

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
kleurstoffen

Onderwerp: Identificatie van een gele kleurstof in/op kip

Bijlagen: Spectra

Doel:

Identificatie van een gele kleurstof in/op kip.

Samenvatting:

Er wordt een verslag gegeven van de isolatie, de zuivering en de identificatie van een gele kleurstof.

Conclusie:

Het vele werk dat aan dit, voor de afdeling Additieven en Spooorelementen, nieuwe onderzoek voorafging heeft geleid tot een methode voor de bepaling van kleurstof in/op kip die ongetwijfeld ook voor andere vleesprodukten is toe te passen.

In dit geval kon de kleurstof worden geïdentificeerd als β -caroteen.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerker/samensteller: J.J. van Oostrom

Handwritten signature

Inleiding

Van afdeling Vlees ontvingen wij 2 monsters kip: één monster vel en één monster vlees in gemalen toestand.

Bij het monster vel was duidelijk een gele kleur aan het oppervlak waarneembaar. Volgens de afdeling Vlees was het kippevlees dat hierbij behoorde niet gekleurd. Het andere monster bestond uit vlees dat een gele kleur vertoonde.

Aan de hand van het uiterlijk van de gele kleur en persoonlijke ervaring ging de gedachte uit naar een natuurlijke kleurstof.

Het onderzoek werd dan ook hierop gericht. Er dient opgemerkt te worden dat de afdeling Additieven en Spoorelementen tot nu toe geen enkele ervaring met kleurstoffen in/op vlees had.

Onderzoek

Isolatie

Het monster vel werd eerst gemalen met een moulinex omdat de hoeveelheid beschikbaar monstermateriaal minimaal was en dus een zo volledig mogelijke extractie moest plaatsvinden. Het monster vlees was reeds gemalen.

De produkten bevatten zeer veel vocht; daarom werden de monsters in een mortier aangewreven met watervrij natriumsulfaat.

Bij het verdere onderzoek hebben we ons laten leiden door de volgende overwegingen:

- 1^e het vermoeden bestond dat het hier om een natuurlijke kleurstof ging.
- 2^e bij het gebruik van natuurlijke kleurstoffen wordt in praktisch alle gevallen gebruik gemaakt van 'of anatto 'of β -caroteen.

De extractie moest dus in eerste instantie hierop gericht worden.

Bekend is dat β -caroteen oplost in petroleumether, en anatto in methanol (zowel water als vetoplosbaar anatto). De extractie werd daarom uitgevoerd met een mengsel ca. 1 : 1 petroleumether - methanol in soxhlet extractie-apparatuur.

Hiermee werd inderdaad een geel extract verkregen.

Zuivering

Het op bovenstaande manier verkregen extract bevatte naast de kleurstof ook nog veel vet en eventuele andere extraheerbare produkten.

De geeigende manier om vet kwijt te raken is verzeppen.

Dit werd gedaan volgens het voorschrift G 44 (β -caroteen in botervet) met behulp van KOH en ethanol. De nu verkregen zeepoplossing werd volgens hetzelfde voorschrift geextraheerd.

Het verkregen (gele) etherextract werd gedroogd met watervrij natriumsulfaat, gefiltreerd en ingedampt.

Wat overbleef was een gele rest die nog steeds vetachtig was.

Identificatie

Dit is in eerste instantie op twee manieren gedaan:

- 1 Dunnelaagchromatografie
- 2 Kolomchromatografie

1 Dunnelaagchromatografie

De verkregen indamprest werd opgelost in enige ml ethanol en met β -caroteen, anatto vetoplosbaar en anatto wateroplosbaar als referentiestoffen op een dunnelaagplaat gebracht (kiezelgel).

Als loopvloeistof werd het gebruikelijke mengsel amylacetaat/azijnzuur (99 : 1) gebruikt.

2 Kolomchromatografie

Een gedeelte van de kleurstofoplossing werd op een kolom aluminiumoxide neutraal act V gebracht en geëluëerd met methanol.

Anatto wordt bij een dergelijke kolom geabsorbeerd aan de top.

Na ontwikkelen van de DLC plaat kwam zowel de kleur als de Rf-waarde van de monsters exact overeen met wateroplosbaar anatto.

In de kolom echter liep de kleurstof door de kolom als β -caroteen.

