

Publikatieblad

van de Europese Gemeenschappen

ISSN 0378-7087

L 257

24e jaargang

10 september 1981

Uitgave
in de Nederlandse taal

Wetgeving

Inhoud

I *Besluiten waarvan de publikatie voorwaarde is voor de toepassing*

.....

II *Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing*

Commissie

81/712/EEG:

- ★ **Eerste richtlijn van de Commissie van 28 juli 1981 betreffende de vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de controle van zuiverheidseisen voor bepaalde levensmiddelenadditieven** 1

81/713/EEG:

- ★ **Beschikking van de Commissie van 28 juli 1981 inzake de lijst van inrichtingen in de Federatieve Republiek Brazilië die erkend zijn voor de invoer in de Gemeenschap van vers vlees van runderen en eenhoevige landbouwhuisdieren** 28

81/714/EEG:

- ★ **Beschikking van de Commissie van 28 juli 1981 tot wijziging van de lijsten van inrichtingen in de Argentijnse Republiek en in de Republiek Uruguay die erkend zijn voor de invoer in de Gemeenschap van vers vlees van runderen, schapen en eenhoevige landbouwhuisdieren** 32

81/715/EEG:

- ★ **Negende richtlijn van de Commissie van 31 juli 1981 houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders** ... 38

II

(Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing)

COMMISSIE

EERSTE RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 28 juli 1981

betreffende de vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de controle van zuiverheidseisen voor bepaalde levensmiddelenadditieven

(81/712/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

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

Gelet op de richtlijn van de Raad van 23 oktober 1962 betreffende de aanpassing van de wettelijke voorschriften van de Lid-Staten inzake kleurstoffen die kunnen worden gebruikt in voor menselijke voeding bestemde waren ⁽¹⁾, laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 78/144/EEG ⁽²⁾, inzonderheid op artikel 11, lid 2,

Gelet op Richtlijn 64/54/EEG 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 ⁽³⁾, laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 79/40/EEG ⁽⁴⁾, inzonderheid op artikel 8, lid 2,

Gelet op Richtlijn 70/357/EEG van de Raad van 13 juli 1970 betreffende de onderlinge aanpassing van de wettelijke voorschriften der Lid-Staten inzake oxydatietegengaande stoffen waarvan het

gebruik in levensmiddelen is toegestaan ⁽⁵⁾, laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 78/143/EEG ⁽⁶⁾, inzonderheid op artikel 5, lid 2,

Overwegende dat in deze voorschriften is bepaald dat de algemene en bijzondere zuiverheidseisen voor additieven volgens gemeenschappelijke analysemethoden dienen te worden gecontroleerd;

Overwegende dat het wenselijk is een eerste reeks methoden vast te stellen, waarvoor de studies konden worden afgesloten;

Overwegende dat de in de onderhavige richtlijn vastgestelde analysemethoden in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Comité voor levensmiddelen,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De Lid-Staten schrijven voor dat de analyses, die noodzakelijk zijn voor de controle van de algemene of bijzondere zuiverheidseisen van bepaalde levens-

⁽¹⁾ PB nr. 115 van 11. 11. 1962, blz. 2645/62.

⁽²⁾ PB nr. L 44 van 15. 2. 1978, blz. 20.

⁽³⁾ PB nr. 12 van 27. 1. 1964, blz. 161/64.

⁽⁴⁾ PB nr. L 13 van 19. 1. 1979, blz. 50.

⁽⁵⁾ PB nr. L 157 van 18. 7. 1970, blz. 31.

⁽⁶⁾ PB nr. L 44 van 15. 2. 1978, blz. 18.

middelenadditieven, worden verricht volgens de methoden beschreven in bijlage II, waarvan het toepassingsgebied is vastgelegd in bijlage I.

Artikel 2

De Lid-Staten doen de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om uiterlijk op 20 februari 1983 aan deze richtlijn te voldoen. Zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Artikel 3

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 28 juli 1981.

Voor de Commissie
Karl-Heinz NARJES
Lid van de Commissie

BIJLAGE I**TOEPASSINGSGEBIED VAN DE COMMUNAUTAIRE ANALYSEMETHODEN VOOR
DE CONTROLE VAN DE ZUIVERHEIDSEISEN VOOR BEPAALDE
LEVENS MIDDELENADDITIEVEN****I. INLEIDING**

.....

II. KLEURSTOFFEN

- II.1. Het bepalen van met diëthylether extraheerbare bestanddelen van in water oplosbare gesulfoneerde organische kleurstoffen: bijlage II, methode 1.

III. CONSERVEERMIDDELEN

- III.1. Het bepalen van mierzuur, formiaten en andere oxydeerbare verontreinigingen in azijnzuur (E 260), kaliumacetaat (E 261), natriumdiacetaat (E 262) en calciumacetaat (E 263): bijlage II, methode 2.
- III.2. Het bepalen van niet-vluchtige stoffen in propionzuur (E 280): bijlage II, methode 3.
- III.3. Het bepalen van het massaverlies bij het drogen van natriumnitriet (E 250): bijlage II, methode 4.
- III.4. De limietproef voor het bepalen van salicylzuur in de ethylester van *p*-hydroxybenzoezuur (E 214), in de ethylester van *p*-hydroxybenzoezuur-natriumverbinding (E 215), in de *p*-hydroxybenzoezuur-*n*-propylester (E 216), in de *p*-hydroxybenzoezuur-*n*-propylester-natriumverbinding (E 217), in de methylester van *p*-hydroxybenzoezuur (E 218) en in het natriumderivaat van de methylester van *p*-hydroxybenzoezuur (E 219): bijlage II, methode 5.
- III.5. Het bepalen van vrij azijnzuur in natriumdiacetaat (E 262): bijlage II, methode 6.
- III.6. Het bepalen van natriumacetaat in natriumdiacetaat (E 262): bijlage II, methode 7.
- III.7. De limietproef voor het bepalen van aldehyden in propionzuur (E 280), in sorbinezuur (E 200) en in natrium-, kalium- en calciumsorbaat (E 201, E 202, E 203): bijlage II, methode 8.

IV. ANTIOXYDANTIA

- IV.1. Het bepalen van het peroxydegetal van lecithinen (E 322): bijlage II, methode 9.
- IV.2. Het bepalen van de in tolueen onoplosbare stoffen van lecithinen (E 322): bijlage II, methode 10.
- IV.3. De limietproef voor het bepalen van reducerende stoffen in natrium-, kalium- en calciumlactaat (E 325, E 326, E 327): bijlage II, methode 11.
- IV.4. Het bepalen van vluchtige zuren in orthofosforzuur (E 338): bijlage II, methode 12.

- IV.5. De limietproef voor het bepalen van nitraten in orthofosforzuur (E 338): bijlage II, methode 13.
- IV.6. Het bepalen van de in water onoplosbare stoffen van mono-, di- en trinatriumorthofosfaat en van mono-, di- en trikaliumorthofosfaat (E 339 i, E 339 ii, E 339 iii, E 340 i, E 340 ii, E 340 iii): bijlage II, methode 14.

V. ALGEMEEN

- V.1. Het bepalen van de pH-waarde van levensmiddelenadditieven: bijlage II, methode 15.
-

BIJLAGE II**METHODEN VAN ONDERZOEK TER CONTROLE VAN DE ZUIVERHEIDSEISEN
VOOR LEVENSMIDDELENADDITIEVEN****INLEIDING****1. Het voorbereiden van de te analyseren waar****1.1. Algemeen**

De hoeveelheid het laboratorium ter onderzoek aangeboden waar dient normalerwijze 50 g te bedragen, tenzij een grotere hoeveelheid voor een specifieke bepaling vereist is.

1.2. Het voorbereiden van het monster

De waar dient voor het onderzoek gehomogeniseerd te worden.

1.3. Het bewaren

De aldus voorbereide waar dient in een luchtdicht afgesloten monsterpot te worden bewaard op zodanige wijze dat bederf wordt voorkomen.

2. Reagentia**2.1. Water**

2.1.1. Onder water, bestemd voor het oplossen, verdunnen of uitwassen, wordt steeds verstaan gedestilleerd water of gedemineraliseerd water van ten minste gelijke zuiverheid.

2.1.2. Zonder nadere specificatie wordt onder „oplossing” of „verdunning” steeds verstaan „oplossing in water” of „verdunning met water”.

2.2. Chemicaliën

Indien niet anders gespecificeerd, dienen de gebruikte chemicaliën van analytisch zuivere kwaliteit te zijn.

3. Apparaten**3.1. Lijst van apparaten**

De lijst van apparaten bevat slechts apparaten voor speciale doeleinden of met speciale specificatie.

3.2. Analytische balans

De analytische balans is een balans met een gevoeligheid van 0,1 mg of groter.

4. Weergave van de resultaten**4.1. Resultaten**

Het gerapporteerde resultaat van de analyse dient het gemiddelde te zijn van ten minste twee bepalingen, die voldoen aan de eisen van de herhaalbaarheid.

4.2. *Het berekenen van de resultaten*

Indien niet anders gespecificeerd, worden de resultaten berekend in massaprocenten (% m/m) van de aan het laboratorium ter onderzoek aangeboden waar.

4.3. *Aantal significante cijfers*

Het resultaat dient niet meer significante cijfers te bevatten dan overeenkomt met de nauwkeurigheid van de gebruikte methode van onderzoek.

METHODE 1**HET BEPALEN VAN MET DIËTHYLETHER EXTRAHEERBARE BESTANDDELEN VAN IN WATER OPLOSBARE GESULFONEERDE ORGANISCHE KLEURSTOFFEN****1. Doel en gebied van toepassing**

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van met diëthylether extraheerbare bestanddelen van in water oplosbare gesulfoneerde organische kleurstoffen die niet met een drager vermengd zijn.

2. Definitie

Het gehalte aan met diëthylether extraheerbare bestanddelen: het gehalte aan met diëthylether extraheerbare bestanddelen bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

De kleurstof wordt geëxtraheerd met diëthylether; het na verdampen van de ether verkregen residu wordt na drogen gewogen.

4. Reagentia

- 4.1. Diëthylether, vrij van peroxyde en gedroogd met vers gegloeid calciumchloride.

5. Apparaten

- 5.1. Soxhletapparaat met extractiekolf.
- 5.2. Exsiccator voorzien van vers geactiveerde silicagel met vochtindicator of een gelijkwaardig droogmiddel.
- 5.3. Analytische balans.
- 5.4. Elektrisch verwarmde droogstoof, voorzien van een thermostaat, en ingesteld op 85 ± 2 °C.

6. Werkwijze

Weeg op een filtreerpapierdje tot op 10 mg nauwkeurig ongeveer 10 g van de proef. Vouw het filtreerpapierdje dicht en breng het in een extractiehuls. Sluit deze af met een prop vetvrije watten. Extraheer gedurende 6 uur met diëthylether (4.1) in het soxhletapparaat (5.1). Destilleer de ether af bij een zo laag mogelijke temperatuur. Plaats de kolf van het

soxhletapparaat met het residu in de droogstoof (5.4). Droog gedurende 20 minuten bij $85 \pm 2^\circ\text{C}$. Plaats de kolf met inhoud, afgedekt door een horlogeglas, in de exsiccator (5.2), koel af tot kamertemperatuur en weeg vervolgens de kolf en het residu. Herhaal het drogen en wegen totdat het verschil tussen twee opeenvolgende wegingen minder dan 0,5 mg bedraagt. Indien de massa is toegenomen, dient voor de berekening de kleinste gevonden massa te worden gebruikt.

7. Weergave van de resultaten

7.1. Formule en methode van berekenen

Het gehalte aan met diëthylether extraheerbare bestanddelen, uitgedrukt in massaprocenten van de waar, wordt berekend met de volgende formule:

$$\frac{m_1 \times 100}{m_0}$$

waarin:

m_1 = de massa van de droogrest in gram,

m_0 = de massa van de ingewogen waar in gram.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil in de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 20 mg per 100 g waar.

METHODE 2

HET BEPALEN VAN MIEREZUUR, FORMIATEN EN ANDERE OXYDEERBARE VERONTREINIGINGEN IN AZIJNZUUR (E 260), IN KALIUMACETAAT (E 261), IN CALCIUMACETAAT (E 263) EN IN NATRIUMDIACETAAT (E 262)

1. Doel en gebied van toepassing

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van mierzuur, formiaten en andere oxydeerbare verontreinigingen in:

- azijnzuur (E 260),
- kaliumacetaat (E 261),
- natriumdiacetaat (E 262),
- calciumacetaat (E 263).

2. Definitie

Het gehalte aan mierzuur, formiaten en andere oxydeerbare verontreinigingen: het gehalte aan mierzuur, formiaten en andere oxydeerbare verontreinigingen bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

Een oplossing van de waar wordt in alkalisch milieu behandeld met een overmaat kaliumpermanganaatoplossing, waarbij mangaandioxyde gevormd wordt. Het mangaandioxyde en de overmaat kaliumpermanganaat worden in zuur milieu jodometrisch bepaald en de concentratie aan oxydeerbare verontreinigingen berekend en uitgedrukt als mierzuur.

