

Studiengang Life Technologies

Vertiefungsrichtung Analytische Chemie

Diplom 2009

Elodie Pellissier

*HPTLC-Bestimmung von unerlaubt
zugesetzten fettlöslichen Azofarbstoffen
in Lebensmitteln*

Dozent	PD Dr. Wilfried Andlauer
Experte	Prof. Dr. Wolfgang Schwack

Es handelt sich um den Originalbericht des Studenten. Er wurde nicht korrigiert und kann folglich Fehler und ungenaue Angaben enthalten.

Universität Hohenheim

Institut für Lebensmittelchemie

**HPTLC-Bestimmung von unerlaubt
zugesetzten fettlöslichen Azofarbstoffen
in Lebensmitteln**

vorgelegt von

Elodie Pellissier

aus Grimisuat (CH)

Die wissenschaftliche Betreuung erfolgte durch

Prof. Dr. W. Schwack

Universität Hohenheim

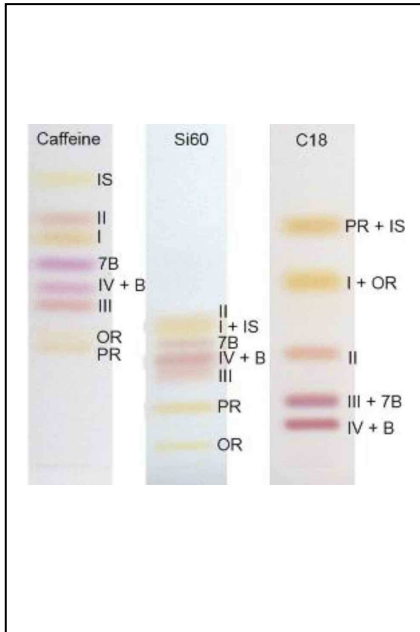
Institut für Lebensmittelchemie

Garbenstraße 28, 70599 Stuttgart

4. Mai 2009 bis 4. November 2009

Bestimmung von Azofarbstoffen in Lebensmitteln

Diplomand/in Elodie Pellissier



Ziel des Projekts

Da Sudanrot I-IV, 7B, B, Sudanorange G und Pararot fettlösliche Farbstoffe sind, die Lebensmitteln unerlaubt zugesetzt werden können, wurde eine schnelle HPTLC-Methode zu deren Nachweis in Gewürzen, Soßen, Pasten und Palmöl entwickelt.

Methoden / Experimente / Resultate

Die beste Trennung wurde auf Coffein-impregnierten NANO-SIL-PAH HPTLC-Platten (Fließmittel: Isohexan - Methylethylketon 5:1, (v/v)) erreicht. Die Nachweisgrenzen liegen im Bereich von 1,7 - 3,2 ng/Spot. Für Kurkumapulver, Öle, Pasten und Soßen wurde keine Aufreinigung benötigt, da die Basislinie schon frei von Matrixstörung war. Bei Paprika- und Chilipulver ist nach der Entwicklung eine 4-minütige Bestrahlung unter UV-Licht vonnöten. Die höchste Nachweisgrenze (10 ppm) erhält man für Gewürzpulver. Diese ist im Hinblick auf die zu erwartenden Zusätze zur gewünschten Farbkorrektur der Produkte ausreichend. Parallel wurde eine Screeningmethode (38 Proben gleichzeitig) entwickelt. Im Vergleich mit einer kürzlich veröffentlichten HPLC-Methode ist die quantitative bzw. Screening-HPTLC-Methode um den Faktor 2 bzw. 4 billiger und um den Faktor 25 bzw. 75 schneller. Funde von Azofarbstoffen können durch UV/Vis-Spektren, Massenspektren - die online HPTLC-HPLC-MS-Kopplung wurde zum ersten Mal vorgestellt - und ein zweites chromatographisches System unterschiedlicher Selektivität (C18-Säule versus Kieselgelplatte) leicht bestätigt werden. All diese Absicherungen bietet je nach Anforderung ein einziger HPTLC-Lauf.

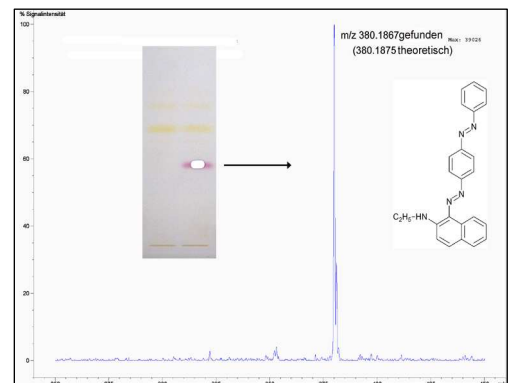
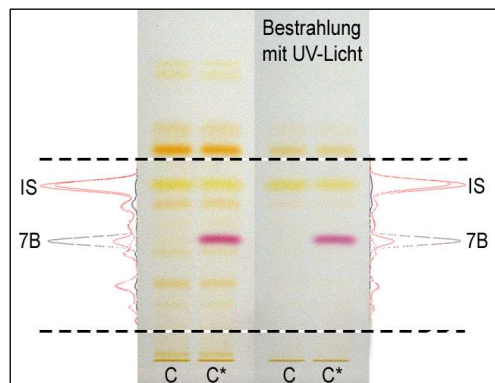
Diplomarbeit
 | 2009 |

Studiengang
 Life Technologies

Anwendungsbereich
 Analytische Chemie

Verantwortliche/r Dozent/in
 PD Dr. Wilfried Andlauer
 wilfried.andlauer@hevs.ch

Partner
 Universität Hohenheim
 Institut für Lebensmittelchemie
 Garbenstraße 28, 70599
 Stuttgart



Effekt der UV-Bestrahlung auf den Matrix-Hintergrund im Chromatogramm eines originalen (C) und dotierten (C*, Sudanrot 7B, 500 mg/kg) Chilipulver-Extraktes

Als zweite Bestätigung des Sudanrot 7B-Fundes das HPTLC-MS-Spektrum des verdächtigen Spots: m/z 380.1887 (gefunden), 380.1875 (theoretisch)

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schwack
für die sehr interessante Aufgabenstellung, die engagierte Betreuung und die ständige
Diskussionsbereitschaft

Frau PD Dr. Gerda Morlock
für die freundliche Hilfsbereitschaft und die wertvollen Diskussionen

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Lebensmittelchemie der Universität
Hohenheim für die Unterstützung und das gute Arbeitsklima

Besonders danke ich meiner Familie für die Unterstützung während meines ganzen Studiums
und meiner Freundin Olga während meiner Zeit in Stuttgart.

Abkürzungsverzeichnis

I	Sudanrot I
II	Sudanrot II
III	Sudanrot III
IV	Sudanrot IV
AAS	Atomic Absorption Spectroscopy (Atomabsorptionsspektrometrie)
ACN	Acetonitril
ADC2	Automatic Development Chamber 2 (Automatische Entwicklungskammer)
API	Atmospheric Pressure Ionization (Ionisation unter Atmosphärendruck)
ATS4	Automatic TLC Sampler 4 (Automatische Probenautomat)
B	Sudanrot B
7B	Sudanrot 7B
BASF	Badische Anilin und Soda-Fabriken
CAS	Chemical Abstracts Service
C.I.	Colour Index
CN	Cyanid
2D	2-Dimension
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatografie
E	Extraktionsmethode
ELSD	Evaporating Light Scattering Detector (Verdampfungslichtstredetektor)
ES	Electrospray (Elektrospray)
EtOH	Ethanol
FM	Fließmittel
GC	Gas Chromatography (Gaschromatographie)
GPC	Gel permeation chromatography (Gel-Permeations-Chromatographie)
HDC	Horizontal Development Chamber (Horizontalentwicklungskammer)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography (Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie)
IARC	International Agency for Research on Cancer (Internationale Agentur für Krebsforschung)
IR	Infrarot
IS	Interner Standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Internationale Union für reine und angewandte Chemie)
k. A.	keine Angabe
KG	Kieselgel
λ_{\max}	Absorptionsmaximum
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
Lf	Luftfeuchtigkeit

LCD	Liquid Crystal Display (Flüssigkristallbildschirm)
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
M	Mix der Azofarbstoffe
MeOH	Methanol
MEK	Methylethylketon
MS	Mass Spectrometry (Massenspektrometrie)
TBME	tert-Butylmethylether
TLC-MS	Thin Layer Chromatographie (Dünnsichtchromatographie)
TTC	Twin Through Chamber (Doppeltrogkammer)
MSD	Mass Spectrometric Detector (Massenspektrometrie-Detektor)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kern(spin)resonanz)
OR	Sudanorange G
P	Probe
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PE	Polyethylen
PFBB	Pentafluorbenzylbromid
PFP	Pentafluorphenacylbromid
PR	Pararot
r	Korrelationskoeffizient
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed (Europäisches Schnellwarnsystem für Lebens- und Futtermittel)
rF	relative Luftfeuchtigkeit
R _F	Retentionsfaktor
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
sdv	relative Standardabweichung
S/N	Signal/Noise (Signal/Rausch-Verhältnis)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
TEA	Triethylamin
UV	Ultraviolett
VIS	Visible (sichtbar)

Inhaltverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Problematik, Europäischer Überblick	1
1.1.1	Sudanfarbstoffe 1 : eine berühmte Fallstudie	1
1.1.2	Statistik 2008 bis Ende erstes Halbjahr 2009 gemäss RASFF	2
1.1.3	Aktuelle europäische Gesetzgebung.....	3
1.2	Farbstoffe.....	3
1.2.1	Kurze Entstehungsgeschichte	3
1.2.2	Klassifikation.....	4
1.3	Azofarbstoffe	5
1.4	Methoden zur Bestimmung der fettlöslichen Azofarbstoffe in Lebensmitteln	5
1.4.1	Analytische Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung.....	6
1.4.2	Extraktionsmethode der Azofarbstoffe in Lebensmitteln.....	7
1.5	Aufgabenstellung.....	7
1.6	Untersuchte Farbstoffe	7
1.7	HPTLC	10
1.7.1	Durchführung der Planar-Chromatographie.....	10
1.7.2	Leistungskenngrößen in der Planar-Chromatographie	16
2.	Ergebnisse und Diskussion.....	17
2.1	HPTLC-Trennungsversuch und –optimierung	17
2.1.1	Fließmittelversuch auf Kieselgel	17
2.1.2	Vergleich der Selektivität von verschiedenen Schichten	19
2.1.3	Optimierung des Fließmittels auf Coffein-imprägnierten Platten	21
2.2	Interner Standard	24
2.2.1	Tests dreier unterschiedlicher Substanzen.....	24
2.2.2	Versuch der Synthese der deuterierten Farbstoffe.....	24
2.3	Densitometrische Detektion : Bestimmung der Messwellenlänge	28
2.4	Quantitative Bestimmung	30
2.5	Kenngrößen der optimierten Trennung	32
2.6	Probenvorbereitung	33
2.6.1	Aufreinigungsvortests.....	33
2.6.2	Löslichkeit der Azofarbstoffe.....	34
2.6.3	Höchstgrenze der Extraktionsmethode.....	34
2.6.4	Optimierung der Probenvorbereitung und weitere Aufreinigungstests mit Silbernitrat	34
2.6.5	Silbernitrat und Bestrahlung.....	37
2.6.6	Erweiterung der Tests auf Soße, Paste und Öl	41
2.7	Wiederfindung	42
2.8	Schnelle Screeningmethode durch antiparallele Entwicklung	43
	Anschliessend können verdächtige Proben mittels der quantitativen HPTLC-Methode (2.9) untersucht werden.....	43
2.9	Optimierte HPTLC-Entwicklung zur quantitativen Bestimmung	44
2.10	Bestätigung positiver Befunde.....	45
2.10.1	Spektrenbibliothek.....	45
2.10.2	MS-Spektren.....	46
2.11	Kosten- und Zeitvergleich HPLC- vs. HPTLC-Methode.....	48
3.	Zusammenfassung	49

4.	Experimenteller Teil	51
4.1	Allgemeine Geräte- und Softwareparameter	51
4.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterial	54
4.2.1	Reagenzien.....	54
4.2.2	Lösemittel	55
4.2.3	Platten	55
4.3	Methodenparameter	56
4.3.1	HPTLC-Trennungsversuch und –optimierung	56
4.3.2	Interner Standard	60
4.3.3	Densitometrische Detektion : Bestimmung der Messwellenlänge	62
4.3.4	Quantitative Bestimmung	63
4.3.5	Probenvorbereitung	65
4.4	Wiederfindung	69
4.5	Schnelle Screeningmethode durch Antiparallele Entwicklung	70
4.5.1	Optimierte HPTLC-Parameter für quantitative Bestimmung.....	70
4.6	Bestätigung positive Befunde.....	71
4.6.1	HPLC-HPTLC-MS	71
5	Literatur	72
6	Anhang	75
6.1	Statistik 2008 bis Ende erstes Halbjahr 2009 gemäss RASFF	75
6.2	HPTLC-Trennungsversuch und –optimierung	79
6.2.1	Optimierung des Fließmittels auf Coffein-imprägnierten Platten	79
6.3	Interner Standard	79
6.3.1	Tests dreier unterschiedlicher Substanzen.....	79
6.3.2	Versuch der Synthese der deuterierten Farbstoffe.....	80
6.4	Quantitative Bestimmung	85
6.5	Kenngößen der optimierten Trennung	88
6.6	Probenvorbereitung	89
6.6.1	Silbernitrat und Bestrahlung.....	89
6.7	Wiederfindung	91

Tabelleverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassung von durch RASFF registrierter Fälle	2
Tab. 2: Sudanrot I-IV	8
Tab. 3: Sudanrot B, Sudanrot 7B, Sudanorange G und Pararot	9
Tab. 4: Vergleich DC-, HPTLC-Materialien	11
Tab. 5: Absorptionsmaxima (λ_{\max}) der Farbstoffe und des internen Standards	29
Tab. 6: Nachweisgrenzen nach densitometrischer Bestimmung	30
Tab. 7: Rf-Werte und Kapazitäts- und Selektivitätsfaktor der optimierten Trennung	32
Tab. 8: Bodenzahlen nach HPLC- und Kowalska-Gleichungen und Auflösung	32
Tab. 9: Mittelwertwiederfindung	42
Tab. 10: Retentionszeit der getestete Farbstoffe auf der C18-Säule	46
Tab. 11: Kosten- und Zeitvergleich zwischen HPTL- vs. HPTLC-Methode	48
Tab. 12: Reagenzien	54
Tab. 13: Lösemittel	55
Tab. 14: Platten	55
Tab. 15: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Tests auf Kieselgel)	56
Tab. 16: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Kieselgel vs. Aminophase)	57
Tab. 17: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Tests auf Aluminiumoxidplatte)	57
Tab. 18: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Tests auf Aminophasen)	57
Tab. 19: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Coffein-impr. KG60-Platten)	58
Tab. 20: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Vergleich von Schichten)	59
Tab. 21: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Zugabe von PR und IS)	59
Tab. 22: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Effekt der Luftfeuchtigkeit)	60
Tab. 23: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Tests dreier Substanzen)	60
Tab. 24: Verbrauchsmaterial (Reinheitsprüfung)	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tab. 25: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Quantitative Bestimmung)	63
Tab. 26: Verdünnungsschema der Kalibrierung	63
Tab. 27: Kalibrierung: Genaue Menge pro Spot	64
Tab. 28: Probenbezeichnung	65
Tab. 29: Probenvorbereitung	66
Tab. 30: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Wirkung von Polyamid)	67
Tab. 31: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Wirkung von AgNO_3 und SbCl_3)	67
Tab. 32: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Optimierung der Extraktionsmethode und weitere Aufreinigungstests mit Silbernitrat)	68
Tab. 33: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Azofarbstoffe vs. Matrix)	68
Tab. 34: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Bestrahlung vs. Silbernitrat)	68
Tab. 35: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Erweiterung der Tests auf Soßen, Pasten und Öle)	69
Tab. 36: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Wiederfindung)	69
Tab. 37: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Screeningmethode)	70
Tab. 38: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Optimierte HPTLC-Parameter)	70
Tab. 39: Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (HPLC-HPTLC-MS)	71
Tab. 40: RASFF Alarmmeldungen	76
Tab. 41: RASFF Informationsmeldungen	77
Tab. 42: RASFF Einfuhrverbote	78
Tab. 43: Lineare Kalibrierfunktionen	85
Tab. 44: Polynomische Kalibrierfunktionen	86
Tab. 45: Wirkung der Bestrahlung auf die Peakfläche der Azofarbstoffe	90
Tab. 46: Wiederfindung in Kurkumapulver	92

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mauve	3
Abb. 2: Ablauf der Planar-Chromatographie	10
Abb. 3: Vario System mit Plattenlinienfräser.....	12
Abb. 4: ATS4.....	12
Abb. 5: Entwicklungskammer	13
Abb. 6: Auswertemethoden	14
Abb. 7: TLC Scanner 3.....	14
Abb. 8: Digistore 2	15
Abb. 9: CAMAG TLC-MS Interface	15
Abb. 10: Erreichte Trennungen nach der Literatur.....	17
Abb. 11: Trennung durch unterschiedliche Fließmittel.....	18
Abb. 12: Erreichte Chromatogramme mit FM 11.....	18
Abb. 13: Einfluss die Luftfeuchte auf KG 60.....	18
Abb. 14: Trennungvergleich zwischen Kieselgel und Aminophase Schichten.	19
Abb. 15: Trennung auf Al ₂ O ₃	19
Abb. 16: Vergleich von drei unterschiedlich modifizierten NH ₂ -Platten.....	20
Abb. 17: Schichtvergleich mit FM 9.....	20
Abb. 18: Schichtvergleich mit FM 5.....	20
Abb. 19: FM 14.....	20
Abb. 20: Optimierungsversuch der Zusammensetzung der FM 9.....	21
Abb. 21: Schichtvergleich	21
Abb. 22: 7 cm vs. 6 cm Entwicklung	22
Abb. 23: Chromatogrammvergleich von verschiedenen, im Labor gemessen Lf.....	22
Abb. 24: Chromatogrammvergleich in ADC2.....	23
Abb. 25: Trennung auf Coffein.....	23
Abb. 26: Azophenol, <i>trans</i> -Azobenzol und 4-Dimethylaminoazobenzol	24
Abb. 27: Ausbildung des Nitrosylkations	25
Abb. 28: Ausbildung des N-Nitroammoniumsalzes, dann des N-Nitrosamins	25
Abb. 29: Ausbildung der Diazohydroxid	25
Abb. 30: Ausbildung des Diazoniumion	25
Abb. 31: Ausbildung des Naphtolats.....	26
Abb. 32: Azokupplung von β -Naphtolat mit dem Diazoniumion.....	26
Abb. 33: Zwischenprodukt der Synthese von Sudanrot 7B und Sudanrot III.....	27
Abb. 34: Absorptionsspektren [200-800 nm] der 8 Farbstoffe und des internen Standards	28
Abb. 35: Absorptionsspektren [320-600 nm] der 8 Farbstoffe und des internen Standards	28
Abb. 36: Lineare und polynomische Kalibration	30
Abb. 37: Proben (P1, P2) und Standardmix (M).....	33
Abb. 38: Schichtvergleich zwischen A) SbCl ₃ 0,2%, B)AgNO ₃ 0,2%, C) AgNO ₃ 3%.	33
Abb. 39: Schichtvergleich von P1 A) ohne AgNO ₃ , B) in AgNO ₃ getaucht	35
Abb. 40: Schichtvergleich von P1 mit A) Kieselgel, B) imprägnierte Coffein-Platte	35
Abb. 41: Schichtvergleich von P1 auf HPTLC-Nano-SIL-PAH mit Silbernitratsbande	36
Abb. 42: Extraktionsmethode 5 ; Auftragsmenge bzw. Nachweisgrenze	36
Abb. 43: Verhalten der Farbstoffe bei Bestrahlung.....	37
Abb. 44: Chromatogrammvergleich zwischen den zwei dotierten Proben	38
Abb. 45: Chromatogrammvergleich zwischen der dotierten Probe	40
Abb. 46: Chromatogramm nach 4 min Bestrahlung.....	41
Abb. 47: Effekt der Bestrahlung auf die Matrix	42
Abb. 48: Chromatogramm der antiparallelen Entwicklung.....	43

Abb. 49: Chromatogramm der 23 Banden nach 4 min Bestrahlung	44
Abb. 50: Spektrenvergleich von Sudanrot 7B	45
Abb. 51: Vergleich der Trennung mit rundem und ovalem Elutionskopf.....	46
Abb. 52: Massenspektrum von Sudanrot 7B	47
Abb. 53: Strukturformeln von 4-Bromphenacylbromid, PFP und PFBB.....	58
Abb. 54: Nukleophile Substitution zwischen der Aminogruppe der Schicht und den folgenden Substanzen.....	58
Abb. 55: Coelution von Sudanrot IV und B	79
Abb. 56: Absorptionsspektrum der potenziellen internen Standards	79
Abb. 57: Vergleich zwischen den Produkten der Synthesen und den Referenzsubstanzen.....	80
Abb. 58: Vergleich zwischen der Referenzsubstanz und dem Produkt der Synthese (I)	80
Abb. 59: Vergleich der Spektren des synthetisierten Sudanrot IV mit der Referenzsubstanz .	81
Abb. 60: Vergleich des synthetisierten Sudanrot II mit der Referenzsubstanz	81
Abb. 61: Vergleich des synthetisierten Sudanrot II mit der Referenzsubstanz	81
Abb. 62: Massenspektrum von Sudanrot I	82
Abb. 63: Massenspektrum von Sudanrot II.....	82
Abb. 64: Massenspektrum von Sudanrot IV	83
Abb. 65: Massenspektrum von Pararot	83
Abb. 66: Vergleich der Synthese Sudanrot B und Sudanrot III	84
Abb. 67: Chromatogramme von Sudanrot 7B	87
Abb. 68: Chromatogramm der Trennung	88
Abb. 69: Chromatogramme der Trennung bei seiner eigenen Messwellenlänge.....	88
Abb. 70: Farbstoffe und Chilipulver vor Bestrahlung.....	89
Abb. 71: Abb. 70, nach 5 min Bestrahlung	89
Abb. 72: Farbstoffe und Chilipulver vor Bestrahlung.....	90
Abb. 73: Abb. 72, nach 5 Min Strahlung	90
Abb. 74: Platte der Wiederfindungstests.....	91
Abb. 75: Peaks von Sudanrot III der Kalibrierungskurve und des Kurkumapulvers.....	91
Abb. 76: Kalibrierkurve von Sudanrot III gemäß Abb. 74 und 75.....	92
Abb. 77: Typische Chromatogramm und Totalionenstrom.....	92

