

REGLAMENTO (UE) N° 118/2010 DE LA COMISIÓN

de 9 de febrero de 2010

que modifica el Reglamento (CE) n° 900/2008, por el que se definen los métodos de análisis y otras disposiciones de carácter técnico necesarios para la aplicación del régimen de importación de determinadas mercancías resultantes de la transformación de productos agrícolas

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CEE) n° 2658/87 del Consejo, de 23 de julio de 1987, relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 9,

Considerando lo siguiente:

(1) El Reglamento (CE) n° 900/2008 de la Comisión ⁽²⁾ establece las fórmulas, procedimientos y métodos que deben utilizarse para determinar el contenido de almidón/glucosa en aplicación de los anexos II y III del Reglamento (CE) n° 1460/96 de la Comisión, de 25 de julio de 1996, por el que se establecen las modalidades de aplicación de los regímenes de intercambios preferenciales, aplicables a determinadas mercancías resultantes de la transformación de productos agrícolas, contemplados en el artículo 7 del Reglamento (CE) n° 3448/93 del Consejo ⁽³⁾.

(2) El Reglamento (CE) n° 900/2008 ha sido examinado por un grupo de expertos con objeto de evaluar si tiene en cuenta la evolución científica y tecnológica de los métodos que en él se establecen. Los estudios y ensayos efectuados en el contexto de ese examen indican que la determinación del contenido de almidón/glucosa por solubilización mediante hidróxido de sodio (antes de la degradación enzimática a glucosa) y la medida del contenido total de glucosa utilizando el método enzimático

con espectrofotometría, según lo prescrito hasta ahora para la mayoría de las mercancías, ya no se ajustan a los requisitos técnicos vigentes y deben por tanto actualizarse.

(3) Por ello, procede disponer que la degradación del almidón/glucosa se realice con un procedimiento enzimático, mediante amilasa y amiloglucosidasa, y que el contenido total de glucosa se determine utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), así como especificar la manera en que debe llevarse a cabo el método enzimático.

(4) Procede, por tanto, modificar el Reglamento (CE) n° 900/2008 en consecuencia.

(5) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité del código aduanero.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El anexo I del Reglamento (CE) n° 900/2008 se sustituye por el texto que figura en el anexo del presente Reglamento.

*Artículo 2*El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

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

Hecho en Bruselas, el 9 de febrero de 2010.

Por la Comisión
El Presidente
José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ DO L 256 de 7.9.1987, p. 1.

⁽²⁾ DO L 248 de 17.9.2008, p. 8.

⁽³⁾ DO L 187 de 26.7.1996, p. 18.

ANEXO

«ANEXO I

Determinación enzimática del contenido de almidón y de sus productos de degradación, incluida la glucosa, en los productos alimenticios, utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**1. Ámbito de aplicación**

Este método describe la determinación del contenido de almidón y de sus productos de degradación, incluida la glucosa (denominados, en lo sucesivo, "almidón"), en los productos alimenticios destinados al consumo humano. El contenido de almidón se determina a partir del análisis cuantitativo del contenido de glucosa mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), previa conversión enzimática en glucosa del almidón y de sus productos de degradación.

2. Definición del contenido total de glucosa y del contenido total de glucosa expresado como almidón

El contenido total de glucosa es el valor Z calculado conforme al punto 7.2.1 del presente anexo. Representa el contenido de almidón y de todos sus productos de degradación, incluida la glucosa.

El contenido de almidón/glucosa definido en el anexo III del Reglamento (CE) n° 1460/96 se calculará con arreglo al contenido total Z de glucosa y según lo establecido en el artículo 2, punto 1, del presente Reglamento.

El contenido de almidón (o dextrina) mencionado en la columna 3 del anexo IV del Reglamento (CE) n° 1043/2005 ⁽¹⁾ se calculará con arreglo al contenido total Z de glucosa, según lo establecido en el artículo 2, punto 1, del Reglamento (CE) n° 904/2008 ⁽²⁾.

