

$$G = \frac{3,22 \times 180,16}{6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times \Delta E_{340} = 0,921 \times \Delta E_{340}$$

$$(\text{Masa molecular de glucosa} = 180,16)$$

6.2.7. Si la medida de la absorbancia a 340 nm no fuera posible, la medida podrá efectuarse a la longitud de onda de 365 nm o 334 nm. En este caso la cifra 6,3 de la fórmula G anterior se sustituirá por la cifra 3,5 o 6,18, respectivamente.

7. Cálculo y expresión de los resultados

$$T = \text{contenido en almidón en g/100 g}$$

$$T = \frac{100 \times 0,9 \times G}{p \times f}$$

donde :

G = glucosa, en g/l (6.2.6),

f = factor de dilución (6.1.1),

p = pesada de la muestra, en g,

0,9 = factor de conversión de la glucosa en el almidón.