

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 liposolubles présents dans les denrées alimentaires
M (76) 11

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu l'article 1er du Protocole du 29 avril 1969 relatif à la suppression des entraves 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 liposolubles présents dans les denrées alimentaires, M (66) 14, est abrogée.

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 liposolubles
présents dans les denrées alimentaires
M (76) 11, Annexe

Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité « pour analyse » dans la mesure où aucune autre indication n'est donnée.

Sable marin, lavé à l'acide chlorhydrique et **calciné**.

Ethanol à 96 % (v/v).

Ether de pétrole, éb. 40°-60° C.

Oxyde d'aluminium basique (Woelm ou équivalent) activé durant 1 h à 400° C immédiatement avant l'emploi.

Benzène/acétone : 9 : 1 (v/v)

Mesurer 225 ml de benzène et 25 ml d'acétone à l'aide d'une éprouvette et mélanger.

Mélange d'éther de pétrole et d'acétone : 98/2 en vol.

Mesurer exactement, à l'aide d'une éprouvette graduée de forme étroite, 98 ml d'éther de pétrole, ajouter à l'aide d'une pipette à un **trait** 2 ml d'acétone, mélanger.

Mélange d'éther de pétrole et d'acétone : 1/1 en vol.

Mesurer 25 ml d'éther de pétrole et 25 ml d'acétone, à l'aide d'une éprouvette graduée, mélanger.

Mélange d'acétone et d'éthanol : 4/1 en vol. Mesurer 40 ml d'acétone et 10 ml d'éthanol, à l'aide d'une éprouvette graduée, mélanger.

Ammoniaque à 25 % en poids de NH_3 , d : 0,91.

Mélange d'éthanol et d'ammoniaque : 2/1 en vol. Mesurer 40 ml d'éthanol et 20 ml d'ammoniaque, à l'aide d'une éprouvette graduée, mélanger.

Solution d'hydroxyde de potassium éthanolique, 0,5 N.

Peser 14 g d'hydroxyde de potassium, dissoudre dans 500 ml d'éthanol. Conserver à l'obscurité.

Ether diéthylique, exempt de peroxydes.

Sulfate de magnésium, anhydre.

Acide sulfurique 8 n.

Colorants de référence.

Solutions éthanoliques ou chloroformiques à 0,5 % des colorants de référence. Dissoudre 50 mg de chaque colorant de référence dans 10 ml de méthanol. Pour le carotène, dissoudre dans le chloroforme.

Mélange d'hexane-n et d'acétate d'éthyle : 9/1 en vol.

Réactifs de Carr-Price.

Peser 25 g de trichlorure d'antimoine dans un flacon conique à bouchon rodé et dissoudre dans 75 ml de chloroforme.

Plaques pour chromatographie sur couche mince :

200 x 200 mm, recouvertes d'une couche de gel de silice G.

Peser 30 g de gel de silice G dans un flacon conique de 300 ml, muni d'un bouchon rodé. Ajouter 60 ml d'eau distillée, boucher le flacon et homogénéiser le contenu durant 1 minute (en agitant). Etendre la suspension, à l'aide d'un appareil d'étalement, sur 5 plaques de manière à obtenir une couche de 0,25 mm d'épaisseur (à l'état humide). Laisser sécher les plaques à l'air pendant 1/2 heure et les conserver pendant une nuit dans une étuve à 60° C jusqu'au moment de l'emploi.

1. Mode opératoire

1.1. *Isolement des matières grasses présentes dans les denrées alimentaires*

1.1.1. Introduire 25 g environ de sable marin dans un *pèse-filtre*, y placer une baguette de verre appropriée, peser le *pèse-filtre* et son contenu.

1.1.2. Peser 5 à 10 g de l'échantillon dans le *pèse-filtre*, ajouter 5 à 10 ml d'éthanol, agiter, puis placer le mélange durant une nuit dans l'étuve.

1.1.3. Transférer le contenu du *pèse-filtre* sur un papier-filtre, fermer celui-ci en le pliant et l'introduire dans une cartouche de l'appareil de Soxhlet.

