

Verdeling van vluchtige stof in verpakking en ontwerp slow release systeem met cyclodextrinen

Stageverslag

12 maart 2001

Ameing Tang



Verdeling van vluchtige stof in verpakking en ontwerp slow release systeem met cyclodextrinen

Stageverslag

12 maart 2001

Ameing Tang
Wageningen, 4 december 2000 – 12 maart 2001

Stagebegeleiders:
R. Jaeger
E.U. Thoden van Velzen

ATO B.V.
Agrotechnologisch Onderzoeksinstituut
Bornsesteeg 59
Postbus 17
6700 AA Wageningen
Tel: 0317-475024
Fax: 0317-475347

2240574

Samenvatting

Uit onderzoek is gebleken dat er een aantal natuurlijke vluchtige stoffen uit planten een anti-microbiële werking hebben bij bepaalde producten. Het is interessant om te bekijken of deze stoffen ook in een verpakking toegepast kan worden met als doel om de houdbaarheid van producten te verlengen.

Er zijn twee stoffen gekozen om te onderzoeken, t-2-hexenal en D-carvon. Van deze twee stoffen is bekend dat ze een anti-microbiële werking hebben.

Het is belangrijk om te weten of een stof die in de verpakking ingebracht wordt zich goed verdeelt over de verpakking. Hiervoor zijn er twee proeven ingezet. De eerste was met een kartonnen doos en kunstcitroenen. Dit is om een product in een verpakking na te bootsen. Hieraan is de actieve stof toegevoegd en gekeken of dit een goede verdeling gaf. Om een beter beeld te krijgen van de verdeling is er ook een proef ingezet waarbij de actieve stof in een metalen pot werd ingebracht. Bij een metalen pot zijn er minder variabelen. Er is gevonden dat carvon zich traag over een verpakking verdeelt. Release vanaf een punt zou voor deze stof niet geschikt zijn, omdat er dan geen goede verdeling in de verpakking ontstaat. Hexenal verdeelt zich wel goed over de verpakking.

Voor het ontwerp van een slow-releasesysteem voor de actieve stoffen is gekeken naar cyclodextrinen. Er is eerst geprobeerd om de actieve stoffen te complexeren met cyclodextrinen, vervolgens is er gekeken met H-NMR hoeveel er in het uiteindelijke poeder overbleef. Alle cyclodextrinen konden met beide gekozen stoffen complexeren. Voor carvon gaven β - en γ -cyclodextrine de beste 1:1 complexen. Met α -cyclodextrine lag het percentage rond de 36%. Bij hexenal lag het percentage met α -cyclodextrine rond de 34% met de andere twee was het niet duidelijk.

Voorwoord

Na een kleine omweg ben ik uiteindelijk terecht gekomen bij de groep PTL (Packaging, Transport and Logistics) bij het ATO om een drie maanden durende stage te doen. Ik kwam terecht bij een hele enthousiaste en leuke groep mensen en ik heb met plezier het onderzoek gedaan. Door middel van de vergaderingen en presentaties die ik bij mocht wonen heb ik veel geleerd over de organisatie en de onderzoeken die hier lopen.

Hierbij zou ik graag een aantal mensen willen bedanken. Ulphard en Raimund voor hun goede begeleiding en nuttige discussies. Pieter van der Meer voor het maken van de vele H-NMR spectra en de goede uitleg ervan. Janine Hermans voor de gezellige gesprekken en hulp bij mijn proefjes. En de rest van de mensen van de PTL groep voor de gezellige lunches, taarten en leuke verhalen. Ten slotte nog Carina Ponne en Jacques Roozen voor het regelen van mijn stage in de beginfase.

Ameing Tang

Wageningen, 15 maart 2001

Inhoudsopgave

1 Inleiding	2
1.1 Actieve verpakkingen	2
1.2 Cyclodextrinen	3
1.3 Vluchtige stoffen	4
1.3.1 D-Carvon	4
1.3.2 Trans-2-hexenal	4
2 Materiaal en methoden	5
2.1 Materiaal	5
2.2 Methoden	5
2.2.1 Het variëren van actieve stof in een verpakking	5
2.2.2 Verdeling van vluchtige stof in een verpakking	6
2.2.3 Verdeling van een vluchtige stof in een gesloten metalen pot	6
2.2.4 Cyclodextrinen complexatie proef	7
2.2.5 Releaseproeven	7
3 Resultaten en discussie	8
3.1 Het variëren van actieve stof in een lege verpakking	8
3.2 Verdeling van vluchtige stof in een doos	9
3.3 Verdeling van een vluchtige stof in een gesloten metalen pot	9
3.4 Standaard complexatie proef	9
3.5 H-NMR metingen aan cyclodextrinecomplexen	10
3.6 Releaseproeven	11
4. Conclusies en aanbevelingen	13
4.1 Conclusies	13
4.2 Aanbevelingen	13
Geraadpleegde literatuur	14
Bijlagen	15

1 Inleiding

1.1 Actieve verpakkingen

Consumenten willen tegenwoordig dat de producten vers, gezond, natuurlijk en puur zijn (Sloan, 1998). Hiervoor zijn er nu veel vers verpakte producten in de supermarkt te koop. Vers verpakte producten kunnen echter snel bederven. Om de houdbaarheid van deze producten te verlengen zou er aan de verpakking veranderingen aangebracht kunnen worden. Een mogelijkheid is om de bacteriën die zorgen voor het bederf in hun groei te remmen of af te doden. Deze techniek wordt anti-microbial packaging genoemd, een vorm van active packaging. Bij actieve verpakkingen speelt de verpakking een actieve rol in de bepaling van de gassamenstelling in de verpakking en interactie met het product. Het doel is om de houdbaarheid van het product te verlengen waarbij de nutritionele kwaliteit zo min mogelijk achteruit gaat. (Labuza, 1989)

Van een aantal natuurlijke vluchtige stoffen is bekend dat ze een anti-microbiële werking hebben. Deze stoffen worden door de planten zelf gemaakt als verdediging tegen bacteriën. Het feit dat de stoffen van nature aanwezig zijn kan de acceptatie van de nieuwe technieken vergemakkelijken.

De vluchtige stoffen zullen in combinatie met modified atmosphere verpakkingen gebruikt worden. Bij deze techniek wordt er gebruik gemaakt van een gewijzigde gassamenstelling in de verpakking en verpakkingsmateriaal dat permeabel is voor een aantal gassen waardoor de gassamenstelling in de verpakking gehandhaafd blijft. Men stuit al snel op het probleem dat door de vluchtigheid van de actieve stoffen, deze stoffen vrij makkelijk uit de verpakking kunnen diffunderen. Hierdoor kan het gebeuren dat na langere tijd bewaren de actieve concentratie niet meer gehaald wordt. Een mogelijkheid is om een hogere concentratie in te brengen en zo te corrigeren voor de hoeveelheid die uittreedt, maar een hele hoge concentratie kan nadelige gevolgen met zich meebrengen, zoals een onaangename geur. Een andere mogelijkheid is het gebruik van een slow-release of controlled-release systeem. Bij deze techniek laat men een actieve stof langzaam in de tijd vrijkomen. Er is gedacht aan het gebruik van cyclodextrinen. Cyclodextrinen zijn commercieel beschikbaar en ze kunnen de actieve stof vrijlaten als ze in contact komen met vocht. Ze worden dus door vocht getriggerd, dat kan goed van pas komen in een levensmiddelenverpakking. Hierop wordt uitgebreid ingegaan in hoofdstuk 1.2

Als er een releasesysteem gebruikt wordt is het ook belangrijk om te weten of de vluchtige stof zich goed verdeelt over de verpakking. Release kan plaatsvinden vanuit een punt of vanuit meerdere punten in de verpakking. Er is daarom ook gekeken naar de verdeling van een vluchtige stof in een verpakking.

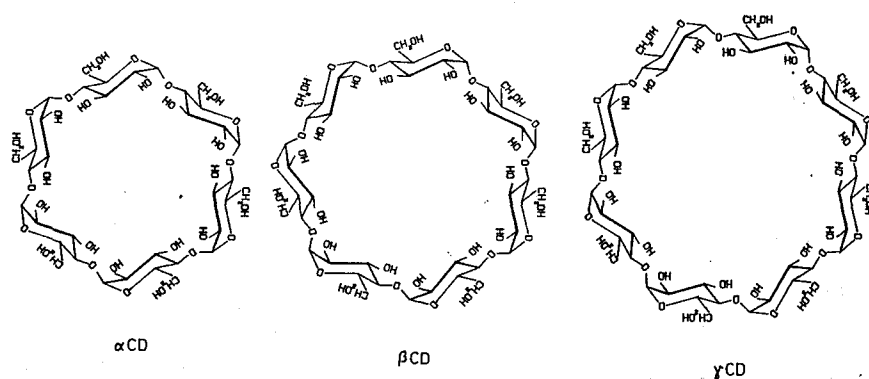
De doelstellingen van dit onderzoek zijn de volgende:

- 1) Bekijken van de verdeling van een vluchtige stof in een verpakking
- 2) Onderzoeken of de gekozen actieve stoffen kunnen complexeren met cyclodextrinen en zo ja in welke mate
- 3) Onderzoeken in welke mate de actieve stoffen uit het cyclodextrinecomplex vrijkomen

1.2 Cyclodextrinen

Cyclodextrinen ontstaan door de omzetting van zetmeel door het enzym glucosyltransferase. Er zijn drie soorten cyclodextrinen die het meest voorkomen. Ze zijn kristallijn, homogeen en non-hygroscopisch. α -cyclodextrine bestaat uit 6, β -cyclodextrine uit 7 en γ -cyclodextrine uit 8 glucose-eenheden. De glucose-eenheden zijn α -1,4 gebonden in een ring en hebben de C1 stoelconformatie. (zie figuur 1) Door de ordening liggen de secundaire hydroxylgroepen aan de ene kant van het molecuul en de primaire hydroxylgroepen aan de andere kant. De ring van primaire hydroxylgroepen is kleiner dan de ring van secundaire hydroxylgroepen waardoor de vorm van het molecuul een taps toelopende conus is. (zie figuur 2) Het cyclodextrinemolecuul is enigszins hydrofiel aan de buitenkant en hydrofoob aan de binnenkant. Hierdoor zijn cyclodextrinen goed te gebruiken om kleinere moleculen in te sluiten en complexen te vormen. Het complex bestaat dan uit een gastmolecuul dat zich voor een groot gedeelte in de holte bevindt. Er worden geen covalente bindingen gevormd, het complex wordt bij elkaar gehouden door zwakke interacties. De voorwaarden voor het wel of niet insluiten van een stof zijn:

- 1) De gast moet in de holte van de conus passen (voor de groottes van de conussen van de verschillende cyclodextrinen zie tabel 1)
- 2) Intermoleculaire interacties tussen de gast en het cyclodextrine moeten aanwezig zijn. Dat kunnen Vanderwaalsbindingen, hydrofobe interacties en waterstofbruggen zijn. Welke het sterkst aanwezig zijn hangt af van de gast.
- 3) Aanwezigheid van tenminste een kleine hoeveelheid water.



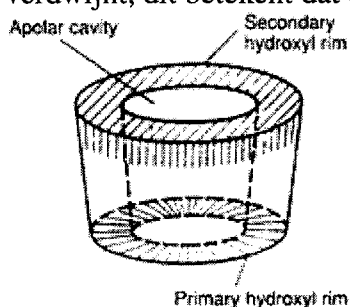
Figuur 1. Structuren van α -, β - en γ -cyclodextrine

Er zijn verschillende methoden om de gast in te sluiten in het molecuul. Het hangt van de gast af welke methode het meest geschikt is. (Maarse, 1991)

Er is in dit onderzoek gebruik gemaakt van een standaardcomplexatiemethode. De complexering gaat aan de hand van een dynamische evenwichtsreactie (zie bijlage 1). Aan een oplossing van cyclodextrine met water wordt een equimolaire hoeveelheid van de gast toegevoegd. Er wordt geen overmaat van de gast gebruikt omdat dit ervoor kan zorgen dat te veel gast op de buitenkant van het cyclodextrine gaat binden.

Het ideale geval is dat er een 1:1 verhouding is, waarbij de gast geheel of gedeeltelijk in de holte van het cyclodextrine bevindt. In de meeste gevallen zal het complex neerslaan, waarna het afgefilterd kan worden.

In de literatuur zijn percentages, van het cyclodextrine dat complex heeft gevormd, gevonden van 6-15% w/w, maar meestal 8-10%. Deze waarden zijn voor β -cyclodextrine gecomplexeerd met een flavourcomponent. Van de andere cyclodextrines zijn de percentages niet gevonden. Stabiliteitstesten wezen ook uit dat na twee jaar bewaren er minder dan 5% van de vluchtige stof uit het cyclodextrine verdwijnt, dit betekent dat de complexen vrij stabiel zijn. (Maarse, 1991)



Figuur 2. Functionele structuur van cyclodextrine

1.3 Vluchtige stoffen

Er zijn twee vluchtige stoffen gekozen die gebruikt werden in het onderzoek. Beide stoffen hadden een eigenschap die in een anti-microbial verpakking goed gebruikt kan worden. De eerste is D-carvon. Uit onderzoek bij het ATO (Oosterhaven, 1995) is gebleken dat D-carvon de spruitvorming bij aardappels kan remmen en waarschijnlijk ook een schimmelziekte. De tweede is t-2-hexenal. Deze stof heeft een antimicrobiële werking hebben bij bepaalde producten.

1.3.1 D-Carvon

Karwijzaadolie wordt gewonnen uit de vruchten van *Carum carvi* L. De hoofcomponenten van karwijzaadolie zijn D-limoneen en D-carvon. Beide kunnen tot 40-80% aanwezig zijn in de olie. De gebruikte carvon bestond uit 5% D-limoneen en 95% D-carvon. D-carvon is een character-impact compound van karwijzaadolie, dat betekent dat deze stof de karakteristieke geur geeft van karwijzaadolie. (Maarse, 1991). Verdere gegevens over deze stof staan in bijlage 2.

1.3.2 Trans-2-hexenal

Trans-2-hexenal (ook wel aangeduid met (E)-2-hexenal) heeft een geur die vaak aangeduid wordt met groen, of de geur van bladeren. Het komt voor in planten zoals in appels (Mattheis, 1991) en paprika's (Luning, 1995), maar het wordt ook gevormd door enzymatische afbraak van onverzadigde vetzuren (Maarse, 1991). Verdere gegevens over deze stof staan in bijlage 2.

2 Materiaal en methoden

2.1 Materiaal

De gaschromatograaf die is gebruikt heeft de volgende gegevens:

GC 8000 top special van Carlo Erba/Interscience

Kolom RTX-5

L15

ID 0.32

DF 0.25

CAT* 10221

Serial 178549A

Het heeft een automatische kanalenwisselaar met 16 kanalen.

In tabel 1 staan de gegevens van de gebruikte cyclodextrinen.

Tabel 1. Gegevens van de gebruikte cyclodextrinen

Type cyclodextrine	Aantal glucose-eenheden	Moleculair gewicht	Diameter van de holte [Å]	Oplosbaarheid in water(25°C) [g/100ml]
α	6	972	4.7-5.3	14.5
β	7	1135	6.0-6.5	1.85
γ	8	1297	7.5-8.3	23.2

2.2 Methoden

2.2.1 Het variëren van actieve stof in een verpakking

Het doel van deze proef was het bekijken van het concentratieverloop in de tijd afhankelijk van beginconcentratie. Het verloop werd gevolgd binnen en buiten de verpakkingen.

Er is gebruik gemaakt van PET bakjes, met een OPP folie. De actieve stof die is gebruikt was trans-2-hexenal. Deze werd in de verpakking verdeeld over twee viltjes die in twee hoeken van de bakjes geplakt werden. De actieve stof werd met behulp van een pipet op de viltjes gedruppeld en snel daarna werd de verpakking gesloten. Om te voorkomen dat de verpakking zou scheuren zijn er vier strookjes plakband op de verpakking op elkaar geplakt op de plaats waar de naald in de verpakking zou gaan.