4. Reagentia

- 4.1. Kaliumjodide.
- 4.2. Kaliumpermanganaatoplossing 0,02 mol/l.
- 4.3. Natriumcarbonaat, watervrij.
- 4.4. Natriumthiosulfaatoplossing 0,1 mol/l.
- 4.5. Zetmeeloplossing ongeveer 1 % (m/v).
- 4.6. Verdund zwavelzuur: voeg 90 ml zwavelzuur ($\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$) toe aan water en verdun met water tot 1 l.

5. Apparaten

- 5.1. Waterbad, kokend.
- 5.2. Analytische balans.

6. Werkwijze

Weeg, indien de waar uit het vrije zuur bestaat, ongeveer 10 g af tot op 10 mg nauwkeurig en verdun met 70 ml water. Voeg toe een oplossing van 10 g watervrij natriumcarbonaat (4.3) in 30 ml water. Weeg, indien de waar een zout is, ongeveer 10 g af tot op 10 mg nauwkeurig en los op in 100 ml water. Voeg toe 1 g watervrij natriumcarbonaat (4.3) en zwenk om totdat alles opgelost is. Voeg toe 20,0 ml kaliumpermanganaatoplossing (4.2) en verwarm gedurende 15 minuten op het kokende waterbad (5.1). Koel het mengsel af. Voeg toe 50 ml verdund zwavelzuur (4.6) en 0,5 g kaliumjodide (4.1). Zwenk het mengsel om totdat het neergeslagen mangaandioxyde weer in oplossing is gegaan. Titreer met de natriumthiosulfaatoplossing (4.4) totdat de oplossing een bleekgele kleur heeft aangenomen. Voeg enkele druppels zetmeeloplossing (4.5) toe en titreer tot de oplossing kleurloos is geworden.

7. Weergave van de resultaten**7.1. Formule en methode van berekenen**

Het gehalte aan mierzuur, formiaten en andere oxydeerbare verontreinigingen, berekend als mierzuur en uitgedrukt in massaprocenten van de waar, wordt berekend met de volgende formule:

$$\frac{2,3b}{m_0} \times \left(\frac{100a}{b} - V \right)$$

waarin:

- a = de molariteit van de kaliumpermanganaatoplossing,
- b = de molariteit van de natriumthiosulfaatoplossing,
- m_0 = de afgewogen hoeveelheid waar in gram,
- V = het volume van de bij de titratie verbruikte natriumthiosulfaatoplossing 0,1 mol/l in milliliter.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd in dezelfde waar onder dezelfde omstandigheden door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 5 mg per 100 g waar.

8. Opmerkingen

- 8.1. Een volume van 11,3 ml natriumthiosulfaatoplossing 0,1 mol/l komt overeen met 0,2 % mierzuur in 10 g van de waar.
- 8.2. Bij afwezigheid van mierzuur of formiaten zal de bij de titratie verbruikte hoeveelheid natriumthiosulfaatoplossing 20 ml bedragen. Indien in de waar meer dan 0,2 % (m/m) mierzuur aanwezig is zal de overmaat kaliumpermanganaat niet voldoende zijn en zal steeds 8 ml natriumthiosulfaatoplossing bij de titratie verbruikt worden. Herhaal in dat geval de bepaling met een kleinere ingewogen hoeveelheid waar.

METHODE 3**HET BEPALEN VAN NIET-VLUCHTIGE STOFFEN IN PROPIONZUUR (E 280)****1. Doel en gebied van toepassing**

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van niet-vluchtige bestanddelen in propionzuur (E 280).

2. Definitie

Het gehalte aan niet-vluchtige bestanddelen: het gehalte aan niet-vluchtige bestanddelen bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

Het monster wordt verdampt en het overblijvende residu na drogen bij $103 \pm 2^\circ\text{C}$ gewogen.

4. Apparaten

- 4.1. Indampschalen van kwarts of platina, voorzien van een passend deksel en met een zodanige inhoud dat zij 100 g van de te onderzoeken waar kunnen bevatten.
- 4.2. Elektrisch verwarmde droogstoof, voorzien van een thermostaat en ingesteld op een temperatuur van $103 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 4.3. Analytische balans.
- 4.4. Waterbad, kokend.
- 4.5. Exsiccator voorzien van vers geactiveerde silicagel met vochtindicator of een gelijkwaardig droogmiddel.

5. Werkwijze

Weeg tot op 0,1 g nauwkeurig in een vooraf gedroogde en gewogen indampschaal (4.1) 100 g van de waar. Verdamp het propionzuur op het kokende waterbad (4.4) in de zuurkast. Plaats na het verdampen van het propionzuur de schaal in de droogstoof (4.2) en droog gedurende 1 uur bij $103 \pm 2^\circ\text{C}$. Plaats de met het deksel afgesloten indampschaal in de exsiccator (4.5) en koel af tot kamertemperatuur. Verwijder het deksel en weeg de schaal met inhoud. Herhaal het drogen en wegen totdat het verschil tussen twee opeenvolgende wegingen minder dan 0,5 mg bedraagt. Indien de massa is toegenomen dient voor de berekening de kleinste gevonden massa te worden gebruikt.

6. Weergave van de resultaten**6.1. Formule en methode van berekenen**

Het gehalte aan niet-vluchtige bestanddelen uitgedrukt in massaprocenten van de waar wordt berekend met de volgende formule:

$$\frac{100 \times m_1}{m_0}$$

waarin:

m_1 = de massa van het residu na het drogen in gram,

m_0 = de massa van de ingewogen waar in gram.

6.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd in dezelfde waar onder dezelfde omstandigheden door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 5 mg per 100 g waar.

METHODE 4**HET BEPALEN VAN HET MASSAVERLIES BIJ HET DROGEN VAN
NATRIUMNITRIET (E 250)****1. Doel en gebied van toepassing**

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van het massaverlies bij het drogen van natriumnitriet (E 250).

2. Definitie

Het vochtgehalte van natriumnitriet: het massaverlies bij het drogen, bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

Het massaverlies bij het drogen wordt bepaald door het drogen van de waar in de droogstoof bij 103 ± 2 °C.

4. Apparaten

- 4.1. Elektrisch verwarmde droogstoof, voorzien van een thermostaat en ingesteld op 103 ± 2 °C.
- 4.2. Glazen droogschalen met platte bodem, diameter 60-80 mm en 25 mm hoog, voorzien van een goedsluitend deksel.
- 4.3. Exsiccator, voorzien van vers geactiveerde silicagel met vochtindicator of een gelijkwaardig droogmiddel.
- 4.4. Analytische balans.

5. Werkwijze

Plaats de droogschaal (4.2) met het deksel ernaast in de droogstoof (4.1) en verwarm gedurende 1 uur bij 103 ± 2 °C. Plaats de met het deksel afgesloten schaal in de exsiccator (4.3), koel af tot kamertemperatuur en weeg. Weeg tot op 10 mg nauwkeurig ongeveer

10 g van de waar in de schaal. Verdeel de afgewogen hoeveelheid gelijkmatig over de bodem van de schaal. Plaats de schaal met het deksel ernaast in de droogstoof (4.1) en verwarm gedurende 1 uur bij $103 \pm 2^\circ\text{C}$. Plaats de schaal met het deksel erop in de exsiccator (4.3) en koel af tot kamertemperatuur. Weeg tot op 10 mg nauwkeurig. Herhaal het verwarmen, afkoelen en wegen totdat het verschil tussen twee opeenvolgende wegingen niet meer dan 10 mg bedraagt. Indien de massa is toegenomen dient voor de berekening de kleinst gevonden massa te worden gebruikt.

6. Weergave van de resultaten

6.1. Formule en methode van berekenen

Bereken het massaverlies bij het drogen, uitgedrukt in massaprocenten van de waar met de formule:

$$\frac{100 \times (m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)}$$

waarin:

m_1 = de massa van de schaal + deksel in gram,

m_2 = de massa van de schaal + ingewogen waar + deksel in gram,

m_3 = de massa van de schaal + droogrest + deksel in gram.

6.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd in dezelfde waar onder dezelfde omstandigheden door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 100 mg per 100 g waar.

METHODE 5

LIMIETPROEF VOOR SALICYLZUUR IN DE ETHYLESTER VAN *p*-HYDROXYBENZOËZUUR (E 214), IN DE ETHYLESTER VAN *p*-HYDROXYBENZOËZUUR-NATRIUMVERBINDING (E 215), IN DE *p*-HYDROXYBENZOËZUUR-*n*-PROPYLESTER (E 216), IN DE *p*-HYDROXYBENZOËZUUR-*n*-PROPYLESTER-NATRIUMVERBINDING (E 217), IN DE METHYLESTER VAN DE *p*-HYDROXYBENZOËZUUR (E 218) EN IN HET NATRIUMDERIVAAT VAN DE METHYLESTER VAN *p*-HYDROXYBENZOËZUUR (E 219)

1. Doel en gebied van toepassing

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van salicylzuur in de ethylester van *p*-hydroxybenzoëzuur (E 214), de *n*-propylester van *p*-hydroxybenzoëzuur (E 216), de methylester van *p*-hydroxybenzoëzuur (E 218) en in hun natriumzouten (E 215, E 217, E 219).

2. Definitie

Het gehalte aan salicylzuur: het gehalte aan salicylzuur bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

Salicylzuur vormt met ammoniumijzer(III)sulfaat een violette kleur. De kleurintensiteit wordt vergeleken met de kleur gevormd door een standaardoplossing.

4. Reagentia

- 4.1. Ammoniumijzer(III)sulfaatoplossing 0,2 % (m/m): los 0,2 g ammoniumijzer(III)sulfaat-dodecahydraat op in 50 ml water; voeg toe 10 ml salpeterzuur 10 % (v/v) en verdun tot 100 ml met water.
- 4.2. Ethanol 95 % (v/v).
- 4.3. Salicylzuuroplossing 0,100 g/l.
- 4.4. Zwavelzuur 1 mol/l.

5. Apparaten

- 5.1. Bij 50 ml gegradueerde Nessler buizen met een totaalvolume van ongeveer 60 ml.

6. Werkwijze

- 6.1. *Ethylester, n-propylester en methylester van p-hydroxybenzoëzuur.*
 - 6.1.1. Weeg tot op 1 mg nauwkeurig 0,1 g van de waar af en los op in 10 ml ethanol 95 % (v/v) (4.2). Breng de verkregen oplossing met water kwantitatief over in de Nessler buis en vul aan tot 50 ml. Roer en voeg onder het roeren 1 ml ammoniumijzer(III)sulfaatoplossing (4.1) toe. Laat gedurende 1 minuut staan.
 - 6.1.2. Bereid tegelijkertijd en op gelijke wijze een vergelijkingsoplossing, waarbij de 0,1 g monster vervangen wordt door 1 ml van de salicylzuuroplossing (4.3).
 - 6.1.3. Vergelijk de kleur van de monsteroplossing met de kleur van de vergelijkingsoplossing.
- 6.2. *Natriumzouten van de ethyl-, n-propyl- en methylesters van p-hydroxybenzoëzuur.*
 - 6.2.1. Herhaal de bewerking beschreven in 6.1.1, met dien verstande dat voor het verdunnen tot 50 ml de pH-waarde van de oplossing op 5 wordt ingesteld met zwavelzuur (4.4).
 - 6.2.2. Als 6.1.2.
 - 6.2.3. Als 6.1.3.

7. Weergave van de resultaten

- 7.1. *Interpretatie van de limietproef*

Wanneer de rood-violetten kleur van de monsteroplossing intensiever is dan de kleur van de vergelijkingsoplossing, is de proef positief en bevat het monster meer dan 0,1 % salicylzuur.
- 7.2. *Detectiegrens*

De detectiegrens van deze bepaling ligt bij 30 mg salicylzuur per 100 g waar.
- 7.3. *Opmerking*

De resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd in dezelfde waar onder dezelfde omstandigheden door dezelfde analist moeten gelijk zijn.

METHODE 6**HET BEPALEN VAN VRIJ AZIJNZUUR IN NATRIUMDIACETAAT (E 262)****1. Doel en gebied van toepassing**

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van vrij azijnzuur in natriumdiacetaat (E 262).

2. Definitie

Het azijnzuurgehalte: het azijnzuurgehalte bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

Titratie van het azijnzuur met natriumhydroxydeoplossing op fenolftaleïne als indicator.

4. Reagentia

4.1. Fenolftaleïne oplossing 1 % (m/v) in ethanol.

4.2. Natriumhydroxydeoplossing 1 mol/l.

5. Apparaten

5.1. Analytische balans.

6. Werkwijze

Weeg tot op 1 mg nauwkeurig 3 g van de waar af en los deze op in 50 ml water. Voeg 2 à 3 druppels fenolftaleïneoplossing (4.1) toe en titreer met de natriumhydroxydeoplossing (4.2) totdat de oplossing een rose kleur heeft aangenomen die ten minste 5 seconden blijft bestaan.

7. Weergave van de resultaten**7.1. Formule en methode van berekenen**

Bereken het gehalte aan azijnzuur uitgedrukt in massaprocenten van de waar met de volgende formule:

$$\frac{6\,005 \times V \times c}{m_0}$$

waarin:

V = de bij de titratie verbruikte hoeveelheid natriumhydroxydeoplossing (4.2) in ml,

c = de molariteit van de natriumhydroxydeoplossing,

m₀ = de ingewogen hoeveelheid waar in gram.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 500 mg per 100 g waar.

