

CHROM. 15,716

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES DE COLORANTS NATURELS

Ch. B. AIRAUDO*, V. CERRI, A. GAYTE-SORBIER et J. ANDRIANJAFINIONY

Laboratoire de Bromatologie, Diététique et Analyse appliquée à l'Expertise, Faculté de Pharmacie, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5 (France)

(Reçu le 12 juillet 1982; manuscrit modifié reçu le 20 janvier 1983)

SUMMARY

Thin-layer chromatography of natural dyes

Thin-layer chromatographic data for about 50 natural dyes samples are presented. The approximate R_f values on silica gel and cellulose layers are given for some of the 18 solvents tested. A comparative study of several samples of the same dyes from different manufacturers showed either similar chromatograms or, on the contrary, very dissimilar patterns if they did not have the same degree of purity or if they had different compositions resulting from their modes of preparation. The method also makes possible the identification of the two dyes in binary mixtures and it was adapted for food analysis. Thus the method is useful for monitoring the purification process of natural dyes testing them as raw materials and identifying them in food products.

INTRODUCTION

A la suite de la méfiance manifestée par les consommateurs à l'égard des colorants de synthèse, on a pu constater dans l'industrie alimentaire une certaine tendance à recourir à des colorants naturels. Cette nouvelle attitude s'est également manifestée dans l'industrie pharmaceutique, où il est vraisemblable qu'elle ne fera que se développer étant donné que la toute récente dixième édition de la *Pharmacopée française*, qui entre en vigueur le 1er janvier 1983, a introduit de nombreux produits naturels dans la liste des colorants utilisés pour les médicaments¹.

Diverses études ont déjà été publiées à propos de la chromatographie sur couche mince des colorants d'origine naturelle. Dans leurs ouvrages respectifs, Stahl² et Randerath³ font par exemple état de travaux concernant le carmin d'indigo, la riboflavine, les chlorophylles α et β ainsi que leurs complexes cuivriques, l'indigotine et divers représentants des familles des caroténoïdes et des xanthophylles. Foppen⁴ a publié des tables pour l'identification de ces derniers colorants. Marine Font et Alvarez Reverter⁵ se sont intéressés à la mise en évidence des mêmes produits et de la riboflavine dans les pâtes alimentaires. Un travail de Casares *et al.*⁶ a porté sur la

riboflavine, la riboflavine 5'-phosphate, les complexes cuivriques des chlorophylles et chlorophyllines et plusieurs caroténoïdes. La bixine a été dosée dans les préparations d'annatto après séparation sur couche mince⁷. Plusieurs caroténoïdes et la curcumine ont été étudiés en vue de leur mise en évidence soit dans les margarines et les fromages, soit dans les saucisses⁸. L'apocaroténal et la canthaxanthine ont de même été séparés sur couche mince à partir de divers aliments⁹. Les chlorophylles et leurs dérivés, déjà cités incidemment, ont fait l'objet d'une étude de Sievers et Hynninen¹⁰ et leur présence a été mise à profit pour distinguer les huiles d'olive vierges et raffinées¹¹. La riboflavine 5'-phosphate apparaît dans une étude relative à la recherche des colorants de synthèse dans les médicaments et les aliments¹². La séparation des anthocyanes extraites de divers fruits a été l'objet de travaux tels que ceux de Barritt et Torre¹³. Plusieurs travaux sur ce sujet ont aussi été passés en revue dans une étude générale due à Shrikhande et Francis¹⁴. Plus récemment, Bézanger-Beauquesne *et al.*¹⁵ ont rapporté dans une publication sur les colorants naturels utilisables en pharmacie les comportements chromatographiques de plusieurs d'entre eux. Il faut rappeler enfin que c'est une méthode chromatographique sur couche mince qui permet d'identifier la curcumine dans la monographie "Temoe-Lawaq" de la neuvième édition de la *Pharmacopée française*¹⁶.

Ce rapide survol des travaux déjà effectués ne vise qu'à citer quelques références pour chacun des différents colorants naturels, parmi les plus importantes et/ou les plus récentes, choisies essentiellement dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. Il est d'autant moins exhaustif que les études concernant certaines familles de colorants (chlorophylles et caroténoïdes notamment) sont très nombreuses et ne peuvent toutes être citées ici: c'est d'ailleurs en raison de cette abondance que le présent travail s'intéressera peu à ces produits. Plusieurs des publications mentionnées constituent néanmoins d'intéressantes sources bibliographiques. Nous signalerons encore un récent ouvrage de Marmion¹⁷, qui rapporte de nombreux travaux relatifs à l'analyse des colorants naturels utilisés dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

En ce qui nous concerne, nous avons pu réunir de très nombreux échantillons de colorants issus du règne végétal et du règne animal, qui différaient entre eux non seulement par la nature de leurs principes colorants et par leurs origines commerciales, mais aussi, lorsque le principe colorant était identique, par leur aspect physique (poudres, liquides) et même par leur forme galénique (extraits aqueux ou huileux, teintures, oléorésines, etc.)¹⁸. Nous nous sommes proposé de rechercher des moyens simples, applicables dans les industries pharmaceutique et alimentaire, permettant de vérifier l'identité de ces substances lors du contrôle des matières premières ou des produits finis. Dans ce dernier cas, l'identification devait pouvoir être menée à bien même en cas d'emploi simultané de plusieurs colorants. Il était en outre souhaitable de pouvoir contrôler la pureté d'un colorant ainsi identifié, et notamment de vérifier l'absence de produits de structure voisine.

