

EUROPESE ECONOMISCHE GEMEENSCHAP

MEDEDELINGEN

DE RAAD

RICHTLIJN VAN DE RAAD

van 27 juni 1967

betreffende het gebruik van bepaalde conserveermiddelen voor de oppervlaktebehandeling van citrusvruchten alsmede betreffende de controlemaatregelen voor de opsporing en de kwantitatieve bepaling van conserveermiddelen in en op citrusvruchten

(67/427/EEG)

DE RAAD VAN DE EUROPESE ECONOMISCHE GEMEENSCHAP,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap, inzonderheid op artikel 100,

Gezien het voorstel van de Commissie,

Gezien het advies van het Europese Parlement⁽¹⁾,

Gezien het advies van het Economisch en Sociaal Comité⁽²⁾,

Overwegende dat op grond van artikel 5 van de richtlijn van de Raad van 5 november 1963 betreffende de aanpassing van de wetgevingen van de Lid-Staten inzake conserveermiddelen die mogen worden gebruikt in voor menselijke voeding be-

stemde waren⁽³⁾, laatstelijk gewijzigd bij artikel 1 van de richtlijn van de Raad van 14 december 1966⁽⁴⁾, de Lid-Staten tot en met 30 juni 1967 de bepalingen van de nationale wetgevingen inzake de oppervlaktebehandeling van citrusvruchten met bifenyl (difenyl), orthofenylfenol en natriumorthofenylfenolaat kunnen handhaven;

Overwegende dat het gebruik van deze stoffen voor de oppervlaktebehandeling van citrusvruchten geen gevaar voor de volksgezondheid inhoudt indien het residugehalte per kilogram hele vruchten aan bifenyl niet groter is dan 70 mg en aan orthofenylfenol en natriumorthofenylfenolaat, berekend als orthofenylfenol, niet groter is dan 12 mg; overwegende voorts dat in alle handelsstadia de verrichte behandeling op passende wijze dient te worden aangegeven;

Overwegende dat de toelating tot het gebruik van de genoemde drie stoffen op communautair vlak eveneens het vastleggen van gemeenschappelijke

⁽¹⁾ PB no. 63 van 3. 4. 1967, blz. 990/67.

⁽²⁾ PB no. 64 van 5. 4. 1967, blz. 1005/67.

⁽³⁾ PB no. 12 van 27. 1. 1964, blz. 161/64.

⁽⁴⁾ PB no. 233 van 20. 12. 1966, blz. 3947/66.

regels voor de officiële controle van de behandelde citrusvruchten noodzakelijk maakt;

Overwegende dat de toepassing door de Lid-Staten van deze richtlijn eerst na een overgangsperiode kan worden verwezenlijkt; dat derhalve tot aan het einde van deze periode de bepalingen van de nationale wetgevingen met betrekking tot de oppervlaktebehandeling van citrusvruchten met de drie onderhavige conserveermiddelen moeten worden gehandhaafd;

Overwegende dat een Lid-Staat niet de verplichting dient te worden opgelegd, het gebruik van een conserveermiddel toe te staan in voedingsmiddelen die op zijn eigen grondgebied worden voortgebracht en geconsumeerd, wanneer er geen technologische noodzaak bestaat die dit gebruik zou rechtvaardigen,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De richtlijn van de Raad van 5 november 1963 betreffende de aanpassing van de wetgevingen van de Lid-Staten inzake conserveermiddelen die mogen worden gebruikt in voor menselijke voeding bestemde waren wordt als volgt gewijzigd:

1. De tweede zin van artikel 2, lid 2, wordt vervangen door de volgende tekst:

„De wetgeving van een Lid-Staat mag evenwel niet volledig het gebruik uitsluiten van een der in de bijlage genoemde conserveermiddelen, behoudens wanneer er geen technologische noodzaak bestaat voor gebruik daarvan in de op zijn eigen grondgebied voortgebrachte en geconsumeerde voedingsmiddelen”.