Er werden drie verpakkingen in cilindervormige metalen potten geplaatst met een hoogte van 20 cm en een diameter van 30 cm. Deze werden luchtdicht afgesloten. De deksel van de metalen pot was van plastic gemaakt, deze kan daardoor geurstoffen opnemen. Om dit te voorkomen werd aluminiumfolie onder de deksel aangebracht. Er waren 16 kanalen van de gaschromatograaf die gebruikt konden worden. In tabel 2 is per kanaal aangegeven welk monster er werd genomen. Kanalen 2, 4 en 6 werden gebruikt voor de buitenkant van de verpakking, dus in de metalen potten.

Tabel 2. De gebruikte monsters bij proef: het variëren van actieve stof in een verpakking

Kanaal	Beginhoeveelheid in μl
1	40
2	0
3	40
4	0
5	40
6	0
7	40
8	40
9	20
10	20
11	20
12	10
13	10
14	10
15	5
16	5

2.2.2 Verdeling van vluchtige stof in een verpakking

Het doel van deze proef was om een inzicht te krijgen in de ruimtelijke verdeling van de actieve stof in de tijd in een verpakking met nagebootst product.

Er werden twee dozen genomen van dubbelgecoat PE karton. De afmetingen van de dozen waren 38x28,5x12 cm. In elke doos werden acht gaten gemaakt voor de kanalen van de gaschromatograaf. De plaatsen van de gaten staan in bijlage 3. De dozen werden elk gevuld met 60 kunstcitroenen. Midden in de doos werd een aluminium bakje geplaatst met een tissue erin waarop vervolgens de vluchtige stof werd aangebracht. De naalden van de gaschromatograaf die in het midden van de doos kwamen, werden met behulp van een stuk karton vastgezet. Om de gaten te dichten is siliconenkit gebruikt. De doos is dichtgemaakt met een OPP-folie, deze werd vastgezet met een brede plakband.

Er zijn twee stoffen gebruikt: d-carvon en t-2-hexenal. Van beide stoffen is 50 μl genomen. Het concentratieverloop is gemeten gedurende 70 uren de eerste keer, de tweede keer gedurende 64 uren.

2.2.3 Verdeling van een vluchtige stof in een gesloten metalen pot

Het doel van deze proef is om inzicht te krijgen in de ruimtelijke verdeling van de actieve stof in de tijd in een gesloten systeem.

Er werden vier metalen cilindervormige potten genomen van 20 cm hoog en een diameter van 30 cm. Ze werden afgesloten met een OPP folie. Per pot is er op vier plaatsen gemeten (zie bijlage 4) In twee potten is carvon gebruikt en twee potten t-2-hexenal. De vluchtige stof werd in een aluminium bakje gedruppeld die midden in de pot stond.

2.2.4 Cyclodextrinen complexatie proef

Het doel van deze proef is het bekijken van de mogelijkheid om de actieve stoffen te complexeren met de verschillende cyclodextrinen.

Om uit te vinden met welke van de drie cyclodextrinen t-2-hexenal zou complexeren is een standaard complexatie proef uitgevoerd. Hierbij werden verzadigde oplossingen gemaakt van de cyclodextrinen waaraan een equimolaire hoeveelheid t-2-hexenal is toegevoegd. Deze werden geroerd voor een aantal uren.

Vervolgens werd de vaste stof gefiltreerd en gedroogd aan de lucht

Om de verzadigde oplossingen te maken is gebruik gemaakt van de hoeveelheden die aangegeven zijn door de producent van de cyclodextrinen (Wacker). De gebruikte hoeveelheden waren in 100 ml: voor α -CD 10,0 g, voor β -CD 1,5 g en voor γ -CD 23,0 g.

Om snel te controleren of de t-2-hexenal gecomplexeerd heeft is er een simpel proefje uitgevoerd door een druppel water aan het verkregen poeder toe te voegen en te ruiken. Verder is er ook gebruik gemaakt van H-NMR om te bepalen hoeveel er gecomplexeerd heeft.

Voor het complexeren van D-carvon is dezelfde procedure gevolgd als voor t-2-hexenal.

2.2.5 Releaseproeven

Het doel van deze proef is om te bepalen hoeveel er vrijkomt bij verschillende omstandigheden, bijvoorbeeld bij verschillende luchtvochtigheden of als er niet genoeg vrijkomt bij toevoegen van vochtaantrekkende zouten.

Er is eerst gekeken of er bij een luchtvochtigheid van 100%, vluchtige stof uit het cyclodextrine vrijkomt. Dit is gedaan met een α -cyclodextrine die met tijmolie gecomplexeerd is verkregen van Wacker Chemie (tijmolie-CD). Van te voren is gekeken welke stof het meest meetbaar is uit het cyclodextrine. Hiervoor is 0,5 g tijmolie-CD opgelost in 5 ml en 25 ml water. Vervolgens is er een monster genomen en gekeken op welke retentietijd de grootste piek kwam. De naam van deze stof is nog onbekend maar aan de hand van de retentietijd kan het verloop van het vrijkomen van deze stof wel gevolgd worden.

Er zijn monsters ingezet bij verschillende omstandigheden. De hieronder beschreven methode is standaard bij alle omstandigheden.

Een 100% luchtvochtigheid werd gerealiseerd door een glazen bak te nemen en deze op de bodem met water te vullen, vervolgens is er een aluminium bakje genomen met 0,5 g CD, deze bleef op het water drijven. De glazen bak werd dichtgemaakt met aluminiumfolie en plakband. Om een lagere luchtvochtigheid (85%) te creëren is een verzadigde oplossing gemaakt van KCl en in plaats van puur water is deze verzadigde oplossing gebruikt. Het gebruik van vochtaantrekkende zouten werd gedaan door het zout (NaCl) toe te voegen aan het bakje met CD en dit vervolgens goed te mengen. De luchtvochtigheid bleef hier op 100%.

3 Resultaten en discussie

3.1 Het variëren van actieve stof in een lege verpakking

De gemeten concentraties zijn uitgezet tegen de tijd. Zie bijlagen 5a.

In bijlage 5a zijn alleen de metingen van de kanalen die verbonden waren met de potten weergegeven. Er is te zien dat de concentratie t-2-hexenal bij alle potten op dezelfde manier verandert. Bij de allereerste meting is nog te zien dat de lucht in de verpakking nog niet met t-2-hexenal verzadigd was en dat de concentratie daardoor erna nog toeneemt.

In bijlage 5b zijn alle verpakkingen die buiten de potten waren bewaard weergegeven. Sommige concentraties zijn in duplo andere in triplo ingezet.

De lijnen lopen bijna allemaal parallel aan elkaar. Ze diffunderen dus met dezelfde snelheid uit de verpakkingen. Van de lijnen zijn de logaritmische functies berekend. De meeste liggen goed op de berekende lijn. De functies zijn weergegeven in tabel 3.

Tabel 3. De log functies van de lijnen

Monsters	Log functie	R ²
40 ul	-3.8052Ln(X)+29.197	0.9771
40 ul	-4.1451Ln(X)+29.468	0.9661
20 ul	-3.5105Ln(X)+24.831	0.9994
20 ul	-3.4665Ln(X)+24.126	0.9972
20 ul	-4.8615Ln(X)+26.833	0.9924
10 ul	-3.3643Ln(X)+20.434	0.9836
10 ul	-3.0122Ln(X)+19.534	0.9805
10 ul	-2.5885Ln(X)+16.322	0.9602
5 ul	0	0
5 ul	-2.07Ln(X)+14.486	0.9811

Een van de lijnen ligt op de x-as. Deze verpakking heeft waarschijnlijk erg gelekt, waardoor de actieve stof al vrij snel uit de verpakking is verdwenen. Ook een verpakking waar 20 ul is toegevoegd heeft waarschijnlijk gelekt, de helling van de lijn is steiler dan bij de rest.

Er werd een evenwichtsconcentratie verwacht bij de potten, waarbij de buiten en binnenconcentratie hetzelfde zouden worden. Dit was na drieëneenhalve dag nog niet te zien, dus werd de proef tien dagen na het starten voortgezet. Zie bijlage 6.

De evenwichtsconcentratie in het ideale geval kan berekend worden van de potten. Dit is 2,99 µg hexenal/l. In de grafiek is te zien dat de concentratie binnen en buiten de verpakking de evenwichtsconcentratie wel naderen, maar na tien dagen nog niet heeft bereikt. Het is mogelijk dat de gebruikte folie een goede barriere vormt en dat de stof niet zo snel uit de verpakking diffundeert. Het kan ook zijn dat de stof door het verpakkingsmateriaal wordt opgenomen en hierdoor niet meer gemeten kan worden. De evenwichtswaarde wordt dan niet meer bereikt. Of dat de stof geoxideerd is en niet meer gemeten kan worden als hexenal (Thoden van Velzen).

3.2 Verdeling van vluchtige stof in een doos

In bijlagen 7a en 7b staan de resultaten van de dozen waar hexenal aan is toegevoegd. Er is vrijwel geen verschil te zien tussen de monsters bovenin en onderin de doos. Dit zou dus kunnen betekenen dat hexenal goed homogeen verdeeld is in de doos. Na 10 uur staan verandert de concentratie nagenoeg niet meer.

De resultaten van de doos met carvon staan in bijlage 8. Er is te zien dat de concentratie bij twee kanalen duidelijk hoger is dan de rest. Kanaal 3 ligt precies boven het bakje met carvon en heeft de hoogste concentratie. Dit zou kunnen betekenen dat de carvon niet snel verdampt en dus boven het bakje blijft hangen. Kanaal 4 ligt boven in de hoek van de doos. De hogere concentratie kan komen doordat tijdens het injecteren er een druppel op de citroenen is gevallen dicht bij kanaal 4 waardoor de concentratie daar hoger is.

De kartonnen doos is een niet geheel gesloten systeem. Het is gebruikt om de werkelijkheid te benaderen, waarbij producten in een doos worden bewaard en een vluchtige stof aan wordt toegevoegd. Om een beter beeld te krijgen van hoe de stof zich verdeeld is er ook een proef ingezet waarbij er zo min mogelijk variabelen zijn, namelijk bij een gesloten metalen pot.

3.3 Verdeling van een vluchtige stof in een gesloten metalen pot

Bij deze proef is gebruik gemaakt van metalen potten. Deze potten kunnen geen geuren opnemen, ze hebben geen openingen waar de stof uit kan. Er zijn ook geen kunstcitroenen gebruikt, omdat ze van plastic zijn gemaakt en daardoor ook stof op kunnen nemen. De potten waren ingezet voor 30 uren. De resultaten zijn uitgezet in een grafiek, zie bijlage 9a en 9b voor carvon en 10a en 10b voor hexenal. Bij carvon is te zien dat de concentratie boven het bakje bij beide potten duidelijk hoger is dan op andere plaatsen. Dit betekent dat het carvon heel moeilijk verdampt. De lijnen lopen allemaal nog op. Er is dus nog geen evenwicht bereikt na 30 uur, het zou beter zijn als de metingen nog langer worden uitgevoerd. Als er gekeken wordt naar de resultaten op andere plaatsen in de pot, dan is te zien dat de concentratie boven in de pot iets hoger is dan onderin. Er werd verwacht dat carvon uit zou zakken, volgens de resultaten is dit niet het geval. Er moet nog wel opgemerkt worden dat de verschillen tussen de monsters niet groot waren en dat het ook in de meetfout zou kunnen liggen. Bij hexenal is er geen uitzakking te zien. De lijnen lopen soms door elkaar en de verschillen zijn ook klein. Hexenal verdeelt zich dus wel goed in de pot.

3.4 Standaard complexatie proef

Volgens tabel 1 zouden de cyclodextrinen oplossen bij de aangegeven hoeveelheden en 25 ° C. Dat was niet bij allemaal het geval. α -CD en γ -CD waren beide troebel, ook nog na meer dan een uur roeren. β -CD loste daarentegen wel op bij de gegeven hoeveelheid. Dit is niet wat er werd verwacht. β -CD zou namelijk het minst oplosbaar moeten zijn. Er is toen geprobeerd om de oplossingen die nog troebel waren te verwarmen op een warmhoudplaatje tot 50 ° C. De oplossingen waren nog steeds troebel, maar duidelijk minder dan zonder verwarmen. Er is toen toch t-2-hexenal toegevoegd bij alle oplossingen. De β -CD werd troebel na het toevoegen van de t-2-hexenal, maar er was geen neerslag dat afgefiltreerd kon worden. Bij α -CD en γ -CD waren wel duidelijke neerslagen te zien. Deze werden afgefiltreerd en gedroogd. Na het drogen is de geurtest uitgevoerd, beide met positief resultaat. Dat betekent dus dat α -CD en γ -CD beide t-2-hexenal hebben gebonden. Van β -CD is een suspensie

gemaakt (5% w/w). Hieraan is een equimolaire hoeveelheid t-2-hexenal aan toegevoegd en vervolgens werd dezelfde procedure gevolgd. Hierbij was wel poeder gewonnen en deze had ook een positief resultaat na de geurtest.

Er is ook gekeken of D-carvon kan complexeren met cyclodextrinen. Hiervoor is dezelfde procedure gevolgd als bij t-2-hexenal. Bij alledrie de cyclodextrinen was er neerslag ontstaan en was de geurtest positief. De cyclodextrinen hebben dus ook D-carvon gebonden. De gevoeligheid van de neus is heel verschillend voor bepaalde stoffen. Er kan niets gezegd worden over de hoeveelheid die gebonden is. Er is daarom ook met H-NMR bepaald of de stoffen in de cyclodextrinen aanwezig waren.

3.5 H-NMR metingen aan cyclodextrinecomplexen

Met H-NMR kan bepaald worden welke moleculen er aanwezig zijn. Er wordt aangenomen dat als er complex gevormd is er dan ook van beide stoffen pieken te zien zijn. Met deze methode kan ook een schatting gemaakt worden van het percentage dat in het cyclodextrine aanwezig is. Er wordt echter geen onderscheid gemaakt tussen gasten die ingesloten zijn door het cyclodextrine en gasten die zich alleen op het oppervlakte van het cyclodextrine bevinden.

Voor de H-NMR metingen moest het aanwezige (gecomplexeerde) water eerst verwijderd worden. Dit is gedaan door de CD-poeders in een exsiccator te zetten met phosphorpentoxide en vervolgens onder vacuüm te bewaren. De eerste reeks metingen zijn gedaan met D₂O als oplosmiddel. Niet alle cyclodextrinen konden goed opgelost worden. De H-NMR spectra staan in bijlage 11a t/m 11m. Omdat de CD's niet goed konden oplossen in water, zijn er nog H-NMR metingen uitgevoerd met DMSO als oplosmiddel. De complexen konden in DMSO wel goed opgelost worden. Ook zijn er voor de aparte stoffen H-NMR metingen gedaan om de toekenning van de pieken duidelijk te krijgen.

De percentages kunnen aan de hand van bovenstaande metingen berekend worden. Dat is eerst gedaan voor de stoffen opgelost in D₂O. Er moet bij de berekening rekening worden gehouden met het feit dat de verschillende CD's uit dezelfde eenheden bestaan, maar wel verschillen in het aantal eenheden. Bij elke meting is een piekoppervlakte genomen van het cyclodextrine. Deze werd op 1.00 gesteld. Ook de oppervlaktes van de pieken van de gecomplexeerde stoffen zijn genomen. Aan de hand van onderstaande formule kon het percentage berekend worden

Piekoppervlakte stof/ aantal H-atomen stof

Piekoppervlakte CD/ aantal H-atomen CD * 100% = percentage stof in cyclodextrine

Voorbeeldberekening: α-CD met t-2-hexenal in DMSO

De pieken van δ=6.1 worden genomen. De oppervlakte is 0.0315 en behoort tot 1 H-atoom van het hexenal. De piek van H₁ van het cyclodextrine wordt genomen, deze staat voor 6 H-atomen, want α-CD bestaat uit zes eenheden en heeft dus 6 H₁-atomen.

