

COMMUNAUTÉ ÉCONOMIQUE EUROPÉENNE

INFORMATIONS

LE CONSEIL

DIRECTIVE DU CONSEIL

du 27 juin 1967

relative à l'emploi de certains agents conservateurs pour le traitement en surface des agrumes ainsi qu'aux mesures de contrôle pour la recherche et le dosage des agents conservateurs dans et sur les agrumes

(67/427/CEE)

LE CONSEIL DE LA COMMUNAUTÉ ÉCONOMIQUE EUROPÉENNE,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne, et notamment son article 100,

vu la proposition de la Commission,

vu l'avis de l'Assemblée⁽¹⁾,

vu l'avis du Comité économique et social⁽²⁾,

considérant que, suivant l'article 5 de la directive du Conseil, du 5 novembre 1963, relative au rapprochement des législations des États membres concernant les agents conservateurs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation

humaine⁽³⁾, modifié en dernier lieu par l'article 1^{er} de la directive du Conseil, du 14 décembre 1966⁽⁴⁾, les États membres peuvent maintenir, jusqu'au 30 juin 1967, les dispositions des législations nationales relatives au traitement en surface des agrumes par le biphényle (diphényle), l'orthophénylphénol et l'orthophénylphénate de sodium;

considérant que l'emploi de ces substances pour le traitement en surface des agrumes ne constitue pas un danger pour la santé si la dose résiduelle par kilogramme de fruits entiers n'excède pas 70 milligrammes de biphényle et 12 milligrammes d'orthophénylphénol et d'orthophénylphénate de sodium, exprimés en orthophénylphénol;

considérant, par ailleurs, qu'il convient d'indiquer le traitement effectué d'une façon appropriée à tous les stades de commerce;

⁽¹⁾ JO n° 63 du 3. 4. 1967, p. 990/67.

⁽²⁾ JO n° 64 du 5. 4. 1967, p. 1005/67.

⁽³⁾ JO n° 12 du 27. 1. 1964, p. 161/64.

⁽⁴⁾ JO n° 233 du 20. 12. 1966, p. 3947/66.

considérant que l'autorisation sur le plan communautaire des trois substances considérées suppose également la fixation de règles communes pour le contrôle officiel des agrumes traités;

considérant que la mise en application par les États membres des dispositions de la présente directive ne peut être réalisée qu'après une période de transition; qu'il convient, dès lors, de maintenir jusqu'à la fin de cette période les dispositions des législations nationales relatives au traitement en surface des agrumes par les trois agents conservateurs considérés;

considérant qu'il ne convient pas d'imposer à un État membre l'obligation d'autoriser l'emploi d'un agent conservateur dans les denrées alimentaires produites et consommées sur son propre territoire lorsqu'il n'y a pas de nécessité technologique qui justifie cet emploi,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

La directive du Conseil, du 5 novembre 1963, relative au rapprochement des législations des États membres concernant les agents conservateurs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine est modifiée comme suit:

1. A l'article 2 paragraphe 2, la deuxième phrase est remplacée par le texte suivant:

« Toutefois, la législation d'un État membre ne peut exclure totalement l'emploi de l'un des agents conservateurs énumérés à l'annexe que dans le cas où il n'y a pas de nécessité technologique d'emploi de celui-ci dans les denrées alimentaires produites et consommées sur son propre territoire. »

2. Les agents conservateurs suivants sont ajoutés à ceux énumérés à la section I de l'annexe:

Numérotation de la C.E.E.	Dénomination	Conditions d'emploi
E 230	Biphényle (Diphényle)	a) Exclusivement pour le traitement en surface des agrumes; b) au moment de la mise dans le commerce des agrumes i) le taux résiduel par kg d'agrumes (fruits entiers) ne doit pas dépasser: pour le biphényle: 70 mg et pour l'orthophénylphénol et l'orthophénylphénate de sodium, isolément ou pris ensemble, exprimés en orthophénylphénol: 12 mg; ii) le traitement doit être indiqué: — dans le commerce de gros, sur les factures et sur une face extérieure des emballages, par la mention: « Conservé au moyen de ... » suivie du nom de la ou des substances utilisées, — dans le commerce de détail, par une indication visible assurant de manière non équivoque, l'information du consommateur.
E 231	Orthophénylphénol	
E 232	Orthophénylphénate de sodium	

3. L'alinéa b) de l'article 5 est supprimé.

Article 2

Les États membres prennent toutes mesures utiles pour que le prélèvement des échantillons et les analyses pour la recherche et le dosage du biphenyle, de l'orthophénylphénol et de l'orthophénylphénate de sodium dans et sur les agrumes soient effectués conformément aux dispositions des annexes I, II, III et IV de la présente directive.