2. De volgende conserveermiddelen worden toegevoegd aan die welke zijn opgesomd onder I van de bijlage:

E.E.G.-nummering	Benaming	Gebruikswijze
E 230 E 231 E 232	Bifenyl (Difenyl) Orthofenylfenol Natriumorthofenylfenolaat	a) Uitsluitend voor de oppervlaktebehandeling van citrusvruchten; b) Bij het in de handel brengen van citrusvruchten i) mag het residugehalte per kilogram (hele) citrusvruchten niet groter zijn dan de volgende waarden; voor bifenyl: 70 mg en voor orthofenylfenol en natriumorthofenylfenolaat, afzonderlijk of te zamen, berekend als orthofenylfenol: 12 mg; ii) moet de behandeling als volgt aangeven: — in de groothandel in de facturen en op een der buitenkanten van de verpakking door de vermelding: „Geconserveerd met ...” gevolgd door de benaming van de gebruikte stof of stoffen; — in de kleinhandel door een zichtbare aanduiding waardoor de consument hiervan op ondubbelzinnige wijze in kennis wordt gesteld.

3. Artikel 5, lid b), vervalt.

Artikel 2

De Lid-Staten nemen alle dienstige maatregelen om te bewerkstelligen dat de monsterneming en het onderzoek voor de opsporing en de kwantitatieve bepaling van bifenyl, orthofenylfenol en natrium-orthofenylfenolaat in en op citrusvruchten geschieden overeenkomstig de bepalingen van de bijlagen I, II, III en IV van deze richtlijn.

Artikel 3

1. De Lid-Staten treffen de nodige maatregelen om de bepalingen van deze richtlijn uiterlijk 1 juli 1968 toe te passen en geven daarvan onmiddellijk kennis aan de Commissie.

2. Tot 1 juli 1968 kunnen de Lid-Staten de bepalingen handhaven van de nationale wetgevingen met betrekking tot de oppervlaktebehandeling van citrusvruchten met bifenyl, orthofenylfenol en natriumorthofenylfenolaat.

Artikel 4

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 27 juni 1967.

Voor de Raad

De Voorzitter

R. VAN ELSLANDE

 BIJLAGE I

**WIJZE WAAROP MONSTERS VAN CITRUSVRUCHTEN MOETEN
WORDEN GENOMEN TEN BEHOEVE VAN DE CONTROLE OP
CONSERVEERMIDDELEN**

A. Monsternemingen

I. De monsters moeten volgens wetenschappelijke methoden worden genomen en wel zodanig dat representatieve monsters van de te onderzoeken partijen worden verkregen.

II. De monsters moeten ten minste aan de volgende eisen voldoen:

1. *Verpakte waar* (kisten, dozen en dergelijke)

Aantal kisten, dozen, e.d. in de partij	t/m 20	van 21 t/m 500	van 501 t/m 1000	meer dan 1000
Minimum aantal kisten, dozen e.d., waaruit monsters moeten worden genomen	1	2	3	4
Hoeveelheid in kilogram per kist, doos, e.d. te nemen vruchten	2	2	2	2

2. *Onverpakte waar*

Hoeveelheid van de partij in kilogram	t/m 20	van 21 t/m 500	meer dan 500
Hoeveelheid te nemen monsters in kilogram	2	4	8

III. Onder partij wordt verstaan een te leveren hoeveelheid welke dezelfde kenmerken vertoont, zoals soort, graad van rijpheid, soort verpakking.

B. Verpakking en doorzending van de monsters

1. De verpakking van de monsters is hermetisch gesloten.
2. De verpakking wordt verzegeld.
3. De aldus verpakte monsters worden zo snel mogelijk aan de controle-laboratoria doorgezonden.