La présente publication a pour objet d'illustrer ce propos à partir de quelques-uns de nos résultats, choisis de façon à évoquer divers aspects de l'étude effectuée.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Colorants étudiés

Les résultats qui seront présentés se rapportent aux colorants cités ci-après.

Etant donné la diversité des échantillons d'un même colorant, qui implique souvent des différences de solubilité et donc de préparation, nous rapportons fidèlement les appellations figurant sur les étiquettes, en mentionnant éventuellement entre parenthèses la forme physique des produits lorsque l'étiquetage ne l'indique pas. Cependant, en raison du nombre des échantillons et afin de les désigner commodément et sans ambiguïté par la suite, nous avons affecté à chacun d'eux un numéro qui sera repris tout au long de l'exposé. Les fournisseurs ont quant à eux été repérés par une lettre capitale, suivie, lorsqu'il en existait une, de la référence du produit considéré au catalogue de la firme.

Fournisseurs ou marques. *A*, Bertrand Frères; *B*, Berty; *C*, B.V. Nederlandse Kleurstofindustrie; *D*, Chr. Hansen's Laboratorium A/S; *E*, Colodor; *F*, Compagnie Française des Pigments; *G*, D.F. Anstead Ltd.; *H*, George T. Gurr; *I*, Hoffmann-La Roche; *J*, Joseph Gazan; *K*, Merck; *L*, Métayer Aromatiques; *M*, Phytocolor; *N*, Prolabo; *O*, R.A.L.; *P*, Sébalcé; *Q*, Verniers; *R*, V. Mane Fils; *S*, Wackherr.

E 100.

- 1 = Curcumine (poudre) (*E*).
- 2 = Curcumine (poudre) (*N*: 23 214).
- 3 = Curcuma (poudre) (*B*).
- 4 = Curcuma extract, liquid, water soluble, E 100 (*C*: 60 366).
- 5 = Curcuma extract, liquid, oil soluble, E 100 (*C*: 60 367).
- 6 = Résinoïde curcuma (masse dure) (*A*: 310 013).

E 101.

- 7 = Lactoflavine, powder, water soluble, E 101 (*C*: 60 301).
- 8 = Colorant riboflavine base, E 101 (*M*).

E 120.

- 9 = Cochenille, acide carminique, E 120 (poudre) (*P*).
- 10 = Carmin de cochenille pur, E 120 (poudre) (*M*).
- 11 = Carmin de cochenille LB (poudre) (*M*).
- 12 = Carmin Covalac (*R*: W 3508).
- 13 = Carmin Nacarat AAA/US (poudre) (*F*).
- 14 = Cochineal red, liquid, water soluble, E 120 (*C*: 60 350).
- 15 = Rouge de cochenille, E 120 (poudre) (*E*).
- 16 = Colorant carmin de cochenille solubilisé, E 120 (*J*).
- 17 = Carmin Nacarat, powder, water soluble, E 120 (*C*: 60 331).
- 18 = Cochineal red, powder, water soluble, E 120 (*C*: 60 336).
- 19 = Colorant carmin, E 120 (liquide) (*L*: 26 053).
- 20 = Cochenille en solution alcoolique à 1% (*N*: 31 714).
- 21 = Cochenilles pulvérisées (*O*).
- 22 = Acide carminique pour analyses et pour la microscopie (poudre) (*K*: 211).
- 23 = Cochineal tincture (*H*).

E 132.

- 24 = Colorant bleu végétal H.C., E 132 (poudre d'indigotine) (*M*).
- 25 = Colorant poudre bleu indigotine (*R*: 5029).

E 140.

- 26 = Chlorophylle (liquide pâteux) (*H*: 7 800).

E 141.

27 = Chlorophylline powder, water soluble, E 141 (C: 60 337).

E 150.

28 = Caramel, double strength acidproof, liquid, E 150 (C: 60 355).

E 160 a.

29 = β -Carotène 10% hydrosoluble (poudre) (I: 402 562).

E 160 b.

30 = Pure bixin (poudre, non-commercialisée) (D).

31 = Colorant rocou liposoluble, E 160 (liquide) (M: 17017).

32 = Annatto, powder, water soluble, E 160 b (C: 60304).

33 = Annatto (poudre) (G: 14480).

34 = Rocou, E 160 (liquide) (E).

35 = Colorant jaune rocou, E 160 (liquide) (J).

36 = Colorant jaune végétal, E 160 ST (liquide) (L).

37 = Rocou R-AA hydrosoluble, E 160 b (liquide) (D).

E 160 e.

38 = Apocaroténal, 10% hydrosoluble (poudre) (I: 406 643).

E 161 g.

39 = Canthaxanthine, 10% hydrosoluble (poudre) (I: 706 450).

E 162.

40 = Beet red, liquid, water soluble, E 162 (C: 60 332).

41 = Beet red dehydrated, E 162 (C: 60 354).

42 = Beet red, powder, water soluble, E 162 (C: 60 244).

43 = Colorant rouge de betterave (liquide) (L: 24 001).

44 = Colorant rouge de betterave (poudre) (L: 24 005).

45 = Colorant rouge de betterave concentré (liquide) (Q: 2 356).