8. Opmerkingen

Voor de titratie van 3,0 g van de waar zijn, indien de waar 40 % azijnzuur bevat, 20,0 ml natriumhydroxydeoplossing 1 mol/l nodig.

METHODE 7**HET BEPALEN VAN NATRIUMACETAAT IN NATRIUMDIACETAAT (E 262)****1. Doel en gebied van toepassing**

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van natriumacetaat en water, uitgedrukt als natriumacetaat, in natriumdiacetaat (E 262).

2. Definitie

Het gehalte aan natriumacetaat: het gehalte aan natriumacetaat en water, uitgedrukt als natriumacetaat, bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

De waar wordt opgelost in azijnzuur 100 % en vervolgens getitreerd met een standaard perchloorzuuroplossing in aanwezigheid van kristalviolet als indicator.

4. Reagentia

- 4.1. Azijnzuur 100 % ($\rho_{20} = 1,049$ g/ml) (voor titraties in niet-waterig milieu).
- 4.2. Kristalvioletindicatoroplossing: een 0,2 % (m/v) oplossing van kristalviolet (CI nr. 42555) in azijnzuur 100 %.
- 4.3. Kaliumwaterstofftalaat, $C_8H_5KO_4$.
- 4.4. Azijnzuuranhydride, $(CH_3CO)_2O$.
- 4.5. Perchloorzuuroplossing 0,1 mol/l, in azijnzuur 100 %. Bereid en standaardiseer deze oplossing op de volgende wijze:

Weeg in een maatkolf van 1 000 ml, voorzien van een ingeslepen glazen stop, P g perchloorzuur af. Bereken de hoeveelheid P met behulp van de volgende formule:

$$P = \frac{1\ 004,6}{m}$$

waarin:

m = de concentratie van het perchloorzuur in massaprocenten (m/m), bepaald door titratie (70-72 % m/m is de meest geschikte concentratie).

Voeg ongeveer 100 ml azijnzuur 100 % toe en vervolgens onder zwenken en afkoelen een hoeveelheid Q azijnzuuranhydride in kleine porties. De hoeveelheid Q wordt berekend met de volgende formule:

$$Q = \frac{(567 \times P) - 5\ 695}{a}$$

waarin:

P = de afgewogen hoeveelheid perchloorzuur in gram,

a = de concentratie in massaprocenten van het azijnzuuranhydride.

Sluit de maatkolf af en laat 24 uur in het donker staan. Vul daarna aan met azijnzuur 100 % tot 1 000 ml. De op deze manier bereide oplossing is praktisch watervrij.

Stel de oplossing tegen kaliumwaterstofftalaat op de volgende wijze:

Weeg tot op 0,1 mg nauwkeurig ongeveer 0,2 g, vooraf gedurende 2 uur op 100 °C gedroogd, kaliumwaterstofftalaat af in een conische kolf. Voeg toe 25,0 ml azijnzuur 10 % en los op onder zacht verwarmen. Koel af tot kamertemperatuur, voeg toe 2 druppels 0,2 % kristalvioletooplossing (4.2) en titreer met de perchloorzuuroplossing totdat de kleur van de indicator omslaat naar zwakgroen. Voer een blancotitratie uit met dezelfde hoeveelheid oplosmiddel en verminder de waarde gevonden bij de bepaling met de waarde van de blanco. 20,42 mg kaliumwaterstofftalaat zijn equivalent met 1 ml perchloorzuuroplossing 0,1 mol/l.

5. Apparaten

5.1. Analytische balans.

6. Werkwijze

Weeg tot op 0,5 mg nauwkeurig ongeveer 0,2 g van de waar af en los op in 50 ml azijnzuur 100 % (4.1). Voeg enkele druppels kristalvioletooplossing (4.2) toe en titreer tot kleuromslag naar zwak groen met perchloorzuuroplossing (4.5).

7. Weergave van de resultaten

7.1. Formule en methode van berekenen

Bereken het gehalte aan natriumacetaat, zoals beschreven onder 2, uitgedrukt in massa-percenten van de waar, met de formule:

$$\frac{8,023 \times V \times c}{m_0}$$

waarin:

V = de bij de titratie verbruikte hoeveelheid perchloorzuuroplossing (4.5) in milliliter,

c = de molariteit van de perchloorzuuroplossing (4.5),

m_0 = de afgewogen hoeveelheid waar in gram.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 1,5 g per 100 g waar.

8. Opmerkingen

Daar de bij deze bepaling gebruikte reagentia of toxisch of explosief zijn, is voorzichtig manipuleren een vereiste.

METHODE 8

DE LIMIETPROEF VOOR HET BEPALEN VAN ALDEHYDEN IN SORBINEZUUR (E 200) EN DE NATRIUM-, KALIUM- EN CALCIUMSORBATEN (E 201, E 202, E 203) EN IN PROPIONZUUR (E 280)

1. Doel en gebied van toepassing

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van aldehyden, uitgedrukt als formaldehyde, in sorbinezuur (E 200) en de natrium-, kalium- en calciumsorbaten (E 201, E 202, E 203) en in propionzuur (E 280).

2. **Definitie**

Het gehalte aan aldehyde: het gehalte aan aldehyden, uitgedrukt als formaldehyde, bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.
3. **Beginsel**

De aldehyden in de monsteroplossing en de formaldehyde in de vergelijkingsoplossing reageren met Schiff's reagens onder vorming van roodgekleurde complexen, waarvan de kleurintensiteit vergeleken wordt.
4. **Reagentia**
 - 4.1. Formaldehydevergelijkingsoplossing 0,01 mg/ml. Bereid deze oplossing door verdunnen van geconcentreerde formaldehydeoplossing (400 mg/ml).
 - 4.2. Schiff's reagens.
5. **Werkwijze**
 - 5.1. Weeg tot op 1 mg nauwkeurig 1 g van de waar af in een conische kolf. Voeg 100 ml water toe en schud. Filtreer, indien nodig, en voeg aan 1 ml van de oplossing of het filtraat 1 ml Schiff's reagens (4.2) toe. Voeg tegelijkertijd aan 1 ml formaldehydevergelijkingsoplossing (4.1) 1 ml Schiff's reagens (4.2) toe.
 - 5.2. Vergelijk na 30 minuten de kleur van de monsteroplossing met de kleur van de vergelijkingsoplossing.
6. **Weergave van de resultaten**
 - 6.1. *Interpretatie van de limietproef*

Indien de rode kleur van de monsteroplossing intensiever is dan de kleur van de vergelijkingsoplossing, is de limietproef positief en bevat het monster meer dan 0,1 % aldehyde uitgedrukt als formaldehyde.
 - 6.2. *Detectiegrens*

De detectiegrens van deze bepaling ligt bij 30 mg formaldehyde per 100 g waar.
 - 6.3. *Opmerkingen*

De resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist moeten gelijk zijn.

METHODE 9

HET BEPALEN VAN HET PEROXYDEGETAL VAN LECITHINEN (E 322)

1. **Doel en gebied van toepassing**

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van het peroxydegetal van lecithine (E 322).
2. **Definitie**

Het peroxydegetal: het resultaat verkregen met de in dit voorschrift beschreven bepaling.

3. Beginsel

Kaliumjodide wordt onder bepaalde reactieomstandigheden geoxydeerd door de in lecithine aanwezige peroxyden onder vorming van vrij jodium. Het gevormde jodium wordt bepaald door titratie met natriumthiosulfaatoplossing.

4. Reagentia

- 4.1. Azijnzuur 100 %.
- 4.2. Chloroform.
- 4.3. Kaliumjodide.
- 4.4. Natriumthiosulfaatoplossing 0,1 mol/l of 0,01 mol/l.
- 4.5. Zetmeeloplossing, ongeveer 1 % (m/v).

5. Apparaten

- 5.1. Analytische balans.
- 5.2. Het apparaat afgebeeld in de figuur bestaande uit:
 - 5.2.1. Rondbodempkolf van 100 ml.
 - 5.2.2. Terugvloekoeler.
 - 5.2.3. Glazen buis, lengte 250 mm en een inwendige diameter van 22 mm, voorzien van slijpstukken.
 - 5.2.4. Bekerglaasje, uitwendige diameter 20 mm en 35-50 mm hoog (zie figuur).

6. Werkwijze

- 6.1. Breng 10 ml azijnzuur (4.1) en 10 ml chloroform (4.2) in de kolf (5.2.1). Plaats de glasbuis (5.2.3) en de terugvloekoeler (5.2.2) op de kolf en kook zacht gedurende 2 minuten om de lucht te verdrijven.

Los 1 g kaliumjodide (4.3) op in 1,3 ml water en voeg deze oplossing toe aan de inhoud van de kolf (5.2.1) er zorg voor dragend dat de vloeistof aan de kook blijft.

Onstaat er tijdens deze bewerking een gele kleur, dan dient de bepaling afgebroken en herhaald te worden met vers bereide reagentia.

- 6.2. Weeg tot op 1 mg nauwkeurig ongeveer 1 g van de waar af en voeg deze hoeveelheid na nogmaals 2 minuten koken aan de inhoud van de kolf (5.2.1) toe, er zorg voor dragend dat de vloeistof aan de kook blijft. Het monster wordt afgewogen in het bekerglaasje (5.2.4) en aan de inhoud van de kolf toegevoegd door het bekerglaasje met een daartoe geschikte glasstaaf via de buis (5.2.3) in de kolf te brengen. (Zie figuur). De terugvloekoeler (5.2.2) kan hiertoe korte tijd verwijderd worden.

Kook gedurende 3 à 4 minuten. Beëindig het verhitten en verwijder onmiddellijk de terugvloekoeler (5.2.2). Voeg snel 50 ml water via de glazen buis (5.2.3) toe, verwijder de glazen buis en koel de kolf (5.2.1) met inhoud tot kamertemperatuur onder stromend water.

Titreer de inhoud van de kolf met de natriumthiosulfaatoplossing 0,1 of 0,01 mol/l (4.4) totdat de waterige laag bleekgeel gekleurd is. Voeg 1 ml zetmeeloplossing (4.5) toe en titreer totdat de kleur van blauw naar kleurloos omslaat. Schud gedurende de titratie de kolf krachtig ten einde een volledige extractie van de jodium uit de niet-waterige laag te bewerkstelligen.

- 6.3. Voer een blancobepaling uit door 6.1 en 6.2 te herhalen zonder toevoeging van het monster.

7. **Weergave van de resultaten**

7.1. *Formule en methode van berekenen*

Bereken het peroxydegetal van de waar, uitgedrukt in milli-equivalent per kg met de formule:

$$\frac{1\ 000 \times a \times (V_1 - V_2)}{m_0}$$

waarin:

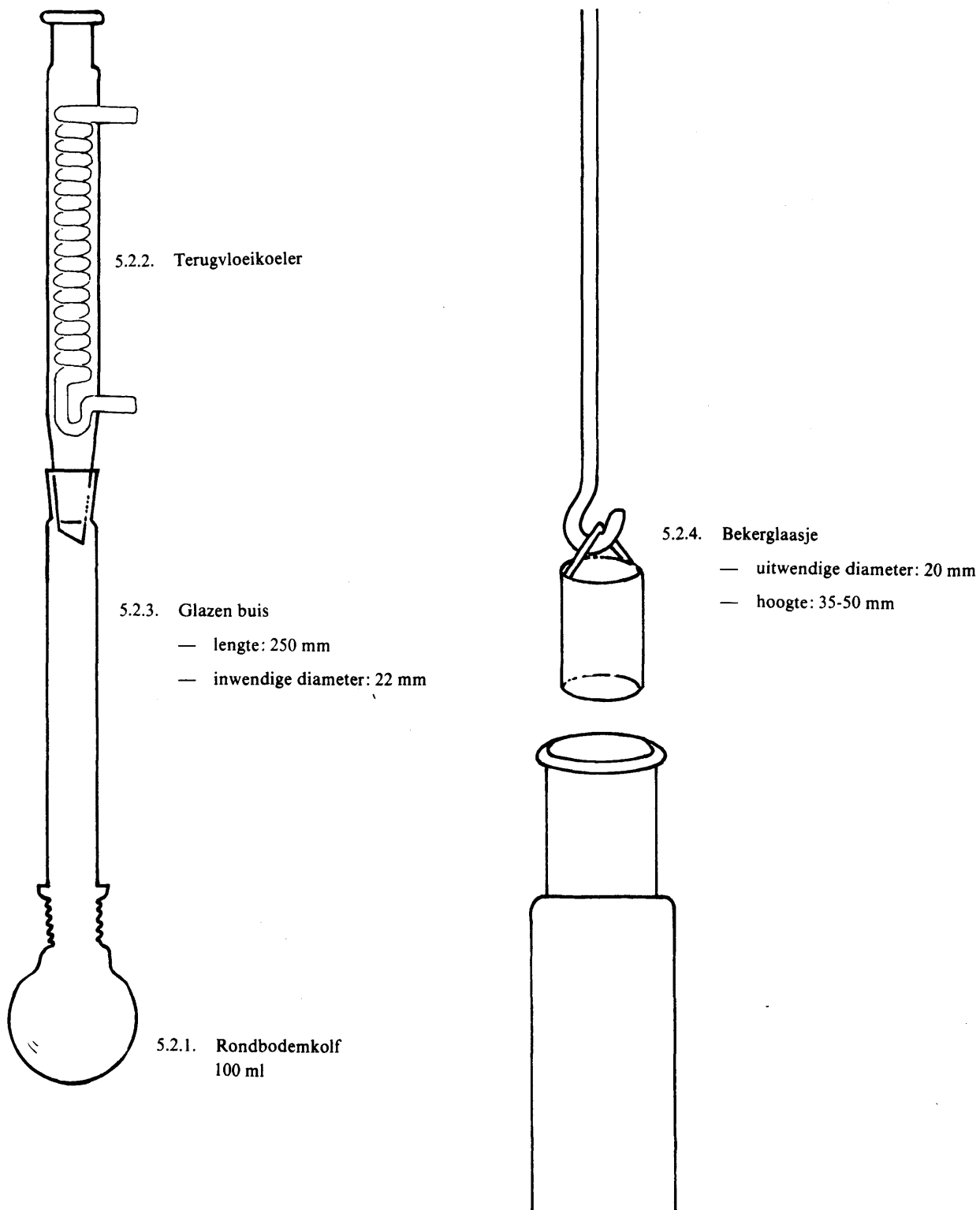
- V_1 = de bij de titratie van het monster verbruikte hoeveelheid natriumthiosulfaatoplossing in milliliter (6.2),
- V_2 = de bij de titratie van de blanco verbruikte hoeveelheid natriumthiosulfaatoplossing in milliliter (6.3),
- a = de concentratie van de natriumthiosulfaatoplossing in mol/liter,
- m_0 = de afgewogen hoeveelheid waar in gram.