BIJLAGE II

OPSPORING VAN RESIDU'S VAN BIFENYL, ORTHOFENYLFENOL EN NATRIUMORTHOFENYLFENOLAAT IN SCHILLEN VAN CITRUSVRUCHTEN

1. Doel en toepassingsgebied:

Volgens de hieronder beschreven methode kunnen residu's van bifenyl, orthofenylnfenol (OFF) of natriumorthofenylnfenolaat in *schillen* van citrusvruchten worden aangetoond. De gevoeligheidsgrens ligt voor bifenyl ongeveer bij $5\mu\text{g}$ en voor OFF of natriumorthofenylnfenolaat bij $1\mu\text{g}$ absoluut, hetgeen overeenkomt met 5 mg bifenyl (5 ppm) respectievelijk 1 mg OFF (1 ppm) in de schillen van 1 kg citrusvruchten.

De behandeling van citrusvruchten met de bovenbedoelde produkten leidt ertoe, dat de residu's zich voor het grootste deel in de schillen van de vruchten bevinden. Kwantitatieve bepaling van deze residu's in hele vruchten blijkt daarom alleen noodzakelijk in gevallen waarin de aanwezigheid daarvan in de schillen wordt aangetoond.

2. Principe:

De schillen worden in een zuur milieu met dichloormethaan geëxtraheerd. Het extract wordt geconcentreerd en in een dunne laag op silicagel gechromatografeerd. De aanwezigheid van bifenyl, orthofenylnfenol of natriumorthofenylnfenolaat wordt door fluorescentie en kleurreacties aangetoond.

3. Reagentia:

cyclohexaan, analysekwaliteit
dichloormethaan, analysekwaliteit
zoutzuur van 25% (gew./vol.)
silicagel CF 254 Merck of gelijkwaardig produkt
0,5%-ige oplossing van 2.4.7-trinitrofluorenon (TNF) (Fluka, B.D.H. of gelijkwaardig produkt) in aceton
0,1%-ige oplossing van 2.6-dibroombenzochinon.4.chlorimide in ethanol (houdbaarheid: ten hoogste een week in een koelkast)
geconcentreerde oplossing van ammoniak, s.g. 0,9
referentieoplossing van 1% zuiver bifenyl in cyclohexaan
referentieoplossing van 1% zuiver orthofenylnfenol in cyclohexaan

4. Apparatuur:

mixer
kolf van 250 ml met geslepen hals en terugvloeikoeler
vacuumverdamper
micropipetten
toestel voor chromatografie in een dunne laag, met plaatjes van 20×20 cm
ultravioletlamp (254 nm): de sterkte moet zodanig zijn dat een vlek van $5\mu\text{g}$ bifenyl nog te herkennen is
verstuiver
droogkast.

5. Werkwijze:

a) *Vorbereiding van het monster en extractie:*

De vruchten waaruit het gehele ter controle genomen monster bestaat worden in tweeën gesneden. Een helft van elke vrucht wordt bestemd voor de bepaling van de residu's van bifenyl en/of orthofenylfenol. Van de andere helften worden stukken schil genomen om een monster van ongeveer 80 gram te verkrijgen. Deze stukken worden klein gesneden, in de mixer fijn gemaakt en in de kolf van 250 ml gebracht, vervolgens voegt men 1 ml zoutzuur van 25% alsmede 100 ml dichloormethaan toe. Dit mengsel wordt onder terugvloeiing 10 minuten lang verhit. Na afkoeling en uitspoeling van de koeler met ongeveer 5 ml dichloormethaan wordt door een vouwfilter afgefilterd. De oplossing wordt overgebracht in de verdampers, enkele kooksteentjes toegevoegd en onder vacuum bij 60°C geconcentreerd totdat een eindvolume van ongeveer 10 ml is verkregen. Indien een roterende verdampers wordt gebruikt moet de kolf vaststaan, om bifenylverliezen door vorming van een dun laagje van het verdampingsresidu op de wand van de kolf te vermijden.

b) *Chromatografie:*

30 gram silicagel en 60 ml water worden een minuut lang in een mixer gemengd, waarna het mengsel over 5 chromatografeerplaatjes wordt verdeeld en daarop in een laagje van ongeveer 0,250 mm dik wordt uitgestreken. De aldus behandelde plaatjes worden 15 minuten lang blootgesteld aan een hete luchtstroom en vervolgens geplaatst in een droogkast, waar zij 30 minuten lang bij een temperatuur van 110°C verblijven.

