KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) nr 118/2010

av den 9 februari 2010

om ändring av förordning (EG) nr 900/2008 om fastställande av analysmetoder och andra bestämmelser av teknisk karaktär som krävs för tillämpningen av systemet för import av vissa varor som framställs genom förädling av jordbruksprodukter

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktionssätt,

med beaktande av rådets förordning (EEG) nr 2658/87 av den 23 juli 1987 om tulltaxe- och statistiknomenklaturen och om Gemensamma tulltaxan ([1]), särskilt artikel 9, och

av följande skäl:

(1) I kommissionens förordning (EG) nr 900/2008 ([2]) anges formler, förfaranden och metoder som ska användas för bestämning av stärkelse/glukos i samband med tillämpningen av bilagorna II och III till kommissionens förordning (EG) nr 1460/96 av den 25 juli 1996 om tillämpningsföreskrifter för systemet med förmånsbehandling i handeln med vissa varor som framställs genom bearbetning av jordbruksprodukter, enligt artikel 7 i rådets förordning (EG) nr 3448/93 ([3]).

(2) Förordning (EG) nr 900/2008 har granskats av en expertgrupp för att bedöma om hänsyn tas i förordningen till den vetenskapliga och tekniska utvecklingen när det gäller de metoder som anges i förordningen. Undersökningar och provningar som utförts under den granskningen tyder på att bestämning av stärkelse/glukoshalt genom löslighetsbehandling med natriumhydroxid (före enzymatisk nedbrytning av glukosen) och mätning av den totala glukoshalten med hjälp av den enzymatiska metoden med spektrofotometri, vilket för närvarande är obligatoriskt för de flesta produkterna, inte längre uppfyller de rådande tekniska kraven och därför måste uppdateras.

(3) Därför bör det föreskrivas att nedbrytning av stärkelse/glukos ska utföras på enzymatisk väg med amylas och amyloglukosidas och att den totala glukoshalten ska bestämmas med hjälp av högupplösande vätskekromatografi (high performance liquid chromatography, HPLC), och det bör fastställas hur den enzymatiska metoden ska utföras.

(4) Förordning (EG) nr 900/2008 bör därför ändras i enlighet med detta.

(5) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från tullkodexkommittén.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilaga I till förordning (EG) nr 900/2008 ska ersättas med texten i bilagan till den här förordningen.

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den tjugonde dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 9 februari 2010.

På kommissionens vägnar
José Manuel BARROSO
Ordförande

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

BILAGA

”BILAGA I

Enzymatisk bestämning av stärkelse och dess nedbrytningsprodukter, inbegripet glukos, i livsmedelsprodukter med hjälp av högupplösande vätskekromatografi (high performance liquid chromatography, HPLC)

1. **Tillämpningsområde**

Nedan beskrivs bestämning av halten av stärkelse och nedbrytningsprodukter därav i livsmedelsprodukter avsedda som människoföda (nedan kallat *stärkelse*). Stärkelsehalten bestäms genom kvantitativ analys av glukos genom högupplösande vätskekromatografi (high-performance liquid chromatography, HPLC) efter enzymatisk omvandling av stärkelse och dess nedbrytningsprodukter till glukos.

2. **Definition av total glukoshalt och total glukoshalt uttryckt som stärkelse**

Med total glukoshalt menas värdet Z beräknat enligt punkt 7.2.1 i denna bilaga. Det inbegriper halten av stärkelse och alla dess nedbrytningsprodukter, inbegripet glukos.

Halten av stärkelse/glukos enligt definitionen i bilaga III till förordning (EG) nr 1460/96 ska beräknas med utgångspunkt i den totala glukoshalten Z och enligt förfarandet i artikel 2.1 i denna förordning.

Halten av stärkelse (eller dextrin) enligt vad som avses i kolumn 3 i bilaga IV till kommissionens förordning (EG) nr 1043/2005 ([1]) ska beräknas med utgångspunkt i den totala glukoshalten Z och enligt förfarandet i artikel 2.2.1 i kommissionens förordning (EG) nr 904/2008 ([2]).