46 = Colorant rouge de betterave (poudre) (Q: 4 350).

47 = Rouge de betterave extrait sec (S: W 873).

E 163.

48 = Anthocyanes, E 163 (liquide) (E).

49 = Enocyanine, medium strength, E 163 (liquide) (C: 60 393).

Matériel et réactifs

Les plaques utilisées étaient des plaques de gel de silice 60, 20 × 20 cm, épaisseur 0.25 mm, sans indicateur fluorescent (Merck, réf. 5 721), et des plaques de cellulose, 20 × 20 cm, épaisseur 0.10 mm, sans indicateur fluorescent (Merck, réf. 5 716).

Solvants de développement. Les solvants indiqués ci-après étaient de qualité pour analyses (Merck et Prolabo). Après diverses modifications destinées à améliorer l'efficacité des solvants initialement essayés, nous avons finalement retenu les dix-huit systèmes suivants:

a, butanol-1-eau-pyridine (2:1:2); *b*, butanol-1-eau-éthanol (2:1:1)⁶; *c*, butanol-1-eau-éthanol (2:2:1); *d*, butanol-1-eau-éthanol-pyridine (2:2:1:1); *e*, butanol-1-eau-éthanol-ammoniacque en solution aqueuse à 28% (25:25:50:2); *f*, butanol-1-eau-acide acétique (4:5:1)¹⁹; *g*, butanol-1-eau-acide acétique (4:2:1); *h*, éthanol-eau-pyridine (1:2:1); *i*, méthanol-eau-ammoniacque en solution aqueuse à 28% (3:16:1); *j*, propanol-1-eau-acétate d'éthyle (6:3:1); *k*, acétate d'éthyle-pyridine-eau (7:3:1); *l*, phase supérieure du mélange acétate d'éthyle-pyridine-eau

(9:1:1); *m*, citrate trisodique-hexamine-eau-méthanol (2 g:5 g:50 ml:50 ml); *n*, citrate trisodique-ammoniacal en solution aqueuse à 28% -eau (16.5 g:156 ml, eau q.s.p. 1000 ml); *o*, benzène-trichlorométhane-éthanol (9:9:2)¹⁵; *p*, dichlorométhane-oxyde d'éthyle (9:1)⁹; *q*, éther de pétrole (35-60°C)-oxyde d'éthyle (95:5)⁹; *r*, éther de pétrole (35-60°C)-benzène-éthanol (10:2:1)⁵.

Étude comparative de plusieurs échantillons d'un même colorant

Il a été préparé à partir des colorants étudiés des solutions de concentrations comprises entre 0.1 et 1% (p/v), selon les solubilités des produits et l'intensité des colorations obtenues. La plupart des colorants analysés étant hydrosolubles, même en l'absence d'indication en ce sens dans leur dénomination, il s'est agi le plus souvent de solutions aqueuses. Toutefois, l'éthanol a été utilisé pour les échantillons de colorant E 100 n^{os} 1 et 2, ainsi que pour le colorant 160 b n^o 36. Les échantillons liposolubles de colorant E 160 b n^{os} 30 et 31 ont été dissous dans le trichlorométhane. Les volumes déposés étaient de 2 ou 3 μ l selon les cas. Les chromatogrammes étaient développés sur une distance de l'ordre de 15 cm.

Les échantillons de colorants et leurs solutions étaient conservés à l'obscurité, mais les manipulations et les chromatographies ont été effectuées à la lumière du jour. En effet, le but du travail, déjà exposé, était essentiellement pratique: aucune précaution particulière vis-à-vis de la lumière n'étant habituellement prise au cours de la fabrication et de la conservation des aliments (sauf cas particulier), il n'y avait pas lieu de se montrer plus strict pour les colorants eux-mêmes. Des précautions plus draconiennes, observées pour les produits de référence alors qu'elles ne l'auraient pas été pour les aliments, auraient même pu gêner l'interprétation des résultats dans le cas de colorants photosensibles, pouvant donner plusieurs taches du fait de leur dégradation.

Étude de mélanges binaires de colorants: préparation des mélanges

Les solutions de divers colorants, dont les concentrations sont indiquées ci-après, ont été mélangées à parties égales. Il s'agissait de solutions aqueuses, sauf dans le cas de la curcumine n^o 1, dissoute dans l'éthanol.

Mélanges verts. Ils ont été obtenus à partir de six colorants jaunes, le colorant bleu étant toujours l'indigotine:

- n^o 1.25: curcumine n^o 1 (0.1%) + indigotine n^o 25 (0.1%);
- n^o 8.25: riboflavine n^o 8 (0.5%) + indigotine n^o 25 (0.1%);
- n^o 29.25: β -carotène n^o 29 (0.1%) + indigotine n^o 25 (0.05%);
- n^o 34.25: rocou n^o 34 (1%) + indigotine n^o 25 (0.1%);
- n^o 38.25: apocaroténal n^o 38 (0.1%) + indigotine n^o 25 (0.05%);
- n^o 39.25: canthaxanthine n^o 39 (0.1%) + indigotine n^o 25 (0.05%).

Mélanges violets. Ils ont été obtenus à partir d'indigotine et de trois colorants rouges:

- n^o 23.25: teinture de cochenille n^o 23 (1%) + indigotine n^o 25 (0.025%);
- n^o 47.25: rouge de betterave n^o 47 (1%) + indigotine n^o 25 (0.025%);
- n^o 48.25: anthocyanes n^o 48 (1%) + indigotine n^o 25 (0.025%).