7.2. *Herhaalbaarheid*

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 0,5 uitgedrukt als peroxydegetal in milli-equivalent per kg waar.

8. **Opmerkingen**

- 8.1. De te kiezen concentratie van de natriumthiosulfaatoplossing hangt af van de te titreren hoeveelheid jodium. Indien minder dan 0,5 ml natriumthiosulfaatoplossing 0,1 mol/l wordt verbruikt, dient de bepaling herhaald te worden met natriumthiosulfaatoplossing 0,01 mol/l.
- 8.2. Voer de bepaling uit onder uitsluiting van zoveel mogelijk licht.



Apparaat voor het bepalen van het peroxydegetal van lecithine

METHODE 10**HET BEPALEN VAN DE IN TOLUEEN ONOPLOSBARE STOFFEN VAN
LECITHINEN (E 322)**

1. **Doel en gebied van toepassing**

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van onoplosbare bestanddelen van lecithine (E 322).
2. **Definitie**

Het gehalte aan in toluen onoplosbare bestanddelen: het gehalte aan in toluen onoplosbare bestanddelen bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.
3. **Beginsel**

De waar wordt opgelost in toluen en de oplossing gefiltreerd. Het op het filter achterblijvende residu wordt gedroogd en gewogen.
4. **Reagentia**
 - 4.1. Toluen.
5. **Apparaten**
 - 5.1. Glazen filterkroezes, 30 ml inhoud en met een porositeit G 3 of gelijkwaardig.
 - 5.2. Elektrisch verwarmde droogstoof, voorzien van een thermostaat, en ingesteld op 103 ± 2 °C.
 - 5.3. Waterbad, ingesteld op een temperatuur van 60 °C.
 - 5.4. Exsiccator, voorzien van vers geactiveerde silicagel met vochtindicator of een gelijkwaardig droogmiddel.
 - 5.5. Conische kolven, inhoud 500 ml.
 - 5.6. Vacuümpomp.
 - 5.7. Analytische balans.
6. **Werkwijze**
 - 6.1. Plaats de filterkroes (5.1) gedurende een half uur in de droogstoof (5.2) bij 103 ± 2 °C. Plaats de filterkroes vervolgens in de exsiccator (5.4) en koel af tot kamertemperatuur en weeg.
 - 6.2. Homogeniseer de waar, indien nodig onder verwarming op het waterbad (5.3). Weeg tot op 1 mg nauwkeurig ongeveer 10 g van de gehomogeniseerde waar af in de conische kolf (5.5). Voeg toe 100 ml toluen (4.1) en schud het mengsel totdat de lecithine is opgelost. Filtreer de oplossing onder vacuüm door de filterkroes (5.1). Spoel de kolf (5.5) uit met 25 ml toluen en filtreer door de filterkroes (5.1). Herhaal deze bewerking nogmaals met 25 ml toluen. Verwijder de toluen zo veel mogelijk uit de filterkroes (5.1) door sterk af te zuigen.

- 6.3. Plaats de filterkroes (5.1) gedurende 2 uur in de droogstoof (5.2) bij 103 ± 2 °C. Koel af tot kamertemperatuur in de exsiccator (5.4) en weeg.
- 6.4. Herhaal 6.3 totdat het verschil tussen twee opeenvolgende wegingen minder dan 0,5 mg bedraagt. Indien de massa is toegenomen dient voor de berekening de kleinst gevonden massa te worden gebruikt.

7. Weergave van de resultaten

7.1. Formule en methode van berekenen

Bereken het gehalte aan in tolueen onoplosbare bestanddelen, uitgedrukt in massaprocenten, met de formule:

$$\frac{100 (m_2 - m_1)}{m_0}$$

waarin:

- m_1 = de massa van de lege filterkroes (6.1) in gram,
 m_2 = de massa van de filterkroes + inhoud (6.4) in gram,
 m_0 = de afgewogen hoeveelheid waar in gram.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 30 mg/100 g waar.

METHODE 11

DE LIMIETPROEF VOOR HET BEPALEN VAN REDUCERENDE STOFFEN IN NARIUM-, KALIUM- EN CALCIUMLACTAAT (E 325, E 326, E 327)

1. Doel en gebied van toepassing

De in dit voorschrift beschreven methode dient om de eventuele aanwezigheid van reducerende bestanddelen in natriumlactaat (E 325), kaliumlactaat (E 326) en calciumlactaat (E 327) vast te stellen.

2. Definitie

Limietproef voor de reductie van Fehling's oplossing: de reactie van het monster met Fehling's oplossing onder de in dit voorschrift beschreven omstandigheden.

3. Beginsel

Fehling's oplossing wordt door reducerende stoffen gereduceerd. Meestal wordt de reductie veroorzaakt door reducerende suikers.

4. Reagentia

- 4.1. Fehling's oplossing A: los 6,93 g kopersulfaat-pentahydraat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) op in water en vul aan tot 100 ml.
- 4.2. Fehling's oplossing B: los 34,6 g kaliumnatriumtartraat-tetrahydraat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 10 g natriumhydroxyde op in water en vul aan tot 100 ml.

5. Werkwijze

Weeg tot op 1 mg nauwkeurig 1 g van de waar af en los op in 10 ml warm water. Voeg aan deze oplossing toe 2 ml Fehling's oplossing A (4.1) en 2 ml Fehling's oplossing B (4.2). Kook het mengsel gedurende 1 minuut. Neem waar of een kleurverandering optreedt. Een eventueel gevormde neerslag van calciumsulfaat stoort de reactie niet.

6. Weergave van de resultaten**6.1. Interpretatie van de limietproef**

Indien er na koken een kleurverandering optreedt is de limietproef positief en zijn in het monster gereduceerde bestanddelen aanwezig.

6.2. Detectiegrens

De detectiegrens voor reducerende stoffen die reageren als glucose ligt bij 100 mg/100 g waar.

6.3. Opmerkingen

6.3.1. De resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist moeten gelijk zijn.

6.3.2. Bij aanwezigheid van 2 % glucose wordt de Fehling's oplossing volledig gereduceerd.

METHODE 12**HET BEPALEN VAN VLUCHTIGE ZUREN IN ORTHOFOSFORZUUR (E 338)****1. Doel en gebied van toepassing**

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor het bepalen van het gehalte aan vluchtige zuren, uitgedrukt als azijnzuur, in orthofosforzuur (E 338).

2. Definitie

Het gehalte aan vluchtige zuren: het gehalte aan vluchtige zuren, uitgedrukt als azijnzuur, bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

Aan het orthofosforzuur wordt water toegevoegd en de verkregen oplossing wordt gedestilleerd. De in het destillaat aanwezige zuren worden bepaald door titratie met natriumhydroxydeoplossing en berekend als azijnzuur.

4. Reagentia

4.1. Fenoltaleïneoplossing, 1 % m/v in ethanol.

4.2. Natriumhydroxydeoplossing, 0,01 mol/l.

5. Apparaten

5.1. Destillatieapparaat, voorzien van een spatbol.

6. Werkwijze

Weeg tot op 50 mg nauwkeurig ongeveer 60 g orthofosforzuur af. Breng de afgewogen hoeveelheid met behulp van 75 ml vers uitgekookt koud water over in de kolf van het destillatieapparaat (5.1). Meng en destilleer totdat 50 ml destillaat verkregen is. Voeg aan het destillaat enkele druppels fenolftaleïneoplossing (4.1) toe en titreer met de natriumhydroxydeoplossing (4.2) tot een rose kleur die 10 seconden blijft bestaan.

7. Weergave van de resultaten**7.1. Formule en methode van berekenen**

Bereken het gehalte aan vluchtige zuren uitgedrukt in mg azijnzuur per kg waar met de formule:

$$\frac{600 \times V}{m_0}$$

waarin:

V = de bij titratie verbruikte hoeveelheid natriumhydroxydeoplossing 0,01 mol/l in milliliter.

m₀ = de afgewogen hoeveelheid orthofosforzuur in gram.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 1 mg/kg waar.

METHODE 13**DE LIMIETPROEF VOOR HET BEPALEN VAN NITRATEN IN ORTHOFOSFORZUUR (E 338)****1. Doel en gebied van toepassing**

De in dit voorschrift beschreven methode dient om de eventuele aanwezigheid van nitraat in fosforzuur (E 338) vast te stellen.

2. Definitie

De limietproef voor nitraat: het vaststellen van de aanwezigheid van nitraat volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

Het ontkleuren van indigokarmijn door oxyderende stoffen waaronder nitraten in zwavelzuurhoudend milieu.

4. Reagentia

4.1. Indigokarmijnoplossing 0,18 % (m/v): los 0,18 g natriumindigotinesulfonaat op in water en vul aan tot 100 ml.

4.2. Natriumchlorideoplossing 0,05 % (m/v).

4.3. Geconcentreerd zwavelzuur, ρ₂₀ = 1,84 g/ml.

5. Werkwijze

Verdun 2,0 ml van de waar tot 10 ml met de natriumchlorideoplossing (4.2). Voeg toe 0,1 ml indigokarmijnoplossing (4.1) en voorzichtig onder afkoelen 10 ml geconcentreerd zwavelzuur (4.3). Beoordeel de kleur na 5 minuten.

6. Weergave van de resultaten**6.1. Interpretatie van limietproef**

De proef is positief indien de blauwe kleur, binnen 5 minuten volledig verdwijnt. Het verdwijnen van de blauwe kleur binnen 5 minuten geeft aan dat het gehalte aan oxyderende stoffen uitgedrukt als natriumnitrat groter is dan 5 mg/kg waar.

6.2. Opmerkingen

6.2.1. Voer een blanco test uit.

6.2.2. De resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussenpozen uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist moeten gelijk zijn.

6.2.3. De indigokarmijnoplossing mag niet gebruikt worden indien zij meer dan 60 dagen oud is.

6.2.4. Indien de reactie positief is kan de waar nitraat bevatten en moet een verder onderzoek uitgevoerd worden volgens de ISO 3709-1976 „Fosforzuur voor industrieel gebruik (inclusief levensmiddelindustrieën). Het bepalen van het gehalte aan stikstofoxyden door middel van de 3,4-xylenol spectrofotometrische methode”.

METHODE 14

HET BEPALEN VAN DE IN WATER ONOPLOSBARE STOFFEN VAN MONO-, DI- EN TRINATRIUMORTHOFOSFAAT EN VAN MONO-, DI- EN TRIKALIUMORTHOFOSFAAT (E 339 i, E 339 ii, E 339 iii, E 340 i, E 340 ii, E 340 iii)

1. Doel en gebied van toepassing

De in dit voorschrift beschreven methode dient voor de bepaling van in water onoplosbare bestanddelen in:

- mononatriumorthofosfaat (E 339 i),
- dinatriumorthofosfaat (E 339 ii),
- trinatriumorthofosfaat (E 339 iii),
- monokaliumorthofosfaat (E 340 i),
- dikaliumorthofosfaat (E 340 ii),
- trikaliumorthofosfaat (E 340 iii).

2. Definitie

Het gehalte aan in water onoplosbare bestanddelen: het gehalte aan in water onoplosbare bestanddelen bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

De waar wordt opgelost in water en de oplossing gefiltreerd door een gesinterde porcelainen filterkroes. Na uitwassen en drogen wordt het residu gewogen en berekend als in water onoplosbare bestanddelen.

