NORME INTERNATIONALE

ISO 13496

Première édition
2000-03-01

Viande et produits à base de viande — Détection des agents colorants — Méthode par chromatographie en couche mince

Meat and meat products — Detection of colouring agents — Method using thin-layer chromatography

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 13496:2000
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32910dcf-5e7e-44ec-959f-390fcb27eeef/iso-13496-2000

Numéro de référence
ISO 13496:2000(F)

© ISO 2000

PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 13496:2000
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32910dcf-5e7e-44ec-959f-390fcb27eeef/iso-13496-2000

© ISO 2000

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 734 10 79
E-mail copyright@iso.ch
Web www.iso.ch

Imprimé en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos iv
1 Domaine d'application 1
2 Références normatives 1
3 Terme et définition 1
4 Principe 2
5 Réactifs 2
6 Appareillage 3
7 Échantillonnage 4
8 Préparation de l'échantillon pour essai 4
9 Mode opératoire 4
10 Rapport d'essai 6
Annexe A (informative) **Synonymes et numéros d'identification des agents colorants synthétiques, solubles dans l'eau** 7
Annexe B (normative) **Perturbations possibles par les colorants** 8
Annexe C (informative) **Spectres d'absorbance** 9
Bibliographie 11

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 13496:2000
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32910dcf-5e7e-44ec-959f-390fcb27eeef/iso-13496-2000

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente Norme internationale peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

La Norme internationale ISO 13496 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 6, *Viande et produits à base de viande*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

L'annexe B constitue un élément normatif de la présente de Norme internationale. Les annexes A et C sont données uniquement à titre d'information.

ISO 13496:2000
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32910dcf-5e7e-44ec-959f-390fcb27eeef/iso-13496-2000

© ISO 2000 – Tous droits réservés

Viande et produits à base de viande — Détection des agents colorants — Méthode par chromatographie en couche mince

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode par chromatographie en couche mince de détection des agents colorants synthétiques solubles dans l'eau dans les viandes et produits à base de viande.

Les agents colorants suivants peuvent être détectés avec cette méthode:

tartrazine	bleu Patente V
jaune de quinoléine	bleu indigo
jaune-orange FCF	noir brillant PN
amarante	noir 7984
ponceau 4R	vert malachite FCF
érythrosine	bleu VRS

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

La liste des synonymes et numéros d'identification de ces agents colorants se trouve dans l'annexe A.

La liste des colorants végétaux et des extraits de plante dont on a constaté qu'ils ne créaient pas de perturbations se trouve dans le Tableau B.1. La liste des colorants naturels qui ont parfois créé des perturbations se trouve dans le Tableau B.2.

ISO 13496:2000
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33910dcf-5e7a-44cc-959f-390fcb27eeef/iso-13496-2000

2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai.*

AOAC 46.1.08:1995, *Official Methods of Analysis* (AOAC International).

3 Terme et définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, le terme et la définition suivants s'appliquent.

3.1
détection des agents colorants
détection de la présence ou de l'absence d'agents colorants conforme à la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

© ISO 2000 – Tous droits réservés

4 Principe

Les agents colorants sont extraits d'une prise d'essai avec de l'eau chaude et adsorbés sur une poudre de polyamide. Les agents colorants extraits sont purifiés par chromatographie sur colonne et les colorants sont élués de la colonne. Les agents colorants sont identifiés par chromatographie en couche mince.

5 Réactifs

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

5.1 Eau, d'au moins qualité 3 selon l'ISO 3696.

5.2 Éther de pétrole, intervalle d'ébullition 40 °C à 60 °C.

5.3 Méthanol.

5.4 Ammoniaque, solution aqueuse à 25 %, ρ_{20} = 0,910 g/ml.

5.5 Acide acétique, fraction massique 100 %, ρ_{20} = 1,050 g/ml.

5.6 Citrate trisodique dihydraté.

5.7 Propan-1-ol.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.8 Acétate d'éthyle.

5.9 2-Méthyl-2-propanol.

ISO 13496:2000
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32910dcf-5e7e-44ec-959f-390fcb27eeef/iso-13496-2000

5.10 Acide propionique.

5.11 Solution d'éluant pour chromatographie sur colonne.

Mélanger 95 volumes de méthanol (5.3) à 5 volumes d'ammoniaque (5.4).

5.12 Acide acétique, solution à 50 % dans du méthanol.

Mélanger 1 volume d'acide acétique (5.5) à 1 volume de méthanol (5.3).

5.13 Poudre de polyamide, taille des particules de 0,05 mm à 0,16 mm.

5.14 Sable, à grains fins, lavé à l'acide chlorhydrique, neutralisé et calciné.

5.15 Colorants étalons de référence.

La pureté des colorants étalons risque de varier; il est donc nécessaire de connaître la pureté des colorants à utiliser comme étalons. La pureté doit être déterminée par la méthode AOAC 46.1.08.

