

AANBEVELING

**van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie
inzake de toepassing van Benelux-Referentie-Methoden
van onderzoek, behorende bij aanbeveling M (68) 20
inzake de harmonisatie der wetgevingen betreffende
koffie, koffie-extracten en koffiesurrogaat**

M (69) 28

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 29 januari 1968 inzake de harmonisatie der wetgevingen betreffende koffie, koffie-extracten en koffie-surrogaat, M (68) 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 voedingsmiddelen toezicht 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 koffie, koffie-extracten en koffiesurrogaat vóór 1 maart 1970 in hun wetgeving op te nemen als enig geldige referentiemethoden.

Gedaan te Brussel, op 23 december 1969.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

H. FAYAT.

ANALYSEMETHODE
behorende bij Aanbeveling M (68) 20 inzake
koffie, koffie-extracten en koffiesurrogaat
M (69) 28, Bijlage

1. VOCHT

1.1. Weeg nauwkeurig 5-10 gram van de tot poeder gebrachte waar af in een weegdoosje met platte bodem en goed sluitend deksel.

1.2. Droog bij 102-105° C tot het gewichtsverlies tussen twee wegingen, verricht met een tussenpoos van 45 minuten, minder dan 5 mg bedraagt.

1.3. Het gewichtsverlies berekend op 100 g is het watergehalte.

2. AS

Reagentia

— Zwavelzuur 94-96 gew. % ; s.g. 1,837-1,840

— Ammoniumcarbonaat, vast.

2.1. Weeg in een getareerde kroes, nauwkeurig 5-10 gram van de tot poeder gebrachte waar af.

2.2. Meng met water aan tot een papje ; voeg 1 ml zwavelzuur toe en meng opnieuw.

2.3. Verhit voorzichtig ter verwijdering van het water en de overmaat zwavelzuur en gloei. Laat afkoelen. Voeg aan de as enkele druppels zwavelzuur toe en gloei opnieuw.

2.4. Voeg gedurende het gloeien enig ammoniumcarbonaat toe. Laat afkoelen en weeg.

2.5. Bereken het asgehalte door de gevonden sulfaatas uitgedrukt per 100 g waar te vermenigvuldigen met 8/9.

3. IN ZOUTZUUR ONOPLOSBAAR AS

Reagentia

— Zoutzuur 4 n.

3.1. Trek de volgens 2 verkregen as uit met warm zoutzuur door 10 minuten te koken. Filtreer door een asvrij filter en was uit tot zuurvrij. Veras het filter en gloei.

3.2. Laat afkoelen in een exsiccator en weeg. Herhaal gloeien en afkoelen totdat het verschil tussen twee opeenvolgende wegingen minder dan 1 mg bedraagt.

3.3. Druk het resultaat uit in gewichtspersenten van de droge stof.

4. CHLORIDE VAN DE AS

Reagentia

- Salpeterzuur s.g. 1,25
- Natriumcarbonaatoplossing 1 n
- IJzer (III) ammoniumsulfaatoplossing, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$, verzadigd
- Kalium- of ammoniumthiocyanaaatoplossing 0,1 n
- Zilvernitraatoplossing 0,1 n.

4.1. Weeg nauwkeurig 10 g van de tot poeder gebrachte waar af in een platina schaal.

4.2. Bevochtig het poeder met een zodanige hoeveelheid natriumcarbonaatoplossing, dat de hoeveelheid natriumcarbonaat ongeveer het 10-voudige bedraagt van de te verwachten hoeveelheid natriumchloride.

Droog en veras.

4.3. Neem de as op in warm gedestilleerd water, zuur voorzichtig aan met salpeterzuur en filtreer.

4.4. Bepaal de chloor-ionen volgens Volhard. Druk het resultaat uit in gewichtspersenten van de as.

5. EXTRACT EN DROGE STOF

5.1. Voor alle vaste waren, met uitzondering van droge extracten

5.1.1. Weeg nauwkeurig 10 g van de tot poeder gebrachte waar af, en breng dit over in een bekersglas met daarin geplaatste roerstaaf.

5.1.2. Voeg nauwkeurig afgemeten 200 ml gedestilleerd water toe en weeg.

5.1.3. Breng de vloeistof onder omroeren voorzichtig aan de kook en laat 5 minuten koken.

5.1.4. Laat afkoelen en voeg gedestilleerd water toe tot oorspronkelijk gewicht. Meng zorgvuldig en filtreer.

5.1.5. Bepaal van het filtraat het soortelijk gewicht bij 15° C tot op 0,0001 nauwkeurig en bereken het extractgehalte uit de bijgevoegde tabel.