Article 3

1. Les États membres mettent en vigueur les mesures nécessaires pour se conformer à la présente directive le 1^{er} juillet 1968 au plus tard et en informant immédiatement la Commission.

2. Jusqu'à la date du 1^{er} juillet 1968, les États membres peuvent maintenir les dispositions des législations nationales relatives au traitement en surface des agrumes par le biphenyle, l'orthophénylphénol et l'orthophénylphénate de sodium.

Article 4

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 27 juin 1967.

Par le Conseil

Le président

R. VAN ELSLANDE

ANNEXE I

**MODALITÉS DE PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS D'AGRUMES POUR
LE CONTRÔLE DES AGENTS CONSERVATEURS**

A. Prélèvement des échantillons

I. Les prélèvements sont effectués selon les méthodes scientifiques permettant d'assurer l'obtention d'échantillons représentatifs du lot à contrôler.

II. Les échantillons doivent répondre au moins aux exigences suivantes:

1. *Marchandise sous emballage* (caisses, cartons et récipients similaires)

Nombre de récipients dans le lot	Jusqu'à 20	De 21 à 500	De 501 à 1000	Au- dessus de 1000
Nombre minimum de récipients à prélever	1	2	3	4
Masse en kg de fruits à prélever par récipient	2	2	2	2

2. *Marchandise en vrac*

Masse du lot en kg	Jusqu'à 20	De 21 à 500	Au- dessus de 500
Masse à prélever en kg	2	4	8

III. On entend par lot: une partie de livraison présentant les mêmes caractéristiques telles que variété, degré de maturité, type d'emballage.

B. Conditionnement et transmission des échantillons

1. Les échantillons sont introduits dans des récipients hermétiques;
2. Les récipients sont scellés;
3. Les échantillons ainsi conditionnés sont transmis le plus rapidement possible aux laboratoires de contrôle.

ANNEXE II

RECHERCHE DES RÉSIDUS DE BIPHÉNYLE, ORTHOPHÉNYLPHÉNOL ET ORTHOPHÉNYLPHÉNATE DE SODIUM DANS LES ÉCORCES D'AGRUMES

1. Objet et domaine d'application

La méthode décrite ci-après permet de vérifier la présence de résidus de biphenyle, d'orthophénylphénol (OPP) ou d'orthophénylphénate de sodium dans les écorces d'agrumes. Sa limite de sensibilité est, en valeur absolue, de l'ordre de 5 μg pour le biphenyle et de 1 μg pour l'OPP ou l'orthophénylphénate de sodium, ce qui équivaut respectivement à 5 mg de biphenyle (5 ppm) et 1 mg de OPP (1 ppm) dans les écorces de 1 kg d'agrumes.

Le traitement des agrumes par les produits susmentionnés entraîne la présence de résidus, en majeure partie, dans les écorces des fruits. Le dosage de ces résidus dans les fruits entiers ne s'avère donc nécessaire que dans les cas où leur présence est décelée dans les écorces.

2. Principe

Les écorces sont extraites par le dichlorométhane en milieu acide. L'extrait est concentré et chromatographié en couche mince sur gel de silice. La présence de biphenyle, d'orthophénylphénol ou d'orthophénylphénate de sodium est mise en évidence par fluorescence et réactions de coloration.

3. Réactifs

cyclohexane p.a.,

dichlorométhane p.a.,

acide chlorhydrique à 25% (p/v),

gel de silice GF 254 Merck ou équivalent,

solution acétonique de 2,4,7-trinitrofluorénone (Fluka, B.D.H. ou équivalent) à 0,5% (TNF),

solution éthanolique de 2,6-dibromo-benzoquinone-4-chlorimide à 0,1% (durée maximale de conservation: une semaine au réfrigérateur),

solution concentrée d'ammoniac, d:0,9,

solution étalon de biphenyle pur à 1% dans le cyclohexane,

solution étalon d'orthophénylphénol pur à 1% dans le cyclohexane.

