

1032

AANBEVELING

**van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie
inzake de toepassing van Benelux-referentiemethoden van
onderzoek, behorende bij de aanbeveling M (63) 21 inzake de
harmonisatie der wetgevingen betreffende honing**

M (68) 49

Het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie,
Gelet op de artikelen 3, 6 en 7 van het Unieverdrag,

Gelet op artikel 9 van de Overgangsovereenkomst,

Gelet op de Aanbeveling van het Comité van Ministers van
23 september 1963 inzake de harmonisatie der wetgevingen
betreffende honing, M (63) 21,

Overwegende, dat geschillen, voortvloeiende uit het toepassen
van verschillende analysemethoden of uit het gebruik van
verschillende normen, dienen te worden vermeden,

Overwegende, dat het in het bijzonder voor de harmonisatie
van het voedingsmiddelentoezicht vereist is, dat gelijke of
gelijkwaardige methoden worden toegepast, dezelfde termen
worden gebezigd en gelijke of gelijkwaardige normen worden
aangelegd,

Beveelt aan :

Enig artikel

De Regeringen der drie Beneluxlanden worden uitgenodigd
bijgaande analysemethoden betreffende honing vóór 1 juli 1969
in hun wetgeving op te nemen als enig geldige referentie-
methoden.

Gedaan te Brussel, op 11 december 1968.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

P. GREGOIRE

Analysemethode voor honing

M (68) 49, Bijlage

1. Voorbereiding van het monster

1.1. Ter bepaling van het diastasegetal en het hydroxymethylfurfural (H.M.F.) gehalte wordt het monster zonder voorafgaande verhitting, zo goed mogelijk gemengd en de voor deze bepalingen benodigde hoeveelheid afgezonderd.

1.2. Verhit de overblijvende honing op een temperatuur van niet meer dan 50° C. De verhitting geschiedt door de gesloten recipiënt zolang in het waterbad of in een stoof te plaatsen tot een homogeniseerbare massa is ontstaan.

Wanneer de recipiënt waarin de honing zich bevindt niet van glas is, wordt de inhoud overgebracht in een hermetisch sluitende recipiënt van doorzichtig glas.

Meng, na smelten en afkoelen, de honing zorgvuldig, er voor zorgend dat alle condensatieprodukten voorkomend op andere delen van de recipiënt opnieuw worden opgenomen.

1.3. Bereid een stam-oplossing door 50 g van de volgens 1.2. voorbereide honing in een maatkolf in gedestilleerd water op te lossen en aan te vullen tot 250 ml.

2. Gehalte aan droge stof

Bepaal, met een pycnometer, de dichtheid bij 20° C van de volgens 1.3. bereide stam-oplossing. Bereken het droge stofgehalte van de honing (E) met behulp van de volgende formule :

$$d \frac{20}{4} = d \frac{20}{20} \times 0,99823$$

$$E = 1302,7 \left(d \frac{20}{4} - 0,99823 \right)$$

3. Gehalte aan in water onoplosbare stof

Weeg, tot op 10 mg nauwkeurig, 20 g van de volgens 1.2. voorbereide honing af. Los de honing op in gedestilleerd water van 80° C, meng goed en filtreer door een van te voren gedroogde en gewogen glas-filterkroes G 3. Was zorgvuldig uit met warm water (80° C) tot alle suikers verdwenen zijn. Droog de kroes gedurende 1 uur bij 100-103° C, laat afkoelen en weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig. De resultaten worden uitgedrukt in gewichtsprocenten van de droge stof.

4. Asgehalte

Weeg 5 à 10 g van de volgens 1.2. voorbereide honing af in een van te voren gewogen platina- of kwartsschaaltje. Verhit voorzichtig tot het monster zwart en droog wordt en er geen gevaar meer bestaat voor verlies. Veras vervolgens in een moffel bij 600° C tot constant-gewicht. Laat afkoelen en weeg. Druk het resultaat uit in gewichts-procenten van de droge stof.

5. Zuurgehalte

Weeg 10 g van de volgens 1.2. voorbereide honing af en los deze op in 75 ml koolzuurvrij gedestilleerd water.

