

CHROM. 5420

Identification simple de treize additifs dans les aliments composés par chromatographie sur couche mince

L'alimentation animale moderne fait appel à un nombre de plus en plus important d'additifs. Ceci constitue un grand problème pour l'analyste, qu'il appartienne aux laboratoires de contrôle de fabrication des aliments, ou aux Services officiels (Répression des Fraudes). Les doses incorporées sont de plus en plus faibles, et l'aliment constitue un milieu très complexe. Des méthodes d'analyse quantitative existent pour chacun des additifs, mais il n'est pas concevable de les appliquer successivement et systématiquement au contrôle de l'étiquetage, à la recherche de l'erreur de fabrication ou de la fraude éventuelle. Seule une détection préalable rapide du ou des additifs présents, peut rendre possible un contrôle efficace et généralisé. La méthode que nous proposons répond à cet objectif, en permettant d'identifier treize substances (Tableau I) parmi celles autorisées en France, et particulièrement les plus récemment admisés.

Une première identification du zoalène, de la nitrofurazone, de la furazolidone et de l'amprolium a été proposée¹, utilisant la chromatographie sur couche mince; la présence de pigments (luzerne) rend la détection difficile. Dix-huit médicaments utilisés dans les aliments médicamenteux et la supplémentation, ont pu être identifiés à l'état pur, également par chromatographie sur couche mince². Enfin, des auteurs anglais³ ont étendu la première méthode¹ à la détection de dix-sept additifs dans les

TABLEAU I

LISTE DES ADDITIFS IDENTIFIÉS PAR LA MÉTHODE PROPOSÉE

<i>Nom commercial</i>	<i>Doses autorisées en France en p.p.m.</i>	<i>Dénomination chimique</i>
Furazolidone	25	3-(5-Nitrofururylidèneamino)-2-oxazolidinone
Nitrofurazone	50	5-Nitrofururaldéhyde semicarbazone
Payzone (Nitrovin)	12	Chlorhydrate de 1,5-bis(5-nitro-2-furyl)penta-1,4-diène-3-one-amidinohydrazone
Zoalène (D.O.T.)	75	3,5 Dinitro- <i>o</i> -toluamide
Dimétridazole	150	1,2 Diméthyl-5-nitroimidazole
Ronidazole	60	(1-Méthyl-5-nitroimidazol-2-yl) méthylcarbamate
Coyden (clopidol)	125	3,5-Dichloro-2,6-diméthyl-4-pyridinol
Buquinolate	80	4-Hydroxy-6,7-di-isobutoxy-3-quinolinecarboxylate d'éthyle
Décoquinate (Deccox)	10	Éthyl 6-décycloxy-7-éthoxy-4-hydroxyquinoline-3-carboxylate
Méthylbenzoquate (Statyl)	10	Méthyl 7-benzyloxy-6-butyl-1,4-dihydroxyquinoléine-3-carboxylate
Carbadox (GS 6244)	(50) ^a	3-Méthyl-(2-quinoxalinylméthylène) carbazate N ¹ ,N ⁴ dioxyde
Ethopabate	8	Méthyl-4-acétamido-2-éthoxybenzoate
Amprolium	125	Chlorhydrate de chlorure de 1-(4-amino-2- <i>n</i> -propyl-5-pyrimidinylméthyl)-2-picolinium

^a Autorisé aux U.S.A.

aliments composés, avec un nombre limité de systèmes de solvants et de révélateurs. Nous avons entrepris simultanément un travail identique portant sur l'identification de treize additifs, dont un certain nombre récemment admis dans les aliments composés. Étant donné le nombre plus restreint de substances envisagées, nous avons abouti à une méthode plus simple, supprimant la chromatographie préalable sur colonne d'alumine³, et pouvant s'appliquer ainsi à des séries d'échantillons. Elle consiste essentiellement dans l'extraction successive d'une même prise d'essai de l'aliment par quatre solvants (hexane, acétone, chloroforme et méthanol), le premier permettant d'éliminer un certain nombre de substances interférentes. Les chromatographies sur couche mince des extraits sont faites sur deux supports différents (silice fluorescente et alumine fluorescente) et comportent deux systèmes de solvants d'élu-tion et deux types de révélateurs. Cette méthode permet de détecter les doses autorisées de chacun des additifs (Tableau I), et pour bon nombre d'entre eux le cinquième de cette dose (10 à 20 p.p.m.).

