RÈGLEMENT (UE) Nº 118/2010 DE LA COMMISSION

du 9 février 2010

modifiant le règlement (CE) nº 900/2008 définissant les méthodes d'analyse et autres dispositions de caractère technique nécessaires pour l'application du régime d'importation de certaines marchandises résultant de la transformation de produits agricoles

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (CEE) nº 2658/87 du Conseil du 23 juillet 1987 relatif à la nomenclature tarifaire et statistique et au tarif douanier commun [1], et notamment son article 9,

Considérant ce qui suit:

(1) Le règlement (CE) nº 900/2008 de la Commission [2] définit les formules, procédures et méthodes à utiliser pour la détermination de la teneur en amidon/glucose pour l'application des annexes II et III du règlement (CE) nº 1460/96 de la Commission du 25 juillet 1996 établissant les modalités d'application des régimes d'échanges préférentiels, applicables à certaines marchandises résultant de la transformation de produits agricoles, visés à l'article 7 du règlement (EC) nº 3448/93 [3].

(2) Le règlement (CE) nº 900/2008 a été examiné par un groupe d'experts, en vue d'évaluer si ce règlement prend en compte l'évolution scientifique et technologique des méthodes définies dans ce règlement. Des études et des essais réalisés dans le cadre de cet examen indiquent que la détermination de la teneur en amidon/glucose par solubilisation au moyen d'hydroxyde de sodium (avant dégradation enzymatique pour obtenir du glucose) et la mesure de la teneur totale en glucose au moyen de la méthode enzymatique avec spectrophotométrie, conformément à ce qui est prescrit pour la plupart des marchandises à l'heure actuelle, ne répondent plus aux exigences techniques actuelles et doivent donc être mises à jour.

(3) Il convient donc de prévoir que la dégradation de l'amidon/du glucose doit être réalisée de manière enzymatique par l'amylase et l'amyloglucocidase et que la teneur totale en glucose doit être déterminée en utilisant la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), et il y a lieu de spécifier les modalités d'exécution de la méthode enzymatique.

(4) Il convient donc de modifier le règlement (CE) nº 900/2008 en conséquence.

(5) Les mesures prévues dans le présent règlement sont conformes à l'avis du comité du code des douanes,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

L'annexe I du règlement (CE) nº 900/2008 est remplacé par le texte figurant à l'annexe du présent règlement.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 9 février 2010.

Par la Commission
Le président
José Manuel BARROSO

[1] JO L 256 du 7.9.1987, p. 1.
[2] JO L 248 du 17.9.2008, p. 8.
[3] JO L 187 du 26.7.1996, p. 18.

ANNEXE

«ANNEXE I

Détermination enzymatique de la teneur en amidon et en ses produits de dégradation, y compris le glucose, dans des produits alimentaires au moyen de la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

1. **Domaine d'application**

Cette méthode décrit la détermination de la teneur en amidon et en ses produits de dégradation, y compris le glucose dans des produits alimentaires destinés à la consommation humaine, soit "amidon". La teneur en amidon est déterminée à partir de l'analyse quantitative du glucose par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) après conversion enzymatique de l'amidon et de ses produits de dégradation en glucose.

2. **Définition de la teneur totale en glucose et de la teneur totale en glucose exprimée en amidon**

On entend par teneur totale en glucose la valeur Z telle qu'elle est calculée au point 7.2.1 de la présente annexe. Elle représente la teneur en amidon et en la totalité de ses produits de dégradation, y compris le glucose.

La teneur en amidon/glucose définie à l'annexe III du règlement (CE) nº 1460/96 est calculée sur la base de la teneur totale en glucose Z et conformément aux dispositions de l'article 2, point 1, du présent règlement.

La teneur en amidon (ou dextrines) visée à la colonne 3 de l'annexe IV du règlement (CE) nº 1043/2005 [1] est calculée sur la base de la teneur totale en glucose Z définie à l'article 2, point 2.1, du règlement (CE) nº 904/2008 [2].

On entend, par teneur en amidon visée au point 1 de la présente annexe, la valeur E, calculée au point 7.2.2 de la présente annexe. Elle est exprimée en % (m/m). Elle est équivalente à la teneur totale en glucose Z, exprimée en amidon. Cette valeur E n'intervient pas dans les calculs précités.