1. Einleitung

1.1 Problematik, Europäischer Überblick

Sudanfarbstoffe sind synthetische Substanzen, die überwiegend verwendet werden, um Schmiermittel, fettlösliche Insektizide, Holzschutzmittel, Poliermittel, Wachs usw. anzufärben. Sudan® ist ein Warenzeichen der BASF. [1]

Wegen ihrer intensiv orangeroten Farbe werden diese Farbstoffe auch seit langem in Lebensmitteln eingesetzt, besonders in Chilipulver. Die internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer, IARC) hat Sudanrot I-IV und Sudanrot 7B als Karzinogene der Kategorie 3 eingestuft. Diese Kategorie enthält alle Stoffe, die möglicherweise krebserzeugendes Potenzial besitzen aber nicht endgültig beurteilt werden können. Deshalb ist ihre Anwendung als Zusatzmittel heutzutage weltweit verboten. [2]

1.1.1 Sudanfarbstoffe 1 : eine berühmte Fallstudie

Am 7. Mai 2003 wurde die Französische Behörde für Lebensmittelsicherheit (Agence française de sécurité sanitaire des aliments, AFSSA) von der Generaldirektion für Wettbewerb, Konsum und Betrugsahndung (Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes) um eine Risikoauswertung über das Vorkommen des Farbstoffs Sudanrot I in Cayennepfeffer gebeten, der in Fleischwaren verwendet wurde. [3] Zwei Tage später wurde über das europäische Schnellwarnsystem (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) eine Warnung verbreitet. Das RASFF wurde 1979 gegründet, um den Mitgliedsstaaten eine Möglichkeit zum Informationsaustausch über erforderliche Maßnahmen für eine garantierte Ernährungssicherheit bereitzustellen. [4]

Während die französische Regierung Maßnahmen ergriff, fingen die anderen beteiligten Länder an, Untersuchungen durchzuführen. Mehr und mehr nicht zulässige Produkte wurden gefunden. Bis Juni 2003 war die Lage so ernst, dass die Europäische Kommission sich entschloss, Eilentscheidungen zu treffen. Am 21. Juni veröffentlichte die Kommission im Amtsblatt der Europäischen Union ihre Dringlichkeitsmaßnahmen (2003/460/EG) hinsichtlich scharfer Chilis und Chilierzugnisse. [5] Diese Entscheidung gilt für scharfe Chilis und scharfe Chilierzugnisse der Gattung *Capsicum* (getrocknet, zerstoßen oder gemahlen). Die Mitgliedsstaaten müssen die Einfuhr verbieten, sofern nicht mit einem die Sendung begleitenden Analysebericht nachgewiesen wird, dass das Erzeugnis kein Sudanrot I enthält. Geeignete Maßnahmen müssen einschließlich der Entnahme und Analyse von Stichproben für Waren ergriffen werden, die zur Einfuhr bestimmt sind oder sich bereits im Handel befinden, um sicher zu stellen, dass sie kein Sudanrot I enthalten. Alle verfälschten Sendungen müssen vernichtet werden. Am 21. Januar 2004 sind diese Notmaßnahmen (2004/92/EG) für Sudanrot II, Sudanrot III und Sudanrot IV und für Currypulver in jeglicher Form in Kraft getreten und am 23. Mai auch für Kurkuma und Palmöl. [6] [7]

Eine andere bekannte Fallstudie ist z.B., was Anfang 2005 in Italien geschah. Sudanrot I wurde in einer Lieferung von Worcestersauce aus Großbritannien aufgefunden. Worcestersauce ist ein Würzmittel, das in vielen traditionellen Gerichten verwendet wird. Alle Produkte, die Sauce aus dieser Charge enthielten, mussten zurückgerufen werden. Bis Ende Februar 2005 wurden circa 600 Produkte identifiziert. Dieser Rückruf kostete £100'000 (Britische Pfund). Weil jedoch Worcestersauce eine häufige Zutat in der

Lebensmittelindustrie ist, ist der Verlust aufgrund der Vertrauenseinbußen für Fertiggerichte nicht bezifferbar. [8]

1.1.2 Statistik 2008 bis Ende erstes Halbjahr 2009 gemäß RASFF

2008 wurden 43 Fälle von Sudanfarbstoffen festgestellt und 19 im ersten Halbjahr 2009. 29 betreffen Sudanrot I und 25 Sudanrot IV, mit Konzentrationen bis 710 ppm. Meistens wurden sie in Chili und Currypulver, Würzmitteln, Tomatenketchup, Palmöl und Fertiggerichten bestimmt, darüber hinaus in Paprika-, Safran- und Kurkumapulver (Tab. 1). Alle nicht zulässigen Palmöle kamen aus Afrika und die meisten Gewürze aus Indien und der Türkei, die restlichen aus den Balkanländern, dem Mittleren Osten, Osteuropa, Afrika, China und Südamerika. [4]

Tab. 1 : Zusammenfassung von durch RASFF registrierter Fälle (nicht vollständig)

Produkte	Gefundene Sudanfarbstoffe	Herkunft	Niedrigste bestimmte Konzentration [ppm]	Höchste bestimmte Konzentration [ppm]
Chili, Chilierzugnisse	Sudanrot I Sudanrot IV	Bangladesch, Polen, Türkei, Indien, Chile, Vereinigte Arabische Emirate	1,5	>25
Curry	Sudanrot I Sudanrot IV Pararot	Polen, Türkei, Indien, Portugal	0,7	80
Kurkuma	Sudanrot IV	Bangladesch, Indien	18	710
Palmöl	Sudanrot I, Sudanrot IV Sudanorange G Pararot	Senegal, Togo, Ghana, Nigeria	0,7	76
Safran	Sudanrot I Sudanrot IV	Portugal	7	90
Tomatenketchup	Sudanrot I Pararot	Georgien	0,4	71
Würzmittel, Fertiggerichte	Sudanrot I Sudanrot IV	China, Türkei, Albanien, Ägypten, Bolivien	0,1	416

Die vollständige Liste im Zeitraum von 2008 bis Juni 2009 gemäß RASFF ist in Tab. 40-42 beigefügt.

1.1.3 Aktuelle europäische Gesetzgebung

Die Europäische Union verbietet Farbstoffe in Gewürzen in der Binnenmarktgesetzgebung, die sowohl in den 27 Mitgliedsstaaten als auch in der Schweiz angewendet wird. [9]

Die Detailausnahmen der Farbstoffanwendung werden in der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 genannt. [10] Darin werden Hauptbegriffe und Grundsätze definiert. Anhang II listet die Lebensmittelzusatzstoffe auf und Anhang III die Lebensmittelzusatzstoffe, -enzyme und -aromen und ihre Verwendungsbedingungen.

Die Richtlinie 2008/128/EG der Kommission vom 22. Dezember 2008 spezifiziert die Reinheitskriterien für Lebensmittelfarbstoffe. [11] Der Farbstoff Gelborange S (E 110) darf zum Beispiel höchstens 0,5 mg Sudanrot I/kg enthalten.

1.2 Farbstoffe

1.2.1 Kurze Entstehungsgeschichte

Seit der Steinzeit werden natürliche Farbstoffen verwendet, wie verschiedene Felsmalereien zeigen. Die ältesten synthetischen Farbpigmente wurden in Ägypten und China entdeckt: Egyptian Blue und Han Blue ($\text{CaCuSi}_2\text{O}_{10}$) und Han Purple ($\text{BaCuSi}_2\text{O}_4$). Außerdem wurden diese Farbstoffe noch in den letzten Jahren nicht nur wegen ihrer Strukturen sondern auch wegen ihrer Produktion intensiv studiert. [12]

1856 wollte William Henry Perkin Chinin – die einzige bekannte Behandlung dieser Zeit gegen Malaria – durch Oxidierung von Alkyltoluidin mit Kaliumdichromat. Chinin ist von von Hoffman aus Steinkohlenteer erzeugt worden. Perkins Synthese war nicht erfolgreich. Diese wurde von Woodward und Doering 88 Jahre später ausgeführt. Allerdings hat Perkin andere Experimente mit Steinkohlenteer weitergeführt. Aus einer Lösung von Toluidin und Anilin in Methanol entstand eine intensiv bläulich-purpurfarbene Lösung, die Seide färben und der Sonne und dem Abwaschen widerstehen konnte: die „Mauve“ oder „Mauvein“ (Abb. 1).

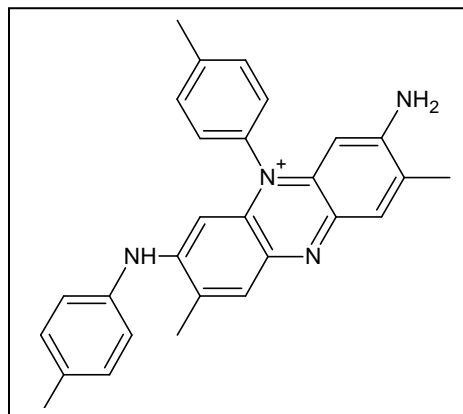


Abb. 1 : Mauve

Perkins Erfolg hatte bei vielen anderen Chemikern Aufmerksamkeit erregt. Verguin entdeckte 1859 das Fuchsin und Griess hat für die Entwicklung der größten synthetischen Farbstoffklasse derzeit – die Azofarbstoffe – den Grundstein gelegt. Die ersten Azofarbstoffe wurden schon 1861 und 1863 synthetisiert. Die Produktion durch aufeinanderfolgende Diazotierung und Azokopplung begannen Caro und Witt (BASF) 1875. Das erste rein synthetische organische Pigment, von Meldola 1885 entdeckt und ebenfalls eine Azoverbindung, wurde Pararot (C.I. Pigment Red 1) genannt. Danach synthetisierte man Pigmentlacke – Ausbildungen von einem Pigment durch Ausfällen eines wasserlöslichen Azofarbstoffs mit einem Schwermetallsalz (BaCl_2) wie Lithol Red R (C.I. Pigment Red 49:1) von Julius (BASF, 1899), Cyanin (Williams, 1856), Metallkomplexe (Turkey Rot, Graebe und Liebermann, 1868), Neolahnfarbstoffe (1915), Dispergierfarbstoffe (1920), Irgalanfarbstoffe (1949), Wollenfarbstoffe (1951), Reaktivfarbstoffe, Farbstoffe für Cellulosefaser (1956), usw.

Obwohl heutzutage tausende verschiedene Farbstoffe lieferbar sind, werden immer noch neue Farbstoffe und Pigmente entwickelt, ihr Reaktionsmechanismus studiert, ihre Synthese optimiert und ihre Anwendung ausgeweitet.

1.2.2 Klassifikation

Es gibt verschiedene Möglichkeiten Farbstoffe zu klassifizieren.

Zunächst können sie nach ihren chemischen Strukturen in zwei Gruppen geteilt werden, organischen oder anorganischen, die sich wieder unterteilen: natürliche und synthetische Farbstoffe. Allerdings ist diese zweite Differenzierung nicht immer bedeutend, weil viele natürliche Farbstoffe synthetisiert werden können.

Deshalb ist das folgende Kriterium wichtiger: Farbstoffe sind Färbemittel oder Pigmente. Pigmente sind kleine Partikel, die in den verwendeten (Löse-)Mitteln fast unlöslich sind. Mit anderen Worten bedürfen Pigmente Zusatzstoffen z.B. Polymere in Anstrichmittel oder Plastik. Andererseits werden Färbemittel auf verschiedenen Materialien (Textilien, Leder, Haare, Papier usw.) aus einer Lösung, in denen sie völlig oder mindestens zum Teil löslich sind.

Farbstoffe werden entsprechend ihren Anwendungsmethoden oder -feldern klassifiziert, wie z.B. Farbstoffe für Laser, LCDs oder in der chemischen Analyse, Biologie, Lebensmitteltechnologie usw.

Diese letzten Substanzen können auch unter dem Namen „funktionelle Farbstoffe“ gefunden werden. Dieser Ausdruck beschreibt auf konjugierten π -Systemen basierende Chromophore für einen anderen Gebrauch als zur Färbung von Massenware. Zu den Reaktivfarbstoffen gehören farbige Substanzen, die mit einem passenden Substrat eine kovalente Bindung eingehen können. Die reaktive Komponente kann prinzipiell aus jeder Farbstoffklasse stammen, aber in der Praxis bedeutend sind a) Triphenodioxazine, b) Aza-annulene, c) Azofarbstoffe und d) Anthrachinone.

Wenn die Farbstoffe gemäß Färbemethoden klassifiziert werden, kann man noch zwischen anionischen, Direkt- oder Dispergierfarbstoffen unterscheiden. Diese werden verwendet, um beispielsweise Proteine, Zellulose- oder Polyamidfasern zu färben.

Die umfangreichste Datenbank von Farbstoffen und Pigmenten ist der „Colour Index“ (C.I.). Farbstoffe sind in die folgenden Gruppen eingeteilt worden: saure, basische, Beiz-, Dispergier- und natürliche Farbstoffe oder Pigmente; Lebensmittel- und Lederfarbstoffe; Direkt-, Schwefel-, Küpen- und Reaktivfarbstoffe und eine ganze Gruppe Entwicklungsfarbstoffe einschließlich Azo-, Diazo- und Azokupplungskomponenten, Oxidationsbasen, optische Aufheller, Zwischenprodukte, Entwickler und Reduktionsmittel. Diese verschiedenen Farbstoffgruppen werden dann nach ihrer Farbe klassifiziert: gelb, orange, rot, violett, blau, grün, braun und schwarz. Seit der 4. Auflage ist der Colour Index nur im Internet verfügbar. Zu jedem Farbstoff oder Pigment gehören zwei Nummern bezüglich der „farbigen“ oder „chemischen“ Eigenschaft. Einer, der „C.I. generic name“, z.B. *C.I. Pigment Red 1* für Pararot, steht für das Anwendungsfeld und/oder für die Auftrags- oder Färbungsmethode. Der andere, z.B. *C.I. 12070* für Pararot, ist die Konstitutionsnummer. Häufig bekommen Substanzen, die als Pigmente und Farbstoffe benutzt werden, dieselbe Konstitutionsnummer aber – je nach Anwendung – verschiedene Namen.

1.3 Azofarbstoffe

Die untersuchten Farbstoffe, beziehungsweise die Sudanfarbstoffe, gehören zu der Gruppe der Azofarbstoffe. Wie der Name schon sagt, sind Azofarbstoffe Substanzen, die eine Azogruppe ($-N=N-$) enthalten, an die sich eine Methingruppe oder ein aromatisches C-Atom anschließt. Gemäß der Anzahl ihrer Azogruppen findet man Mono-, Bis-, Tris-, usw. Azofarbstoffe. Die Azogruppen sind meistens an Benzol- oder Naphtalinringe gebunden, manchmal auch an aromatische Heterozyklen (z.B. Pyrazole) oder an enolisierbare aliphatische Gruppen (z.B. 3-Oxobutanoat). Interessanterweise werden Azofarbstoffe, außer Azoxysubstanzen ($-N=N(O)-$), in der Natur nicht aufgefunden. Meistens werden sie aufgrund ihrer komplizierten Strukturen nicht nach ihren IUPAC Namen, sondern bei Kurz- oder Trivialnamen genannt. Azofarbstoffe weisen unter den Farbstoffen die größte Anzahl und Produktionsmenge auf.

Für den Erfolg der Azofarbstoffe gibt es verschiedene Gründe. Erstens ist die Synthese ziemlich einfach – eine Diazotierung von einem primären aromatischen Amin, gefolgt von einer Azokopplung. Zweitens ist eine große Strukturvielfalt an Farbstoffen erreichbar und die molaren Extinktionskoeffizienten sind generell hoch. Schließlich besitzen die Azofarbstoffe eine mittlere bis hohe Stabilität gegen Licht und Feuchtigkeit.

1.4 Methoden zur Bestimmung der fettlöslichen Azofarbstoffe in Lebensmitteln

Unter den analytischen Methoden um Sudanfarbstoffe in Lebensmittel zu bestimmen, finden sich überwiegend TLC- und HPLC-Methoden. Am häufigsten wird eine Umkehrphase verwendet. Jedoch findet man in der Literatur nur wenige Methoden, die eine optimale Trennung der Sudanfarbstoffe I bis IV und anderer Azofarbstoffe bieten, und noch weniger die gleichzeitig in unterschiedlichen Lebensmittelmatrixen getestet wurden.

1.4.1 Analytische Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung

Die 60 mm Entwicklung der HPTLC-Methode [13] verwendet als stationäre Phase RP-18-Materialien und eine Mischung aus ACN/Ammoniaklösung (25%) (95:5, v/v) als mobile Phase und dauert 12 min. Die Chromatogramme werden erst visuell, dann mit Multi-Wellenlänge Densitometrie bewertet. Trotz ihrer 17 getesteten chromatographischen Systeme war die Trennung von den Paaren Sudanrot 7B – Sudanrot III und Sudanrot B – Sudanrot IV nicht erfolgreich. ACN/EtOH- (9:1, v/v) und ACN/Wasser-Gemische (18:15, v/v) werden auch in HPTLC-Methoden [14] [15] mit RP-18-Materialien verwendet.

Unter den HPTLC-Methoden auf Kieselgelschichten findet man Methode [16]. Diese verwendet als Fließmittel Dichlormethan zum Screening auf Sudanrot I-IV, Sudanrot 7B und Sudanorange G und n-Hexan/Aceton (80:4, v/v) zur Trennung der einzelnen Farbstoffe, außer Sudanrot B und IV. In einer 2D-HPTLC-Methode werden drei Pigmente aus Kurkuma und Metanil Yellow, Farbstoffe Sudanrot I und Sudanrot IV untersucht. Die Pigmente aus Kurkuma und Metanil Yellow werden durch die erste Entwicklung (Fließmittel: Chloroform/Methanol (9:1, v/v)) und Sudanrot I und Sudanrot IV mit Toluol/Hexan/Essigsäure (50:50:1, v/v/v) während der zweiten Entwicklung (80 cm) getrennt. Die Auswertung der Chromatogramme wird durch Densitometrie ausgeführt. [17] DC-Methode [18] gemäß dem Schweizerischen Lebensmittelbuch verwendet Toluol oder eine n-Hexan/Ethylacetat-Mischung (9:1, v/v) auf Kieselgel.

Ähnlich wie die HPTLC-Methoden auf RP-18-Materialien werden die meisten HPLC-Methoden auf Umkehrphase und mit ACN/MeOH oder ACN/Wasser als mobile Phase durchgeführt.

[19] verwendet HPLC/DAD-Methode mit einer 25 cm langen RP-Amid (C16) Säule zur quantitativen Bestimmung und eine HPLC/APCI-MS-Methode um positive Befunde abzusichern. Allerdings dauert die HPLC/DAD-Methode 35 min (Gradientenmodus mit ACN/MeOH) und nur Sudanfarbstoff I wird analysiert. Mit ähnlicher Laufzeit und ähnlichen Eluenten, aber isokratisch (80:20, v/v), ermöglicht eine HPLC/DAD-Methode [20] die Trennung der Sudanfarbstoffe I – IV auf einer 15 cm langen RP-18 Säule. Eine HPLC/VIS-Methode [21] schlägt mit der gleichen mobilen Phase eine kürzere Trennung (9 min) auf einer 25 cm langen RP-18 Säule vor. Diese Methode dient auch zur Bestimmung von Pararot und verwendet eine einzige Wellenlänge (506 nm) zur Detektion.

In Methode [22] können 7 Sudanfarbstoffe mittels HPLC/DAD (C18-Säule, 25 cm, ACN/Essigsäure (0,2%), Gradientenmodus) in unterschiedlichen Lebensmittelmatrixen wie Gewürze, Würzsoßen, Teigwaren und Palmöl bestimmt und positive Befunde mittels HPLC-MS/MS abgesichert werden. Diese HPLC/DAD-Methode dauert jedoch 57 min.

In den Methoden [23] [24] [25] und [26] werden die Sudanfarbstoffe I – IV auf C18-Säulen mittels ACN/Wasser- und ACN/MeOH-Gemischen mit 0,1%iger Ameisensäure getrennt. Nachgewiesene Farbstoffe werden mittels GC-MS [26] und LC-MS/MS [25] abgesichert.

1.4.2 Extraktionsmethode der Azofarbstoffe in Lebensmitteln

Als Extraktionsmittel für Gewürze, Würzmittel und Soßen werden ACN [13] [20], Aceton [23] [25], MeOH [17] [23], Ethanol [19], Aceton/ACN- [16] [22] und Aceton/Dichlorethan/MeOH-Mischungen [24] verwendet. Die Extraktionsschritte werden einfach durch Vortexen, Ultraschallbad und/oder Rühren ausgeführt. Außer Methode [20], haben die schon zitierten Methoden trotzdem verschiedene Extraktion- und Konzentrierungsschritte. Die Verhältnisse zwischen Menge der Probe [g] und Extrakt [mL] reichen von 2:1 bis 1:50. Der Extrakt wird in den meisten Fällen direkt eingesetzt. Methoden [13] und [23] schlagen allerdings eine Aufreinigung mittels SPE-Kartuschen vor.

1.5 Aufgabenstellung

Nach der erstmaligen Meldung über das Schnellwarnsystem der Europäischen Kommission über Nachweise von Sudanfarbstoffen in verschiedenen Erzeugnissen, insbesondere in Gewürzen mit Chili oder Paprika, sind unterschiedliche analytische Methoden entwickelt worden. Die meisten dienen dem Nachweis der Sudanfarbstoffe I bis IV in Gewürzen.

Seitdem vermeldet der wöchentliche Bericht des Schnellwarnsystems noch Funde von verbotenen Farbstoffen in Lebensmitteln, aber nicht nur die Sudanfarbstoffe I bis IV, sondern auch andere Azofarbstoffe wie Pararot, Sudanrot B, Sudanrot 7B und Sudanorange G. Nebenbei sind diese Farbstoffe auch in anderen Lebensmitteln als in Chiliprodukten nachweisbar: Palmöle, Gewürzmischungen, Soßen usw.

Aus diesem Grund sind neue oder verbesserte analytische Methoden nötig. Diese sollen dazu geeignet sein sowohl um eine Vielzahl an Proben nachzuweisen (Screening-Methode) als auch um positive Befunde zu quantifizieren und zu überprüfen.

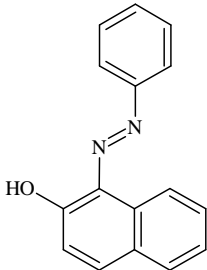
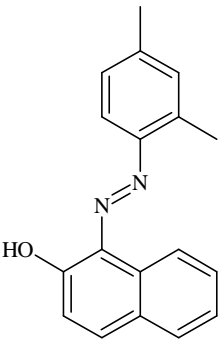
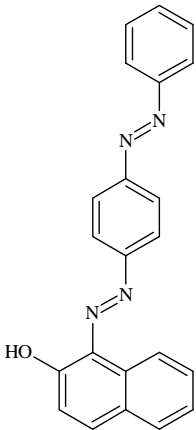
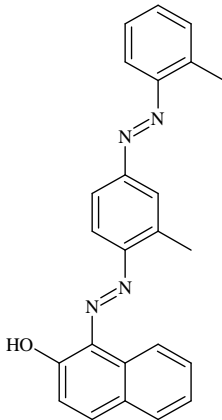
Zusätzlich zu den schon vorhandenen Methoden soll diese Arbeit mittels moderner Planar-Chromatographie eine alternative Lösung zu dieser Problematik bieten. So soll eine analytische, möglichst kosten- und zeitsparende HPTLC-Methode entwickelt und diese, soweit möglich, validiert werden.

