

**Benelux-referentiemethode voor het opsporen
en identificeren van in levensmiddelen aanwezige
in vet oplosbare kleurstoffen**

M (66) 14, Bijlage

LIJST VAN REAGENTIA

Aluminiumoxide, Brockmann, dat een uur op 400°C is geactiveerd

Ethanolische kaliumhydroxide, ongeveer 0,5 n

Magnesiumsulfaat, watervrij

Ether, peroxide vrij

Ethanol : 96 vol. %

Petroleumether : kookpunt 40° - 60°C

Chloroform

Dimethylformamide (DMF)

Petroleumether-aceton :

— mengsel van 98 vol. petroleumether en 2 vol. aceton

Ethanol-zoutzuur :

— mengsel van 9 vol. ethanol en 1 vol. zoutzuur 36 %

Ethanol ammonia :

— mengsel van 2 vol. ethanol en 1 vol. ammonia 25 gew. %
NH₃

Dunnelaagchromatografie :

— plaat voorzien van een laag kieselgel G met een dikte van 250.

— mengsel van 9 vol. benzeen en 1 vol. aceton

1. Het isoleren :

- 1.1. Los 5 g vet of olie op in 50 ml petroleumether. Schud de oplossing achtereenvolgens éénmaal met 10 ml en tweemaal met 5 ml DMF uit. Verzamel de DMF-lagen en schud deze zorgvuldig viermaal uit met petroleumether

om zoveel mogelijk het vet en de laatste sporen carotenen te verwijderen. Verzamel alle petroleumetherische oplossingen en behandel deze indien ze gekleurd zijn, volgens 1.3. (B-apocarotinal blijft verdeeld tussen de twee oplosmiddelen).

- 1.2. Verdun de DMF-laag met een gelijk volume water. Was deze meestal iets troebele oplossing zeer voorzichtig tweemaal met 10 ml chloroform uit. Spoel, ter verwijdering van de laatste sporen DMF, de verzamelde chloroformlagen tenminste zesmaal telkens met 10 ml water na.

De verwijdering van de laatste sporen DMF is compleet als de laatste 10 ml waswater geen zichtbare indamprest meer geeft.

Droog de chloroformlaag met magnesiumsulfaat en filtreer over een klein papieren filter. Damp de oplossing in vacuo of in een stikstofstroom tot droog in. Neem het residu op in 2 ml petroleumether en handel zoals onder 1.4, 1.6, 1.7, en 1.8 is aangegeven.

- 1.3. Damp de volgens 1.1. verkregen petroleumetherlaag in vacuo of in een stikstofstroom tot droog in. Voeg 100 ml ethanolische kaliumhydroxide-oplossing toe en kook een uur onder terugvloeiakoeling ter verzeeping van de lipiden. Koel af. Voeg 200 ml water toe en schud driemaal uit, met resp. 100 ml, 25 ml en 25 ml ether. Verzamel de etherische oplossingen en spoel deze driemaal met 25 ml water na. Droog de verzamelde etherlagen met magnesiumsulfaat en filtreer. Damp het filtraat in vacuo of in een stikstofstroom tot droog in. Neem het residu op in 2 ml petroleumether en handel zoals onder 1.4, 1.5 en 1.6 is aangegeven.

- 1.4. Maak een zuiltje van aluminiumoxide ($\varnothing$ 1 cm, lengte 10 cm), dat doordrenkt is met petroleumether. Giet daarna de onder 1.2 of 1.3 verkregen oplossing op de zuil. Laat de vloeistof doorlopen. Spoel de zuil met petroleumether na. (De kleurstoffen blijven aan het boveninde van de kolom geadsorbeerd).

- 1.5. Elueer de carotenen met petroleumether-aceton. Damp het eluaat in vacuo of in stikstofstroom tot droog in en identificeer het verkregen residu volgens 2.1.
- 1.6. Elueer de synthetische azokleurstoffen en β -apocarotinal met ethanol. Damp het eluaat in vacuo of in een stikstofstroom tot droog in. Neem het residu op in 2 ml petroleumether en was deze oplossing acht maal, telkens met 10 ml water. Verdamp het oplosmiddel en identificeer het verkregen residu volgens 2.1.
- 1.7. Elueer de bixine vervolgens met ethanolammonia. Damp het eluaat in vacuo of in een stikstofstroom tot droog in en identificeer het verkregen residu volgens 2.1. Curcumine, waarvan de kleur naar rood veranderd is, blijft op de zuil.
- 1.8. Was de zuil met ethanol ter verwijdering van ammonia. Elueer vervolgens de curcumine met ethanol-zoutzuur. Voeg aan het eluaat het drievoudige volume water toe. Schud de curcumine met ether uit. Droog de etherische oplossing op magnesiumsulfaat, damp tot droog in en identificeer het verkregen residu volgens 2.1.

2. De identificatie

- 2.1. Neem elk van de onder 1.4. t/m 1.8. verkregen resten afzonderlijk in 1 ml ether op. Breng met behulp van een capillaire pipet een voldoende hoeveelheid oplossing op de kieselgel G plaat. Chromatografeer met het mengsel benzeen-aceton. Vergelijk de verkregen vlekken met die van authentieke kleurstoffen. Voeg, in geval van twijfel, aan een deel van het vetmonster, de authentieke kleurstof toe en pas hierop de hele bewerking weer toe.