0.0315/1

1/6 * 100% = 19%

Voor de rest van de pieken zijn dezelfde berekeningen uitgevoerd. Het verschil binnen de spectra zijn groot. Bij veel spectra zijn de percentages voor elke piek anders. Ze behoren hetzelfde te zijn. Er is gekozen om een gemiddelde te nemen voor elk spectrum. De resultaten staan in tabel 4. Van een aantal spectra waren de pieken niet geheel duidelijk. Ze waren daardoor niet goed te integreren. Daarom zijn ook de minimale en maximale waarden aangegeven die gevonden zijn.

Voor het berekenen van de percentages zijn alleen de pieken genomen die duidelijk te scheiden waren. Bij carvon waren de pieken van de H-atomen genomen op de C7 en C9 plaats (zie bijlage 11b). Op de C7 plaats bevindt zich 1 H-atoom en op de C9 plaats 6.

Bij hexenal zijn er meerdere pieken duidelijk te herkennen (zie bijlage 11c). Bij de spectra van gecomplexeerde hexenal is gekeken of deze ook duidelijk te herkennen waren. Dat was niet bij alle spectra het geval. Bij de meeste spectra vielen een aantal pieken weg. Er is geprobeerd om van zo veel mogelijk pieken een piekoppervlakte te berekenen, maar doordat de pieken niet duidelijk waren zijn de berekende percentages niet betrouwbaar. Bij een aantal spectra waren een aantal pieken zelfs helemaal niet te zien.

Tabel 4. De berekende percentages van gast in cyclodextrine

Spectrum	Percentage gecomplexeerd (gemiddeld)	Minimum en maximum van percentages
α -CD met carvon in D ₂ O	36	30-52
β -CD met carvon in D ₂ O	96	79-112
γ -CD met carvon in D ₂ O	100	85-117
α -CD met hexenal in D ₂ O	36	26-46
β -CD met hexenal in D ₂ O	90	14-159*
γ -CD met hexenal in D ₂ O	92	24-198*
β -CD met carvon in DMSO	93	83-103
γ -CD met carvon in DMSO	105	91-119
α -CD met hexenal in DMSO	32	18-53
β -CD met hexenal in DMSO	103	93-113*

*Deze spectra hadden onduidelijke pieken, of er misten een aantal pieken, de percentages lopen daardoor soms ver uiteen.

De fout in de berekening van de percentages is vrij groot. Er wordt een 1:1 verhouding (100% gecomplexeerd) verwacht. Waarden die liggen tussen 90 en 110% zijn goed. Er is te zien dat het verschil tussen gebruik van D₂O en DMSO niet erg groot is. Voor carvon is complexatie met β -CD en γ -CD het beste. Deze geven een goed 1:1 complex. Met α -CD is het percentage lager, namelijk 36%. Voor hexenal is het niet duidelijk welke het beste complex geeft. Aan de hand van de tabel zou er ook voor β -CD en γ -CD gekozen kunnen worden, maar de spreiding tussen de percentages zijn erg groot. Het is dus niet met zekerheid te zeggen of het gemiddelde genomen mag worden. Volgens Bhandari (1998) zijn aldehyden niet geschikt om met β -CD te complexeren. Of dit ook geldt voor complexatie met α -CD en γ -CD is niet gevonden. Er is in tabel 4 te zien dat er maar gemiddeld 34% van het α -CD gecomplexeerd is met hexenal.

3.6 Releaseproeven

Er is eerst bepaald hoeveel van de actieve stof met het CD is gecomplexeerd. Dit geeft een bepaald percentage maar dat wil nog niet zeggen dat al het gecomplexeerde stof ook daadwerkelijk vrijkomt in de verpakking. Bij deze proef is het de bedoeling om te bepalen hoeveel er vrijkomt bij verschillende omstandigheden, bijvoorbeeld bij

verschillende luchtvochtigheden of als er niet genoeg vrijkomt bij toevoegen van vochtaantrekkende zouten.

Er werd een eerste test gedaan met tijmolie-CD. Bij een luchtvochtigheid van 100% was er wel een duidelijke piek te zien. Dit betekent dus dat bij deze luchtvochtigheid het vrijkomen van de vluchtige stof mogelijk is. Dezelfde methode is ook gebruikt bij de CD's met carvon en hexenal. Tijmolie-CD is ook nog gebruikt om de release bij 85% RV en met vochtaantrekkende zouten te bekijken.

Wegens een defect van de gaschromatograaf zijn er na de metingen van tijmolie-CD geen verdere metingen van de andere cyclodextrinen mogelijk.

4. Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

- T-2-hexenal verdeelt zich goed over een verpakking. In de verpakking is een release vanaf een punt wel geschikt voor deze stof.
- Carvon verdeelt zich heel traag over een verpakking. De hoogste concentratie ligt rond het punt van aanbrengen. Release vanaf een punt is niet geschikt voor deze stof. Voor een meer evenwichtige verdeling in de verpakking zou gedacht moeten worden aan een systeem waarbij meerdere releasepunten zijn.
- Uit de gedane proeven kan geconcludeerd worden dat alle cyclodextrinen met t-2-hexenal en carvon konden complexeren.
- D-carvon complexeert het minst goed met α -CD. Volgens de NMR meting is er gemiddeld 36% gecomplexeerd.
- β -CD en γ -CD complexeren beide wel goed met carvon. Volgens NMR metingen ontstaan er complexen met een 1:1 verhouding tussen gast en cyclodextrine.
- Volgens de NMR metingen is er gemiddeld 34% t-2-hexenal gecomplexeerd met α -CD.
- De percentages van t-2-hexenal met β -CD en γ -CD liggen wel rond de 100% maar zijn niet betrouwbaar, omdat niet alle pieken even duidelijk waren.
- Bij een luchtvochtigheid van 100% is er wel afgifte waar te nemen van een vluchtige stof uit tijmolie-cyclodextrine.

4.2 Aanbevelingen

- Wegens een defect aan de gaschromatograaf konden de releaseproeven niet uitgevoerd worden. Voor de toepasbaarheid van de cyclodextrinen als slow-release systeem is dit heel belangrijk om te weten. Hier zou nog naar gekeken kunnen worden.
- Er is NMR gebruikt om te bepalen of er een complex is gevormd. Bij deze methode wordt er geen onderscheid gemaakt tussen gast dat zich echt in de holte van de cyclodextrine bevindt en gast dat zich alleen op het oppervlakte bevindt. Dit zou invloed kunnen hebben op de release van de gast. Hier zou nog naar gekeken kunnen worden met andere technieken.
- De verdeling van een gas over een verpakking zou nog met de theorie vergeleken kunnen worden.
- Aldehydes kunnen niet goed met cyclodextrinen complexeren. Er kan nog gekeken worden naar andere releasesystemen dan cyclodextrinen om aldehydes in te sluiten.

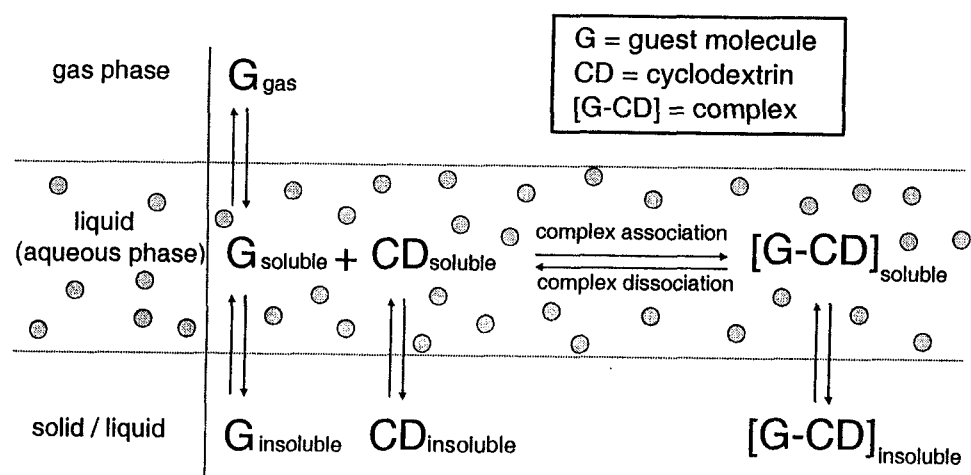
Geraadpleegde literatuur

- Bhandari, B.R., D'Arcy, B.R., Bich, L.L.T. 1998. Lemon oil to β -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1494-1499.
- Burdock, G.A. 1995. *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. Volume II, 3rd edition. CRC Press USA
- Collins, P., Ferrier, R. 1995. *Monosaccharides, their chemistry and their roles in natural products*. John Wiley & Sons Inc. New York. USA
- Kemerink, P. 1996. *Binding en release van aromacomponenten uit een matrix van plantecelwandpolysacchariden en beta-cyclodextrine*. Wageningen University.
- Kemp, W. 1987. *Organic Spectroscopy*. 2nd edition. Macmillon publishers Ltd.
- Labuza, T.P., Breene, W.M. 1989. Applications of "active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *Journal of food processing and preservation*. 13 1-69
- Luning, P.A., Yuksel, D., Vuurst de Vries, R. van der, Roozen, J.P. 1995. Aroma changes in fresh bell peppers (*Capsicum annuum*) after hot air-drying. *Journal of Food Science*. 60(6) 1269-1276.
- Maarse, H. 1991. *Volatile compounds in food and beverages*. New York, Marcel Dekker Inc.
- Mattheis, J.P., Fellman, J.K., Chen, P.M., Patterson, M.E. 1991. *Journal of agricultural and food chemistry*. 39 (11) 1902-1906.
- Mockevicius, D. 1994. *Flavor binding and release in a model system composed of carbohydrates and beta-cyclodextrins*. Wageningen Agricultural University.
- Oosterhaven, K., Hartmans, K.J., Scheffer, J.J.C. 1995. Inhibition of potato sprout by carvone enantiomers and their bioconversion in prouts. *Potato Research*.
- Scott, R.P.W. *Techniques and practice of chromatography*. Chromatographic series volume 70. Marcel Dekker Inc. New York USA.
- Sloan, A.E. 1998. Food industry forecast: consumer trends 2020 and beyond. *Food Technology*. 52(1) 37-38, 40, 42, 44.
- Szejtli, J. 1988. *Cyclodextrin technology*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

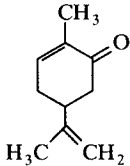
Bijlagen

Bijlage 1 Dynamische evenwichtsreactie bij complexatie

Complexation as a system of dynamic equilibria

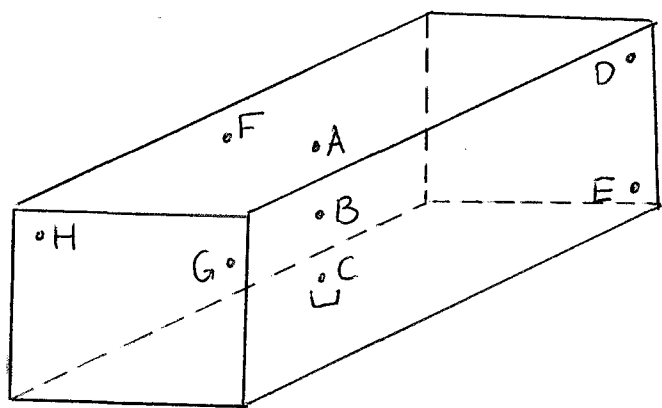


Bijlage 2 Gegevens van carvon en hexenal

Carvone																											
Other names	Carvol; 6,8(9)- <i>p</i> -menthadien-2-one; 1-menthyl-4-isopropenyl-6-cyclohexen-2-one																										
Empirical formula	C ₁₀ H ₁₄ O																										
Structure																											
Physical/chemical characteristics ⁵	<table><tr><td><i>l</i>-Carvone</td><td><i>d</i>-Carvone</td></tr><tr><td>Colorless to pale straw-colored liquid²</td><td>Colorless to light yellow liquid</td></tr><tr><td>Assay</td><td></td></tr><tr><td>97% min² (as ketone content)</td><td>95% min²</td></tr><tr><td>Molecular weight</td><td>150.21</td></tr><tr><td>Boiling point</td><td>230–231°C at 755 mmHg</td></tr><tr><td></td><td>230–231°C at 763 mmHg</td></tr><tr><td>Specific gravity</td><td>0.956–0.960 at 25°C²</td></tr><tr><td>Refractive index</td><td>0.956–0.960 at 25°C²</td></tr><tr><td></td><td>1.4965–1.4990 at 20°C²</td></tr><tr><td>Optical rotation</td><td>–57.0° to –62.0°²</td></tr><tr><td>Solubility</td><td>+50° to +60°²</td></tr><tr><td></td><td>1:5 in 60% alcohol²</td></tr></table>	<i>l</i> -Carvone	<i>d</i> -Carvone	Colorless to pale straw-colored liquid ²	Colorless to light yellow liquid	Assay		97% min ² (as ketone content)	95% min ²	Molecular weight	150.21	Boiling point	230–231°C at 755 mmHg		230–231°C at 763 mmHg	Specific gravity	0.956–0.960 at 25°C ²	Refractive index	0.956–0.960 at 25°C ²		1.4965–1.4990 at 20°C ²	Optical rotation	–57.0° to –62.0° ²	Solubility	+50° to +60° ²		1:5 in 60% alcohol ²
<i>l</i> -Carvone	<i>d</i> -Carvone																										
Colorless to pale straw-colored liquid ²	Colorless to light yellow liquid																										
Assay																											
97% min ² (as ketone content)	95% min ²																										
Molecular weight	150.21																										
Boiling point	230–231°C at 755 mmHg																										
	230–231°C at 763 mmHg																										
Specific gravity	0.956–0.960 at 25°C ²																										
Refractive index	0.956–0.960 at 25°C ²																										
	1.4965–1.4990 at 20°C ²																										
Optical rotation	–57.0° to –62.0° ²																										
Solubility	+50° to +60° ²																										
	1:5 in 60% alcohol ²																										
Organoleptic characteristics	<i>l</i> -Carvone exhibits odor of spearmint; ² <i>d</i> -carvone exhibits odor reminiscent of caraway ²																										
2-Hexenal																											
Other names	α - β -Hexylenaldehyde; β -propyl acrolein																										
Empirical formula	C ₆ H ₁₀ O																										
Structure	$\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH=CH—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—H}$																										
Physical/chemical characteristics ⁵																											
Appearance	Oily liquid																										
Molecular weight	98.15																										
Boiling point	43°C at 12 mmHg; 47–48°C at 17 mmHg																										
Specific gravity	0.8491 at 20°C; 0.8740 at 17.9°C																										
Refractive index	1.4462 at 18°C; 1.44602 at 17.9°C																										
Solubility	Soluble in most organic solvents																										
Organoleptic characteristics	Characteristic green, leafy odor																										