NOTE Les colorants alimentaires certifiés peuvent aussi être utilisés comme étalons.

5.16 Solutions étalons de référence pour chromatographie en couche mince.

Constituer avec de l'eau des solutions séparées de chacun des colorants étalons de référence (5.15) à une concentration de colorant étalon d'environ 1 g/l.

Préparer les solutions de bleu indigo le jour même de leur utilisation. D'autres solutions peuvent se conserver pendant au moins 3 mois (les solutions d'érythrosine se conservent pendant 1 mois) lorsqu'elles sont stockées dans le noir.

 © ISO 2000 – Tous droits réservés

5.17 Éluant pour chromatographie en couche mince: solution I.

Peser, à 0,1 g près, 25 g de citrate trisodique dihydraté (5.6) dans une fiole jaugée à un trait de 1 000 ml. Dissoudre dans de l'eau, diluer avec de l'eau jusqu'au trait et mélanger.

Mélanger 80 volumes de cette solution de citrate à 20 volumes d'ammoniaque diluée (5.4) et à 12 volumes de méthanol (5.3).

De manière à éviter ou à réduire les perturbations dues au saffleur ou au safran, il est recommandé d'utiliser la solution chromatographique II (5.18).

5.18 Éluant pour chromatographie en couche mince: solution II.

Mélanger 6 volumes de propan-1-ol (5.7) à 1 volume d'acétate d'éthyle (5.8) et à 3 volumes d'eau.

5.19 Éluant pour chromatographie en couche mince: solution III.

Mélanger 50 volumes de 2-méthyl-2-propanol (5.9) à 12 volumes d'acide propionique (5.10) et à 38 volumes d'eau.

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, notamment, les éléments suivants.

6.1 Équipement mécanique ou électrique capable d'homogénéiser l'échantillon pour laboratoire.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Ceci inclut une machine de découpe rotative à vitesse élevée et un hacheur équipé d'une plaque dont les ouvertures ont un diamètre inférieur ou égal à 4,0 mm.

6.2 Tubes de centrifugeuse, en verre, d'une contenance de 75 ml.

ISO 13496:2000
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32910dcf-5e7e-44ec-959f-
3a0f2ed4f7ab/iso-13496-2000

6.3 Fioles à fond plat, d'une contenance de 250 ml, à bouchon en verre rodé.

6.4 Fioles à fond rond, d'une contenance de 100 ml, avec rodage.

6.5 Centrifugeuse, fonctionnant avec une accélération radiale d'environ 2 000 g_n.

6.6 Évaporateur rotatif.

6.7 Colonne de chromatographie, en verre, équipée d'un filtre fritté et d'un robinet, longueur environ 20 cm, diamètre environ 30 mm, taille des pores du filtre de 40 µm à 100 µm (échelle de porosité P 100 selon l'ISO 4793 [2]).

Mettre de la laine de verre dans la colonne et ajouter 1 g à 2 g de sable (5.14).

6.8 Récipient en plastique, d'un volume d'environ 10 ml, avec couvercle.

6.9 Plaques de chromatographie en couche mince, recouvertes d'une couche de poudre cellulosique d'une épaisseur de 0,10 mm ou équivalent.

Des plaques du type prêtes à l'emploi conviennent.

6.10 Micropipettes, d'une contenance d'environ 5 µl.

6.11 pH-mètre, précis à 0,1 unité de pH près.

© ISO 2000 – Tous droits réservés

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. On trouvera une méthode d'échantillonnage recommandée dans l'ISO 3100-1 [1].

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon qui soit réellement représentatif et n'ait pas été endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

Partir d'un échantillon représentatif d'au moins 200 g. Entreposer l'échantillon de manière à empêcher tout endommagement ou changement de composition.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Homogénéiser l'échantillon à l'aide de l'équipement approprié (6.1). Veiller à ce que la température de la matière de l'échantillon ne s'élève pas au-dessus de 25 °C. Si l'on utilise un hachoir, faire passer l'échantillon dans l'équipement au moins deux fois.

Remplir un récipient approprié, étanche à l'air, avec l'échantillon préparé. Fermer le récipient et l'entreposer de manière à éviter tout endommagement ou changement de composition de l'échantillon. Analyser l'échantillon dès que les conditions pratiques le permettent, mais toujours dans un délai de 24 h après l'homogénéisation.

9 Mode opératoire

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

AVERTISSEMENTS

Si l'échantillon contient de l'indigo, la température ne doit, à aucun moment de l'analyse, dépasser 35 °C. Le bleu indigo se décompose partiellement dans la solution chromatographique I, c'est pourquoi on doit utiliser la solution II.

ISO 13496:2000
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32910dcf-5e7e-44ec-959f-390fcb27eeef/iso-13496-2000

L'érythrosine est sensible à la lumière. Lorsque l'analyse se trouve interrompue, les solutions et les plaques doivent être entreposées dans le noir. Ceci est également valable pour l'indigo.

