

**BESCHIKKING**  
**van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie**  
**inzake de toepassing van een Benelux-referentiemethode**  
**voor het opsporen en het identificeren van in levensmiddelen aanwezige,**  
**in water oplosbare, synthetische kleurstoffen**

**M (76) 10**

Het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie,

Gelet op artikel 1 van het Protocol van 29 april 1969, inzake de afschaffing van controles en formaliteiten aan de binnengrenzen van Benelux en inzake de opheffing van de belemmeringen van het vrije verkeer,

Gelet op de Aanbeveling van het Comité van Ministers van 23 september 1963 inzake de harmonisatie der wetgevingen betreffende kleurstoffen, welke kunnen worden gebruikt in voor menselijke voeding bestemde waren, M (63) 18,

Overwegende, dat geschillen, voortvloeiende uit het toepassen van verschillende analysemethoden of uit het gebruik van verschillende normen, dienen te worden vermeden,

Overwegende, dat het in het bijzonder voor de harmonisatie van het voedingsmiddelentoezicht vereist is dat gelijke of gelijkwaardige methoden worden toegepast, dezelfde termen worden gebezigd en gelijke of gelijkwaardige normen worden aangelegd,

Heeft het volgende beslist :

*Artikel 1*

1. De regeringen van de drie Beneluxlanden nemen de nodige maatregelen opdat de bepalingen van het aan deze beschikking gehechte reglement, als enige referentiemethode op 1 september 1976 worden aanvaard.
2. Uiterlijk 6 maanden na afloop van de in het eerste lid genoemde termijn brengt ieder der drie regeringen verslag uit aan het Comité van Ministers over de maatregelen die zijn getroffen ter uitvoering van onderhavige beschikking. Bij dit verslag zal de tekst van de nationale uitvoeringsmaatregelen worden gevoegd.

*Artikel 2*

De aanbeveling inzake de toepassing van een Benelux-referentiemethode voor het opsporen en het identificeren van in levensmiddelen aanwezige, in water oplosbare, synthetische kleurstoffen M (65) 4 en de aanbeveling tot aanvulling hiervan, M (66) 13, vervallen.

GEDAAN te Brussel, op 26 januari 1976.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

G. THORN

### BENELUX-REFERENTIEMETHODE

voor het opsporen en het identificeren van in levensmiddelen aanwezige,  
in water oplosbare synthetische kleurstoffen

M (76) 10, Bijlage

### LIJST VAN REAGENTIA

Bufferoplossing : pH = 3. Los in gedestilleerd water 2 g natriumacetaat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ), op. Voeg toe 25 ml ijsazijn en verdun tot 1 liter met gedestilleerd water.

Chinoline : kwaliteit purissimum. Indien de chinoline lichtgeel gekleurd is, stoot dit de bepaling niet.

Amberliet : LA<sub>2</sub> (BDH, ROHM en HAAS of gelijkwaardig)

Diëthyl-ether : peroxidevrij

Ammonia : 25 %, 10 %, 5 % gewichtsprocent NH<sub>3</sub>

IJsazijn p.a.

Zoutzuur : 1 n

Aceton p.a.

Celite

Chloroform p.a.

Referentiekleurstoffen

Ethanol : 96 vol. %, 70 vol. %

Petroleumether : kookpunt 40° — 60° C

Zeezand, gewassen met zoutzuur en gegloeid

Titaantrichloride-oplossing in water : 15 % (m/v)

p-Dimethylaminobenzaldehydereagens : los 1 g p-dimethylaminobenzaldehyde op in 30 ml 96 vol. % ethanol, voeg vervolgens toe 180 ml n. butanol en 30 ml 36 % zoutzuur.

n Butanol

Tertiair Butanol (2-methylpropanol-2)

n Propanol

Pyridine : kleurloos

Propionzuur

Natriumcitraat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_5 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ )

Kaliumchloride

1. Het isoleren van in water oplosbare organisch synthetische kleurstoffen m.b.v. chinoline

1.1. Werkwijze voor sterk suikerhoudende waren, alcoholische dranken, melkproducten.

1.1.1. Van vaste waren :

behandel een deel van de waar met 4 delen bufferoplossing en breng van dit mengsel 30 ml in een centrifugebuis, bij voorkeur met ingeslepen glazen stop, van een inhoud van ongeveer 50 ml (lang ongeveer 20 cm, uitwendige doorsnede ongeveer 2 cm).

