KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) Nr. 118/2010

af 9. februar 2010

om ændring af forordning (EF) nr. 900/2008 om fastlæggelse af de analysemetoder og andre bestemmelser af teknisk art, der skal anvendes i forbindelse med importordningen for visse varer fremstillet af landbrugsprodukter

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 2658/87 af 23. juli 1987 om told- og statistiknomenklaturen og den fælles toldtarif ([1]), særlig artikel 9, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Ved Kommissionens forordning (EF) nr. 900/2008 ([2]) fastsættes de formler, procedurer og metoder, der skal anvendes til bestemmelsen af stivelse/glucose i forbindelse med bilag II og III til Kommissionens forordning (EF) nr. 1460/96 af 25. juli 1996 om gennemførelsesbestemmelser for præferencehandelsordningerne for visse varer fremstillet af landbrugsprodukter, jf. artikel 7 i Rådets forordning (EF) nr. 3448/93 ([3]).

(2) Forordning (EF) nr. 900/2008 er blevet undersøgt af en gruppe eksperter med henblik på at vurdere, om forordningen tager hensyn til den videnskabelige og teknologiske udvikling af de metoder, der er fastsat i forordningen. Det fremgår af de undersøgelser og forsøg, der er foretaget i forbindelse med denne vurdering, at bestemmelsen af indholdet af stivelse/glucose ved opløsning med natriumhydroxyd (før enzymatisk nedbrydning til glucose) og målingen af det samlede glucoseindhold med den enzymatiske metode med spektrofotometri, som nu gælder for de fleste varer, ikke længere lever op til de nuværende tekniske krav og derfor bør ajourføres.

(3) Det bør derfor besluttes, at nedbrydningen af stivelse/glucose skal foretages på enzymatisk vis med amylase og amyloglucosidase, at det samlede glucoseindhold skal bestemmes ved højtryksvæskekromatografi (HPLC) og at det skal specificeres, hvorledes den enzymatiske metode gennemføres.

(4) Forordning (EF) nr. 900/2008 bør derfor ændres.

(5) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra Toldkodeksudvalget —

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

Artikel 1

Bilag I til forordning (EF) nr. 900/2008 erstattes af teksten i bilaget til nærværende forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 9. februar 2010.

På Kommissionens vegne
José Manuel BARROSO
Formand

([1]) EFT L 256 af 7.9.1987, s. 1.
([2]) EUT L 248 af 17.9.2008, s. 8.
([3]) EFT L 187 af 26.7.1996, s. 18.

BILAG

»BILAG I

Enzymatisk bestemmelse af stivelse og nedbrydningsprodukter, herunder glucose i fødevarer, ved højtryksvæskekromatografi (HPLC)

1. **Anvendelsesområde**

Metoden tillader bestemmelse af indholdet af stivelse og nedbrydningsprodukter deraf, inkl. glucose i fødevarer til konsum, herefter benævnt »stivelse«. Stivelsesindholdet bestemmes ved kvantitativ analyse af glucose ved højtryksvæskekromatografi (HPLC) efter enzymatisk nedbrydning af stivelse og nedbrydningsprodukter til glucose.

2. **Definition af det samlede glucoseindhold og af det samlede glucoseindhold udtrykt som stivelse**

Det samlede glucoseindhold er værdien Z som beregnet i punkt 7.2.1 i dette bilag. Det udtrykker stivelsesindholdet og alle nedbrydningsprodukter, inkl. glucose.

Indholdet af stivelse/glucose som defineret i bilag III til forordning (EF) nr. 1460/96 skal beregnes på basis af det samlede glucoseindhold Z og som beskrevet i artikel 2, nr. 1), i nærværende forordning.

Indholdet af stivelse (eller dekstrin) nævnt i kolonne 3 i bilag IV til Kommissionens forordning (EF) nr. 1043/2005 ([1]) skal beregnes på basis af det samlede glucoseindhold Z som beskrevet i artikel 2, nr. 2), punkt 1, i forordning (EF) nr. 904/2008 ([2]).

