

1064

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) 20 inzake de
harmonisatie der wetgevingen betreffende
zetmeel en puddingpoeder**

M (68) 52

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 zetmeel en puddingpoeder, M (63) 20,

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
bijaande analysemethoden betreffende zetmeel en pudding-
poeder vóór 1 juli 1969 in hun wetgeving op te nemen als
enig geldige referentiemethoden.

Gedaan te Brussel, op 11 december 1968.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

P. GREGOIRE

1065

Analysemethode voor zetmeel en puddingpoeder

M (68) 52, Bijlage

1. Bepaling van het vochtgehalte

Apparatuur

Een elektrisch verwarmde stoof regelbaar tussen 130 en 133° C (1) met voldoende ventilatie (2).

1.1. Breng ongeveer 5 gram van de waar in een weegdoosje met platte bodem en goed sluitend deksel. Bepaal het gewicht tot op 1 mg nauwkeurig.

1.2. Plaats het met het analysemonster gevulde doosje met open deksel gedurende 2 uur in de stoof, berekend vanaf het moment dat de temperatuur van de stoof 130° C weer bereikt heeft. Neem het monster uit de stoof en bepaal het gewicht van het doosje met gesloten deksel na afkoeling in een exsiccator.

1.3. Het gewichtsverlies berekend op 100 g van de waar is het vochtgehalte.

2. Bepaling van het asgehalte

Reagentia :

Ethanol 96 vol. %.

2.1. Weeg nauwkeurig 5-6 gram van de waar af in een van te voren uitgedroogde en getareerde platina schaal. Bevochtig het analysemateriaal met 1 - 2 ml ethanol.

2.2. Plaats de schaal vóór in een moffeloven en laat de deur open. Schuif de schaal, nadat het materiaal is uitgebrand verder in de oven, waarvan de temperatuur 900° C is. Veras gedurende 2 uur onder een voldoende toevoer van lucht.

2.3 Haal het schaaltje uit de oven en plaats het gedurende 1 min. op een asbest-cementplaat. Koel daarna in een exsiccator af tot kamertemperatuur. Weeg tenslotte snel tot op 0,1 mg nauwkeurig (3).

- (1) Temperatuur van de lucht in de buurt van de weegdoosjes. De stoof moet een zodanige verwarmingscapaciteit hebben, dat zij, na van tevoren op 131° C te zijn gebracht, deze temperatuur binnen 45 minuten, nadat het maximale aantal monsters dat tegelijk kan worden gedroogd in de stoof is gebracht, weer bereikt.
- (2) De doeltreffendheid van de ventilatie wordt gecontroleerd met durumgries, waarvan de deeltjes niet groter zijn dan 1 mm. De ventilatie moet zodanig zijn dat, wanneer het maximale aantal monsters dat de stoof kan bevatten gedurende 2 en gedurende 3 uur bij 130 - 133° C wordt gedroogd, de resultaten onderling niet meer afwijken dan 0,15 % vocht.
- (3) De as is hygroscopisch.

1066

2.4. de hoeveelheid as in percenten van de stof bedraagt :

$$\frac{b - a}{M} \times 100$$

waarin :

a = gewicht van de lege schaal in grammen

b = gewicht van de schaal met het gloeiresidu in grammen

M = gewicht van het ingewogen analysemateriaal in grammen.

3. Vuilproef (Filth-test)

Reagentia :

Zoutzuur, 4 n

Ethanol, 96 vol. %

Petroleumether, kooktraject 40 - 60° C

Vloeibare paraffine

Instrumenten :

Scheitrechter, eindigend in een cylindervorming gedeelte (diameter 1 cm, lengte 8 cm) boven de kraan.

Twee glazen platen, waarvan één voorzien van een lijnenraster van 2 mm. De lijnen moeten genummerd zijn.

Kieselgurfilter, Delta n° 325, of gelijkwaardig, diameter 4 cm.

Filter, SS n° 1575 of gelijkwaardig, diameter 5 cm.