1.1.2. Van vloeibare waren :

breng direct 10 ml van de waar in de centrifugebuis en voeg 20 ml bufferoplossing toe.

1.1.3. Breng vervolgens in de centrifugebuis 10 ml chinoline; schud de inhoud van de buis krachtig en centrifugeer gedurende vijf minuten met een snelheid van 1.200 omwentelingen per minuut. Verwijder de waterige oplossing zo goed mogelijk door opzuigen met een dun uitgetrokken buisje. Schud de chinoline vervolgens met 20 ml water, centrifugeer en zuig de bovenstaande waterlaag scherp af. Herhaal deze bewerking nog een keer. Indien de chinoline troebel is, wordt deze door een droog filter in een andere centrifugebuis gefiltreerd.

1.1.4. Voeg aan de in chinoline opgeloste kleurstof 30 ml ether en 1 ml water toe. Schud de buis vervolgens krachtig en centrifugeer. Onderzoek de ether-chinolinelaag volgens 1.1.5. en de waterlaag volgens 1.1.6. Bepaalde kleurstoffen, zoals nigrosine, vlokken bij het schudden van het ether-chinoline-mengsel met water uit en hechten zich aan het glas. Onderzoek in dat geval volgens 1.1.8.

1.1.5. Breng, indien de ether-chinolinelaag gekleurd blijft (het geen kan wijzen op de aanwezigheid van erytrosine, eosine, floxine, en/of bepaalde natuurlijke kleurstoffen) 2 ml ammonia 10 % in de buis en schud de inhoud van de buis krachtig. Verwijder na het centrifugeren de bovenstaande ether-chinolinelaag door afzuigen. Bewaar deze laag voor het onderzoek op basische kleurstoffen (onder welke rhodamine B) volgens 1.1.7.

De verdunning met ether verandert deze kleurstoffen in een kleurloze vorm die als zodanig in het ether-chinolinemengsel opgelost blijft. Indien in de te onderzoeken stof als rode kleurstof uitsluitend rhodamine B aanwezig is, levert de ontkleuring van de gekleurde chinoline, die bij de verdunning met ether ontstaat, een waardevolle aanwijzing voor de aanwezigheid van genoemde kleurstof.

Onderzoek de ammoniakale waterlaag volgens 1.1.9.

1.1.6. Schud, indien de waterlaag gekleurd is, deze enige malen met een weinig ether en verwijder de ether na goede scheiding der lagen. Onderzoek vervolgens de waterige kleurstofoplossing volgens 1.1.9.

- 1.1.7. Schud het bij de bewerking 1.1.5. verkregen ether-chinoline-mengsel met 10 ml zoutzuur 1 n uit. Een gekleurde zure waterige laag wijst op de aanwezigheid van basische kleurstoffen. Een rode kleur wijst op de aanwezigheid van rhodamine B. Centrifugeer en verwijder daarna de bovenstaande ether-chinolinelaag (scherp afzuigen). Schud de zoutzure waterige kleurstofoplossing met 2 ml chloroform en verwijder, na afscheiding der lagen, de waterige laag. Was de chloroformoplossing vervolgens 2 maal met 1 ml water en verwijder telkens de waterlaag. Onderzoek de kleurstofhoudende chloroform volgens 1.1.9.
- 1.1.8. Breng de afgescheiden kleurstof met ethanol 96 vol. % weer in oplossing. Onderzoek de alcoholische kleurstofoplossing volgens 1.1.9.
- 1.1.9. Damp, wanneer de verkregen gezuiverde kleurstofoplossing te zwak van kleur is, deze in een glazen indampschaaftje op het waterbad tot een kleiner volume (ongeveer 0,5 ml) in. Zuur de waterige oplossing, alvorens in te dampen, zwak aan met azijnzuur. Verricht de identificatie volgens 2.
- 1.2. Werkwijze voor sterk zetmeelhoudende waren, sterk eiwithoudende waren of eierdooier bevattende waren.
- 1.2.1. *Voor sterk vethoudende waren* : verwijder het vet als volgt. Breng in een mortier 10 g van het monster. Verwrijf dit met 3 g zeezand, 6 à 7 g celite en 30 à 40 ml aceton. Decanteer de bovenstaande vloeistof en filtreer door een vouwfilter. Neem het residu achtereenvolgens driemaal op met telkens 30 à 40 ml aceton, decanteer iedere keer de bovenstaande vloeistof en filtreer. Laat het ontvette residu drogen, eerst aan de buitenlucht en tenslotte 30 minuten in een droogstoof. Verpoeder het residu.
- 1.2.2. *Voor vetarme waren* : droog zonodig zonder voorafgaande ontvetting en verpoeder.
- 1.2.3. Breng in een mortier ongeveer 2 g van de droge, gepoederde waar en 15 ml chinoline, die vooraf met water is verzadigd. Extraheer de kleurstof zo goed mogelijk door de waar hiermede enige tijd aan te wrijven. Voeg 20 ml bufferoplossing toe en wrijf wederom enige tijd aan.
- Breng het geheel over in een centrifugebuis en schud de inhoud krachtig door. Centrifugeer gedurende 10 minuten bij 1200 omwentelingen per minuut en verwijder de bovenstaande waterige laag door afzuigen. Verwijder de eventueel tussen de water- en de chinolinelaag aanwezige emulsie, te gelijk met de waterlaag.
- Voeg 20 ml water toe, schud wederom krachtig en centrifugeer gedurende 10 minuten.
- Verwijder de waterlaag zo volledig mogelijk door afzuigen. Filtreer de chinoline door een droog filter in een andere centrifugebuis.

