VERORDNUNG (EU) Nr. 118/2010 DER KOMMISSION

vom 9. Februar 2010

zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 900/2008 zur Festlegung der Analysenmethoden und anderer technischer Bestimmungen für die Anwendung der Einfuhrregelung für bestimmte aus landwirtschaftlichen Erzeugnissen hergestellte Waren

DIE EUROPÄISCHE KOMMISSION —

gestützt auf den Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union,

gestützt auf die Verordnung (EWG) Nr. 2658/87 des Rates vom 23. Juli 1987 über die zolltarifliche und statistische Nomenklatur sowie den Gemeinsamen Zolltarif [1], insbesondere auf Artikel 9,

in Erwägung nachstehender Gründe:

(1) Die Verordnung (EG) Nr. 900/2008 der Kommission [2] enthält die Formeln, Verfahren und Methoden für die Bestimmung des Stärke-/Glucosegehalts für die Anwendung der Anhänge II und III der Verordnung (EG) Nr. 1460/96 der Kommission vom 25. Juli 1996 über die Modalitäten der Anwendung der Präferenzregelungen gemäß Artikel 7 der Verordnung (EG) Nr. 3448/93 des Rates [3] beim Handel mit bestimmten landwirtschaftlichen Verarbeitungserzeugnissen.

(2) Eine Gruppe von Sachverständigen hat geprüft, ob die Verordnung (EG) Nr. 900/2008 dem wissenschaftlichen und technischen Fortschritt bei den in ihr festgelegten Methoden Rechnung trägt. Die im Rahmen dieser Untersuchung durchgeführten Studien und Tests haben ergeben, dass die Bestimmung des Stärke-/Glucosegehalts nach Aufschluss mit von Natriumhydroxid (vor dem enzymatischen Abbau zu Glucose) und die Messung des Gesamtglucosegehalts nach der enzymatischen Methode mit Spektralphotometrie, wie sie zurzeit für die meisten Waren vorgeschrieben sind, die derzeitigen technischen Anforderungen nicht mehr erfüllen und daher aktualisiert werden müssen.

(3) Es empfiehlt sich daher vorzuschreiben, dass die Stärke/Glucose mithilfe von Amylase und Amyloglucosidase enzymatisch abgebaut und der Gesamtglucosegehalt durch Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) bestimmt werden muss, und darüber hinaus festzulegen, wie das enzymatische Verfahren durchzuführen ist.

(4) Die Verordnung (EG) Nr. 900/2008 sollte daher entsprechend geändert werden.

(5) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ausschusses für den Zollkodex —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Anhang I der Verordnung (EG) Nr. 900/2008 erhält die Fassung des Anhangs der vorliegenden Verordnung.

Artikel 2

Diese Richtlinie tritt am zwanzigsten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Union* in Kraft.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 9. Februar 2010

Für die Kommission
Der Präsident
José Manuel BARROSO

[1] ABl. L 256 vom 7.9.1987, S. 1.
[2] ABl. L 248 vom 17.9.2008, S. 8.
[3] ABl. L 187 vom 26.7.1996, S. 18.

ANHANG

„ANHANG I

Enzymatische Bestimmung von Stärke und ihren Abbauprodukten, einschließlich Glucose, in Lebensmitteln durch Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)

1. **Anwendungsbereich**

Diese Methode beschreibt die Bestimmung des Gehalts an Stärke und ihren Abbauprodukten, einschließlich Glucose, in Lebensmitteln, nachstehend ‚Stärke' genannt. Der Stärkegehalt wird bestimmt durch die quantitative Analyse von Glucose mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) nach enzymatischer Umwandlung der Stärke und ihrer Abbauprodukte in Glucose.

2. **Bestimmung des Gesamtglucosegehalts und des Gesamtglucosegehalts, ausgedrückt als Stärke**

Der Gesamtglucosegehalt entspricht dem unter Ziffer 7.2.1 berechneten Wert Z. Er steht für den Gehalt an Stärke und allen ihren Abbauprodukten, einschließlich Glucose.

Der Stärke-/Glucosegehalt im Sinne von Anhang III der Verordnung (EG) Nr. 1460/96 wird auf Basis des Gesamtglucosegehalts Z und gemäß Artikel 2 Nummer 1 dieser Verordnung berechnet.

Der in Spalte 3 von Anhang IV der Verordnung (EG) Nr. 1043/2005 der Kommission ([1]) angegebene Gehalt an Stärke (oder Dextrinen) wird auf Basis des Gesamtglucosegehalts Z und gemäß Artikel 2 Nummer 2.1 der Verordnung (EG) Nr. 904/2008 der Kommission ([2]) berechnet.