5.2. Voor droge extracten

5.2.1. Bereken het gehalte aan droge stof door 100 te verminderen met het percentage water, bepaald volgens 1.

5.3. Voor alle vloeibare waren

5.3.1. Leid het extractgehalte af uit het soortelijk gewicht, bepaald van de waar als zodanig, of van een, na geschikte verdunning met gedestilleerd water verkregen oplossing. Dit extractgehalte wordt tevens als droge stofgehalte aangemerkt.

6. VUILPROEF (Filth-test) (voor gemalen koffie)

Reagentia

- Zoutzuur, 4 n.
- Ethanol, 96 vol. %.
- Petroleumether, kooktraject 40 — 60° C.
- Vloeibare paraffine.

Instrumenten

- Scheitrechter, eindigend in een cilindervormig gedeelte (diameter 1 cm, lengte 8 cm) boven de kraan.
- Twee glazen platen, waarvan één voorzien van een lijnen raster van 2 mm. De lijnen moeten genummerd zijn.
- Kieselgurfilter, Delta nr. 325, of gelijkwaardig, diameter 4 cm.
- Filter, SS no 1575 of gelijkwaardig, diameter 5 cm.
- Doorzichtig plakband.

6.1. Breng 50 g gemalen koffie (1) in een konische kolf van 1 liter. Voeg 350 ml water en 50 ml zoutzuur toe. Breng het mengsel onder

(1) Zeef bij grof gemalen koffie de grovere delen van het monster zonodig af en onderzoek deze afzonderlijk microscopisch zoals onder 6.13.

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.

6.2. 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.

6.3. Vul het cilindervormige 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.

6.4. 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.

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

6.6. Herhaal de bewerkingen 6.4. en 6.5. nog tweemaal.

6.7. 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.

6.8. 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.

6.9. Leg in een Buchnertrechter van 4 cm diameter een kieselguhr-filter en daarop het filter SS no 1575. Laat de rand hiervan tegen de wand van de Buchnertrechter aansluiten.

6.10. 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.

6.11. 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.

6.12. 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.

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

6.14. Geef de uitkomst op per 50 g onderzocht materiaal.

7. GLANSMIDDELEN

Reagentia

- Diéthylether
- Ethanol 96 vol. %

7.1. Schud 10 g bonen gedurende 2 minuten met 50 ml ether.

Filtreer de ether in een gewogen kolfje, was filter en bonen na met ether. Destilleer het oplosmiddel af. Droog het kolfje een uur in een stoof op 96 - 98° C en weeg. Bereken het percentage van de met ether afwasbare en daarin oplosbare stoffen.

7.2. Verwarm 10 g bonen met 100 ml ethanol tot koken. Filtreer de alcohol en was bonen en filter met warme alcohol na. Vul het filtraat aan tot 150 ml. Breng in een gewogen kolfje 100 ml filtraat en destilleer de ethanol af. Droog het kolfje één uur bij 102 - 105° C en weeg. Bereken het percentage van de met alcohol afwasbare en daarin oplosbare stoffen.

7.3. Schud 20 g bonen gedurende 5 minuten met 500 ml water. Filtreer daarna door een wattenpropje en vul het filtraat aan tot 500 ml. Damp 250 ml van het filtraat tot droog in een platina schaal. Droog de rest gedurende 3 uur bij 102 - 105° C en weeg (W_1 g). Veras het residu en weeg de verkregen as (W_2 g).

Het percentage van de met water afwasbare en daarin oplosbare organische stoffen is gelijk aan $10 (W_1 - W_2)$.

8. COFFEINE

Reagentia

- IJsazijn
- Aangezuurde waterstofperoxydeoplossing: voeg aan 100 ml waterstofperoxyde 3 % 1 ml ijsazijn toe
- Kaliumpermanganaatoplossing 1 %
- Chloroform
- Paraffine, vast
- Tetrachloorkoolstof

8.1. In koffie

8.1.1. Weeg in een bekglas nauwkeurig 15 g gemalen koffie (korrelgrootte ± 1 mm) af. Meng met ongeveer 7,5 ml water.

8.1.2. Breng na ongeveer 1 à 2 uur het mengsel over in een extractiehuls en extraheer met tetrachloorkoolstof.

8.1.3. Voeg aan het extract 1 gram vaste paraffine toe en destilleer de tetrachloorkoolstof af.

8.1.4. Kook het residu met 50 ml water gedurende ongeveer een halve minuut op een asbestplaat. Filtreer het extract na afkoelen door een vochtig filter.