El contenido de almidón mencionado en el punto 1 es el valor E calculado conforme al punto 7.2.2 del presente anexo. Se expresa en porcentaje (m/m). Es equivalente al contenido total de glucosa Z, expresado como almidón. Este valor E no interfiere en los cálculos antes mencionados.

3. Principio

Las muestras se homogeneizan y se suspenden en agua. El almidón y sus productos de degradación presentes en las muestras se convierten enzimáticamente en glucosa en dos pasos:

1) El almidón y sus productos de degradación se convierten parcialmente en cadenas solubles de glucosa utilizando alfa-amilasa termoestable a 90 °C. Para una conversión efectiva es necesario que las muestras se disuelvan completamente o se presenten en forma de suspensión con partículas sólidas muy pequeñas.

2) Las cadenas solubles de glucosa se convierten en glucosa utilizando amiloglicosidasa a 60 °C.

Los productos con alto contenido de proteínas o grasas se clarifican y filtran.

La determinación de azúcares se efectúa mediante un análisis con HPLC.

Puesto que durante el tratamiento enzimático puede producirse una inversión parcial de la sacarosa, la determinación de los azúcares libres se realiza también mediante un análisis con HPLC para calcular el contenido de glucosa corregido.

4. Reactivos y otros materiales

Deben utilizarse reactivos con pureza reconocida de grado analítico y agua desmineralizada.

- 4.1. Glucosa, con una pureza mínima del 99 %.
- 4.2. Fructosa, con una pureza mínima del 99 %.
- 4.3. Sacarosa, con una pureza mínima del 99 %.
- 4.4. Maltosa monohidrato, con una pureza mínima del 99 %.
- 4.5. Lactosa monohidrato, con una pureza mínima del 99 %.
- 4.6. Solución de alfa-amilasa termoestable (1,4-alfa-D-glucano glucanohidrolasa), con una actividad de unas 31 000 U/ml (1 U liberará 1,0 mg de maltosa del almidón en 3 minutos a un pH de 6,9 y una temperatura de 20 °C). Esta enzima puede contener un volumen reducido de impurezas (por ejemplo, glucosa o sacarosa) y otras enzimas de interferencia. Se conserva a unos 4 °C. Como alternativa pueden utilizarse otras fuentes de alfa-amilasa que obtengan una solución final con una actividad enzimática comparable.

⁽¹⁾ DO L 172 de 5.7.2005, p. 24.

⁽²⁾ DO L 249 de 18.9.2008, p. 9.