1.1.4. Extraire les matières grasses au bain d'eau, à l'aide d'éther de pétrole, pendant 4 heures.

1.1.5. Lorsque l'extraction est terminée, évaporer l'éther de pétrole au bain d'eau.

1.2. *Isolement des colorants présents dans les huiles ou les matières grasses*

1.2.1. Dissoudre 0,5 g du résidu obtenu en 1.1.5. ou 0,5 g d'huile ou de graisse à examiner dans 10 ml d'éther de pétrole, introduire la solution dans un bécher.

1.2.2. Introduire dans le tube pour chromatographie un tampon de coton, enfoncer celui-ci jusqu'au-dessus du robinet. Remplir le tube d'une suspension d'oxyde d'aluminium dans le benzène, de manière à obtenir une colonne de 10 cm de hauteur.

1.2.3. Laisser couler le benzène, en veillant à ce que la colonne ne soit pas mise à sec. Eliminer le benzène en rinçant la colonne par 50 ml d'éther de pétrole.

1.2.4. Verser sur la colonne la solution obtenue en 1.2.1. Régler la vitesse d'écoulement à 1 ml environ par minute.

1.2.5. Rincer ensuite la colonne par 100 ml d'éther de pétrole. Eviter de mettre la colonne à sec. Eliminer l'éluat.

- 1.2.6. *Eluer les carotènes* par 50 ml du mélange d'éther de pétrole/acétone 98/2. Recueillir l'éluat dans un ballon à fond rond de 100 ml. Evaporer à sec sous vide, à l'aide de l'évaporateur rotatif ou d'un courant d'azote au bain d'eau. Reprendre le résidu par 1 ml d'éther diéthylique et procéder à l'identification comme indiqué en 2. Eviter de mettre la colonne à sec.
- 1.2.7. *Eluer les colorants aminoazoïques* par 50 ml du mélange éther de pétrole/acétone 1/1. Recueillir l'éluat dans un ballon à fond rond de 100 ml. Evaporer à sec sous vide, à l'aide de l'évaporateur rotatif ou d'un courant d'azote, au bain d'eau. Reprendre le résidu par 1 ml d'éther diéthylique et procéder à l'identification comme indiqué en 5.2. Eviter de mettre la colonne à sec.
- 1.2.8. *Eluer les colorants hydroxyazoïques* par 50 ml du mélange acétone/éthanol. Recueillir l'éluat dans un ballon à fond rond de 100 ml. Evaporer à sec sous vide, à l'aide de l'évaporateur rotatif ou d'un courant d'azote, au bain d'eau. Reprendre le résidu par 1 ml d'éther diéthylique et procéder à l'identification comme indiqué en 2. Eviter de mettre la colonne à sec.
- 1.2.9. *Eluer la bixine et les colorants hydroxyazoïques*, subsistant éventuellement dans la colonne, par 50 ml du mélange éthanol/ammoniaque. Recueillir l'éluat dans un ballon à fond rond de 100 ml. Evaporer à sec sous vide, à l'aide de l'évaporateur rotatif ou d'un courant d'azote au bain d'eau. Reprendre le résidu par 1 ml d'éther diéthylique et procéder à l'identification comme indiqué en 2.
Le virage de la colonne d'oxyde d'aluminium au rouge violet après l'addition du mélange éthanol/ammoniaque indique la présence de *curcumine* dans l'échantillon.
- 1.2.10. La présence d'huile ou de graisse résiduelle dans les fractions 1.2.6., 1.2.7., 1.2.8., ou 1.2.9. peut entraver l'identification par chromatographie sur couche mince (2). Dans ce cas, il est recommandé de saponifier les lipides présents comme indiqué ci-après.
- 1.2.11. Ajouter aux résidus obtenus en 1.2.6., 1.2.7., 1.2.8., et 1.2.9., 50 ml de *solution d'hydroxyde de potassium* éthanolique et quelques fragments de pierre ponce. Faire bouillir pendant 45 minutes sous *réfrigérant à reflux*. Refroidir et transférer les solutions à l'aide de 100 ml d'eau dans des ampoules à décanter.
- 1.2.12. Extraire prudemment les phases aqueuses obtenues en 1.2.11., pour autant qu'elles ne concernent pas la bixine, par une fois 50 ml et deux fois 25 ml d'éther diéthylique. Laver ensuite à trois reprises les extraits étherés réunis par 25 ml d'eau chaque fois.
- 1.2.13. Acidifier la phase aqueuse obtenue en 1.2.11. pour autant qu'elle concerne la bixine, par de l'acide sulfurique; extraire ensuite par une fois 50 ml et deux fois 25 ml d'éther diéthylique. Laver à trois reprises les extraits étherés réunis par 25 ml d'eau chaque fois.

