# VERORDENING (EU) Nr. 118/2010 VAN DE COMMISSIE

## van 9 februari 2010

## tot wijziging van Verordening (EG) nr. 900/2008 tot vaststelling van de analysemethoden en andere bepalingen van technische aard die noodzakelijk zijn voor de toepassing van de invoerregeling voor bepaalde goederen, verkregen door verwerking van landbouwproducten

DE EUROPESE COMMISSIE,

Gelet op het Verdrag betreffende de werking van de Europese Unie,

Gelet op Verordening (EEG) nr. 2658/87 van de Raad van 23 juli 1987 met betrekking tot de tarief- en statistieknomenclatuur en het gemeenschappelijk douanetarief [1], en met name op artikel 9,

Overwegende hetgeen volgt:

(1) In Verordening (EG) nr. 900/2008 van de Commissie [2] zijn de formules, procedures en methoden vastgesteld voor de bepaling van het zetmeel/glucosegehalte voor de toepassing van de bijlagen II en III bij Verordening (EG) nr. 1460/96 van de Commissie van 25 juli 1996 tot vaststelling van de uitvoeringsbepalingen van de preferentiële handelsregelingen voor bepaalde, door verwerking van landbouwproducten verkregen goederen, bedoeld in artikel 7 van Verordening (EG) nr. 3448/93 van de Raad [3].

(2) Een groep deskundigen heeft Verordening (EG) nr. 900/2008 onderzocht om te beoordelen of hierin rekening wordt gehouden met de wetenschappelijke en technologische ontwikkeling van de in die verordening vastgelegde methoden. Uit studies en tests in het kader van dit onderzoek blijkt dat de bepaling van het zetmeel/glucosegehalte door oplossen met behulp van natriumhydroxide (vóór de enzymatische afbraak tot glucose) en de meting van het totale glucosegehalte met de enzymatische methode en spectrofotometrie, die nu voor de meeste goederen zijn voorgeschreven, niet langer aan de huidige technische eisen voldoen en derhalve moeten worden geactualiseerd.

(3) Daarom moet worden vastgelegd dat de afbraak van zetmeel/glucose op enzymatische wijze met amylase en amyloglucosidase moet worden uitgevoerd en dat het totale glucosegehalte met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC) moet worden bepaald, en moet worden gespecificeerd hoe de enzymatische methode moet worden uitgevoerd.

(4) Verordening (EG) nr. 900/2008 moet daarom dienovereenkomstig worden gewijzigd.

(5) De bepalingen van deze verordening zijn in overeenstemming met het advies van het Comité douanewetboek,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

*Artikel 1*

Bijlage I bij Verordening (EG) nr. 900/2008 wordt vervangen door de tekst in de bijlage bij deze verordening.

*Artikel 2*

Deze verordening treedt in werking op de twintigste dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke lidstaat.

Gedaan te Brussel, 9 februari 2010.

*Voor de Commissie*
*De voorzitter*
José Manuel BARROSO

---

[1] PB L 256 van 7.9.1987, blz. 1.
[2] PB L 248 van 17.9.2008, blz. 8.
[3] PB L 187 van 26.7.1996, blz. 18.

*BIJLAGE*

*„BIJLAGE I*

**Enzymatische bepaling van zetmeel en afbraakproducten van zetmeel alsmede glucose in voedingsmiddelen met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC)**

1. **Toepassingsgebied**

Deze methode beschrijft hoe het gehalte aan zetmeel en afbraakproducten van zetmeel, alsmede glucose, in voedingsmiddelen voor menselijke consumptie, hierna „zetmeel" genoemd, moet worden bepaald. Het zetmeelgehalte wordt bepaald door de kwantitatieve analyse van glucose met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC) na de enzymatische omzetting van zetmeel en afbraakproducten van zetmeel tot glucose.

2. **Definitie van het totale glucosegehalte en het totale glucosegehalte uitgedrukt als zetmeel**

Het totale glucosegehalte is de waarde Z zoals berekend in punt 7.2.1 van deze bijlage. Het staat voor het gehalte aan zetmeel en alle afbraakproducten van zetmeel, alsmede glucose.

Het zetmeel/glucosegehalte zoals gedefinieerd in bijlage III bij Verordening (EG) nr. 1460/96 wordt berekend op basis van het totale glucosegehalte Z, zoals vastgelegd in artikel 2, punt 1, van deze verordening.