Titreer met een 0.1 n carbonaatvrije oplossing van natriumhydroxide onder toevoeging van 4 of 5 druppels fenolphthaleïne oplossing. De kleuromslag moet gedurende 10 seconden blijven bestaan. Gebruik bij donker gekleurde monsters een pH-meter en titreer tot pH 8.3. De resultaten worden uitgedrukt in ml normaal zuur per 100 g honing.

6. Bepaling van ware saccharose

Reagentia :

— *Kaliumhexacyanoferraat (II)-oplossing* : los 106 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ in gedestilleerd water op en verdun tot een liter.

— *Zinkacetaat-oplossing* : los 219,5 g $(CH_3COO)_2Zn \cdot 2 H_2O$ in gedestilleerd water op, voeg 30 g ijsazijn toe en verdun met gedestilleerd water tot een liter.

— Azijnzuur, 20 %

— Kaliumjodide

— Zwavelzuur, 25 gew. %

— Natriumthiosulfaat, 0,1 n

— Zetmeel-oplossing, 1 %

— *Reagens volgens Luff-Schoorl* : bereid de volgende drie oplossingen :

a. 25 g kopersulfaat ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$) in 100 ml water ;

b. 388 g natriumcarbonaat ($Na_2CO_3 \cdot 10 H_2O$) in 300 à 400 ml water ;

c. 50 g citroenzuur ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) in 50 ml water.

Giet oplossing c. voorzichtig bij de afgekoelde oplossing b. en roer tot geen koolzuur meer ontwijkt. Voeg aan dit mengsel onder roeren de oplossing a. toe. Laat afkoelen, verdun tot een liter en filtreer na 24 uur. De aldus bereide oplossing heeft een pH van ca. 9,9.

Controleer het reagens als volgt :

1035

aa. Voeg aan 25 ml van het reagens 3 g kaliumjodide, opgelost in weinig water, en 25 ml 25 % zwavelzuur toe. Titreer met 0,1 n natriumthiosulfaat. Voeg tegen het einde van de titratie een weinig zetmeel-oplossing toe. Het verbruik moet 25 ml 0,1 n natriumthiosulfaat bedragen.

bb. Breng in een maatkolf van 100 ml, 10 ml van het reagens en vul aan tot de maatstreep.

Meng in een konische kolf 10 ml van dit verdunde reagens met 25 ml 0,1 n zoutzuur en verwarm gedurende 1 uur op een kokend waterbad. Laat afkoelen, breng de inhoud van het kolfje met water op het beginvolume en titreer met 0,1 n NaOH met behulp van fenolftaleïne als indicator. Het verbruik moet 5,5 tot 6,5 ml 0,1 n NaOH bedragen.

cc. Titreer met 0,1 n zoutzuur en fenolftaleïne als indicator, 10 ml van het reagens verdund volgens bb. Het verbruik moet 6 tot 7,5 ml 0,1 n HCl bedragen.

— *Invertase-oplossing* : laat 25 g verse bakkersgist, gesuspenderd in 150 ml water, bij ca. 20° C autolyseren ; voeg na 8 of 15 dagen, voordat het mengsel alkalisch wordt ten opzichte van lakmoes, talk toe en filtreer. Het filtraat wordt bewaard onder tolueen bij 4° C en beschermd tegen licht.

6.1. Breng 10 ml van de volgens 1.3 bereide oplossing over in een maatkolf van 200 ml en vul aan tot de maatstreep.

6.2. Breng in een maatkolf van 100 ml, 25 ml van de onder 6.1. verkregen oplossing en 25 ml water ; voeg 4 tot 5 druppels 20 % azijnzuur en 2 ml invertase-oplossing toe. Schud om, sluit de kolf met een wattenprop en plaats de kolf gedurende 2 tot 3 uur in een stoof bij 53-55° C. Koel af.

6.3. Voeg aan de onder 6.2 verkregen oplossing 2 ml kaliumhexacyanoferraat (II)-oplossing en 2 ml zinkacetaat-oplossing toe, waarbij na iedere toevoeging krachtig wordt geroerd. Vul met gedestilleerd water aan tot de maatstreep. Filtreer de vloeistof door een droog filter en verwerp de eerste gedeelten van het filtraat. Gebruik de rest van het filtraat voor de bepaling van het invertsuikergehalte volgens de methode van Luff-Schoorl als omschreven in 6.5.

