

**BESCHIKKING**  
**van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie**  
**inzake de toepassing van een Benelux-referentie-methode**  
**voor het opsporen en het identificeren**  
**van in levensmiddelen aanwezig, in vet oplosbare**  
**synthetische kleurstoffen**  
**M (76) 11**

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 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 Benelux-landen 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 vet oplosbare kleurstoffen, M (66) 14, vervalt.

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 vet oplosbare synthetische kleurstoffen**  
**M (76) 11, Bijlage**

**Lijst van reagentia**

Alle reagentia moeten van « pro analyse » kwaliteit zijn, voor zover niet anders is aangegeven.

Zeezand, met zoutzuur gewassen en **gegloeid**.

Ethanol, 96 % (v/v).

Petroleumether, kookpunt 40° - 60° C.

Basisch aluminiumoxide (Woelm of gelijkwaardig), onmiddellijk vóór het gebruik geactiveerd gedurende 1 uur bij 400° C.

Benzeen/aceton : 9 : 1 (v/v)

Meet 225 ml benzeen en 25 ml aceton af m.b.v. een maatcilinder en meng.

Mengsel van petroleumether en aceton : 98/2 (v/v).

Meet nauwkeurig met behulp van een smalle maatcilinder 98 ml petroleumether af, voeg hieraan met behulp van een volpipet 2 ml aceton toe en meng.

Mengsel van petroleumether en aceton : 98/2 (v/v).

Meet 25 ml petroleumether en 25 ml aceton af met behulp van een maatcilinder en meng.

Mengsel van aceton en ethanol : 4/1 (v/v).

Meet 40 ml aceton en 10 ml ethanol af met behulp van een maatcilinder en meng.

Ammonia, 25 gew. %  $\text{NH}_3$ ,  $d = 0,91$ .

Mengsel van ethanol en ammonia : 2/1 (v/v).

Meet 40 ml ethanol en 20 ml ammonia af met behulp van een maatcilinder en meng.

Ethanolische kaliumhydroxide-oplossing, 0,5 n.

Weeg 14 g kaliumhydroxide af, los dit op in 500 ml ethanol. Bewaar in het donker.

Diëthylether, peroxidevrij.

Magnesiumsulfaat, watervrij.

Zwavelzuur, 8 n.

Referentie-kleurstoffen.

Ethanolische of chloroform-oplossingen van 0,5 % van de referentie-kleurstoffen. Los 50 mg van iedere referentie-kleurstof op in 13 ml ethanol.

Los caroteen op in chloroform.

Mengsel van n-hexaan en ethylacetaat : 9/1 (v/v).

Reagens volgens Carr en Price.

Weeg 25 g antimoontrichloride af in een konische kolf met ingeslepen stop en los het op in 75 ml chloroform.

Platen voor dunnelaagchromatografie :

200 x 200 mm bedekt met een laag silicagel G.

Weeg 30 g silicagel G af in een konische kolf van 300 ml, voorzien van een geslepen stop. Voeg hier 60 ml gedestilleerd water aan toe, sluit de kolf af en homogeniseer de inhoud gedurende 1 minuut (door te schudden). Smeer de suspensie uit met behulp van een uitsmeerapparaat, over 5 platen, zodat een laag van 0,25 mm dikte (in vochtige staat) wordt verkregen. Laat de platen gedurende een half uur in de lucht drogen en plaats deze platen gedurende één nacht in een stoof van 60° C totdat zij worden gebruikt.

## 1. Werkwijze

### 1.1. *Het isoleren van de in levensmiddelen aanwezige vetten*

1.1.1. Breng ongeveer 25 g zeezand in een weegflesje, plaats er een passend glazen staafje in en weeg flesje met inhoud.

1.1.2. Weeg 5 à 10 g van het monster af in het weegflesje, voeg er 5 à 10 ml ethanol bij, schud en plaats het mengsel gedurende één nacht in een droogstoof.

1.1.3. Breng de inhoud van het weegflesje over op een papieren filter, vouw het filter dicht en breng het in een huls van een Soxhlet-apparaat.