4. Apparaten

- 4.1. Gesinterde porceleinen filterkroes, porositeit G 3 of gelijkwaardig.
- 4.2. Exsiccator, voorzien van vers geactiveerde silicagel met vochtindicator of een gelijkwaardig droogmiddel.
- 4.3. Elektrisch verwarmde droogstoof, voorzien van een thermostaat en ingesteld op $103 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 4.4. Bekerglas van polypropyleen, inhoud 400 ml.
- 4.5. Waterbad, kokend.

5. Werkwijze

Weeg tot op 10 mg nauwkeurig ongeveer 10 g van de waar van fosfaat af in de polypropyleenbeker (4.4) en los op in 100 ml heet water. Laat gedurende 15 minuten op het kokende waterbad (4.5) staan. Filtreer de oplossing door de vooraf gedroogde en gewogen filterkroes (4.1). Was het onoplosbare residu met heet water uit. Plaats de filterkroes met inhoud gedurende 2 uur in de droogstoof (4.3) bij $103 \pm 2^\circ\text{C}$.

Koel af tot kamertemperatuur in de exsiccator (4.2) en weeg. Herhaal het drogen, koelen en wegen totdat het verschil tussen twee opeenvolgende wegingen minder dan 0,5 mg bedraagt. Indien de massa is toegenomen dient voor de berekening de kleinst gevonden massa te worden gebruikt.

6. Weergave van de resultaten**6.1. Formule en methode van berekenen**

Bereken het gehalte aan in water onoplosbare bestanddelen uitgedrukt in massaprocenten van de waar met de formule:

$$\frac{m_1}{m_0} \times 100$$

waarin:

m_1 = de massa van het gedroogde residu in gram,

m_0 = de afgewogen hoeveelheid waar in gram.

6.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 10 mg per 100 g waar.

METHODE 15**HET BEPALEN VAN DE pH-WAARDE VAN LEVENSMIDDELENADDITIEVEN****1. Doel en gebied van toepassing**

Dit voorschrift beschrijft een algemene richtlijn voor het bepalen van de pH-waarde van levensmiddelenhulpstoffen.

2. Definitie

De pH-waarde van een levensmiddelenhulpstof: de pH-waarde bepaald volgens de in dit voorschrift beschreven methode.

3. Beginsel

De pH-waarde van een waterige oplossing of een waterige suspensie van de waar wordt bepaald met behulp van een glaselektrode, referentie-elektrode en een pH-meter.

4. Reagentia**4.1. Gebruik om het instrument te ijken de volgende oplossingen:**

- 4.1.1. Bufferoplossing, pH 6,88 bij 20 °C: meng gelijke volumina van een oplossing van kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4) 0,05 mol/l en een oplossing van dinatriumwaterstoffosfaat-dihydraat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,05 mol/l.
- 4.1.2. Bufferoplossing, pH 4,00 bij 20 °C: een oplossing van kaliumwaterstofftalaat ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) 0,05 mol/l.
- 4.1.3. Bufferoplossing, pH 9,22 bij 20 °C: een oplossing van natriumtetraboraat-dekahydraat, ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 0,05 mol/l.
- 4.2. Verzadigde of 3 mol/l oplossing van kaliumchloride (KCl), voor het vullen van de referentie-elektrode of een andere geschikte oplossing voorgeschreven door de fabrikant van de elektrode.
- 4.3. Gedestilleerd water, koolzuurvrij, met een pH tussen 5 en 6.

5. Apparaten

- 5.1. pH-meter, nauwkeurig tot op 0,01 pH-eenheid.
- 5.2. Elektroden: glaselektroden en referentie-elektroden al of niet gecombineerd en geschikte elektrodeklemmen.
- 5.3. Magneetroerder met verwarmingsinrichting.
- 5.4. Thermometer met een schaalverdeling van 0 tot 100 °C.

6. Werkwijze**6.1. Het ijken van de pH-meter**

Volg voor het gebruik van de elektroden de aanwijzingen van de fabrikant. De afgelezen pH-waarden dienen regelmatig te worden gecontroleerd door vergelijking met bufferoplossing van bekende pH-waarde. De elektroden dienen alvorens een meting uit te voeren of met water afgespoeld en daarna afgewist te worden met een zachte „tissue” of met water en vervolgens tweemaal met de te meten oplossing afgespoeld te worden.

Indien de te onderzoeken oplossing een zure pH vertoont dient de controle van de pH-aflezing te geschieden met de bufferoplossing, pH 4,00 (4.1.2) en de bufferoplossing, pH 6,88 (4.1.1). Vertoont de oplossing een alkalische reactie dan dient de controle van de pH-aflezing te geschieden met de bufferoplossing, pH 9,22 (4.1.3) en de bufferoplossing, pH 6,88 (4.1.1).

6.2. *Het meten van de oplossing van de waar*

De te gebruiken concentratie van de waar of de wijze van de bereiding van de te meten oplossing dient te geschieden op de wijze zoals voorgeschreven in de betreffende communautaire richtlijn inzake levensmiddelenhulpstoffen.

Bereid de meetoplossing op de voorgeschreven wijze waarbij gebruik gemaakt wordt van water als bedoeld onder 4.3 en stel onder roeren de temperatuur in op 20 °C. Staak het roeren, plaats de elektroden (5.2) in de oplossing en lees na 2 minuten de pH-waarde op de pH-meter (5.1) af.

7. **Weergave van de resultaten**

7.1. *Herhaalbaarheid*

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen tegelijkertijd of met korte tussentijd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden in dezelfde waar door dezelfde analist mag niet meer bedragen dan 0,05 pH-eenheid.

8. **Opmerkingen**

Deze methode is alleen toepasbaar bij die pH-eisen in de betreffende communautaire richtlijn voor levensmiddelenhulpstoffen, waarbij de hulpstof wordt opgelost of gesuspenderd in water.

BESCHIKKING VAN DE COMMISSIE

van 28 juli 1981

inzake de lijst van inrichtingen in de Federatieve Republiek Brazilië die erkend zijn voor de invoer in de Gemeenschap van vers vlees van runderen en eenhoevige landbouwhuisdieren

(81/713/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE
GEMEENSCHAPPEN,Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese
Economische Gemeenschap,Gelet op Richtlijn 72/462/EEG van de Raad van
12 december 1972 inzake gezondheidsvraagstukken
en veterinaire rechtelijke vraagstukken bij de invoer
van runderen en varkens en van vers vlees uit derde
landen ⁽¹⁾, en met name op artikel 4, lid 1, en arti-
kel 18, lid 1, sub a) en b),Overwegende dat aan inrichtingen in derde landen
slechts kan worden toegestaan vers vlees naar de
Gemeenschap te exporteren wanneer zij aan de bij
Richtlijn 72/462/EEG van de Raad vastgestelde
algemene en bijzondere voorwaarden voldoen;Overwegende dat de Federatieve Republiek Brazilië
overeenkomstig artikel 4, lid 3, van Richtlijn 72/
462/EEG een lijst heeft medegedeeld van de inrich-
tingen die naar de landen van de Gemeenschap
mogen exporteren;Overwegende dat bij een groot aantal van deze
inrichtingen door de Gemeenschap een inspectie ter
plaats is verricht, waarbij is gebleken dat zij op
hygiënisch gebied voldoende waarborgen bieden en
derhalve kunnen worden opgenomen in een eerste
lijst van inrichtingen, opgesteld overeenkomstig arti-
kel 4, lid 1, van voornoemde richtlijn, van waaruit
de invoer van vers vlees mag worden toegestaan;Overwegende dat met betrekking tot de overige door
Brazilië voorgestelde inrichtingen een nieuw onder-
zoek moet worden verricht op basis van aanvullende
gegevens ten aanzien van de situatie op hygiënisch
gebied en de mogelijkheden om zich snel aan de
communautaire wetgeving aan te passen; dat intus-
sen, om de bestaande handelstromen niet abrupt te
onderbreken, aan deze inrichtingen tijdelijk toe-
stemming kan worden verleend om verder vers vlees
uit te voeren naar de Lid-Staten die bereid zijn dit
vlees te accepteren;Overwegende dat deze beschikking derhalve
opnieuw zal moeten worden gezien en eventueelgewijzigd aan de hand van de ter zake genomen ini-
tiatieven en plaatsgevonden verbeteringen;Overwegende dat eraan moet worden herinnerd dat
op de invoer van vers vlees nog andere communau-
taire voorschriften op veterinair gebied van toepas-
sing zijn, met name gezondheidsvoorschriften, waar-
onder bijzondere bepalingen ten gunste van Dene-
marken, Ierland en het Verenigd Koninkrijk;Overwegende dat de voorwaarden voor invoer van
vers vlees voortkomende van de bedrijven voorko-
mend op de bijgevoegde lijst, onderworpen blijven
aan de maatregelen elders genomen, alsook aan de
algemene bepalingen van het Verdrag; dat meer in
het bijzonder de invoer uit derde landen en de door-
zending naar andere Lid-Staten van bepaalde soor-
ten vlees, zoals vlees van minder dan 3 kg of vlees
dat residuen bevat van bepaalde substanties waar-
omtrent nog een bijzondere geharmoniseerde rege-
ling moet worden ingevoerd, aan de veterinairech-
telijke voorschriften van de Lid-Staat van bestem-
ming betreffende de invoer onderworpen blijven;Overwegende dat de in deze beschikking vervatte
maatregelen in overeenstemming zijn met het advies
van het Permanent Veterinair Comité,HEEFT DE VOLGENDE BESCHIKKING
GEGEVEN:*Artikel 1*

1. De in de bijlage vermelde inrichtingen in de
Federatieve Republiek Brazilië worden erkend voor
invoer in de Gemeenschap van vers vlees van run-
deren en eenhoevige landbouwhuisdieren.
2. De invoer uit deze inrichtingen valt verder
onder toepassing van de overige communautaire
voorschriften op veterinair gebied, met name de
gezondheidsvoorschriften.

Artikel 2

1. De Lid-Staten verbieden de invoer van vers
vlees van de soorten, bedoeld in artikel 1, lid 1, van

⁽¹⁾ PB nr. L 302 van 31. 12. 1972, blz. 28.

herkomst uit andere dan de in bijlage vermelde inrichtingen.

2. Dit verbod geldt evenwel vóór 1 mei 1982 niet voor inrichtingen die niet zijn vermeld in de bijlage maar die officieel op 1 juli 1981 door de Braziliaanse autoriteiten zijn erkend en voorgesteld overeenkomstig artikel 4, lid 3, van Richtlijn 72/462/EEG, behoudens andersluidende beslissing vóór 1 mei 1982 ten aanzien van deze inrichtingen genomen, overeenkomstig artikel 4, lid 1, van voornoemde richtlijn.

De lijst van deze inrichtingen wordt door de Commissie aan de Lid-Staten medegedeeld.

Artikel 3

Deze beschikking treedt in werking op 1 oktober 1981.

Artikel 4

Deze beschikking wordt opnieuw bezien en zonodig gewijzigd vóór 1 maart 1982.

Artikel 5

Deze beschikking is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 28 juli 1981.

Voor de Commissie

De Voorzitter

Gaston THORN

BIJLAGE

LIJST VAN DE INRICHTINGEN

I. RUNDVLEES

A. Slachthuizen en uitsnijderijen

Nr.	Adres
0005	Cooperativa Rural Serrana Ltda, Tupanciretã, Rio Grande do Sul
0226	Frigorífico Bordon SA, Bagé, Rio Grande do Sul
0385	Frigorífico Mouran SA, Andradina, São Paulo
0458	Frigorífico União SA, Presidente Epitácio, São Paulo
0834	Frigorífico Kaiowa SA, Presidente Venceslau, São Paulo
0906	Frigorífico T. Maia SA, Governador Valadares, Minas Gerais
1602	Bon Beef Indústria e Comércio de Carnes SA, Vinhedo, São Paulo
1651	Frigorífico Extremo Sul SA, Pelotas, Rio Grande do Sul
1926	Frigorífico Anselmi SA, Indústria de Carnes, Derivados e Conservas, Pelotas, Rio Grande do Sul

B. Slachthuizen

Nr.	Adres
0076	SA Frigorífico Anglo-Barretos, São Paulo

C. Uitsnijderijen

Nr.	Adres
0001	Cia de Alimentos do Brasil SA (COMABRA), Osasco, São Paulo

II. PAARDEVLEES

Slachthuizen en uitsnijderijen

Nr.	Adres
0003	Frigorífico Yukijirushi do Paraná SA, Curitiba, Paraná
0924	Matadouro e Frigorífico Industrial SA (MAFISA), Belo Jardim, Pernambuco

III. KOELINRICHTINGEN

Nr.	Adres
0072	Cefri Centrais de Estocagem Frigorificada Ltda, Mairinque, São Paulo
0078	Interfrio SA Comercial e Industrial, Pelotas, Rio Grande do Sul
0535	Matadouro e Frigorífico Industrial SA (MAFISA), Recife, Pernambuco
0933	Companhia Brasileira de Armazenamento (CIBRAZEM), Rio de Janeiro
0966	C. Sola, Comércio e Exportação SA, Três Rios, Rio de Janeiro
1075	Frigorífico de Cotia SA, Santos, São Paulo
1127	Companhia Brasileira de Armazenamento (CIBRAZEM), Curitiba, Paraná
1599	Martini Meat SA, Comércio, Importação e Exportação de Carnes, Paranaguá, Paraná
1945	Departamento Estadual de Portos Riós e Canais, Rio Grande, Rio Grande do Sul
1958	Avante SA Produtos Alimentícios, Santos, São Paulo
2176	Frimorite Frigorífico Ltda, São Gonçalo, Rio de Janeiro