Het gehalte aan zetmeel (of dextrines) zoals bedoeld in kolom 3 van bijlage IV bij Verordening (EG) nr. 1043/2005 van de Commissie [1] wordt berekend op basis van het totale glucosegehalte Z, zoals vastgelegd in artikel 2, punt 2.1, van Verordening (EG) nr. 904/2008 van de Commissie [2].

Met het in punt 1 van deze bijlage genoemde zetmeelgehalte wordt de waarde E bedoeld, zoals berekend in punt 7.2.2 van deze bijlage. Het wordt uitgedrukt in % (m/m). Het komt overeen met het totale glucosegehalte Z, uitgedrukt als zetmeel. Deze waarde E is niet van invloed op de bovengenoemde berekeningen.

3. **Principe**

De monsters worden gehomogeniseerd en in water gesuspendeerd. Het zetmeel en de afbraakproducten van zetmeel in de monsters worden in twee stappen enzymatisch in glucose omgezet:

1. Het zetmeel en de afbraakproducten van zetmeel worden bij 90 °C met behulp van thermostabiele alfa-amylase gedeeltelijk in oplosbare glucoseketens omgezet. Voor een effectieve omzetting moeten de monsters volledig worden opgelost of in de vorm van een suspensie met heel kleine vaste deeltjes aanwezig zijn.

2. De oplosbare glucoseketens worden bij 60 °C met behulp van amyloglucosidase in glucose omgezet.

Producten met een hoog gehalte aan eiwitten of vetten worden geklaard en gefiltreerd.

De bepaling van suikers wordt met behulp van HPLC-analyse uitgevoerd.

Aangezien tijdens de enzymatische behandeling een gedeeltelijke inversie van sacharose kan plaatsvinden, wordt ook het gehalte aan vrije suikers met behulp van HPLC bepaald om het gecorrigeerde glucosegehalte te berekenen.

4. **Reagentia en andere materialen**

Gebruik reagentia van p.a.-kwaliteit en gedemineraliseerd water.

4.1. Glucose, minimaal 99 %.

4.2. Fructose, minimaal 99 %.

4.3. Sacharose, minimaal 99 %.

4.4. Maltosemonohydraat, minimaal 99 %.

4.5. Lactosemonohydraat, minimaal 99 %.

4.6. Oplossing van thermostabiele alfa-amylase (1,4-alfa-D-glucanglucanohydrolase) met een activiteit van circa 31 000 U/ml (1U maakt bij een pH van 6,9 en 20 °C in 3 minuten 1,0 mg maltose uit zetmeel vrij). Dit enzym kan een gering gehalte aan onzuiverheden (bv. glucose of sacharose) en andere storende enzymen bevatten. Bewaren bij ongeveer 4 °C. Ook kunnen andere bronnen van alfa-amylase worden gebruikt die een uiteindelijke oplossing met een vergelijkbare enzymactiviteit opleveren.

[1] PB L 172 van 5.7.2005, blz. 24.
[2] PB L 249 van 18.9.2008, blz. 9.

4.7. Amyloglucosidase (1,4-alfa-D-glucanglucohydrolase) uit *Aspergillus niger*, een poeder met een activiteit van circa 120 U/mg of circa 70 U/mg (1U maakt bij een pH van 4,8 en 60 °C per minuut 1 micromol glucose uit zetmeel vrij). Dit enzym kan een gering gehalte aan onzuiverheden (bv. glucose of sacharose) en andere storende enzymen (bv. invertase) bevatten. Bewaren bij ongeveer 4 °C. Ook kunnen andere bronnen van amyloglucosidase worden gebruikt die een uiteindelijke oplossing met een vergelijkbare enzymactiviteit opleveren.

4.8. Zinkacetaat-dihydraat, p.a.

4.9. Kaliumhexacyanoferraat(II) ($K_4[Fe(CN)]_6.3H_2O$), extra zuiver.

4.10. Natriumacetaat, watervrij, p.a.

4.11. IJsazijn, (ten minste) 96 % (V/V).

4.12. Natriumacetaatbuffer (0,2 mol/l). Weeg 16,4 g natriumacetaat (punt 4.10) af in een bekerglas. Los dit op in water en breng kwantitatief over in een maatkolf van 1 000 ml. Verdun tot de maatstreep met water en breng de pH met azijnzuur op 4,7 (m.b.v. een pH-meter (punt 5.7)). Deze oplossing kan maximaal 6 maanden worden gebruikt, indien bewaard bij 4 °C.