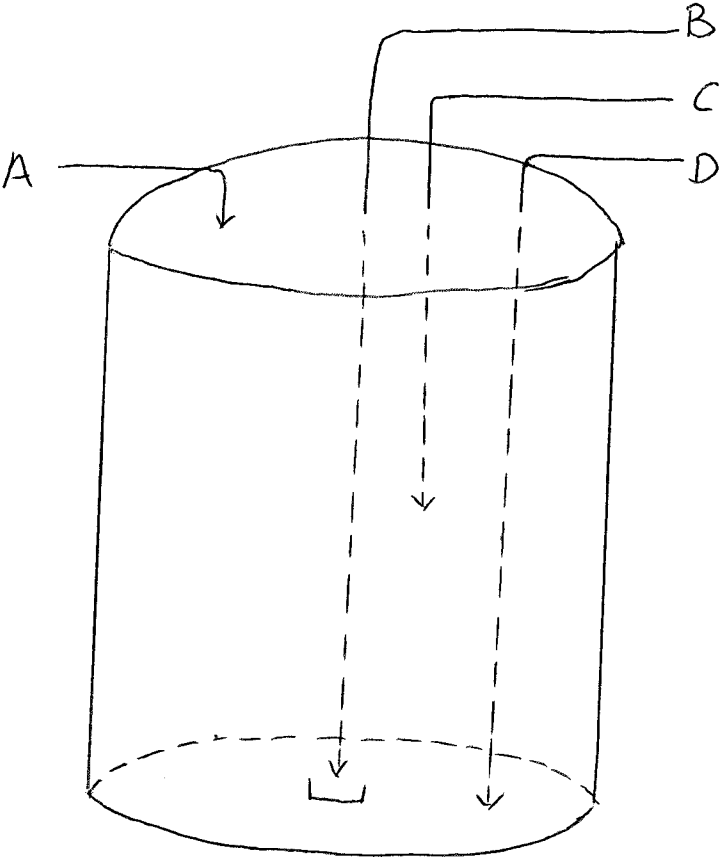
Bijlage 3 Plaats van de naalden in de kartonnen doos

plaats	Hexenal(1e proef)	Hexenal(2e proef)	Carvon
A	1	9	1
B	2	11	2
C	3	10	3
D	9	12	4
E	10	13	5
F	7	14	6
G	8	15	7
H	11	16	8

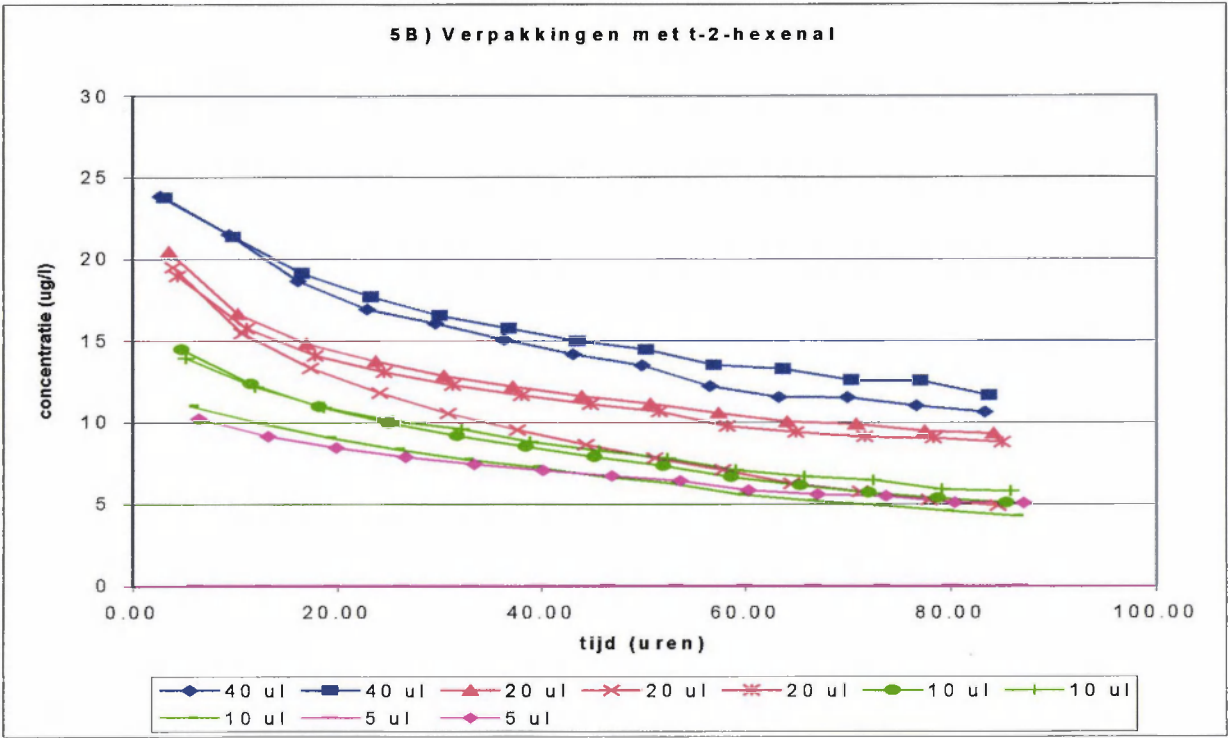
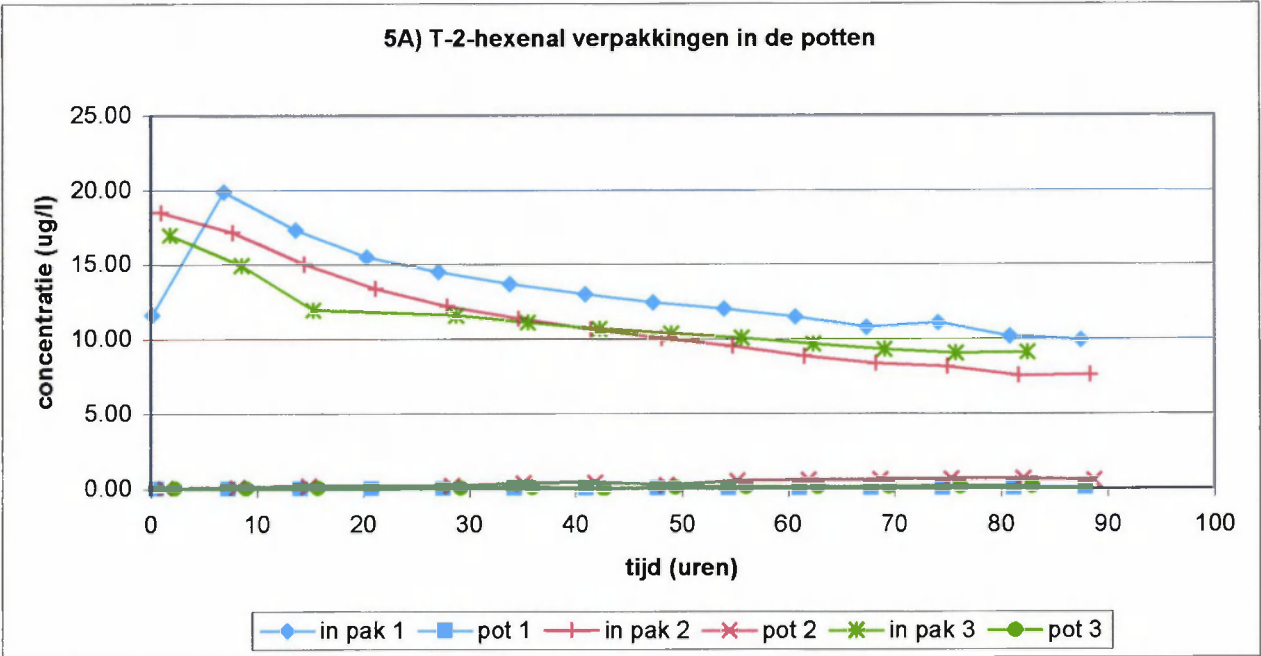


Bijlage 4 Plaats van de naalden in de metalen pot

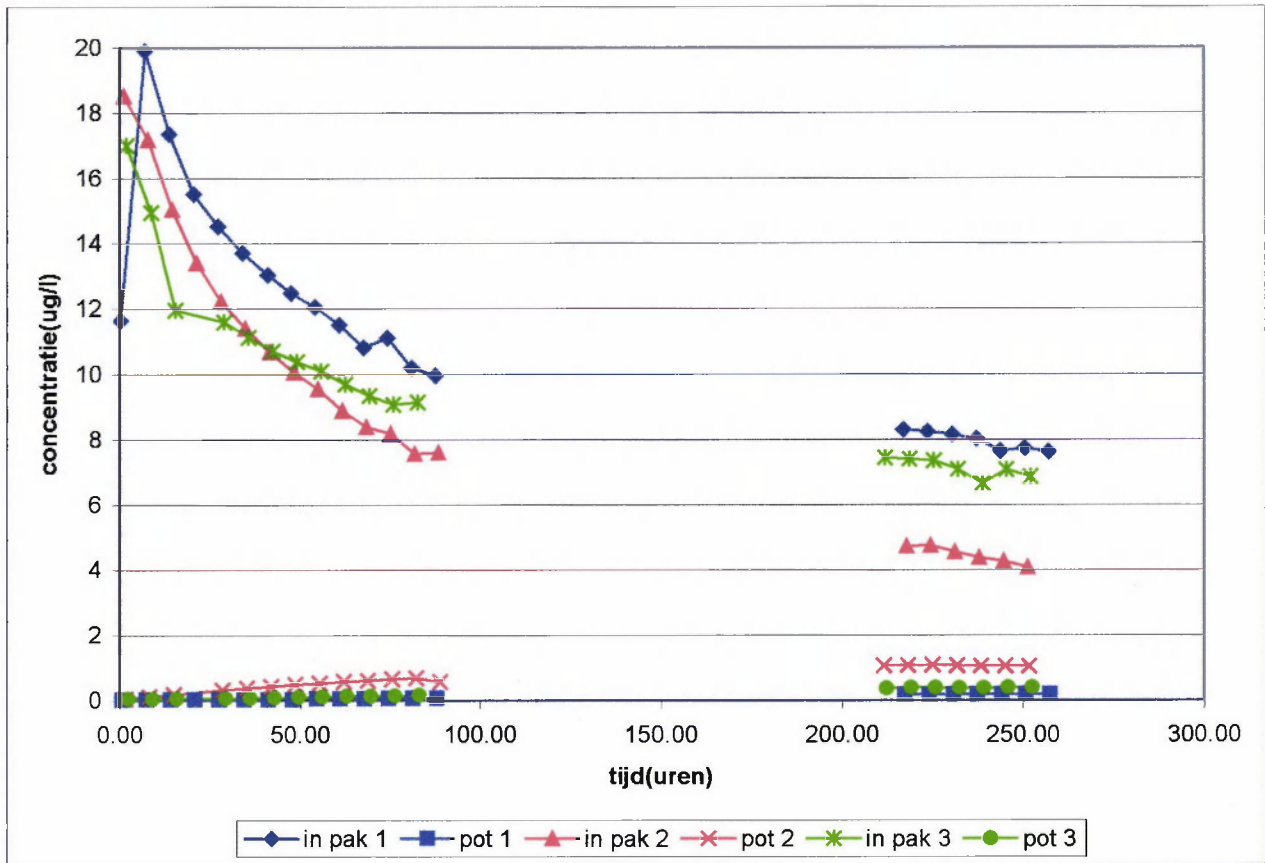
Plaats	Carvon(pot 1)	Carvon(pot 2)	Hexenal(pot3)	Hexenal(pot4)
A	3	6	12	13
B	4	5	9	14
C	2	7	10	15
D	1	8	11	16



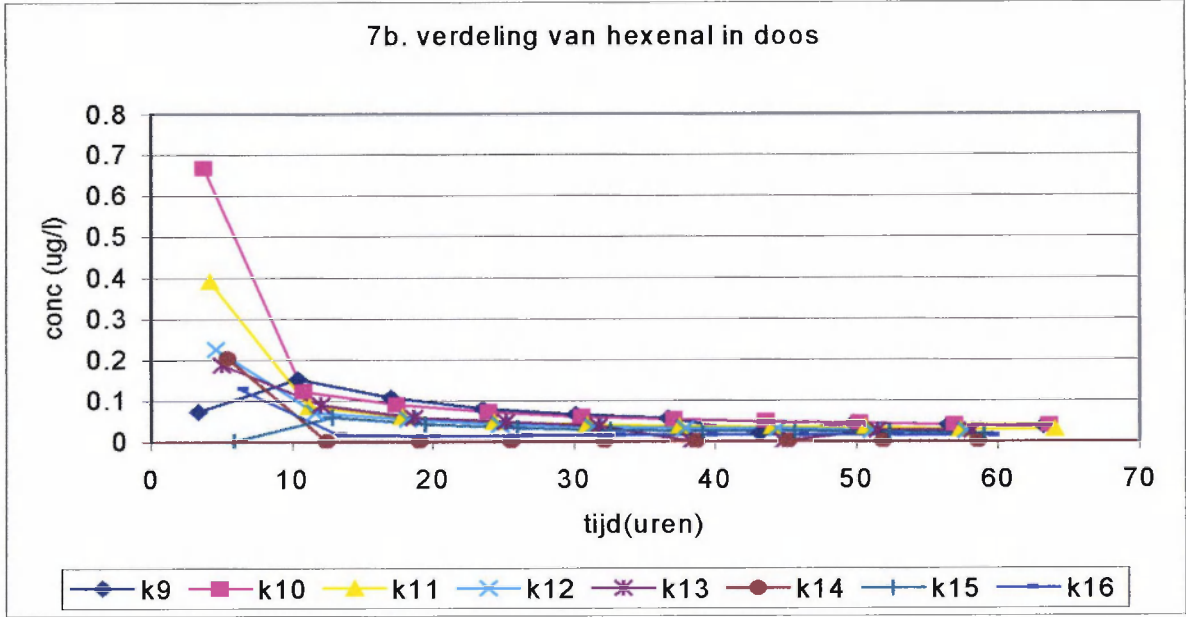
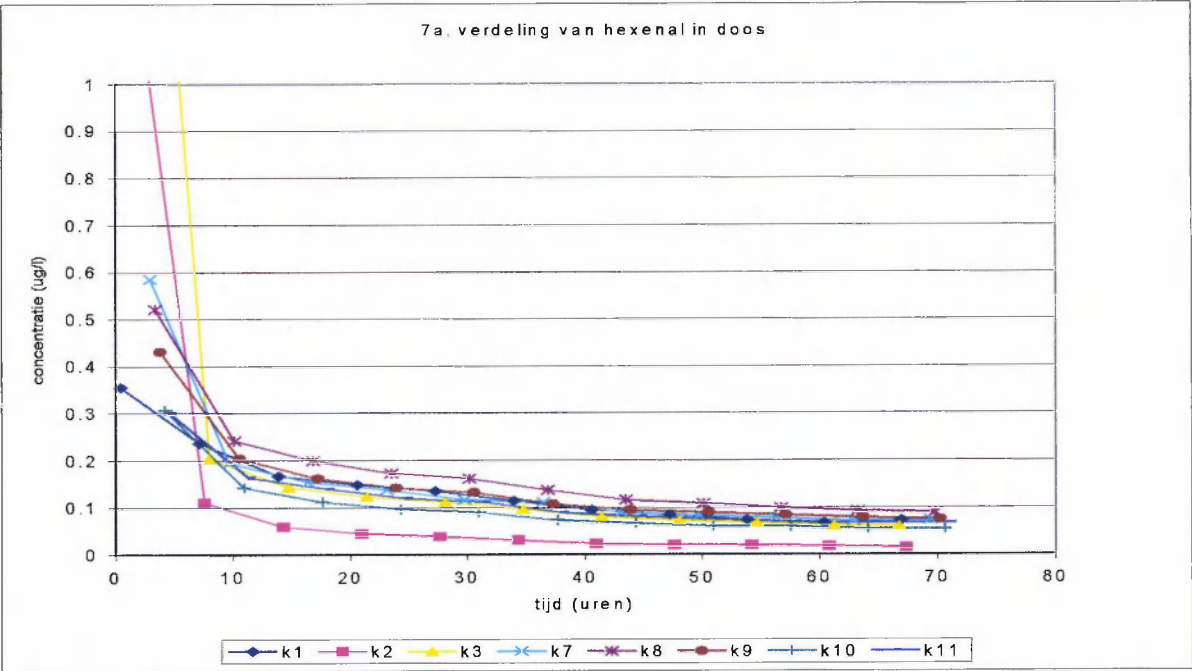
Bijlage 5