6.4. Herhaal de bewerkingen, omschreven in 6.3, met 25 ml van de onder 6.1 verkregen oplossing, waaraan 25 ml water is toegevoegd. Bepaal in de rest van het filtraat het invertsuikergehalte volgens de methode van Luff-Schoorl als omschreven in 6.5.

6.5. Pipetteer 25 ml van het reagens volgens Luff-Schoorl, 5 ml water en 20 ml van het onder 6.3 of 6.4 verkregen filtraat in een konische kolf van 300 ml. Voeg enige kooksteentjes toe en verbind de kolf met een terugvloeiakoeler. Plaats de kolf op een metalen gaasje, waarop een asbestplaatje met een ronde opening, van dezelfde diameter als de bodem van de konische kolf, ligt.

Breng de inhoud van de konische kolf binnen twee minuten tot koken en houd de inhoud gedurende precies tien minuten juist aan de kook. Indien de koper-oplossing geheel gereduceerd wordt, gaat men uit van minder van de onder 6.3 of 6.4 verkregen oplossing en voegt, na toevoeging van 25 ml van het reagens volgens Luff-Schoorl, zoveel water toe, dat het volume 50 ml bedraagt. (De bepaling geeft de beste resultaten indien de 25 ml oplossing tussen de 15 en 60 mg reducerende suikers bevatten).

6.6. Koel snel af tot 20° C. Voeg toe 3 g kaliumjodide, opgelost in weinig water, en vervolgens onder voortdurend omzwinken voorzichtig 25 ml zwavelzuur.

Titreer de oplossing direct met 0,1 n natriumthiosulfaat onder voortdurend omzwinken. Voeg tegen het einde van de titratie 1 tot 2 ml zetmeel-oplossing toe.

6.7. Voer op dezelfde wijze een blanco titratie uit, waarbij de suiker-oplossing vervangen is door 25 ml water.

6.8. Bereken op de volgende wijze het gehalte aan saccharose. Verminder het aantal ml 0,1 n natriumthiosulfaat, verbruikt bij de blanco titratie met het aantal ml 0,1 n natriumthiosulfaat, verbruikt bij de bepaling. Bepaal met behulp van de tabel volgens Luff-Schoorl de hoeveelheid invertsuiker, die overeenkomt met dit verschil.

Stel m mg = deze hoeveelheid in de onder 6.3 verkregen oplossing en m' mg = deze hoeveelheid in de onder 6.4 verkregen oplossing. Het gehalte aan saccharose in de honing, uitgedrukt in gewichtsprocenten, wordt aangegeven door de formule

$2 (m - m') \times 0,95$.

TABLE SELON LUFF-SCHOORL

0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ml	Glucose, fructose of invertsuiker mg	Vershil
1	2.4	2.4
2	4.8	2.4
3	7.2	2.5
4	9.7	2.5
5	12.2	2.5
6	14.7	2.5
7	17.2	2.6
8	19.8	2.6
9	22.4	2.6
10	25.0	2.6
11	27.6	2.7
12	30.3	2.7
13	33.0	2.7

1037

14	35.7	2.8
15	38.5	2.8
16	41.3	2.9
17	44.2	2.9
18	47.1	2.9
19	50.0	3.0
20	53.0	3.0
21	56.0	3.1
22	59.1	3.1
23	62.2	

7. Aantonen van kunstmatige zoetstoffen

Lijst der reagentia en hulpmiddelen

- natriumsulfaat-oplossing : verzadigd
- watervrij natriumsulfaat
- ethylacetaat
- ethanol p.a. 96 %
- ethanol-water 1:1
- zwavelzuur 4 n
- Oplossingen van de kunstmatige zoetstoffen :

cyclamaatoplossing : 100 mg natriumcyclamaat oplossen in 100 ml van het ethanol-water mengsel

dulcine-oplossing : 100 mg dulcine oplossen in 100 ml ethanol

saccharine-oplossing : 100 mg saccharine oplossen in 100 ml ethanol.

Platen voor dunnelaagchromatografie

Meng in een mixer 9 g 10 % geacetylerde cellulose (MN 300 Ac Macherey-Nagel & Co) en 6 g polyamidepoeder voor dunnelaagchromatografie (Woelm of gelijkwaardig) met 60 ml ethanol tot een homogene suspensie. Breng deze suspensie met een laagdikte van 0,25 mm aan op de platen voor dunnelaagchromatografie. Laat drogen aan de lucht, vervolgens 10 min. op 70° C in de droogstoof. Koel de platen af in een exsiccator.

