L'authenticité des sirops naturels de grenade par des techniques de laboratoire

par Jamila CHERIF, Abir ALATRACHE et Naceur AYED
Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie
Laboratoire des colorants naturels (EO2/C12 DGRST)
BP 676 - 1080 Tunis
Tunisie

RÉSUMÉ

L'étiquette d'un sirop de grenadine porte des inscriptions telles que : Colorant E124, jus de fruits rouges, etc... Par ce travail, nous avons proposé une méthode pratique révélant ces mentions et vérifiant l'authenticité d'un sirop naturel et ce par emploi de méthodes analytiques spécifiant le caractère naturel d'un marqueur : le colorant.

1. INTRODUCTION

La nomenclature internationale mentionne des termes que le consommateur n'est pas toujours en mesure de saisir. Par cette manipulation, nous projetons de définir certaines mentions attachées aux colorants rouges et aux sirops de grenadine, telles que : sirop de grenade et grenadine, colorant de constitution, additif naturel, synthétique, code d'un colorant, sa structure, sa dose journalière admise.

La grenadine authentique est naturellement colorée. Elle renferme six anthocyanines alors que les sirops industriels de grenadine sont colorés synthétiquement, par application des connaissances chimiques des colorants.

2. OBJECTIFS

On désire présenter quelques notions sur les colorants alimentaires et les sirops rouges et s'exercer sur ces mentions en travaux pratiques.

On se propose de réaliser une mise en œuvre d'une méthode de vérification de l'authenticité des sirops naturels de grenadine pour une réhabilitation de la qualité de ce

produit actuellement rare dans le commerce et ceci par emploi comme sonde des colorants anthocyaniques, des polyphénols et de certains éléments minéraux marqueurs.

3. NOTIONS SUR LES COLORANTS ALIMENTAIRES ROUGES ET CODES CEE

Les colorants constituent une très faible partie des boissons et des aliments. Ils sont responsables de certaines de leurs propriétés organoleptiques.
Suivant leurs origines, on classe les colorants rouges en :

– naturels, extraits de matières végétales ou animales : jus concentrés, poudres...

– produits obtenus par synthèse : à partir de substances de composition chimique identique à celle des colorants naturels, ou à partir de substances non encore identifiées dans la nature.

Le nombre de colorants alimentaires rouges est important comparé aux autres nuances (jaune, verte, bleue...).

Parmi les colorants rouges synthétiques autorisés figurent : l'azorubine, le rouge cochenille et l'érythrosine. Les colorants naturels regroupent la cochenille (ou acide carminique, le rouge de betterave (bétanine) et les anthocyanes (extraits des raisins le plus souvent) (figure 1).

Depuis 1970, l'industriel devrait juste écrire sur l'étiquette de son produit alimentaire «colorant» sans avoir à le spécifier. En raison des problèmes toxicologiques qu'ont posés certains colorants, la législation exige depuis le 1er janvier 1986, que toutes les denrées alimentaires portent obligatoirement mention sur l'étiquette des additifs colorants en E (E100 à E180, codes proposés par la communauté économique européenne) [1].

La plupart des colorants sont utilisés pour améliorer l'aspect du produit donc pour des raisons d'appétence.

Plusieurs recherches ont montré que certains colorants sont allergisants [2] pour une partie de la population tels que E122 (Azorubine) et E124 (Rouge cochenille) ; on a aussi rapporté dans une moindre mesure des allergies au colorant E127 (Erythrosine).
Les doses journalières admises (exprimées en mg par kg de poids corporel) sont :

– E122 (DJA = 0 à 4 mg/kg. p.c),

– E124 (DJA = 0 à 0,075 mg/kg. p.c),

– E127 (DJA = 0 à 2,5mg/kg. p.c).

La grenadine est un sirop rougeâtre fait à l'origine de jus de grenades [4].