1.6 Untersuchte Farbstoffe

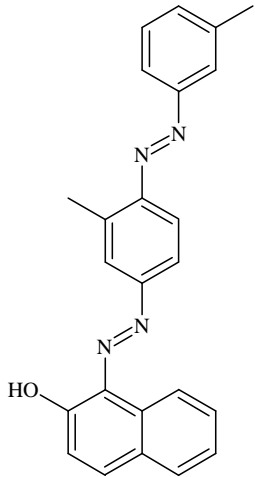
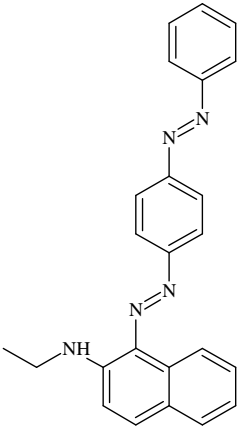
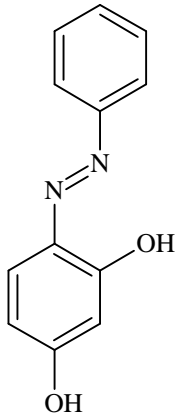
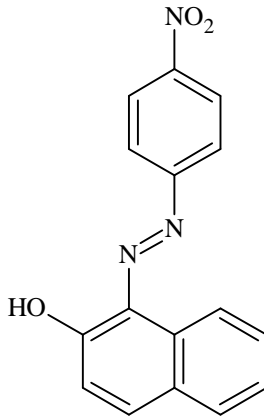
Für diese Arbeit sind acht verschiedene fettlösliche Azofarbstoffe gewählt worden, die nach RASFF Statistik (siehe 1.1.2) am häufigsten nachgewiesen wurden: Sudanrot I-IV, Sudanrot 7B, Sudanrot B, Sudanorange G und Pararot.

Tab. 2 und 3 listen die untersuchten Farbstoffe auf. [27]

Tab. 2 : Sudanrot I-IV

Sudanfarbstoffe	Sudanrot I	Sudanrot II	Sudanrot III	Sudanrot IV
Farbindex Name	Solvent Yellow 14	Solvent Orange 7	Solvent Red 23	Solvent Red 24
Farbindex N°	12055	12140	26100	26105
Summenformel	$C_{16}H_{12}N_2O$	$C_{18}H_{16}N_2O$	$C_{22}H_{16}N_4O$	$C_{24}H_{20}N_4O$
CAS-Nummer	842-07-9	3118-97-6	85-86-9	85-83-6
Molare Masse [g/mol]	248.10	276.13	352.13	380.16
Beschaffenheit	orangefarbener kristalliner Feststoff	bräunlich-orangefarbenes Pulver	rotbraunes Pulver	dunkelrotbraunes Pulver
Strukturformeln				

Tab. 3 : Sudanrot B, Sudanrot 7B, Sudanorange G und Pararot

Sudanfarbstoffe	Sudanrot B	Sudanrot 7B	Sudanorange G	Pararot
Summenformel	$C_{24}H_{20}N_4O$	$C_{24}H_{21}N_5$	$C_{12}H_{10}N_2O_2$	$C_{16}H_{11}N_3O_3$
Farbindex Name	Solvent Red 25	Sovent Red 19	Solvent Orange 1	Pigment Red 1
Farbindex N°	26110	26050	11920	12070
CAS-Nummer	3176-79-2	6368-72-5	2051-85-6	6410-10-2
Molare Masse [g/mol]	380.16	379.18	214.0722	293.28
Beschaffenheit	dunkelrotes Pulver	dunkelrotes Pulver	rötlich-orangefarbenes Pulver	rotes Pulver
Strukturformeln				

1.7 HPTLC

Die Planar-Chromatographie (TLC) umfasst die Dünnschicht-Chromatographie (DC) und ihre moderne Variante: die Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC).

Die HPTLC ist eine komplementäre Technik der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie, aber mit eigener Spezifität. Obwohl die Anwendungen dieser Techniken unterschiedlich sind, bleiben Trennprinzip und verwendete Phasen gleich. Zusammen mit HPLC und GC gehört die HPTLC zu den mikroanalytischen Verfahren, die heutzutage eine entscheidende Rolle in der Forschungs- und der Routineanalytik spielen. In verschiedenen Fällen bietet die HPTLC mehr passende Lösungen und wird oft als unterstützende oder alternative Technik eingesetzt. Wegen ihres off-line-Prinzips ist die HPTLC sehr flexibel. Bei minimaler Zeit und Kosten ermöglicht die HPTLC die qualitative und quantitative Bestimmung von vielen Proben parallel. Die Probenvorbereitung ist in den meisten Fällen einfacher im Vergleich zu HPLC und GC, deren Säulen beschädigt oder zerstört werden könnten. Die stationäre Phase wird nämlich nur einziges Mal benutzt. Zudem bringen die zahlreichen Kombinationen der in situ Detektions- und Identifizierungsmethoden auch relevante Informationen über Nebenbestandteile einer Matrix.

Kurz gesagt, die Planar-Chromatographie wird nicht mehr nur als Methode zur präparativen Probenvorbereitung oder zur Verfolgung eines Syntheseverlaufs angesehen, sondern auch als ein Teil der modernen quantitativen Analytik.

1.7.1 Durchführung der Planar-Chromatographie

Abb. 2 listet die Hauptschritte der Planar-Chromatographie auf.

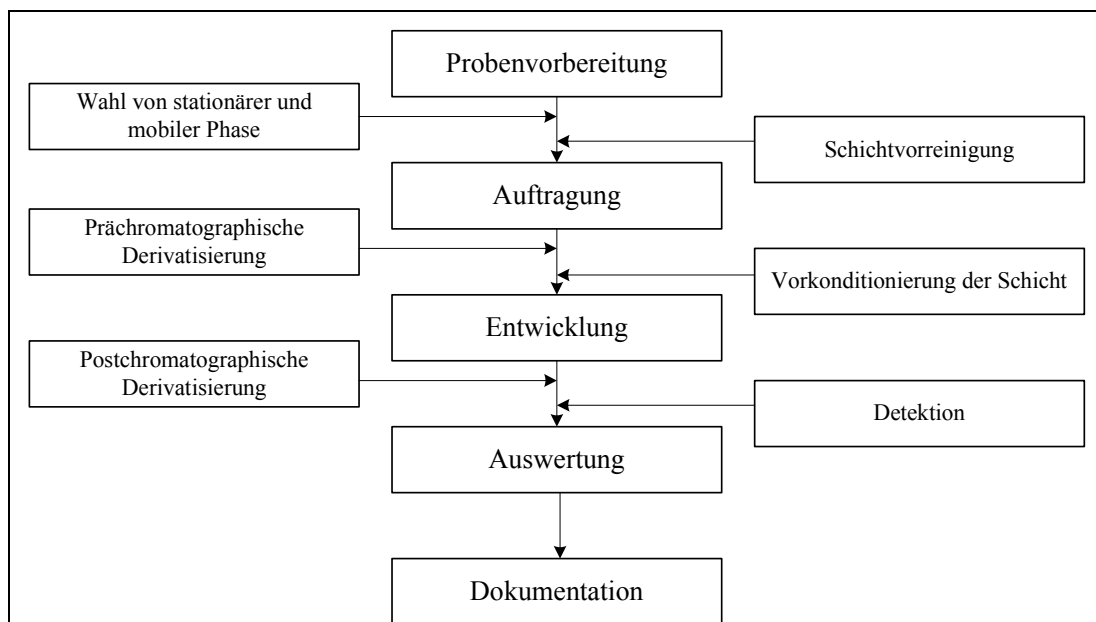


Abb. 2 : Ablauf der Planar-Chromatographie [28]

Die Planar-Chromatographie wird von Parametern beeinflusst, die sich in anderen on-line Trennungsmethoden nicht finden: die Geschwindigkeit der mobilen Phase, die Beschaffenheit der Dampfphase und die Entwicklungstechnik.

Eine erfolgreiche Trennung beinhaltet zwei optimierte Gleichgewichte: a) zwischen der mobilen, stationären und der Dampfphase, b) zwischen der Probe und der mobilen und stationären Phase. Um diese Gleichgewichte zu beeinflussen, muss man die verschiedenen Einflussfaktoren berücksichtigen.

▪ Wahl der Schicht

Es gibt verschiedene Schichttypen (Normal- und Umkehrphasen), auf verschiedenen Unterlagen (Glas, Kunststoff- und Alufolie), in verschiedenen Formaten, mit unterschiedlichen Schichtdicken: 10, 50, 100, 200 und 250 μm (analytisch) und 0,5 bis 10 mm (präparativ). [29]

Als Normalphasen findet man Al_2O_3 , SiO_2 , $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{Diol}$ und $-\text{NO}_2$ sowie RP-30, RP-18, RP-8, RP-2, $-\text{Phenyl}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$ -Phasen und hydrophobe Polymere als Umkehrphasen. Die Entwicklung auf Kieselgel kann mittels amorphem (Kieselgel 60), sphärischem (LiChrospher[®]) oder monolithischem Kieselgel geschehen. Der Wahl der Kieselgel-Partikel unterscheidet DC und HPTLC (Tab. 4).

Tab. 4 : Vergleich DC-, HPTLC-Materialien

	DC	HPTLC
Kieselgel-Partikel	amorph	amorph/globulär
mittl. Porengröße [nm]	6	6
mittl. Korngröße [μm]	10-15	5-7
Korngrößenverteilung	weit	eng
Schichtdicke [μm]	200, 250	100, 200, 250
Probenzahl	12 (20 x 10 cm)	36-72 (20 x 10 cm)
Laufstrecke [mm]	100-150	30-70
Laufzeit [min]	15-200	5-30
Fließmittelverbrauch [mL]	50-100	5-20
LOD [ng]	Absorbanz	10-100
	Fluoreszenz	0,1-10

Neue Selektivitäten können auch durch imprägnierte Schichten erreicht werden, wie z.B. mit Coffein für PAK oder quarternäre Ammoniumsalze für Sulfonamide und Penicilline.

▪ Wahl des Fließmittels

Unmittelbar nach der Wahl der Schicht folgt die Wahl des Fließmittels. Dieses soll nicht nur die Proben lösen, die Substanzen trennen und sie zum gewünschten R_F -Bereich transportieren, sondern auch nicht toxisch, niedrigviskos und ohne große Polaritätsunterschiede sein. Die mobile Phase soll auch einfach zusammengesetzt sein.

Die Eigenschaft der mobilen Phase kann nach dem Snyder-Selektivitäts-Dreieck eingeteilt werden, einem Modell in dem Lösemittel in 8 Selektivitätsgruppen je nach Eigenschaft als Protonenakzeptor, Protonendonator oder Dipol unterteilt sind.

Die Mischung des Fließmittels kann mittels des HPTLC Vario Systems mit Plattenlinienfräser (CAMAG, Schweiz) optimiert werden (Abb. 3).

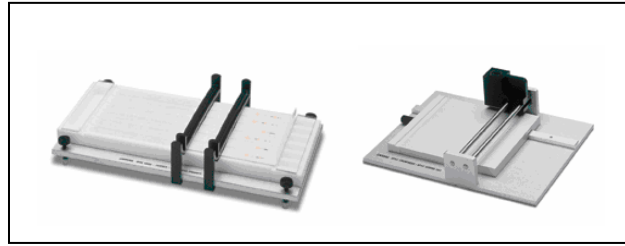


Abb. 3 : Vario System mit Plattenlinienfräser [30]

▪ Auftragung

Der Einfluss der Startzone ist sehr groß. Auftragsfehler werden während den nächsten Schritten der HPTLC nicht kompensiert. Die aufgetragene Lösung (Reinheit, Toxizität, Lösemittelstärke, Polarität), Auftragsmenge, -form (Band, Punkt oder Fläche) und -modus (Kontakt oder Spray) sind alles verschiedene Parameter, die bei einem Trennungsversuch optimiert werden sollen.

Die Auftragung der Proben wird in dieser Arbeit mit Hilfe des ATS4 (Abb. 4) (CAMAG, Schweiz) durchgeführt. Im Gegensatz zu anderen Auftragegeräten ist dieser vollautomatisch. Er ermöglicht Auftragsvolumina von 0,1 μL bis 1 mL. Spritzen sind in Größen zu 10, 25 und 100 μL erhältlich. Die Auftragung kann eine Kontaktauftragung oder eine Sprühauftragung (mittels Stickstoff), punkt- oder bandförmig (bessere Auflösung), oder eine Fläche sein. Um den Einfluss des Auftrags-Lösemittels zu reduzieren, kann noch die Geschwindigkeit der Auftragung optimiert und die Sprühdüse beheizt werden.



Abb. 4 : ATS4 [30]

Eine automatische Auftragung ermöglicht eine bessere Reproduzierbarkeit (unabhängig von der ausführenden Person), ein besseres S/N-Verhältnis und ist auch zeitsparend.

▪ Entwicklung

Eine Spezifität der Planar-Chromatographie ist die Dampfphase. Während der Entwicklung findet man vier verschiedene Prozesse: die Kammersättigung, die Vorkonditionierung, die Verdunstung und die sekundäre Frontausbildungen. Die Entwicklung hängt vom Kammertyp, der Kammersättigung und der Konditionierung ab. Die Kammergeometrie ist entscheidend für die Menge des Fließmittels, das Volumen und die Zusammensetzung der Dampfphase sowie die Vorkonditionierung.

Zudem ist die Dünnschicht-Chromatographie nicht isokratisch. Die Fließmittelzusammensetzung und die Fließgeschwindigkeit ändern sich während der Entwicklung. Die Geschwindigkeit der Front (μ_F) nimmt mit steigender Laufstrecke (Z_F) hyperbolisch ab:

$$\mu_F = k \left(\frac{\gamma}{\eta} \cdot 2 \cdot Z_F \right), \quad (1)$$

wobei γ die Oberflächenspannung, η die Viskosität, und k die Fließkonstante darstellen.

Zwischen der Laufstrecke und der Laufzeit (t) besteht eine quadratische Beziehung:

$$Z_F^2 = k \cdot t. \quad (2)$$

Unter den verfügbaren Entwicklungskammern findet man die Flachbodenkammer, die Doppeltrogkammer (TTC), die Horizontalentwicklungskammer (HDC) und die automatische Entwicklungskammer (ADC2) (Abb. 5).

Die Flachbodenkammer ist kostensparend und leicht sättigbar. Die Doppeltrogkammer, teuer in der Anschaffung, benötigt weniger Fließmittel und ermöglicht eine Vorkonditionierung der Platte.

Die Horizontalentwicklungskammer ist die ökonomischste Entwicklungskammer (nur 2 mL Fließmittel für eine 10x10 cm Kammer). Über Trockenmittel (Salze, Schwefelsäure) kann die Luftfeuchtigkeit in der Kammer und damit die Plattenaktivität reguliert werden. Der größte Vorteil dieses Kammertyps ist die gleichzeitige Entwicklung von beiden Seiten der Schicht, so kann die Zahl der Proben pro Platte verdoppelt werden.

Die automatische Entwicklungskammer wird vor allem für eine bessere Reproduzierbarkeit eingesetzt. Der Laufmittelfront wird von Dioden abgemessen und wenn diese das richtige Niveau erreicht hat, wird die Platte automatisch aus der Kammer entfernt und getrocknet. Automatische Entwicklungssysteme wie der ADC2 (CAMAG, Schweiz) sind auch unabhängig von der Luftfeuchtigkeit. So kann, dank gesättigter Salzlösungen, die Aktivität der Schicht kontrolliert werden. Der Temperatureinfluss ist nicht kontrollierbar.

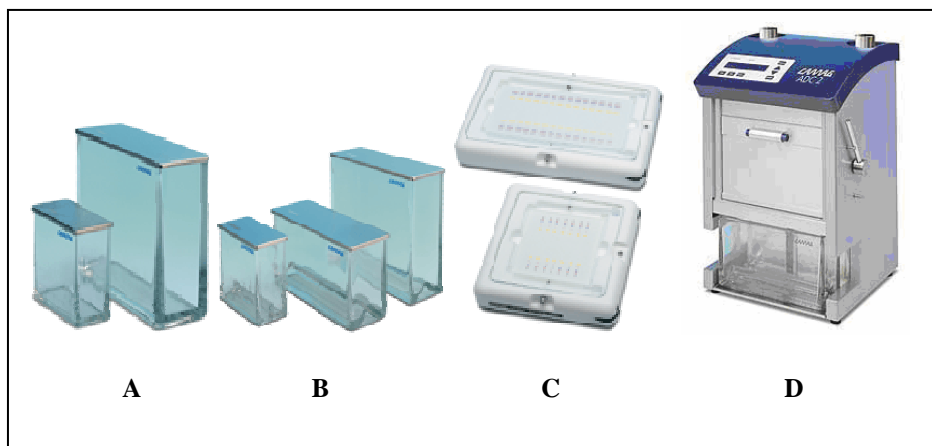


Abb. 5 : Entwicklungskammern: A) Flachbodenkammer, B) Doppeltrogkammer, C) Horizontalentwicklungskammer, D) ADC2 [30]

▪ **Detektion, Identifizierung und Dokumentation**

Um ein Dünnschicht-Chromatogramm auszuwerten steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, welche der Aufgabenstellung angepasst sind (Abb. 6).

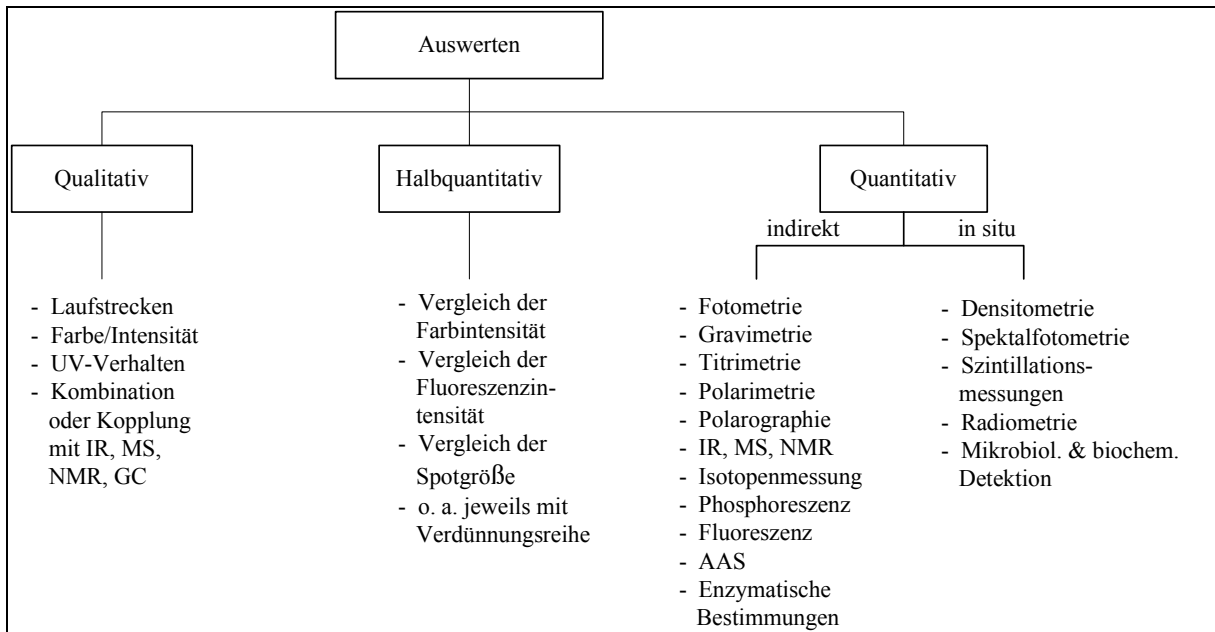


Abb. 6 : Auswertemethoden [31]

Unter den direkten quantitativen Auswertungen wird die Densitometrie häufig angewendet. Die Chromatogramme werden Bahn für Bahn mit einem Chromatogramm-Spektralphotometer vermessen (Abb. 7) und durch Vergleich der Peakhöhen oder Peakflächen von Standards und Proben ausgewertet. Die Messungen werden – je nach Substanzeigenschaften – im sichtbaren Licht oder UV-Bereich durchgeführt, in der Regel bei der Wellenlänge, bei der die zu bestimmenden Substanzen ein Absorptions- oder Fluoreszenzmaximum aufweisen.



Abb. 7 : TLC Scanner 3 [30]

Im Allgemeinen wird die Lichtabsorption als Remission gemessen (Kubelka-Munk-Funktion)

$$F(R_{\infty}) = (k/s) \cdot c = (1 - R_{\infty})^2 / 2 R_{\infty}, [31] \quad (3)$$

wobei R_{∞} die absolute Remission, s der Streukoeffizient und k der Absorptionskoeffizient ist. Es ist auch möglich die Transmission von gefärbten oder fluoreszierenden Substanzen zu messen.

Geräte wie der TLC Scanner 3 ermöglichen es auch von jedem Spot UV/VIS-Spektren zu vermessen. Diese können dann mit Spektren aus einer Spektrenbibliothek verglichen werden.

Es gibt Software wie z.B. VideoScan Digital Image Evaluation (CAMAG, Schweiz), die die Vermessung von Chromatogrammen auch nach einige Monaten ermöglicht. Allerdings muss vorher die Platte mithilfe einer Digitalkamera (DigiStore 2, CAMAG, Schweiz) dokumentiert worden sein (Abb. 8).



Abb. 8 : Digistore 2 [30]

Unter den zahlreichen möglichen Kopplungen mit HPTLC findet man die HPTLC-MS. Statt einen Spot von der Platte abzukratzen, zu eluieren und in das MS überzuführen, gibt es jetzt als Alternative, das semi-automatische CAMAG TLC-MS Interface (Abb. 9). Eine unbekannte isolierte Substanz wird mit einem adäquaten Lösungsmittel direkt von der Platte extrahiert und automatisch in das MS überführt. Das Lösungsmittel wird von einer HPLC-Pumpe abgegeben.