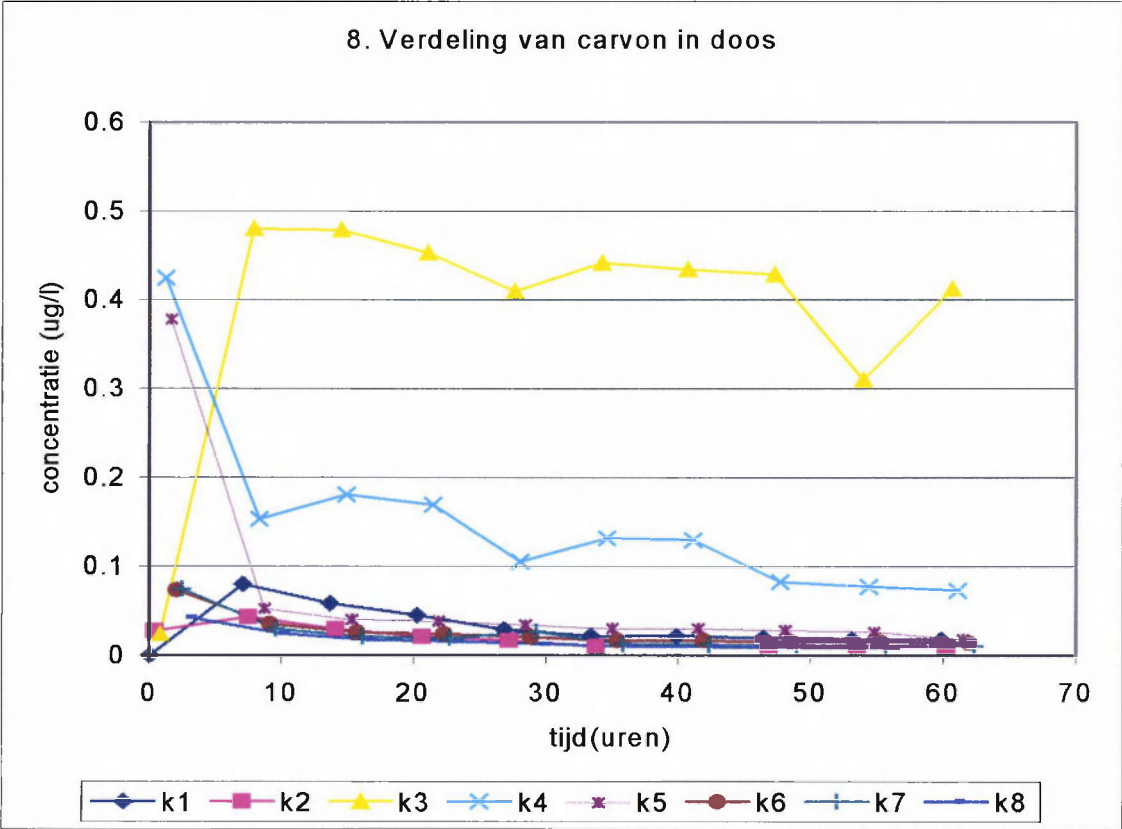


Bijlage 6 Verdeling van hexenal in verpakkingen bewaard in metalen potten na 10 dagen

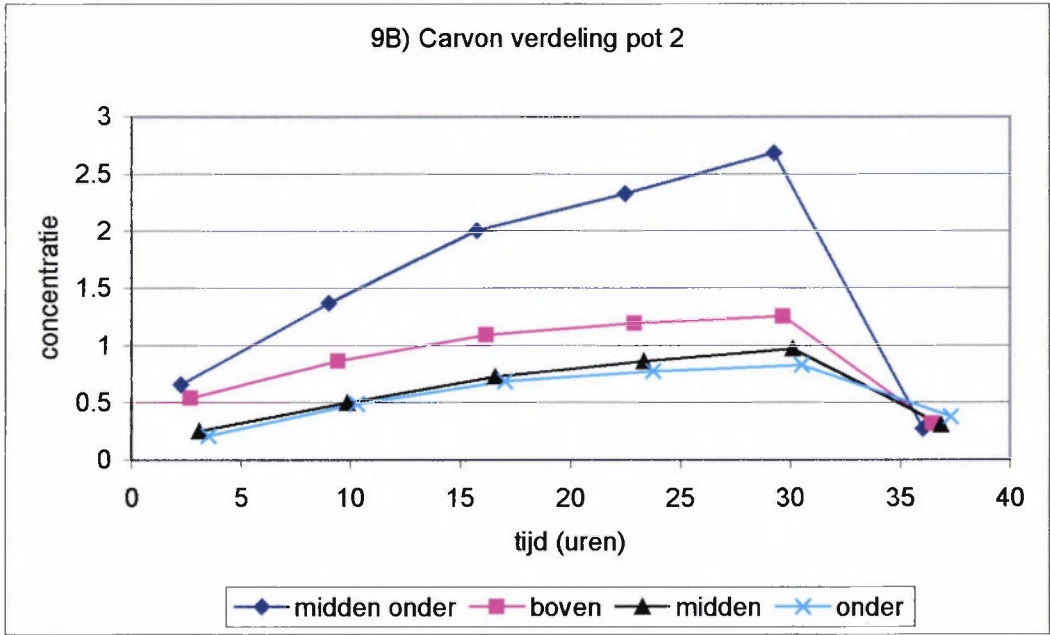
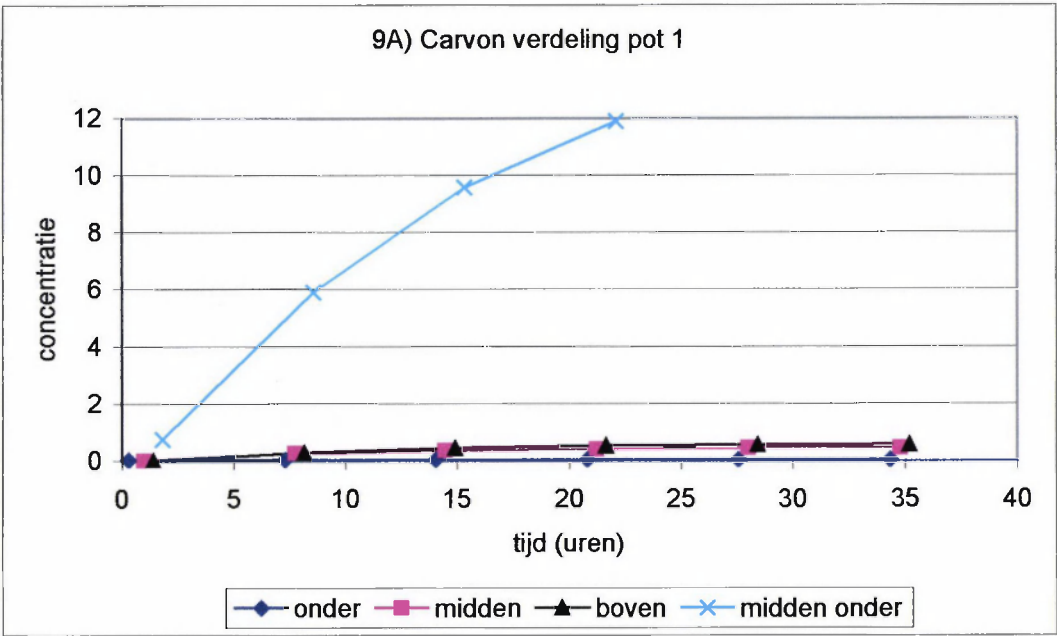


Bijlage 7 Verdeling van hexenal in doos

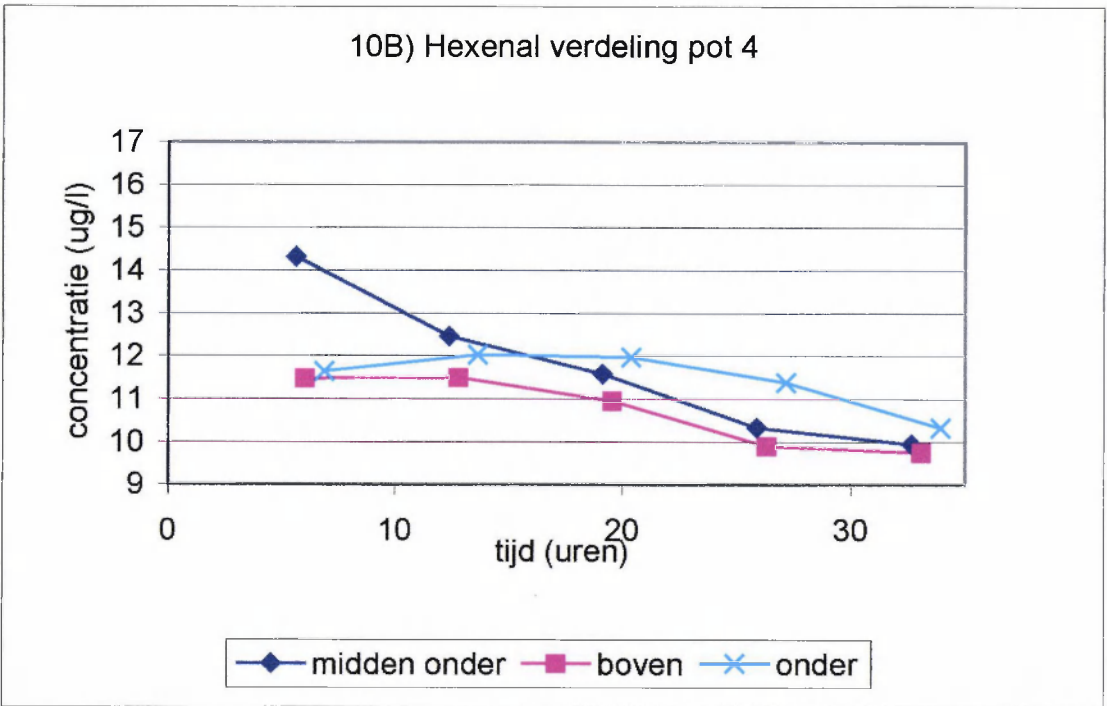
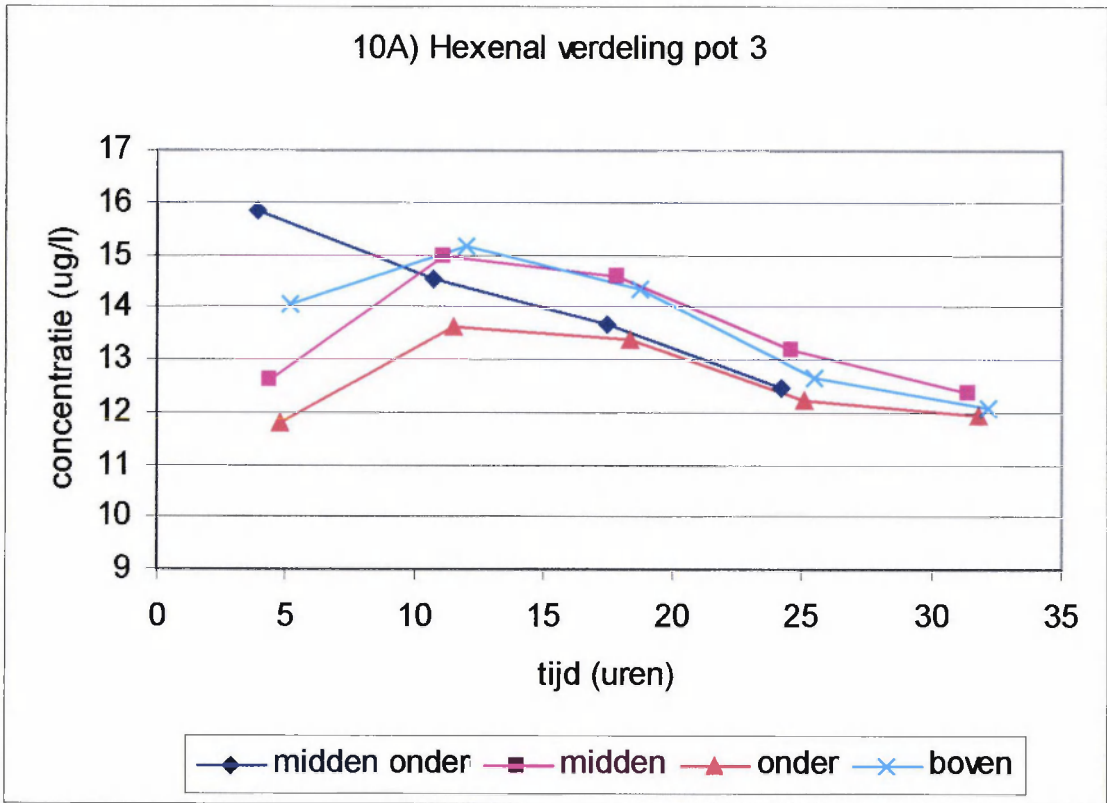




Bijlage 9



Bijlage 10

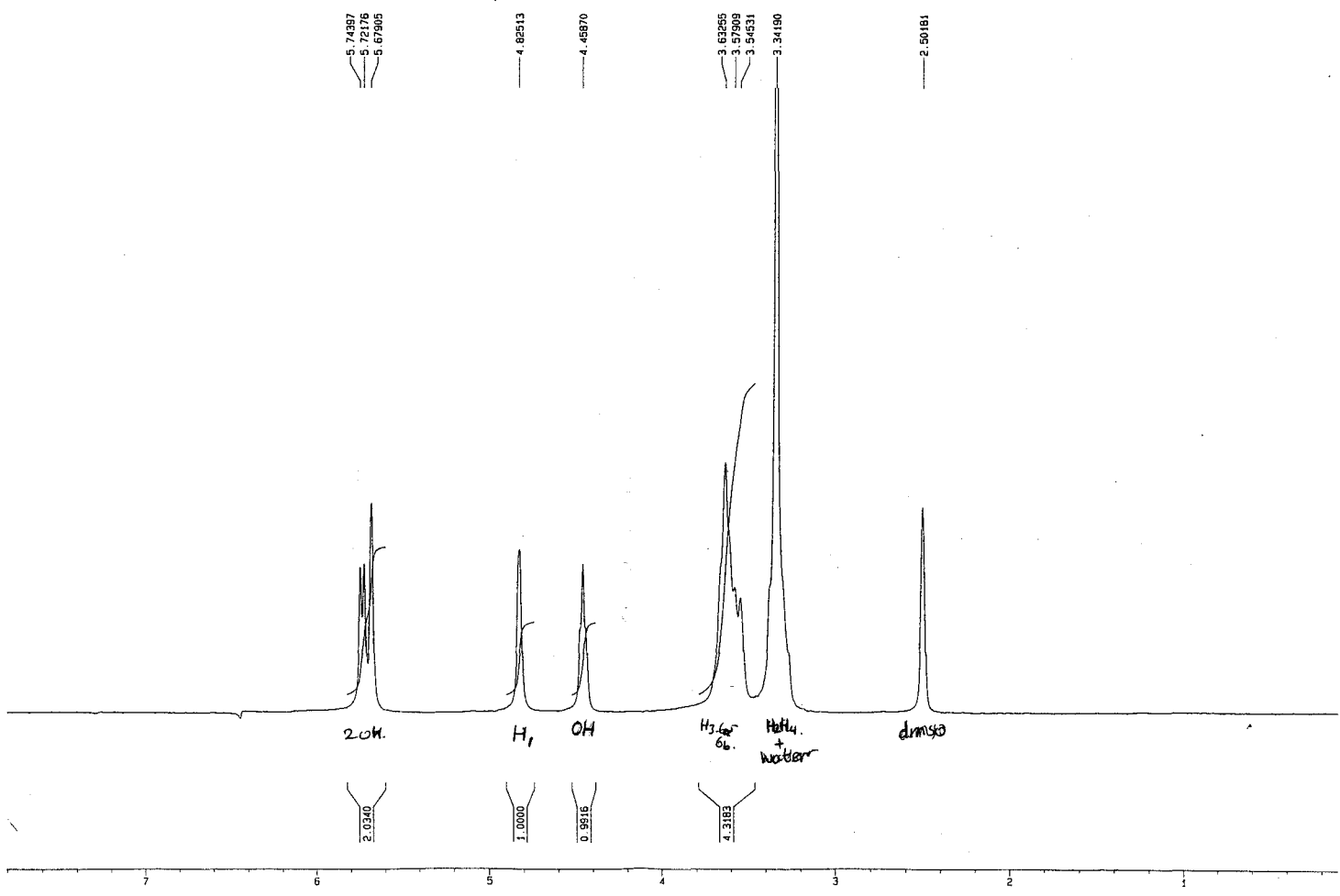


Bijlage 11

Op de volgende pagina's staan de gemaakte H-NMR spectra.