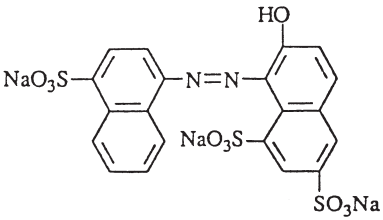
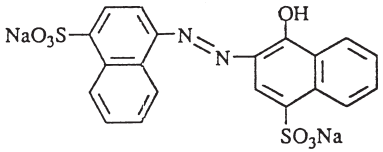
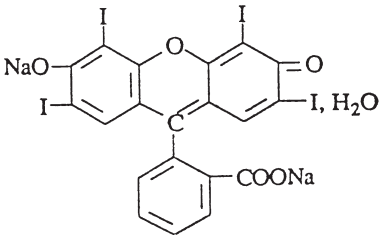
Rouge Cochenille ou rouge Ponceau 4R (monoazoïque) E124 CI : 16255 (color index) DJA : 0 à 0,075 mg/kg. p.c	
Azorubine ou carmoisine (monoazoïque) E122 CI : 14720 DJA : 0 à 4 mg/kg. p.c	
Erythrosine (dérivé du Xanthène) E127 CI : 45430 DJA : 0 à 2,5 mg/kg. p.c	

Figure 1a : Structures des colorants alimentaires synthétiques rouges, leurs codes et leurs doses journalières admises.

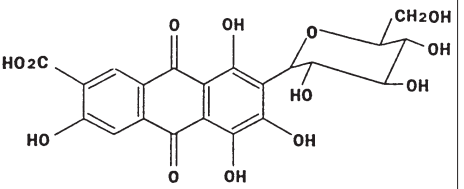
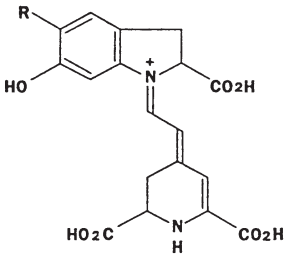
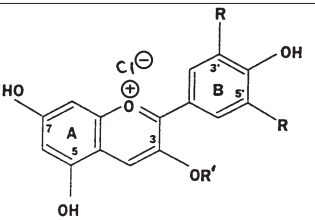
4. MATÉRIEL ET RÉACTIFS

Matériel

Trois sirops de grenadine ont été soumis à cette étude. Deux d'entre eux proviennent du commerce : le premier est coloré synthétiquement, le deuxième fabriqué synthétiquement, et coloré au naturel, le troisième est préparé de façon traditionnelle au laboratoire à partir de grenade et a servi de référence aux mesures.

Réactifs

Acétate de plomb, eau, acide chlorhydrique à 37 %, acide méthanoïque, méthanol (de qualités HPLC), ammoniaque concentrée, éthanoate d'éthyle, pyridine, eau oxygénée à 30 volumes, acide perchlorique, chlorure de lithium.

Cochenille ou Acide Carminique E120 CI : 75470	
Rouge de Betteraves ou Betanine E162	R = Glucose 
Anthocyanines E163	

R’ = Glycosyl

2- Phenyl benzopyrolium (Flavilium)

Les anthocyanines communes

Anthocyanidine	Abréviation	Substitution 3’	Substitution 5’
Pelargonidine	(Pg)	H	H
Cyanidine	(Cy)	OH	H
Delphinidine	(Dp)	OH	OH
Péonidine	(Pe)	OCH_3	H
Petunidine	(Pt)	OCH_3	OH
Malvidine	(Mv)	OCH_3	OCH_3

Figure 1b : Structures des colorants alimentaires naturels rouges et leurs codes internationaux.

5. MÉTHODES D'ANALYSE

5.1. Analyse des colorants naturels anthocyaniques

5.1.1. Analyse des colorants naturels

La coloration rouge du jus de grenade est due à la présence de pigments anthocyaniques [5] [6].

La détermination de la teneur en anthocyanes est réalisée à l'aide d'une méthode [3] qui ne peut être appliquée qu'à des dérivés de fruits renfermant ces pigments naturels.

En effet, dans le cas de sirops colorés au rouge de cochenille ou avec un autre produit de synthèse, la technique n'est pas utilisable étant donné l'interférence amenée par l'absorption du colorant synthétique avec celle des anthocyanes.