1.1.4. Extraheer het vet op een waterbad met behulp van petroleumether gedurende 4 uur.

1.1.5. Nadat de extractie is voltooid wordt de petroleumether afgedampt op een waterbad.

### 1.2. *Het isoleren van de in oliën of vetten aanwezige kleurstoffen*

1.2.1. Los 0,5 g van het in 1.1.5. verkregen residu of 0,5 g van de te onderzoeken olie of het vet op in 10 ml petroleumether. Breng de oplossing over in een bekeerglas.

1.2.2. Breng in een chromatografiebuis een prop watten, duw deze verder tot juist boven de kraan. Vul de buis met een aluminiumoxide-suspensie in benzeen, zodat een kolom met een hoogte van 10 cm wordt verkregen.

1.2.3. Laat de benzeen uitstromen, doch let er op, dat de kolom niet droog komt te staan. Verwijder de benzeen door de kolom te spoelen met 50 ml petroleumether.

1.2.4. Breng de volgens 1.2.1. verkregen oplossing op de kolom. Regel de uitstroomsnelheid uit de kolom op ongeveer 1 ml per minuut.

1.2.5. Was de kolom tenslotte uit met 100 ml petroleumether let er op, dat de kolom niet droog komt te staan. Verwijder het eluaat.

- 1.2.6. Elueer de *carotenen* met 50 ml van het mengsel petroleumether/aceton 98/2. Vang het eluaat op in een rondbodempkolf van 100 ml. Damp tot droog in onder vacuum met behulp van een roterende verdamper of onder een stikstofstroom op een waterbad. Neem het residu op in 1 ml diëthylether en ga verder met de identificatie zoals onder 2. is aangegeven. Let er op, dat de kolom niet droog komt te staan.
- 1.2.7. Elueer de *amino-azo kleurstoffen* met 50 ml van het mengsel petroleumether/aceton 1/1. Vang het eluaat op in een rondbodempkolf van 100 ml. Damp tot droog in onder vacuum met behulp van een roterende verdamper of onder een stikstofstroom op een waterbad. Neem het residu op in 1 ml diëthylether en ga verder met de identificatie zoals onder 2. is aangegeven. Let er op, dat de kolom niet droog komt te staan.
- 1.2.8. Elueer de *hydroxy-azo kleurstoffen* met 50 ml van het mengsel aceton/ethanol. Vang het eluaat op in een rondbodempkolf van 100 ml. Damp tot droog in onder vacuum met behulp van een roterende verdamper of onder een stikstofstroom op een waterbad. Neem het residu op in 1 ml diëthylether en ga verder met de identificatie zoals onder 2. is aangegeven. Let er op, dat de kolom niet droog komt te staan.
- 1.2.9. Elueer de *bixine* en de zich nog eventueel in de kolom bevindende hydroxy-azo kleurstoffen met 50 ml van het mengsel ethanol/ammonia. Vang het eluaat op in een rondbodempkolf van 100 ml. Damp tot droog in onder vacuum met behulp van een roterende verdamper of onder een stikstofstroom op een waterbad. Neem het residu op in 1 ml diëthylether en ga verder met de identificatie zoals onder 2. is aangegeven. Een roodviolette verkleuring van de aluminiumoxide-kolom na de toevoeging van het mengsel ethanol/ammonia, duidt op de aanwezigheid van *curcumine* in het monster.
- 1.2.10. De aanwezigheid van resten olie of vet in de fracties 1.2.6., 1.2.7., 1.2.8. of 1.2.9. kan de identificatie met behulp van een dunnelaag chromatografie (2.) bemoeilijken. In dit geval wordt aanbevolen de aanwezige vette te verzeppen zoals hieronder is aangegeven.
- 1.2.11. Voeg bij de in 1.2.6., 1.2.7., 1.2.8. en 1.2.9. verkregen residuen 50 ml ethanolische kaliumhydroxyde-oplossing en enige kooksteentjes. Laat 45 minuten koken aan een terugvloeiakoeler. Koel af en breng de oplossingen met behulp van 100 ml water over in scheidtrechters.
- 1.2.12. Schud voorzichtig de in 1.2.11. verkregen waterige fasen, voor zover het niet bixine betreft, met één keer 50 ml en twee keer 25 ml diëthylether. Wat daarna de verenigde ether-extracten drie keer telkens met 25 ml water.
- 1.2.13. Zuur de in 1.2.11. verkregen waterige fase, voor zover het bixine betreft, aan met zwavelzuur; schud deze daarna uit één keer met 50 ml en twee keer met 25 ml diëthylether. Was de verenigde ether-extracten drie keer telkens met 25 ml water.