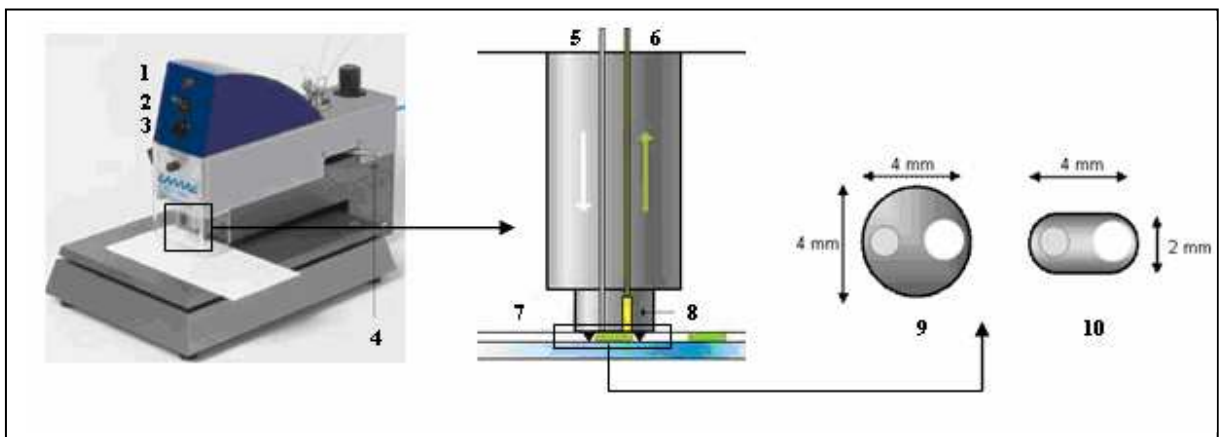


Abb. 9 : CAMAG TLC-MS Interface, Schema von Extraktionskopf und Geometrie des ovalen (9) und runden (10) Stempels, 1: Laserlicht on/off, 2: Steuerung des Extraktionskopfs 3: Stickstoffeinlass zur Reinigung, 4: MS-Verbindungsschieber, 5: Eingang des Fließmittels, 6: Ausgang des Fließmittels, 7: Platte, 8: Fritte [30]

1.7.2 Leistungskenngrößen in der Planar-Chromatographie

Die wichtigen chromatographischen Kenngrößen und Beziehungen in der Planar-Chromatographie sind in gewisser Weise gleich wie in der Hochleistungsflüssigchromatographie.

▪ Der Retentionsfaktor

Ein zusätzlicher Wert muss dennoch definiert werden: der R_F -Wert. Dieser setzt die Laufhöhe der Substanz ins Verhältnis zur Fließmittelfront:

$$R_F = \frac{\text{Abstand Startpunkt} - \text{Substanzspot}}{\text{Abstand Startpunkt} - \text{Laufmittelfront}} = \frac{d_R}{d_M} \quad (4)$$

Der R_F -Wert reicht von einem Wert, nahe 0 (keine Substanzmigration) bis 1 (keine Substanzretention). [31]

▪ Der Selektivitätsfaktor

Der Selektivitätsfaktor $\alpha_{A/B}$ zwischen zwei Substanzen (A und B) ist:

$$\alpha_{A/B} = R_{F,A} / R_{F,B} (> 1). \quad [32] \quad (5)$$

▪ Die Auflösung

Die Auflösung R zwischen zwei Substanzen (A und B) errechnet sich über:

$$R = 2 (d_{R,B} - d_{R,A}) / (\omega_A + \omega_B), \quad (6)$$

$$R = \frac{1}{4} (\alpha - 1) (N \cdot R_F)^{1/2} (1 - R_F), \quad (7)$$

wobei ω die Basisbreite ist. R ist maximal für einen R_F von 0,3. [33]

▪ Bodenzahl und Bodenhöhe

Die theoretische Bodenzahl N kann durch verschiedene Formeln bestimmt werden. Oft werden die HPLC-Gleichungen benutzt :

$$N_{\text{pro Substanz}} = 16 \cdot (d_R / \omega)^2 \quad (8)$$

$$N_{\text{pro Schichtmeter}} = (N_{\text{pro Substanz}} / d_R) \cdot 1000 \quad [33] \quad (9)$$

Eine andere Gleichung ist nach Kowalska :

$$N_{\text{pro Substanz}} = (16 \cdot L \cdot d_R) / \omega^2 \quad (10)$$

$$N_{\text{pro Schichtmeter}} = (N_{\text{pro Substanz}} / L) \cdot 1000 \quad (11)$$

wobei L die Laufhöhe des Fließmittels ist. [34]

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 HPTLC-Trennungsversuch und –optimierung

Aus Kostengründen wurde die Trennung der acht Farbstoffe erst auf Kieselgel versucht. Die verwendete Entwicklungskammer war die Doppeltrogkammer.

2.1.1 Fließmittelversuch auf Kieselgel

Abbildung 10 zeigt die verschiedenen Trennungen gemäß der in der Literatur vorgeschlagenen Fließmittel (FM) (auf HPTLC-Platten, Alufolie).

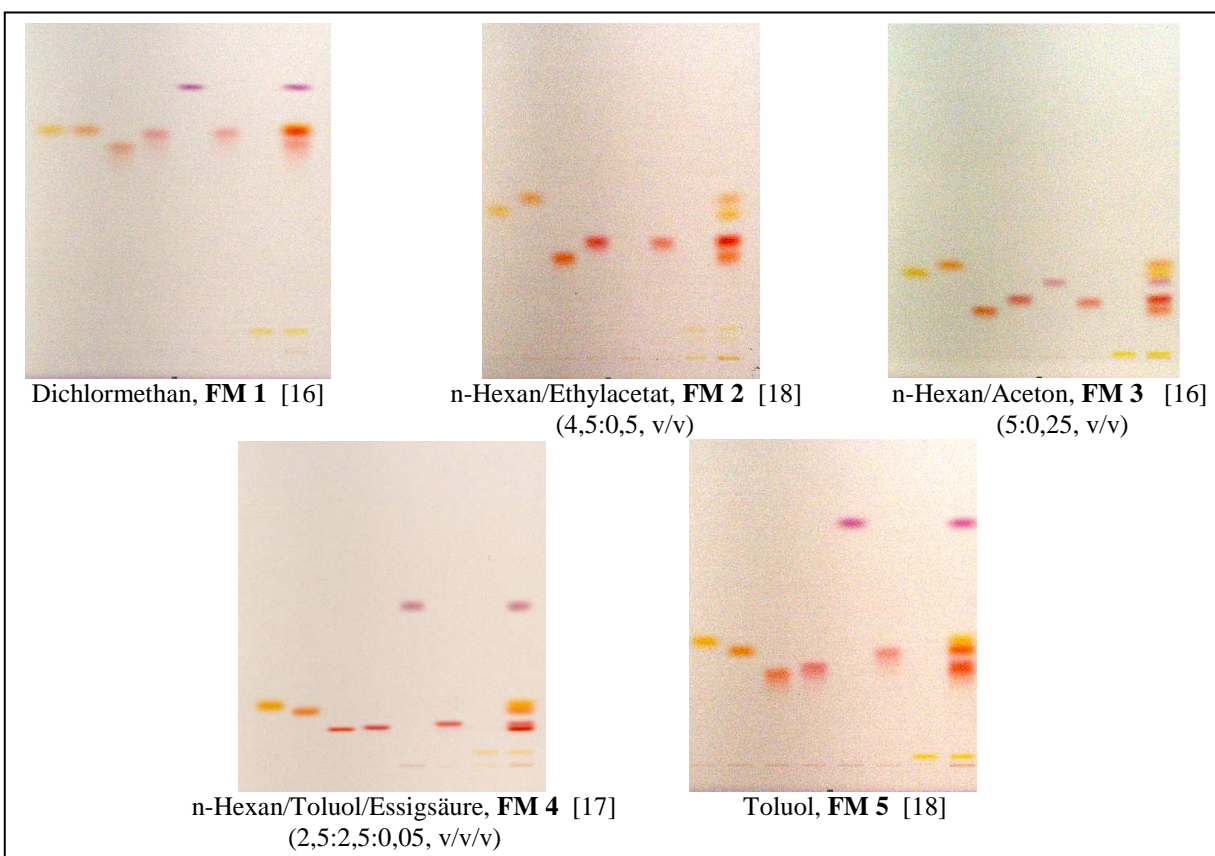


Abb. 10: Erreichte Trennungen nach der Literatur mit der Nummer des Fließmittel (fettgedruckt). Auftragungsreihe (von links nach rechts): Sudanrot I (I), Sudanrot II (II), Sudanrot III (III), Sudanrot IV (IV), Sudanrot 7B (7B), Sudanrot B (B), Orange G (OR) und Mix der sieben verschiedenen Farbstoffe.

Toluol ermöglicht die Trennung der Sudanfarbstoffe 7B und Sudanorange G. Die fünf anderen Farbstoffe coeluierten in zwei Gruppen. Dichlormethan ist nicht geeignet: Sudanrot 7B läuft mit der Front und verbreitert den Spot. Der Zusatz von Essigsäure mit Toluol (FM 4) macht den Spot schärfer. Das Chromatogramm mit FM 2 und FM 3 (beide in Gruppe VI, gemäß Snyder's Theorie) zeigt allerdings die beste allgemeine Trennung bisher.

Nach Snyder's Selektivitätsgruppe wurde auch ein Lösungsmittel der Gruppe I (TBME, FM 6), IV (n-Hexan/Essigsäure, (6:0,2, v/v), FM 7) und VIII (Chloroform, FM 8) getestet (Abb. 11). Weil die Chromatogramme mit FM 3 und 5 die besten Trennungen zeigen, wurde versucht, diese durch FM 9 (Hexan/MEK, (5:0,25, v/v)) und 10 (Toluol/MEK (5:0,25, v/v)) zu verbessern (Abb. 11).

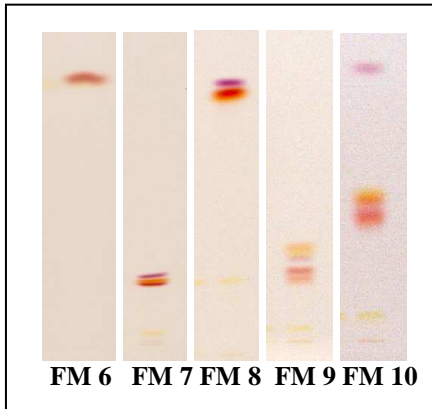


Abb. 11 : Trennung durch unterschiedliche Fließmittel

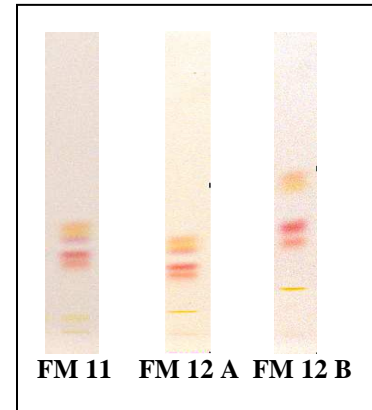


Abb. 12 : Erreichte Chromatogramme mit FM 11 und FM 12 (A: 1. Entwicklung, B: 2. Entwicklung)

Die Entwicklung mit FM 9 wurde wiederholt, aber mit einem Zusatz von Säure (schärferer Spot): Salzsäure (FM 12: (n-Hexan/MEK/Salzsäure), (5:0.25:0,01, v/v/v); FM 13 (n-Hexan/MEK/Trifluoressigsäure), (5:0,25:0,01, v/v/v)). Die Trennung war allerdings nicht besser, auch nach einer zweiten Entwicklung mit demselben Fließmittel (Abb. 12).

Der Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Schichtaktivität und infolgedessen auf die Trennung wurde mit Toluol (FM 5) und der Mischung n-Hexan/MEK (FM 9) getestet. Das Chromatogramm der Abb. 13 zeigt die beste Trennung mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 16 % (Fließmittel: FM 5).

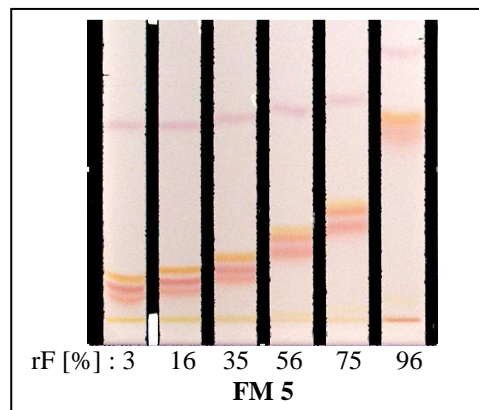


Abb. 13 : Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf KG 60

2.1.2 Vergleich der Selektivität von verschiedenen Schichten

Parallel zum Versuch auf KG 60 wurden auch andere Selektivitäten durch Verwendung unterschiedlicher Schichtmaterialien getestet.

▪ Kieselgel- vs. Aminophase

Die Trennung wurde anhand von drei verschiedenen Fließmitteln (neutral (FM 5), basisch (n-Hexan/Diethylether/Ammoniaklösung (25 %), FM 11) und sauer (FM 13)) auf Kieselgel und einer weniger polaren Phase (NH₂-Phase) verglichen (Abb. 14).

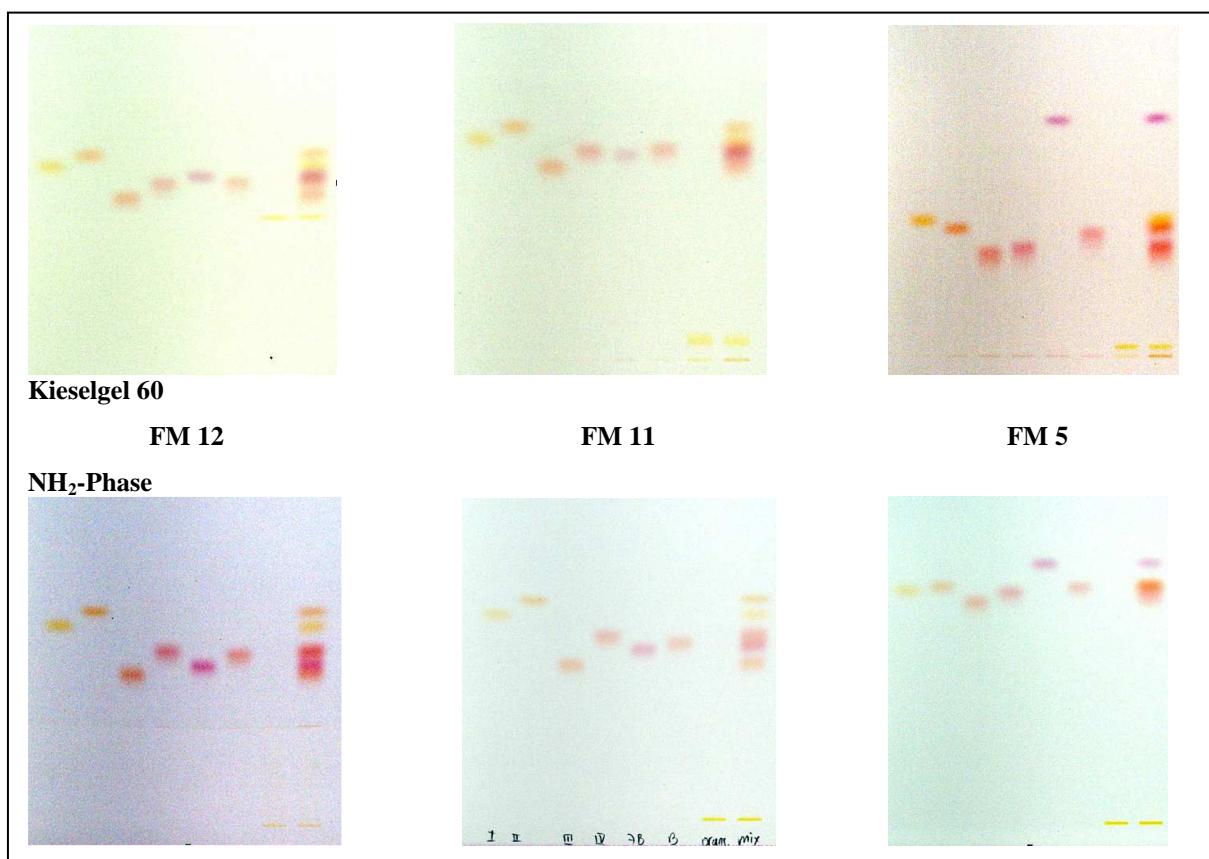


Abb. 14 : Trennungvergleich zwischen Kieselgel und Aminophase und Effekt einer Base und einer Säure auf beide Schichten (HPTLC-Platten, Glas); Auftragsreihe: siehe Abb. 10.

Die NH₂-Phase ermöglicht die Trennung von Sudanrot I und II mit FM 12 und FM 11. Aber es bildet sich mit FM 12 auf der NH₂-Platte eine β -Front. Ferner ist die Selektivität der Aminophase für Sudanorange G nicht relevant (keine Migration).

▪ Aluminiumoxidschichten

Da Aluminiumoxidschichten zur Trennung von Alkaloiden, Terpenen, Steroiden und Substanzen mit aliphatischen und aromatischen Verbindungen verwendet werden, wurde die Selektivität dieser Schicht untersucht (Abb. 15). Die Selektivität der Schicht ist allerdings nicht relevant: Sudanorange G bleibt in der Startzone.



Abb. 15 : Trennung auf Al₂O₃, neutral

▪ Alkylierte Aminophasen

Es wurde versucht drei NH_2 -Platten mit 4-Bromophenacylbromid, Pentafluorphenacylbromid (PFP) und Pentafluorbenzylbromid (PFBB) zu modifizieren, um drei neue Schichtselektivitäten zu vergleichen (Abb. 16). Die Reaktion auf der Schicht wurde nur einmal versucht. Die Reaktion mit 4-Bromophenacylbromid und Pentafluorbenzylbromid hat allerdings nicht funktioniert, da keine unterschiedlichen Selektivitäten beobachtet werden konnten. Der Vergleich der Trennung mit den zwei Schichten (NH_2 -Platte und die modifizierte Platte) zeigte kein Unterschied. Verglichen mit der NH_2 -Platte war die Selektivität der mit PFP modifizierten Platte verändert, aber nicht bedeutsam.

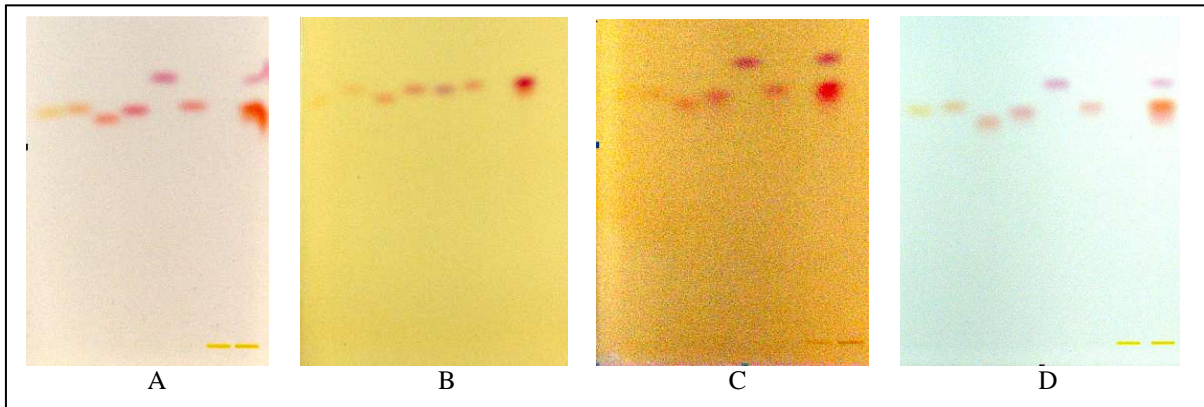


Abb. 16: Vergleich von drei unterschiedlich modifizierten NH_2 -Platten (Glas); Modifizierung mit A) 4-Bromophenacylbromid, B) PFP, C) PFBB; D) normale NH_2 -Phase; FM 5; Auftragungsreihe: siehe Abb. 10

▪ Coffein-imprägnierte Kieselgel-Platten

Die Selektivität einer KG 60-Schicht imprägniert mit Coffein wurde getestet. Dieser Elektronenakzeptor wird normalerweise für die PAK-Analytik auf der Basis von Charge-Transfer-Komplexen verwendet. Trennungen auf Coffein-imprägniertem Kieselgel und normalem Kieselgel (HPTLC-Alufolie) wurden mit FM 9 und FM 5 durchgeführt. FM 5 mit der Coffein-imprägnierten Platte ermöglichte es, Sudanfarbstoff 7B zu isolieren (Abb. 17). Die Farbstoffe Sudanrot I und II sind allerdings weniger gut getrennt.

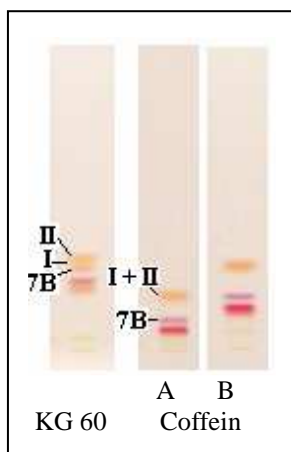


Abb. 17: Schichtvergleich mit FM 9; A: 1. Entwicklung, B: 2. Entwicklung (HPTLC-Alufolie)

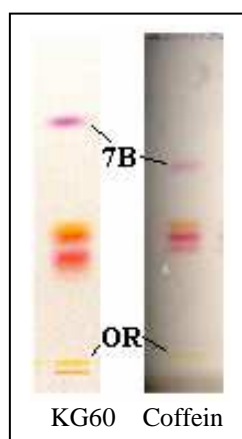


Abb. 18: Schichtvergleich mit FM 5 (HPTLC-Glasplatten)

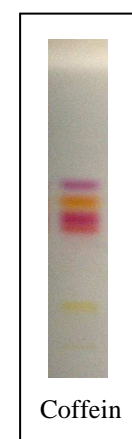


Abb. 19: FM 14

Das Chromatogramm auf der Coffein-imprägnierten Platte mit Toluol (FM 5) zeigt im Vergleich mit dem auf KG 60 keinen großen Selektivitätsunterschied (Abb. 18). Da Toluol die Abtrennung von Sudanrot 7B und FM 9 die Trennung von Sudanrot I und II ermöglicht, wurde eine Entwicklung mit der Mischung Toluol/MEK (4:0,5, v/v) (FM 14) versucht (Abb. 19). Parallel wurde auch die unterschiedliche Zusammensetzung von FM 9 getestet (Abb. 20).