L'analyse qualitative des colorants présents dans les sirops échantillonnés a donc commencé par la recherche de la présence d'anthocyanes dans ces produits. Cela est réalisé par un test de précipitation à l'acétate de plomb (voir Annexe). Lorsque le test est positif, il est alors possible de mesurer la concentration du sirop en pigments par la méthode préconisée [3] : à partir d'un prélèvement de 25 g de sirop, la détermination de la teneur en anthocyanes a porté sur 10 ml d'échantillon hydroalcoolique acidifié par 0,02 ml d'acide chlorhydrique à 37 %. La mesure des absorbances a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre visible Philips PU 8800.

La teneur en anthocyanes exprimée en mg/100 g de produit, est donnée par l'expression : $A \times 10^4 \times f/850$ où A est la différence d'absorbance de la solution lue à 525 nm et à 595 nm, f est le facteur de dilution, 850 est le coefficient d'absorption du cyanidol glycoside.

5.1.2. Identification des anthocyanines

L'identification des anthocyanines a été faite par analyse chromatographique HPLC des colorants des sirops de grenadine. Pour cela, un chromatographe Merck-Hitachi L.3000, muni d'un détecteur à barrette de diodes de même marque et d'un enregistreur, a été utilisé. La colonne était du type Lichrochart 100 R.P. 18 (hauteur : 12,5 cm, diamètre : 0,4 cm) avec des particules de 5 µm.

Les solvants d'élution sont l'eau à 5 % d'acide méthanoïque (solvant A) et le méthanol (solvant B) ; l'élution a été faite avec un gradient en commençant par 15 % de solvant B pour atteindre 35 % de ce même solvant après quinze minutes ; ensuite, une élution isochratique a été poursuivie pendant vingt minutes avec un débit de 1 ml/min.

Les différentes anthocyanines ont été identifiées par comparaison avec un marqueur de référence correspondant à un jus de grenade purifié [7].

5.2. Analyse des colorants de synthèse

L'analyse des colorants de synthèse est basée sur la méthode ccm modifiée [8] [9].

Une prise d'essai de 5 g de sirop a été additionnée à 10 ml d'eau chaude et 2 ml d'ammoniaque à 28 % (densité = 0,895) ; après agitation et centrifugation, le surnageant a été filtré. Les colorants ainsi extraits des sirops ont été purifiés par fixation sur l'alumine acide, suivie d'une élution à l'ammoniaque concentré.

L'extrait purifié a été chromatographié sur plaque de cellulose Merck, à partir d'un dépôt de 2 ml effectué à l'aide d'un injecteur automatique Camag Limonat IV. L'élution a été faite par un mélange acétate d'éthyle, pyridine et eau (55/25/20).

La lecture des taches séparées a été effectuée avec un scanner Camag TLC Scanner II à λ = 525 nm et un enregistreur Hewlett Packard HP 3396. L'identification a été faite par comparaison avec les valeurs obtenues pour les colorants de référence chromatographiés dans les mêmes conditions et caractérisés chacun par un facteur de rétention spécifique.

La teneur en colorants a été déterminée par utilisation d'une courbe d'étalonnage construite à partir des densités optiques (DO) obtenues par la lecture sur scanner, correspondant à différentes concentrations du colorant E124 utilisé comme référence.

5.3. Analyse spectrométrique UV-Vis

Les courbes d'absorption UV-visible du vin et de produit agro-alimentaire riches en anthocyanes présentent des valeurs optimales (maximums à 280 nm et 520 nm et minimum à 420 nm). Ces valeurs permettent de calculer la nuance de coloration $NC = DO_{420\ nm} / DO_{520\ nm}$ et le taux de polyphénols $TP = DO_{280\ nm} / DO_{525\ nm}$.

Ces termes sont conventionnellement employés pour comparer et différencier les profils de deux séries de produits du type synthétique ou naturel tels que les miels purs ou frauduleux [10].