BESCHIKKING VAN DE COMMISSIE**van 28 juli 1981****tot wijziging van de lijsten van inrichtingen in de Argentijnse Republiek en in de Republiek Uruguay die erkend zijn voor de invoer in de Gemeenschap van vers vlees van runderen, schapen en eenhoevige landbouwhuisdieren**

(81/714/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE
GEMEENSCHAPPEN,Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese
Economische Gemeenschap,Gelet op Richtlijn 72/462/EEG van de Raad van
12 december 1972 inzake gezondheidsvraagstukken
en veterinairerechtelijke vraagstukken bij de invoer
van runderen en varkens en van vers vlees uit derde
landen ⁽¹⁾, en met name op artikel 4, lid 1, en artikel
18, lid 1, sub a) en b),Overwegende dat de lijsten van de inrichtingen in
Argentinië en Uruguay, welke erkend zijn voor de
invoer in de Gemeenschap van vers vlees van run-
deren, schapen en eenhoevige landbouwhuisdieren,
oorspronkelijk opgesteld werden in de beschikkin-
gen van de Commissie van 25 november 1980,
gewijzigd bij de Beschikkingen 81/91/EEG ⁽²⁾ en
81/92/EEG ⁽³⁾, en laatstelijk gewijzigd bij beschik-
king van 15 juli 1981;Overwegende dat verdere inspecties ter plaatse heb-
ben aangetoond dat de hygiënische situatie van
andere inrichtingen, voorgesteld door Argentinië en
Uruguay, verbeterd is en nu als toereikend kan wor-
den beschouwd; dat daarom deze inrichtingen kun-
nen worden toegevoegd aan de lijsten opgesteld in
overeenstemming met artikel 4, lid 1, van Richtlijn
72/462/EEG;Overwegende dat het daarom nodig is de lijst van de
inrichtingen aan te vullen;Overwegende dat de in deze beschikking vervatte
maatregelen in overeenstemming zijn met het advies
van het Permanent Veterinair Comité,HEEFT DE VOLGENDE BESCHIKKING
GEGEVEN:*Artikel 1*De bijlage van Beschikking 81/91/EEG wordt ver-
vangen door bijlage A van deze beschikking.*Artikel 2*De bijlage van Beschikking 81/92/EEG wordt ver-
vangen door bijlage B van deze beschikking.*Artikel 3*

Deze beschikking is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 28 juli 1981.

*Voor de Commissie**De Voorzitter*

Gaston THORN

⁽¹⁾ PB nr. L 302 van 31. 12.1972, blz. 28.⁽²⁾ PB nr. L 58 van 5. 3. 1981, blz. 39.⁽³⁾ PB nr. L 58 van 5. 3. 1981, blz. 43.

BIJLAGE A

LIJST VAN DE INRICHTINGEN

I. RUNDVLEES

A. Slachthuizen en uitsnijderijen

Nr.	Adres
8	Corporación argentina de productores de carnes (CAP) cuatrerros, Daniel Cerri, Buenos Aires
9	Corporación argentina de productores de carnes (CAP) yuqueri, Concordia, Entre Ríos
13	Cia Swift de la Plata SA, Rosarie, Santa Fé
15	Frigorífico Colón SA, Colon, Entre Ríos
16	Frigorífico regional Santa Elena SA, Santa Elena, Entre Ríos
20	SA Frigorífico Monte Grande Ltda, Monte Grande, Buenos Aires
89	Frigorífico Carcarana SACI, Carcarana, Santa Fé
249	Industrias frigoríficas Nelson SACIA, Nelson, Santa Fé
1113	La Morocha SAAICF, Villa Mercedes, San Luis
1333	Frigorífico argentino San Antonio (FASA), Parana, Entre Ríos
1344	Vizental y Cia SACIA, Ramirez, Entre Ríos
1352	Frigorífico Meatex Ciafiiesa, Alejandro Korn, Buenos Aires
1373	Frigorífico el Gentenario SA, Venado Tuerto, Santa Fé
1383	Barreca Hnos, Vivorata, Buenos Aires
1399	Frigorífico regional industria argentina SAIC (FRIA), Casilda, Santa Fé
1404	Pedro Hnos SAICIFA, Monte Chingolo, Buenos Aires
1408	Subpga SACIEI, Berazategui, Buenos Aires
1905	Frigorífico Yaguune SACIFA, Gonzalez Catan, Buenos Aires
1918	Cocarsa Cia de carneros SAICAI, San Fernando, Buenos Aires
1920	Frigorífico rioplatense SAICIF, General Pacheco, Buenos Aires
1921	San Telmo SACIAFIF, Mar de Plata, Buenos Aires
1930	Vizental y Cia SACIA, San José, Entre Ríos
1970	Frigorífico regional industrias alimenticias reconquista SA, Reconquista, Santa Fé
1984	Matadero y Frigorífico regional de Azul SAGIC, Azul, Buenos Aires
1989	Corporación argentina de productores de carnes (CAP), Rosario, Santa Fé
2012	Frigorífico el Duranzillo IFCA SAIFCA, Río Segundo, Córdoba
2019	Abastecedora delfino SACI, Tres Lomas, Buenos Aires
2052	Matadero y Frigorífico Antartico SAIC, Gonzalez Catan, Buenos Aires
2064	Frigorífico Siracusa SAACIIF, Bahía Blanca, Buenos Aires
2065	Frigorífico mediterraneos SAICIFA, Pajas Blancas
2067	Cia elaboradora de productos animales SAI CAGT, Pontevedra, Buenos Aires
2072	Frigorífico ganadero SACI AFIGMS, Curuzu Cuatia, Corrientes
2080	Caucan SA, Ezeiza, Buenos Aires

B. Uitsnijderijen

Nr.	Adres
18	Quickfood, Buenos Aires
273	Frigorífico guardia nacional SA, Guardia Nacional 1166, Cap. Federal
1122	Frigorífico Lafayette SAICAG, Lafayette 1740, Cap. Federal
1311	Frymat SAICFA, Buenos Aires 3680, Santa Fé
1920 a.	Frigorífico rioplatense SAICIF, General Pacheco, Buenos Aires

II. SCHAPEVLEES**Slachthuizen en uitsnijderijen**

Nr.	Adres
8	Corporación argentina de productores de carnes (CAP) cuaterros, Daniel Cerri, Buenos Aires
9	Corporación argentina de productores de carnes (CAP) yuqueri, Concordia, Entre Ríos
14	Corporación argentina de productores de carnes (CAP) Rio Grande, Tierra del fuego
97	Corporación argentina de productores de carnes (CAP), Pto. deseado, Santa Cruz
286	Frigorífico San Jorge SAIC, Bo Industrial, Comodoro Rivadavia
1352	Frigorífico Meatex Ciafiiesa, Alejandro Korn, Buenos Aires
1408	Subpga SACIEI, Berazategui, Buenos Aires
2006	Vizental y Cia SACIA, General Pico, La Pampa
2044	Frigorífico Siracusa SAACIIF, Comodoro Rivadavia, Chubut
2062	Finexcor, Pernal, Buenos Aires
2072	Frigorífico ganadero SACIA FIGMS, Curuzu Cuatia, Corrientes

III. PAARDEVLEES**Slachthuizen en uitsnijderijen**

Nr.	Adres
351	SA Indio Pampa ICAG, Trenque Lauquen, Buenos Aires
1369	Frigorífico Felmar SA, San Francisco, Buenos Aires
1400	Frigorífico Juchco SCA, Gialeguay, Entre Ríos
1451	Lamar SRL, Mercedes, Buenos Aires
2028	Lamar SRL, Resistencia, Chaco

IV. KOELINRICHTINGEN

Nr.	Adres
152	Comalfri, Pilar, Buenos Aires
267	Frymat SACIFA, Santa Fé
308	Frigorífico americano de morris Neremberg Ltda SA, Boulogne sur mer 260/2, Cap. Federal
391	Frigorífico Siracusa SAACIIF, Avellaneda, Buenos Aires
1326	Establecimiento azul SRL, Azul, Buenos Aires
1838	Guaicos SAIIF, Osvaldo Cruz 3047, Cap. Federal

BIJLAGE B

I. RUNDVLEES

Slachthuizen en uitsnijderijen

Nr.	Adres
1	Codadesa, Ruta 39, km 143, departamento de Maldonado
2	Colonia, Tarariras, departamento de Colonia
3	Carrasco, Camino Carrasco 5, departamento de Canelones
7	Infrinsa, Ruta Brigadier-General Juan A. Lavalleja, km 391, Ciudad de Melo, departamento de Cerro Largo
8	Canelones, Ciudad de Canelones, departamento de Canelones
12	Tacuarembó, Rutas 5 y 26, departamento de Tacuarembó
14	Efcsa (durazno), Santa Bernardina, departamento de Durazno
20	Comargen, Ruta 67 y Elias Regules, las Piedras, departamento de Canelones
106	Improgan, Camino Santos Lugares, km 4, la Pas, departamento de Canelones
344	San Jacinto, Ruta 7, km 59,5, San Jacinto, departamento de Canelones
394	Cybaran, La Caballada, departamento de Salto

II. SCHAPEVLEES

Slachthuizen en uitsnijderijen

Nr.	Adres
1	Codadesa, Ruta 39, km 143, departamento de Maldonado
2	Colonia, Tarariras, departamento de Colonia
3	Carrasco, Camino Carrasco 5, departamento de Canelones
7	Infrinsa, Ruta Brigadier-General Juan A. Lavalleja, km 391, Ciudad de Melo, departamento de Cerro Largo
8	Canelones, Ciudad de Canelones, departamento de Canelones
12	Tacuarembó, Rutas 5 y 25, departamento de Tacuarembó
14	Efcsa (durazno), Santa Bernardina, departamento de Durazno
20	Comargen, Ruta 67 y Elias Regules, las Piedras, departamento de Canelones
106	Improgan, Camino Santos Lugares, km 4, la Pas, departamento de Canelones
344	San Jacinto, Ruta 7, km 59,5, San Jacinto, departamento de Canelones
394	Cybaran, La Caballada, departamento de Salto

III. PAARDEVLEES

Slachthuizen en uitsnijderijen

Nr.	Adres
303	Clay, Ruta 7, km 40, departamento de Canelones

IV. KOELINRICHTINGEN

Nr.	Adres
10	Frigorífico Modelo SA (Planta Propios), Br. Batten Ordones 3029, departamento de Montevideo
87	Santos Arbiza, Colombia 1257, departamento de Montevideo
175	Corfrisa, Las Piedras, departamento de Canelones
903	Acer, Rambla Baltasar Brum 3653, departamento de Montevideo

NEGENDE RICHTLIJN VAN DE COMMISSIE

van 31 juli 1981

houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders

(81/715/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE
GEMEENSCHAPPEN,HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN
VASTGESTELD:Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese
Economische Gemeenschap,*Artikel 1*Gelet op Richtlijn 70/373/EEG van de Raad van
20 juli 1970 betreffende de invoering van gemeen-
schappelijke bemonsterings- en analysemethoden
voor de officiële controle van diervoeders ⁽¹⁾, laat-
stelijk gewijzigd bij de Toetredingsakte van Grie-
kenland, inzonderheid op artikel 2,De Lid-Staten schrijven voor dat de analyses voor
de officiële controle van diervoeders ten aanzien
van hun gehalte aan avoparcin en monensin
natrium geschieden volgens de in de bijlage
omschreven methoden.Overwegende dat bovenbedoelde richtlijn bepaalt
dat de officiële controle van diervoeders, welke
ertoe strekt na te gaan of aan de op grond van de
wettelijke of bestuursrechtelijke bepalingen inzake
de kwaliteit en de samenstelling van diervoeders
gestelde eisen is voldaan, geschiedt volgens commu-
nautaire bemonsterings- en analysemethoden;*Artikel 2*De Lid-Staten doen de wettelijke of bestuursrechte-
lijke bepaling in werking treden, die nodig zijn om
op 1 december 1981 aan deze richtlijn te voldoen en
stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.Overwegende dat bij de volgende Richtlijnen
71/250/EEG ⁽²⁾, 71/393/EEG ⁽³⁾, 72/199/EEG ⁽⁴⁾,
73/46/EEG ⁽⁵⁾, 74/203/EEG ⁽⁶⁾, 75/84/EEG ⁽⁷⁾,
76/372/EEG ⁽⁸⁾ en 78/633/EEG ⁽⁹⁾ van de Com-
missie, laatstelijk gewijzigd bij richtlijn van 30 juli
1981, reeds een zeker aantal gemeenschappelijke
analysemethoden is vastgesteld; dat het gezien de
vorderingen welke de werkzaamheden sindsdien
hebben gekend, dienstig is een negende reeks
methoden vast te stellen;*Artikel 3*

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Overwegende dat de in deze richtlijn vervatte maat-
regelen in overeenstemming zijn met het advies van
het Permanent Comité voor diervoeders,

Gedaan te Brussel, 31 juli 1981.