4. Appareillage

Mixer,

ballon de 250 ml, à col rodé, avec réfrigérant à reflux,

évaporateur à pression réduite,

micropipettes,

appareillage de chromatographie en couche mince avec plaques de 20 x 20 cm,

lampe U.V. (254 nm): l'intensité doit être telle qu'une tache de 5 μg de biphenyle soit perceptible,

pulvérisateur à réactifs,

étuve.

5. Mode opératoire

a) Préparation de l'échantillon et extraction

Les fruits constituant la totalité de l'échantillon prélevé pour le contrôle sont coupés en deux. Une moitié de chaque fruit est réservée au dosage des résidus de biphenyle et (ou) d'orthophénylphénol. On prélève sur les autres moitiés des fragments d'écorce pour obtenir un échantillon de 80 g environ. Ces fragments sont coupés en morceaux, broyés dans le mixer et introduits dans le ballon de 250 ml; on y ajoute 1 ml d'acide chlorhydrique à 25% et 100 ml de dichlorométhane. Le mélange est chauffé sous reflux durant 10 minutes. Après refroidissement et rinçage du réfrigérant avec 5 ml environ de dichlorométhane, on filtre sur filtre plissé. On porte la solution dans l'évaporateur et on ajoute quelques pierres poreuses. La solution est concentrée sous pression réduite, à la température de 60° C, jusqu'à obtention d'un volume final de 10 ml environ. Si l'on fait usage d'un évaporateur rotatif, le ballon doit être maintenu en position fixe, pour éviter des pertes en biphenyle par formation d'un film du produit sur la paroi supérieure du ballon.

b) Chromatographie

On introduit dans un mixer 30 g de gel de silice et 60 ml d'eau. On mélange durant une minute, on coule ensuite le mélange sur 5 plaques chromatographiques et on l'étale pour former une couche de 0,250 mm environ d'épaisseur. Les plaques ainsi recouvertes sont soumises, durant 15 minutes, à un courant d'air chaud et ensuite introduites dans une étuve où elles sont maintenues, durant 30 minutes, à 110° C.

Après refroidissement, chaque plaque est divisée en bandes de 2 cm de largeur, par des traits parallèles pénétrant le recouvrement jusqu'à la surface de la plaque. On dépose sur chaque bande, à environ 1,5 cm du bord et en une série de gouttes juxtaposées, 50 µl de l'extrait à analyser. Une bande au moins est réservée aux témoins constitués par un dépôt de 1 µl (soit 10 µg) des solutions étalons de biphenyle et d'orthophénylphénol.

Les plaques chromatographiques sont développées à l'aide d'un mélange de cyclohexane et de dichlorométhane (25:95) dans les cuves préalablement tapissées intérieurement d'un papier-filtre.

c) Détection et identification

La présence de biphenyle et d'orthophénylphénol se marque par l'apparition de taches en lumière U.V. (254 nm). L'orthophénylphénate de sodium ayant été transformé en orthophénylphénol lors de l'extraction en milieu acide, sa présence ne se différencie pas de celle de l'orthophénylphénol. L'identification des produits est effectuée de la manière suivante:

- i) le *biphenyle* donne une tache jaune, à la lumière du jour, par pulvérisation avec la solution de TNF;
- ii) l'*orthophénylphénol* donne une tache bleue par pulvérisation avec la solution de 2,6-dibromo-benzoquinone-4-chlorimide, suivie d'un passage rapide dans un courant d'air chaud et d'une exposition dans une atmosphère saturée d'ammoniac.

ANNEXE III

DOSAGE DES RÉSIDUS DE BIPHÉNYLE DANS LES AGRUMES

1. Objet et domaine d'application

La méthode décrite ci-après permet de doser les résidus de biphenyle dans les agrumes (fruits entiers). La marge d'erreur des résultats est de $\pm 10\%$ pour les teneurs en biphenyle supérieures à 10 mg par kg de fruits (10 ppm).