Na afkoeling wordt het op ieder plaatje aangebrachte laagje door evenwijdige strepen, die tot het glasoppervlak reiken, verdeeld in stroken van 2 cm breed. Op iedere strook wordt, op een afstand van ongeveer 1,5 cm van de rand van het plaatje en in rijen druppels naast elkaar, 50µl van het te onderzoeken extract gebracht. Ten minste één strook is bestemd voor het referentiemonster, bestaande uit een mengsel van 1 µl (dat is 10 µg) van elk der bifenyl- en orthofenylfenol referentieoplossingen.

Vervolgens worden de plaatjes met een mengsel van cyclohexaan en dichloormethaan (25:95) ontwikkeld in bakjes die tevoren van binnen met filtreerpapier zijn bekleed.

c) *Opsporing en identificatie:*

De aanwezigheid van bifenyl en orthofenylfenol blijkt uit het optreden van vlekken in ultraviolet licht (254 nm). Nadat het natriumorthofenylfenolaat bij de extractie in een zuur milieu in orthofenylfenol is omgezet, onderscheidt de aanwezigheid daarvan zich niet van het orthofenylfenol. De producten worden op de volgende wijze geïdentificeerd:

- i) het *bifenyl* geeft bij daglicht een gele vlek bij besproeiing met de TNF-oplossing;
- ii) het *orthofenylfenol* geeft een blauwe vlek bij besproeiing met de oplossing van 2.6-dibroombenzochinon.4.chlorimide, en daaropvolgende korte nabehandeling in een hete luchtstroom alsmede in een met ammoniak verzadigde atmosfeer.

BIJLAGE III

BEPALING VAN BIFENYL-RESIDU'S IN CITRUSVRUCHTEN

1. Doel en toepassingsgebied:

Volgens de hieronder beschreven methode kunnen residu's van bifenyl in (hele) citrusvruchten worden bepaald. Voor bifenylgehalten van meer dan 10 mg per kilogram vruchten (10 ppm) zijn de resultaten tot op ± 10% nauwkeurig.

2. Principe:

Na distillatie in een zuur milieu en daaropvolgende extractie met cyclohexaan wordt het extract in een dunne laag op silicagel gechromatografeerd. Het chromatogram wordt ontwikkeld, het bifenyl wordt geëluëerd en spectrofotometrisch bij 248 nm bepaald.

3. Reagentia:

geconcentreerd zwavelzuur

antischuimemulsie op siliconebasis

cyclohexaan, analysekwaliteit

hexaan, analysekwaliteit

ethanol, analysekwaliteit

watervrij natriumsulfaat

silicagel GF 254 Merck of gelijkwaardig produkt

referentieoplossing van 1% zuiver bifenyyl in cyclohexaan: te verdunnen met cyclohexaan tot (a) 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; (b) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; (c) 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4. Apparatuur:

mixer van 1 l

distilleerkolf van 2 l met afscheider van gewijzigd Clevenger-type(1) en terugvloeiakoeler

maatkolf van 10 ml

micropipetten van 50 μl

toestel voor chromatografie in een dunne laag, met plaatjes van 20×20 cm

droogkast

centrifugeertoestel met conische buizen van 15 ml

spectrofotometer voor metingen in ultraviolet licht

5. Werkwijze:

a) Voorbereiding van het monster en extractie:

De vruchten waaruit het gehele ter controle genomen monster bestaat worden in tweeën gesneden. Een helft van elke vrucht wordt bestemd voor de opsporing van residu's van bifenyyl, CFF of natriumorthofenyylfenolaat. De andere helften worden bijeengebracht, in een molen klein- of fijngemaakt totdat een homogeen mengsel is verkregen. Hieruit worden ten minste twee deelmonsters van 200 g genomen, welke op de hieronder beschreven wijze worden onderzocht. Ieder deelmonster wordt met 100 ml water in een mixer gebracht en bij geringe snelheid gedurende enkele seconden fijngemaakt. Er wordt water bijgevoegd totdat het volume van het mengsel $\frac{3}{4}$ van de inhoud van de mixer bedraagt. Vervolgens wordt met hoge snelheid gedurende 5 minuten fijngemaakt. De aldus verkregen brij wordt in de distilleerkolf van 2 l overgebracht. De mixer wordt met water uitgespoeld en het spoelwater bij de inhoud van de kolf gevoegd (de totale voor het fijnmaken en spoelen te gebruiken hoeveelheid water bedraagt 1 l). Aan het mengsel worden 2 ml zwavelzuur, 1 ml antischuimemulsie en enige kooksteentjes toegevoegd. De afscheider en de koeler worden op de kolf geplaatst.

In de afscheider wordt gedistilleerd water gebracht totdat het water duidelijk boven de onderste aftakking van de zijbuis voor de terugvloeiing staat, waarna 7 ml cyclohexaan wordt toegevoegd. Er wordt ongeveer 2 uur gedistilleerd. Vervolgens brengt men de inhoud van de afscheider over in de maatkolf van 10 ml, spoelt de afscheider uit met ongeveer 1,5 ml cyclohexaan, voegt de spoeloplossing bij de inhoud van de kolf en vult met cyclohexaan aan tot de streep. Tenslotte wordt een weinig watervrij natriumsulfaat bijgevoegd en geschud.

b) Chromatografie:

30 g silicagel en 60 ml water worden een minuut lang in een mixer gemengd, waarna het mengsel over 5 chromatografeerplaatjes wordt verdeeld en daarop in een laagje van ongeveer 0,250 mm dik wordt uitgestreken. De aldus behandelde plaatjes worden

(1) Zie figuur blz. 9.

15 minuten lang blootgesteld aan een hete luchtstroom en vervolgens geplaatst in een droogkast, waar zij 30 minuten lang bij een temperatuur van 110° C verblijven. Na afkoeling wordt het op ieder plaatje aangebrachte laagje door evenwijdige strepen, die tot het glasoppervlak reiken, verdeeld in 4 stroken van 4,5 cm breed. Op een van de stroken wordt, op een afstand van ongeveer 1,5 cm van de rand van het plaatje en in rijen druppels naast elkaar, 50 μ l van het te onderzoeken extract gebracht en op ieder van de andere drie stroken 50 μ l van de referentieoplossingen (a), (b) en (c), overeenkomende met hoeveelheden bifenylnyl van 30, 50 en 70 μ g.

Bij serieonderzoek behoeven geen referentieoplossingen op ieder plaatje te worden gebracht; in dit geval kan voor de ijkcurve het gemiddelde worden genomen van de waarden die op ten minste 5 plaatjes met dezelfde referentiehoeveelheden zijn verkregen.

c) *Ontwikkeling van de chromatogrammen en elutie:*

De chromatogrammen worden over een hoogte van 17 cm met hexaan ontwikkeld in bakjes die tevoren van binnen met filtreerpapier zijn bekleed. De plaatjes worden aan de lucht gedroogd. De zones waarin het bifenylnyl voorkomt worden gelokaliseerd in ultraviolet licht van 254 nm en in rechthoeken met gelijk oppervlak afgebakend.

Van de aldus afgebakende oppervlakken wordt het opgebrachte laagje onmiddellijk met een spatel over de gehele dikte afgekrabd. Hieruit wordt het bifenylnyl gedurende 10 minuten met 10 ml ethanol geëxtraheerd waarbij herhaaldelijk wordt geschud. Het product wordt overgebracht in de centrifugeerbuizen en daarna wordt 5 minuten lang gecentrifugeerd met een snelheid van 2.500 omwentelingen per minuut.