Mélanges orangés. Ils ont été préparés à partir de six colorants jaunes et de trois colorants rouges:

- n^o 1.23: curcumine n^o 1 (0.5%) + cochenille n^o 23 (0.5%);

- n° 8.23: riboflavine n° 8 (0.5%) + cochenille n° 23 (0.5%);
 n° 29.23: β -carotène n° 29 (0.1%) + cochenille n° 23 (0.5%);
 n° 34.23: rocou n° 34 (1%) + cochenille n° 23 (0.5%);
 n° 38.23: apocaroténal n° 38 (0.1%) + cochenille n° 23 (0.5%);
 n° 39.23: canthaxanthine n° 39 (0.1%) + cochenille n° 23 (0.5%);
 n° 1.47: curcumine n° 1 (0.5%) + rouge de betterave n° 47 (1%);
 n° 8.47: riboflavine n° 8 (0.5%) + rouge de betterave n° 47 (1%);
 n° 29.47: β carotène n° 29 (0.1%) + rouge de betterave n° 47 (1%);
 n° 34.47: rocou n° 34 (1%) + rouge de betterave n° 47 (1%);
 n° 38.47: apocaroténal n° 38 (0.1%) + rouge de betterave n° 47 (1%);
 n° 39.47: canthaxanthine n° 39 (0.1%) + rouge de betterave n° 47 (1%);
 n° 1.48: curcumine n° 1 (0.5%) + anthocyanes n° 48 (5%);
 n° 8.48: riboflavine n° 8 (0.5%) + anthocyanes n° 48 (5%);
 n° 29.48: β carotène n° 29 (0.1%) + anthocyanes n° 48 (5%);
 n° 34.48: rocou n° 34 (1%) + anthocyanes n° 48 (5%);
 n° 38.48: apocaroténal n° 38 (0.1%) + anthocyanes n° 48 (5%);
 n° 39.48: canthaxanthine n° 39 (0.1%) + anthocyanes n° 48 (5%).

Applications dans le domaine alimentaire

Préparation des yaourts colorés. Des prises d'essai de yaourt "nature" ont été additionnées de quantités convenables de divers colorants, soit directement, soit après mise en solution de ceux-ci, de façon à obtenir les différentes couleurs et nuances indiquées par les fabricants:

<i>Colorants</i>	<i>Concentrations</i>	<i>Couleurs-nuances</i>
Curcuma n° 4	0.05 g/kg	Jaune citron
Lactoflavine n° 7	0.10 g/kg	Jaune vanille
Rouge de cochenille n° 18	0.025 g/kg	Rouge framboise
Rouge de betterave n° 45	5.0 ml/kg	Rouge framboise
Encyanine n° 49	1.00 g/kg	Rouge myrtille
Chlorophylline n° 27	0.05 g/kg	Vert pistache
Caramel n° 28	1.00 g/kg	Marron café

Extraction. Des prises d'essai de 20 g des yaourts colorés ont été extraites par 50 ml, 20 ml et 20 ml d'eau distillée, les phases liquides étant chaque fois séparées par centrifugation (2500 g, 10 min), puis réunies et portées à 100 ml. Des solutions témoins ayant les concentrations théoriques des extractifs servaient de références lors des chromatographies, effectuées avec le système *b*.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Étude systématique

D'une façon générale, les couches minces de silice conduisent à de meilleures séparations que celles de cellulose, sauf dans le cas du colorant E 120. Le nombre des systèmes solvants retenus est bien sûr d'abord dû au fait que la sécurité d'une identification est d'autant plus grande que la similitude des comportements de la substance testée et de la substance de référence se manifeste dans un plus grand

nombre de solvants. Mais il s'explique surtout par le fait, qu'en cas de mélange de plusieurs colorants, la connaissance des R_F de chacun d'eux dans divers systèmes solvants permet de choisir le système qui conduira à une séparation satisfaisante. Seuls les résultats les plus intéressants seront rapportés ici. Nous donnons à titre d'exemples dans le Tableau I les R_F des taches obtenues dans plusieurs des conditions testées.

