

DECISION

**du Comité de Ministres de l'Union économique Benelux
relative à l'application d'une méthode de référence Benelux
pour la recherche et l'identification des colorants synthétiques solubles
dans l'eau, présents dans les denrées alimentaires**

M (76) 10

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu l'article 1er du Protocole du 29 avril 1969 relatif à la suppression des contrôles et formalités aux frontières intérieures du Benelux et à la suppression des entraves à la libre circulation,

Vu la Recommandation du Comité de Ministres du 23 septembre 1963, relative à l'harmonisation des législations concernant les matières colorantes pour les denrées destinées à l'alimentation humaine, M (63) 18,

Considérant qu'il y a lieu d'éviter des contestations nées de l'application de techniques d'analyse différentes ou de l'emploi de normes différentes,

Considérant qu'en particulier l'harmonisation du contrôle des denrées alimentaires exige la mise en œuvre de techniques identiques ou équivalentes et l'emploi de modes d'expression semblables et le recours à des normes identiques ou équivalentes,

A pris la décision suivante :

Article 1^{er}

1. Les Gouvernements des trois pays du Benelux prendront les mesures nécessaires pour que les dispositions reprises dans le Règlement annexé à la présente Décision soient considérées à partir du 1er septembre 1976 comme seule méthode de référence.
2. Dans les 6 mois qui suivent l'expiration du délai prévu au § 1, chacun des trois Gouvernements fait rapport au Comité de Ministres sur les mesures qui ont été prises pour l'exécution de cette Décision. Le texte des mesures d'exécution nationales sera joint à ce rapport.

Article 2

La recommandation relative à l'application d'une méthode de référence Benelux pour la recherche et l'identification des colorants synthétiques solubles dans l'eau présents dans les denrées alimentaires M (65) 4 et la recommandation complétant celle-ci, M (66) 13, sont abrogées.

FAIT à Bruxelles, le 26 janvier 1976.

Le Président du Comité de Ministres,

G. THORN

METHODE DE REFERENCE BENELUX
pour la recherche et l'identification des colorants synthétiques,
solubles dans l'eau, présents dans les denrées alimentaires
M (76) 10, Annexe

LISTE DES REACTIFS

Solution tampon : pH = 3. Dissoudre dans l'eau distillée 2 g d'acétate de sodium ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$), ajouter 25 ml d'acide acétique glacial et diluer à 1 litre à l'aide d'eau distillée.

Quinoléine : qualité purissimum. Une légère coloration jaune de la quinoléine n'exclut pas son utilisation.

Amberlite : LA₂ (BDH, ROHM et HAAS ou équivalent)

Ether diéthylique : exempt de peroxyde

Ammoniaque : 25 %, 10 %, 5 % en poids de NH_3

Acide acétique glacial p.a .

Acide chlorhydrique : .1 n

Acétone p.a .

Célite

Chloroforme p.a.

Colorants de référence

Ethanol : 96 % vol., 70 % vol.

Ether de pétrole : P.E. 40° — 60° C

Sable marin, lavé à l'acide chlorhydrique et calciné

Solution aqueuse de trichlorure de titane : 15 % (m/v)

Réactif à la p-diméthylaminobenzaldéhyde : dissoudre 1 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde dans 30 ml d'éthanol à 96 % vol., ajouter ensuite 180 ml de n. butanol et 30 ml d'acide chlorhydrique à 36 %.

n Butanol

Butanol tertiaire (2-méthylpropanol-2)

n Propanol

Pyridine incolore

Acide propionique

Citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$)

Chlorure de potassium

1. Isolement par la quinoléine des colorants synthétiques solubles dans l'eau

- 1.1. Mode opératoire applicable aux denrées à forte teneur en sucre, aux boissons alcooliques, aux produits laitiers.