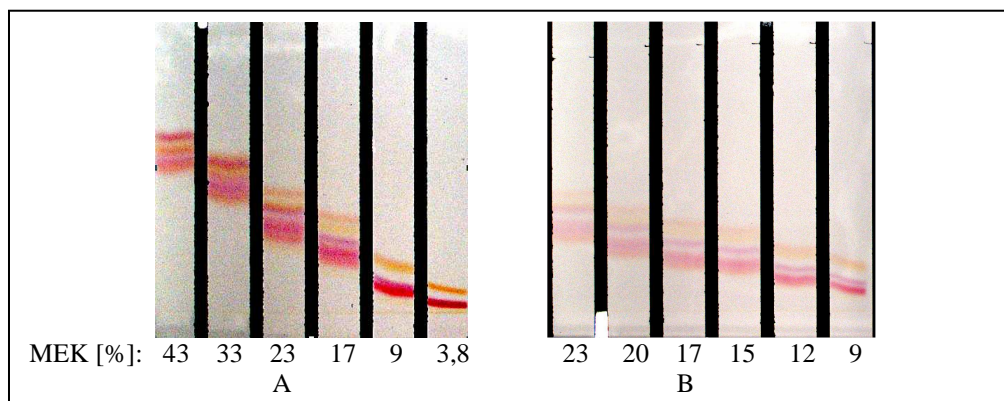


Abb. 20 : Optimierungsversuch der Zusammensetzung der FM 9; A: breite Bereich von % MEK, B: Optimierung des relevanten Bereichs gemäß Platte A.

Die optimale Zusammensetzung des FM 9 auf einer Coffein-imprägnierten HPTLC-Platte wird bei einem Gehalt von 17 % MEK – n-Hexan/MEK (5:1, v/v) (FM 15) – erreicht. Die Trennung ist mit dieser Zusammensetzung wiederholt worden und ist bisher die beste (siehe Abb. 21, D).

2.1.3 Optimierung des Fließmittels auf Coffein-imprägnierten Platten

▪ Vergleich unterschiedlicher Schichten

Die optimierte Trennung mit FM 15 (siehe 2.1.2) wurde auf unterschiedlichen Glas-HPTLC-Kieselgel 60 Platten (gekaufte und selbst Coffein-imprägnierte Platten) von verschiedener Schichtqualität (amorphes oder sphärisches Kieselgel) verglichen (Abb. 21).

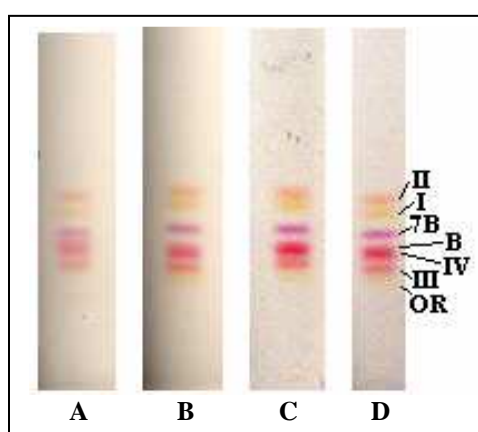


Abb. 21 : Schichtvergleich: A: Coffein-imprägnierte LiChrospher® (sphärisches Kieselgel) (Merck); B: Nano-Sil PAH (Macherey-Nagel); C: für PAK (Merck); D: Coffein-imprägnierte KG 60 (Merck)

Die Verwendung von LiChrospher® Platten zeigt keine relevante Verbesserung. Die Trennung ist gleich, egal welcher Hersteller oder ob die Schicht selbst imprägniert ist oder nicht. Allerdings wurde aus Kostengründen und Zeitersparnis mit den Platten von Macherey-Nagel (Nano-SIL PAH) – Mercks Coffein-imprägnierte KG 60 sind nicht mehr lieferbar – weitergearbeitet. Die selbst imprägnierte Schicht wurde mit einer Lösung von 1,7 % Coffein in ACN (60 mL pro 20x10 cm Platte) vorbehandelt, der Zeitaufwand betrug 40 min (20 min zum Tauchen und 20 min zum Trocknen bei 120 °C). Der Einsatz von bereits imprägnierten Fertigplatten ist sehr benutzerfreundlich, notfalls können die Platten aber auch selbst hergestellt werden.

▪ Reduzierung der Laufstrecke und Zugabe der Farbstoffe Pararot und des internen Standards

Parallel zur Trennungsoptimierung wurden die Farbstoffe Pararot (PR) und der interne Standard (IS) (siehe 2.2) in der Trennung zugegeben. Aber da Pararot mit Sudanorange G mit FM 15 coeluiert wenn n-Hexan verwendet wird, aber nicht bei Isohexan, wurde von n-Hexan zu Isohexan gewechselt (Isohexan/MEK, (5:1, v/v) FM 16). Gleichzeitig, um die Diffusion zu limitieren und die Zeit der Entwicklung zu verkürzen, wurde die Laufstrecke von 7 cm auf 6 cm reduziert. Die Auflösung ist dabei besser, da die Spots schmaler und die Diffusion kleiner sind (Abb. 22).

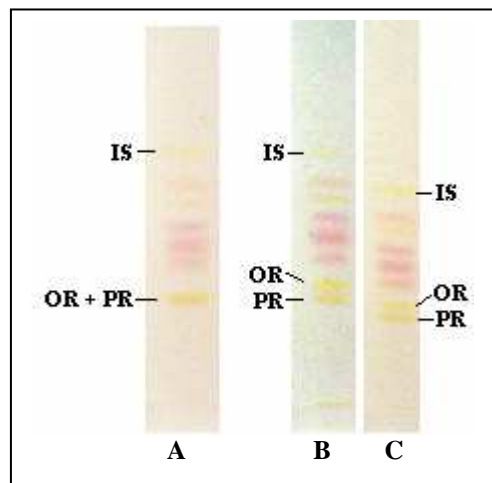


Abb. 22 : 7 cm Entwicklung mit FM 14 (A) und FM 15 (B); C: 6 cm Entwicklung mit FM 15.

▪ Einfluss der Luftfeuchtigkeit

Schon von Anfang dieser Arbeit an konnte bei verschiedenen Tests in der Doppeltrogkammer ein Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit (Lf) festgestellt werden. Abb. 23 zeigt die Chromatogramme (FM 14) bei unterschiedlichen gemessenen Luftfeuchtigkeit im Labor.

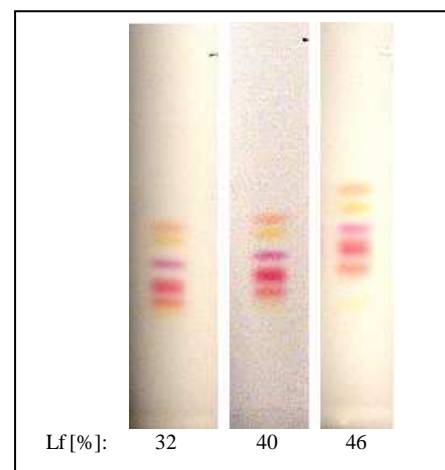


Abb. 23 : Chromatogrammvergleich von verschiedenen, im Labor gemessenen Lf

Daher, um eine reproduzierbare Trennung zu erreichen, wurde die Trennung im ADC2 weitergeführt. Die relative Luftfeuchtigkeit (rF) wurde mithilfe dreier verschiedener gesättigter Salzlösungen optimiert: Magnesiumchlorid, Kaliumcarbonat und Kaliumthiocyanat. Bei den Experimenten waren die rF größer als die theoretischen: ~39 %, 51 % und 52 % statt 33 %, 43 % und 47 % (Temperatur: 20 °C). Die erhaltenen Chromatogramme bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 % (K_2CO_3 und KSCN) zeigten eine bessere Trennung als die bei 39 % (Abb. 24). Aus Kostengründen wurde die gesättigte Kaliumcarbonatlösung bevorzugt. Die Kosten betragen für Kaliumcarbonat und Kaliumthiocyanat 3,90 bzw. und 11,20 Euro/100 g gesättigte Lösung (jeweilige Löslichkeit bei 20 °C: 110,6 und 222,5 g/100 g Wasser). [35] [36]

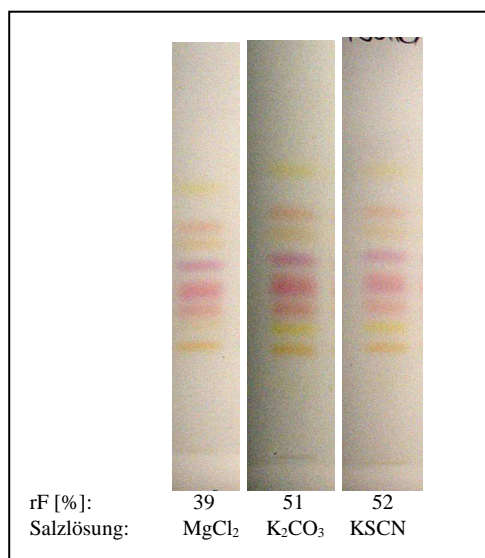


Abb. 24 : Chromatogrammvergleich in ADC2 bei drei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeit.

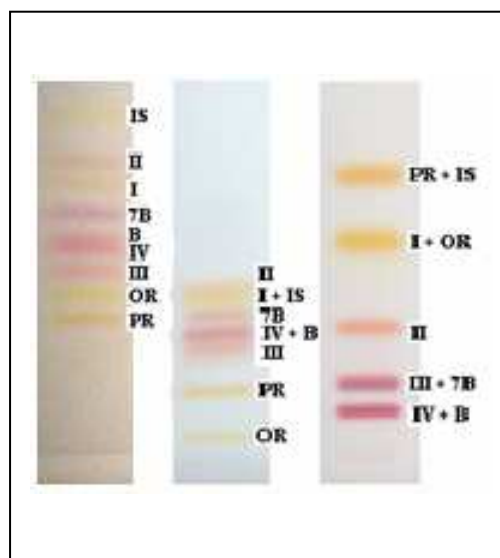


Abb. 25 : Trennung auf Coffein (A), KG 60 (B) und RP 18 (C)

Auch wenn die Trennung der zwei Konstitutionsisomere Sudanrot IV und B nicht erfolgreich war (Abb. 55), wurde kein weiterer Trennungsversuch unternommen. Allerdings muss man bedenken, dass kein Trennsystem in der Literatur eine Trennung dieser Farbstoffe ermöglicht. Abb. 25 zeigt die Trennung der 8 Azofarbstoffe auf Coffein-impregnierten HPTLC-Platten NANO-SIL-PAH, HPTLC-Platten Kieselgel 60 und HPTLC-Platten (FM 15) und RP 18, gemäß [13] (siehe 1.4.1). Für eine verbesserte Auflösung wurden die Auftragungsbanden von 6 mm (Abb. 10 bis 24) auf 8 mm (Abb. 25) vergrößert.

2.2 Interner Standard

Um zufällige Fehler während des Analyseverfahrens auszugleichen ist ein optimaler interner Standard notwendig. Dieser soll nicht nur eine ähnliche chemische Struktur wie die verwendeten Farbstoffe aufweisen, sondern auch die Trennung nicht stören.

2.2.1 Tests dreier unterschiedlicher Substanzen

Drei verschiedene Substanzen wurden getestet (Abb. 26): *trans*-Azobenzol, Azophenol und 4-Dimethylaminoazobenzol (Dimethylgelb (C.I. 11020)).

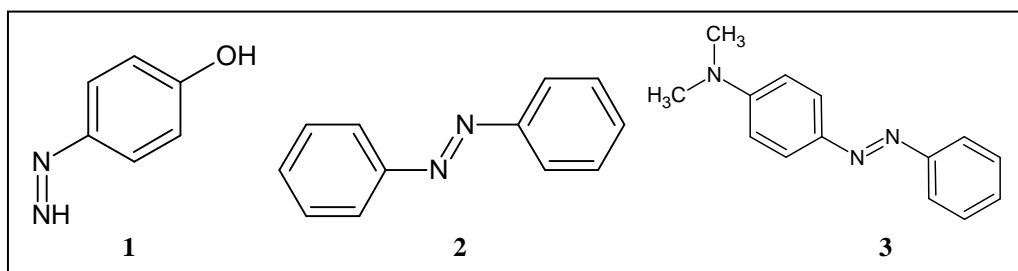


Abb. 26 : 1: Azophenol, 2: *trans*-Azobenzol, 3: 4-Dimethylaminoazobenzol

Azophenol und *trans*-Azobenzol sind unter Weißlicht nicht sichtbar. Die Absorptionsmaxima (λ_{\max}) betragen 350 bzw. 325 nm (Abb. 56). λ_{\max} von 4-Dimethylaminoazobenzol liegt bei 415 nm (Abb. 35). Die R_F betragen für Azophenol, *trans*-Azobenzol und 4-Dimethylaminoazobenzol 0,34, 0,88 und 0,63 (Abb. 56). Die R_F -Werte des Trennungsbereichs liegen, für eine Laufstrecke von 6 cm auf Coffein-imprägnierter Schicht, zwischen 0,24 und 0,55. Da 4-Dimethylaminoazobenzol unter Weißlicht sichtbar ist, aber vor allem weil es nicht im aber nahe am Trennungsbereich liegt, wurde dieses aus den Substanzen ausgewählt.

2.2.2 Versuch der Synthese der deuterierten Farbstoffe

Die Synthesen der verwendeten Sudanfarbstoffe wurden versucht, um deuterierte interne Standards für die massenspektrometrische Bestimmungen zu erhalten.

Wegen ihrer ähnlichen chemischen Struktur können Sudanrot I-II, Sudanrot IV und Pararot auf demselben Weg synthetisiert werden: eine Diazotierung eines primären aromatischen Amins (Anilin für Sudanrot I, 2,4-Dimethylanilin für Sudanrot II, 4'-Amino-2',3'-dimethylazobenzol für Sudanrot IV und 4-Nitroanilin für Pararot) mit Natriumnitrit, dann eine Kupplung in alkalischer Lösung mit β -Naphthol, der deuterierten Substanz.

▪ Mechanismus der Synthesen von Sudanrot I-II, Sudanrot IV und Pararot

a) Diazotierung

Die Diazotierung eines aromatischen primären Amins ist der erste Schritt der Zweistufenreaktion, mittels derer fast alle Azofarbstoffe hergestellt werden. [12]

Die Amine reagieren mit salpetriger Säure über einen nukleophilen Angriff auf das Nitrosylkation NO^+ . Dieses muss in situ durch Zusatz von Salzsäure erzeugt werden (Abb. 27). Mehr als 2 Äquivalente von H^+ sollten eingesetzt werden, um die Konzentration des Nitrosylkations zu erhöhen.

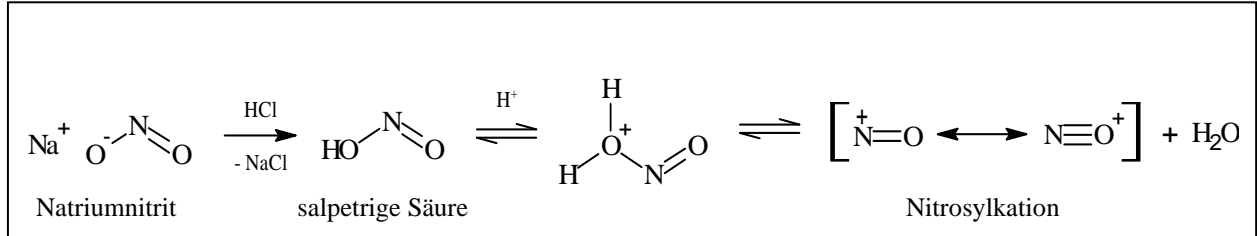


Abb. 27 : Ausbildung des Nitrosylkations

Das Nitrosylkation wird vom Amin (Lösung im Eisbad) angegriffen und bildet ein N-Nitrosammoniumsalz, gefolgt von einem N-Nitrosamin (Abb. 28).

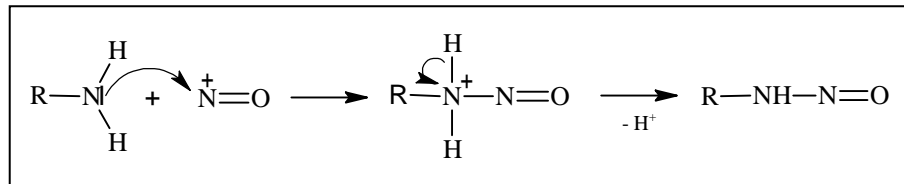


Abb. 28 : Ausbildung des N-Nitrosammoniumsalzes, dann des N-Nitrosamins. R steht für Benzol (Sudanrot I), 2,4-Dimethylbenzol (Sudanrot II), 2,3'-Dimethylazobenzol (Sudanrot IV) und Nitrobenzol (Pararot).

Das Nitrosamin ist aber nur ein Zwischenprodukt, das über das Diazohydroxid schnell in das Diazoniumion transformiert wird. Der Grund der Labilität des primären N-Nitrosamins ist das Proton, das am Stickstoff verbleibt. Nach einer Serie von Protonenabspaltungen, bildet sich zunächst das Diazohydroxid (Abb. 29).

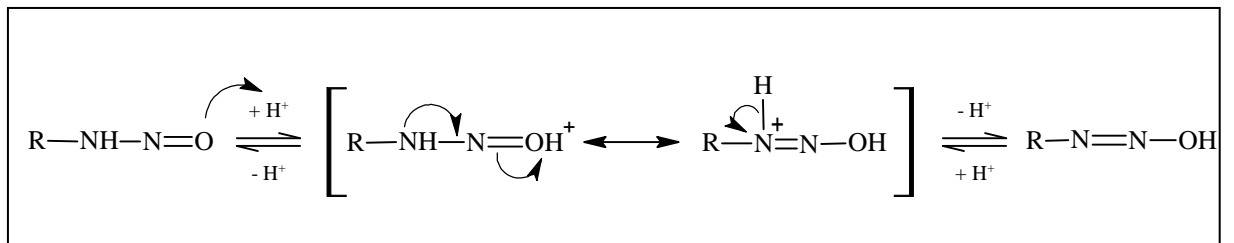


Abb. 29 : Ausbildung des Diazohydroxids

Danach führt eine Protonierung, gefolgt von einer Wasserabspaltung zum Diazoniumion ($\text{R}-\text{N}_2^+$), das extrem reaktiv ist (Abb. 30).

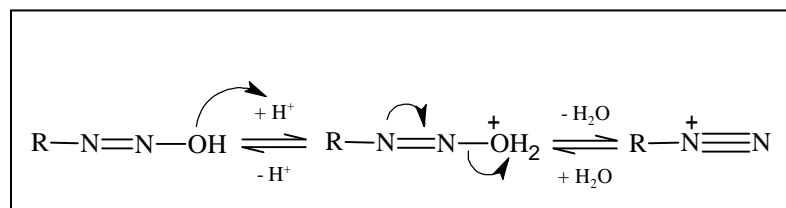


Abb. 30: Ausbildung des Diazoniumions

Die Diazotierungsreaktion muss unbedingt bei tiefer Temperatur ($< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) durchgeführt werden, da ansonsten unerwünschte Nebenreaktionen ablaufen.

b) Azokupplung

Wegen ihrer positiven Ladung zeigen Diazoniumionen ein elektrophiles Verhalten. Die Salze sind allerdings nicht sehr reaktiv. Trotzdem können sie aromatische elektrophile Substitutionen eingehen, sofern es sich bei den nucleophilen Substraten um aktivierte Arene handelt wie z.B. Phenole oder β -Naphthol (Abb. 31-32) in unserem Fall. Diese Reaktion nennt man Azokopplung. Die Produkte sind intensiv farbige Substanzen. Die Reaktion wird im Basischen durchgeführt.

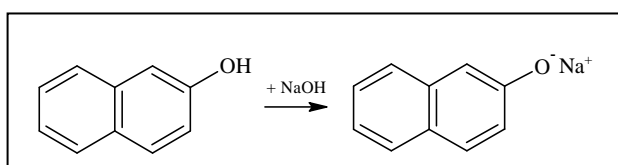


Abb. 31: Ausbildung des Naphtolats

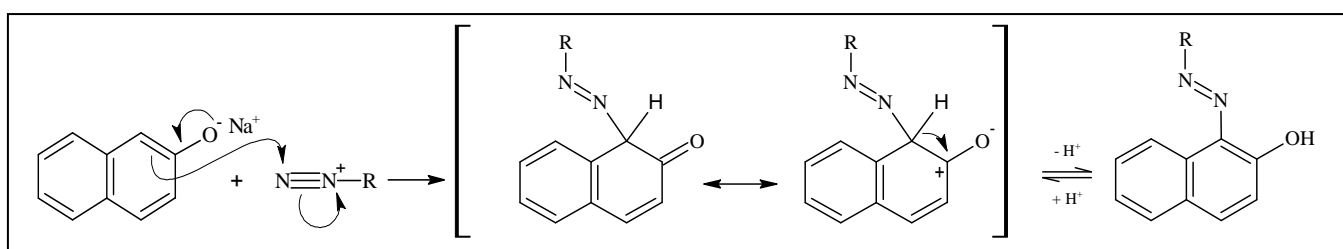


Abb. 32: Azokupplung von β -Naphtolat mit dem Diazoniumion

Die Synthese dieser vier Farbstoffe hat den Vorteil, dass man außer einer Analysenwaage und einem Magnetrührer keine speziellen Materialien oder Geräte benötigt. Nebenbei ist die Synthesezeit kurz: eine halbe Stunde für ungefähr 4 mmol oder 1-1,5 g Edukt. Als Ausbeuten vor der Umkristallisation erhielt man für Sudanrot I-II, IV und Pararot 84, 90, 79 und 67 %.

▪ Reinigung

Sudanrot I und II können in MeOH oder EtOH umkristallisiert werden (reine Ausbeuten: 60 und 66 %). Beide sind kristallin. Die Umkristallisation von Sudanrot IV und Pararot in MeOH und EtOH wurde ebenfalls durchgeführt. Dennoch sind beide Produkte pulverartig. Die gekauften Referenzsubstanzen zeigen dieselbe Beschaffenheit, abweichend ist nur Sudanrot I pulverartig.

▪ Reinheitsprüfung

Die synthetisierten Azofarbstoffe wurden mittels Chromatographie, Spektrenvergleich mit der selbst erstellten Spektrenbibliothek und MS-Spektren geprüft. Sudanrot I, II und IV haben gleiche R_F -Werte (Abb. 57) und eine Korrelation $\geq 0,99883$ mit den Spektren der Spektrenbibliothek (Abb. 59-61). Pararot zeigt das gleiche Absorptionsmaximum wie in der Literatur [27] und denselben R_F -Wert der Trennung auf einer RP18-Platte der Methode [13] (Abb. 25). Ferner konnten alle Masse der Farbstoffe mittels Massenspektrometrie bestimmt werden (Abb. 62-65).