1.2.4. Voeg in deze buis 30 ml ether en 1 ml water toe, schud krachtig en centrifugeer. Verzamel door afzuigen de bovenstaande ether-chinoline-laag, die erytrosine, eosine, floxine en rhodamine B kan bevatten. Onderzoek op de aanwezigheid van deze kleurstoffen volgens 1.1.5., 1.1.7. en 1.1.9.

1.2.5. Voeg aan de waterige oplossing na verwijdering van de ether-chinoline-laag 20 ml bufferoplossing en 10 ml chinoline toe. Schud dit mengsel krachtig en centrifugeer gedurende 5 minuten.

Verwijder de waterlaag, voeg 30 ml ether en 1 ml water toe. Schud wederom en centrifugeer.

Verwijder de ether-chinolinelaag en onderzoek de waterige kleurstofoplossing volgens 1.1.6. en 1.1.9.

1.3. Werkwijze voor geconfijte vruchten of vruchten op sap (op siroop).

1.3.1. Verwijder de aan de buitenkant aanwezige suiker met zo weinig mogelijk water. Verwarm de vruchten daarna op het waterbad met ethanol 70 vol. % tot de kleurstof opgelost is. Giet de vloeistof af. Damp deze in tot de ethanol verwijderd is en het volume ongeveer 10 ml is. Breng de oplossing met 20 ml bufferoplossing over in een centrifugebuis, voeg 10 ml chinoline toe en handel verder zoals is aangegeven vanaf 1.1.3.

1.4. Werkwijze voor produkten op basis van vlees.

1.4.1. Ontvet 10 g van het monster op de wijze zoals aangegeven onder 1.2.1.

1.4.2. Breng in een mortier de ontvette, gedroogde en verpoederde waar. Wrijf met 1,25 ml amberlite LA<sub>2</sub> aan, voeg vervolgens 15 ml chinoline toe en wrijf opnieuw aan. Voeg vervolgens 5 ml water toe, wrijf aan en laat gedurende 1 uur staan onder af en toe aanwrijven. Brengt het mengsel over in een centrifugeerbuis, centrifugeer gedurende 10 minuten bij 1200 omwentelingen/ minuut, decanteer de bovenstaande vloeistof op watte en verzamel het filtraat in een andere centrifugeerbuis. Voeg 20 ml buffer-oplossing toe en schud krachtig.

Centrifugeer gedurende 10 minuten bij 1200 omwentelingen/minuut en verwijder de bovenstaande waterige laag door afzuigen. Verwijder de eventueel op de afscheiding tussen de lagen aanwezige emulsie tegelijk met de waterlaag.

Voeg 20 ml water toe, schud wederom krachtig en centrifugeer. Verwijder de waterlaag zo volledig mogelijk door afzuigen. Filtreer de chinoline-laag door een droog papierfilter of door ontvette watten en verzamel het filtraat in een andere centrifugebuis.

1.4.3. Voeg toe 30 ml diethylether en 2 ml ammonia, schud krachtig en centrifugeer. Verzamel de bovenstaande ether-chinolinelaag voor een eventueel onderzoek van basische kleurstoffen volgens 1.1.7.

Voeg aan de ammoniakale oplossing 20 ml bufferoplossing en 10 ml chinoline toe. Schud dit mengsel krachtig en centrifugeer. Verwijder de waterlaag, voeg 30 ml diethylether en 2 ml ammonia toe. Schud wederom en centrifugeer.