4.13. Amyloglucosidase-oplossing. Bereid een oplossing van amyloglucosidasepoeder (punt 4.7) met behulp van natriumacetaatbuffer (punt 4.12). De enzymactiviteit moet voldoende zijn en overeenkomen met het zetmeelgehalte in het monster (een activiteit van circa 600 U/ml wordt bijvoorbeeld verkregen uit 0,5 mg amyloglucosidasepoeder 120 U/mg (punt 4.7) in een volume van in totaal 100 ml voor 1 g zetmeel in de hoeveelheid monster). Onmiddellijk voor gebruik bereiden.

4.14. Referentieoplossingen. Bereid oplossingen van glucose, fructose, sacharose, maltose en lactose in water, zoals gangbaar bij gebruik voor HPLC-analyse van suikers.

4.15. Reagens voor klaring (Carrez I). Los 219,5 g zinkacetaat (punt 4.8) in een bekerglas op in water. Breng kwantitatief over in een maatkolf van 1 000 ml en voeg 30 ml azijnzuur toe (punt 4.11). Meng grondig en verdun tot de maatstreep met water. Deze oplossing kan maximaal 6 maanden worden gebruikt, indien bewaard bij kamertemperatuur. Ook andere klaringsreagentia die gelijkwaardig zijn aan de Carrez-oplossing, kunnen worden gebruikt.

4.16. Reagens voor klaring (Carrez II). Los 106,0 g kaliumhexacyanoferraat(II) (punt 4.9) in een bekerglas op in water. Breng kwantitatief over in een maatkolf van 1 000 ml. Meng grondig en verdun tot de maatstreep met water. Deze oplossing kan maximaal 6 maanden worden gebruikt, indien bewaard bij kamertemperatuur. Ook andere klaringsreagentia die gelijkwaardig zijn aan de Carrez-oplossing, kunnen worden gebruikt.

4.17. HPLC-mobiele fase. Bereid een mobiele fase die gangbaar is voor gebruik bij HPLC-analyse van suikers. Wanneer een aminopropyl-silicagelkolom wordt gebruikt, is een mengsel van water van HPLC-kwaliteit en acetonitril bijvoorbeeld een gangbare mobiele fase.

5. **Apparatuur**

5.1. Standaardlaboratoriumglaswerk.

5.2. Vouwfilters, bv. 185 mm.

5.3. Spuitfilters, 0,45 µm, geschikt voor waterige oplossingen.

5.4. Monsterflesjes, geschikt voor de HPLC-autosampler.

5.5. Maatkolven, 100 ml.

5.6. Plastic spuiten, 10 ml.

5.7. pH-meter.

5.8. Analytische balans.

5.9. Waterbad met thermostaat, instelbaar op 60 en 90 °C.

5.10. Voor de analyse van suikers geschikte HPLC-apparatuur.

6. **Procedure**

6.1. *Voorbereiding van het monster voor bepaalde soorten producten*

Het product wordt gehomogeniseerd.

6.2. *Monsterhoeveelheid*

De hoeveelheid monster wordt op basis van de lijst van ingrediënten en de condities van de HPLC-analyse (concentratie van de referentieoplossing voor glucose) geraamd en mag niet groter zijn dan:

$$\text{hoeveelheid monster (g)} = \frac{\text{volume van de maatkolf (bv. 100 ml)}}{\text{geraamd zetmeelgehalte (\%)}}$$

Het monster wordt op 0,1 mg nauwkeurig afgewogen.

6.3. *Blancobepaling*

Het blancogehalte wordt bepaald door een volledige analyse (zoals beschreven in punt 6.4) zonder toevoeging van een monster uit te voeren. Het resultaat van de blancobepaling wordt bij de berekening van het zetmeelgehalte (punt 7.2) gebruikt.

6.4. *Analyse*

6.4.1. Monstervoorbereiding

Homogeniseer het monster door schudden of roeren. Weeg de gekozen monsterhoeveelheid (punt 6.2) af in een maatkolf (punt 5.5) en voeg circa 70 ml warm water toe.

Voeg na oplossen of suspenderen 50 µl thermostabiele alfa-amylase (punt 4.6) toe en verwarm gedurende 30 min bij 90 °C in een waterbad (punt 5.9). Koel in een waterbad zo snel mogelijk af tot 60 °C en voeg 5 ml amyloglucosidase-oplossing (punt 4.13) toe. Controleer de pH-waarde van monsters die de pH van de reactie-oplossing kunnen beïnvloeden, en breng deze zo nodig op 4,6 tot 4,8. Laat 60 min bij 60 °C reageren. Laat de monsters tot omgevingstemperatuur afkoelen.