Die Synthese von Sudanrot III und B wurde ebenfalls ausgeführt. In diesen Synthesen finden nacheinander zwei Azokupplungen statt. Sudan III und B sollten durch a) die Diazotierung des Anilins bzw. m-Toluidins, b) die Azokopplung der Addukte und Anilin bzw. o-Toluidin, c) die Diazotierung der neuen Addukte und d) die Azokopplung mit β -Naphthol synthetisiert werden. Beide Synthesen waren nicht erfolgreich. Durch Planar-Chromatographie-Bestimmung war das Produkt der Synthese von Sudanrot III mit Sudanrot I vergleichbar. Sudanrot III hat nur eine zusätzliche Phenylidiazengruppe. Das Chromatogramm (Abb. 66) zeigt für Sudanrot B zwei Spots, womöglich eine Mischung aus den Addukten der Azokopplung zwischen m-Toluidin bzw. o-Toluidin und β -Naphthol. Dies bedeutet, dass in beiden Fällen eine Diazotierung, gefolgt von einer Azokopplung ablief, aber dass beide Zwischenprodukte (Abb. 33) nicht synthetisiert worden sind.

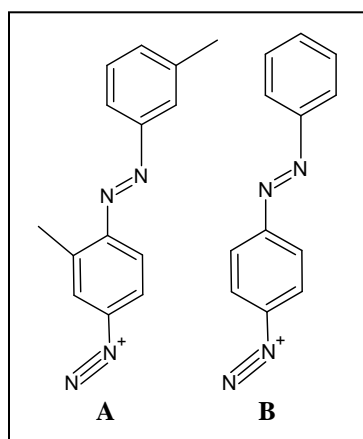


Abb. 33: Zwischenprodukt der Synthese von Sudanrot 7B (A) und Sudanrot III (B)

Weil es nicht möglich war, Sudanrot III und Sudanrot B zu synthetisieren, wurde die Synthese von Sudanrot 7B nicht durchgeführt. Ferner enthält Sudanorange G, wie übrigens auch Sudanrot 7B, kein β -Naphthol (die potenziell deuterierte Substanz). Aus all diesen Gründen wurde die Synthese nicht weitergeführt.

Trotzdem wurden die synthetisierten Farbstoffe Pararot und Sudanrot I weiterverwendet. Pararot wurde in der Trennung zugegeben und Sudanrot I als zusätzlicher analytischer Vergleichsstandard eingesetzt.

2.3 Densitometrische Detektion: Bestimmung der Messwellenlänge

Um die richtige Messwellenlänge zu bestimmen wurde erst ein Multi-Wellenlängenscan bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt, um die Spots als einzelne Substanzen zu detektieren. Diese wurden nach der Literatur gewählt: 550 nm, 500 nm, 525 nm, 400 nm [27] [13]. Dann wurden Spektren über den UV/VIS-Bereich (200-800 nm) von den definierten Peaks aufgenommen (Abb. 34)

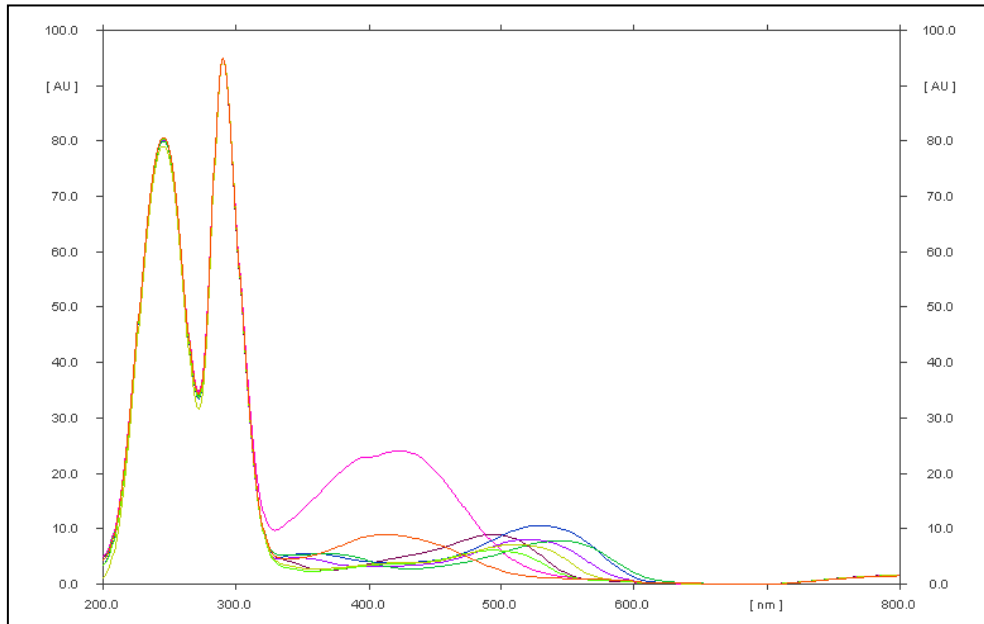


Abb. 34: Absorptionsspektren [200-800 nm] der 8 Farbstoffe und des internen Standards

Die Spektren zeigen einen interessanten Bereich von 320 bis 600 nm, da die verschiedenen Farbstoffe, außer Sudanrot IV und B (Konstitutionsisomere) unterschieden werden können (Abb. 35).

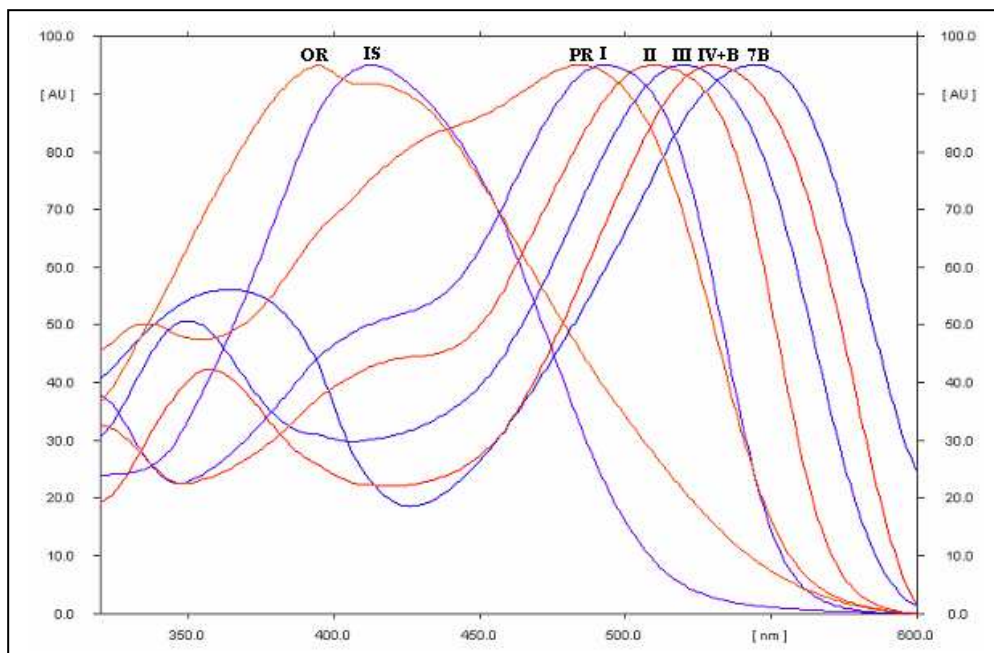


Abb. 35: Absorptionsspektren [320-600 nm] der 8 Farbstoffe und des internen Standards

Die Absorptionsmaxima (λ_{\max}) der Farbstoffe sind in Tab. 5 gegeben.

Tab. 5 : Absorptionsmaxima (λ_{\max}) der Farbstoffe und des internen Standards

Farbstoffe	λ_{\max} [nm]
Sudanrot I	495
Sudanrot II	510
Sudanrot III	522
Sudanrot IV + B	533
Sudanrot 7B	545
Sudanorange G	395
IS	415

Die gewählten Messwellenlängen sind: 390 nm (Sudanorange G), 415 nm (IS), 500 nm (Sudanrot I, II und Pararot), 525 nm (Sudanrot IV und B), 550 nm (Sudanrot 7B).

2.4 Quantitative Bestimmung

Die Kalibrationskurven wurden anhand dreier unterschiedlicher Farbstoffmischstandards (mit internem Standard) erstellt und die Bestimmung dreimal wiederholt. Zwei Regressionen für die Fläche können gemäß dem Arbeitsbereich festgelegt werden: linear (4 bis 40 ng/Band) und polynomisch (10 bis 200 ng/Band) (Abb. 36). Tab. 43 und 44 listen alle Kalibrationskurven auf. Die Reproduzierbarkeit ($n = 3$) der Kalibrationskurven vom engen und weiten Bereich weisen einen relativen Korrelationskoeffizienten $\geq 0,99878$ bzw. $\geq 0,99705$ und eine Standardabweichung $\leq 2,56\%$ bzw. $\leq 5,69\%$ auf.

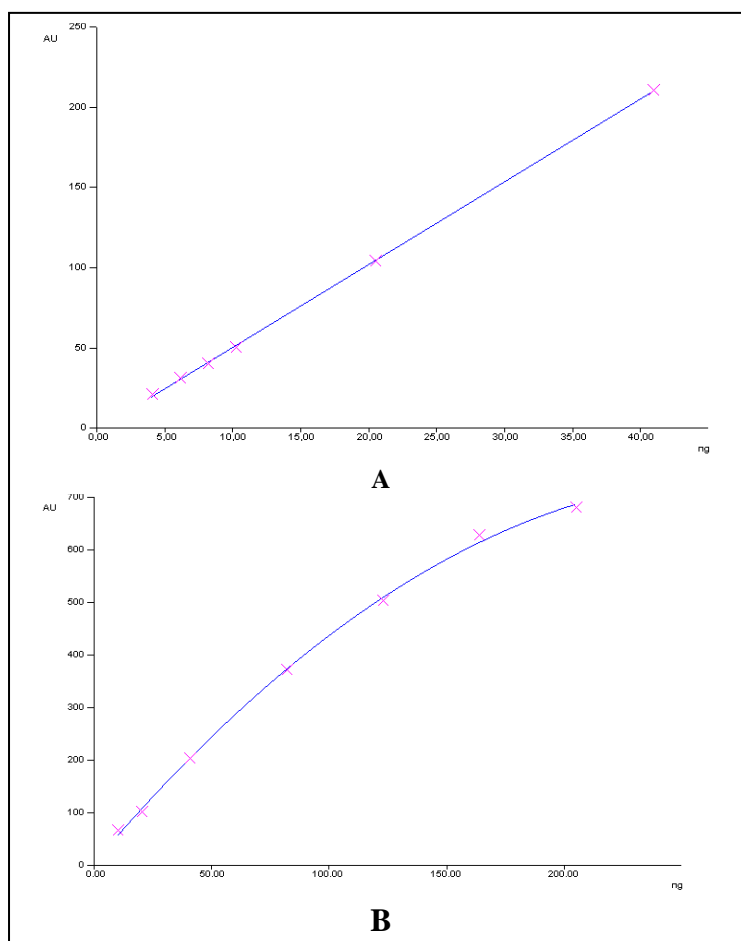


Abb. 36: Lineare (A) und polynomische (B) Kalibration über A) den engen (Signalintensität [AU] = $-1,408 + 5,176 \cdot \text{Menge [ng/Spot]}$, $r = 0,9999$, $sdv = 0,1\%$) bzw. B) den weiten (Signalintensität [AU] = $-0,010 \cdot (\text{Menge [ng/Spot]}^2 + 5,383 \cdot \text{Menge/Spot [ng]} - 3,759)$, ($r = 0,9994$, $sdv = 2,8\%$) Kalibrationsbereich am Beispiel von Sudanrot 7B

Um die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) zu definieren, wurden Mengen von 200 bis 1 ng/Spot aufgetragen. Dann wurden die Grenzen durch die Höhe des Rauschens (dreimal für LOD, zehnmal für LOQ) bestimmt (Tab. 6).

Tab. 6 : Nachweisgrenzen nach densitometrischer Bestimmung ⁽¹⁾

Farbstoffe	Menge [ng]	Peakhöhe [AU]	Rauschen [AU]	Signal/Rauschen	LOD [ng/Band]	LOQ [ng/Band]
I	4,0	10,0	2,6	3,8	2,3	7,1
II	4,3	11,5	2,9	4,8	2,3	7,0
III	4,3	14,5	3,0	4,8	3,2	6,6
IV	4,1	12,0	2,2	5,5	2,2	6,4
B	4,1	12,3	2,9	4,2	2,0	6,5
7B	4,1	14,1	3,7	3,8	2,4	7,4
OR	4,0	15,0	4,1	3,7	2,9	9,3
PR	4,1	14,5	2,9	6,0	1,7	5,6

⁽¹⁾ Die verwendeten Gleichungen (fettgedruckt) sind in Tab. 43 gegeben.

Obwohl die theoretischen LOQ etwa bei 7 ng/Spot liegen, können in der Praxis die Peaks der Farbstoffe bis 4 ng/Spot bestimmt werden (Abb. 67). So wurden die Kalibrationskurven im engen Bereich bis auf 4 ng/Spot hinab erstellt.

In der Praxis hat jede Platte ihre eigenen Kalibrationskurven. Daher wurden vier Banden pro Platte für die Kalibration vorgesehen (siehe Platten der Abb. 49 und 74 als Beispiele).

2.5 Kenngrößen der optimierten Trennung

Die R_F -Werte und der Selektivitätsfaktor der Trennung der 8 Farbstoffe und des internen Standards auf HPTLC-SIL-PAH sind in Tab. 7 gegeben.

Tab. 7 : R_F -Werte und Kapazitäts- und Selektivitätsfaktoren der optimierten Trennung (siehe Abb. 25 (A)).

Substanz	R_F	$\alpha^{(1)}$
IS	0,55	1,17
II	0,47	1,09
I	0,43	1,16
7B	0,37	1,12
B	0,33	1,03
IV	0,32	1,19
III	0,27	1,13
OR	0,24	1,14
PR	0,21	-

⁽¹⁾ durch Gleichung 3 gerechnet

Wie in Abb. 25 (A) und Abb. 68 gezeigt, waren die zwei Konstitutionsisomere Sudanrot IV und B schwer zu trennen. Aber da beide identische UV/VIS- und Massenspektren aufweisen und beide in Lebensmitteln verboten sind, kann nur eine der Substanzen in die Trennung aufgenommen werden.

Die Bodenzahlen der Trennung ohne Sudanrot B sind in Tab. 8 gegeben. Diese wurden für jeden Farbstoff und den internen Standard bei ihrer jeweiligen Messwellenlänge und bei einer Menge $> 3 \cdot \text{LOQ}$ (circa 25 ng/Spot), außer beim internen Standard (100 ng/Spot) ermittelt (Abb. 68 und 69).

Tab. 8 : Bodenzahlen nach HPLC- (8-9) und Kowalska-Gleichungen (10-11) und Auflösung nach (6) bei einer Laufhöhe des Fließmittels von 60 mm.

Farbstoffe	PR	OR	III	IV	7B	I	II	IS
d_R [mm]	12,1	13,4	17,4	19,7	22,6	26,1	28,5	33,9
ω [mm]	3,3	3,3	3,3	3,1	3,3	3,2	3,2	5,8
Bodenzahlen	HPLC							
$N_{\text{pro Substanz}}$	215	264	445	646	750	1064	1269	547
$N_{\text{pro Schichtmeter}}$	17778	19688	25565	32800	33205	40781	44531	16124
	Kowalska							
$N_{\text{pro Substanz}}$	1067	19688	1534	1967	1992	2447	2672	967
$N_{\text{pro Schichtmeter}}$	17778	19688	25565	32800	33205	40781	44531	16124
Auflösung	0,39	1,21	0,72	0,72	0,91	1,08	0,75	1,20

2.6 Probenvorbereitung

Die Herausforderung der Methode (Extraktion und Aufreinigung) lag im Folgenden: sie sollte nicht nur so selektiv wie möglich für Azofarbstoffe, sondern auch anwendbar für unterschiedliche Matrices – Soßen, Pulver, Pasten und Öle – sowie kosten- und zeitsparend sein. Zu Beginn wurde mit einigen Änderungen Methode [16] als Extraktionsmethode (E1) verwendet.

2.6.1 Aufreinigungsvortests

Parallel zu HPTLC-Trennungsversuch und –optimierung wurden einige Aufreinigungstests durchgeführt.

▪ Wirkung von Polyamid

Der Trennmechanismus von Polyamid beruht auf Wasserstoffbrücken zu den Amidgruppen der Polymermatrix sowie auf Ionen-, Dipol- und Elektronendonator/-akzeptor-Wechselwirkungen.

Abb. 37 zeigt die Trennung von einer Gewürzmischung (P1, E1) und einer Soße (P2, E1) mit Isohexan (FM 15) und n-Hexan/MEK (FM 9). Da für die Gewürzmischung keine Trennung erreicht wurde, wurden andere Versuche auf Polyamidschicht unterlassen und, aus dem gleichen Grund, Versuche mit Polyamidmaterial.

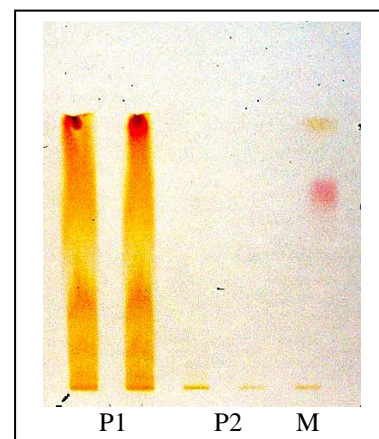


Abb. 37: Proben (P1, P2) und Standardmix (M)

▪ Wirkung von Silbernitrat und Antimon(III)-chlorid

Silbernitrat und Antimon(III)-chlorid sind bekannt für ihre Fähigkeit mit Fettsäuren, Mono-/Di-/Triacylglyceriden, Phospholipiden, Glycolipiden etc. und Carotinoiden Komplexe zu bilden.

Abb. 38 zeigt die erhaltenen Chromatogramme der Gewürzmischung (P1, E1) im Vergleich mit Sudanrot I und III mit FM 9 auf HPTLC-Alufolien Kieselgel 60 imprägniert mit einer AgNO_3 - bzw. SbCl_3 -MeOH-Lösung.

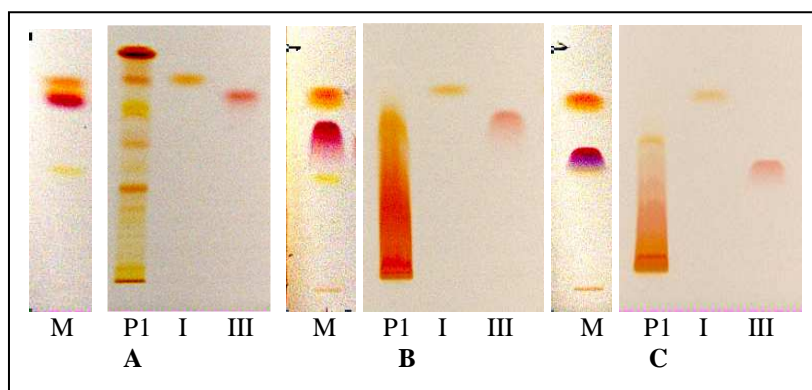


Abb. 38: Chromatogrammvergleich zwischen A) SbCl_3 0,2 %, B) AgNO_3 0,2 %, C) AgNO_3 3 %.

SbCl₃ zeigt keine relevante Wirkung, da zahlreiche Substanzen über die gesamte Laufstrecke verteilt sind. Silbernitrat ermöglicht es, die Matrix weit unten auf der Platte zu fixieren. Platten B und C zeigen, dass die Matrix mit einer höheren Konzentration an Silbernitrat besser zurückzuhalten ist. Beide Substanzen (SbCl₃ und AgNO₃) haben allerdings einen negativen Einfluss auf die Trennung.

2.6.2 Löslichkeit der Azofarbstoffe

Wie schon unter 1.4.2 beschrieben, verwenden die meisten Methoden ACN, Aceton oder eine Mischung von diesen mit MeOH oder EtOH als Extraktionsmittel.

Um die Extraktion unerwünschter fettlöslicher Substanzen zu minimieren, wurden Löslichkeitstests der Azofarbstoffe mit MeOH (siehe 4.3.5) durchgeführt. Die Ergebnisse weisen jedoch eine inakzeptable Streuung auf. Zudem schlug der Versuch, die ermittelten Löslichkeiten in einer zweiten Versuchsreihe zu überprüfen mit Ausnahme von Sudanorange G (Löslichkeit bei 22 °C \geq 10 mg/mL) fehl. Die Hauptgründe für diese nicht erfolgreichen Tests können an folgender Tatsache liegen: Trotz des Zentrifugierschritts (10 min bei 4000 rpm) trennten sich die zwei Phasen (unlösliche Substanz und die überstehende Lösung) nicht vollständig. Es gab noch Schwebstoffe in der überstehenden Lösungen.

Beim Herstellen der Stammlösungen erwies sich Aceton als das wesentlich geeignetere Lösemittel. Hierbei wurde parallel der Lösemittelbedarf empirisch ermittelt (siehe Stammlösungen der Tab. 22).

2.6.3 Höchstgrenze der Extraktionsmethode

Da keine weiteren Löslichkeitstests mit MeOH oder anderen Lösemitteln durchgeführt wurden, wurden nur die benötigten Volumina (siehe Stammlösungen der Tab. 22) in Aceton zur Vorbereitung der Stammlösungen verwendet, um eine vollständige Lösung zu erreichen und mit MeOH lediglich aufgefüllt. Es wurde beobachtet, dass für die weniger gut löslichen Farbstoffe (Sudanrot IV und B) maximal 1,8 mL Aceton/mg Farbstoff eingesetzt werden müssen. Dies bedeutet, dass bei Extraktion aus 1 g Probe mit 4 mL Aceton bei einem Bedarf von näherungsweise 2 mL Aceton pro mg Farbstoff 2 mg Farbstoff extrahiert werden können, oder anders gesagt 2000 ppm. Diese Höchstgrenze ist viel größer als die höchste bestimmte Konzentration im Lebensmitteln gemäß der RASFF-Meldungen.

2.6.4 Optimierung der Probenvorbereitung und weitere Aufreinigungstests mit Silbernitrat

Um die Trennung der Farbstoffe nicht zu stören, wurde nur 1 cm der Platte in eine 1,5%ige Lösung von AgNO₃ in MeOH getaucht (Abb. 39). Gemäß den Anmerkungen von 2.6.3 wurde von ACN auf MeOH gewechselt (E2). Mit dieser Extraktionsmethode beträgt die Nachweisgrenze der Azofarbstoffe in einem Gewürzpulver 20 ppm. Um diese weiter zu verringern wurde Extraktionsmethode 3 (E3), dann 4 (E4) getestet. Diese zwei Methoden konzentrieren die Probe auf das 10-fache (theoretische Nachweisgrenze von 2 ppm). Extraktionsmethode 4 erlaubt den Zentrifugations- und den Verdampfungsschritt auf einen Schritt zu reduzieren.