Den stärkelsehalt som avses i punkt 1 i denna bilaga är värdet E, beräknat enligt punkt 7.2.2 i denna bilaga. Den uttrycks i massprocent. Den är ekvivalent med den totala glukoshalten Z, uttryckt som stärkelse. Detta värde E påverkar inte ovannämnda beräkningar.

3. **Princip**

Proven homogeniseras och suspenderas i vatten. Stärkelsen och dess nedbrytningsprodukter i proven omvandlas enzymatiskt till glukos i två steg:

1. Stärkelse och dess nedbrytningsprodukter omvandlas delvis till lösliga glukoskedjor med hjälp av värmestabil alfaamylas vid 90 °C. För effektiv omvandling krävs att proven är helt upplösta eller föreligger i form av suspension med mycket små fasta delar.

2. De lösliga glukoskedjorna omvandlas till glukos med hjälp av amyloglukosidas vid 60 °C.

Produkter som innehåller en hög halt proteiner eller fetter klaras och filtreras.

Bestämningen av sockerarter utförs genom HPLC-analys.

Eftersom en partiell inversion av sackaros kan inträffa under enzymbehandlingen, ska halten av fria sockerarter också utföras med HPLC-analys så att den korrigerade glukoshalten kan beräknas.

4. **Reagenser och andra material**

Använd reagenser av för analytiska ändamål godkänd klass och avmineraliserat vatten.

4.1 Glukos, minst 99 %.

4.2 Fruktos, minst 99 %.

4.3 Sackaros, minst 99 %.

4.4 Maltosmonohydrat, minst 99 %.

4.5 Laktosmonohydrat, minst 99 %.

4.6 Lösning av värmestabilt alfaamylas (1,4-alfa-D-glukan-glukanohydrolas), med aktivitet på omkring 31 000 U/ml (1U frigör 1,0 mg maltos från stärkelse på 3 minuter vid pH 6,9 och 20 °C). Detta enzym kan innehålla en liten mängd orenheter (t.ex. glukos eller sackaros) och andra störande enzymer. Förvaras vid ca. 4 °C. Som alternativ får andra källor till alfaamylas användas om dessa leder till en slutlig lösning med jämförbar enzymaktivitet.

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

4.7 Amyloglukosidas (1,4-alfa-D-glukan glukohydrolas) från *Aspergillus niger*, pulveriserad, med aktivitet på omkring 120 U/mg eller omkring 70 U/mg (1U frigör 1 mikromol glukos från stärkelse per minut vid pH 4,8 och 60 °C). Detta enzym kan innehålla en liten mängd orenheter (t.ex. glukos eller sackaros) och andra störande enzymer (t.ex. invertas). Förvaras vid ca. 4 °C. Som alternativ får andra källor till amyloglukosidas användas om dessa leder till en slutlig lösning med jämförbar enzymaktivitet.

4.8 Zinkacetatdihydrat, p.a.

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

4.10 Natriumacetat, vattenfri, p.a.

4.11 Isättika, minst 96 volymprocent.

4.12 Natriumacetatbuffert (0,2 mol/l). Väg upp 16,4 gram natriumacetat (punkt 4.10) i en glasbägare. Lös upp i vatten och för över till en mätkolv med volymen 1 000 ml. Späd till märket med vatten och justera pH-värdet till 4,7 med hjälp av ättika (genom att använda en pH-mätare (punkt 5.7)). Denna lösning kan användas upp till sex månader om den förvaras vid 4 °C.

4.13 Amyloglukosidaslösning. Blanda en lösning av amyloglukosidaspulver (punkt 4.7) med hjälp av natriumacetatbuffert (punkt 4.12). Enzymaktiviteten ska vara tillräcklig och avpassad till stärkelsehalten i provet (exempelvis erhålls en aktivitet på omkring 600 U/ml från 0,5 g amyloglukosidaspulver 120 U/mg (punkt 4.7) i en slutlig volym om 100 ml för 1 g stärkelse i provet). Bered lösningen omedelbart före användning.