2. Principe

Après distillation en milieu acide et extraction par le cyclohexane, l'extrait est chromatographié en couche mince sur gel de silice. Le chromatogramme est développé, le biphenyle est élué et déterminé spectrophotométriquement à 248 nm.

3. Réactifs

Acide sulfurique concentré,
émulsion antimousse à base de silicone,
cyclohexane p.a.,
hexane p.a.,
éthanol p.a.,
sulfate de sodium anhydre,
gel de silice GF 254 Merck ou équivalent,
solution étalon de biphenyle pur à 1% dans le cyclohexane: diluer avec du cyclohexane afin d'obtenir les trois solutions, suivantes: (a) 0,6 µg/µl; (b) 1 µg/µl; (c) 1,4 µg/µl

4. Appareillage

Mixer de 1 l,
ballon à distiller de 2 l avec séparateur du type Clevenger⁽¹⁾ modifié et réfrigérant à reflux,
ballon jaugé de 10 ml,
micropipettes de 50 µl,
appareillage de chromatographie en couche mince avec plaques de 20×20 cm,
étuve,
centrifugeuse avec tubes coniques de 15 ml,
spectrophotomètre U.V.

5. Mode opératoire

a) Préparation de l'échantillon et extraction

Les fruits constituant la totalité de l'échantillon prélevé pour le contrôle sont coupés en deux. Une moitié de chaque fruit est réservée à la recherche des résidus de biphenyle, d'OPP ou d'orthophénylphénate de sodium. Les autres moitiés sont rassemblées, hachées dans un moulin ou broyées jusqu'à obtention d'un mélange homogène. On en prélève au moins deux sous-échantillons de 200 g sur lesquels on effectue l'analyse selon le procédé indiqué ci-après. Chaque sous-échantillon est introduit dans un mixer avec 100 ml d'eau et broyé à faible vitesse durant quelques secondes. On y ajoute une quantité d'eau telle que le volume du mélange atteigne les $\frac{3}{4}$ du contenu du mixer. On broie ensuite à grande vitesse durant 5 minutes. La purée ainsi obtenue est transvasée dans le ballon à distiller de 2 l. On rince le mixer avec de l'eau et on ajoute les eaux de rinçage au contenu du ballon. (La quantité totale d'eau à utiliser pour le broyage et le rinçage est de 1 l). Le mélange est additionné de 2 ml d'acide sulfurique, de 1 ml d'émulsion antimousse et de quelques pierres poreuses. On ajuste le séparateur et le réfrigérant sur le ballon. On introduit dans le séparateur de l'eau distillée, jusqu'à ce que le niveau de l'eau dépasse nettement l'embranchement inférieur du tube latéral de retour, et ensuite 7 ml de cyclohexane. On distille durant 2 heures environ. On recueille ensuite le contenu du séparateur dans le ballon jaugé de 10 ml, on rince le séparateur avec 1,5 ml environ de cyclohexane, on ajoute la solution de rinçage au contenu du ballon et on porte au volume avec du cyclohexane. On introduit, pour terminer, un peu de sulfate de sodium anhydre et on agite.

b) Chromatographie

On introduit dans un mixer 30 g de gel de silice et 60 ml d'eau. On mélange durant une minute, on coule ensuite le mélange sur 5 plaques chromatographiques et on l'étale pour former une couche de 0,250 mm environ d'épaisseur. Les plaques ainsi recouvertes sont soumises, durant 15 minutes, à un courant d'air chaud et sont introduites dans une étuve où elles sont maintenues, durant 30 minutes, à 110°C. Après refroidissement, chaque plaque est divisée en 4 bandes de 4,5 cm de largeur, par des traits parallèles pénétrant le recouvrement jusqu'à la surface de la plaque. On dépose, à 1,5 cm environ du bord de la plaque et en séries de gouttes juxtaposées, 50 µl de l'extrait à analyser sur l'une des bandes et, sur chacune des trois autres bandes, 50 µl des solutions étalons (a), (b) et (c), correspondant respectivement à des doses de biphenyle de 30, 50 et 70 µg.

(1) Voir figure à la page 9.