5.4. Analyse élémentaire par spectrométrie d'émission plasma à courant continu et spectrométrie d'absorption atomique

Les sirops étudiés ont été analysés quant à leur composition chimique en utilisant un spectromètre d'émission de plasma à courant continu, DCP (*Direct Current Plasma*), pour analyses atomiques du type ARL SSVB Spectraspan VB.

La minéralisation a été conduite pour tous les éléments comme suit : à 10 ml de sirop rouge ont été ajoutés 5 ml d'eau oxygénée H_2O_2 à 30 % puis le mélange a reposé pendant une nuit. A la solution décolorée alors obtenue ont été ajoutés 2 ml d'acide perchlorique $HClO_4$, après sa recoloration en rouge, le mélange a été chauffé pendant six heures à 65°C ; pendant un tel chauffage, la coloration s'atténue et devient jaune foncé. La solution a ensuite été placée dans une fiole jaugée dont le volume a été ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée et 5 ml de LiCl.

6. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les trois sirops étudiés sont de couleur rouge «grenadine». Cependant le sirop préparé de façon traditionnelle [11] a une nuance plus violacée.

6.1. Analyse des colorants dans les échantillons

6.1.1. Teneur en anthocyanes des sirops

• *Les sirops*

Le sirop 2 fabriqué synthétiquement et coloré au naturel et le sirop 3 préparé de façon traditionnelle, ont présenté un test positif à l'acétate de plomb (tableau 1), révélant donc la présence d'anthocyanes dont le taux est de 34 et 17 mg/100 g de sirop respectivement (tableau 2).

Cependant la chromatographie liquide à haute pression HPLC conduite sur l'échantillon 2 a montré un profil chromatographique d'anthocyanes, différent de ceux obtenus pour la grenade. Cet échantillon serait donc teinté artificiellement par des colorants naturels d'autres fruits rouges (framboise, groseille, cassis, etc.). Le sirop 3 fabriqué selon des procédés traditionnels, présente des chromatogrammes HPLC comparables à ceux d'un jus de grenade frais, c'est-à-dire composé de delphinidine 3,5-diglucoside, cyanidine 3,5-diglucoside, pelargonidine 3,5-diglucoside, delphinidine 3-glucoside, cyanidine 3-glucoside, pelargonidine 3-glucoside [12].

6.1.2. Colorants de synthèse

Le sirop de fabrication industrielle 1, négatif au test de précipitation par l'acétate de plomb (tableau 1), donc sans anthocyanes, tient probablement sa teinte de colorants

N° du sirop	Type de fabrication	Composition annoncée sur l'étiquette	Test à l'acétate de plomb	Facteur de rétention Rf (ccm)	Temps de rétention Tr (ccm)	Colorant identifié (Code CEE)	Teneur en colorant en mg/l
1	Industrielle	Grenadine naturelle, colorant autorisé	Négatif	0,21	0,506	E124	142
2	Industrielle	Jus concentré de fruits rouges sans colorant	Positif	–	pic large centré à 0,449	Anthocyanes	–
3	Traditionnelle	Jus de grenade et sucre	Positif	–	(*)	Anthocyanes de grenades	–
(*) Ce sirop a été analysé par HPLC, les deux autres par scanner CCM.							

Tableau 1 : Identification de la présence et de la nature de colorants dans des sirops de grenade préparés industriellement et fabriqués traditionnellement.

N° du sirop	DO × 10^3 λ = 525 nm	DO × 10^3 λ = 595 nm	Facteurs de dilution f(1)	Taux d'anthocyanes (2) en mg/100 g de jus
2	648	794	20	34
3	100	244	10	17

(1) f est le produit entre le facteur de dilution relatif à l'extraction du colorant et le facteur correspondant au coefficient de dilution au moment de la lecture de l'absorbance.

(2) Le taux d'anthocyanes est donné par l'expression A x 10^4 x f/850 où A est la différence d'absorbance de la solution lue à 525 nm et à 595 nm, f le facteur de dilution, 850 est le coefficient d'absorption du cyanidol glycoside.