Doorzichtig plakband.

3.1. Breng 100 g van het monster in een konische kolf van 1 liter. Voeg 350 ml water en 50 ml zoutzuur toe. Breng het mengsel onder goed roeren aan de kook en kook gedurende 1 uur. Zorg, dat aan de wand van de kolf boven de vloeistof geen vaste bestanddelen kleven. Laat iets afkoelen.

3.2. Voeg 20 ml paraffine toe, roer krachtig en vul met water aan tot de paraffinelaag in de hals van de kolf staat. Laat de kolf een kwartier rustig staan.

3.3. Vul het cylindervormige gedeelte van de scheitrechter met water en giet de paraffine en een deel van de waterige vloeistof in de scheitrechter. Vul de inhoud van de kolf met water aan en giet wederom af in de scheitrechter. Herhaal deze bewerking totdat alle paraffine in de scheitrechter is overgebracht. Laat een kwartier rustig staan.

3.4. Breng opnieuw 5 ml paraffine in de kolf en roer de gehele inhoud goed om. Vul aan met water tot de paraffinelaag in de hals van de kolf staat. Laat een kwartier rustig staan.

3.5. Laat het water uit de scheitrechter weglopen, er voor zorgdragend, dat het cylindervormige gedeelte met water gevuld blijft. Giet vervolgens de paraffinelaag uit de kolf en een deel van de waterige oplossing in de scheitrechter.

3.6. Herhaal de bewerkingen 3.4. en 3.5. nog tweemaal.

3.7. Laat wederom het grootste deel van het water uit de scheitrechter weglopen en voeg 300 ml water toe. Schud om en tap, na een kwartier rustig staan, het water grotendeels af. Herhaal deze bewerking tot het aflopende water helder is.

3.8. Voeg toe 100 ml petroleumether en 200 ml water. Schud om en laat, na een kwartier staan, zoveel water af, totdat slechts enkele ml overblijven.

3.9. Leg in een Buchnertrechter van 4 cm diameter een kieselguhr-filter en daarop het filter SS n° 1575. Laat de rand hiervan tegen de wand van de Buchnertrechter aansluiten.

3.10. Breng de vloeistof uit de scheitrechter bij gedeelten op het filter en zuig af. Bedek de Buchnertrechter hierbij met een horlogeglas. Was de scheitrechter met water geheel schoon en breng het waswater op het filter. Was tenslotte viermaal met 20 ml ethanol.

3.11. Breng het filter over in een Petrischaal en droog het hierin, afgedekt, bij 60° C. Bevochtig het filter met enige druppels paraffine en laat deze zich over het gehele oppervlak uitbreiden.

3.12. Plaats het filter zodanig tussen de twee glazen platen, dat het raster van de verdeelde glasplaat direct op het filter komt te liggen. Fixeer de beide glazen platen met doorzichtige plakbanden.

3.13. Tel onder zwakke vergroting het aantal insecten, mijten en de fragmenten hiervan alsmede het aantal haren van knaagdieren voorkomend op het gehele filter.

3.14. Geef de uitkomst op per 100 g materiaal.

4. 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 aktiveer vervolgens door verwarming op 110° C gedurende 30 minuten.

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

Chromatografiekamer : verzadigd met de loopvloeistof.

Detectiemiddelen

— Benzoëzuur :

a) 4,5 ml H_2O_2 (30 %)

4,5 ml water

1 ml $Mn SO_4$ verzadigd

b) 0,3 % $Fe SO_4$ oplossing

— Sorbinezuur :

a) meng 5 vol. van een waterige 0,5 % $K_2Cr_2O_7$ 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 phenolrood-oplossing (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.

4.1. Isolatie

4.1.1. Schud 10 g van het produkt met 50 ml van de aangezuurde ether gedurende 3 minuten.

4.1.2. Laat bezinken en breng voorzichtig de etherlaag op een filter. Herhaal deze bewerking met 30 vervolgens met 20 ml aangezuurde ether.