3. **Principes**

Les échantillons sont homogénéisés et suspendus dans l'eau. L'amidon et ses produits de dégradation présents dans les échantillons sont convertis de façon enzymatique en glucose en deux étapes:

1) l'amidon et ses produits de dégradation sont partiellement convertis en chaînes de glucose soluble au moyen d'alpha-amylase thermostable à 90 °C. Pour une conversion effective, il est nécessaire que les échantillons soient complètement dissous ou présents sous forme d'une suspension contenant des parties solides de très petite taille;

2) les chaînes de glucose soluble sont converties en glucose au moyen d'amyloglucosidase à 60 °C.

Les produits ayant une teneur élevée en protéines ou graisses sont clarifiés et filtrés.

La détermination des sucres est réalisée par analyse CLHP.

Parce qu'il peut se produire une inversion du sucrose au cours du traitement enzymatique, la détermination des sucres libres est aussi réalisée par analyse CLHP pour calculer la teneur corrigée en glucose.

4. **Réactifs et autres matériaux**

Utiliser des réactifs d'une classe analytique reconnue et de l'eau déminéralisée.

4.1. Glucose, minimum 99 %.

4.2. Fructose, minimum 99 %.

4.3. Sucrose, minimum 99 %.

4.4. Maltose-monohydraté, minimum 99 %.

4.5. Lactose-monohydraté, minimum 99 %.

4.6. Solution d'alpha-amylase thermostable (1,4-alpha-D-Glucan-glucanohydrolase), avec une activité de l'ordre de 31 000 U/ml (1U libère 1,0 mg de maltose de l'amidon en 3 minutes, avec un pH de 6,9 et à 20 °C). Cet enzyme peut contenir un faible volume d'impuretés (par exemple, du glucose ou du sucrose) et d'autres enzymes interférents. Stockage à environ 4 °C. Comme solution de rechange, d'autres sources d'alpha-amylase peuvent être utilisées en fournissant une solution finale avec une activité enzymatique comparable.

[1] JO L 172 du 5.7.2005, p. 24.
[2] JO L 249 du 18.9.2008, p. 9.

4.7. Amyloglucosidase (1,4-alpha-D-Glucan glucohydrolase) à partir d'*Aspergillus niger*, poudre d'une activité d'environ 120 U/mg ou environ 70 U/mg (1 U libère 1 micromol de glucose de l'amidon par minute avec un pH de 4,8 et à 60 °C). Cet enzyme peut contenir un faible volume d'impuretés (par exemple, du glucose ou du sucrose) et d'autres enzymes interférents (par exemple, de l'invertase). Stockage à environ 4 °C. Comme solution de rechange, d'autres sources d'amyloglucosidase peuvent être utilisées en fournissant une solution finale avec une activité enzymatique comparable.

4.8. Acétate de zinc dihydraté, p.a.

4.9. Hexacyanoferrate de potassium (II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), extra-pur.

4.10. Acétate de sodium anhydre, p.a.

4.11. Acide acétique glacial, 96 % (v/v) (minimum).

4.12. Tampon d'acétate de sodium (0,2 mol/l). Peser 16,4 grammes d'acétate de sodium (point 4.10) dans un bécher. Les dissoudre dans de l'eau et les transvaser avec les eaux de rinçage dans une fiole jaugée de 1 000 ml. Porter au volume avec de l'eau et ajuster le pH à 4,7 à l'aide d'acide acétique [au moyen d'un pH-mètre (point 5.7)]. Cette solution peut être utilisée au maximum pendant six mois si elle est stockée à 4 °C.

4.13. Solution d'amyloglucosidase. Préparer une solution d'amyloglucosidase en poudre (point 4.7), au moyen d'un tampon d'acétate de sodium (point 4.12). L'activité enzymatique doit être suffisante et conforme à la teneur en amidon dans la quantité d'échantillon [par exemple, une activité d'environ 600 U/ml est obtenue à partir de 0,5 g d'amyloglucosidase en poudre à 120 U/mg (point 4.7) dans un volume final de 100 ml pour 1 g d'amidon dans la quantité d'échantillon]. À préparer immédiatement avant utilisation.