— Loopvloeistof : meng 45 vol. Shell sol. A, * - 6 vol. n-propanol, 7 vol. azijnzuur en 2 vol. mierzuur. Bereid op het ogenblik van het gebruik. Voorzie chromatografie-kamer van filterpapier ter verzadiging van de kamer.

— Detectiemiddel : Los 200 mg dichloorfluoresceïen op in 100 ml ethanol.

*) Shell sol. A, is een mengsel van koolwaterstoffen dat door Shell in de handel wordt gebracht.

7.1. Isolatie

7.1.1. Los 20 g honing op in 40 ml verzadigde Na_2SO_4 -oplossing, voeg toe 10 ml H_2SO_4 4 n en 10 ml ethanol 96 % en meng.

7.1.2. Schud dit mengsel driemaal uit met telkens 25 ml ethylacetaat.

7.1.3. Droog de verzamelde ethylacetaat-extracten op watervrij Na_2SO_4 en damp in tot 4 ml.

7.2. Identificatie

7.2.1. Breng 3 μl van de verkregen oplossing op de startlijn van een plaat voor dunnelaagchromatografie.

7.2.2. Breng vervolgens 2 μl van de cyclamaat-, de dulcine- en de saccharine-oplossing op de startlijn.

7.2.3. Elueer de plaat met vers bereide loopvloeistof tot de afstand tussen startlijn en het front 10 cm bedraagt.

7.2.4. Bespuit de plaat na verdampen van de loopvloeistof met het detectiemiddel.

7.2.5. Beschouw het zo verkregen chromatogram in ultraviolet licht (254 nm).

8. Aantonen van conserveermiddelen

Lijst van reagentia

— Aangezuurde ether : 98 vol. ether + 2 vol. ijsazijn.

— Watervrij natriumsulfaat

— Standaard-oplossingen : 1 % in ethanol.

— Platen voor dunnelaagchromatografie : meng met een mixer 15 g Kieselgel G en 15 g Kieselgur G met 60 ml van een 0,02 % waterige Ultraphoroplossing.

De Ultraphor W.T. (B.A.S.F.) moet regelmatig vernieuwd worden (bewaren in bruine fles). Breng het homogene mengsel met een laagdikte van 0,25 mm aan op de dunnelaagplaten. Droog de platen aan de lucht en activeer vervolgens door verwarming op 110° C gedurende 30 minuten.

— Loopvloeistof : meng 100 vol. petroleumether, 40 vol. chloroform en 10 vol. mierzuur.

— Chromatografiekamer : verzadigd met de loopvloeistof.

Detectiemiddelen

— Benzoëzuur :

a) 4,5 ml H_2O_2 (30 %)
4,5 ml water

1039

1 ml Mn SO_4 verzadigd

b) 0,3 % Fe SO_4 oplossing

— Sorbinezuur :

a) meng 5 vol. van een waterige 0,5 % $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oplossing + 5 vol. H_2SO_4 0,3 n

b) verzadigde thiobarbituurzuuroplossing in water.

— Salicylzuur : 0,1 % waterige FeCl_3 oplossing.

— Dehydroazijnzuur : 0,1 % waterige FeCl_3 oplossing.

— Broomazijnzuur :

a) meng 3 vol. van een fenolroodoplossing (24 mg phenolrood in 2,4 ml NaOH 0,1 n, aanvullen tot 100 ml met aceton) met 1 vol. natriumacetaatoplossing (6 g natriumacetaat + 3 vol. azijnzuur, aanvullen met water tot 100 ml).

b) chloramine T oplossing : los 25 mg chloramine T op in 15 ml van een mengsel aceton-water 1 : 1.

— Parahydroxybenzoëzuur en zijn esters : Millon's reagens. Los 10 g kwik op in 10 g rokend salpeterzuur. Voeg 10 à 20 ml water toe. Filtreer het eventuele neerslag af.

8.1. Isolatie

8.1.1. Schud 50 ml van de volgens 1.3. bereide oplossing met 50 ml van de aangezuurde ether gedurende 3 minuten.

8.1.2. Laat staan tot de lagen zich afgescheiden hebben, scheid de etherlaag af op een filter. Herhaal de extractie met resp. 30 en 20 ml aangezuurde ether.