TABLEAU I
EXEMPLES DE R_F ET CONDITIONS PRÉCONISÉES

No.	Échantillons	Couche: silice			Conditions préconisées			
		Système <i>a</i>	Système <i>b</i>	Aspect	Couche	Système	R_F	Aspect
1	Curcumine, poudre	0.85	0.88	Jaune	Silice	<i>o</i>	0.44 0.37 0.29	Jaune Jaune Jaune
2	Curcuma, extrait liquide hydrosoluble	0.85	0.88	Jaune	Silice	<i>o</i>	0.44 0.37 0.29	Jaune Jaune Jaune
8	Riboflavine, solution	0.77	0.60	Jaune	Silice	<i>b</i>	0.60	Jaune
9	Cochénille, poudre	0.35	0.32	Rose	Cellulose	<i>c</i>	0.63 0.48	Rose Rose
23	Cochénille, teinture	0.52	0.40	Rose	Cellulose	<i>c</i>	0.65	Rose
25	Indigotine, poudre	0.64	0.60	Bleu	Silice	<i>g</i>	0.26 0.12	Bleu Bleu
26	Chlorophylle, pâte	0.71 0.61 0.55	0.64 0.55 0.40	Vert Vert Vert	Silice	<i>b</i>	0.64 0.55 0.40	Vert Vert Vert
27	Chlorophylline, poudre	0.70 0.61 0.55	0.65 0.54 0.40	Vert Vert Vert	Silice	<i>b</i>	0.65 0.54 0.40	Vert Vert Vert
29	β -Carotène, poudre	0.96	0.88	Jaune- orangé	Silice	<i>p</i>	0.90 0.55	Jaune- orangé Jaune- orangé
34	Rocou, liquide	0.65	0.67 0.52 0.44	Jaune- orangé Jaune- orangé Jaune- orangé	Silice	<i>l</i>	0.58	Jaune- orangé
38	Apocaroténal, poudre	0.95	0.86	Orangé	Silice	<i>p</i>	0.80 0.77 0.55	Orangé Orangé Orangé
39	Canthaxanthine, poudre	0.95	0.91	Orangé	Silice	<i>p</i>	0.55 0.46	Jaune- orangé Jaune- orangé
47	Rouge de betterave, extrait	0.50	0.30	Rose	Silice	<i>m</i>	0.68 0.59	Rouge Jaune
48	Anthocyanes, liquide	0.12	0.10	Marron	Silice	<i>f</i>	0.58 0.24 0.10	Rose Bleu Marron

S'il s'agit de rechercher l'identité d'un colorant, on voit que le système de développement *b*, avec une couche mince de silice, ou à la rigueur le système de développement *a*, également avec une couche de silice, apportent des solutions assez satisfaisantes puisqu'ils permettent de distinguer la plupart des colorants. Seuls la curcumine et certains caroténoïdes sont difficiles à différencier dans ces conditions, d'autant que les couleurs des taches sont proches. Mais, il est rare dans l'industrie que l'on ait à établir l'identité d'un colorant inconnu: l'analyse consiste le plus souvent à contrôler l'identité ou la pureté d'un colorant dont la présence est attendue. La distinction entre de nombreuses molécules différentes est alors sans grand intérêt. C'est pourquoi nous indiquons aussi dans le tableau I les conditions opératoires donnant les meilleurs résultats pour un colorant ou une famille de colorants donnés.

Les commentaires suivants permettent de préciser l'aspect des chromatogrammes obtenus.

Les trois taches jaunes de la curcumine sont fluorescentes sous rayonnement ultraviolet de longueur d'onde 254 nm aussi bien que 366 nm. La tache jaune de riboflavine est également fluorescente dans ces mêmes conditions, mais on observe alors en outre une seconde tache fluorescente, non-colorée, de R_F 0.71 dans le système de développement *b*. Les taches vertes de la chlorophylle sont modérément fluorescentes, dans les conditions de concentration indiquées, sous rayonnement de 366 nm. Les deux échantillons de cochenille n^{os} 9 et 23 présentent dans le système *a* une traînée depuis la ligne de dépôt jusqu'aux taches de R_F indiqués. Il en est de même pour l'échantillon n^o 23 dans le système *b*. Dans ce cas, la tache rose est en outre bordée d'un halo jaune dans sa partie supérieure. Ce halo est également visible pour le même échantillon sur plaque de cellulose avec le système *c*. Enfin, la tache jaune-orangé de rocou, de R_F 0.65 dans le système *a*, est accompagnée d'une traînée.

Étude comparative de plusieurs échantillons d'un même colorant d'origines différentes

La diversité des formes commerciales disponibles pour un colorant donné et le fait que certains produits aient montré plusieurs taches au cours de l'étude systématique précédente nous ont amenés à étudier leur comportement chromatographique sur des échantillons provenant de différents fabricants. Nous nous sommes intéressés ici aux colorants E 100, E 120, E 160 et E 162. Les produits testés, les systèmes solvants utilisés et les résultats sont présentés dans le tableau II et dans la Fig. 1.

Colorant E 100. Que ce soit à la lumière du jour ou sous rayonnement ultraviolet, on observe pour chacun des six échantillons étudiés, sur couche de silice et avec le système de développement *o*, les trois mêmes taches déjà indiquées dans le Tableau I. En dépit de la diversité de leurs formes et de leurs solubilités, qui impliquent des différences dans les modes de préparation des colorants, la composition des six produits est qualitativement identique: tous contiennent la curcumine I (diméthoxylée), la curcumine II (monométhoxylée) et la curcumine III (totalement diméthoxylée).

Colorant E 162. Les huit échantillons testés donnent chacun, sur couche de silice avec le système de développement *m*, les deux mêmes taches que celles indiquées dans le Tableau I. La conclusion est analogue à celle du cas précédent: tous les échantillons contiennent des bétacyanines (rouges) et des bétaxanthines (jaunes).