Méthode

Réactifs. Tous les réactifs sont de qualité "pour analyse": Hexane, acétone, chloroforme, méthanol, méthanol ammoniacal (2,5 %), acétate d'éthyle, chlorure de méthylène, ether éthylique, Gel de Silice GF₂₅₄ (Merck), Alumine GF₂₅₄ (Merck).

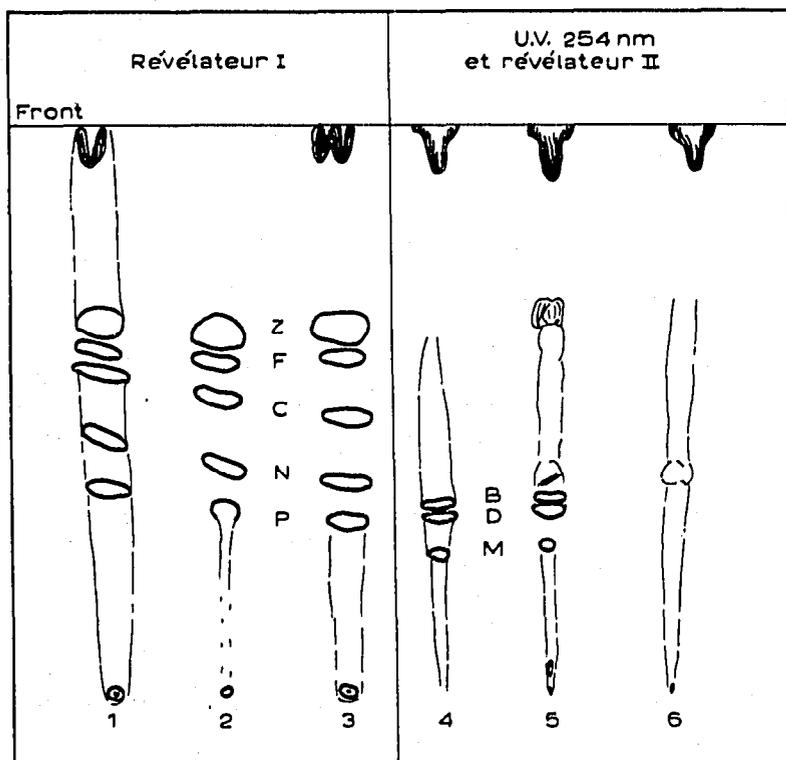


Fig. 1. (1) Extrait 1 d'aliment témoin, surchargé d'additifs purs; (2) additifs purs; (3) extrait 1 d'aliment; (4) extrait 2 d'aliment témoin, surchargé d'additifs purs; (5) extrait 2 d'aliment; (6) extrait 2 d'aliment témoin. P = Payzone, rouge brun; N = nitrofurazone, rouge brun; C = carbadox, jaune orangé; F = furazolidone, rouge brun; Z = zoalène, violet; M = méthylbenzoquate; D = dimétridazole; B = buquinolate, M, D et B sont rouge brun après révélation II, et violet foncé sous UV.

Systèmes de développement: (A) acétate d'éthyle-chlorure de méthylène (1:1), (B) chloroforme-méthanol (9:1).

Révélateurs (I) éthylène diamine, (II) réactif de Dragendorff modifié¹. Solution-stock: Dissoudre 8 g de sous-nitrate de bismuth dans 5 ml d'acide nitrique pur, ajouter 15 ml d'eau. Verser cette solution dans une suspension de 20 g d'iodure de potassium dans 1 ml d'acide chlorhydrique 6 N et 5 ml d'eau. Compléter à 100 ml avec de l'eau (cette solution se conserve plusieurs mois). Solution pour la pulvérisation: À 5 ml de solution stock, ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique concentré et 20 ml d'eau (cette solution se conserve au moins 10 jours).

Appareillage. Matériel classique pour la chromatographie sur couche mince. Les plaques (20 × 20 cm) d'épaisseur 0.25 mm, sont confectionnées suivant la technique habituelle, et activées à 110° durant 1 h avant emploi.

Extraction des additifs. Peser 10 g d'aliment en farine dans un tube à centrifuger de 100 ml, ajouter 50 ml d'hexane, boucher et agiter fortement durant 5 min, centrifuger quelques minutes, et éliminer le surnageant par pipettage. Répéter une fois l'opération.