Op dezelfde wijze wordt een vergelijkingsmonster van dezelfde afmetingen genomen. Bij serieonderzoek wordt dit uit een niet-benutte strook van het plaatje genomen, bij afzonderlijk onderzoek uit een met een referentiemonster behandelde strook onder de zone die het bifenylnyl bevat.

d) *Spectrofotometrische bepaling:*

De bovenstaande heldere vloeistof wordt afgeschonken in de bakjes van de spectrofotometer en de extinctie bepaald bij 248 nm, vergeleken met een extract afkomstig van een zone van het chromatogram die geen bifenylnyl bevat.

6. Berekening van de resultaten:

Er wordt een ijkcurve getrokken, waarbij als coördinaten de hoeveelheden bifenylnyl van 30, 50 en 70 μ g en de overeenkomstige met de spectrofotometer bepaalde extincties worden genomen. De aldus verkregen curve is een rechte lijn die door het nulpunt loopt. Uit deze curve kunnen de bifenylnylgehalten van de monsters in ppm rechtstreeks uit de extinctiewaarden van hun extracten worden afgelezen.

BIJLAGE IV

BEPALING VAN RESIDU'S VAN ORTHOFENYLFENOL EN NARIUMORTHOFENYLFENOLAAT IN CITRUSVRUCHTEN

1. Doel en toepassingsgebied:

Volgens de hieronder beschreven methode kunnen residu's van orthofenylnylfenol (OFF) en natriumorthofenylnylfenolaat in (hele) citrusvruchten worden bepaald. Bij een OFF- of natriumorthofenylnylfenolaatgehalte van ongeveer 12 ppm vertonen de resultaten een gemiddelde afwijking naar beneden van 10—20%.

2. Principe:

Na distillatie in een zuur milieu en extractie met di-isopentylether wordt het extract gezuiverd en behandeld met een oplossing van 1-fenylnyl-2,3 dimethyl-4 aminopyrazolon(5) (=4-aminoantipyrine). Er treedt roodkleuring op, waarvan de intensiteit spectrofotometrisch bij 510 nm wordt gemeten.

3. Reagentia:

Fosforzuur van 70%

antischuimemulsie op siliconbasis

di-isopentylether, analysekwaliteit

gezuiverd cyclohexaan: driemaal met een natriumhydroxydeoplossing van 4% uitgeschud en driemaal met gedistilleerd water uitgewassen

natriumhydroxydeoplossing van 4%

bufferoplossing met pH 10,4: 6,64 g boorzuur, 8,00 g kaliumchloride en 93,1 ml natriumhydroxydeoplossing 1 N worden in een maatkolf van 2 l gebracht, gemengd en met gedistilleerd water tot de streep aangevuld

reagens I: 1,0 gram 1-fenyl-2,3-dimethyl-4-aminopyrazolon(5) (=4-aminoantipyrine) wordt in 100 ml gedistilleerd water opgelost

reagens II: 2,0 g kaliumferrocyanide wordt in 100 ml gedistilleerd water opgelost. De reagentia I en II moeten in een fles van donker glas worden bewaard en zijn ongeveer 14 dagen houdbaar

silicagel

referentieoplossing: 10 mg zuiver OFF wordt in 0,5 ml NaOH 0,1 N opgelost, en met 0,2 M natriumboraatoplossing tot 100 ml aangevuld (1 ml = 100 µg). Voor de ijkcurve moet tot 1:10 met de bufferoplossing worden verdund.

4. Apparatuur:

vlees- of andere molen

mixer

distilleerkolf van 1 l met afscheider van gewijzigd Clevengertype (1) en terugvloeikoeler

infraroodbad

scheitrecther van 200 ml

maatglazen van 25 en 100 ml

maatkolven van 25 en 100 ml

pipetten van 1—10 ml

maatpipetten van 0,5 ml

spectrofotometer met bakjes van 5 cm.