9.1 Prise d'essai

Peser, à 0,1 g près, 5 g de l'échantillon pour essai préparé (voir article 8) dans un tube de centrifugeuse (6.2).

Pour les échantillons gras, procéder conformément à 9.2.

Pour les échantillons non gras, procéder conformément à 9.3.

9.2 Échantillons gras

Ajouter environ 20 ml d'éther de pétrole (5.2) dans le tube de centrifugeuse et mélanger avec une baguette de verre. Décanter l'éther de pétrole.

Renouveler cette opération trois fois.

9.3 Échantillons non gras

Ajouter 25 ml d'eau bouillante (voir les avertissements) et mélanger. Ajouter 25 ml de solution d'éluant (5.11).

Vérifier que le pH est de 9 ± 0,5 en utilisant le pH-mètre (6.11). Si ce n'est pas le cas, **ajuster le pH** avec de l'acide acétique (5.5) ou de l'ammoniaque diluée (5.4).

Bien mélanger. Mettre l'échantillon à refroidir dans un congélateur pendant 15 min (pour empêcher la turbidité).

 © ISO 2000 – Tous droits réservés

Centrifuger (voir 6.5) pendant 10 min avec une accélération radiale d'environ 2 000 g_n.

Décanter la solution claire dans une fiole à fond plat (6.3). Pour l'indigo, utiliser une fiole à fond rond (6.4).

Ajouter 5 ml d'eau au tube de centrifugeuse contenant le résidu. Mélanger et ajouter 10 ml de solution d'éluant (5.11). Mélanger et centrifuger comme indiqué ci-dessus.

Renouveler l'opération jusqu'à ce que tout le colorant soit extrait de l'échantillon et combiner tous les extraits.

Évaporer l'extrait combiné sur un bain-marie jusqu'à environ 25 ml de manière à éliminer le méthanol. Pour l'indigo, utiliser une fiole à fond rond (6.4) et l'évaporateur rotatif (6.6) à 35 °C.

Ajouter 25 ml d'eau bouillante (voir les avertissements) et mélanger.

9.4 Transfert des colorants sur la poudre de polyamide

Avec l'acide acétique (5.5), ou l'ammoniaque diluée (5.4), ajuster le pH entre 4 et 5.

Ajouter 1 g de poudre de polyamide (5.13) à la solution tiède (voir les avertissements). Secouer vigoureusement pendant 1 min.

Laisser la poudre sédimenter.

Vérifier qu'il ne reste pas de colorant dans la solution. Si la solution est colorée, ajouter un peu plus de poudre de polyamide et secouer vigoureusement.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

NOTE Certains colorants naturels (voir annexe B) ne sont pas complètement adsorbés par la poudre de polyamide, laissant une solution colorée même quand tous les colorants synthétiques ont été entièrement adsorbés. Il est en général possible de décider en fonction du type d'échantillon si ces colorants naturels sont présents ou non.

ISO 13496:2000
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1ed85f1-1f1d-4b2f-
390fcb27eeef/iso-13496-2000

Secouer et transférer la solution tiède en suspension dans la colonne de chromatographie (6.7).

Rincer la fiole à fond plat avec trois volumes d'eau chaude de 10 ml chacun (voir les avertissements) et ajouter les trois volumes de rinçage, un par un, à la colonne. Laver à nouveau la colonne à trois reprises avec des volumes d'eau chaude de 10 ml (voir les avertissements) et pour finir la laver à trois reprises avec trois volumes d'éthanol de 5 ml (5.3). Si les colorants naturels sont élués, poursuivre le lavage de la colonne avec du méthanol jusqu'à ce que le méthanol élué soit devenu incolore.

9.5 Élution et concentration des colorants isolés

Placer une fiole à fond rond (6.4) sous la colonne et éluer les colorants de la poudre de polyamide en utilisant des volumes de solution d'éluant (5.11) de 5 ml, à un débit d'élution de 2 ml/min, jusqu'à ce que le polyamide soit devenu incolore.

Évaporer l'éluat jusqu'à séchage complet à l'aide de l'évaporateur (6.6) à une température de 35 °C maximum (voir les avertissements).

Ajouter 1,0 ml ou 2,0 ml de solution d'éluant (5.11) en fonction de la quantité et du nombre de colorants, et dissoudre le résidu. Transférer la solution colorée dans un récipient en plastique (6.8).

9.6 Séparation chromatographique en couche mince

9.6.1 Plaques étalons de référence

Préparer trois plaques de chromatographie en couche mince étalons de référence. Avec une micropipette (6.10), déposer sur chacune des plaques (6.9) une goutte d'environ 5 µl (diamètre < 5 mm) de chaque solution étalon (5.16). Laisser celles-ci développer séparément, chacune des plaques avec un éluant chromatographique (5.17, 5.18 et 5.19), dans une cuve non saturée jusqu'à ce que le front du solvant se trouve à environ 10 cm à 12 cm de

© ISO 2000 – Tous droits réservés