1.2.14. Droog de etherische fase met behulp van magnesiumsulfaat. Damp tot droog in onder vacuum met behulp van een roterende verdampers of onder een stikstofstroom op een waterbad. Neem het residu op in 1 ml diëthylether en ga verder met de identificatie zoals onder 2. is aangegeven.

## 2. De identificatie met behulp van dunnelaag chromatografie

2.1. Breng 4 microliter of zo nodig een groter volume van elke in 1.2.6., 1.2.7., 1.2.8., 1.2.9. en 1.2.14. verkregen oplossing aan met behulp van een microcapillair pipet langs een denkbeeldige lijn op 2,5 cm van de rand van de plaat. Houd een afstand van 2 cm tussen de vlekken. Breng op dezelfde wijze 2 microliter aan van de oplossingen van de referentiekleurstoffen.

2.2. Ontwikkel de plaat in benzeen/aceton (9 : 1) in een bak, welke verzadigd is met de damp van deze loopvloeistof. Laat over een afstand van 17 cm lopen. De scheiding van de verschillende kleurstoffen kan vergemakkelijkt worden door de plaat na de ontwikkeling aan de lucht te laten drogen en vervolgens opnieuw te ontwikkelen met benzeen/aceton. In sommige gevallen is het nuttig deze werkwijze te herhalen.

2.3. Ontwikkel met het mengsel n-hexaan/ethylacetaat om soedan I van soedan II te scheiden.

2.4. Bekijk de plaat en identificeer de kleurstoffen door de Rf-waarden van de vlekken van de extracten te vergelijken met die van de referentieoplossingen.

2.5. Bespuit de plaat na de beoordeling met het reagens volgens Carr en Price totdat de plaat juist vochtig is. Een blauwe vlek afkomstig van fractie 1.2.9. duidt op de aanwezigheid van bixine. Verwarm de plaat gedurende 10 minuten bij 100° C. De blauwe vlek verkleurt tot roodbruin.

## 3. Opmerkingen.

3.1. De bixine is door de verzeeping in norbixine omgezet. Als de in 1.2.9. verkregen fractie verzeept is, dient hiermee bij het beoordelen van de plaat rekening te worden gehouden, d.w.z. bij het vergelijken van de Rf-waarden van de vlekken met die van de referentiestoffen. Daarom is het nuttig een referentieoplossing van norbixine te maken.

3.2. Daar de carotenoiden gemakkelijk oxyderen, moeten de betreffende fracties zo snel mogelijk op de chromatografieplaat worden aangebracht, bij voorkeur onder een koolzuur- of stikstofstroom.

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

Standaard	hR <sub>f</sub> -waarde
$\alpha$ -bixine	8
curcumine	21
canthaxanthine	53
Soedan I	67
Soedan II	69
$\beta$ -8'-apocarotenal	69
ethylesters van $\beta$ -8'-apocaroteenzuur	75
$\beta$ -caroteen	83

\*\*\*

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

Référence	valeur hR <sub>f</sub>
$\alpha$ -bixine	8
curcumine	21
canthaxanthine	53
Soudan I	67
Soudan II	69
$\beta$ -8'-apocaroténal	69
esters éthyliques de $\beta$ -8'-acide apocaroténal	75
$\beta$ -carotène	83