Colorant E 160 b. Les résultats présentés dans le Tableau II montrent ici au contraire que les huit échantillons analysés se répartissent en trois groupes. Le pre-

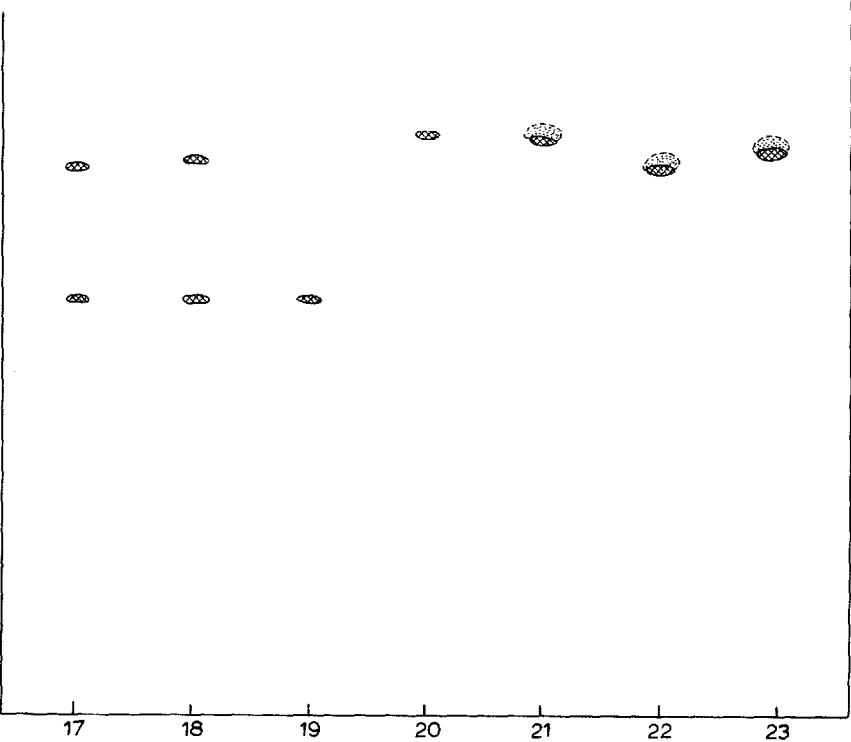
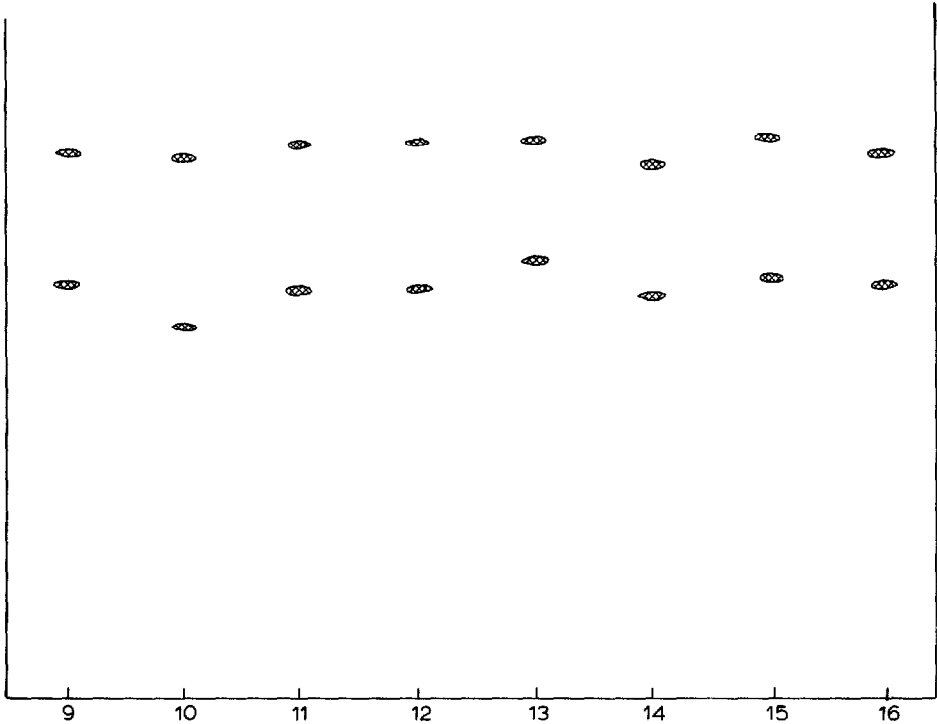


Fig. 1. Chromatogrammes de colorants dérivés de la cochenille. Couche mince: cellulose. Système solvant: butanol-1-eau-éthanol (2:2:1).

mier comprend les produits n^{os} 30 et 31, qui ne donnent qu'une seule tache de R_F 0.70-0.71, correspondant à la bixine de référence. Le deuxième groupe englobe les produits n^{os} 32-36, qui ne donnent également qu'une seule tache, mais de R_F 0.58:

TABLEAU II

ÉTUDE COMPARATIVE DE PLUSIEURS ÉCHANTILLONS D'UN MÊME COLORANT D'ORIGINES DIVERSES

Couche mince: silice.

