

**Méthode de référence Benelux pour la recherche
et l'identification des colorants liposolubles
présents dans les denrées alimentaires**

M (66) 14 Annexe,

LISTE DES REACTIFS

Oxyde d'aluminium, Brockmann, activé pendant une heure
à 400°C

Solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, environ 0,5 n

Sulfate de magnésium anhydre

Ether exempt de peroxyde

Ethanol : 96 % vol.

Ether de pétrole : P.E. 40° - 60°C

Chloroforme

Diméthylformamide (DMF)

Ether de pétrole-acétone :

— mélange de 98 vol. d'éther de pétrole et 2 vol. d'acétone

Ethanol chlorhydrique :

— mélange de 9 vol. d'éthanol et 1 vol. d'acide chlorhydrique
36 %

Ethanol ammoniacal :

— mélange de 2 vol. d'éthanol et 1 vol. d'ammoniaque 25 % en
poids de NH₃

Chromatographie en couche mince :

— plaque recouverte d'une épaisseur de 250 de kieselgel G

— mélange de 9 vol. de benzène et 1 vol. d'acétone

1. Isolement :

- 1.1. Dissoudre 5 g de graisse ou d'huile dans 50 ml d'éther
de pétrole. Agiter la solution une fois avec 10 ml, puis
deux fois avec 5 ml de DMF. Rassembler les couches
de DMF et les agiter soigneusement à quatre reprises,

avec de l'éther de pétrole pour éliminer autant que possible la graisse et les dernières traces de carotènes.

Réunir toutes les solutions d'éther de pétrole et, si elles sont colorées, les traiter selon 1.3 (le B-apocarotinal se répartit entre les deux solvants).

- 1.2. Diluer la couche de DMF à l'aide d'un volume égal d'eau. Laver très prudemment cette solution, le plus souvent un peu trouble, à deux reprises avec 10 ml de chloroforme. Pour éliminer les dernières traces de DMF, laver à six reprises au moins les couches de chloroforme rassemblées, chaque fois avec 10 ml. d'eau.

L'élimination des dernières traces de DMF est complète lorsque les derniers 10 ml d'eau de lavage ne donnent plus de résidu visible d'évaporation.

Sécher la couche de chloroforme à l'aide de sulfate de magnésium et filtrer sur un petit filtre en papier. Evaporer à sec la solution, sous vide ou sous courant d'azote. Reprendre le résidu par 2 ml d'éther de pétrole et traiter selon 1.4, 1.6, 1.7 et 1.8.

- 1.3. Evaporer à sec, sous vide ou sous courant d'azote, la couche d'éther de pétrole obtenue selon 1.1. Ajouter 100 ml de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium et faire bouillir pendant une heure sous réfrigérant à reflux, pour saponifier les lipides. Refroidir. Ajouter 200 ml d'eau et agiter à trois reprises, respectivement avec 100 ml, 25 ml et 25 ml d'éther. Rassembler les solutions éthérées et les laver trois fois avec 25 ml d'eau. Déshydrater au sulfate de magnésium les couches d'éther rassemblées et filtrer. Evaporer à sec le filtrat, sous vide ou sous courant d'azote. Reprendre le résidu par 2 ml d'éther de pétrole et traiter selon 1.4, 1.5 et 1.6.

- 1.4. Préparer une colonne d'oxyde d'aluminium ($\varnothing$ 1 cm, longueur 10 cm) imbibée d'éther de pétrole. Verser ensuite sur la colonne, la solution obtenue sous 1.2 ou 1.3. Laisser le liquide s'écouler. Laver la colonne à l'éther de pétrole. (Les colorants restent adsorbés à l'extrémité supérieure de la colonne).

- 1.5. Eluer les carotènes à l'éther de pétrole-acétone. Evaporer à sec l'éluat sous vide ou sous courant d'azote et identifier le résidu obtenu selon 2.1.
- 1.6. Eluer à l'éthanol, les colorants azoïques synthétiques et le β -apocarotinal. Evaporer à sec l'éluat sous vide ou sous courant d'azote. Reprendre le résidu par 2 ml d'éther de pétrole et laver cette solution à huit reprises, chaque fois avec 10 ml d'eau. Chasser le solvant par évaporation et identifier le résidu obtenu selon 2.1.
- 1.7. Eluer ensuite la bixine à l'éthanol ammoniacal. Evaporer à sec l'éluat sous vide ou sous courant d'azote et identifier le résidu obtenu selon 2.1. La curcumine, dont la couleur a viré au rouge, reste fixée sur la colonne.
- 1.8. Laver la colonne à l'éthanol pour éliminer l'ammoniacque. Eluer ensuite la curcumine à l'éthanol chlorhydrique. Ajouter à l'éluat trois fois son volume d'eau. Extraire la curcumine par l'éther. Sécher la solution éthérée sur sulfate de magnésium, évaporer à sec et identifier le résidu, obtenu selon 2.1.

2. Identification

- 2.1. Reprendre séparément par 1 ml d'éther chacun des résidus obtenus sous 1.4. à 1.8. Transférer, à l'aide d'une pipette capillaire, une quantité suffisante de solution sur la plaque de kieselgel G. Chromatographier avec le mélange-benzène acétone. Comparer les taches obtenues avec celles de colorants témoins. En cas de doute, ajouter le colorant-témoin à une portion de l'échantillon de matière grasse et lui appliquer tout le mode opératoire.