Si l'on procède à des analyses en série, on peut omettre de déposer sur chaque plaque les solutions étalons et s'en référer, pour la courbe d'étalonnage, à la moyenne des valeurs obtenues à partir de 5 plaques au moins, avec les mêmes doses étalons;

c) *Développement des chromatogrammes et élution*

Les chromatogrammes sont développés sur une hauteur de 17 cm avec de l'hexane dans les cuves préalablement tapissées intérieurement d'un papier-filtre. Les plaques sont séchées à l'air libre. Les zones dans lesquelles se localise le biphényle sont repérées en lumière U.V. à 254 nm, et délimitées en rectangles d'égales superficies.

Les surfaces ainsi délimitées sont immédiatement raclées, à l'aide d'une spatule, sur toute l'épaisseur de la couche de support. Le biphényle en est extrait par 10 ml d'éthanol, durant 10 minutes, en agitant à plusieurs reprises. On transvase dans les tubes à centrifugation et on centrifuge, durant 5 minutes, à 2500 tours par minute.

On prélève de la même manière une zone témoin de même dimension. Dans le cas d'analyses en série, on prélève cette zone dans une bande vierge de la plaque; dans le cas d'analyses individuelles, on la prélève dans une bande occupée par un étalon en dessous de la zone contenant le biphényle.

d) *Détermination spectrophotométrique*

On décante le liquide surnageant dans les cellules du spectrophotomètre et on détermine l'extinction à 248 nm, par comparaison avec un extrait témoin provenant d'une zone chromatographique exempte de biphényle.

6. Calcul des résultats

On dresse une courbe d'étalonnage en prenant respectivement comme coordonnées les doses de biphényle de 30, 50 et 70 μg et les extinctions correspondantes, déterminées au spectrophotomètre. La courbe ainsi obtenue est une ligne droite qui passe par l'origine. Ce graphique permet la lecture directe en ppm des teneurs en biphényle des échantillons, à partir des valeurs d'extinction de leurs extraits.

ANNEXE IV

DOSAGE DES RÉSIDUS D'ORTHOPHÉNYLPHÉNOL ET D'ORTHOPHÉNYLPHÉNATE DE SODIUM DANS LES AGRUMES

1. Objet et domaine d'application

La méthode décrite ci-après permet de doser les résidus d'orthophénylphénol (OPP) et d'orthophénylphénate de sodium dans les agrumes (fruits entiers). Les résultats sont entachés d'une erreur par défaut dont la valeur moyenne se situe entre 10 et 20% pour une teneur en OPP ou orthophénylphénate de sodium de l'ordre de 12 ppm.

2. Principe

Après distillation en milieu acide et extraction par l'éther di-isopentylique, l'extrait est purifié et traité par une solution de 1-phényl-2,3-diméthyl-4-aminopyrazolone (5) (= 4-aminoantipyrine). Il se développe une coloration rouge dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à 510 nm.

3. Réactifs

- Acide phosphorique à 70%,
émulsion antimousse à base de silicone,
éther di-isopentylique p.a.,
cyclohexane purifié: agiter 3 fois avec une solution d'hydroxyde de sodium à 4%, laver 3 fois avec de l'eau distillée,
solution d'hydroxyde de sodium à 4%,
solution tampon à pH 10,4: introduire dans un ballon jaugé de 2 l: 6,64 g d'acide borique, 8,00 g de chlorure de potassium et 93,1 ml de solution d'hydroxyde de sodium 1 N; mélanger et porter au trait avec de l'eau distillée,
réactif I: dissoudre 1,0 g de 1-phényl-2,3-diméthyl-4-aminopyrazolone (5) (= 4-aminoantipyrine) dans 100 ml d'eau distillée,
réactif II: dissoudre 2,0 g de ferrocyanure de potassium dans 100 ml d'eau distillée. Les réactifs I et II doivent être conservés en flacons de verre brun et ne sont stables que durant 14 jours environ,
gel de silice,
solution étalon: dissoudre 10 mg d'OPP pur dans 1 ml de NaOH 0,1 N; porter à 100 ml avec une solution de borate de sodium 0,2 m (1 ml = 100 µg). Pour la courbe d'étalonnage, diluer à 1:10 avec la solution tampon.