Ajouter 40 ml d'acétone au culot d'aliment, agiter fortement 5 min, centrifuger quelques minutes, et prélever le surnageant dans un ballon à évaporer de 250 ml. Répéter une fois l'opération. Réduire sous vide les extraits acétoniques réunis jusqu'à

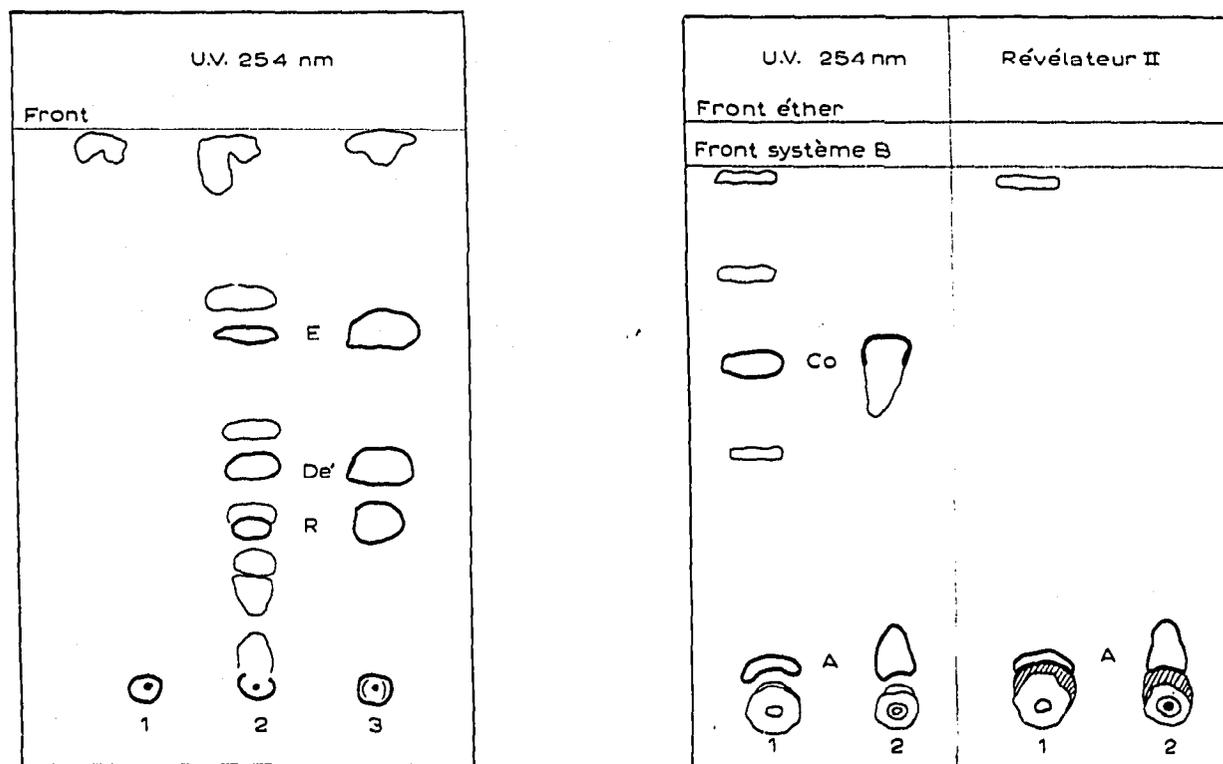


Fig. 2. (1) Extrait 1 d'aliment témoin; (2) extrait 1 d'aliment; (3) extrait 1 d'aliment témoin surchargé d'additifs purs. R = Ronidazole; Dé = décoquinatate; E = ethopabate, R, Dé et E sont violet foncé sous UV et rouge brun après révélation II pour les surcharges.

Fig. 3. (1) Extrait 3 d'aliment; (2) extrait 3 d'aliment témoin, surchargé d'additifs purs. A = Amprolium, violet foncé sous UV, rouge après révélation II; Co = coyden, violet foncé sous UV.

1 à 2 ml, transvaser dans un petit récipient et protéger de la lumière: ceci constitue l'extrait 1.

Ajouter 40 ml de chloroforme au culot d'aliment, agiter fortement durant 5 min, et verser rapidement sur un filtre plissé placé dans un entonnoir au-dessus d'un ballon à évaporer de 100 ml. Laisser filtrer complètement, conserver l'aliment dans le filtre, évaporer l'extrait chloroformique jusqu'à 1 à 2 ml, transvaser dans un petit récipient: ceci constitue l'extrait 2.