Colorant	No.	Échantillons	Origines	R_F	Aspect
E 100 (solvant <i>o</i>)	1	Curcumine, poudre	<i>E</i>	0.44	Jaune
				0.37	Jaune
				0.29	Jaune
	2	Curcumine, poudre	<i>N</i>	0.44	Jaune
				0.37	Jaune
				0.29	Jaune
	3	Curcuma, poudre	<i>B</i>	0.44	Jaune
				0.37	Jaune
				0.29	Jaune
	4	Curcuma, extrait liquide, hydrosoluble	<i>C</i>	0.44	Jaune
				0.37	Jaune
				0.30	Jaune
	5	Curcuma, extrait liquide, liposoluble	<i>C</i>	0.44	Jaune
				0.37	Jaune
				0.29	Jaune
	6	Curcuma, résinoïde	<i>A</i>	0.45	Jaune
				0.37	Jaune
				0.30	Jaune
E 162 (solvant <i>m</i>)	40	Rouge de betterave, liquide, hydrosoluble	<i>C</i>	0.68	Rouge
				0.59	Jaune
	41	Rouge de betterave déshydraté	<i>C</i>	0.68	Rouge
				0.59	Jaune
	42	Rouge de betterave, poudre, hydrosoluble	<i>C</i>	0.68	Rouge
				0.59	Jaune
	43	Colorant rouge de betterave, liquide	<i>L</i>	0.69	Rouge
				0.59	Jaune
	44	Colorant rouge de betterave, poudre	<i>L</i>	0.68	Rouge
0.59				Jaune	
45	Colorant rouge de betterave concentré	<i>Q</i>	0.68	Rouge	
			0.58	Jaune	
46	Colorant rouge de betterave poudre	<i>Q</i>	0.68	Rouge	
			0.59	Jaune	
47	Rouge de betterave extrait sec	<i>S</i>	0.68	Rouge	
			0.59	Jaune	
E 160 b (solvant <i>l</i>)	30	Bixine pure	<i>D</i>	0.71	Jaune-orangé
				0.70	Jaune-orangé
	31	Colorant rocou, liquide liposoluble	<i>M</i>	0.70	Jaune-orangé
				0.50	Jaune-orangé
	32	Annatto, poudre, hydrosoluble	<i>C</i>	0.50	Jaune-orangé
				0.58	Jaune-orangé
	33	Annatto, poudre	<i>G</i>	0.58	Jaune-orangé
				0.58	Jaune-orangé
34	Rocou, liquide	<i>E</i>	0.58	Jaune-orangé	
			0.58	Jaune-orangé	
35	Colorant jaune rocou, liquide	<i>J</i>	0.58	Jaune-orangé	
			0.58	Jaune-orangé	
36	Colorant jaune végétal, liquide	<i>L</i>	0.58	Jaune-orangé	
			0.58	Jaune-orangé	
37	Rocou, liquide, hydrosoluble	<i>D</i>	0.70	Jaune-orangé	
			0.58	Jaune-orangé	

il est logique de penser que cette tache correspond à la norbixine, malgré l'absence de produit de référence. Enfin l'échantillon n° 37, qui donne simultanément les deux taches, avec les mêmes R_F , est un mélange de bixine et de norbixine. La définition des deux premiers groupes est en rapport avec la liposolubilité (bixine) ou l'hydrosolubilité (norbixine) annoncées par les divers fabricants. Mais on voit que l'échantillon n° 37 contient une quantité appréciable de bixine, liposoluble, malgré le caractère d'hydrosolubilité annoncé pour cet échantillon. Cependant, étant donné que le produit a été analysé en solution aqueuse, il est très vraisemblable que la bixine s'y trouve sous une forme hydrodispersible grâce à l'adjonction d'un agent tensio-actif.

La méthode permet par conséquent de distinguer des échantillons divers, soit qu'étant obtenus par des méthodes différentes ils n'aient effectivement pas la même composition, soit qu'étant d'origines variées ils n'aient pas le même degré de pureté. Elle peut donc servir à contrôler la fabrication des colorants, la purification devant être poursuivie jusqu'à l'obtention des seules taches correspondant aux molécules colorantes désirées.

Colorant E 120. La Fig. 1 montre d'assez grandes différences entre les résultats obtenus pour les divers produits examinés. Les échantillons n°s 9-16 donnent sur couche mince de cellulose avec le système *c* deux taches de R_F voisins de 0.48 et 0.63. Dans le cas des échantillons n°s 17 et 18, la deuxième de ces taches est accompagnée d'un halo jaune ou d'une tache jaune juxtaposée, la première tache restant inchangée. L'échantillon n° 19 ne montre que la tache de R_F 0.48, alors qu'au contraire l'échantillon n° 20 ne donne qu'une tache de R_F 0.67. Enfin les échantillons n°s 21-23 ne présentent que cette dernière tache mais accompagnée d'un halo jaune ou d'une tache jaune secondaire de R_F 0.72. Ce dernier groupe de produits correspond notamment à des échantillons provenant de fabricants de produits chimiques et destinés à la microscopie: la tache dont le R_F varie entre 0.61 et 0.67 paraît correspondre à l'acide carminique proprement dit.

La conclusion est ici analogue à celle précédemment exposée pour les colorants E 160 b.

Étude de mélanges binaires de colorants

Les industries pharmaceutiques et alimentaires recourent à des mélanges pour obtenir des colorations ou des nuances qui ne peuvent résulter de l'emploi d'un seul colorant. Des critères de stabilité, de compatibilité ou de prix de revient peuvent aussi orienter le choix de l'industriel vers des mélanges de colorants alors même que la coloration désirée pourrait être obtenue grâce à un seul produit.

Nous avons pour notre part procédé à des séparations de mélanges verts, violets et orangés, chacun d'eux étant obtenu à partir de colorants variés, indiqués plus haut. En recourant au système de développement *b* sur couche mince de silice, nous avons dans la plupart des cas obtenu des séparations convenables et des valeurs de R_F concordant avec celles mentionnées dans le Tableau I. Nous avons toutefois pu noter dans le cas du mélange vert n° 34.25 une migration un peu plus importante du rocou, les deux taches secondaires de R_F inférieurs étant d'autre part plus ou moins visibles. Par ailleurs, la cochenille n° 23 se trouvait légèrement retardée dans sa migration lorsqu'elle était incluse dans les mélanges violets et orangés.