- 4.7. Amiloglicosidasa (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa) de *Aspergillus niger*, en polvo con una actividad aproximada de 120 U/mg o de 70 U/mg (1 U liberará 1 micromol de glucosa del almidón por minuto a un pH de 4,8 y una temperatura de 60 °C). Esta enzima puede contener un volumen reducido de impurezas (por ejemplo, glucosa o sacarosa) y otras enzimas de interferencia (por ejemplo, invertasa). Se conserva a unos 4 °C. Como alternativa pueden utilizarse otras fuentes de amiloglicosidasa que obtengan una solución final con una actividad enzimática comparable.
- 4.8. Acetato de zinc dihidrato, p. a.
- 4.9. Hexacianoferrato (II) de potasio ($K_4[Fe(CN)]_6 \cdot 3H_2O$), extra puro.
- 4.10. Acetato de sodio anhidro, p. a.
- 4.11. Ácido acético glacial, 96 % (v/v) (mínimo).
- 4.12. Solución amortiguadora de acetato de sodio (0,2 mol/l). Se pesan 16,4 g de acetato de sodio (punto 4.10) en un vaso de precipitados. Se disuelven en agua y se pasan, enjuagando, a un matraz aforado de 1 000 ml. Se enrasa con agua y se ajusta el pH a 4,7 con ácido acético utilizando un pH-metro (punto 5.7). Esta solución puede conservarse durante un máximo de 6 meses a 4 °C.
- 4.13. Solución de amiloglicosidasa. Se prepara una solución con amiloglicosidasa en polvo (punto 4.7) utilizando solución amortiguadora de acetato de sodio (punto 4.12). La actividad enzimática debe ser suficiente y acorde con el contenido de almidón en la cantidad de muestra (por ejemplo, se obtiene una actividad aproximada de 600 U/ml a partir de 0,5 de amiloglicosidasa en polvo con 120 U/mg (punto 4.7) en un volumen final de 100 ml por 1 g de almidón en la cantidad de muestra). La preparación se hace en el momento.
- 4.14. Soluciones de referencia. Se preparan soluciones de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y lactosa en agua, como se utilizan normalmente en el análisis de azúcares con HPLC.
- 4.15. Reactivo para la clarificación (Carrez I). Se disuelven 219,5 g de acetato de zinc (punto 4.8) en agua, en un vaso de precipitados. Se pasan, enjuagando, a un matraz aforado de 1 000 ml; se añaden 30 ml de ácido acético (punto 4.11). Se mezcla bien y se enrasa con agua. Esta solución puede conservarse un máximo de 6 meses a temperatura ambiente. Es posible utilizar otros reactivos de clarificación, equivalentes a la solución de Carrez.
- 4.16. Reactivo para la clarificación (Carrez II). Se disuelven 106,0 g de hexacianoferrato (II) de potasio (punto 4.9) en agua, en un vaso de precipitados. Se pasan, enjuagando, a un matraz aforado de 1 000 ml. Se mezcla bien y se enrasa con agua. Esta solución puede conservarse un máximo de 6 meses a temperatura ambiente. Es posible utilizar otros reactivos de clarificación, equivalentes a la solución de Carrez.
- 4.17. Fase móvil para la HPLC. Se prepara una fase móvil que se utilice normalmente en el análisis de azúcares con HPLC. En caso de empleo de una columna de gel de sílice aminopropilada, puede citarse como ejemplo común de fase móvil una mezcla de agua de grado HPLC y acetonitrilo.
5. **Equipo**
- 5.1. Material de vidrio normal de laboratorio.
- 5.2. Filtros de pliegues, por ejemplo, de 185 mm.
- 5.3. Filtros de jeringa, de 0,45 µm, adecuados para soluciones acuosas.
- 5.4. Frascos de muestra adecuados para el automuestreador de HPLC.
- 5.5. Matraces aforados de 100 ml.
- 5.6. Jeringas de plástico de 10 ml.
- 5.7. pH-metro.
- 5.8. Balanza analítica.
- 5.9. Baño María con termostato, regulable a 60 °C y a 90 °C.
- 5.10. Equipo de HPLC adecuado para el análisis de azúcares.

6. Procedimiento

6.1. Preparación de la muestra para varios tipos de productos

Se homogeneiza el producto.

6.2. Porción de muestra

La cantidad de muestra se estima a partir de la declaración de ingredientes y las condiciones del análisis con HPLC (concentración de la solución de glucosa de referencia), y no excederá de:

$$\text{cantidad de muestra (g)} = \frac{\text{volumen del matraz aforado (porejemplo, 100 ml)}}{\text{contenido estimado de almidón (\%)}}$$

Se pesa la muestra con una precisión de 0,1 mg.

6.3. Prueba en blanco

El blanco se determina efectuando un análisis completo (como se describe en el punto 6.4) sin añadir muestra. El resultado de la prueba en blanco se utiliza para calcular el contenido de almidón (punto 7.2).

6.4. Análisis

6.4.1. Preparación de las muestras

La muestra se homogeneiza sacudiendo el recipiente o agitando con varilla. La porción de muestra elegida (punto 6.2) se pesa en un matraz aforado (punto 5.5) y se añaden unos 70 ml de agua templada.

Tras disolverla o suspenderla, se añaden 50 microlitros de alfa-amilasa termoestable (punto 4.6) y se calienta a 90 °C durante 30 minutos al baño María (punto 5.9). Se enfría lo más rápidamente posible a 60 °C al baño María y se añaden 5 ml de una solución de amiloglucosidasa (punto 4.13). Para muestras que puedan influir en el pH de la solución de reacción, se controla el pH y se ajusta a 4,6-4,8, en caso necesario. Se deja reaccionar durante 60 minutos a 60 °C. Las muestras se enfrían a temperatura ambiente.