Der unter Ziffer 1 des vorliegenden Anhangs genannte Stärkegehalt entspricht dem gemäß Ziffer 7.2.2 berechneten Wert E. Er wird in % (m/m) ausgedrückt und ist dem Gesamtglucosegehalt Z, ausgedrückt als Stärke, gleichwertig. Der Wert E hat keinen Einfluss auf die oben genannten Berechnungen.

3. **Prinzip**

Die Proben werden homogenisiert und in Wasser suspendiert. Die Stärke und ihre Abbauprodukte, die in den Proben enthalten sind, werden in zwei Schritten enzymatisch in Glucose umgewandelt:

1. Stärke und ihre Abbauprodukte werden mithilfe von thermostabiler α-Amylase bei 90 °C teilweise in lösliche Glucoseketten gespalten. Damit die Reaktion störungsfrei abläuft, müssen die Proben vollständig aufgelöst sein oder als Suspension mit sehr kleinen Feststoffpartikeln vorliegen.

2. Die löslichen Glucoseketten werden mithilfe von Amyloglucosidase bei 60 °C zu Glucose hydrolysiert.

Produkte mit hohem Protein- oder Fettgehalt werden geklärt und filtriert.

Der Gehalt an Zuckern wird durch HPLC-Analyse bestimmt.

Da es unter Einwirkung der Enzyme zu einer partiellen Inversion von Saccharose kommen kann, werden die freien Zucker zwecks Berechnung des berichtigten Glucosegehalts ebenfalls mittels HPLC-Analyse bestimmt.

4. **Reagenzien und Geräte**

Zu verwenden sind Reagenzien von anerkannter Analysequalität und entmineralisiertes Wasser.

4.1. Glucose, mindestens 99 %

4.2. Fructose, mindestens 99 %

4.3. Saccharose, mindestens 99 %

4.4. Maltose-Monohydrat, mindestens 99 %

4.5. Lactose-Monohydrat, mindestens 99 %

4.6. Lösung von thermostabiler α-Amylase (1,4-α-D-Glucan-Glucanohydrolase) mit einer Aktivität von etwa 31 000 U/ml (1 U setzt bei pH 6,9 und 20 °C innerhalb von 3 Min. 1,0 mg Maltose aus Stärke frei). Dieses Enzym kann eine geringe Menge an Verunreinigungen (z. B. Glucose oder Saccharose) und anderen störenden Enzymen enthalten. Lagerung bei etwa 4 °C. Alternativ kann auch α-Amylase aus anderen Quellen verwendet werden, die eine Lösung mit vergleichbarer Enzymaktivität ergibt.

([1]) ABl. L 172 vom 5.7.2005, S. 24.
([2]) ABl. L 249 vom 18.9.2008, S. 9.

4.7. Amyloglucosidase (1,4-α-D-Glucan-Glucohydrolase) aus Aspergillus niger, Pulver mit einer Aktivität von etwa 120 U/mg oder etwa 70 U/mg (1 U setzt bei pH 4,8 und 60 °C pro Minute 1 Mikromol Glucose aus Stärke frei). Dieses Enzym kann eine geringe Menge an Verunreinigungen (z. B. Glucose oder Saccharose) und anderen störenden Enzymen (z. B. Invertase) enthalten. Lagerung bei etwa 4 °C. Alternativ kann auch Amyloglucosidase aus anderen Quellen verwendet werden, die eine Lösung mit vergleichbarer Enzymaktivität ergibt.

4.8. Zinkacetatdihydrat, p. a.

4.9. Kaliumhexacyanoferrat(II), $(K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O)$, reinst

4.10. Natriumacetat wasserfrei, p. a..

4.11. Essigsäure (Eisessig), 96 % (v/v)

4.12. Natriumacetatpuffer (0,2 mol/l). 16,4 g Natriumacetat (4.10) werden in ein Becherglas eingewogen, in Wasser aufgelöst und in einen 1 000-ml-Messkolben überführt. Die Lösung wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und der pH-Wert mit Essigsäure auf 4,7 eingestellt (mithilfe eines pH-Meters (5.7)). Diese Lösung ist bei 4 °C maximal 6 Monate haltbar.