Tableau 2 : Mesure du taux d'anthocyanes à partir de la mesure de densités optiques par spectrométrie UV-visible d'extraits alcooliques d'échantillons de deux sirops ayant donné une réponse positive au test de précipitation à l'acétate de plomb.

de synthèse ; l'utilisation du scanner de chromatographie sur couche mince a permis de déterminer que son facteur de rétention était de 0,21 et son temps de rétention de 0,50 (tableau 1). Or ces valeurs sont spécifiques du rouge cochenille E124 qui serait donc le colorant de synthèse introduit dans ces sirops. Dans cet échantillon la teneur en colorant est de 142 mg/l (tableau 1).

Le colorant E124 est un colorant synthétique alimentaire autorisé, appelé rouge de cochenille ou rouge ponceau 4R, correspondant à un colorant monoazoïque à l'état de sel, un trisodique d'un acide naphto-sulfonique. Cependant, l'appellation «sirop naturel» ne peut être donnée à des produits le contenant.

6.1.3. Coloration des sirops et taux de polyphénols

Les indices de nuance de couleur (NC) et les taux de polyphénols (TP) des trois sirops étudiés ont montré des valeurs différentes qui permettent de diviser globalement l'ensemble des produits en deux groupes (tableau 3). Le premier constitué du sirop 1, a la valeur la plus basse : NC est inférieure à 1 et TP inférieur à 5 ; ce résultat caractérise les sirops contenant des colorants synthétiques [4].

Le second lot comprend les sirops 2 et 3 ; NC est alors supérieure à 1 et TP varie entre 8,78 et 13,45 respectivement. Ces valeurs correspondent à des sirops contenant des colorants artificiels et naturels.

Les valeurs de la nuance de coloration et du taux de polyphénols constituent des marqueurs fiables pour déterminer la nature des colorants entrant dans la composition des sirops de grenadine d'après une étude que nous avons menée [6].

N° du sirop	**DO × 10^3 λ = 420 nm**	**DO × 10^3 λ = 520 nm**	**Nuance de couleur(1)**	**DO × 10^3 λ = 280 nm**	**DO × 10^3 λ = 525 nm**	**Taux de polyphénols(2)**
1	78	215	0,36	573	204	2,81(3)
2	100	99	1,01	860	98	8,78
3	261	215	1,21	780	58	13,45

(1) Nuance de couleur = DO_{420nm}/DO_{520nm}.

(2) Taux de polyphénols = DO_{280nm}/DO_{525nm}.

(3) Cette valeur n'est pas une teneur en polyphénols, mais correspond plutôt à une interférence du colorant de synthèse puisque ce sirop montre un test négatif à la précipitation à l'acétate de plomb.

Tableau 3 : Détermination de la nuance de couleur et du taux de polyphénols à partir de la mesure de densités optiques par spectroscopie UV-visible d'extraits aqueux des trois échantillons de sirops analysés.

6.1.4. Composition en éléments chimiques des sirops

L'analyse de la composition chimique des trois sirops étudiés a mis en évidence certains éléments pouvant servir d'indicateurs pour distinguer les sirops naturels des sirops synthétiques (tableau 4).

C'est le cas, tout d'abord, de l'élément phosphore (P) dont les teneurs sont bien plus élevées dans les échantillons 2 (82 mg/L) et 3 (109 mg/L) que dans le sirop 1 à colorant synthétique pour lequel le taux est de 29 mg/L.

A l'inverse, le strontium (Sr) présente les teneurs les plus élevées dans le sirop 1 contenant le colorant synthétique (1,270 mg/L) alors que sa concentration est plus faible dans le sirop 2 coloré naturellement (0,480 mg/L) et dans la préparation traditionnelle 3 (0,349 mg/L).

Certaines teneurs de divers constituants de l'eau utilisée pour la préparation des sirops industriels se sont révélées globalement plus faibles dans le sirop 3 préparé à partir de jus de grenade, donc sans ajout d'eau lors de sa fabrication, que dans les sirops préparés de façon industrielle (tableau 4). Les sirops contenant des colorants naturels à base de fruits rouges se sont alors classés entre ces deux lots, ce qui s'explique par le fait qu'il s'agit de boissons colorées artificiellement. Ainsi, les teneurs en fer (Fe), en calcium (Ca) et en silicium (Si), entrant dans la composition de l'eau, pourraient être également exploitées pour différencier les sirops échantillonnés.