- 1.1.1. Dans le cas d'une denrée solide :
- traiter une partie de la substance par 4 parties de solution tampon et transférer 30 ml de ce mélange dans un tube à centrifugation, de préférence bouché à l'émeri, d'une contenance approximative de 50 ml (longueur 20 cm environ, diamètre extérieur 2 cm environ).
- 1.1.2. Dans le cas d'une denrée liquide :
- introduire directement 10 ml de la denrée dans le tube à centrifugation et ajouter 20 ml de solution tampon.
- 1.1.3. Ajouter ensuite dans le tube à centrifugation, 10 ml de quinoléine; agiter énergiquement puis centrifuger durant 5 minutes à la vitesse de 1.200 tours par minute. Eliminer la solution aqueuse aussi parfaitement que possible par aspiration au moyen d'un tube effilé. Agiter la quinoléine avec 20 ml d'eau, centrifuger et aspirer complètement la couche aqueuse surnageante. Répéter ce lavage une seconde fois. Si la quinoléine est trouble, filtrer sur filtre sec dans un autre tube à centrifugation.
- 1.1.4. Ajouter au colorant dissous dans la quinoléine 30 ml d'éther et 1 ml d'eau. Agiter énergiquement puis centrifuger. Traiter la couche éthéro-quinoléinique selon 1.1.5. et la couche aqueuse selon 1.1.6. Certains colorants, comme la nigrosine, flocculent par agitation du mélange éther-quinoléine avec l'eau et adhèrent au verre. Dans ce cas traiter selon 1.1.8.
- 1.1.5. Si la couche éthéro-quinoléinique demeure colorée (ce qui peut indiquer la présence d'érythrosine, d'éosine, de phloxine et/ou de certains colorants naturels), ajouter dans le tube 2 ml d'ammoniaque à 10 % et agiter énergiquement le tube et son contenu. Après centrifugation séparer par aspiration la couche supérieure éthéroquinoléinique. Conserver cette couche pour la recherche des colorants basiques (dont la rhodamine B) selon 1.1.7.

La dilution par l'éther change ces colorants en forme incolore qui reste en solution dans la couche éthéro-quinoléinique. Si, dans la substance à examiner, la rhodamine B est le seul colorant rouge présent, la décoloration de la quinoléine lors de sa dilution à l'aide d'éther, constitue une indication valable de la présence de ce colorant.

Traiter la couche aqueuse ammoniacale selon 1.1.9.

- 1.1.7. Agiter la couche éthéro-quinoléinique, mise en réserve selon les indications en 1.1.5. avec 10 ml d'acide chlorhydrique 1 n. Une coloration de la phase aqueuse acide indique la présence de colorants basiques. Cette coloration est rouge dans le cas de la rhodamine B. Centrifuger et aspirer complètement la couche éthéro-quinoléinique. Agiter la solution aqueuse acide colorée avec 2 ml de chloroforme et éliminer, après séparation des phases, la couche aqueuse. Laver à 2 reprises la solution chloroformique avec 1 ml d'eau et éliminer, chaque fois, la couche aqueuse. Examiner le chloroforme contenant la matière colorante selon 1.1.9.
- 1.1.8. Redissoudre le colorant précipité dans l'éthanol à 96 % vol. Examiner la solution alcoolique du colorant selon 1.1.9.
- 1.1.9. Si la solution purifiée du colorant est à concentration trop faible, évaporer cette solution au bain-marie, dans une capsule en verre jusqu'à obtention d'un volume plus réduit (environ 0,5 ml). Dans le cas de la solution aqueuse, l'acidifier très légèrement à l'acide acétique avant évaporation. Procéder à l'identification selon 2.
- 1.2. Mode opératoire applicable aux denrées à forte teneur en amidon, à forte teneur en matière protéiques ou contenant des jaunes d'œufs.
- 1.2.1. *Dans le cas des denrées riches en matières grasses*, dégraisser comme suit : Introduire dans un mortier 10 g de l'échantillon. Triturer avec 3 g de sable marin, 6 à 7 g de célite et 30 à 40 ml d'acétone. Décanter le liquide surnageant et le filtrer sur un papier filtre plissé. Reprendre le résidu 3 fois successivement par 30 à 40 ml d'acétone, décanter chaque fois le liquide surnageant et le filtrer. Sécher le résidu dégraissé, d'abord à l'air libre et ensuite durant 30 minutes dans l'étuve, et pulvériser.
- 1.2.2. *Dans le cas des denrées peu riches en matières grasses* : dessécher si nécessaire sans dégraissage préalable et pulvériser.
- 1.2.3. Introduire dans un mortier 2 g de matière séchée et pulvérisée et 15 ml de quinoléine préalablement saturée d'eau. Extraire le plus parfaitement possible le colorant en triturant quelque temps la denrée en présence de cette quinoléine. Ajouter 20 ml de solution tampon et triturer à nouveau pendant quelque temps.
- Transférer le tout dans un tube à centrifugation et agiter énergiquement. Centrifuger durant 10 minutes à 1.200 tours/minute, puis éliminer par aspiration la couche aqueuse supérieure. Si une émulsion s'est formée à l'interphase des couches aqueuse et quinoléinique, l'éliminer en même temps que la couche aqueuse.
- Introduire ensuite 20 ml d'eau, agiter de nouveau énergiquement puis centrifuger 10 minutes.
- Éliminer le plus complètement possible la couche aqueuse par aspiration. Filtrer la quinoléine sur un filtre sec dans un autre tube à centrifugation.