4.1.3. Verzamel de etherische extracten droog met watervrij natriumsulfaat. Filtreer. Damp af tot een volume van ± 5 ml.

4.2. Identificatie

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

4.2.2. 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.

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

4.2.4. 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) chloride-oplossing. Salicylzuur geeft een violette vlek.

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

Monobroomazijnzuur : stel de plaat 10 min. bloot aan ammoniakdampen, verwarm 10 min. op 100°C om de overmaat amoniak te verdrijven. Bespuit met fenolrood natriumacetaatmengsel, vervolgens met de chloramine 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.

4.2.5. 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 bij U.V. licht golflengte 366 nm.

5. Aantonen van kunstmatige zoetstoffen

Lijst der reagentia en hulpmiddelen

- natriumsulfaat-oplossing : verzadigd
- watervrij natriumsulfaat
- ethylacetaat
- ethanol p.a. 96 %
- ethanol-water 1 : 1

1070

— 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 & C^o) 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, (1) 6 vol. n-propanol, 7 vol. azijnzuur en 2 vol. mierzuur. Bereid op het ogenblik van het gebruik. Voorzie de chromatografiekamer van filterpapier ter verzadiging van de kamer.

— Detectiemiddel : los 200 mg dichloorfluoresceïne op in 100 ml ethanol.

5.1. Isolatie

5.1.1. Schud gedurende 3 minuten 3 g monster met 50 ml aangezuurde ethylacetaat.

5.1.2. Laat bezinken en breng de bovenstaande vloeistof voorzichtig op een filter. Herhaal deze bewerking met 30 vervolgens met 20 ml aangezuurde ethylacetaat.

5.1.3. Verzamel de ethylacetaatextracten, droog over watervrij natriumsulfaat. Filtreer en damp in tot een volume van 4 ml.

5.2. Identificatie

5.2.1. Breng 3 μ l van de verkregen oplossing op de startlijn van een plaat voor dunnelaagchromatografie.

5.2.2. Breng vervolgens 2 μ l van de cyclamaat-, de dulcine- en de saccharine-oplossing op de startlijn.

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

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

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

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

6. Kleurstoffen

Het onderzoek wordt verricht conform de 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.

7. Zuurtegraad

Reagentia :

- natriumhydroxydeoplossing 0,1 n
- ethanol 67 vol. %
- fenolftaleïne, 1 % ethanolische oplossing.

7.1. Meng 10 g van het monster gedurende 5 minuten met 50 ml alcohol, die van tevoren met 0,1 n natriumhydroxydeoplossing op fenolftaleïne geneutraliseerd is. Filtreer vervolgens door een vouwfilter met een diameter van 15 cm, terwijl de trechter afgedekt wordt. Pipetteer 25 ml van het filtraat zodra genoeg is doorgelopen in een konische kolf van 100 ml. Na toevoeging van 3 druppels fenolftaleïne titreer met de natriumhydroxydeoplossing tot aan een rose verkleuring.

7.2. Het aantal verbruikte ml natriumhydroxydeoplossing 0,1 n vermenigvuldigd met 2 geeft de zuurgraad.

8. Aard van het zetmeel

8.1. Breng een paar korreltjes of een weinig van de te onderzoeken waar op een voorwerpglaasje. Voeg een druppeltje water toe en meng met een roerstaafje. Bedek het mengsel met een dekglasje en bekijk het preparaat microscopisch.

9. Bepaling van sulfiet in maïszetmeel

Reagentia :

- Methanol
- Stikstof in cylinder
- Waterstofperoxyde 3 % g/g (vers bereid)
- Zoutzuur 4n
- Broomfenolblauw 0,1 % (g/v) in 20 % (v/v) ethanol
- Natriumhydroxyde 0,1000 n.
- Bariumchloride 0,01 M.

— Bufferoplossing : los op 10 g magnesiumdikaliumzout van EDTA in 200 ml water en meng met een oplossing van 70 g ammoniumchloride in 1800 ml ammoniak 25 % (g/g).
(EDTA = ethyleen diamine N.N' tetra azijnzuur).