L'élément cuivre (Cu) présente par ailleurs, des teneurs relativement plus élevées dans le sirop préparé de façon traditionnelle que dans les sirops industriels. Cela pourrait être lié à la richesse naturelle du jus de grenade en ces divers éléments [7] [8].

En revanche, de nombreux éléments qui ont également été dosés dans les jus échantillonnés au cours de ces analyses chimiques n'ont pas montré de différences significatives permettant de distinguer les divers procédés de fabrication des jus. Il s'agit, en particulier, des éléments aluminium, antimoine, argent, baryum, béryllium, bore, cadmium, chrome, cobalt, étain, germanium, manganèse, mercure, nickel, plomb, thorium, titane, vanadium et zirconium.

N° du sirop	P	Sr	Fe	Ca	Si	Cu	Na	K	Mg
1	29	1,27	41	91	0,800	0,380	496,0	54	28,8
2	82	0,480	46	33	0,580	0,210	335,0	160	15,5
3	109	0,349	2,8	14	0,050	0,490	360,0	101	27,1

Tableau 4 : Analyse de certains éléments permettant de différencier des sirops synthétiques de grenadines et des sirops naturels provenant de jus de grenade.

CONCLUSION

La fabrication traditionnelle des sirops de grenade, dont la consommation est fort ancienne, est maintenant souvent remplacée par des préparations industrielles utilisant une solution concentrée, sucrée et aromatisée, contenant des colorants synthétiques ou des extraits naturels différents de ceux trouvés dans la grenade. L'étiquette de ces produits, porte des inscriptions que nous avons développées en précisant la signification des termes colorants naturels, synthétiques, codes des additifs colorants.

L'étude analytique de trois sirops, dont deux de fabrication industrielle, trouvés dans le commerce, et un préparé de façon traditionnelle au laboratoire, a permis de mettre au point une méthode de contrôle du caractère authentique d'un sirop naturel en se basant sur l'analyse des anthocyanes.

La technique de chromatographie HPLC a identifié six constituants colorés, caractéristiques de la grenade : trois monoglucosylés en -3 et trois autres diglucosylés en -3,5 et dérivés de la delphinidine, de la pelargonidine et de la cyanidine.

Le rapport qui traduit la nuance de coloration des sirops a présenté une valeur supérieure à 1 pour le sirop naturel, et inférieure à 1 pour les produits synthétiques. Il peut donc être utilisé pour distinguer ces deux types de produits.

Le taux de polyphénols, faible pour les sirops synthétiques, et fort pour le produit naturel s'avère être également un bon indicateur de l'authenticité du sirop de grenade.

Par ailleurs, l'analyse de la composition en éléments minéraux des sirops est aussi susceptible de renseigner sur le caractère naturel d'un sirop et permet même de distinguer un produit synthétique d'une boisson additionnée d'extraits naturels grâce aux éléments phosphore, potassium, cuivre et magnésium qui sont des constituants naturels du jus de grenade.

Les éléments sodium, calcium, fer, silicium, ainsi que d'autres éléments, peuvent enfin conduire à identifier la technique de fabrication des sirops, effectuée soit à partir de jus naturel soit de solution aqueuse de sucre. Dans ce dernier cas les teneurs des éléments précités se trouvent élevées, surtout si l'eau utilisée présente une certaine dureté.

L'ensemble de ces résultats devrait permettre, à terme, de définir un procédé simple de détection de la qualité «naturelle» d'un sirop et donc de mettre cette méthode au service de l'enseignement pratique de la chimie.

Voici dévoilée l'identité de ces agents colorants secrets des produits bioalimentaires, masqués derrière leurs codes : E...

BIBLIOGRAPHIE

[1] S. GODET : *«Le dictionnaire des additifs alimentaires»* - Agent E version 1.00 pour windows, (1995) pp. 1-7.

[2] C.-L. MULTON : «*Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires»* - Tec doc - lavoisier, Apria, Paris (1984) pp. 1-680.