6.4.2. Clarificación

Para muestras con un elevado contenido de proteínas o grasas se requiere una clarificación añadiendo 1 ml de Carrez I (punto 4.15) a la solución de muestra. Después de agitar, se añade 1 ml de Carrez II (punto 4.16). Agitar la muestra de nuevo.

6.4.3. Tratamiento del análisis con HPLC

La muestra del matraz aforado se enrasa con agua, se homogeneiza y se pasa por un filtro de pliegues (punto 5.2). Se recoge el extracto de la muestra.

Se pasan los extractos a través de un filtro de jeringa (punto 5.3) con una jeringa (punto 5.6) que se ha purgado previamente con el extracto. Los filtrados se recogen en frascos (punto 5.4).

6.5. Cromatografía

Se realiza una HPLC normal para análisis de azúcares. Si el análisis con HPLC revela trazas de maltosa, la transformación del almidón ha sido incompleta, lo que implica una recuperación de glucosa demasiado baja.

7. Cálculo y expresión de los resultados

7.1. Cálculo de los resultados de la HPLC

Para calcular el contenido de almidón se necesitan los resultados de dos análisis con HPLC: los azúcares presentes en la muestra antes ("azúcares libres") y después del tratamiento enzimático (conforme a la descripción del presente método). Asimismo, ha de realizarse una prueba en blanco para poder corregir los azúcares presentes en las enzimas.

En el análisis con HPLC, el área del pico se determina por integración, y la concentración se calcula tras el calibrado con soluciones de referencia (punto 4.14). De la concentración de glucosa (en g/100 ml) tras el tratamiento enzimático se resta la concentración de glucosa (en g/100 ml) en la prueba en blanco. Por último, se calcula el contenido de azúcares (en g de azúcar /100 g de muestra) utilizando la cantidad de muestra pesada, lo que da como resultado:

1) Análisis con HPLC antes del tratamiento enzimático, que da el contenido (g/100 g) de azúcares libres:

- glucosa G
- fructosa F
- sacarosa S

2) Análisis con HPLC después del tratamiento enzimático, que da el contenido (g/100 g) de azúcares:

- glucosa, corregida en función del blanco ($G_{e\text{ cor}}$)
- fructosa F_e
- sacarosa S_e

7.2. Cálculo del contenido de almidón

7.2.1. Cálculo del contenido total de glucosa "Z"

Si la cantidad de fructosa tras el tratamiento enzimático (F_e) es mayor que la cantidad de fructosa antes del tratamiento enzimático (F), entonces la sacarosa presente en la muestra se ha convertido parcialmente en fructosa y glucosa. Esto significa que ha de hacerse una corrección para la glucosa liberada ($F_e - F$).

Z, contenido final de glucosa tras la corrección, en g/100 g:

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

7.2.2. Cálculo del contenido total de glucosa expresado como almidón

E, contenido de "almidón", en g/100 g:

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

8. Precisión

En el presente punto se ofrecen datos sobre una prueba interlaboratorios relativa a la precisión del método aplicado con dos muestras. Estos datos reflejan los requisitos de eficacia para el método descrito en el presente anexo.

Resultados de una prueba interlaboratorios (informativa)

En 2008 se efectuó una prueba interlaboratorios con la participación de los laboratorios aduaneros europeos.

La evaluación de los datos sobre precisión se realizó con arreglo al "Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies" (Protocolo de diseño, realización e interpretación de los estudios sobre eficacia de métodos) de W. Horwitz, (informe técnico de la UIQPA), *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 67, n° 2, pp. 331-343, 1995.

Los datos sobre precisión se ofrecen en el siguiente cuadro:

Muestras 1 : barra de chocolate y galleta 2 : galleta	Z muestra 1	Z muestra 2
Número de laboratorios	41	42
Número de laboratorios tras eliminar los valores extremos	38	39
Media (% m/m)	29,8	55,0
Desviación tipo de la repetibilidad sr (% m/m)	0,5	0,5
Desviación tipo de la reproducibilidad sR (% m/m)	1,5	2,3
Límite de repetibilidad r (% m/m)	1,4	1,4
Límite de reproducibilidad R (% m/m)	4,2	6,6*