5. Werkwijze:

De vruchten waaruit het gehele ter controle genomen monster bestaat worden in tweeën gesneden. Een helft van elke vrucht wordt bestemd voor de opsporing van residu's van bifenyl, OFF of natriumorthofenyfenolaat. De andere helften worden bijeengebracht, in een molen klein- of fijngemaakt totdat een homogeen mengsel is verkregen. Hieruit worden ten minste twee deelmonsters van 250 gram genomen welke op de hieronder beschreven wijze worden onderzocht.

Ieder deelmonster wordt met 500 ml water in een mixer gebracht en fijngemaakt totdat een op de tast volkomen homogene brij is verkregen waarin geen oliecellen meer kunnen worden waargenomen. Naar gelang van het vermoede OFF-gehalte wordt 150 tot 300 gram van de brij afgewogen en in de distilleerkolf van 1 l gebracht met behulp van een zodanige hoeveelheid water dat het mengsel in de kolf 500 gram bedraagt. Na toevoeging van 10 ml fosforzuur van 70%, enige kooksteentjes en 0,5 ml antischuimemulsie plaatst men de afscheider en de koeler op de kolf. In de afscheider wordt 10 ml di-isopentylether gebracht, waarna de kolf in het infraroodbad langzaam wordt verhit om aanbakken of overschuimen van de brij te voorkomen. Er wordt ongeveer 6 uur gedistilleerd. Na beëindiging van het distillatieproces brengt men de inhoud van de afscheider in de scheitrecther van 200 ml, spoelt de afscheider en de koeler met 60 ml cyclohexaan en vervolgens met 60 ml water uit en voegt de spoelvroestoffen bij de inhoud van de

(1) Zie figuur blz. 9.

scheitrechter. Deze wordt krachtig geschud, en na scheiding der lagen wordt de waterfase afgeschonken en verwijderd.

Voor de extractie van het OFF wordt de organische fase vijfmaal steeds 3 minuten met 10 ml natriumhydroxide van 4% krachtig geschud. De verzamelde alkalische oplossingen worden met behulp van fosforzuur en fenolftaleïnepapier als indicator geneutraliseerd op een pH 9-10 en met gedistilleerd water tot 100 ml aangevuld. Ten einde de licht troebele oplossing helder te maken voegt men een mespuntje silicagel toe, schudt om en filtreert door een droog filter met nauwe poriën. Aangezien de grootste gevoeligheid en nauwkeurigheid bij de ontwikkeling van de kleur ligt tussen 10 en 70 μg OFF, wordt overeenkomstig de te verwachten hoeveelheid OFF een aliquot gedeelte (0,5 tot 10 ml) van de verkregen oplossing in een maatkolf van 25 ml gepipetteerd. Daarbij wordt 0,5 ml reagens I, 10 ml bufferoplossing en tenslotte 0,5 ml reagens II gevoegd, waarna met de bufferoplossing tot de streep wordt aangevuld en krachtig geschud.

Na 5 minuten meet men de extinctie van de rode kleur spectrofotometrisch bij 510 nm door vergelijking met een zonder extract verkregen blanco. De intensiteit van de kleur verandert gedurende 30 minuten niet. De beoordeling geschiedt aan de hand van een onder dezelfde omstandigheden met de referentieoplossing van OFF verkregen ijkcurve.

6. Opmerkingen:

Voor iedere analyse wordt de spectrofotometrische meting aanbevolen als dubbele bepaling met verschillende volumes van het geneutraliseerde alkalische extract uit te voeren.

Voor niet-behandelde citrusvruchten vindt men volgens deze methode blancowaarden die voor sinaasappelen 0,5 ppm en voor citroenen 0,8 ppm kunnen bedragen.

CLEVENGER

(Bijlage III, Hoofdstuk 4

Bijlage IV, Hoofdstuk 4)