4.14 Referenslösningar. Bered lösningar av glukos, fruktos, sackaros, maltos och laktos i vatten, sådana som vanligtvis används i en HPLC-analys.

4.15 Reagens för klarning (Carrez I). Lös upp 219,5 gram zinkacetat (punkt 4.8) i vatten i en glasbägare. För över till en mätkolv med volymen 1 000 ml, tillsätt 30 ml ättika (punkt 4.11). Blanda noggrant och fyll på med vatten till märket. Denna lösning kan användas upp till sex månader om den förvaras vid rumstemperatur. Andra reagenser för klarning som är likvärdiga med Carrezlösningen kan användas.

4.16 Reagens för klarning (Carrez II). Lös upp 106,0 gram kaliumhexacyanoferrat II (punkt 4.9) i vatten i en glasbägare. För över till en mätkolv med volymen 1 000 ml. Blanda noggrant och späd med vatten till märket. Denna lösning kan användas upp till sex månader om den förvaras vid rumstemperatur. Andra reagenser för klarning som är likvärdiga med Carrezlösningen kan användas.

4.17 Mobil fas för HPLC. Bered en rörlig fas, en sådan som vanligtvis används i en HPLC-analys av socker. Om exempelvis en aminopropyl-kiselgelkolonn används, är en blandning av vatten av HPLC-kvalitet och acetonitril en vanlig rörlig fas.

5. **Redskap**

5.1 Standardmässiga laboratorieglas.

5.2 Veckade filter, t.ex. 185 mm.

5.3 Sprutfilter, 0,45 µm, lämpliga för vattenlösningar.

5.4 Provbehållare lämpliga för HPLC-autosampler.

5.5 Mätkolvar med volymen 100 ml.

5.6 Plastsprutor, 10 ml.

5.7 pH-mätare.

5.8 Analysvåg.

5.9 Vattenbad med termostat, justerbart till 6 °C och 90 °C.

5.10 HPLC-apparat lämplig för analys av sockerarter.

6. **Förfarande**

6.1 *Beredning av provet för flera typer av produkter*

Produkten homogeniseras.

6.2 *Provmängd*

Provmängden skattas med ledning av innehållsdeklarationen och förhållandena för HPLC-analys (glukosreferenslösningens koncentration), och får inte överskrida:

$$\text{provmängd (g)} = \frac{\text{mätkolvens volym (t.ex.100 ml)}}{\text{uppskattad stärkelsehalt (\%)}}$$

Väg upp provet med en noggrannhet av ± 0,1 mg.

6.3 *Bestämning av blankprov*

Blankprovet bestäms genom en fullständig analys (enligt beskrivningen i punkt 6.4) utan tillsättning av ett prov. Resultatet av blankprovet används för att beräkna stärkelsehalten (punkt 7.2).

6.4 *Analys*

6.4.1 Beredning av proverna

Homogenisera provet genom att skaka eller röra om. Den valda provmängden (punkt 6.2) vägs upp i en mätkolv (punkt 5.5) och omkring 70 ml varmt vatten tillsätts.

Tillsätt, efter upplösning eller suspendering, 50 mikroliter värmebeständigt alfaamylas (punkt 4.6) och värm vid 90 °C i 30 minuter i ett vattenbad (punkt 5.9). Kyl ned så snabbt som möjligt till 60 °C i ett vattenbad och tillsätt 5 ml amyloglukosidaslösning (punkt 4.13). För prov som kan påverka reaktionslösningens pH-värde, kontrollera pH-värdet och justera det vid behov till 4,6–4,8. Låt reagera under 60 minuter vid 60 °C. Kyl ned proven till rumstemperatur.