*Voor de Commissie**De Voorzitter*

Gaston THORN

⁽¹⁾ PB nr. L 170 van 3. 8. 1970, blz. 2.
⁽²⁾ PB nr. L 155 van 12. 7. 1971, blz. 13.
⁽³⁾ PB nr. L 279 van 20. 12. 1971, blz. 7.
⁽⁴⁾ PB nr. L 123 van 29. 5. 1972, blz. 6.
⁽⁵⁾ PB nr. L 83 van 30. 3. 1973, blz. 21.
⁽⁶⁾ PB nr. L 108 van 22. 4. 1974, blz. 7.
⁽⁷⁾ PB nr. L 32 van 5. 2. 1975, blz. 26.
⁽⁸⁾ PB nr. L 102 van 15. 4. 1976, blz. 8.
⁽⁹⁾ PB nr. L 206 van 29. 7. 1978, blz. 43.

BIJLAGE

1. BEPALING VAN AVOPARCIN DOOR MIDDEL VAN AGARDIFFUSIE

1. DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

Met deze methode kan avoparcin in diervoeders en voormengsels worden bepaald. De ondergrens van de bepaling ligt bij 2 mg/kg (2 ppm). In aanwezigheid van polyether-antibiotica kan de bepaling gestoord worden.

2. PRINCIPE

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel van aceton, water en zoutzuur. De antibiotische activiteit van het extract wordt bepaald door meting van de diffusie van avoparcin in een agarvoedingsbodem die geënt is met *Bacillus subtilis*. De diffusie wordt zichtbaar door de vorming van groeiremmingszones van het micro-organisme. De diameter van deze remzones wordt geacht recht evenredig te zijn met de logaritme van de antibioticumconcentratie binnen het gebruikte concentratiegebied.

3. MICRO-ORGANISME: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Bewaren van de stam

Buizen met schuingestolde voedingsbodem (4.1) worden geënt met *Bacillus subtilis* en een nacht bebroed bij 30 °C. De kweek wordt in de koelkast bewaard bij ca. 4 °C. Elke maand wordt opnieuw overgeënt.

3.2. Bereiding van de sporesuspensie ⁽¹⁾

Een vers bereide cultuur in een agarbuisje (3.1) wordt gesuspendeerd in 2 à 3 ml steriel water. Met deze suspensie wordt het oppervlak beënt van 300 ml in een Roux-fles gestolde voedingsbodem (4.1), die daarna 3-5 dagen geïncubeerd wordt bij 30 °C. Neem de cultuur op in 15 ml ethanol (4.2) na de vorming van sporen te hebben gecontroleerd onder de microscoop en meng goed. Deze suspensie kan ten minste 5 maanden bij ca. 4 °C bewaard worden.

4. VOEDINGSBODEMS EN REAGENTIA

4.1. Voedingsbodems ⁽²⁾

Pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Gistextract	3,0 g
Rundvleesextract	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar-agar	15,0 g
Water	1 000 ml
pH 6,5 (na sterilisatie).	

4.2. Ethanol 20 % (v/v): verdun 200 ml ethanol met 800 ml water.

4.3. Zoutzuur, d: 1,18-1,19.

⁽¹⁾ Andere methoden kunnen gebruikt worden voor zover is bewezen dat zij overeenkomstige sporesuspensies geven.

⁽²⁾ Elke handelsvoedingsbodem van vergelijkbare samenstelling, die dezelfde resultaten geeft, kan gebruikt worden.

- 4.4. 2 M-natriumhydroxydeoplossing.
- 4.5. Fosfaatbuffer, 0,1 M:
Monokaliumfosfaat, KH_2PO_4 13,6 g
Water tot 1 000 ml
Breng de pH op 4,5.
- 4.6. Mengsel van aceton, water en zoutzuur (4.3): 65 : 32,5 : 2,5 (v/v/v).
- 4.7. Standaard: avoparcinsulfaat met bekende activiteit.

5. STANDAARDOPLOSSINGEN

Los een nauwkeurig afgewogen hoeveelheid standaard (4.7) van ongeveer 10 mg op in de fosfaatbuffer (4.5), en verdun met deze buffer tot een voorraadoplossing van 100 μg avoparcin per ml. Deze kan in een gesloten kolf maximaal 7 dagen bij 4 °C bewaard worden.

5.1. Voor voormengsels

Met de voorraadoplossing worden door successieve verdunning met de buffer (4.5) de volgende oplossingen bereid:

S ₈	4 $\mu\text{g/ml}$
S ₄	2 $\mu\text{g/ml}$
S ₂	1 $\mu\text{g/ml}$
S ₁	0,5 $\mu\text{g/ml}$.

5.2. Voor diervoeders

Met de voorraadoplossing worden door successieve verdunning met de buffer (4.5) de volgende oplossingen bereid:

S ₈	2,0 $\mu\text{g/ml}$
S ₄	1,0 $\mu\text{g/ml}$
S ₂	0,5 $\mu\text{g/ml}$
S ₁	0,25 $\mu\text{g/ml}$.

6. BEREIDING VAN HET EXTRACT EN DE VERDUNNINGEN

6.1. Voormengsels

Weeg tot op 10 mg nauwkeurig een hoeveelheid van het monster af die 10 tot 100 mg avoparcin bevat. Breng deze hoeveelheid met 60 ml van het mengsel (4.6) over in een maatkolf van 100 ml. Schud gedurende 15 minuten op een schudapparaat. Controleer de pH en breng hem zo nodig op 2 met zoutzuur (4.3). Vul aan tot 100 ml met mengsel (4.6) en meng goed. Filtreer een deel door geschikt filtreerpapier (b. v. Whatman nr. 1), waarbij de eerste 5 ml van het filtraat worden weggeworpen. Neem een aliquoot deel en breng met natriumhydroxydeoplossing (4.4) op pH 4,5. Verdun deze oplossing met buffer (4.5) tot dat een aangenomen avoparcinconcentratie van 4 $\mu\text{g/ml}$ is bereikt (= U₈).

Bereid, uitgaande van deze oplossing, door successieve verdunning (1+1) met buffer (4.5), de oplossingen U₄ (aangenomen gehalte 2 $\mu\text{g/ml}$), U₂ (aangenomen gehalte 1 $\mu\text{g/ml}$) en U₁ (aangenomen gehalte 0,5 $\mu\text{g/ml}$).

6.2. Diervoeders

Voeg aan een afgewogen hoeveelheid van 50,0 g monster 100 ml van het mengsel (4.6) toe en schud gedurende 30 minuten op een schudapparaat. Maak het extract helder door centrifugeren (waarbij gebruik wordt gemaakt van met een stop gesloten centrifugebuizen), neem een aliquoot deel van het heldere extract (zie onderstaande tabel) en breng met de natriumhydroxydeoplossing (4.4) de pH op 4,5. Verdun dit aliquoot deel met buffer (4.5) tot U₈ (zie onderstaande tabel).

Bereid, uitgaande van deze oplossing, door successieve verdunningen (1 + 1) met de buffer (4.5), de oplossingen U₄ (aangenomen gehalte: 1,0 µg/ml), U₂ (aangenomen gehalte: 0,5 µg/ml) en U₁ (aangenomen gehalte: 0,25 µg/ml).

Vermoedelijk avoparcinegehalte in (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Gewicht van het monster in g (± 0,1 g)	50	50	50	50	50	50
Volume van het mengsel (4.6) (ml)	100	100	100	100	100	100
Volume van het heldere extract (ml)	20	15	20	15	20	10
Eindvolume (ml): U ₈	25	25	50	50	100	100
Aangenomen U ₈ concentratie in µg/ml	2	ca. 2	2	ca. 2	2	2

7. UITVOERING VAN DE BEPALING

7.1. Enten van de voedingsbodem

Beënt bij 50 °C de voedingsbodem (4.1) met de sporesuspensie (3.2). Door voorafgaande proeven met platen met voedingsbodem (4.1) dient men de hoeveelheid sporesuspensie te bepalen die bij de verschillende concentraties avoparcin zo groot mogelijke remzones geeft, die toch nog scherp zijn.

7.2. Gereedmaken van de platen

De agardiffusie vindt plaats in platen waarop de vier standaardconcentraties (S₈, S₄, S₂ en S₁) voorkomen en de vier extractconcentraties (U₈, U₄, U₂ en U₁). Elke plaat moet beslist alle vier concentraties van standaard en extract bevatten. Daarom moet de afmeting van de platen zo gekozen worden dat men in de agarvoedingsbodem ten minste 8 gaatjes kan ponsen van 10 tot 13 mm diameter, waarvan de middelpunten niet minder dan 30 mm van elkaar verwijderd zijn. Als platen kan men vlakke glazen platen gebruiken, waarop aluminium of plastic ringen van 200 mm diameter en 20 mm hoogte gezet worden.

Giet in de platen een hoeveelheid voedingsbodem (4.1), geënt als aangegeven in 7.1, die een laagdikte van ca. 2 mm geeft (60 ml voor een plaat van 200 mm diameter). Laat de voedingsbodem stollen, pons er de gaatjes in en pipeteer er de exact afgemeten hoeveelheden van standaard en extract in (0,10 tot 0,15 ml per gaatje, afhankelijk van de diameter). Breng iedere concentratie tenminste in viervoud aan, zodat iedere bepaling als grondslag voor de berekening 32 remzones heeft.

7.3. Bebroeding

Bebroed de platen 16 tot 18 uur bij 30 °C.

8. METING EN BEREKENING

Meet de diameter van de remzones tot op 0,1 mm nauwkeurig. Zet voor elke concentratie de gemiddelde waarden op semilogaritmisch papier uit, zodanig dat de logaritme van de concentraties tegen de diameter van de remzones komt te staan. Trek de best passende lijnen voor standaard en extract en ga daarbij, bij voorbeeld, als volgt te werk.

Bepaal het meest passende punt voor de laagste standaardwaarde (SL) volgens de formule:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Bepaal het meest passende punt voor de hoogste standaardwaarde (SH) volgens de formule:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Bepaal op dezelfde wijze de meest passende punten voor de laagste extractwaarde (UL) en de hoogste extractwaarde (UH) door in bovenstaande formules S_1, S_2, S_4 en S_8 door U_1, U_2, U_4 en U_8 te vervangen.

Vul de waarden SL en SH in dezelfde grafiek in. Door deze twee punten te verbinden krijgt men de meest passende rechte voor de standaardoplossing. Op dezelfde wijze verkrijgt men met UL en UH de meest passende rechte voor het extract.

Wanneer er geen enkele storing is, moeten de rechten evenwijdig zijn. In de praktijk kunnen de rechten als evenwijdig worden beschouwd wanneer $(SH - SL)$ en $(UH - UL)$ niet meer dan 10 % van hun gemiddelde afwijken.

Als de rechten niet evenwijdig zijn, kan men hetzij U_1 en S_1 , hetzij U_8 en S_8 uitsluiten. De waarden SL, SH, UL en UH waarmee men dan de meest passende rechten kan trekken, worden dan berekend volgens de volgende formules:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{of} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{of} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

en analoge formules voor UL en UH. De met deze alternatieve formules getrokken rechten moeten ook op evenwijdigheid onderzocht worden, zoals boven aangegeven. Wanneer het resultaat uit drie niveaus berekend is, moet dit op het analysecertificaat vermeld worden.

Wanneer de rechten als evenwijdig beschouwd kunnen worden, wordt de logaritme van de relatieve activiteit ($\log A$) berekend volgens één van de volgende formules:

Voor 4 niveaus

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Voor 3 niveaus

$$(d) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

of

$$(d') \quad \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Werkelijke activiteit = aangenomen activiteit \times relatieve activiteit.

Blijkt de relatieve activiteit buiten het gebied 0,5 tot 2,0 te liggen, dan moet men de bepaling herhalen met geschikte aanpassingen aan de extractconcentraties of, indien zulks onmogelijk is, aan de standaardoplossingen. Indien de relatieve activiteit in het gebied van de gevraagde waarden niet opgebracht kunnen worden, moet het resultaat als een benadering worden beschouwd en als zodanig op het analysecertificaat worden vermeld.

Wanneer de rechten niet als evenwijdig beschouwd kunnen worden, moet men de bepaling herhalen. Wanneer het dan nog steeds niet lukt evenwijdige rechten te verkrijgen, moet de bepaling als niet bevredigend worden beschouwd.

9. HERHAALBAARHEID

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen aan hetzelfde monster uitgevoerd door dezelfde analist mag niet groter zijn dan:

- 2 mg/kg in absolute waarde bij avoparcingehalten van 2 t/m 10 mg/kg;
- 20 % van de hoogste waarde bij gehalten van meer dan 10 en t/m 25 mg/kg;
- 5 mg/kg in absolute waarde bij gehalten van meer dan 25 en t/m 50 mg/kg;
- 10 % van de hoogste waarde bij gehalten van meer dan 50 mg/kg.

2. BEPALING VAN MONENSIN NATRIUM DOOR MIDDEL VAN AGARDIFFUSIE

1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Met deze methode kan monensin natrium in diervoeders en voormengsels worden bepaald. De ondergrens van de bepaling ligt bij 10 mg/kg (10 ppm) ⁽¹⁾.