Stivelsesindholdet nævnt i punkt 1 i dette bilag er værdien E, der beregnes som beskrevet i punkt 7.2.2 i dette bilag. Det udtrykkes i % (m/m). Det svarer til det samlede glucoseindhold Z, der udtrykkes som stivelse. Denne værdi E indgår ikke i ovennævnte beregninger.

3. **Princip**

Prøverne homogeniseres og opslæmmes i vand. Stivelsen og nedbrydningsprodukter, der er til stede i prøverne, konverteres enzymatisk til glucose i to faser:

1) Stivelsen og nedbrydningsprodukter konverteres delvist til opløselige glucosekæder ved anvendelse af varmestabil alfa-amylase ved 90 °C. For at opnå en effektiv konvertering er det nødvendigt, at prøverne er helt opløst eller opslæmmet til kun at indeholde meget små faste bestanddele.

2) De opløselige glucosekæder konverteres til glucose med amyloglucosidase ved 60 °C.

Produkter med et højt indhold af proteiner eller fedtstof klares og filtreres.

Bestemmelsen af sukkerarter foretages ved HPLC-analyse.

Fordi der kan forekomme delvis inversion af saccharose under den enzymatiske behandling, foretages bestemmelsen af frie sukkerarter også ved HPLC-analyse for at beregne det korrigerede glucoseindhold.

4. **Reagenser og andre materialer**

Alle reagenser skal være af anerkendt analysekvalitet og vand demineraliseret.

4.1. Glucose, min. 99 %

4.2. Fructose, min. 99 %

4.3. Saccharose, min. 99 %

4.4. Maltose-monohydrat, min. 99 %

4.5. Lactose-monohydrat, min. 99 %

4.6. Opløsning af varmestabil alfa-amylase (1,4-alfa-D-glucan-glucanohydrolase), med aktivitet på ca. 31 000 U/ml (1U vil frigøre 1,0 mg maltose fra stivelsen på 3 min ved pH 6,9 og 20 °C). Dette enzym kan indeholde en lav mængde urenheder (f.eks. glucose eller saccharose) og andre interfererende enzymer. Lagring ved ca. 4 °C. Alternativt kan andre kilder til alfa-amylase anvendes til at opnå en endelig opløsning med tilsvarende enzymaktivitet.

([1]) EUT L 172 af 5.7.2005, s. 24.
([2]) EUT L 249 af 18.9.2008, s. 9.

4.7. Amyloglucosidase (1,4-alfa-D-glucan-glucohydrolase) fra Aspergillus niger, pulver med en aktivitet på ca. 120 U/mg eller ca. 70 U/mg (1U vil frigøre 1 micromol glucose fra stivelsen pr. minut ved en pH på 4,8 og 60 °C). Dette enzym kan indeholde en lav mængde urenheder (f.eks. glucose eller saccharose) og andre interfererende enzymer (f.eks. invertase). Lagring ved ca. 4 °C. Alternativt kan andre kilder til amyloglucosidase anvendes til at opnå en endelig opløsning med tilsvarende enzymaktivitet.

4.8. Zinkacetatdihydrat, p.a.

4.9. Kalimhexacyanoferrat (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), ekstra rent.

4.10. Natriumacetat, vandfrit, p.a.

4.11. Iseddike, 96 % (v/v) (minimum).

4.12. Natriumacetatbuffer (0,2 mol/l). I et bægerglas afvejes 16,4 g natriumacetat (punkt 4.10). Opløs i vand, og overfør til en 1 000 ml målekolbe. Der fyldes op til mærket med vand, og pH justeres til 4,7 med eddikesyre (brug pH-meter (punkt 5.7)). Denne opløsning er holdbar i op til 6 måneder ved opbevaring ved 4 °C.

4.13. Amyloglucosidaseopløsning. Der fremstilles en opløsning af amyloglucosidasepulver (punkt 4.7) i natriumacetatbuffer (punkt 4.12). Enzymaktiviteten skal være tilstrækkelig og i overensstemmelse med stivelsesindholdet i prøvemængden (f.eks. opnås en aktivitet på ca. 600 U/ml fra 0,5 g amyloglucosidasepulver 120 U/mg (punkt 4.7) i en slutvolumen på 100 ml for 1 g stivelse i prøvemængden). Fremstilles umiddelbart før brug.