1.4.4. Verwijder de ether-chinolinelaag en was de ammoniakale oplossing 4 keer telkens met 5 ml diethylether alvorens verder te gaan volgens 1.1.9.

## 2. De identificatie van in water oplosbare organisch synthetische kleurstoffen

Onderzoek de kleurstofoplossing, verkregen zoals aangegeven onder 1., met behulp van papierchromatografie.

Maak, gelijktijdig met het chromatogram van de uit het monster geïsoleerde kleurstof, chromatogrammen van bekende kleurstoffen op hetzelfde vel chromatografiepapier.

Vergelijk het chromatografisch gedrag met dat van de authentieke kleurstoffen met behulp van drie loopvloeistoffen behorende tot drie van de hierna vermelde vier groepen. Pas, tenzij anders aangegeven, stijgende chromatografie toe.

De loopvloeistoffen moeten vers bereid worden.

### Groep nr 1 :

- a) los 2 g natriumcitraat op in 100 ml 5 %-ige ammonia
- b) meng 20 volumedelen 2,5 % waterige oplossing van natriumcitraat met 1 volumedeel. pyridine.

### Groep nr 2 :

- a) meng 50 ml n. butanol, 10,5 ml ethanol 96 vol. %, 21 ml water en 1 ml 25 %-ige ammonia
- b) meng 50 ml n. butanol, 25 ml ethanol 96 vol. %, 25 ml water en 10 ml 25 %-ige ammonia (dalende chromatografie; verzadig het vat vooraf gedurende 24 u.).

### Groep nr 3 :

- a) meng 50 ml n. butanol, 26 ml ethanol 96 vol. %, en ml water
- b) meng 40 ml n. butanol, 40 ml water, 20 ml pyridine, 10 ml ethanol 96 vol. % (dalende chromatografie; verzadig het vat vooraf gedurende 24 u.).

### Groep nr 4 :

meng 50 ml tertiair butanol (2-methylpropanol-2) en 50 ml waterige oplossing, bevattende 4 g KCl en 240 ml propionzuur per liter.

In geval van toegelaten kleurstoffen (met uitzondering van Oranje GGN en Oranje-geel S) kunnen de kleurstof en de authentieke kleurstof als identiek worden beschouwd, indien zij bij het chromatografisch onderzoek met tenminste drie verschillende loopvloeistoffen zich volkomen gelijk gedragen.

Identificatie van Orange GGN, Oranje-geel S en Ponceau SX vindt plaats volgens 3.

### 3. Naderere identificatie van Oranje GGN, Oranje-geel S en Ponceau SX

Breng op de startlijn van een vel chromatografiepapier vlekken aan van de nader te identificeren kleurstof, alsmede van de authentieke kleurstof, eventueel naast sulfanilzuur, naftioonzuur, metanilzuur, 2,4-dimethyl-5-aminobenzeensulfonzuur en 2,5-diaminobenzeensulfonzuur.

Droog de kleurstofvlekken met behulp van een warme luchtstroom. Breng op de gedroogde kleurstofvlekken aan 5 microliter van een mengsel van 2 ml 15 %  $TiCl_3$ -oplossing en 9 ml gedestilleerd water. Hierdoor zullen de gekleurde vlekken veelal ontkleuren. Mocht dit niet het geval zijn, herhaal dan de behandeling met de verdunde  $TiCl_3$ -oplossing tot volledige ontkleuring is verkregen. Droog vervolgens de behandelde vlekken weer met een warme luchtstroom.

Chromatografeer dalend bij 15-20° C met behulp van de loopvloeistof n. propanol (2 vol.)—25 % ammoniak (1 vol.) gedurende ten minste 16 u. Droog hierna het chromatogram aan de lucht. Besproei het chromatogram vervolgens met het p-dimethylaminobenzaldehydereagens.

Vergelijk de verkregen resultaten van de te onderzoeken kleurstof met die van de authentieke kleurstof en de eventueel op het papier aangebrachte sulfonzuren.

De hiernavolgende tabel geeft de kleuren na het besproeien met p-dimethylaminobenzaldehyde aan van de reactieproducten zoals deze zijn ontstaan uit de kleurstoffen na reductie.

## Reactie met p-dimethylaminobenzaldehyde reagens

## Réaction avec le réactif à la p-diméthylaminobenzaldéhyde

E.E.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.