8.1.3. Droog de verzamelde etherische extracten op watervrij Na_2SO_4 . Filtreer. Damp af tot ongeveer 5 ml.

8.2. Identificatie

8.2.1. Breng op de startlijn van de chromatografieplaat met 20 μl van de verkregen oplossing, een 1,5 cm lange streep aan. Doe hetzelfde met 10 μl van de benzoëzuuroplossing, 5 μl van de dehydroazijnzuuroplossing en 3 μl van de andere standaarden.

8.2.2. Ontwikkel de plaat met de loopvloeistof totdat de afstand tussen startlijn en het front 15 cm bedraagt. Neem de plaat uit, droog aan de lucht. Ontwikkel een tweede maal op dezelfde wijze.

8.2.3. Bekijk de plaat onder U.V. (366 nm). Markeer de vlekken.

8.2.4. Zichtbaar maken van de chromatogrammen

Benzoëzuur : Bespuit met de oplossing a ; droog en bespuit met de oplossing b. Benzoëzuur geeft een bruine vlek op witte achtergrond.

Sorbinezuur : bespuit met het $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$ mengsel ; droog de plaat in de droogstoof, verstuif de thiobarbituurzuur-oplossing, droog opnieuw. Sorbinezuur geeft een rose vlek.

Salicylzuur : bespuit met ijzer (III) chlorideoplossing. Salicylzuur geeft een violette vlek.

Dehydroazijnzuur : bespuit met ijzer (III) chlorideoplossing. Dehydroazijnzuur geeft een gele kleur op witte achtergrond.

Monobroomazijnzuur : stel de plaat 10 min. bloot aan amoniakdampen, verwarm 10 min. op 100° C om de overmaat ammoniak te verdrijven. Bespuit met fenolrood natriumacetaatmengsel, vervolgens met de chloamine T oplossing. Monobroomazijnzuur geeft een blauwe vlek op gele achtergrond.

p. Hydroxybenzoëzuur en zijn esters : bespuit met Millon's reagens en verwarm in de droogstoof. p. Hydroxybenzoëzuur en zijn esters geven een rode vlek.

8.2.5. Algemene opmerkingen

1) Het is aan te raden de detectiemiddelen te verstuiven in kleine hoeveelheden. Verwarm indien de reactie geen duidelijk resultaat geeft, in een stoof van 100° C. Bespuit en verwarm zonodig een tweede en zelfs een derde maal.

2) Spuit het detectiemiddel slechts op de zone van het chromatogram waar zich het gezochte conserveermiddel kan bevinden ; dek de rest van de plaat af.

3) Bekijk de platen in U.V. licht golflengte 366 n.m.

9. Fermenterende eigenschappen

Reagentia

— Bufferoplossing (pH = 5,3) :

los 43,5 g natriumacetaat ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) en 4,5 ml ijsazijn op in vers uitgekookt gedestilleerd water en vul aan tot 250 ml met hetzelfde gedestilleerd water. Langere tijd houdbaar.

— Natriumchlorideoplossing 0,5 mol. :

los 2,92 g NaCl op in vers uitgekookt gedestilleerd water en vul aan tot 100 ml. Houdbaarheid slechts enkele dagen (schimmelt).

— Zetmeeloplossing 2 % :

(gebruik voor de bereiding van dit reagens het volgens 9.1 t/m 9.4 bereide en gestandaardiseerde oplosbare zetmeel.)

Weeg zoveel oplosbaar zetmeel af, als overeenkomt met 2,000 g droge stof en breng dit in een maatkolf van 100 ml. Voeg 5 ml bufferoplossing en ongeveer 75 ml gedestilleerd water toe. Suspender het zetmeel

in de vloeistof en verhit gedurende 5 min. in een kokend waterbad. Bij het begin van het verhitten wordt de maatkolf voortdurend omgezwenkt totdat het zetmeel opgelost is. Koel af en vul aan tot de maatstreep.

Houdbaarheid: 24 h.

— Zoutzuur: 1 n.

— Zoutzuur 0,1 n.

— Jodiumoplossing 0,02 n.

— Jodiumoplossing 0,0007 n.