[3] Anonyme - *«Jus de fruits et légumes»* - Détermination conventionnelle de la teneur en anthocyanes - Recherche et identification Paris, France, Afnor, norme française V05-129 (1984).

[4] Anonyme - Le petit Robert - Dictionnaire de la langue française Canada, les dictionnaires Robert (1991) 2550 p.

[5] J.K. CHERIF, N. AYED, T. TLILI, T. BEN AMOR et A. NAFTI : Teneur des anthocyanes dans les grenades de Tunisie - Ann de l'Inrat Tunisie, 65 (1,2) (1992) pp. 207-211.

[6] J.K. CHERIF : «Les anthocyanes de la grenade, des raisins de cuve et de leur sous-produits : analyse et identification» - Tunis, Tunisie, université de Tunis, mémoire de thèse (1998), 120 p.

[7] M.I. GIL, J. CHERIF, N. AYED, F. ARTES et F.A. TOMAS BARBERAN : *«Influence of cultivar, maturity stage and geographical location on the juce pigmentation of Tunisian pomegranates»* - Z. Lebens Unters Forsch 201 (1995), pp. 361-364.

[8] M. KALLEL : *«Les colorants alimentaires de synthèse»* - Microbiologie et hygiène alimentaire, Tunis 3 (6) (1991) pp. 27-31.

[9] F. KRIFA, M. KALLEL et J. ALARY : *«Identification des colorants de synthèse dans des produits alimentaires tunisiens par chromatographie sur couche mince»* - Lyon, France, Société de pharmacie de Lyon, (1987) pp. 27-31.

[10] T. TLILI, A. NAFTI, M. BACCAR et N. AYED : «Fiche comparative de différents types de miels commercialisés en Tunisie», Tunisie, Ann de l'Inrat 60 (1.2) (1993) pp. 255-267.

[11] K. WARRAK : *«Les industries de conserves de fruits et légumes»* - Syrie, Dar el Maarifa (1991) pp. 1-55.

[12] J.K. CHERIF et N. AYED : «La grenadine et les sirops de grenade» - Fruits, vol. 52-2 Elsevier, Paris (1997) p. 99.70.

Annexe

Test des anthocyanes à l'acétate de plomb [3]

PRINCIPE

Isolement des anthocyanes à l'état de complexe avec un sel de plomb. L'analyse CCM sera opérée sur l'extrait anthocyanique obtenu à partir de ce complexe par l'alcool n-butylique.

RÉACTIFS

Solution d'acétate de plomb à 80 g/L, ammoniaque (densité = 0,90), solution d'acide chlorhydrique 2 mol/L, hexane pour chromatographie.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE

Introduire à l'aide d'une pipette 25 ml de l'échantillon pour essai dans un tube de centrifugation (50 ml). Ajouter 10 ml de la solution d'acétate de plomb et goutte à goutte l'ammoniaque jusqu'à un pH voisin de 10, en agitant avec une baguette de verre.

Centrifuger. Rejeter le liquide, laver le culot en le dispersant dans 10 ml d'alcool éthylique. Centrifuger à nouveau. Rejeter le liquide et recommencer l'opération ci-dessus. Sécher les parois du tube au moyen de papier-filtre. L'isolement des anthocyanes peut se faire en dispersant le culot (constitué par le complexe anthocyanes-plomb) dans 5 ml de butan-1 ol au moyen d'une baguette de verre et ajouter en agitant l'acide chlorhydrique jusqu'à ce que le précipité soit devenu complètement blanc. Centrifuger.

Verser le surnageant coloré obtenu précédemment dans une ampoule à décanter. Ajouter 30 ml d'hexane, agiter. Si la solution reste limpide, ajouter de nouveau de l'hexane par fraction de 10 ml en agitant entre chaque addition. Dès que la solution se trouble, laisser se déposer les fines gouttelettes colorées qui renferment les anthocyanes. Recueillir dans un petit tube, après complète décantation, la couche inférieure qui sera utilisée par la chromatographie des anthocyanes.