4.14. Solutions de référence. Préparer des solutions de glucose, de fructose, de sucrose, de maltose et de lactose dans de l'eau, telles qu'elles sont utilisées conventionnellement pour l'analyse CLHP de sucres.

4.15. Réactif pour la clarification (Carrez I). Dans un bécher, dissoudre 219,5 grammes d'acétate de zinc (point 4.8) dans de l'eau. Les transvaser avec les eaux de rinçage dans une fiole jaugée de 1 000 ml et ajouter 30 ml d'acide acétique (point 4.11). Bien mélanger et porter au volume avec de l'eau. Cette solution peut être utilisée au maximum pendant six mois si elle est stockée à température ambiante. D'autres réactifs de clarification équivalents à la solution de Carrez peuvent être utilisés.

4.16. Réactif pour la clarification (Carrez II). Dans un bécher, dissoudre 106,0 grammes d'hexacyanoferrate de potassium (II) (point 4.9) dans de l'eau. Les transvaser avec les eaux de rinçage dans une fiole jaugée de 1 000 ml. Bien mélanger et porter au volume avec de l'eau. Cette solution peut être utilisée au maximum pendant six mois si elle est stockée à température ambiante. D'autres réactifs de clarification équivalents à la solution de Carrez peuvent être utilisés.

4.17. Phase mobile CLHP. Préparer une phase mobile qui est conventionnellement utilisée pour l'analyse des sucres par la CLHP. Si on utilise une colonne de gel de silice amynopropile, par exemple, un mélange d'eau et d'acétonitrile est une phase mobile courante.

5. **Appareils**

5.1. Verrerie de laboratoire standard.

5.2. Filtres plissés, par exemple, 185 mm.

5.3. Filtres à seringue, 0,45 µm, convenant pour les solutions aqueuses.

5.4. Tubes à échantillons convenant au passeur d'échantillons utilisé dans le cadre de la CLHP.

5.5. Fioles jaugées de 100 ml.

5.6. Seringues en plastique, 10 ml.

5.7. pH-mètre.

5.8. Balance d'analyse.

5.9. Bain-marie avec thermostat, réglable à 60 °C et 90 °C.

5.10. Appareils à CLHP pour l'analyse des sucres.

6. **Procédure**

6.1. *Préparation de l'échantillon pour différents types de produits*

Le produit est homogénéisé.

6.2. *Portion de l'échantillon*

La quantité d'échantillon est estimée à partir de la déclaration des ingrédients et des conditions de l'analyse CLHP (concentration de la solution de référence du glucose) et ne dépasse pas:

$$\text{quantité de l'échantillon (g)} = \frac{\text{volume de la fiole jaugée (parexemple, 100ml)}}{\text{teneur en amidon estimée (\%)}}$$

Peser l'échantillon avec une précision de 0,1 mg.

6.3. *Essai à blanc*

L'essai à blanc consiste à accomplir une analyse complète (décrite au point 6.4), sans ajouter l'échantillon. Son résultat est utilisé pour calculer la teneur en amidon (point 7.2).

6.4. *Analyse*

6.4.1. Préparation des échantillons

Mélanger l'échantillon en le secouant ou en le remuant. La portion d'essai choisie (point 6.2) est transvasée dans une fiole jaugée (point 5.5) avec environ 70 ml d'eau chaude.

Après dissolution ou suspension, ajouter 50 microlitres d'alpha-amylase thermostable (point 4.6) et chauffer à 90 °C pendant 30 minutes dans un bain-marie (point 5.9). Refroidir aussi vite que possible à 60 °C dans un bain-marie et ajouter 5 ml d'une solution d'amyloglucosidase (point 4.13). Pour des échantillons qui pourraient influencer le pH de la solution de réaction, contrôler le pH et l'ajuster à 4,6-4,8, au besoin. Laisser réagir pendant 60 minutes à 60 °C. Refroidir les échantillons à la température ambiante.