- 1.2.4. Introduire dans ce tube 30 ml d'éther et 1 ml d'eau, agiter énergiquement, centrifuger. Recueillir par aspiration la couche éthéro-quinoléine surnageante, qui peut contenir l'érythrosine, l'éosine, la phloxine et la rhodamine B. Rechercher ces solorants selon 1.1.5., 1.1.7. et 1.1.9.
- 1.2.5. Après élimination de la couche éthéro-quinoléinique, additionner la solution aqueuse de 20 ml de solution tampon et de 10 ml de quinoléine. Agiter énergiquement le mélange puis centrifuger durant 5 minutes.
- Éliminer la phase aqueuse puis ajouter 30 ml d'éther et 1 ml d'eau. Agiter de nouveau puis centrifuger.
- Éliminer la couche éthéro-quinoléinique et traiter la solution aqueuse de colorant selon 1.1.6. et 1.1.9.
- 1.3. Mode opératoire applicable aux fruits confits et aux fruits au sirop.
- 1.3.1. Enlever le sucre superficiel des fruits avec un minimum d'eau. Chauffer ensuite les fruits au bain-marie avec de l'éthanol à 70 % vol. jusqu'à dissolution du colorant. Décanter le liquide et en chasser l'alcool par évaporation tout en réduisant le volume à 10 ml environ. Transférer cette solution dans un tube à centrifugation, à l'aide de 20 ml de solution tampon, ajouter 10 ml de quinoléine et traiter ensuite selon les directives données à partir de 1.1.3.
- 1.4. Mode opératoire applicable aux produits à base de viande.
- 1.4.1. Dégraisser 10 g de l'échantillon comme indiqué en 1.2.1.
- 1.4.2. Introduire dans un mortier la matière dégraissée, séchée et pulvérisée. Triturer avec 1,25 ml d'amberlite LA₂, ajouter 15 ml de quinoléine et triturer à nouveau. Ajouter 5 ml d'eau, triturer et laisser reposer durant 1 heure en triturant de temps à autre. Transvaser le mélange dans un tube à centrifugation, centrifuger durant 10 minutes à 1.200 tours/minute, décanter le liquide surnageant sur coton et recueillir le filtrat dans un autre tube à centrifugation. Ajouter 20 ml de solution tampon et agiter énergiquement.
- Centrifuger durant 10 minutes à 1.200 tours/minute, puis éliminer par aspiration la phase aqueuse surnageante. Si une émulsion s'est formée au niveau de la séparation des phases, éliminer celle-ci avec la phase aqueuse.
- Ajouter 20 ml d'eau, agiter à nouveau énergiquement, puis centrifuger. Éliminer aussi complètement que possible la phase aqueuse par aspiration. Filtrer la phase quinoléinique sur un papier-filtre sec ou sur coton hydrophile et recueillir le filtrat dans un autre tube à centrifugation.

- 1.4.3. Ajouter 30 ml d'éther diéthylique et 2 ml d'ammoniaque, agiter énergiquement et centrifuger. Recueillir la phase éthéro-quinoléinique sur-nageante pour la recherche éventuelle de colorants basiques selon 1.1.7.

Ajouter à la solution ammoniacale 20 ml de solution tampon et 10 ml de quinoléine. Agiter énergiquement, puis centrifuger. Eliminer la phase aqueuse, ajouter 30 ml d'éther diéthylique et 2 ml d'ammoniaque. Agiter à nouveau, puis centrifuger.

- 1.1.4. Eliminer la phase éthéro-quinoléinique et laver quatre fois la solution ammoniacale avec 5 ml d'éther diéthylique chaque fois. Poursuivre comme indiqué en 1.1.9.

2. Identification des colorants synthétiques solubles dans l'eau

Appliquer à la solution colorée, obtenue selon les indications données sous 1., la méthode de séparation par chromatographie sur papier.

Effectuer, en même temps que le chromatogramme du colorant isolé de l'échantillon, des chromatogrammes de colorants témoins sur la même feuille de papier chromatographique.

Comparer le comportement chromatographique de l'échantillon à celui des colorants témoins, dans trois phases mobiles appartenant à trois groupes parmi les quatre cités ci-dessous. Sauf indication contraire, utiliser la chromatographie ascendante.

Les phases mobiles sont à préparer extemporanément.

Groupe n° 1 :

- a) dissoudre 2 g de citrate de sodium dans 100 ml d'ammoniaque à 5 %;
- b) mélanger 20 volumes de solution aqueuse à 2,5 % de citrate de sodium et 1 volume de pyridine.

Groupe n° 2 :

- a) mélanger 50 ml de n. butanol, 10,5 ml d'éthanol 96 % vol., 21 ml d'eau, 1 ml d'ammoniaque à 25 %;
- b) mélanger 50 ml de n. butanol, 25 ml d'éthanol 96 % vol., 25 ml. d'eau, 10 ml d'ammoniaque à 25 % (chromatographie descendante; saturer préalablement la cuve pendant 24 h).