Los, in een maatkolf van 100 ml, 4 g. kaliumjodide op in een weinig uitgekookt gedestilleerd water. Voeg 0,70 ml 0,1 n jodiumoplossing toe, meng en vul aan tot de maatstreep met gekookt gedestilleerd water.

Houdbaarheid: enkele dagen.

9.1. Bereiding oplosbaar zetmeel

9.1.1. 20 g Aardappelzetmeel worden in een konische kolf met een mengsel van 100 ml 95 % ethanol en 7 ml zoutzuur 1 n 1 uur lang in een waterbad onder terugvloeikoeling gekookt. koel af, filtreer door een filterkroes (poriënwijdte 90 — 150 μ) en was met water uit tot het waswater geen chloride-reactie meer geeft. Zuig scherp af en droog het zetmeel aan de lucht bij 35° C.

9.2. Bepaling van het vochtgehalte van het oplosbaar zetmeel

9.2.1. Weeg nauwkeurig ongeveer 2 g oplosbaar zetmeel, in een dunne laag op de bodem van een plat weegflesje ($\varnothing$ 5 cm), af.

9.2.2. Droog 1½ h. bij 130° C. Laat afkoelen in een exsiccator en weeg terug. Het per 100 g berekend gewichtsverlies wordt als het vochtgehalte beschouwd.

9.3. Bepaling van de blauw-waarde van oplosbaar zetmeel

9.3.1. Breng in een maatkolf van 100 ml zoveel luchtdroog oplosbaar zetmeel als overeenkomt met 1,000 g droge stof. Voeg toe 80 ml water en 2,5 ml bufferoplossing en slib op. Verhit vervolgens de maatkolf in een kokend waterbad gedurende 5 minuten onder voortdurend omzwenken tot het zetmeel is opgelost. Koel af en vul aan tot de maatstreep.

9.3.2. In een maatkolf van 100 ml brengt men achtereenvolgens ongeveer 75 ml gedestilleerd water, 1,0 ml zoutzuur 1 n en 1,50 ml jodiumoplossing 0,02 n. Daarna voegt men onder voortdurend omzwenken met een maatpipet 0,5 ml zetmeeloplossing 9.3.1. toe, vult aan tot de maatstreep, meng zorgvuldig en laat 1 h in het donker staan.

9.3.3. Na 60 tot 80 min. wordt in een 2 cm cuvet bij 20° C en bij een golflengte van 575 nm de extinctie E_1 gemeten. De cuvet moet onmiddellijk voor de meting door plaatsen in het water van de thermostaat op 20° C gebracht worden.

9.3.4. Een zelfde blanco proef (zonder zetmeel) wordt gelijktijdig uitgevoerd. Gemeten extinctie E_2 .
De blauw-waarden van het onderzocht oplosbare zetmeel is dan gelijk aan $E_1 - E_2$.

9.4. Voorbereiding van het standaard zetmeel

Zetmeel met verschillende blauw-waarden verkrijgt men uit aard-appelmeel van verschillende herkomst of door variëren van de verhit-tingstijd of de zoutzuurconcentratie. Door vermenging van zetmeel-soorten met verschillende blauw-waarden bereidt men een standaard-monster dat een blauw-waarde $1 \pm 0,1$ heeft.

9.5. Bepaling van het diastasegetal (D.G.)

Het D.G. geeft aan hoeveel amylase-eenheden in 1 g honing aanwezig zijn. Een eenheid is die enzyme-hoeveelheid (α -amylase) die in 1 uur 0,010 g zetmeel afbreekt tot het vastgestelde eindpunt (transmis-sie 50 %).

9.5.1. Opmerking :

- a) Voor de bereiding van alle oplossingen moet vers uitgekookt gedes-tilleerd water worden gebruikt.
- b) Alle pipetten worden aan de bovenzijde voorzien van watteproppen, teneinde besmetting met sporen speeksel te voorkomen.

9.5.2. Bereiding gebufferde honingstamoplossing 20 %

Weeg 5,00 g van het volgens 1.1 voorbereide honingmonster af in een klein bekglas en meng met een weinig water.
Voeg toe 2,5 ml acetaatbuffer en spoel over in een maatkolf van 25 ml. Voeg 1,5 ml NaCl-oplossing toe en vul aan tot de maatstreep. Voor de bepaling van het D.G. moet steeds een vers bereide honingoplossing gebruikt worden (hoogstens 6 u oud).