6.4.2. Klaring

Monsters met een hoog gehalte aan eiwitten of vetten moeten worden geklaard door 1 ml Carrez I (punt 4.15) aan de monsteroplossing toe te voegen. Schud en voeg vervolgens 1 ml Carrez II (punt 4.16) toe. Schud het monster opnieuw.

6.4.3. Verwerking voor HPLC-analyse

Verdun het monster in de maatkolf tot de maatstreep met water, homogeniseer het en filtreer het over een vouwfilter (punt 5.2). Vang het extract van het monster op.

Filtreer de extracten over een spuitfilter (punt 5.3) met een spuit (punt 5.6) die vooraf met het extract is gespoeld. Vang het filtraat in monsterflesjes (punt 5.4) op.

6.5. *Chromatografie*

HPLC wordt zoals voor de analyse van suikers gebruikelijk uitgevoerd. Als uit de HPLC-analyse blijkt dat er sporen van maltose aanwezig zijn, is het zetmeel niet volledig omgezet, wat tot een te lage terugvinding voor glucose leidt.

7. **Berekening en uitdrukking van de resultaten**

7.1. *Berekening van de HPLC-resultaten*

Voor de berekening van het zetmeelgehalte zijn de resultaten van twee HPLC-analyses nodig, namelijk suikers in het monster vóór („vrije suikers") en na enzymatische behandeling (zoals in deze methode beschreven). Er moet ook een blancobepaling worden uitgevoerd om voor suikers in de enzymen te corrigeren.

In de HPLC-analyse wordt de piekoppervlakte door te integreren bepaald en de concentratie na kalibratie met referentieoplossingen berekend (punt 4.14). Van de glucoseconcentratie (g/100 ml) na de enzymatische behandeling wordt de glucoseconcentratie (g/100 ml) in de blanco-oplossing afgetrokken. Uiteindelijk wordt het suikergehalte (g suiker/100 g monster) berekend met behulp van de ingewogen hoeveelheid monster, wat leidt tot:

1. HPLC-analyse vóór enzymatische behandeling, waaruit het gehalte (g/100 g) aan vrije suikers blijkt:
   — glucose G
   — fructose F
   — sacharose S
2. HPLC-analyse na enzymatische behandeling, waaruit het gehalte (g/100 g) aan suikers blijkt:
   — glucose na correctie voor de blancobepaling ($G_{e\ cor}$)
   — fructose $F_e$
   — sacharose $S_e$

7.2. *Berekening van het zetmeelgehalte*

7.2.1. Berekening van het totale glucosegehalte „Z”

Indien de hoeveelheid fructose na enzymatische behandeling ($F_e$) groter is dan de hoeveelheid fructose vóór enzymatische behandeling (F), is de sacharose in het monster gedeeltelijk in fructose en glucose omgezet. Dit betekent dat voor de vrijgemaakte glucose moet worden gecorrigeerd ($F_e - F$).

Z, uiteindelijke glucosegehalte na correctie in g/100 g:

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

7.2.2. Berekening van het totale glucosegehalte uitgedrukt als zetmeel

E, „zetmeel”-gehalte in g/100 g:

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

8. **Precisie**

In dit punt worden nadere gegevens verstrekt over een ringonderzoek naar de precisiegegevens van de methode die op twee monsters is uitgevoerd. Zij weerspiegelen de prestatie-eisen voor de in deze bijlage beschreven methode.

Resultaten van een ringonderzoek (ter informatie)

In 2008 vond een ringonderzoek plaats waaraan de Europese douanelaboratoria deelnamen.

De beoordeling van de precisiegegevens is uitgevoerd overeenkomstig het „Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies”, W. Horwitz, (technisch rapport van de IUPAC), Pure & Appl. Chem., Vol. 67, Nº 2, blz. 331-343, 1995.

De precisiegegevens zijn in onderstaande tabel weergegeven.

| **Monsters**<br>**1 : chocoladereep met biscuit**<br>**2 : biscuit** | **Z**<br>**monster 1** | **Z**<br>**monster 2** |
|---|---|---|
| Aantal laboratoria | 41 | 42 |
| Aantal overgebleven laboratoria na eliminatie van uitschieters | 38 | 39 |
| Gemiddeld (%, m/m) | 29,8 | 55,0 |
| Standaardafwijking herhaalbaarheid sr (%, m/m) | 0,5 | 0,5 |
| Standaardafwijking reproduceerbaarheid sR (%, m/m) | 1,5 | 2,3 |
| Herhaalbaarheidgrens r (%, m/m) | 1,4 | 1,4 |
| Reproduceerbaarheidsgrens R (%, m/m) | 4,2 | 6,6” |