6.4.2 Klarning

För prover med hög protein- eller fetthalt krävs klarning genom tillsats av 1 ml Carrez I (punkt 4.15) till provlösningen. Efter skakning tillsätts 1 ml Carrez II (punkt 4.16). Skaka provet igen.

6.4.3 Behandling för HPLC-analys

Provet i mätkolven späds till märket med vatten, homogeniseras och filtreras genom ett veckat filter (punkt 5.2). Samla upp provextraktet.

Filtrera extraktet genom ett sprutfilter (punkt 5.3) med en spruta (punkt 5.6) som har försköljts med extraktet. Samla upp filtraten i provrör (punkt 5.4).

6.5 *Kromatografi*

HPLC utförs som normalt vid analys av socker. Om HPLC-analysen visar spår av maltos har stärkelsen omvandlats ofullständigt, vilket leder till för låg halt av glukos.

7. **Beräkning och redovisning av resultat**

7.1 *Beräkning av HPLC-resultaten*

För beräkning av stärkelsehalten krävs resultaten från två HPLC-analyser, nämligen socker i provet före ('fria sockerarter') och efter enzymbehandlingen (enligt beskrivningen i denna metod). Dessutom ska ett blankprov bestämmas så att resultaten kan korrigeras för socker i enzymerna.

I HPLC-analysen bestäms arean under toppen genom integration och koncentrationen beräknas efter kalibrering med referenslösningar (punkt 4.14). Från glukoskoncentrationen (g/100 ml) efter enzymbehandling subtraheras glukoskoncentrationen (g/100 ml) i blankprovet. Slutligen beräknas sockerhalten (g socker/100 g prov) med hjälp av den vägda provmängden, vilket ger:

1. HPLC-analys före enzymbehandlingen, vilket ger halten (g/100 g) fria sockerarter:

   — glukos G

   — fruktos F

   — sackaros S

2. HPLC-analys efter enzymbehandlingen, vilket ger halten (g/100 g) sockerarter:

   — glukos efter korrektion för blankprovet ($G_{e\ cor}$)

   — fruktos F_e

   — sackaros S_e

7.2 *Beräkning av stärkelsehalten*

7.2.1 Beräkning av total glukoshalt 'Z'

Om mängden fruktos efter enzymbehandling (F_e) är högre än mängden fruktos före enzymbehandling (F) har sackaros i provet delvis omvandlats till fruktos och glukos. Detta innebär att resultaten ska korrigeras för frisläppt glukos ($F_e - F$).

Z , slutlig halt glukos efter korrektion i g/100 g:

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

7.2.2. Beräkning av den totala glukoshalten uttryckt som stärkelse

E, halt av 'stärkelse' i g/100 g:

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

8. **Precision**

Närmare uppgifter om en jämförelse mellan olika laboratorier av metodens precision för mätvärden från två prov återfinns här. De återspeglar prestandakraven på den metod som beskrivs i denna bilaga.

Resultat av en jämförelse mellan olika laboratorier (upplysningsvis)

Under 2008 utfördes jämförelser mellan laboratorier med deltagande från EU:s tullaboratorier.

Mätresultaten utvärderades i enlighet med *Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies*, W. Horwitz, (IUPAC technical report), Pure & Appl. Chem., Vol. 67, Nº 2, s. 331–343, 1995.

Precisionsdata återges i nedanstående tabell.

Prov **1 : choklad- och kexkonfektyr** **2 : kex**	**Z** **prov 1**	**Z** **prov 2**
Antal laboratorier	41	42
Antal laboratorier sedan extrema värden avlägsnats	38	39
Medelvärde (massprocent)	29,8	55,0
Repeterbarhet standardavvikelse sr (massprocent)	0,5	0,5
Reproducerbarhet standardavvikelse sR (massprocent)	1,5	2,3
Repeterbarhetsgräns r (massprocent)	1,4	1,4
Reproducerbarhetsgräns R (massprocent)	4,2	6,6”