We hebben hier dus te maken met twee elkaar tegensprekende analyseresultaten.

Uit deze gegevens kan het volgende geconcludeerd worden.

- 1^e De kleurstof is een andere dan de aangenomen kleurstoffen.
- 2^e De kleurstof is β -caroteen maar wordt op de DLC plaat afgeremd door resten vet e.d.

Om het probleem op te lossen zijn de volgende experimenten/techniek gedaan.

- 1 Enige proefjes uit oude analysevoorschriften uit de vijftiger en zestiger jaren.
- 2 Circulaire papierchromatografie
- 3 Electrochemische identificatie
- 4 Zichtbaarlichtspectrofotometer:

- 1 In oude analyse voorschriften (o.a. G 9 en G 12) werden enige proefjes gevonden om vetoplosbare kleurstoffen snel te identificeren. De proeven en de verkregen resultaten zijn de volgende:

a Kleurstof + H_2SO_4 $\longrightarrow$ kleur bruin-groen

Anatto en β -caroteen geven volgens het voorschrift een blauw-groene verkleuring.

b Etheroplossing van de kleurstof + 0,1 N KOH $\longrightarrow$ géén kleuring.

Bij aanwezigheid van anatto zou de waterlaag geel moeten kleuren.

c Etheroplossing van de kleurstof + 38% HCL $\longrightarrow$ géén kleuring.

Vetoplosbare anilinekleurstoffen zouden de zoutzuurlaag moeten kleuren.

d Etheroplossing van de kleurstof + HCL + ethanol $\longrightarrow$ géén kleuring.

Synthetische wateroplosbare kleurstoffen zouden de waterlaag moeten kleuren.

2 Circulair papierchromatogram.

Ook dit is een oude methode om natuurlijke kleurstoffen te identificeren.

De etheroplossing van de monsters is met referentiekleurstoffen op een circulair papierchromatogram gebracht. Als loopvloeistof is gebruik gemaakt van aceton - water (7 : 3).

Hiermee kon de kleurstof niet worden geïdentificeerd als anatto, echter ook niet duidelijk als β -caroteen.

3 Electrochemische detectie.

Na enig literatuuronderzoek werd een voorschrift voor de identificatie van β -caroteen gevonden en we probeerden dit met standaardoplossingen van zowel β -caroteen als anatto na te werken. Dit had geen direct succes, volgens Van der Struijs was het noodzakelijk dat er eerst enig ontwikkelingswerk werd uitgevoerd.

4 Spectrum in het zichtbare gebied.

Er werden standaardoplossingen gemaakt van β -caroteen, wateroplosbaar anatto en vetoplosbaar anatto in chloroform, ook de resterende kleurstof uit de monsters werd na drogen opgelost in chloroform.

Van deze vijf oplossingen werd een spectrum opgenomen met de SP 1700 spectrofotometer.

De kleurstof bleek overeen te komen met het spectrum van β -caroteen.

De verkregen spectra zijn als bijlage bijgevoegd.

Conclusie

De gele kleurstof op en in de monsters kip is geïdentificeerd als β -caroteen. Uit bovenstaand verslag blijkt dat de extractie van vetoplosbare kleurstoffen uit vleesprodukten gedaan kan worden met methanol-petroleumether. De zuivering kan door middel van verzeping en extractie met ether. Uit de gevolgde identificatiemethoden blijkt dat deze zuivering niet volledig is, aangezien dunnelaag- en papierchromatografie verkeerde respectievelijk onduidelijke informatie opleveren. Dit is waarschijnlijk te wijten aan vet of vetachtige stoffen die na de zuivering zijn achtergebleven (onverzeepbare deel!).

Uit de proefjes uit oude voorschriften zijn wel enige conclusies te halen. Verschillende groepen kleurstoffen kunnen hiermee worden uitgeschakeld zodat de verdere analyse gerichter kan worden uitgevoerd.

De electrochemische identificatie zal, indien voldoende tijd en moeite geïnvesteerd wordt, wel een belangrijk hulpmiddel kunnen worden bij onderzoeken als deze.

De identificatie met behulp van een zichtbaarlichtspectrum is in dit geval succesvol geweest, aan de hand van het spectrum kon de kleurstof geïdentificeerd worden.