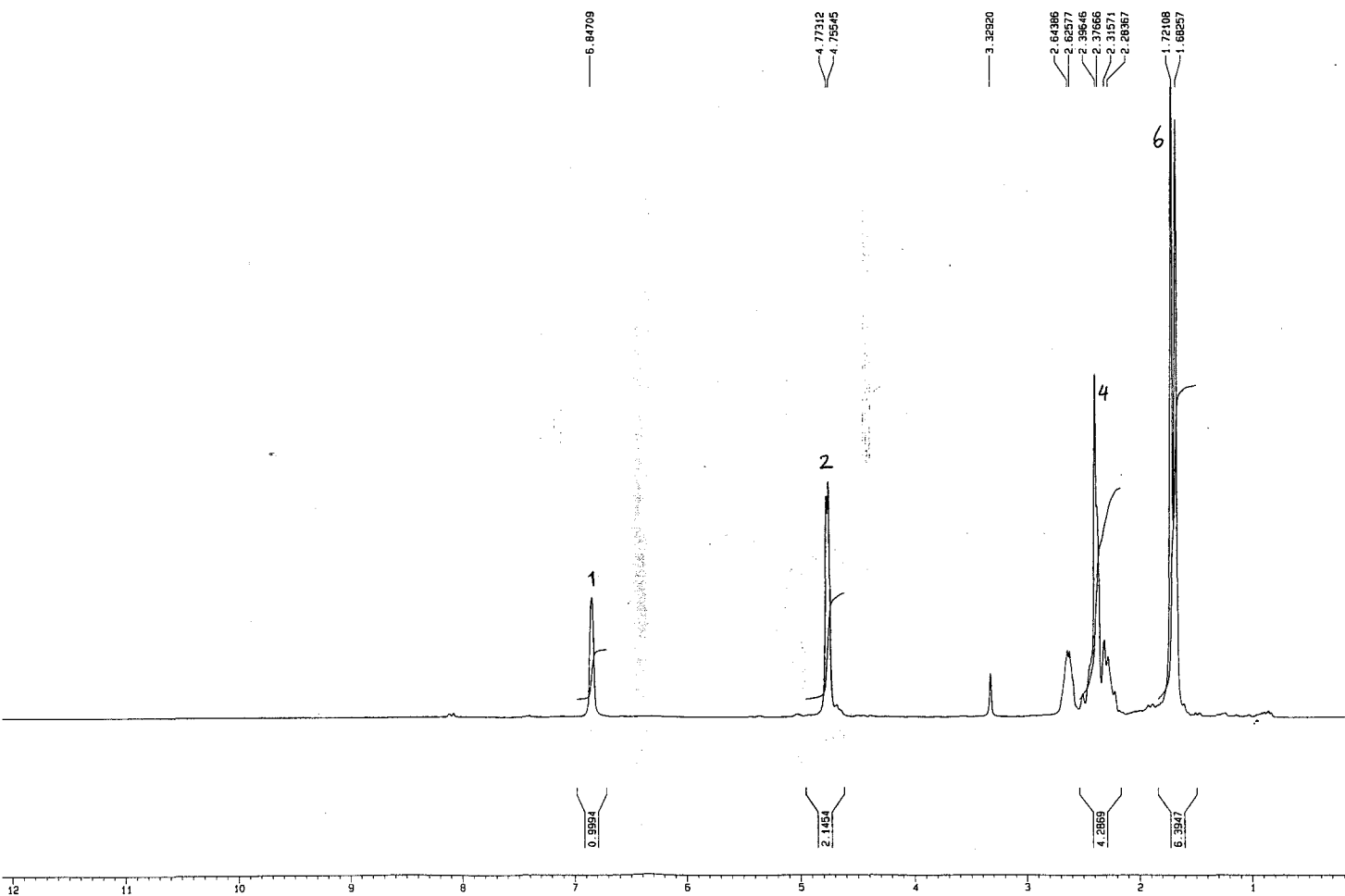
- A) β -CD in DMSO
- B) carvon in DMSO
- C) hexenal in DMSO
- D) α -CD met carvon in D₂O
- E) β -CD met carvon in D₂O
- F) γ -CD met carvon in D₂O
- G) α -CD met hexenal in D₂O
- H) β -CD met hexenal in D₂O
- I) γ -CD met hexenal in D₂O
- J) β -CD met carvon in DMSO
- K) γ -CD met carvon in DMSO
- L) α -CD met hexenal in DMSO
- M) β -CD met hexenal in DMSO

at-beta: beta cyclodextrine in DMSO, 1 scan, roomtemp, 5-3-01



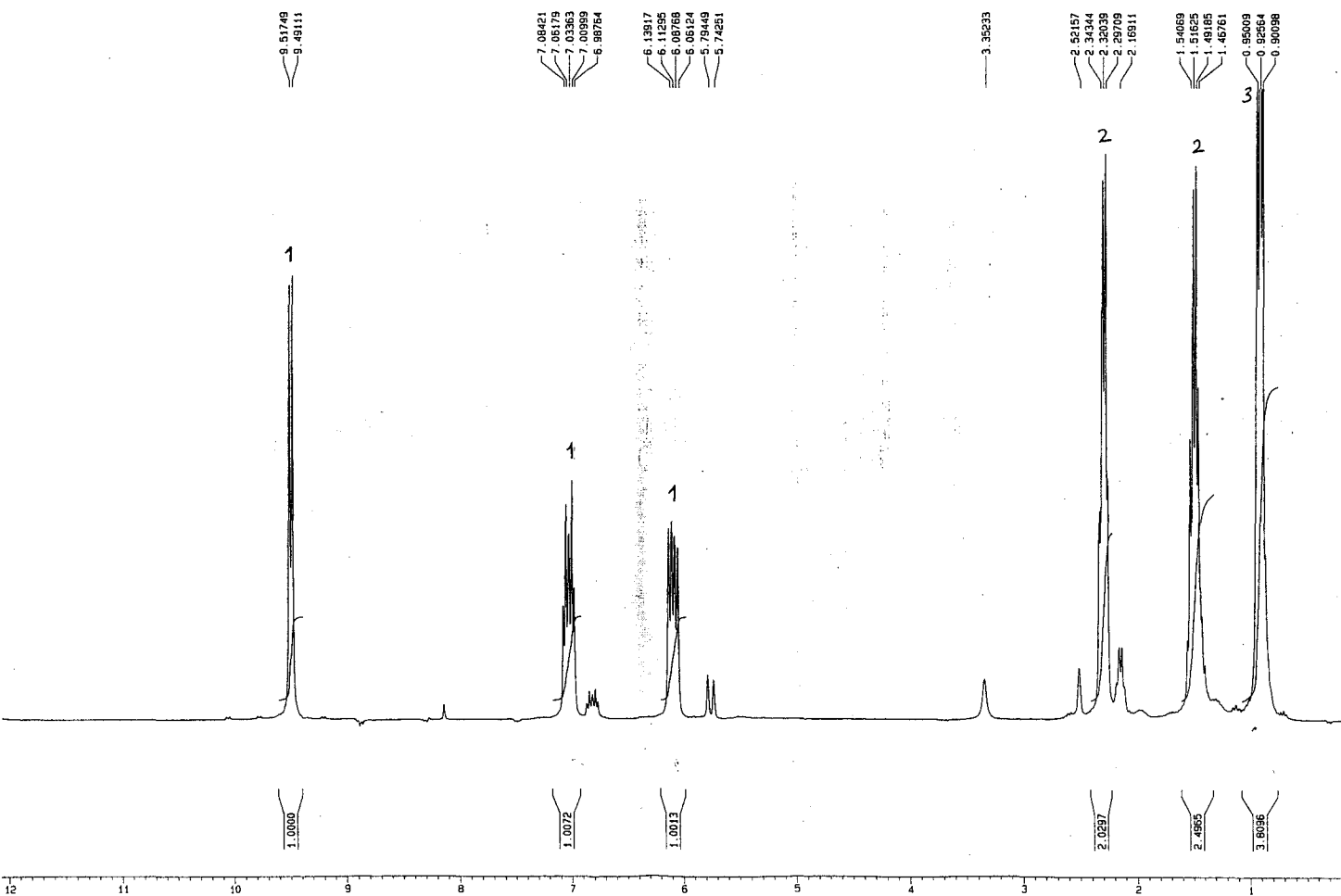
A

at-carbon: carvon in DMSO, 1 scan, roomtemp, 5-3-01



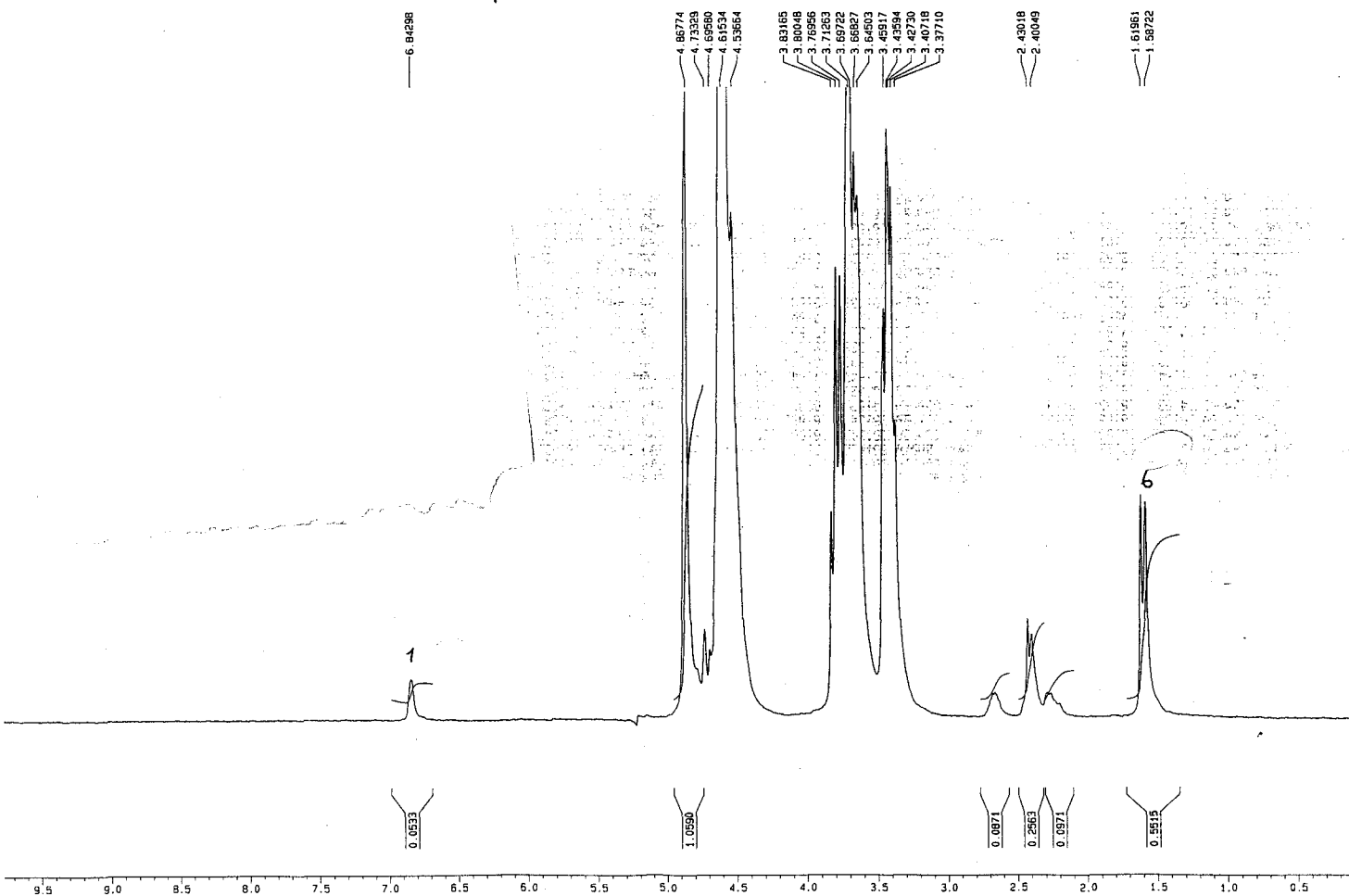
B

at-hexenal: hexenal in DMSO, 4 scans, roomtemp, 5-3-01



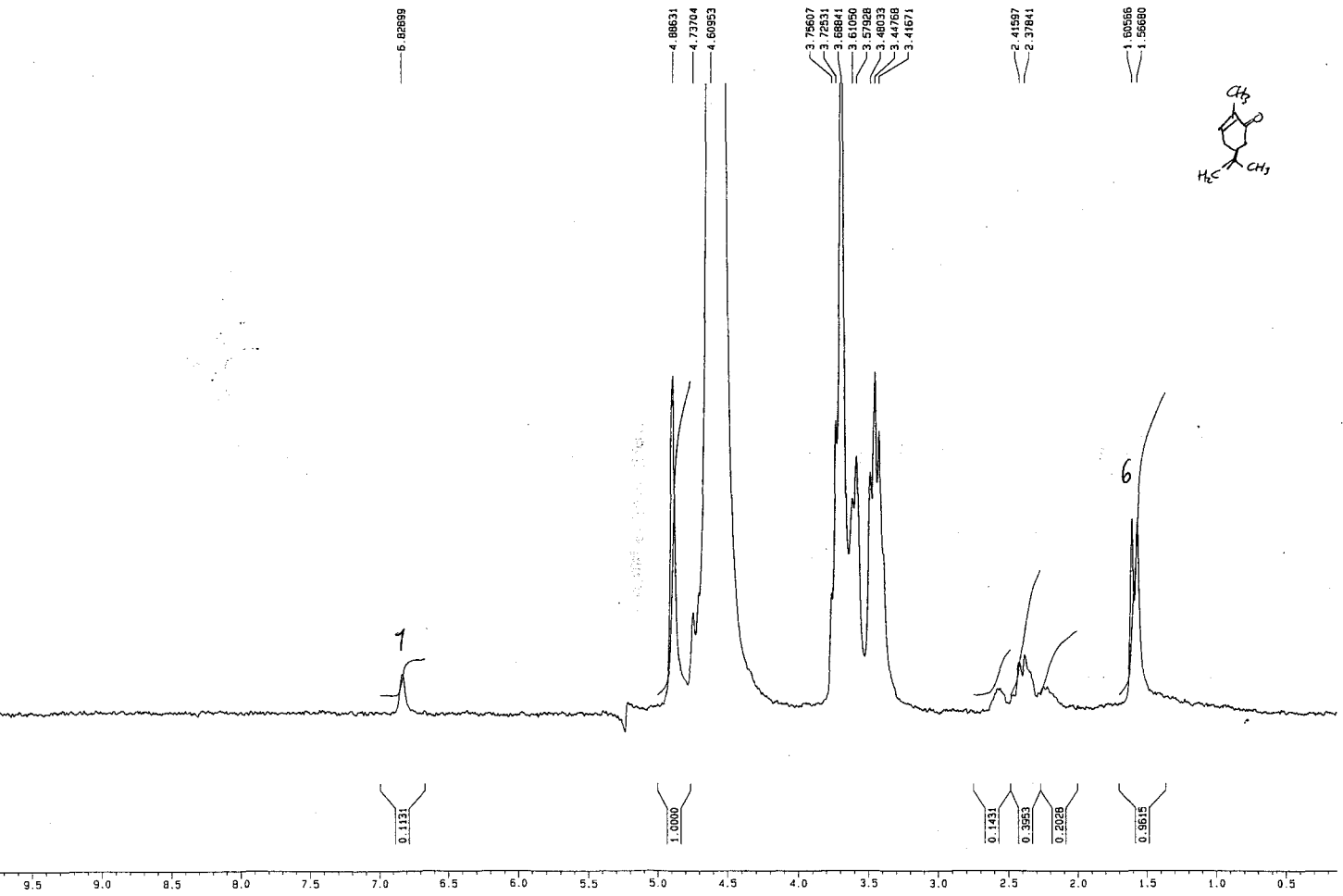
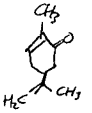
C