9.6. Bepaling van het eind-volume

9.6.1. Het eindvolume moet vooraf bepaald worden en heeft voor ieder zetmeelpreparaat zijn eigen constante waarde.

9.6.2. Maak een verdunde zetmeeloplossing door 5 ml 2 % zetmeel-oplossing te pipetteren bij 10 ml afgepipetteerd water en meng.

9.6.3. Pipetteer 5,0 ml 0,1 n zoutzuur in een schudcilinder van 50 ml (of in een wijde reageerbuis) met ingeslepen stop.

1043

9.6.4. Pipetteer hierbij 0,5 ml verdunde zetmeeloplossing 9.6.2. en pipetteer met een vol-pipet, onder voortdurend omzwenken, hierbij nog 5,0 ml 0,0007 n jodiumoplossing.

9.6.5. Laat uit een 50 ml buret (portiesgewijze) zo veel water toevloeien dat de oplossing een extinctie van 1,75 tot 1,77 heeft.

9.6.6. Meet de extinctie telkens na het toevoegen van iedere portie water, in 2 cm cuvetten bij 575 nm en 20° C tegen een blanco proef met 5,0 ml jodiumoplossing die ongeveer tot het te verwachten eindvolume verdund is.

Giet na iedere meting de inhoud van de cuvet in de schudcilinder terug. Spoel na iedere watertoevoeging de cuvet na met de nieuw verkregen oplossing er voor zorgend dat geen druppel vloeistof verloren gaat.

9.6.7. Herhaal de proef ter controle als volgt :

voeg aan 5,0 ml 0,1 n zoutzuur achtereenvolgens toe 0,5 ml verdunde zetmeeloplossing 9.6.2., daarna de volgens 9.6.5. tot en met 9.6.6. bepaalde hoeveelheid water en tenslotte onder omzwenken 5,0 ml jodiumoplossing 0,0007 n.

9.6.8. Laat deze oplossing één uur in het donker staan, vul de cuvet en plaats deze in het water van de thermostaat van 20,0° C. totdat de inhoud der cuvet deze temperatuur bereikt heeft.

9.6.9. Bepaal de extinctie. Corrigeer zo nodig het eindvolume.

9.7. Amylase-bepaling

9.7.1. Pipetteer in een schudcilinder (met glazen stop) van $\pm$ 25 ml 10,0 ml 20 % honingoplossing 9.5.2.

9.7.2. Vul een andere schudcilinder met de 2 % zetmeeloplossing.

9.7.3. Plaats beide afgesloten cylinders in het water van de thermostaat van 40,0° C (verzwaar met lood).

9.7.4. Pipetteer, nadat beide vloeistoffen op temperatuur zijn gekomen, 5,0 ml van 2 % zetmeeloplossing bij de 10,0 ml honingoplossing, roer grondig om en noteer de tijd (begintijd).

9.7.5. Pipetteer na verloop van bepaalde tijden (afhankelijk van het diastatisch vermogen, alle 2 tot 6 minuten) met een 1 ml pipet, 0,50 ml van het reactiemengsel in een schudcilinder van 50 ml inhoud of een reageerbuis, met ingeslepen stop, waarin zich 5,00 ml 0,1 n zoutzuur bevindt. (Door het zoutzuur wordt de enzymwerking direct onderbroken).

9.7.6. Noteer telkens de overeenstemmende reactietijden.

9.7.7. Voeg vervolgens de volgens 9.6.7. bepaalde hoeveelheid water toe, meng en voeg, onder voortdurend omzwinken 5,0 ml 0,0007 n jodiumoplossing toe.

9.7.8. Ga zo lang door volgens 9.7.5. totdat toevoeging van de jodium-oplossing slechts een geelbruine verkleuring geeft (transmissie is dan ongeveer 60 à 70 %).

9.7.9. Laat na het mengen de schudcylinders een uur in het donker staan.

9.7.10. Doe een blancoproef met dezelfde reagentia, waarbij i.p.v. de honing 0,5 ml water genomen wordt.

9.7.11. Meet de extincties op de manier als aangegeven onder 9.3.3. en 9.3.4. Druk de metingen als transmissie uit.

9.8. Berekening van het diastase-getal (D.G.)

9.8.1. Zet op millimeterpapier de reactietijd in minuten uit tegen de transmissie. (Tussen 35 en 70 % transmissie verloopt de kurve practisch lineair).