— EDTA-oplossing 0,0200 M ; los op 7,444 g dinatriumzout van EDTA in water en vul aan tot 1000 ml. Stel de titer t_k .

— Eriochroomzwart-T : los op 0,5 g Eriochroomzwart-T en 4,5 g hydroxylamine hydrochloride in 96 vol % ethanol en verdun tot 100 ml. (Deze oplossing is 3 weken houdbaar).

Benodigde apparatuur

Zwavel dioxide-destillatietoestel (zie tekening blz. 1074) bestaande uit vijf delen.

A is een kolf van 1 liter met twee slijpstukken B 34.

D is een recipiënt met 25 ml inhoud ; gas kan ontsnappen door een geperforeerd bolletje. Het verbindingstuk E is voorzien van slijpstukken B 12,5 en B 19.

Alle slijpstukken worden afgedicht met siliconenvet en met veren vergrendeld.

Elektrische kookplaat met magnetische roerder.

9.1. Breng in de kookkolf een magnetisch roerstaafje, enige kooksteentjes en 50 ml methanol.

Leid door het gehele toestel gedurende ten minste 15 minuten een gelijkmatige stikstofstroom van ca. 100 ml/min.

Breng met behulp van een maatcilinder 10 ml waterstofperoxyde in de recipiënt (D).

9.2. Weeg 100 g van de waar (tot op 0,1 g nauwkeurig) af in een bekersglas van 600 ml.

Voeg 100 ml methanol toe en roer tot een gladde suspensie.

Laat, zonder de gasstroom te onderbreken, deze suspensie door de doseertrechter in de kolf vloeien.

Spoel bekersglas en trechter enige malen na met totaal 75 ml methanol en 50 ml gedestilleerd water. Houd de suspensie in beweging d.m.v. de magnetische roerder.

Voeg dan, eveneens door de doseertrechter, 40 ml zoutzuur toe en stel de koeling in werking.

Verhit de kolf zodanig, dat de inhoud krachtig en gelijkmatig kookt ; zet het koken gedurende één uur voort, onder voortdurend gas inleiden.

9.3. Spoel de inhoud van de recipiënt met weinig gedestilleerd water over in een konische kolf van 300 ml en kook 15 minuten.

Titreer, na afkoelen en toevoegen van 3 druppels broomfenolblauw, met natriumhydroxyde (Verbruik a ml). Verricht een blanco titratie van 10 ml waterstofperoxyde na 15 min. koken en afkoelen. (Verbruik b ml).

1073

9.4. Kook de na de alkalimetrische titratie verkregen oplossing gedurende 5 minuten en voeg aan de kokende vloeistof met een pipet 10,00 ml bariumchloride toe. Kook nog één minuut door en plaats de kolf gedurende één uur op een kokend waterbad.

Koel af en voeg zoveel water toe, tot het volume ca. 100 ml bedraagt.

9.5. Voeg nu achtereenvolgens toe 4 ml bufferoplossing, 0,5 ml zoutzuur en 7 druppels Eriochroomzwart-T.

Titreer direct met de EDTA-oplossing uit een microburet, tot de vloeistof zuiver blauw is. (Verbruik c ml).

Verricht een blanco titratie van 10 ml bariumchloride. (Verbruik d ml).

9.6. Bereken het sulfietgehalte G van de waar uit de alkalimetrische titratie met behulp van de formule :

$$G = \frac{(a-b) \cdot t_1 \cdot 32.1000}{g} \text{ mg SO}_2/\text{kg}$$

of uit de komplexometrische titratie met behulp van de formule :

$$G = \frac{(d-c) \cdot t_k \cdot 64.1000}{g} \text{ mg SO}_2/\text{kg}$$

t_1 = titer loog (NaOH).

t_k = titer EDTA-oplossing

10. Microbiologisch onderzoek

10.1. Schimmels

Deze methode zal worden beschreven in een aanvulling bij deze Aanbeveling.

1074