6.4.2. Clarification

Pour les échantillons avec une forte teneur en protéines ou graisses, la clarification est nécessaire en ajoutant 1 ml de Carrez I (point 4.15) à la solution d'échantillon. Après avoir secoué, ajouter 1 ml de Carrez II (point 4.16). Secouer l'échantillon à nouveau.

6.4.3. Traitement pour analyse CLHP

L'échantillon dans la fiole jaugée est dilué jusqu'au trait de jauge avec de l'eau, homogénéisée et filtrée dans un filtre plissé (point 5.2). Collecter l'extrait d'échantillon.

Filtrer les extraits au moyen d'un filtre à seringue (point 5.3) avec une seringue (point 5.6) qui a fait l'objet d'un lavage préalable à l'aide de l'extrait. Collecter le filtrat dans des tubes (point 5.4).

6.5. *Chromatographie*

La CLHP est habituellement réalisée pour l'analyse des sucres. Si l'analyse CLHP révèle des traces de maltose, cela peut être un signe de la conversion incomplète de l'amidon, qui se traduit par une récupération trop faible du glucose.

7. **Calcul et expression des résultats**

7.1. *Calcul des résultats de la CLHP*

Pour le calcul de la teneur en amidon, les résultats de deux analyses CLHP sont nécessaires, à savoir les sucres présents dans l'échantillon avant "sucres libres" et après traitement enzymatique (conformément à la description de la présente méthode). Il faut aussi procéder à une détermination à blanc pour être en mesure de corriger les sucres présents dans les enzymes.

Dans l'analyse CLHP, la zone de pic est déterminée par intégration, et la concentration est calculée après calibrage avec des solutions de référence (point 4.14). À partir de la concentration de glucose (g/100 ml) après traitement enzymatique, la concentration de glucose (g/100 ml) dans l'essai à blanc est soustraite. En fin de compte, la teneur (g de sucre/100 g d'échantillon) en sucre est calculée au moyen de la quantité d'échantillon pesée, ce qui donne:

1) Analyse CLHP avant traitement enzymatique, fournissant la teneur (g/100 g) en sucres libres:

— glucose G

— fructose F

— sucrose S

2) Analyse CLHP après traitement enzymatique, donnant la teneur (g/100 g) en sucres:

— glucose après correction de l'essai à blanc ($G_{e\ cor}$)

— fructose F_e

— sucrose S_e

7.2. *Calcul de la teneur en amidon*

7.2.1. Calcul de la teneur totale en glucose "Z"

Si la quantité de fructose après traitement enzymatique (F_e) est supérieure à la quantité de fructose avant traitement enzymatique (F), le sucrose présent dans l'échantillon est alors en partie converti en fructose et en glucose. Cela signifie qu'une correction doit être opérée pour le glucose libéré ($F_e - F$).

Z, teneur finale en glucose après correction en g/100 g:

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

7.2.2. Calcul de la teneur totale en glucose exprimée en amidon

E, teneur en amidon en g/100 g:

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

8. **Précision**

Les détails d'un essai interlaboratoire sur la précision de la méthode appliquée sur deux échantillons sont résumés sous ce point. Ils reflètent les exigences de performance pour la méthode décrite dans la présente annexe.

Résultats d'un essai interlaboratoire (à titre d'information)

Un essai interlaboratoire a été réalisé, en 2008, avec la participation des laboratoires douaniers européens.

L'évaluation de la précision a été réalisée conformément au texte intitulé "Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies", W. Horwitz, (IUPAC technical report), Pure & Appl. Chem., vol. 67, nº 2, pp. 331-343, 1995.

Les données relatives à la précision de la méthode sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Échantillons **1 : biscuit chocolaté en barre** **2 : biscuit**	**Z** **échantillon 1**	**Z** **échantillon 2**
Nombre de laboratoires	41	42
Nombre de laboratoires retenus après élimination des cas extrêmes	38	39
Moyenne (%, m/m)	29,8	55,0
Écart-type de répétabilité (s_r) (%, m/m)	0,5	0,5
Écart-type de reproductibilité (s_R) (%, m/m)	1,5	2,3
Limite de répétabilité (r) (%, m/m)	1,4	1,4
Limite de reproductibilité (R) (%, m/m)	4,2	6,6»