at-alpha-carvon: alphacyclodextrine met carvon, 12-2-01

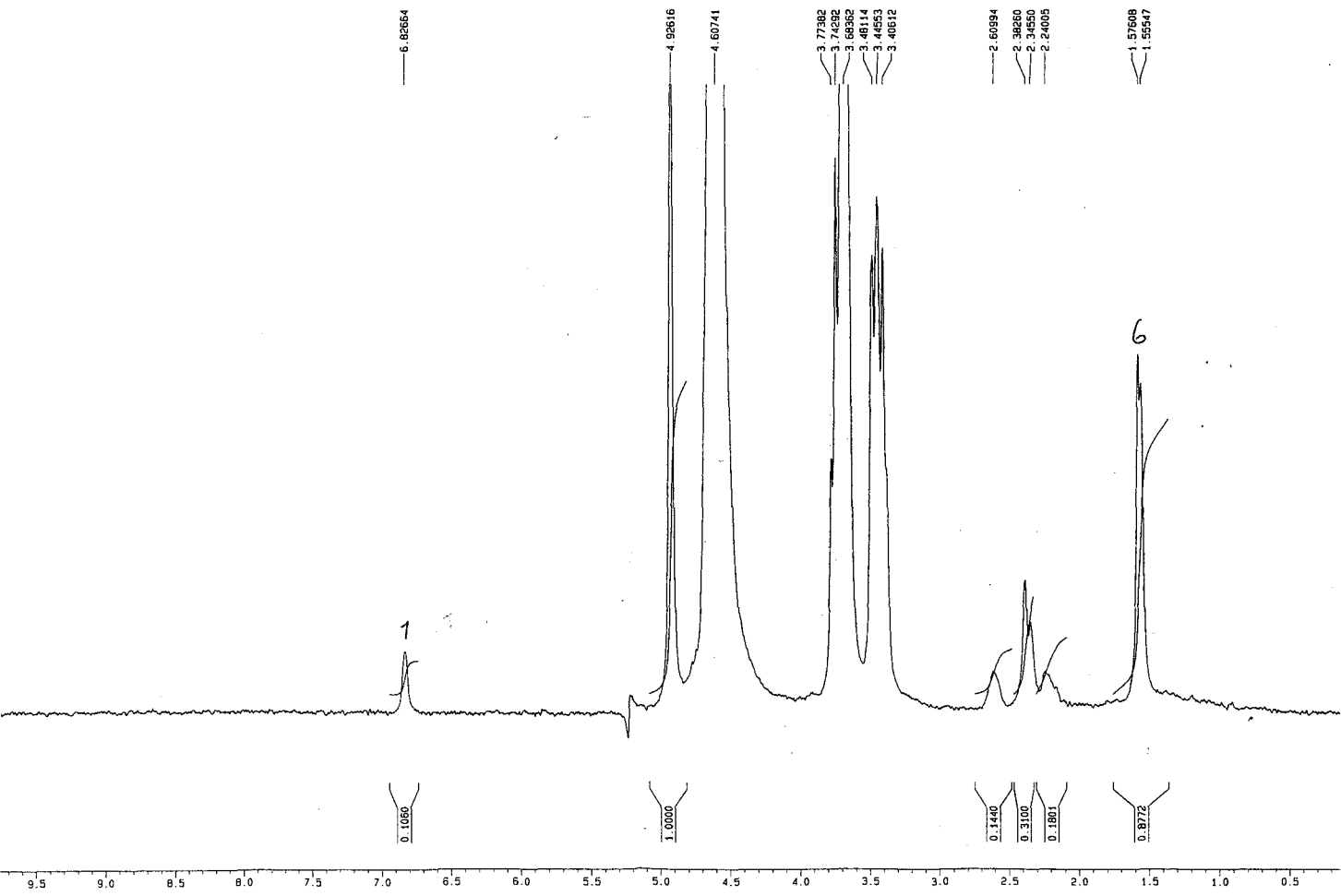


D

at-betacarvon: betacyclodextrine met carvon 12-02-01

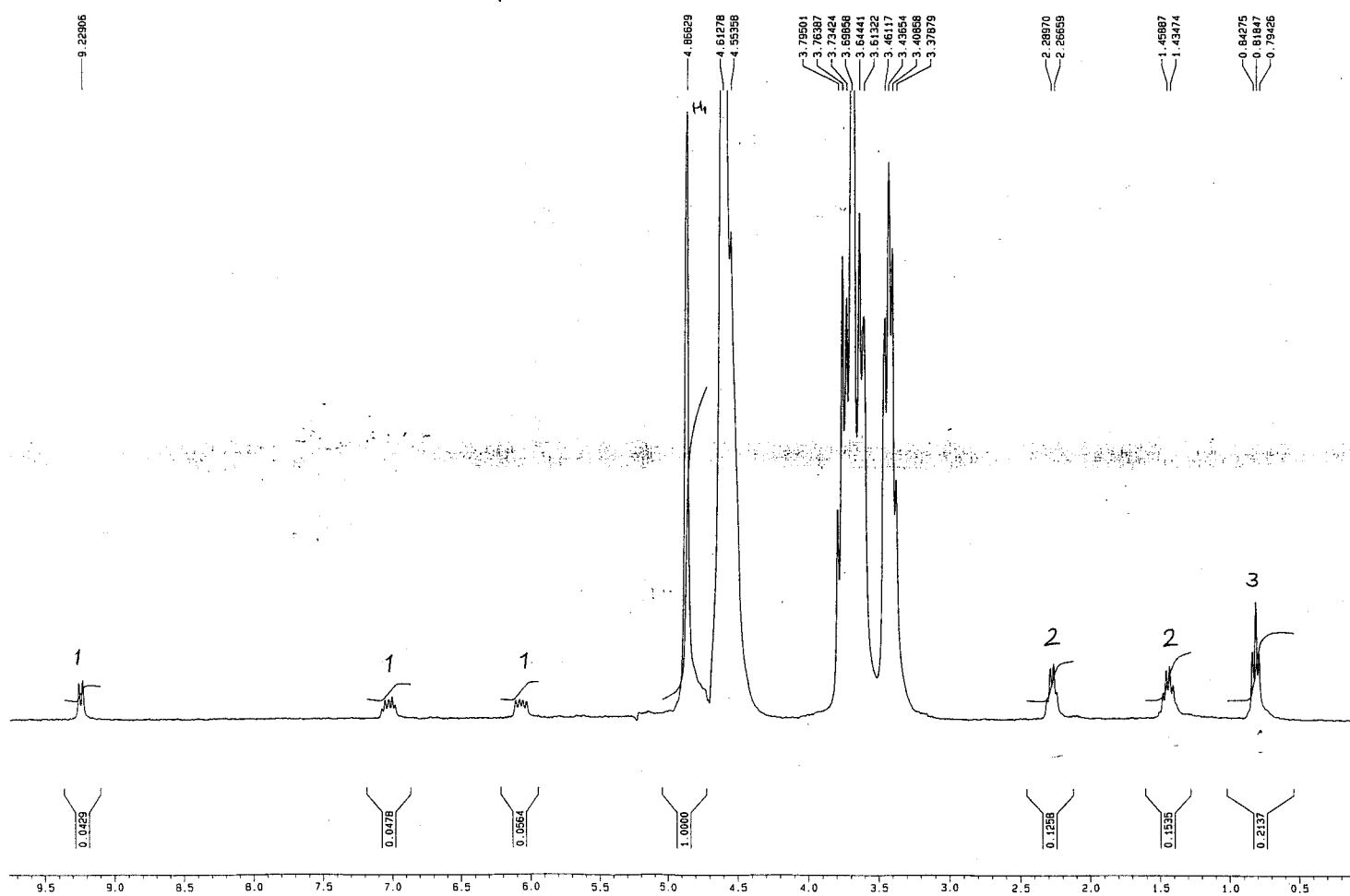


at-gammacarvon: gammacyclodextrine met carvon 12-02-01

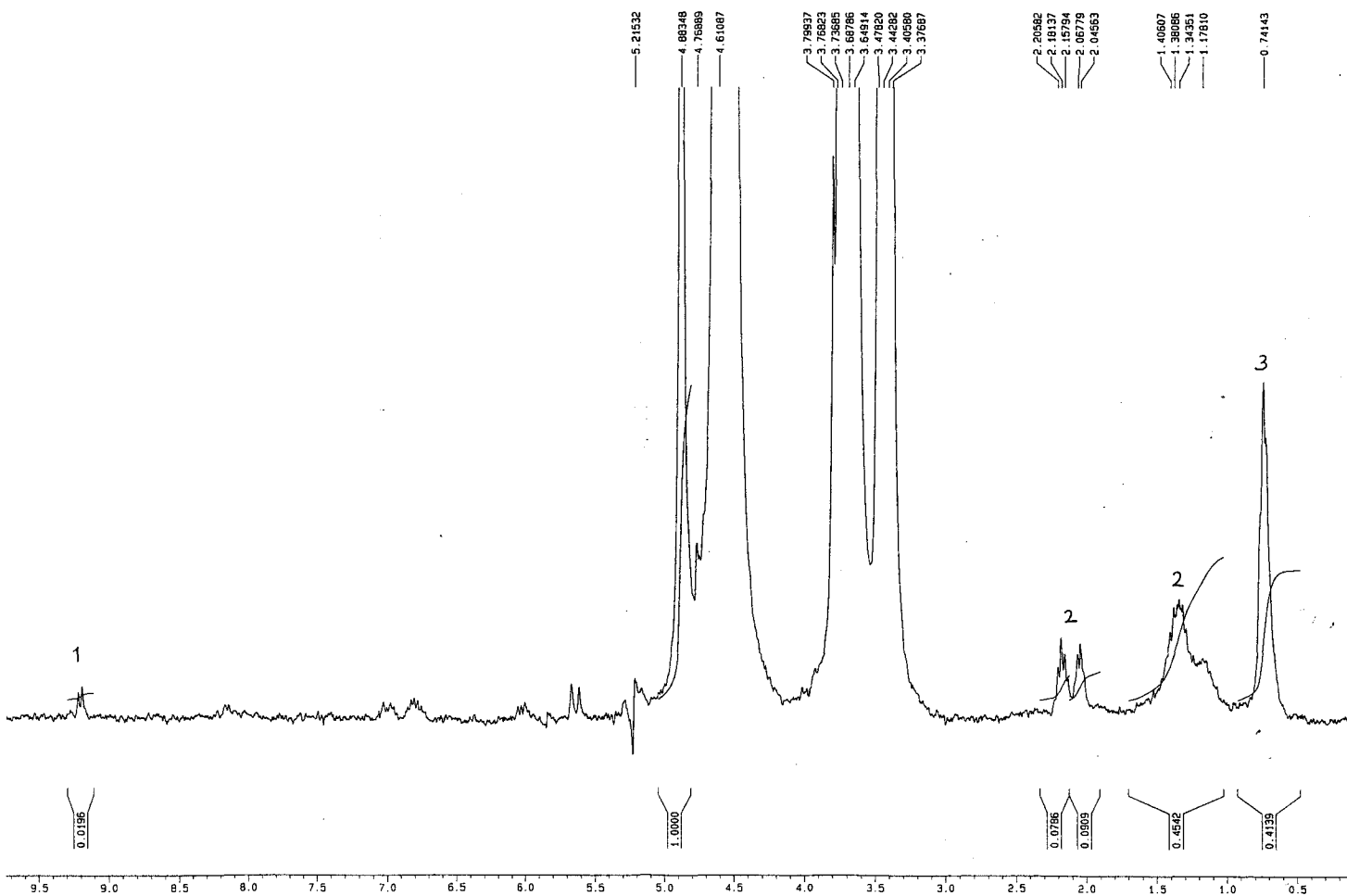


F

at-alphanex: alphacyclodextrine met 2-hexenal, 12-02-01



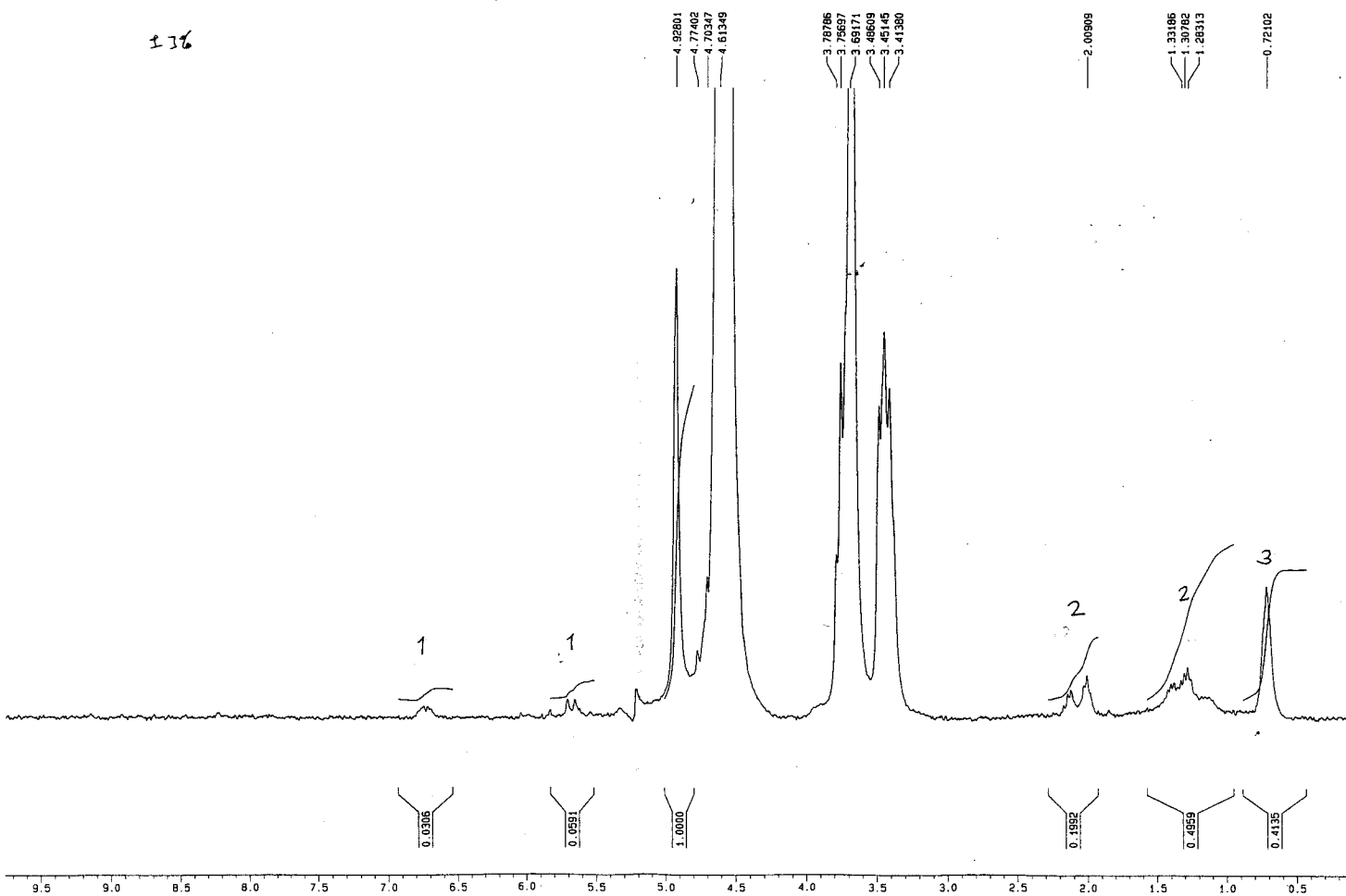
at-betahex: betacyclodextrine en hexenol, 12-02-01