9.8.2. Lees de reactietijd (t) af, welke overeenkomt met 50 % transmissie. Om deze met voldoende nauwkeurigheid te bepalen is het voldoende 3 tot 4 punten van de kurve tussen 35 tot 70 % transmissie te bepalen.

9.8.3. Het diastasegetal is :

$$\text{D.G.} = \frac{60}{t} \cdot \frac{0,10}{0,01} \cdot \frac{1,0}{2,0} = \frac{300}{t}$$

t = reactietijd in minuten om 50 % transmissie te bereiken. (Zie definitie onder 9.5. In reactiemengsel is aanwezig 0,1 g zetmeel en 2,0 gram honing).

De fermenteerende eigenschappen worden als intact beschouwd wanneer het diastasegetal gelijk is aan 8 of hoger.

10. Kolorimetrische bepaling van hydroxymethylfurfural (HMF) volgens Winckler

Reagentia :

— Barbituurzuuroplossing : Weeg in een maatkolf van 100 ml 500 mg barbituurzuur af, die van te voren gedroogd is bij 105° C, en voeg 70 ml water toe. Plaats de kolf op een waterbad totdat het barbituurzuur is opgelost. Laat afkoelen en vul met water aan tot de maatstreep. Bewaar de oplossing in een ijskast.

— p-Toluidine-oplossing : Los 10,0 g p-toluidine p.a. in ongeveer 50 ml isopropanol op onder voorzichtige verwarming op een waterbad. Breng deze oplossing over in een maatkolf van 100 ml en voeg 10 ml ijsazijn toe. Laat afkoelen en vul met isopropanol aan tot de maatstreep. Bewaar de

1045

oplossing in een bruine fles in de ijskast. Vernieuw de oplossing na 3 of 4 dagen.

10.1. De volgende bewerkingen moeten binnen één uur worden uitgevoerd.

10.2. Maak een stamoplossing door 10 g volgens 1.1. voorbereide honing op te lossen in ontlucht gedestilleerd water en in een maatkolf tot 50 ml aan te vullen met hetzelfde ontluchte gedestilleerde water.

10.3. Neem twee reageerbuisen en breng in ieder met behulp van een pipet 2.0 ml van de honingoplossing, voeg hieraan vervolgens 5,0 ml p-toluïdine-oplossing toe. Voeg aan reageerbuis nr 1 met behulp van een pipet 1,0 ml water toe en schud. Voeg aan reageerbuis nr 2 met behulp van een pipet 1,0 ml van de barbituurzuuroplossing toe, schud en druk gelijktijdig een chronometer in.

10.4. Breng de oplossingen in 1 cm cuvetten snel in de spectrofotometer. Lees, bij een golflengte van 550 nm, de extincties van oplossing 2 ten opzichte van oplossing 1 van minuut tot minuut gedurende 4 tot 5 minuten af gerekend vanaf de toevoeging van de barbituurzuuroplossing.

10.5. De curve van de extincties als functie van de tijd moet tussen 2 en 4 minuten een maximum hebben. Laat A deze maximale extinctie zijn.

10.6. Het gehalte aan HMF in mg/100 g wordt berekend volgens:
 $A \times 19,2$

Aangenomen wordt, dat als het resultaat de 4 mg/100 g niet passeert, het HMF afwezig is.

11. Vuilproef (Filtth-test)

Reagentia :

— Salpeterzuur s.g. 1,37

11.1. Los 200 g van de volgens 1.2 voorbereide honing op in 200 ml heet, met 5 ml HNO_3 aangezuurd water.

11.2. Filtreer direct daarna door een 7 cm snel lopend papierfilter in een afzuigtrechter.

Was met zo min mogelijk heet water na en onderzoek het filter microscopisch.

12. Kleurstoffen

Het onderzoek wordt verricht conform Aanbeveling M (65) 4 van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie inzake de toepassing van een Benelux-Referentiemethode voor het opsporen en het identificeren van in levensmiddelen aanwezige, in water oplosbare, synthetische kleurstoffen.

1046

13. Pollen

Microscopisch onderzoek.

14. Microbiologisch onderzoek

14.1. Schimmels

Onderzoek de oppervlakte van de honing macroscopisch op de afwezigheid van schimmels