Le système de développement *b*, qui donne satisfaction dans la majorité des cas, n'est toutefois pas le seul utilisable et il est possible de recourir, selon les colorants

considérés, aux conditions préconisées qui sont indiquées dans le Tableau I. Cependant, lorsque les mélanges de colorants contiennent des caroténoïdes autres que le β -carotène, qui ne migrent pas dans les systèmes solvants polaires, il est nécessaire d'effectuer une double migration, les caroténoïdes étant alors identifiés grâce à l'importance de leur déplacement dans les systèmes p , q ou r .

Applications dans le domaine alimentaire

Afin d'illustrer les applications possibles de notre étude dans le domaine alimentaire, nous avons appliqué la méthode au cas de yaourts colorés, préparés et traités comme indiqué plus haut.

Les taches principales des chromatogrammes obtenus ont été identiques, quant à leurs positions, à celles données par les solutions témoins. Cependant, il existait de légères différences par rapport aux témoins dans la coloration et la surface des taches. Ceci est vraisemblablement dû à une interaction entre les colorants et les protéines du yaourt. L'identification et l'évaluation de la pureté des colorants utilisés reste néanmoins très facile.

CONCLUSION

Les exemples qui viennent d'être présentés montrent qu'en dépit de sa simplicité, la chromatographie sur couche mince est bien adaptée au contrôle des colorants d'origine naturelle. Elle permet tout d'abord aux fabricants de ces substances de suivre les processus de préparation et notamment de poursuivre l'élimination des molécules colorantes voisines de celles qui les intéressent jusqu'à obtention d'un produit suffisamment pur. Aux utilisateurs que sont les industriels de la pharmacie et de l'alimentation, elle procure les moyens de s'assurer de l'identité et de la qualité commerciale de leurs matières premières, ainsi que de contrôler la composition des produits préparés. Enfin, en cas de doute à propos d'une denrée alimentaire, elle permet à l'expert de confirmer ou non la conformité à la composition annoncée.

RÉSUMÉ

Les auteurs ont étudié par chromatographie sur couche mince de nombreux échantillons de colorants naturels et ils présentent quelques-uns des résultats concernant 49 d'entre eux. Les valeurs approximatives des R_F sur couches de gel de silice et de cellulose sont rapportées pour certains des 18 solvants essayés. L'étude comparative de plusieurs échantillons des mêmes colorants (provenant de différents fabricants) montre des chromatogrammes identiques, ou au contraire très différents si les échantillons n'ont pas le même degré de pureté ou s'ils ont des compositions différentes en rapport avec les modalités de leur préparation. La méthode permet aussi d'identifier les deux colorants de mélanges binaires et elle a été adaptée aux aliments. Elle est donc utilisable pour guider les processus de purification des colorants naturels, pour les contrôler en tant que matières premières et pour les identifier dans les produits alimentaires élaborés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 *Pharmacopée Française*, Maisonneuve, Moulins-lès-Metz, 10ème éd., 1982.
- 2 E. Stahl, *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
- 3 K. Randerath, *Chromatographie sur Couches Minces*, Gauthier-Villars, Paris, 1971.
- 4 F. H. Foppen, *Chromatogr. Rev.*, 14 (1971) 133.
- 5 A. Marine Font et M. Alvarez Reverter, *Circ. Farm.*, 31 (1973) 383.
- 6 R. Casares, L. Villanúa, R. Garcia Olmedo et M. P. Villanúa, *Anal. Bromatol.*, 28 (1976) 103.
- 7 D. A. V. Dendy, *J. Sci. Food Agr.*, 17 (1966) 75.
- 8 A. Montag, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 116 (1962) 413.
- 9 M. Osadca, C. de Ritter et R. H. Bunnell, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 49 (1966) 1078.
- 10 G. Sievers et P. H. Hynninen, *J. Chromatogr.*, 134 (1977) 359.
- 11 E. Dujardin, A. Fouassin et H. Degraeve, *Rev. Ferm. Ind. Aliment.*, 30 (1975) 63.
- 12 G. Lehmann, P. Collet, H. G. Hahn et M. R. F. Ashworth, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 53 (1970) 1182.
- 13 B. H. Barritt et L. C. Torre, *J. Chromatogr.*, 75 (1973) 151.
- 14 A. J. Shrikhande et F. J. Francis, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 7 (1976) 193.
- 15 L. Bézanger-Beauquesne, M. G. Jessenne et N. Didry, *Labo-Pharma Probl. Tech.*, 28 (1980) 299.
- 16 *Pharmacopée Française*, Maisonneuve, Moulins-lès-Metz, 9ème éd., 1972.
- 17 B. M. Marmion, *Handbook of U.S. Colorants for Foods, Drugs, and Cosmetics*, Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1979.
- 18 Ch. B. Airaudo, A. Gayte-Sorbier et J. Andrianjafiniony, *Proceedings of the World Congress on Food-borne Infections and Intoxications, Berlin, June 29th-July 3rd 1980*, Paul Parey, Berlin, Hambourg, sous presse.
- 19 E. Minitiati, *Fitoterapia*, (1981) 267.