8.1.5. Herhaal deze bewerking driemaal, telkens met 25 ml water. Was het filter na met 75 ml kokend water.

8.1.6. Voeg bij het afgekoelde filtraat 30 ml kaliumpermanganaatoplossing. Laat een kwartier staan.

8.1.7. Voeg druppelsgewijze aangezuurde waterstofperoxydeoplossing toe totdat de overmaat kaliumpermanganaat als MnO_2 is overgeslagen.

Verwarm de vloeistof een kwartier op een kokend waterbad en filtreer warm. Was het filter en neerslag uit met 75 ml warm water.

8.1.8. Damp het filtraat in een glazen schaal op een waterbad in tot droog. Droog nog een kwartier bij 100° C. Het residu wordt daarna onmiddellijk uitgetrokken met warme chloroform.

8.1.9. Filtreer het chloroformextract in een getareerde kolf en destilleer de chloroform af. Droog het residu gedurende een half uur bij 102 - 105° C en weeg.

8.2. In extracten

8.2.1. Extraheer met tetrachloorkoolstof 50 ml extract (droge extracten worden met water in een geschikte oplossing gebracht) in een perforator. Destilleer de tetrachloorkoolstof af.

8.2.2. Vervolg de bepaling als aangegeven in 8.1.4. en volgende.

9. KLEURSTOFFEN

Verricht het onderzoek op de wijze als in de Benelux-referentiemethoden voor het opsporen en identificeren van in levensmiddelen aanwezige, in water oplosbare, synthetische kleurstoffen, M (65) 4, bijlage bij de aanbeveling van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie, M (63) 18 inzake de harmonisatie der wetgevingen betreffende kleurstoffen, welke kunnen worden gebruikt in voor menselijke voeding bestemde waren, is aangegeven.

10. 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. mierzuur
- 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 fenolroodoplossing (24 mg fenolrood 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.

10.1. Isolatie

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

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

10.1.3. Verzamel de etherische extracten droog met watervrij natriumsulfaat. Filtreer. Damp af tot een volume van $\pm$ 5 ml.

10.2. Identificatie

10.2.1. 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.

10.2.2. 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.

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

10.2.4. 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 ammoniak 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.

10.2.5. 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 mm.

11. MICROBIOLOGISCH ONDERZOEK

Bij macroscopisch onderzoek mogen op het oppervlak van de koffie geen schimmelen zichtbaar zijn.

TABEL VOOR DE AFLEIDING VAN HET EXTRACTGEHALTE
TABLE POUR LA DETERMINATION DE
LA TENEUR EN EXTRAIT

S.g. — 15	15 P.s. — 15	Temp. corr. voor 1° tussen 15°-30°C	Correction par degré de températ. entre 15°-30°C	Gram extract per 100 ml oplossing	Gramme extrait 100 ml de solution
1.000			0,00023		0,00
1			0,00023		0,26
2			0,00023		0,52
3			0,00023		0,77
4			0,00023		1,03
5			0,00023		1,29
6			0,00023		1,55
7			0,00024		1,81
8			0,00024		2,07
9			0,00024		2,33
10			0,00024		2,58
15			0,00024		3,87
20			0,00024		5,17
25			0,00025		6,46
30			0,00025		7,76
35			0,00026		9,05
40			0,00026		10,35
45			0,00027		11,65
50			0,00027		12,95
55			0,00028		14,25
60			0,00029		15,55
65			0,00029		16,86
70			0,00030		18,16
75			0,00030		19,47
80			0,00031		20,78
85			0,00032		22,09
90			0,00032		23,41
95			0,00033		24,72
100			0,00033		26,04
110			0,00034		28,67
120			0,00035		31,31
130			0,00036		33,96
140			0,00037		36,61
150			0,00038		39,27
160			0,00039		41,94
170			0,00040		44,62
180			0,00041		47,30
190			0,00042		49,99
200			0,00043		52,68

1195

TABEL VOOR DE AFLEIDING VAN HET EXTRACTGEHALTE
TABLE POUR LA DETERMINATION DE
LA TENEUR EN EXTRAIT

15 S.g. — 15	15 P.s. — 15	Temp. corr. voor 1° tussen 15°-30°C	Correction par degré de températ. entre 15°-30°C	Gram extract per 100 ml oplossing de solution	Gramme extrait par 100 ml
210			0,00044		55,39
220			0,00044		58,10
230			0,00045		60,82
240			0,00046		63,56
250			0,00047		66,29
260			0,00048		69,04
270			0,00049		71,80
280			0,00050		74,57
290			0,00051		77,35
300			0,00051		80,13
310			0,00052		82,93
320			0,00052		85,74
330			0,00052		88,55
340			0,00053		91,38
350			0,00053		94,21
360			0,00053		97,07