2. PRINCIPE

Het monster wordt geëxtraheerd met 90 % methanol. Het extract wordt verder behandeld, afhankelijk van het gehalte monensin natrium van het monster. De antibiotische activiteit wordt bepaald door meting van de diffusie van monensin natrium in een agarvoedingsbodem, die geënt is met *Bacillus subtilis*. De diffusie wordt zichtbaar door de vorming van groeiremmingszones van het micro-organisme. De diameter van deze remzones wordt geacht recht evenredig te zijn met de logaritme van de antibioticumconcentratie binnen het gebruikte concentratiegebied. De gevoeligheid van deze bepalingsmethode neemt af in aanwezigheid van natriumionen.

3. MICRO-ORGANISME: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Bewaren van de stam

Buizen met schuingestolde voedingsbodem (4.1) worden geënt met *Bacillus subtilis*, en een nacht geïncubeerd bij 30 °C. De kweek wordt in de koelkast bewaard bij ca. 4 °C. Elke maand wordt opnieuw overgeënt.

3.2. Bereiding van de sporesuspensie ⁽²⁾

Een vers bereide cultuur in een agarbuisje (3.1) wordt gesuspendeerd in 2 à 3 ml steriel water. Met deze suspensie wordt het oppervlak beënt van 300 ml in een Roux-fles gestolde voedingsbodem (4.1), die daarna 3-5 dagen geïncubeerd wordt bij 30 °C. Neem de cultuur op in 15 ml ethanol (4.3) na de vorming van sporen te hebben gecontroleerd onder de microscoop en meng goed. Deze suspensie kan ten minste 5 maanden bij 4 °C bewaard worden.

4. VOEDINGSBODEMS EN REAGENTIA

4.1. Voedingsbodem voor het voortkweken van de stam ⁽³⁾

Trypton	10,0 g
Gistextract	3,0 g
Vleesextract	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar-agar (naar gelang de kwaliteit)	10,0 tot 20,0 g
Water	1 000 ml
pH 6,5 (na sterilisatie).	

4.2. Voedingsbodem voor de metingen

Glucose	10,0 g
Gistextract	2,5 g
Dikaliumfosfaat K ₂ HPO ₄	0,69 g
Monokaliumfosfaat KH ₂ PO ₄	0,45 g
Agar-agar (naar gelang kwaliteit)	10,0 tot 20,0 g
Water	1 000 ml
pH 6,0 (na sterilisatie).	

⁽¹⁾ 1 mg monensin natrium komt overeen met 1 000 „UK” eenheden.

⁽²⁾ Andere methoden kunnen gebruikt worden voor zover is bewezen dat zij overeenkomstige sporesuspensies geven.

⁽³⁾ Elke handelsvoedingsbodem van vergelijkbare samenstelling, die dezelfde resultaten geeft, kan gebruikt worden.

- 4.3. Ethanol 20 % (v/v): verdun 200 ml ethanol met 800 ml water.
- 4.4. Methanol, watervrij.
- 4.5. Methanol 90 % (v/v): verdun 900 ml methanol (4.4) met 100 ml water.
- 4.6. Methanol 50 % (v/v): verdun 500 ml methanol (4.4) met 500 ml water.
- 4.7. Aluminiumoxide, gekorrelt (Alcoa F, 20 mesh; Activated alumina UG1: F. Lancaster and Co., of gelijkwaardig).
- 4.8. Standaard: monensin natrium met bekende activiteit (b. v. van het International Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey KT15 3NB, Groot-Brittannië).

5. APPARATUUR

- 5.1. Roterende vacuümverdamer met rondbodemkolf van 250 ml.
- 5.2. Glazen chromatografiekolom, inwendige diameter; 25 mm, lengte: 400 mm, met aan een uiteinde een vernauwde opening van 2 mm doorsnede.
- 5.3. Glazen chromatografiekolom, inwendige diameter: 11 mm, lengte: ongeveer 300 mm, met aan een uiteinde een vernauwde opening van 2 mm doorsnede.

6. STANDAARDOPLOSSINGEN

Los een nauwkeurig afgewogen hoeveelheid standaard (5.8) op in methanol (4.4), en verdun tot een voorraadoplossing van 800 µg monensin natrium per ml. Deze kan in gesloten kolven 2 weken bij 4 °C bewaard worden.

Met deze voorraadoplossing worden door successieve verdunning met 50 % methanol (4.6) de volgende oplossingen bereid:

- S₈ 8 µg/ml
- S₄ 4 µg/ml
- S₂ 2 µg/ml
- S₁ 1 µg/ml.

7. BEREIDING VAN HET EXTRACT

7.1. Extractie

7.1.1. Voormengsels

Aan een afgewogen hoeveelheid van 2,0 g van het monster worden 100 ml 90 % methanol (4.5) toegevoegd. Homogeniseer en centrifugeer gedurende enkele minuten. Verdun de bovenstaande vloeistof met 50 % methanol (4.6) tot een aangenomen monensin natriumgehalte van 8 µg/ml bereikt is (= U₈).

7.1.2. Diervoeders met een monensin natriumgehalte van niet minder dan 50 ppm

Aan een afgewogen hoeveelheid van 10,0 tot 20,0 g van het monster wordt 100 ml 90 % methanol (4.5) toegevoegd. Het mengsel wordt gedurende 15 minuten gehomogeniseerd; vervolgens laten rusten.

Breng in het smalle uiteinde van een glazen kolom (5.2) een prop watten aan, voeg onder zacht tikken aluminiumoxyde (4.7) toe tot de kolom 75 tot 80 mm hoog is.

Decanteer het homogenaat over de bereide aluminiumoxydekolom en vang de doorgelopen vloeistof op. Verdun 30 ml van de doorgelopen vloeistof tot 50 ml met water. Maak daarna verdunningen met 50 % methanol (4.6) tot een aangenomen monensin natriumgehalte van 8 µg/ml bereikt is (U₈).

7.1.3. Diervoeder met een monensin natriumgehalte minder dan 50 ppm (ondergrens: 10 ppm)

Aan een afgewogen hoeveelheid van 10,0 tot 20,0 g van het monster wordt 100 ml 90 % methanol (4.5) toegevoegd. Het mengsel wordt gedurende 15 minuten gehomogeniseerd en dan gecentrifugeerd voor het verkrijgen van een helder extract.

Van een monster met een monensin natriumgehalte van 20 ppm wordt 40 ml van de bovenstaande vloeistof afgenomen; van een monster met een gehalte van 10 ppm wordt 80 ml afgenomen. De oplossing wordt onder vacuüm in de roterende verdamper (5.1) bij een temperatuur van niet meer dan 40 °C verdampt en het residu in 10 ml 90 % methanol (4.5) opgelost.

Breng in het smalle uiteinde van een glazen kolom (5.3) een prop watten aan en voeg onder zacht tikken aluminiumoxyde (4.7) toe tot de kolom 75 tot 80 mm hoog is.

Decanteer de methanolische oplossing van het residu op de aluminiumoxydekolom en verzamel het filtraat. Was de kolom met 10 ml 90 % methanol (4.5) en voeg de spoelvoelstof bij het filtraat.

De oplossing wordt onder vacuüm in de roterende verdamper (5.1) bij een temperatuur van niet meer dan 40 °C geheel verdampt, het residu in 10 ml waterrijke methanol (4.4) opgelost en met water tot 20 ml verdund. Centrifugeer gedurende ten minste 5 minuten bij tenminste 4 000 tpm. Maak daarna verdunningen met 50 % methanol (4.6) tot een aangenomen monensin natriumgehalte van 8 µg/ml bereikt is (= U_8).

7.2. Verdunningen van het extract

Bereid, uitgaande van U_8 , door successieve verdunningen (1 + 1) met 50 % methanol (4.6), de oplossingen U_4 (aangenomen gehalte 2 µg/ml), U_2 (aangenomen gehalte 2 µg/ml) en U_1 (aangenomen gehalte 1 µg/ml).

8. UITVOERING VAN DE BEPALING**8.1. Enten van de voedingsbodem**

Beënt bij 50-60 °C de voedingsbodem (4.2) met de sporesuspensie (3.2). Door voorproeven met platen met voedingsbodem (4.2) dient men de hoeveelheid inoculum te bepalen die bij de verschillende concentraties monensin natrium zo groot mogelijke remzones geeft, die toch nog scherp zijn.

8.2. Gereedmaken van de platen

De agardiffusie vindt plaats in platen waarop de vier standaardconcentraties (S_8 , S_4 , S_2 en S_1) voorkomen en de vier extractconcentraties (U_8 , U_4 , U_2 en U_1). Elke plaat moet beslist alle vier concentraties van standaard en extract bevatten. Daarom moet de afmeting van de platen zo gekozen worden dat men in de agarvoedingsbodem ten minste 8 gaatjes kan ponsen van 10 tot 13 mm diameter, waarvan de middelpunten niet minder dan 30 mm van elkaar verwijderd zijn. Als platen kan men vlakke glazen platen gebruiken, waarop aluminium of plastic ringen van 200 mm diameter en 20 mm hoogte gezet worden.

Giet in de platen een hoeveelheid voedingsbodem (4.2), die geënt is als aangegeven in 8.1, die een laagdikte van ca. 2 mm geeft (60 ml voor een plaat van 200 mm diameter). Laat de voedingsbodem stollen, pons er de gaatjes in en pipeteer er de exact afgemeten hoeveelheden van standaard en extract in (0,10 tot 0,15 ml per gaatje, afhankelijk van de diameter). Breng iedere concentratie ten minste in viervoud aan, zodat iedere bepaling als grondslag voor de berekening 32 remzones heeft.

8.3. Bebroeding

Bebroed de platen ca. 18 uur bij 35–37 °C.

9. METING EN BEREKENING

Meet de diameter van de remzones tot op 0,1 mm nauwkeurig. Zet voor elke concentratie de gemiddelde waarden op semilogaritmisch papier uit, zodanig dat de logaritme van de concentraties tegen de diameter van de remzones komt te staan. Trek de best passende lijnen voor standaard en extract en ga daarbij, bij voorbeeld, als volgt te werk.

Bepaal het meest passende punt voor de laagste standaardwaarde (SL) volgens de formule:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Bepaal het meest passende punt voor de hoogste standaardwaarde (SH) volgens de formule:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Bepaal op dezelfde wijze de meest passende punten voor de laagste extractwaarde (UL) en de hoogste extractwaarde (UH) door in bovenstaande formules S_1 , S_2 , S_4 en S_8 door U_1 , U_2 , U_4 en U_8 te vervangen.

Vul de waarden SL en SH in dezelfde grafiek in. Door deze twee punten te verbinden krijgt men de meest passende rechte voor de standaardoplossing. Op dezelfde wijze verkrijgt men met UL en UH de meest passende rechte voor het extract.

Wanneer er geen enkele storing is, moeten de rechten evenwijdig zijn. In de praktijk kunnen de rechten als evenwijdig worden beschouwd, wanneer $(SH - SL)$ en $(UH - UL)$ niet meer dan 10 % van hun gemiddelde afwijken.

Als de rechten niet evenwijdig zijn, kan men hetzij U_1 en S_1 , hetzij U_8 en S_8 uitsluiten. De waarden SL, SH, UL en UH waarmee men dan de meest passende rechten kan trekken, worden dan berekend volgens de volgende formules:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \text{ of } \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \text{ of } \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

en analoge formules voor UL en UH. De met deze alternatieve formules getrokken rechten moeten ook op evenwijdigheid onderzocht worden, zoals boven aangegeven. Wanneer het resultaat uit drie niveaus berekend is, moet dit op het analysecertificaat vermeld worden.

Wanneer de rechten als evenwijdig beschouwd kunnen worden, wordt de logaritme van de relatieve activiteit ($\log A$) berekend volgens een van de volgende formules:

Voor 4 niveaus

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Voor 3 niveaus

$$(d) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

of

$$(d') \quad \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Werkelijke activiteit = aangenomen activiteit \times relatieve activiteit.

Blijkt de relatieve activiteit buiten het gebied 0,5 tot 2,0 te liggen, dan moet men de bepaling herhalen met geschikte aanpassingen aan de extractconcentraties of, indien zulks onmogelijk is, aan de standaardoplossingen. Indien de relatieve activiteit in het gebied van de gevraagde waarden niet opgebracht kunnen worden, moet het resultaat als een benadering worden beschouwd en als zodanig op het analysecertificaat worden vermeld.

Wanneer de rechten niet als evenwijdig beschouwd kunnen worden, moet men de bepaling herhalen. Wanneer het dan nog steeds niet lukt evenwijdige rechten te verkrijgen, moet de bepaling als niet bevredigend worden beschouwd.

10. HERHAALBAARHEID

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen op hetzelfde monster uitgevoerd door dezelfde analist mag niet groter zijn dan:

- 20 % van de hoogste waarde bij monensin natriumgehalten van 10 tot en met 25 mg/kg;
- 5 mg/kg in absolute waarde bij gehalten van meer dan 25 en tot en met 50 mg/kg;
- 10 % van de hoogste waarde bij gehalten van meer dan 50 mg/kg.

