

RECOMMANDATION
DU COMITE DE MINISTRES DE L'UNION
ECONOMIQUE BENELUX RELATIVE
A L'APPLICATION D'UNE METHODE
DE REFERENCE BENELUX POUR LA
RECHERCHE ET L'IDENTIFICATION
DES COLORANTS SYNTHETIQUES,
SOLUBLES DANS L'EAU, PRESENTS
DANS LES DENREES ALIMENTAIRES
(M (65) 4)

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu les articles 3, 6 et 7 du Traité d'Union,

Vu l'article 9 de la Convention transitoire,

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,

Recommande :

Article unique

Les Gouvernements des trois pays du Benelux sont invités à introduire, avant le 18 avril 1965,

dans leurs législations, comme seule méthode de référence valable, la méthode d'analyse ci-annexée relative à la recherche et l'identification des colorants synthétiques, solubles dans l'eau, présents dans les denrées alimentaires.

Fait à Bruxelles, le 31 mars 1965.

Le Président du Comité de Ministres,

(s.) FAYAT

METHODE DE REFERENCE BENELUX
POUR LA RECHERCHE ET
L'IDENTIFICATION DES COLORANTS
SYNTHETIQUES, SOLUBLES DANS L'EAU,
PRESENTS DANS LES DENREES
ALIMENTAIRES
(M (65) 4 Bijlage)

LISTE DES REACTIFS

Solution tampon : pH = 3. Dissoudre dans l'eau distillée 2 g d'acétate de sodium (CH_3COONa 3 H_2O), 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.

Ether

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

Acide chlorhydrique : 1 n

Chloroforme

Ethanol : 96 % vol., 70 % vol.

Ether de pétrole : P.E. 40°-60° C

Solution aqueuse de trichlorure de titane : 15 %

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 chimiquement pur

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

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 1200 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 à la solution du colorant 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 éthéro-quinoléinique. 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.

- 1.1.6. Si la solution aqueuse est colorée l'agiter à quelques reprises avec un peu d'éther et éliminer l'éther après parfaite séparation des phases. Examiner ensuite la solution aqueuse de colorants 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 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 matières protéiques ou contenant des jaunes d'œufs.*

1.2.1. Dans le cas des denrées riches en matières grasses : dégraisser d'abord par extraction à l'éther de pétrole, après dessiccation

éventuelle. Chasser ensuite les restes d'éther de pétrole par séchage. Pulvériser finement au mortier ou au moulin la masse ainsi dégraissée et séchée.

- 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 1200 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-quinoléinique surnageante, qui peut contenir l'érythrosine, l'éosine, la phloxine et la rhodamine B. Rechercher ces colorants 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.

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 tertiaire dans 100 ml d'ammoniaque à 5 %
- b) mélanger 20 volumes de solution aqueuse à 2,5 % de citrate de sodium tertiaire 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 chroma-

tographique 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, métanilique, 2,4-diméthyl-5-aminobenzènesulfonique 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.) — ammoniacale 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, à titre indicatif, les réactions présentées par les produits de réduction de différents colorants.

Réaction avec le réactif à la p-diméthylaminobenzaldéhyde

Numérotation de la C.E.E.	Nom commercial	Index Colour 2 ^e éd.	Acide naphtionique	Acide sulfanilique	Acide 2,4-diméthyl-5- aminobenzène sulfonique	Acide méthanilique	Acide 2,5-diamino- benzènesul- fonique
			Tache jaune	Tache jaune	Tache jaune	Tache jaune	Tache rouge
			Rf 0,65	Rf 0,55	Rf 0,70	Rf 0,60	Rf 0,43
—	Rouge solide E	16.045	+	—	—	—	—
E 122	Azorubine	14.720	+	—	—	—	—
E 123	Amarante	16.185	+	—	—	—	—
E 124	Rouge Cochenille A	16.255	+	—	—	—	—
E 126	Ponceau 6 R	16.290	+	—	—	—	—
E 105	Jaune solide	13.015	—	+	—	—	+
E 103	Chrysoïne S	14.270	—	+	—	—	—
E 110	Jaune orangé S	15.985	—	+	—	—	—
E 102	Tartrazine	19.140	—	+	—	—	—
E 151	Noir Brillant BN	28.440	—	+	—	—	—
—	Ponceau SX	14.700	—	—	+	—	—
E 111	Orange GGN	15.980	—	—	—	+	—

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

Benelux, 10^{me} supplément