4.14. Referenceopløsninger. Der fremstilles opløsninger af glucose, fructose, saccharose, maltose og lactose i vand som dem, der sædvanligvis benyttes ved HPLC-analyse af sukker.

4.15. Klaringsreagens (Carrez I). I et bægerglas opløses 219,5 g zinkacetat (punkt 4.8) i vand. Opløsningen overføres til en 1 000 ml målekolbe, og der tilsættes 30 ml eddikesyre (punkt 4.11). Efter omhyggelig blanding fyldes der op til mærket med vand. Denne opløsning er holdbar i op til seks måneder ved opbevaring ved rumtemperatur. Der kan anvendes andre klaringsreagenser svarende til Carrez-opløsningen.

4.16. Klaringsreagens (Carrez II). I et bægerglas opløses 106,0 g kaliumhexacyanoferrat (II) (punkt 4.9) i vand. Opløsningen overføres til en 1 000 ml målekolbe. Efter omhyggelig blanding fyldes der op til mærket med vand. Denne opløsning er holdbar i op til seks måneder ved opbevaring ved rumtemperatur. Der kan anvendes andre klaringsreagenser svarende til Carrez-opløsningen.

4.17. Mobil fase til HPLC. Der fremstilles en mobil fase som dem, der sædvanligvis benyttes ved HPLC-analyse af sukker. Hvis der f.eks. anvendes en aminopropylsilicagelkolonne, benyttes almindeligvis en blanding af vand af HPLC-kvalitet og acetonitril som mobil fase.

5. **Apparatur**

5.1. Standardlaboratorieglasudstyr.

5.2. Foldefiltre, f.eks. 185 mm.

5.3. Sprøjtefiltre, 0,45 µm, til vandige opløsninger.

5.4. Prøveglas, der passer til HPLC-autosampleren.

5.5. 100 ml målekolber.

5.6. Injektionssprøjter af plast, 10 ml.

5.7. pH-meter.

5.8. Analysevægt.

5.9. Vandbad med termostat, temperaturinterval 60-90 °C.

5.10. HPLC-apparatur, der er egnet til sukkeranalyse.

6. **Metode**

6.1. *Prøveforberedelse for forskellige produkttyper*

Prøverne homogeniseres.

6.2. *Prøvemængde*

Prøvemængden skønnes ud fra varedeklarationen og betingelserne for HPLC-analyse (glucosereferenceopløsningens koncentration), og må ikke overskride:

$$\text{Prøvemængde (g)} = \frac{\text{målekolbens rumfang (f.eks. 100 ml)}}{\text{skønnet stivelsesindhold (\%)}}$$

Prøven afvejes med en nøjagtighed på 0,1 mg.

6.3. *Blindprøve*

Der foretages en blindbestemmelse i form af en fuldstændig analyse (som beskrevet i punkt 6.4) uden tilsætning af prøve. Resultatet af blindbestemmelsen bruges ved beregningen af stivelsesindholdet (punkt 7.2).

6.4. *Analyse*

6.4.1. Prøveforberedelse

Prøven homogeniseres ved rystning eller omrøring. Den valgte prøvemængde (punkt 6.2) afvejes i en målekolbe (punkt 5.5), og der tilsættes ca. 70 ml varmt vand.

Efter opløsning eller opslæmning tilsættes der 50 µl varmestabil alfa-amylase (punkt 4.6), og der opvarmes til 90 °C i 30 min i et vandbad (punkt 5.9). Der afkøles så hurtigt som muligt til 60 °C i et vandbad, og der tilsættes 5 ml amyloglucosidaseopløsning (punkt 4.13). For prøver, der kan påvirke reaktionsopløsningens pH-værdi, kontrolleres pH og om nødvendigt justeres den til 4,6-4,8. Lad blandingen reagere i 60 min ved 60 °C. Lad prøverne køle ned til rumtemperatur.

6.4.2. Klaring

For prøver med et højt indhold af proteiner eller fedtstoffer foretages der klaring ved at tilføje 1 ml Carrez I (punkt 4.15) til prøveopløsningen. Efter omrystning tilføjes 1 ml Carrez II (punkt 4.16). Prøve omrystes igen.