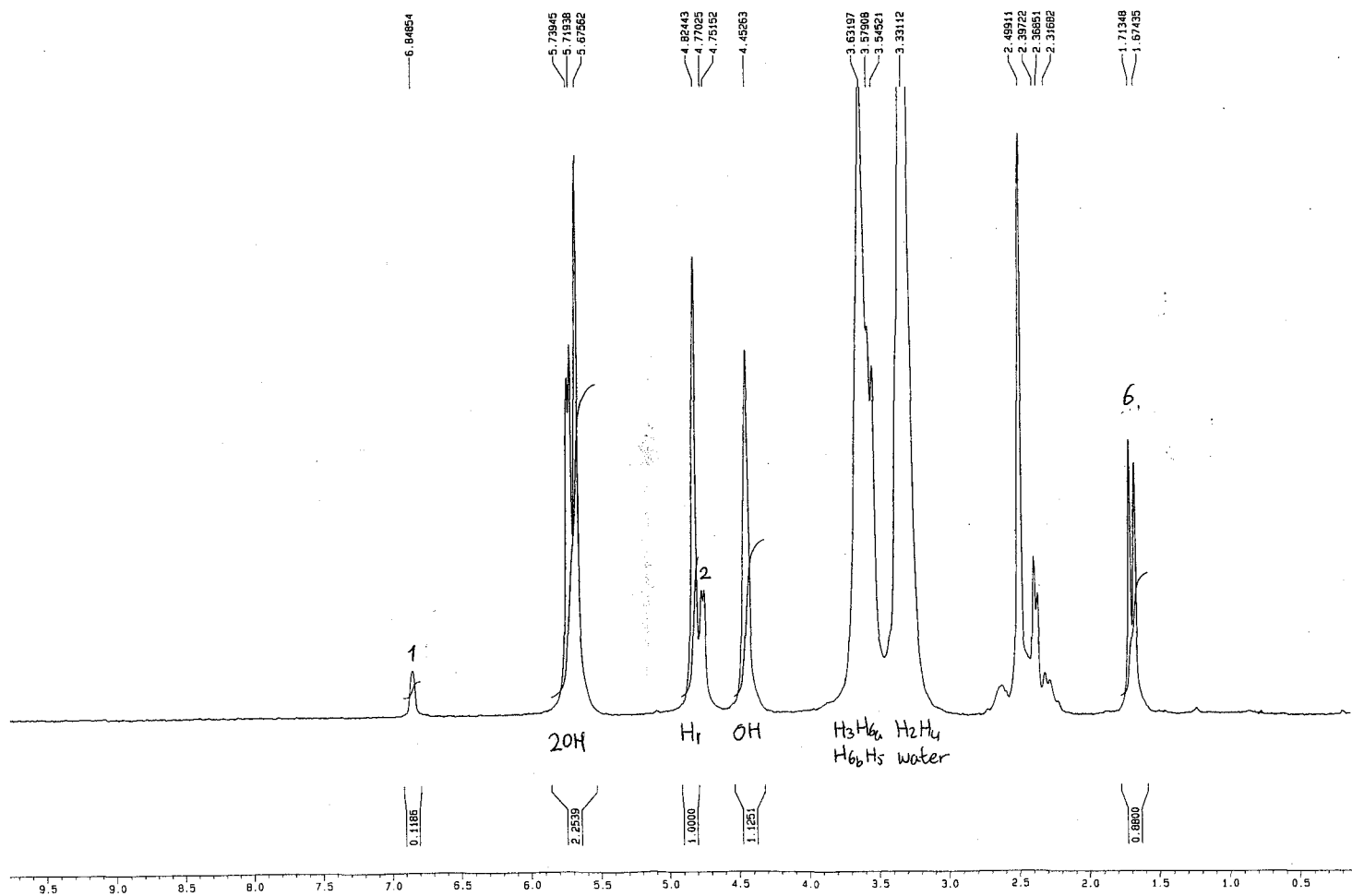
H

at-gammahex: gammacyclodextrine met hexenal, 12-02-01

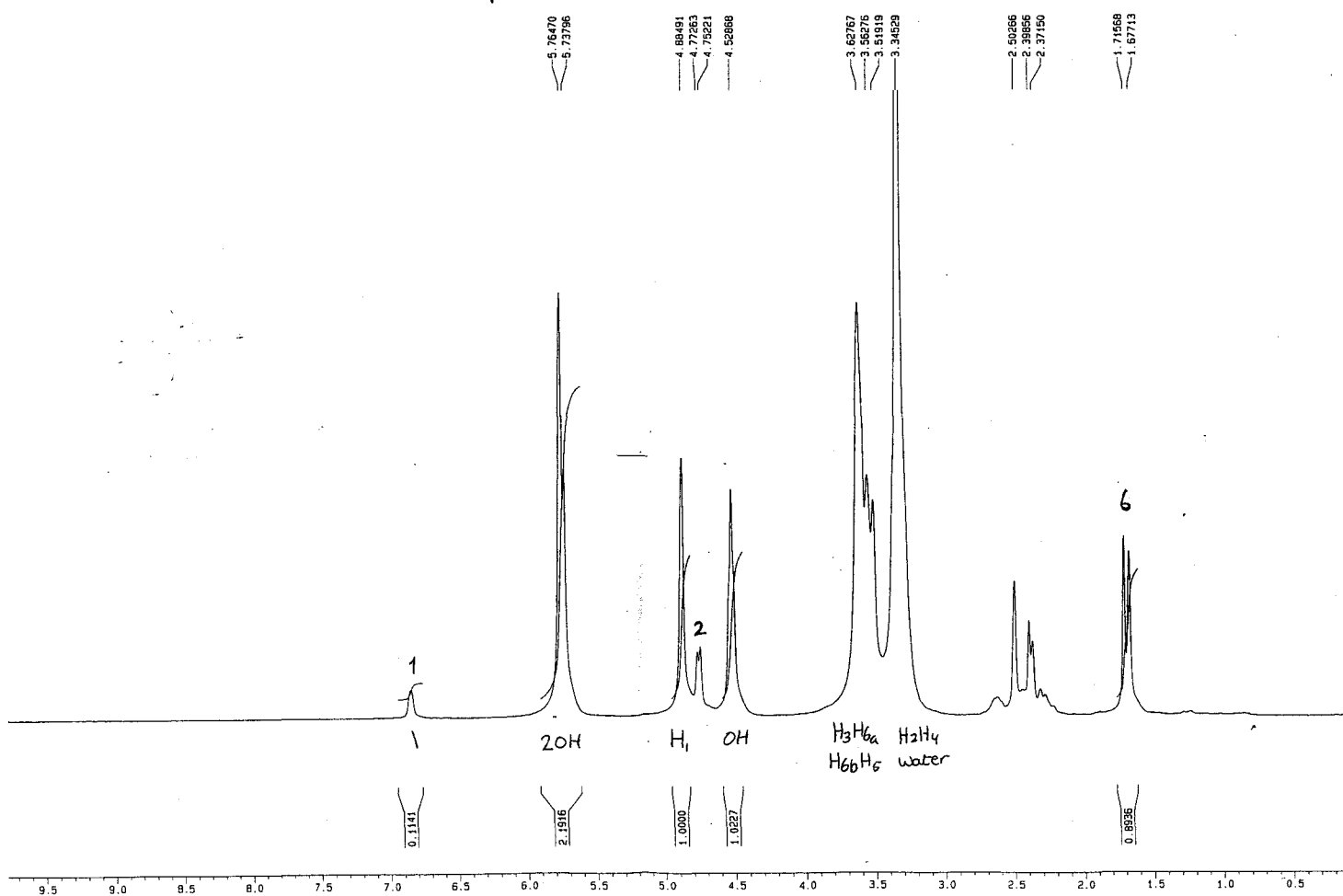
± 1%



at- α -carv-DMSO: beta cyclodextrine met carvon in DMSO. 21-02-01

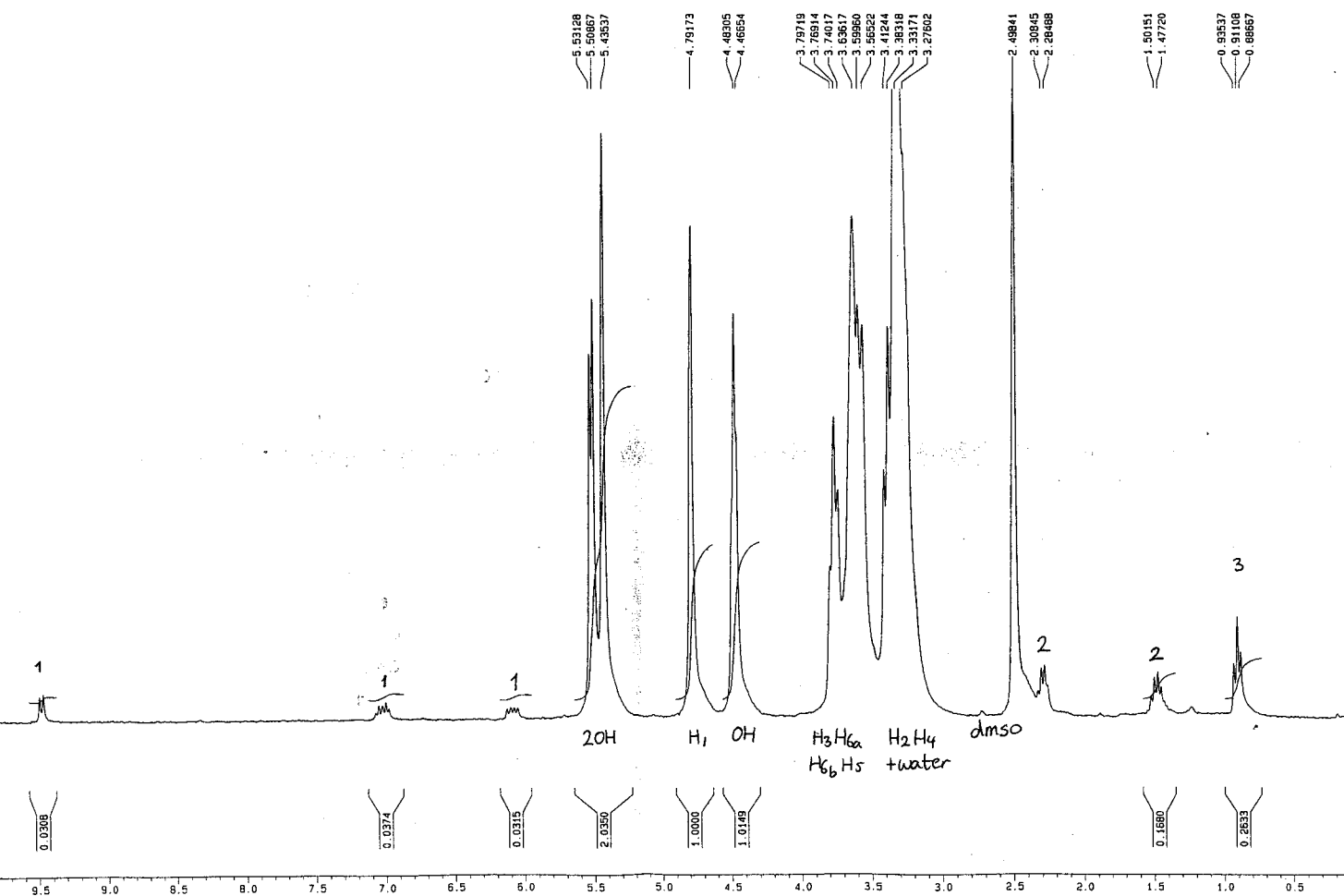


at-c-carv-DMSO: ^βgamma cyclodextrine in DMSO. 21-02-01



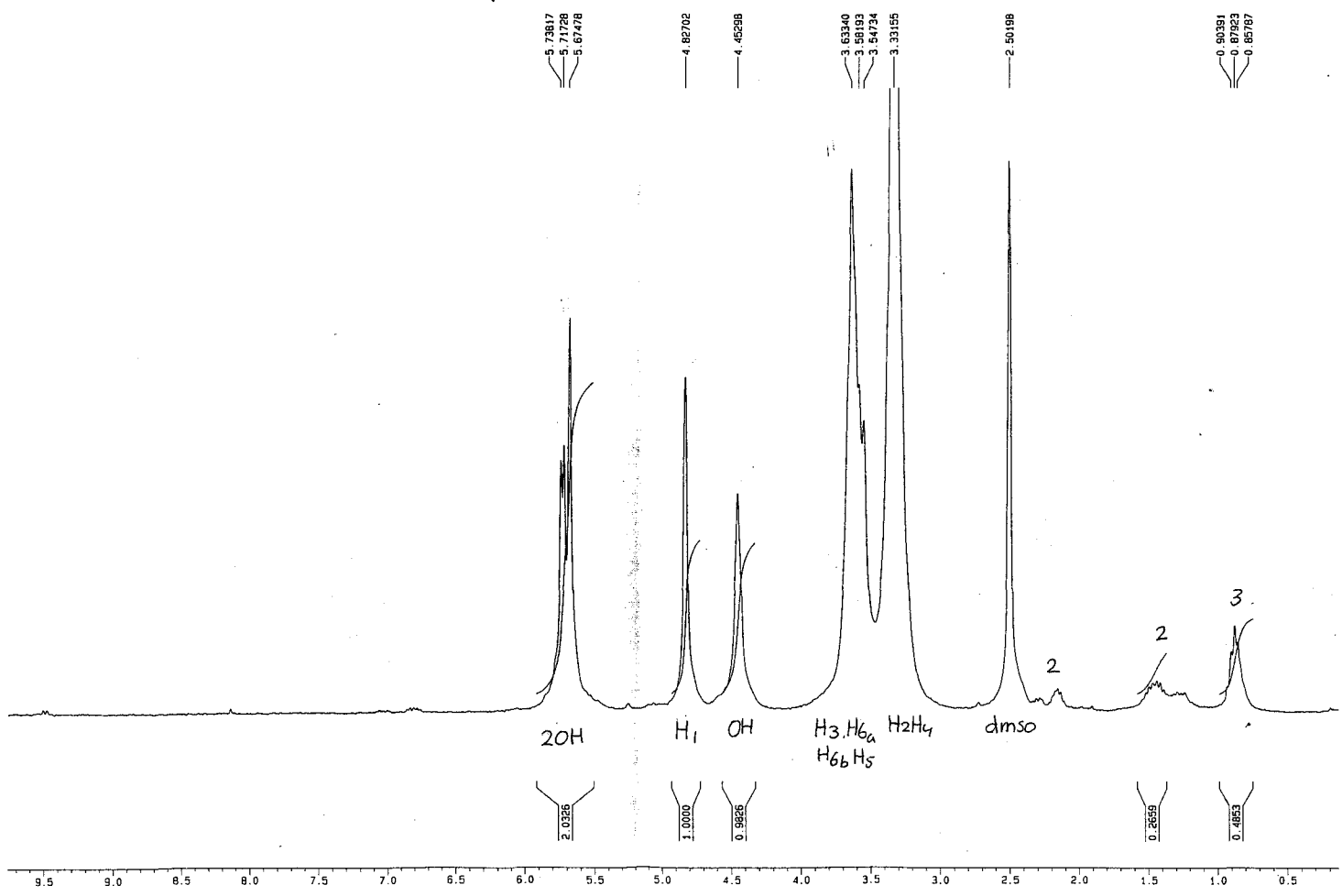
K

at-a-hex-DMSO: alpha cyclodextrine met hexenal in DMSO, 21-2-01



L

at-b-hex-DMSO: beta cyclodextrine met hexenal in DMSO, 21-02-01



M