4.13. Amyloglucosidaselösung. Aus dem Amyloglucosidasepulver (4.7) wird mithilfe des Natriumacetatpuffers (4.12) eine Lösung hergestellt. Die Enzymaktivität muss ausreichend hoch und auf den Stärkegehalt der Probe abgestimmt sein. (Beispiel: Eine Aktivität von 600 U/ml wird erzielt durch 0,5 g Amyloglucosidasepulver 120 U/mg (4.7) in einem Endvolumen von 100 ml für 1 g Stärke in der Probe). Die Lösung muss immer frisch angesetzt werden.

4.14. Referenzlösungen. Für die HPLC-Analyse der Zucker werden die üblicherweise verwendeten Lösungen von Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose und Lactose in Wasser hergestellt.

4.15. Klärungsreagenz (Carrez I). 219,5 g Zinkacetat (4.8) werden in einem Becherglas in Wasser aufgelöst. Die Lösung wird in einen 1 000-ml-Messkolben überführt und mit 30 ml Essigsäure versetzt (4.11). Nach gründlichem Mischen wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur bis zu 6 Monate haltbar. Es können auch andere, der Carrez-Lösung äquivalente Klärungsreagenzien verwendet werden.

4.16. Klärungsreagenz (Carrez II). 106,0 g Kaliumhexacyanoferrat (II) (4.9) werden in einem Becherglas in Wasser aufgelöst und in einen 1 000-ml-Messkolben überführt. Die Lösung wird gründlich gemischt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur bis zu 6 Monate haltbar. Es können auch andere, der Carrez-Lösung äquivalente Klärungsreagenzien verwendet werden.

4.17. Mobile Phase für die HPLC: Es wird das üblicherweise bei der HPLC-Analyse von Zuckern gebräuchliche Fließmittel hergestellt. Bei Verwendung einer Aminopropylkieselgelsäule z. B. dient als mobile Phase in der Regel eine Mischung aus HPLC-Wasser und Acetonitril.

5. **Geräte**

5.1. Standardlaborglasgeräte

5.2. Faltenfilter, z. B. 185 mm

5.3. Spritzenfilter, 0,45 µm, für wässrige Lösungen geeignet

5.4. Probengläschen, geeignet für HPLC-Probengeber

5.5 Messkolben, 100 ml

5.6. Kunststoffspritzen, 10 ml

5.7. pH-Meter

5.8. Analysenwaage

5.9. Wasserbad mit Thermostat, einstellbar auf 60 °C und 90 °C.

5.10. Für die Analyse von Zuckern geeignete HPLC-Anlage.

6. **Verfahren**

6.1. *Vorbereitung der Probe für verschiedene Produktarten*

Das Produkt wird homogenisiert.

6.2. *Probeneinwaage*

Die Probeneinwaage wird anhand der Zutatenliste und der Bedingungen der HPLC-Analyse (Konzentration der Glucosereferenzlösung) geschätzt und beträgt höchstens:

$$\text{Probeneinwaage (g)} = \frac{\text{Volumen des Messkolbens (z. B. 100 ml)}}{\text{Geschätzter Stärkegehalt (\%)}}$$

Die Probe wird auf 0,1 mg genau eingewogen.

6.3. *Blindwert*

Für die Bestimmung des Blindwerts wird eine vollständige Analyse (wie unter 6.4 beschrieben) ohne Zugabe einer Probe durchgeführt. Das Ergebnis der Blindprobe wird zur Berechnung des Stärkegehalts verwendet (7.2).

6.4. *Analyse*

6.4.1. Vorbereitung der Proben

Die Proben werden durch Schütteln oder Rühren homogenisiert. Die Probe wird in einen Messkolben (5.5) eingewogen (6.2) und mit etwa 70 ml warmem Wasser versetzt.

Nach Zugabe von 50 Mikroliter thermostabiler α-Amylase (4.6) wird die Lösung oder Suspension 30 Min. bei 90 °C im Wasserbad (5.9) erhitzt. Anschließend wird sie so schnell wie möglich im Wasserbad auf 60 °C abgekühlt und mit 5 ml Amyloglucosidaselösung (4.13) versetzt. Bei Probenmatrices, die den pH-Wert der Reaktionslösung beeinflussen könnten, wird der pH-Wert überprüft und erforderlichenfalls auf 4,6 bis 4,8 eingestellt. Man lässt die Proben 60 Min. bei 60 °C reagieren und kühlt sie anschließend auf Raumtemperatur ab.

6.4.2. Klärung

Für Proben mit einem hohen Protein- oder Fettgehalt ist eine Carrez-Klärung erforderlich. Nach Zugabe von 1 ml Carrez I (4.15) wird die Probelösung geschüttelt und mit 1 ml Carrez II (4.16) versetzt. Die Probe wird nochmals geschüttelt.