6.4.3. Behandling i forbindelse med HPLC-analyse

Prøven i målekolben fortyndes ved at fylde op til mærket med vand, den homogeniseres og filtreres gennem et foldefilter (punkt 5.2). Prøveekstraktet opsamles.

Ekstrakterne filtreres gennem et sprøjtefilter (punkt 5.3) med en injektionssprøjte (punkt 5.6), der først er skyllet med ekstraktet. Filtratet omsamles i glas (punkt 5.4).

6.5. *Kromatografi*

HPLC-analysen gennemføres som normalt for sukker. Spor af maltose ved HPLC-analysen kan være tegn på, at stivelsen ikke er fuldstændigt omdannet, hvilket medfører en for lav udskillelse af glucose.

7. **Beregning og angivelse af resultater**

7.1. *Beregning af HPLC-resultater*

For beregningen af stivelsesindholdet er det nødvendigt med resultaterne af to HPLC-analyser, nemlig mængden af sukker til stede i prøven før (»frie sukkerarter«) og efter den enzymatiske behandling (som beskrevet i denne metode). Der foretages ligeledes en blindbestemmelse for at kunne korrigere for de sukkerarter, der er til stede i enzymerne.

I HPLC-analysen bestemmes toparealet efter integration, og koncentrationen beregnes efter kalibrering med referenceopløsningerne (punkt 4.14). Koncentrationen af glucose (g/100 ml) i blindprøven fratrækkes glucosekoncentrationen (g/100 ml) efter enzymatisk behandling. Eventuelt beregnes indholdet (g sukker/100 g prøve) af sukkerarter ud fra den vejede prøvemængde, hvilket resulterer i:

1) HPLC-analyse før enzymatisk behandling, der giver indholdet (g/100 g) af frie sukkerarter:

— glucose g

— fructose F

— saccharose S

2) HPLC-analyse efter enzymatisk behandling, der giver indholdet (g/100 g) af sukkerarter:

— glucose efter korrektion for blindprøven ($G_{e\ cor}$)

— fructose F_e

— saccharose S_e

7.2. *Beregning af stivelsesindholdet*

7.2.1. Beregning af det samlede glucoseindhold »Z«

Hvis mængden af fructose efter enzymatisk behandling (F_e) er højere end mængden af fructose før enzymatisk behandling (F), konverteres den saccharose, der er til stede i prøven, delvist til fructose og glucose. Dette betyder, at der skal foretages korrektion for den frigjorte glucose ($F_e - F$).

Z, det endelige glucoseindhold efter korrektion i g/100 g:

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

7.2.2. Beregning af det samlede glucoseindhold, der udtrykkes som stivelse

E, »stivelsesindhold« i g/100 g:

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

8. **Præcision**

Resultaterne af en ringtest af præcisionen af den metode, der anvendes for de 2 prøver, er beskrevet i dette punkt. De afspejler de krav for metoden, der er beskrevet i dette bilag.

Resultater af ringtesten (vejledende)

Der er i 2008 udført en ringtest med deltagelse af de europæiske toldmyndigheders laboratorier.

Evalueringen af præcisionsdata blev udført i overensstemmelse med »Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies«, W. Horwitz, (IUPAC teknisk rapport), Pure & Appl. Chem., Vol. 67, nr. 2, s. 331-343, 1995.

Præcisionsdataene er vist i nedenstående tabel.

Prøveemner **1 : chokolade og kiks** **2 : kiks**	**Z** **prøve 1**	**Z** **prøve 2**
Antal laboratorier	41	42
Antal laboratorier efter eliminering af laboratorier med afvigende resultater	38	39
Gennemsnit (%, m/m)	29,8	55,0
Standardafvigelse på repeterbarhed, sr (%, m/m)	0,5	0,5
Standardafvigelse på reproducerbarhed, sR (%, m/m)	1,5	2,3
Repeterbarhedsgrænse, r (%, m/m)	1,4	1,4
Reproducerbarhedsgrænse, R (%, m/m)	4,2	6,6«