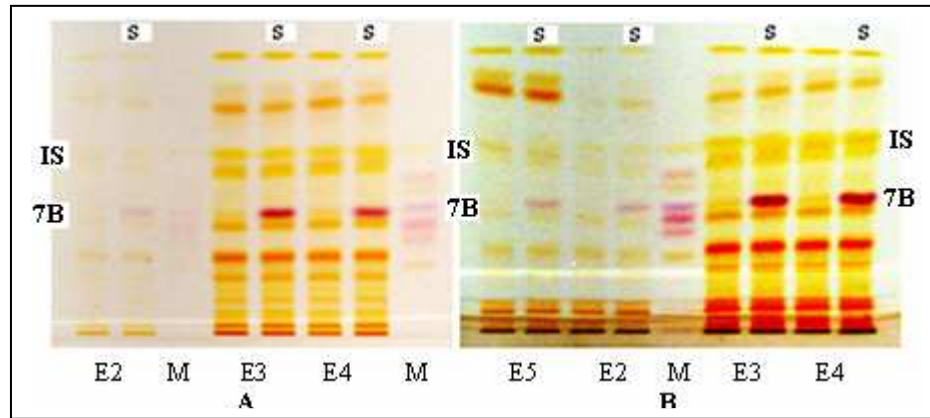


Abb. 39: Schichtvergleich (HPTLC-Nano-SIL-PAH) von P1 A) ohne AgNO_3 , B) in AgNO_3 getaucht (s: dotiert mit Sudanrot 7B, 200 ppm; Menge an IS in jeder Probe: 200 ppm)

Silbernitrat ermöglicht es einen Teil der Matrix im Startbereich zu fixieren. Die Aufreinigung ist allerdings nicht ausreichend, da der Trennungsbereich nicht sauber ist. Im Vergleich zu Extraktionsmethode 3 ist Extraktionsmethode 4 nicht besser: 2 Stunden wurden benötigt um das Lösemittel komplett abzdampfen, wohingegen E3 nur eine halbe Stunde (zentrifugieren und abrotieren) dauert.

Um die eventuelle Wirkung der Schicht auf die Komplexierungskapazität des Silbernitrats mit den verschiedenen Substanzen der Matrix zu untersuchen wurde eine HPTLC-Nano-SIL-PAH Platte mit einer HPTLC-Kieselgel 60 Platte verglichen. Diesmal wurde, um die Auftragungsmenge der Silbernitratlösung auf der Platte zu kontrollieren, eine 3 mm breite Bande oberhalb der Auftragungspunkte aufgetragen (Abb. 40). Zudem wurde eine neue Extraktionsmethode (E5) getestet. Im Vergleich zu Methode E2 reduziert sie Lösemittelvolumen und Probenmenge um die Hälfte.

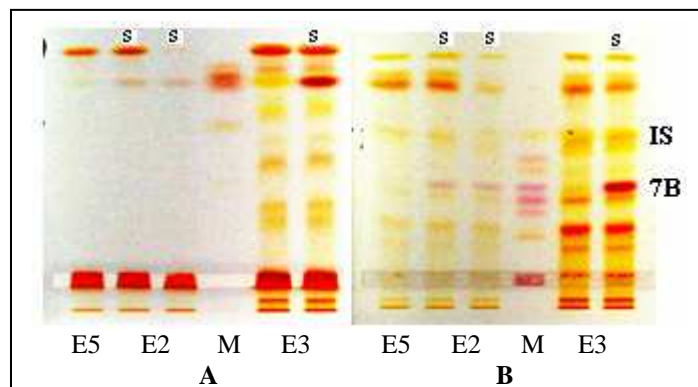


Abb. 40: Schichtvergleich von P1 mit A) Kieselgel, B) imprägnierte Coffein-Platte; Menge AgNO_3 : $190 \mu\text{g}/\text{cm}$ Band; (s: spiked mit Sudanrot 7B, 200 ppm, Menge an IS in jeder Probe: 200 ppm)

Abb. 40 belegt eine Wechselwirkung zwischen Coffein und Silbernitrat. Coffein reduziert stark die Wirkung des Silbernitrats auf die Matrix, zudem wurde in der Silbernitratzone ein Teil der Standards zurückgehalten. Der Versuch wurde mit den zwei höchsten Konzentrationen an Silbernitrat wiederholt (Abb. 41). Die maximale Wirkung des Silbernitrats auf die Matrix ist bei einer Konzentration von $385 \mu\text{g}$ Silbernitrat/cm Band (Platte A, Abb. 41) erreicht. Die zurückgehaltenen Verunreinigungen stammen von keinem einzelnen Farbstoff im Speziellen (Abb. 70).

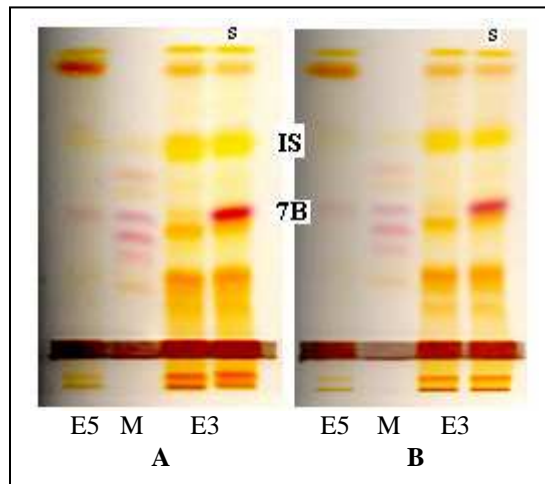


Abb. 41: Schichtvergleich von P1 auf HPTLC-Nano-SIL-PAH mit Silbernitratbande : A) 385 μg AgNO_3/cm Band, B) 770 μg AgNO_3/cm Band; (s: dotierte mit Sudanrot 7B, 200 ppm; Menge an IS in jeder Probe: 200 ppm)

Da Extraktionsmethode 3 für den Trennungsbereich ein Problem darstellt, wurde sie in den weiteren Versuchen nicht mehr angewandt. Die Nachweisgrenze der Extraktionsmethode 5 (E5) kann durch höhere Auftragungsvolumina auf 4 ppm gesenkt werden (Abb. 42). Extraktionsmethode 5 hat im Gegensatz zu Extraktionsmethode 3 einen weiteren Vorteil: die Vorbereitung der Proben ist schneller und einfacher, da sie direkt nach dem Extraktionsschritt eingesetzt werden können.

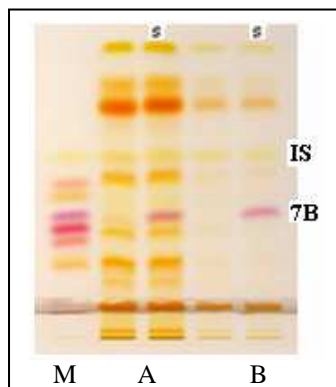


Abb. 42: Extraktionsmethode 5 ; Auftragungsmenge bzw. Nachweisgrenze : A) 10 μL , 4 ppm und B) 2 μL , 20 ppm; (s: dotiert mit Sudanrot 7B, 500 ppm; Menge an IS in jeder Probe: 500 ppm); Silbernitratbande: 385 μg AgNO_3/cm Band

2.6.5 Silbernitrat und Bestrahlung

Da der Trennungsbereich für eine Nachweisgrenze von 4 ppm in Chilipulver trotz der Silbernitratbande noch nicht sauber genug war, wurde die Aufreinigung durch Bestrahlung getestet.

▪ Azofarbstoffe vs. Matrix

Die Wirkung der Bestrahlung (600 W/m^2) wurde nach 5, 10, 15 und 25 Minuten anhand der normalisierten Peakfläche vermessen. Abb. 44 zeigt die Wirkung der Strahlung auf den Trennungsbereich der zwei dotierten Proben. Der Effekt wird die $2 \mu\text{L}$ -Auftragung bereits nach 5 Minuten Bestrahlung maximal, wie die saubere Basislinie zeigt. Bei der $10 \mu\text{L}$ -Auftragung ist der beobachtet Effekt nicht zufriedenstellend, wird jedoch bei längerer Bestrahlung nicht besser. Die Strahlung hat auf Sudanrot 7B und den internen Standard nach 5 Minuten nur eine limitierte Wirkung. Abb. 43 zeigt den Einfluss der Strahlung auf die Peakfläche der Standards bis 25 min

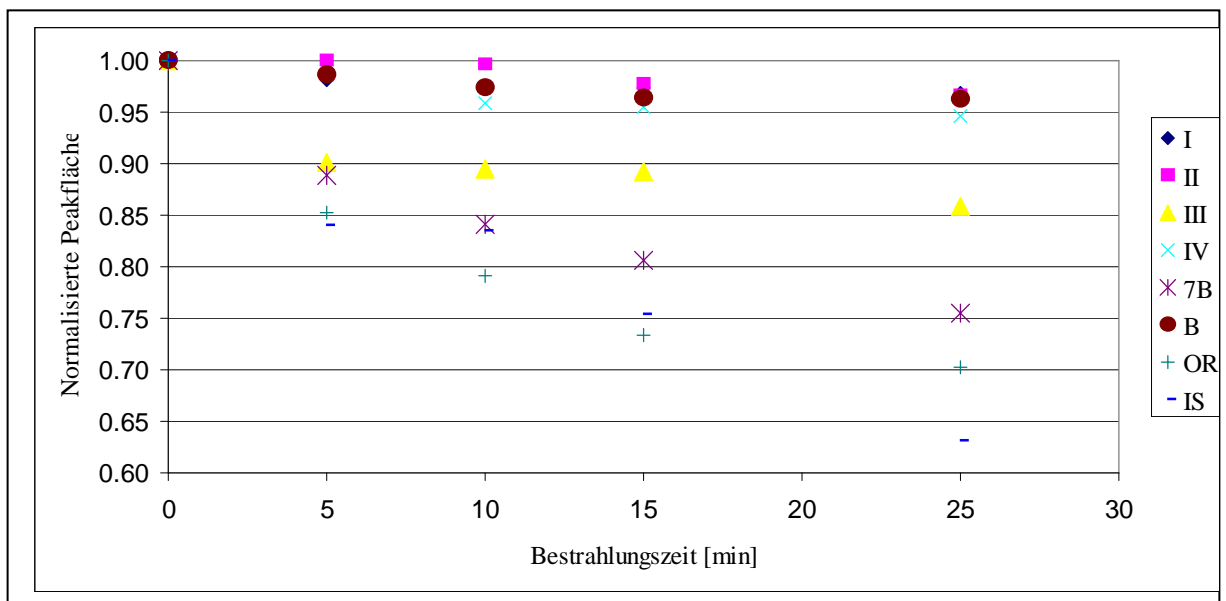


Abb. 43: Verhalten der Farbstoffe bei Bestrahlung (Tab. 45)

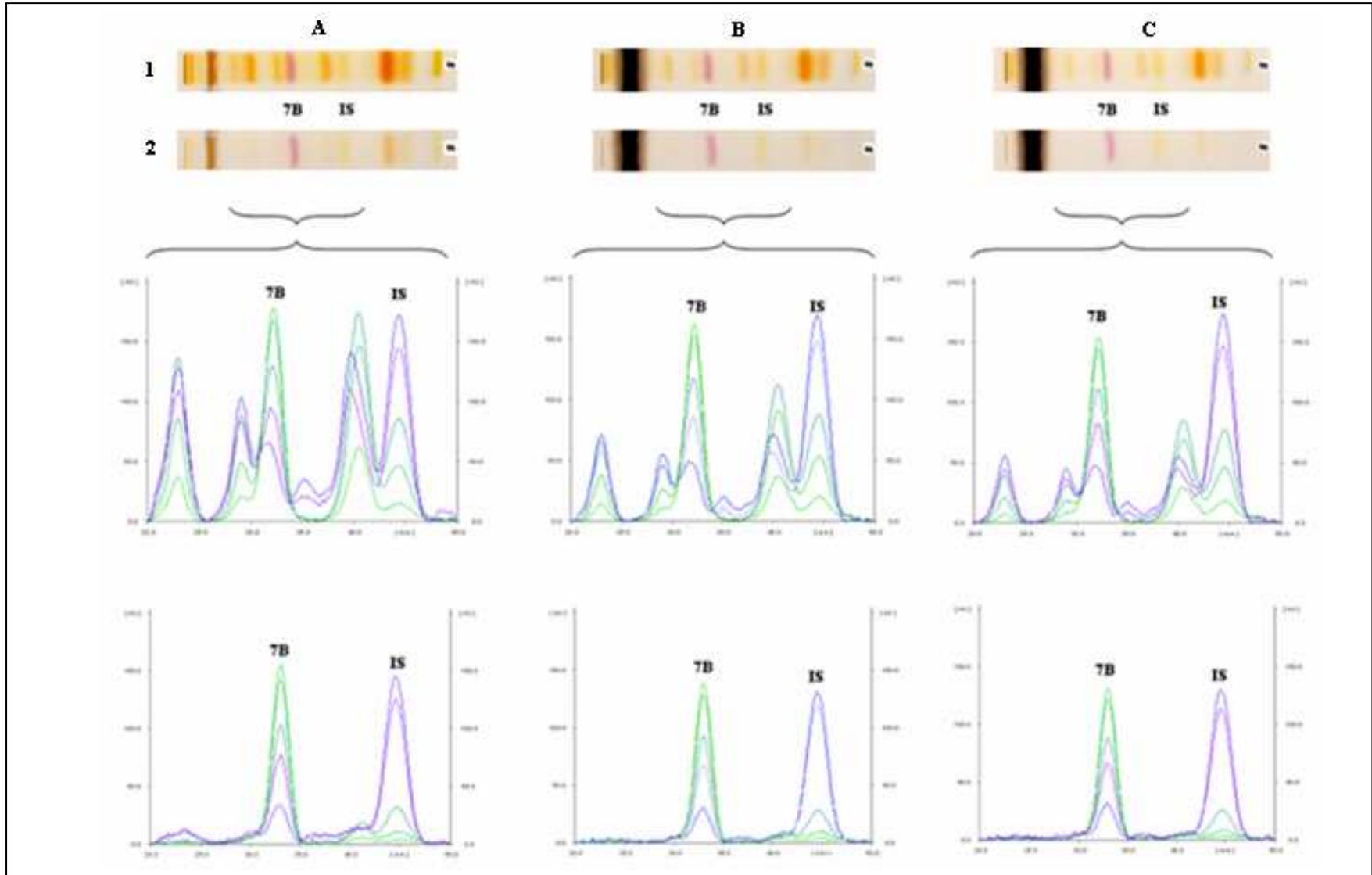


Abb. 44: Chromatogrammvergleich (alle Wellenlängen) zwischen den zwei dotierten Proben (Sudanrot 7B, 500 ppm; Menge an IS in jeder Probe: 500 ppm): Auftragungsmenge: 2 (1) und 10 (2) µL; A) ohne Bestrahlung, B) nach 5 min Bestrahlung, C) nach 10 min Bestrahlung ; Silbernitratbande: 385 µg AgNO₃/cm Band (originale Platte ist in Abb. 70 und 71 gegeben).

▪ **Bestrahlung vs. Silbernitrat**

Die Wirkung von Silbernitrat mit und ohne Bestrahlung wurde gegen alleinige Bestrahlung (5 und 10 min) auf einer einzelnen Platte verglichen (Abb. 72-73).

Parallel wurden auf derselben Platte auch die Auftragszeit und -menge des Silbernitratbands optimiert. Die Auftragung des Silbernitrats wie unter 2.6.5 beschrieben war zu langsam: 2,8 min/cm Band für eine Endkonzentration von 385 µg Silbernitrat/cm Band (Auftragungsgeschwindigkeit: 500 nL/s), somit für ein 19 cm Band (10x20 cm Platte) 53 min. Das Problem liegt an der Löslichkeit des Silbernitrats in MeOH (maximal 1,5 %). So wurde versucht die Auftragszeit durch eine höhere Silbernitratkonzentration (5 %) in einem MeOH/Wasser-Gemisch (50/50) (v/v) zu reduzieren. MeOH war am Anfang gewählt worden um die Diffusion der Silbernitratlösung auf der Platte zu minimieren. Die Menge des Silbernitrats wurde auch anhand zweier unterschiedlicher Konzentrationen (750 und 1500 µg AgNO₃/cm Band) optimiert.

Die Auftragszeit betrug auf dieser Platte (siehe Abb. 45) für Silbernitratmengen von 385, 750 und 1500 µg AgNO₃/cm Band 50, 25 und 13 s/cm Band (Auftragungsgeschwindigkeit: 500 nL/s).

Abb. 45 zeigt, dass die Aufreinigung mit einer Konzentration von 750 µg AgNO₃/cm Band maximal ist und dass das Silbernitratband einen Einfluss auf die Geometrie der Spots hat: je konzentrierter das Silbernitratband ist, desto weniger scharf sind die Spots und umso schlechter ist die Auflösung der Trennung. Dennoch bringt die Auftragung eines Silbernitratbands im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung keinen relevanten Vorteil, sondern eher Nachteile: sowohl die Kosten als auch der Zeitaufwand der Analyse wurden bei der Verwendung von Silbernitrat höher. Der Bestrahlungseffekt ist bereits nach 5 min erreicht. Daher wurde Aufreinigungsmethode 1B (siehe Abb. 45) gewählt.

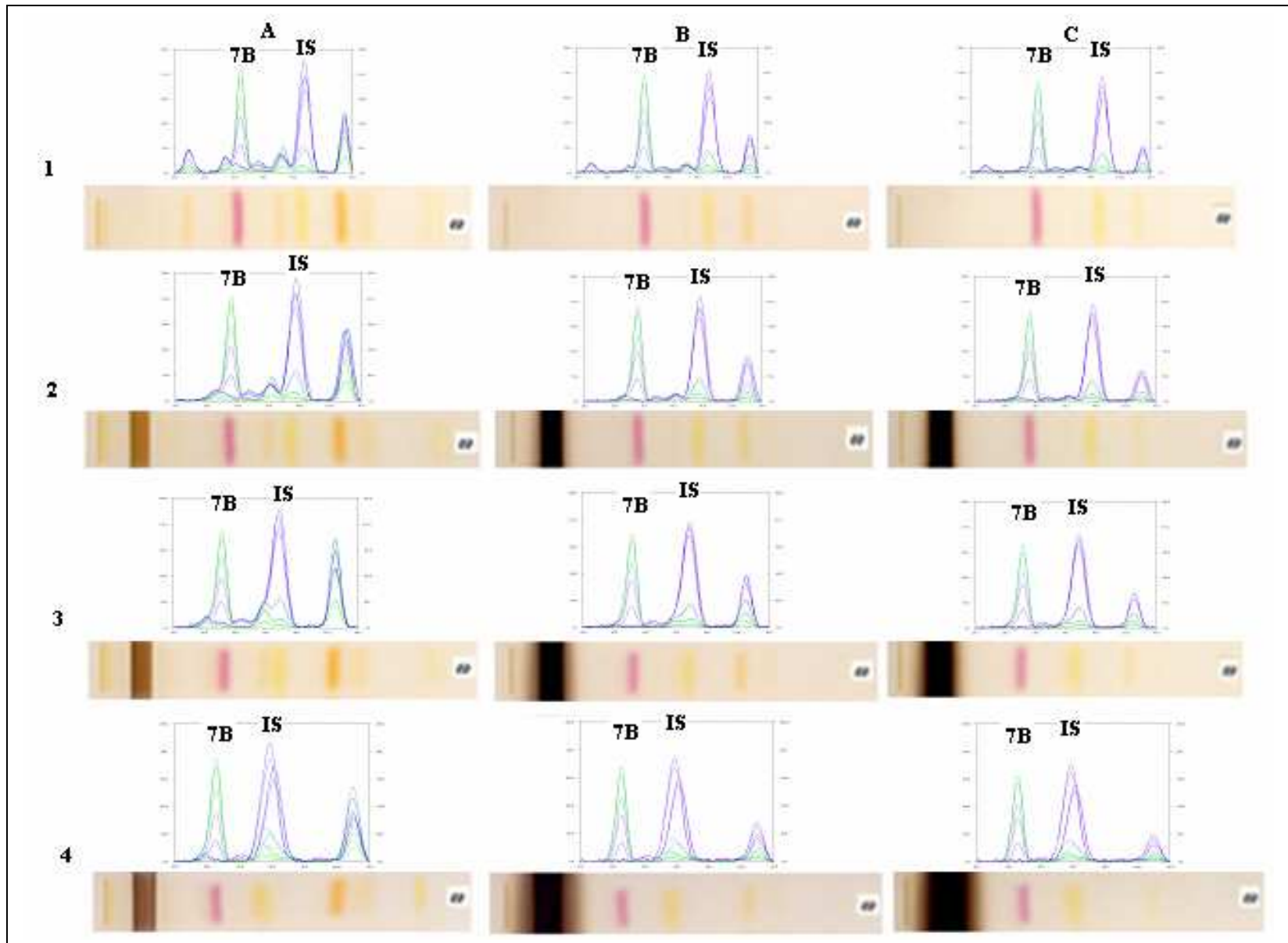


Abb. 45: Chromatogrammvergleich (alle Wellenlängen) zwischen der dotierten Probe (P3, E5, Sudanrot 7B, 500 ppm, Auftragsmenge: 4 µL, Nachweisgrenze: 20 ppm): ohne Silbernitratband (1) und mit Silbernitratband (375 (2), 750 (3) und 1500 (4) µg AgNO₃/cm Band; ohne Bestrahlung (A), nach 5 min Strahlung (B), nach 10 min Bestrahlung (C) (Originale Platte ist in Abb. 72 und 73, gegeben).

2.6.6 Erweiterung der Tests auf Soße, Paste und Öl

Extraktionsmethode 5 wurde für Paste und Öl mit folgender Änderung durchgeführt: die Probenmenge wurde auf 2 g erhöht (E6). Für die Soße wurden 10 g abgewogen und folgender Schritt eingeführt (E7): das in der Soße enthaltene Wasser wurde mittels ACN abgedampft, da ACN mit Wasser ein Azeotrop bildet.

Um die Nachweisgrenze in Lebensmitteln in Gewürzpulver auf 10 ppm zu senken, wurde bei den nächsten Tests 4 μL aufgetragen. Aufgrund der höheren Einwaage beträgt die Nachweisgrenze in Öl und Paste 5 ppm. Diese ist noch niedriger in Soße (1 ppm). Um die Bestrahlungszeit zu reduzieren wurden auch Tests mit 4 und 2 min Bestrahlungszeit durchgeführt.