6.4.3. Vorbereitung für die HPLC-Analyse

Die Probe im Messkolben wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt, geschüttelt und durch ein Faltenfilter (5.2) filtriert. Das Filtrat wird aufgefangen.

Die Probenfiltrate werden mit einer Spritze (5.6), die mit dem jeweiligen Filtrat vorgespült wurde, durch ein Spritzenfilter (5.3) filtriert. Diese Filtrate werden in Probegläsern (5.4) aufgefangen.

6.5. *Chromatografie*

Die HPLC wird wie bei der Analyse von Zuckern üblich durchgeführt. Sollte die Analyse Spuren von Maltose ergeben, so ist die Stärke unvollständig abgebaut, was zu einem zu niedrigen Wert für Glucose führt.

7. **Berechnung und Darstellung der Ergebnisse**

7.1. *Berechnung der HPLC-Ergebnisse*

Für die Berechnung des Stärkegehalts werden die Ergebnisse von zwei HPLC-Analysen benötigt, nämlich die der Zucker, die vor der Enzymbehandlung in der Probe enthalten sind („freie Zucker"), und die der Zucker, die nach der Enzymbehandlung (wie in dieser Methode beschrieben) enthalten sind. Außerdem ist eine Blindwertbestimmung durchzuführen, damit das Ergebnis um die in den Enzymen enthaltenen Zucker korrigiert werden kann.

Bei der HPLC-Analyse wird die Peak-Fläche nach der Integration bestimmt, und die Konzentration wird nach Kalibrierung mit den Referenzlösungen (4.14) berechnet. Die bei der Blindwertbestimmung ermittelte Glucosekonzentration (g/100 ml) wird von der Glucosekonzentration (g/100 ml) nach Enzymbehandlung abgezogen. Schließlich wird der Zuckergehalt (g Zucker/100 g Probe) unter Zugrundelegung der Probeneinwaage berechnet, was zu folgenden Ergebnissen führt:

1. Die HPLC-Analyse vor der Enzymbehandlung ergibt den Gehalt (g/100 g) an freien Zuckern:

   — Glucose G

   — Fructose F

   — Saccharose S

2. Die HPLC-Analyse nach der Enzymbehandlung ergibt den Gehalt (g/100 g) an Zuckern:

   — Glucose nach Berichtigung um den Blindwert ($G_{e\ cor}$)

   — Fructose F_e

   — Saccharose S_e

7.2. *Berechnung des Stärkegehalts*

7.2.1. Berechnung der Gesamtglucose ‚Z'

Ist die Fructosemenge nach der Enzymbehandlung (F_e) höher als die Fructosemenge vor der Enzymbehandlung (F), wurde die in der Probe vorhandene Saccharose teilweise in Fructose und Glucose invertiert. Das bedeutet, dass eine Berichtigung um die freigesetzte Glucose vorgenommen werden muss ($F_e - F$).

Z, endgültiger Glucosegehalt nach Berichtigung in g/100 g:

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

7.2.2. Berechnung des Gesamtglucosegehalts, ausgedrückt als Stärke

E, ‚Stärke'-Gehalt in g/100 g:

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

8. **Präzision**

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse einer Laborvergleichsuntersuchung an zwei Proben erläutert, bei der Präzisionsdaten zu der Methode ermittelt wurden. Die Präzisionsdaten spiegeln die Leistungsanforderungen an die im vorliegenden Anhang beschriebene Methode wider.

Ergebnisse eines Laborvergleichstests (zur Information)

2008 wurde eine Laborvergleichsstudie durchgeführt, an der die europäischen Zolllabore teilnahmen.

Die Ermittlung der Präzisionsdaten erfolgte nach dem ‚Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies', W. Horwitz (IUPAC technical report), Pure & Appl. Chem., Vol. 67, Nº2, PP.331-343, 1995.

Die Präzisionsdaten sind in der nachstehenden Tabelle angegeben.

Proben **1 : Schokolade-Keks-Riegel** **2 : Keks**	**Z** **Probe 1**	**Z** **Probe 2**
Anzahl der Labore	41	42
Anzahl der Labore ohne Ausreißer	38	39
Mittelwert (%, m/m)	29,8	55,0
Wiederholbarkeit Standardabweichung sr (%, m/m)	0,5	0,5
Reproduzierbarkeit Standardabweichung sR (%, m/m)	1,5	2,3
Wiederholgrenze r (%, m/m)	1,4	1,4
Reproduzierbarkeitsgrenze R (%, m/m)	4,2	6,6“