Remettre l'aliment retenu sur le filtre dans le tube à centrifuger, ajouter 40 ml de méthanol ammoniacal, agiter fortement durant 5 min, centrifuger. Prélever le surnageant dans un ballon à évaporer de 250 ml. Evaporer jusqu'à 1 à 2 ml, transvaser dans un petit récipient: ceci constitue l'extrait 3.

Séparation et identification

(a) Chromatographie sur Silice GF₂₅₄ fluorescente

1. Déposer sur une moitié de plaque des taches de 20 à 50 μ l d'un ou plusieurs extraits 1, encadrées de taches témoin du mélange: payzone, nitrofurazone, furazolidone, zoalène et carbadox. Déposer sur la seconde moitié des taches de 20 à 50 μ l d'un ou plusieurs extraits 2, encadrées de taches témoin du mélange: méthylbenzoate, dimétridazole et buquinolate. Développer par le système A sur 10 cm environ, retirer la plaque, sécher à l'air chaud, puis développer par le système B sur 15 cm. Retirer la plaque, sécher sous air chaud. Révéler la moitié de plaque correspondant à l'extrait 1 en pulvérisant le révélateur I et en protégeant l'autre partie. Observer sous lumière ultra-violette (254 nm) la seconde moitié, puis la révéler par pulvérisation du révélateur II. Interpréter chaque étape à l'aide de la Figure 1.

2. Déposer des taches de 20 à 50 μ l d'un ou plusieurs extraits 1, encadrées par des taches témoin du mélange: éthopabate, décoquinatate et ronidazole. Développer par le système A sur 15 cm, retirer la plaque, sécher sous air chaud, observer sous lumière ultra-violette (254 nm), puis révéler par pulvérisation du révélateur II. Interpréter à l'aide de la Figure 2.

(b) Chromatographie sur Alumine GF₂₅₄ fluorescente

Déposer des taches de 20 à 50 μ l d'extrait 3, encadrées par des taches témoin du mélange: coyden et amprolium. Faire une préélution dans l'éther sur 15 cm, retirer la plaque, sécher, puis développer par le système B sur 15 cm. Observer sous lumière ultra-violette (254 nm), puis révéler par pulvérisation du réactif II. Interpréter à l'aide de la Figure 3.

Discussion

Cette méthode permet d'identifier les substances aux doses autorisées (Tableau I), mais pour certaines d'entre elles (zoalène, payzone, nitrofurazone, amprolium), la limite de détection est de l'ordre du cinquième de cette dose. Pour les additifs présents aux plus faibles doses (décoquinatate, éthopabate, méthylbenzoate) et particulièrement lors de l'examen sous UV, où de nombreuses taches sont visibles, un doute peut exister. Il est alors nécessaire de répéter une nouvelle chromatographie en encadrant chaque extrait, d'une part par le mélange des additifs purs, d'autre part par l'extrait surchargé avec le même mélange. Ceci peut être également utile lorsque les extraits sont chargés de substances interférentes qui peuvent modifier la migration et la qualité de la séparation. La chromatographie simultanée du coyden et de l'am-

prolium (système B) peut conduire, suivant la nature et l'importance des substances interférentes, à une interprétation difficile pour l'amprolium, son R_F étant faible; le doute peut être levé complètement en effectuant une migration complémentaire dans le méthanol pur.

Nous ne donnons aucun R_F indicatif, mais seulement l'ordre de séparation, la référence aux mélanges de substances pures ou aux surcharges étant beaucoup plus utile, et pouvant éviter des erreurs d'interprétation.

Les extractions et les chromatographies peuvent être réalisées en série, permettant le traitement simultané de plusieurs échantillons d'aliment.

*Station de Recherches de Nutrition, INRA, CNRZ,
Jouy-en-Josas (France)*

G. F. BORIES*

- 1 H. Z. KNAPSTEIN, *Z. Anal. Chem.*, 217 (1966) 181.
- 2 J. J. ANTKOWIAK AND A. L. SPATORICO, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 277.
- 3 P. W. HAMMOND AND R. E. WESTON, *Analyst (London)*, 94 (1969) 921.

Reçu le 22 mars 1971

* Avec la collaboration technique de EVELYNE BIETTE.