4. Appareillage

- Moulin à hacher ou broyeur,
mixer,
ballon à distiller de 1 l avec séparateur du type Clevenger⁽¹⁾ modifié et réfrigérant à reflux,
bain à infra-rouge,
ampoule à décanter de 200 ml,
cylindres gradués de 25 et 100 ml,
ballons jaugés de 25 et 100 ml,
pipettes de 1 à 10 ml,
pipettes jaugées de 0,5 ml,
spectrophotomètre avec cuvettes de 5 cm.

5. Mode opératoire

Les fruits constituant la totalité de l'échantillon prélevé pour le contrôle sont coupés en deux. Une moitié de chaque fruit est réservée à la recherche des résidus de biphenyle, d'OPP ou d'orthophénylphénate de sodium. Les autres moitiés sont rassemblées, hachées dans un moulin ou broyées jusqu'à obtention d'un mélange homogène. On en prélève au moins deux sous-échantillons de 250 g sur lesquels on effectue l'analyse selon le procédé indiqué ci-après.

Chaque sous-échantillon est introduit dans un mixer avec 500 ml d'eau et broyé jusqu'à obtention d'une purée homogène impalpable dans laquelle les cellules huileuses ne sont plus perceptibles. On prélève, selon la teneur présumée en OPP, 150 à 300 g de la purée et on les introduit dans le ballon à distiller de 1 l à l'aide d'une quantité d'eau telle que le mélange soit porté à 500 g dans le ballon. Après addition de 10 ml d'acide phosphorique à 70%, de quelques pierres poreuses et de 0,5 ml d'émulsion antimousse, on ajuste le séparateur et le réfrigérant sur le ballon. On introduit dans le séparateur 10 ml d'éther di-isopentylique et on chauffe lentement le ballon dans le bain infra-rouge en évitant la cuisson de la purée ou la formation de mousse. On distille durant 6 heures environ. On verse ensuite le contenu du séparateur dans l'ampoule à décanter de 200 ml, on rince

(1) Voir figure à la page 9.

le séparateur et le réfrigérant avec 60 ml de cyclohexane et, ensuite, avec 60 ml d'eau. On ajoute les liquides de rinçage au contenu de l'ampoule à décanter. On agite vigoureusement et, après séparation des phases, on décante et on élimine la phase aqueuse.

Pour extraire l'OPP, la phase organique est agitée vigoureusement 5 fois, chaque fois durant 3 minutes avec 10 ml d'hydroxyde de sodium à 4%. Les solutions alcalines sont réunies, neutralisées à pH 9-10 avec de l'acide phosphorique en présence de papier à la phénolphthaléine, et complétées à 100 ml avec de l'eau distillée. On ajoute une pincée de gel de silice, afin de clarifier la solution qui présente un léger trouble, on agite et on filtre ensuite sur un filtre sec à grains fins. Étant donné que le maximum de précision et d'exactitude dans le développement de la coloration est atteint avec des quantités d'OPP comprises entre 10 et 70 μg , on prélève à l'aide d'une pipette une partie aliquote de 0,5 à 10 ml de solution en tenant compte des quantités d'OPP que l'on doit s'attendre à trouver. On introduit la prise dans un ballon jaugé de 25 ml; on y ajoute 0,5 ml du réactif I, 10 ml de la solution tampon et ensuite 0,5 ml du réactif II. On porte au trait avec la solution tampon et on agite énergiquement.

Après 5 minutes, on mesure au spectrophotomètre l'extinction de la coloration rouge à 510 nm par comparaison avec un témoin exempt d'extrait. L'intensité de la coloration ne se modifie pas dans les 30 minutes. L'évaluation est effectuée en fonction des valeurs de la courbe d'étalonnage dressée dans les mêmes conditions avec la solution étalon d'OPP.

6. Observations

Pour chaque analyse, il est recommandé de faire la détermination spectrophotométrique en double avec des volumes différents de l'extrait alcalin neutralisé.

Les agrumes non traités donnent, selon cette méthode, des valeurs à blanc pouvant atteindre 0,5 ppm pour les oranges et 0,8 ppm pour les citrons.

CLEVENGER

(Annexe III, Chapitre 4;

Annexe IV, Chapitre 4)