1.2.14. Sécher la phase étherée avec du sulfate de magnésium. Evaporer à sec sous vide, à l'aide de l'évaporateur rotatif ou d'un courant d'azote au bain d'eau. Reprendre le résidu par 1 ml d'éther diéthylique et procéder à l'identification comme indiqué en 2.

2. Identification par chromatographie sur couche mince

- 2.1. Déposer 4 microlitres ou, le cas échéant, un volume plus important de chacune des solutions obtenues en 1.2.6., 1.2.7., 1.2.8., 1.2.9. et 1.2.14., à l'aide d'une pipette microcapillaire, le long d'une ligne imaginaire distante de 2,5 cm du bord de la plaque. Espacer les taches de 2 cm. Déposer de la même façon 2 microlitres des solutions des colorants de référence.
- 2.2. Développer la plaque avec le benzène/acétone (9 : 1) dans une cuve saturée de vapeurs de ce *solvant*. Laisser *migrer* sur une distance de 17 cm. On peut faciliter la séparation des différents colorants en laissant sécher la plaque à l'air après le développement et en développant à nouveau avec le benzène/acétone. Dans certains cas, il est utile de répéter cette opération.
- 2.3. Pour séparer le soudan I du soudan II, développer avec le mélange n-hexane-acétate d'éthyle.
- 2.4. Examiner la plaque et identifier les colorants en comparant les valeurs Rf des taches des extraits à celles des solutions de référence.
- 2.5. Après examen, vaporiser la plaque dans la cuve à l'aide du réactif de Carr-Price jusqu'à ce que la plaque soit apparemment humide. Une tache bleue provenant de la fraction 1.2.9. indique la présence de bixine. Chauffer la plaque durant 10 minutes à 100° C. La tache bleue vire au rouge-brun.

3. Observations

- 3.1. La bixine est transformée par saponification en norbixine. Si la fraction obtenue en 1.2.9. a été saponifiée, il faut en tenir compte lors de l'examen chromatographique, c'est-à-dire lors de la comparaison des valeurs Rf des taches avec celles des témoins. Pour cette raison, il est utile de préparer une solution de référence de norbixine.
- 3.2. Les caroténoïdes étant susceptibles de s'oxyder, il est nécessaire de porter les fractions qui les concernent le plus rapidement possible sur la plaque chromatographique, de préférence, sous un courant d'anhydride carbonique ou d'azote.

3.3. In het loopvloeistofsysteem benzeen/aceton = 9:1 en in de silicagel dunnelaagplaten kunnen de volgende hRf-waarden worden verwacht :

Standaard	hR _f -waarde
α -bixine	8
curcumine	21
canthaxanthine	53
Soedan I	67
Soedan II	69
β -8'-apocarotenal	69
ethylesters van β -8'-apocaroteenzuur	75
β -caroteen	83

3.3. En appliquant le mode opératoire selon 2, les hRf suivants sont à prévoir :

Référence	valeur hR _f
α -bixine	8
curcumine	21
canthaxanthine	53
Soudan I	67
Soudan II	69
β -8'-apocaroténal	69
esters éthyliques de β -8'-acide apocaroténal	75
β -carotène	83