Groupe n° 3 :

- a) mélanger 50 ml de n. butanol, 26 ml d'éthanol 96 % vol., 24 ml d'eau;
- b) mélanger 40 ml de n. butanol, 40 ml d'eau, 20 ml de pyridine, 10 ml d'éthanol 96 % vol. (chromatographie descendante; saturer préalablement la cuve pendant 24 h).

Groupe n° 4 :

mélanger 50 ml de butanol tertiaire (2-méthylpropanol-2) et 50 ml de solution aqueuse contenant par litre 4 g de KCl et 240 ml d'acide propionique.

Dans le cas des colorants autorisés (à l'exception de l'Orange GGN et du Jaune Orangé S) un colorant et un témoin peuvent être considérés comme identiques si leur comportement chromatographique est le même avec au moins trois phases mobiles différentes.

L'identification de l'Orange GGN, du Jaune Orangé S et du Ponceau SX s'effectue selon 3.

3. Identification complémentaire de l'Orange GGN, du Jaune Orangé S et du Ponceau SX

Déposer sur la ligne de départ d'une feuille de papier chromatographique des taches du colorant dont on désire une identification complémentaire ainsi que du colorant témoin et éventuellement d'acides sulfanilique, naphthionique, méthanilique, 2,4-diméthyl-5-aminobenzène-sulfonique et 2,5-diaminobenzènesulfonique.

Sécher les taches à l'aide d'un courant d'air chaud. Déposer sur les taches sèches des colorants 5 microlitres d'un mélange de 2 ml de solution de $TiCl_3$ à 15 % et de 9 ml d'eau distillée. Sous l'influence de ce traitement, les taches seront le plus souvent décolorées. Si tel n'était pas le cas, répéter le traitement à l'aide de la solution diluée de $TiCl_3$ jusqu'à décoloration complète. Sécher de nouveau par un courant d'air chaud les taches ainsi traitées.

Développer en chromatographie descendante à 15-20° C à l'aide du milieu n. propanol (2 vol.) — ammoniacé à 25 % (1 vol.) durant au moins 16 h. Sécher ensuite le chromatogramme à l'air libre. Pulvériser ensuite le réactif à la p-diméthylaminobenzaldéhyde sur le chromatogramme.

Comparer les résultats obtenus pour le colorant à identifier avec ceux obtenus pour le colorant témoin et les acides sulfoniques éventuellement déposés sur le papier.

Le tableau ci-après donne les teintes, après vaporisation de p-diméthylaminobenzaldéhyde des produits de réaction provenant des colorants après réduction.

Reactie met p-dimethylaminobenzaldehyde reagens

Réaction avec le réactif à la p-diméthylaminobenzaldéhyde

E.F.G.- nummering — numérotation le la C.E.E.	Handelsnaam — Nom commercial	Index Colour 2e dr. — 2e éd.	Nftioon- zuur — Acide naphionique	Suljanil- zuur — Acide suljanilique	2,4-dimethyl- 5-aminoben- zeensulfonzuur — Acide 2,4-dimethyl- 5-aminobenzène- sulfonique	Metanil- zuur — Acide métanilique	2,5-diamino- benzen- sulfonzuur — Acide 2,5-diamino- benzènesul- fonique
			Gele vlek — Tache jaune	Gele vlek — Tache jaune	Gele vlek — Tache jaune	Gele vlek — Tache jaune	Rode vlek — Tache rouge
			Rf 0,65	Rf 0,55	Rf 0,70	Rf 0,60	Rf 0,43
—	Echtrood E Rouge solide E	16.045	+	—	—	—	—
E 122	Azorubine	14.720	+	—	—	—	—
E 123	Amarant Amarante	16.185	+	—	—	—	—
E 124	Cochenillerood A Rouge Cochenille A	16.255	+	—	—	—	—
E 126	Ponceau 6 R	16.290	+	—	—	—	—
E 105	Echtgeel Jaune solide	13.015	—	+	—	—	+
E 103	Chrysoïne S	14.270	—	+	—	—	—
E 110	Oranje-geel S Jaune orangé S	15.985	—	+	—	—	—
E 102	Tartrazine	19.140	—	+	—	—	—
E 151	Briljantzwart BN Noir Brillant BN	28.440	—	+	—	—	—
—	Ponceau SX	14.700	—	—	+	—	—
E 111	Oranje GGN Orange GGN	15.980	—	—	—	+	—

De Rf-waarden zijn gemiddelden verkregen met papier S en S 2043 bMgl.

Les Rf sont des valeurs moyennes obtenues en utilisant le papier S et S 2043 bMgl.