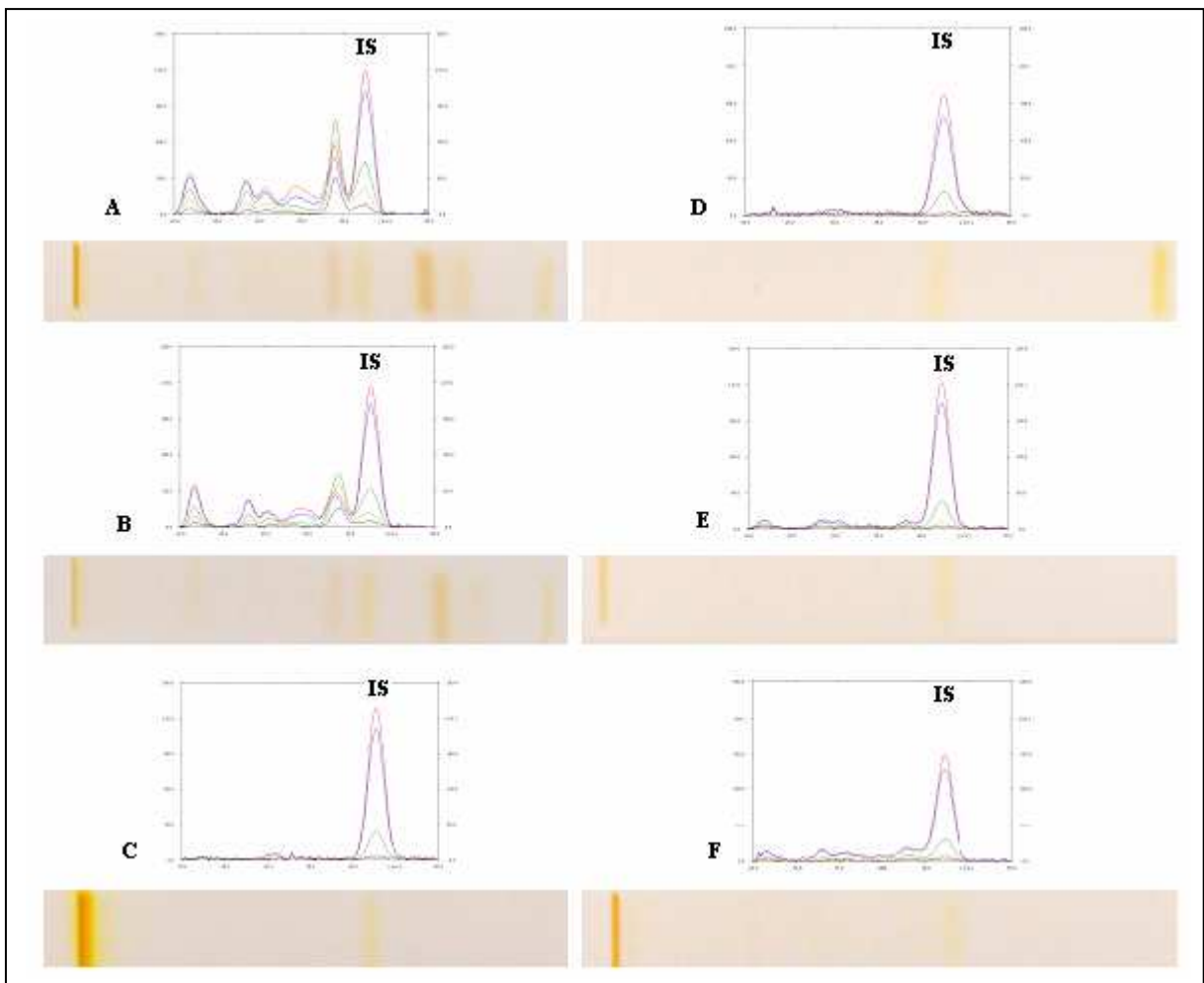


Abb. 46: Nach 4 min Bestrahlung: Paprikapulver (P4) (A) und Chilipulver (P3) (B); ohne Bestrahlung: Kurkumapulver (P5) (C), Palmöl (P6) (D), Currypaste (P7) (E) und Chilisoße (P8) (D).

Abb. 46 zeigt, dass keine Bestrahlung für Kurkumapulver, Soße, Öl und Paste benötigt wird. Die maximale Wirkung der Bestrahlung ist für Chili- und Paprikapulver nach 4 min erreicht.

Ein Beispiel für den Effekt der vierminütigen Bestrahlung auf den Matrix-Hintergrund im Chromatogramm eines nicht veränderten und eines dotierten (500 ppm) Chilipulver-Extraktes ist in Abb. 47 gegeben.

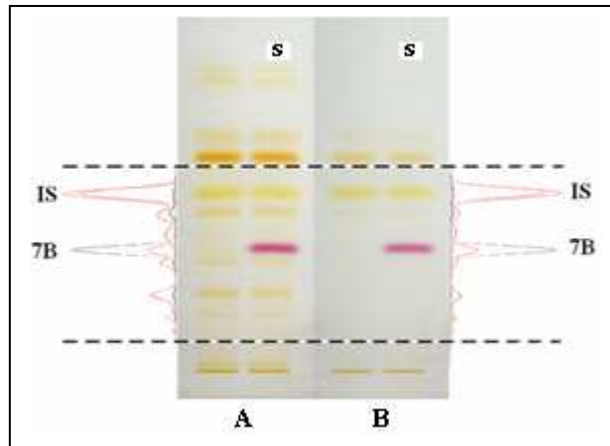


Abb. 47: Effekt der Bestrahlung auf die Matrix; Trennungsbereich: zwischen Strichlinien; (s: dotiert mit Sudanrot 7B, 500 ppm; Menge an IS in jeder Probe: 500 ppm)

2.7 Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde für Sudanrot I, III und 7B und Sudanorange G bei zwei Konzentrationen in Chilisoße (P8), Currypaste (P7), Palmöl (P6) und Gewürzen (Chili- (P3), Paprika- (P4) und Kurkumapulver (P5)) (Tab. 9) bestimmt und zweimal wiederholt.

Tab. 9 : Mittelwertwiederfindung (n = 2) von den dotierten Farbstoffen; Fettgedruckt: Beispiel der Rechnung ist für Sudanrot III in Kurkumapulver gegeben (siehe 4.3.4 und 6.7).

	Chilipulver		Paprika-pulver		Kurkuma-pulver		Chilisoße		Currypaste		Palmöl	
	300	50	300	50	300	50	30	5	150	25	150	25
Zudo-tierte Konz. [ppm]												
Farb-stoffe	Mittelwertwiederfindung [%]											
I	97,8	93,4	94,9	120,1	99,0	112,4	97,24	85,1	95,4	97,5	93,6	84,6
III	99,7	82,7	95,2	97,7	105,7	113,6	100,1	75,6	92,3	89,3	82,7	76,6
7B	103,8	110,2	99,6	111,8	105,9	120,4	99,6	78,9	93,5	92,5	83,7	73,0
OR	103,7	139,5	89,6	120,3	96,9	109,5	115,7	110,2	100,5	120,9	120,0	109,3

2.8 Schnelle Screeningmethode durch antiparallele Entwicklung

Die antiparallele Entwicklung wurde in der horizontalen Entwicklungskammer durchgeführt. Die Proben wurden 1 mm vom Plattenrand entfernt aufgetragen, um die Höhe der Laufstrecke zu maximieren (5 cm). Die Trennung ist allerdings nicht ausreichend für eine Quantifizierung. Die Methode kann trotzdem zum schnellen Screening verwendet werden. Bis zu 38 Proben können auf derselben Platte aufgetragen und gleichzeitig in 5 Minuten entwickelt werden (Abb. 48).

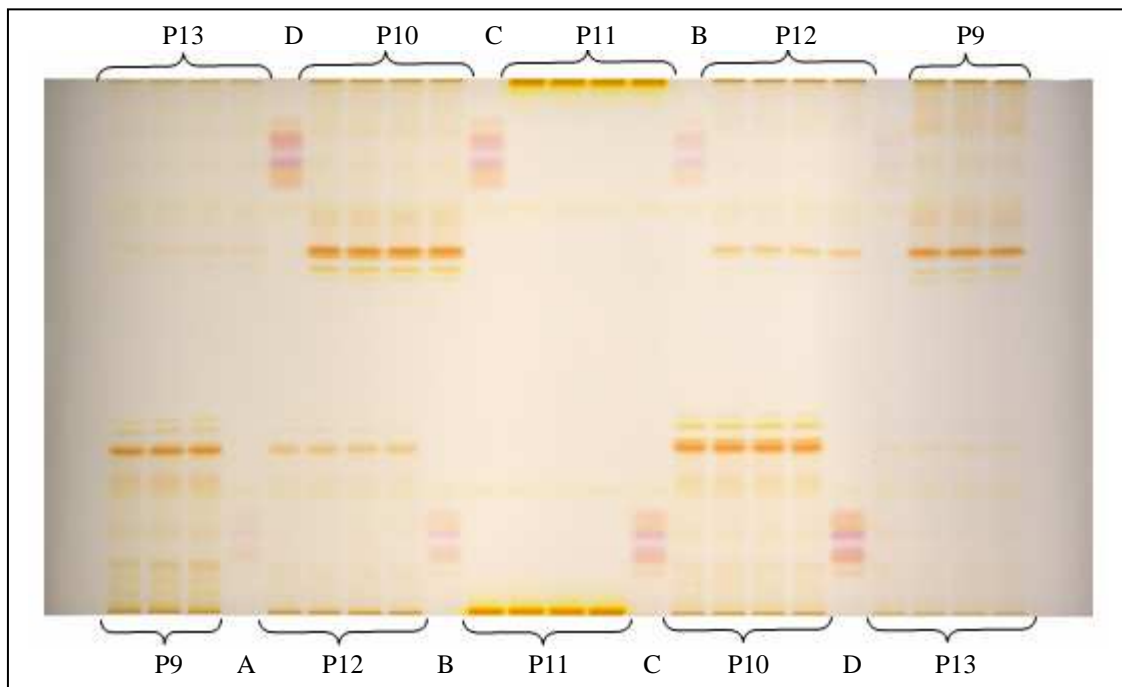


Abb. 48: Chromatogramm der antiparallelen Entwicklung (46 Banden) nach 4 min Bestrahlung von Paprika- (P9) und Kurkumapulver (P11), Cayennepfeffer (P10) und Gewürzmischung (P12 und P13) (alle Proben mit IS dotiert); Standardkonzentrationen: 10 (A), 20 (B), 40 (C) und 60 (D) ng/Spot.

Anschliessend können verdächtige Proben mittels der quantitativen HPTLC-Methode (2.9) untersucht werden.

2.9 Optimierte HPTLC-Entwicklung zur quantitativen Bestimmung

Bis zu 19 Proben gleichzeitig (Abb. 49) können durch die entwickelte HPTLC-Methode dieser Arbeit quantitativ bestimmt werden.

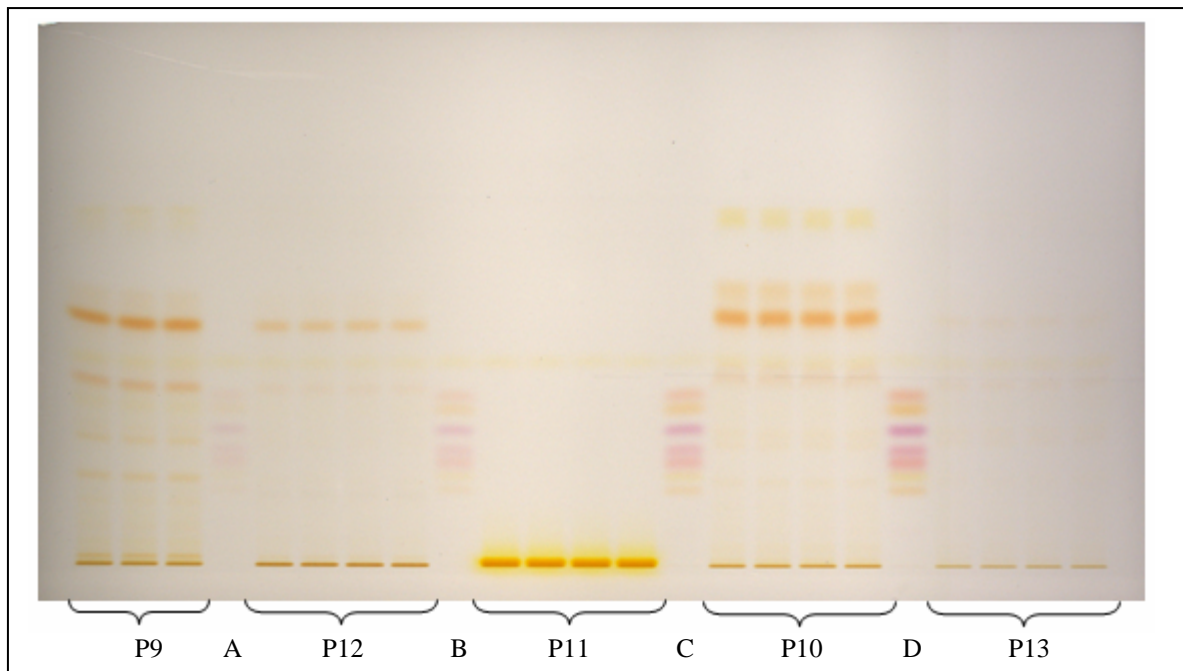


Abb. 49: Chromatogramm der 23 Banden nach 4 min Bestrahlung von Paprika- (P9) und Kurkumapulver (P11), Cayennepfeffer (P10) und Gewürzmischung (P12 und P13) (alle Proben mit IS dotiert); Standardkonzentrationen: 10 (A), 20 (B), 40 (C) und 60 (D) ng/Spot.

2.10 Bestätigung positiver Befunde

Zwei unterschiedliche Methoden wurden verwendet, um einen positiven Befund in einer Probe zu bestätigen: der Vergleich von Spektren durch eine selbst erstellte Spektrenbibliothek und, in Zweifelsfällen, die Bestimmung der genauen Masse durch Massenspektrometrie.

2.10.1 Spektrenbibliothek

Die Spektrenbibliothek wurde basierend auf 3 Konzentrationen (20, 80 und 200 ng/Spot) pro Azofarbstoff aufgebaut. Abb. 48 zeigt einen Spektrenvergleich von Sudanrot 7B der Abb. 47 (Abb. 50).

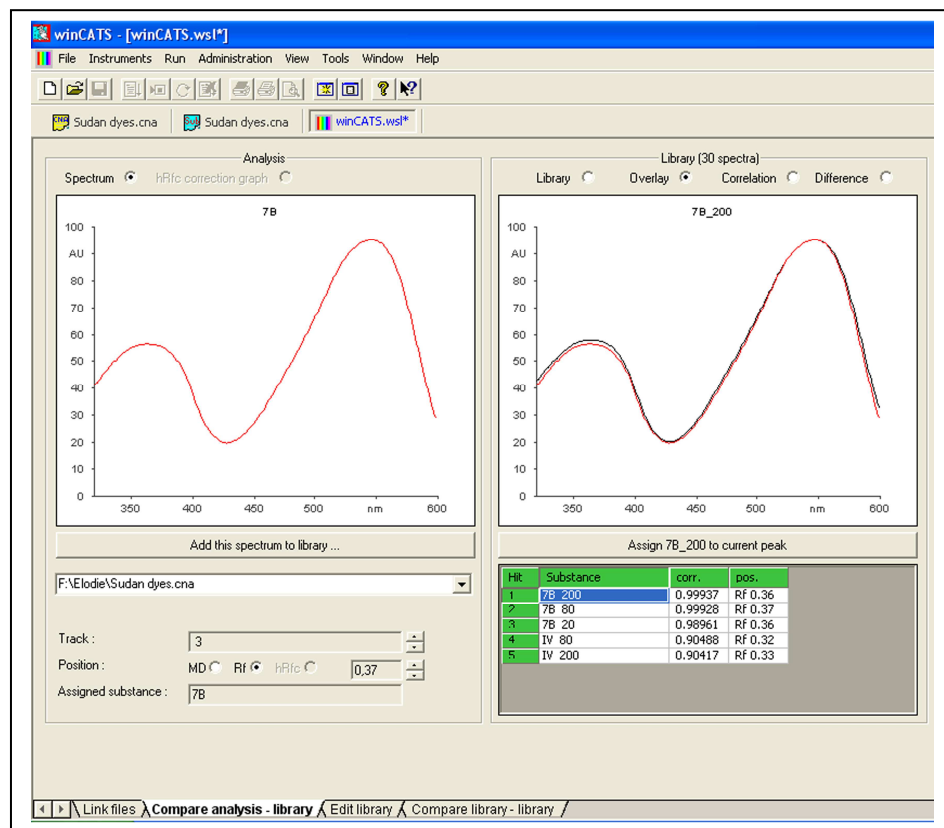


Abb. 50: Spektrenvergleich von Sudanrot 7B (Korrelation: 0,9994).

2.10.2 MS-Spektren

▪ Probenextraktion von der Platte

Die Extraktion wurde mittels des TLC-MS-Interfaces (CAMAG, Schweiz) durchgeführt. Abb. 51 zeigt eine verbesserte Extraktion mit ovalem Elutionskopf.

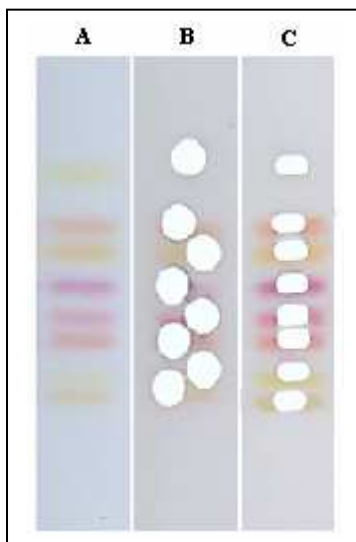


Abb. 51: Vergleich der Trennung (A) mit rundem (B) und ovalem (C) Elutionskopf

▪ HPTLC-HPLC-MS-Kopplung

Eine HPTLC-HPLC-MS-Kopplung wurde zum ersten Mal getestet, da die Azofarbstoffe bei HPTLC-MS-Kopplung nicht vom Coffein getrennt wurden. Um eine zusätzliche Trennung zu erreichen, wurde diese mittels einer monolithischen C18-Säule (Eluent: MeOH/Ameisensäure 90:10 (v/v)) durchgeführt. Sudanrot I, II, IV, B, 7B, Pararot und der interne Standard konnten vom Coffein getrennt werden, wohingegen Sudanorange G und Sudanrot III mit dem Coffein coeluierten. Die Retentionszeiten sind in Tab. 10 gegeben. Beispielhaft sind ein Chromatogramm und der Totalionenstrom in Abb. 77 gegeben.

Tab. 10 : Retentionszeiten der untersuchten Farbstoffe auf der C18-Säule

Substanz	Retentionszeit [min]
Fließmittel : MeOH/Ameisensäure 90:10 (v/v)	
Sudanrot I	9,9
Sudanrot II	17,0
Sudanrot IV	10,9
Sudanrot B	12,1
Sudanorange G	5,4
Pararot	8,8
IS	11,0
Coffein	4,5
Fließmittel : MeOH/Ameisensäure 90:10 (v/v)	
Sudanorange G	7,5
Coffein	3,4

Die Massengenauigkeit kann durch die Verwendung der MassWorks-Software berechnet werden (Abb. 52).

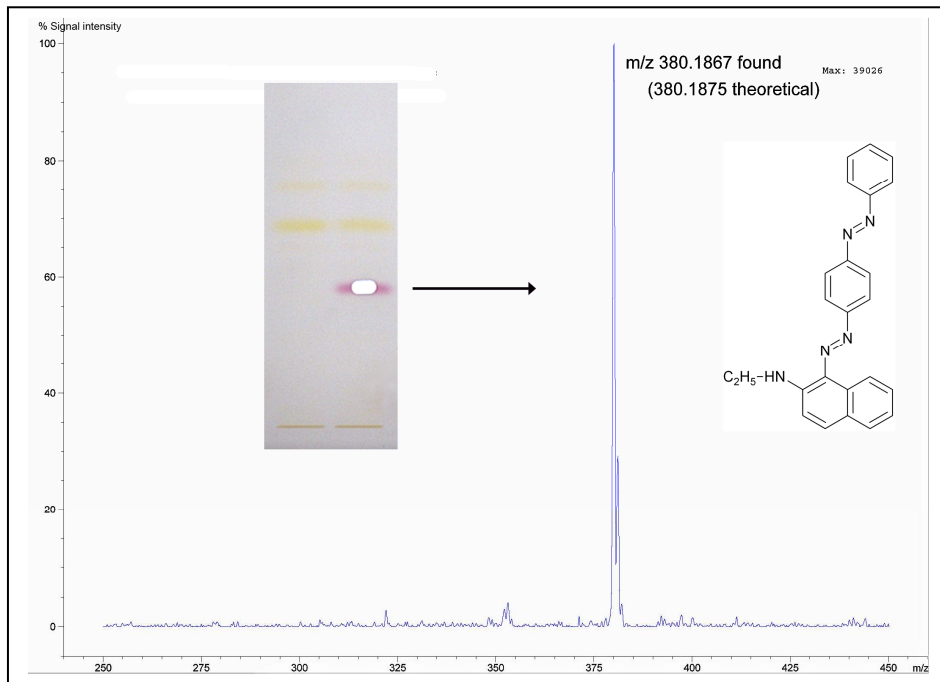


Abb. 52: Massenspektrum von Sudanrot 7B der Abb. 47 mit der „exakten“ Masse durch MassWorks-Software

Wie schon beschrieben sind Sudanrot B und IV mittels Planarchromatographie schwer zu trennen und mittels MS-Spektrum nicht zu unterscheiden. Die Retentionszeiten dieser zwei Farbstoffe sind allerdings auf der C18-Säule unterschiedlich. Weitere Untersuchungen könnten darauf abzielen, die Azofarbstoffe erst mittels Planarchromatographie von der Matrix zu trennen und dann die Farbstoffe mit einem anderen Fließmittel zu konzentrieren. So würden alle Farbstoffe gleichzeitig als ein einziger Spot extrahiert, auf der C18-Säule getrennt und ihre Massenspektren aufgenommen werden.

2.11 Kosten- und Zeitvergleich HPLC- vs. HPTLC-Methode

Ein Kosten- und Zeitvergleich mit einer kürzlich veröffentlichten HPLC-Methode [37] zeigt, dass die entwickelte HPTLC-Methode dieser Arbeit zweimal billiger und 25 mal schneller als der HPLC-Methode ist. Diese Parameter können für die Screeningmethode um Faktor 2 und 3 (Kosten bzw. Zeit) gesteigert werden. Dieser Vergleich zeigt die Effektivität (Kosten, Zeit, Umweltfreundlichkeit) der HPTLC-Methode in der Bestimmung von verbotenen Azofarbstoffen in Lebensmitteln (Tab. 11).

Tab. 11 : Kosten- und Zeitvergleich HPLC vs. HPTLC-Methode

Untersuchte Probe	Verbotene Azofarbstoffe		
	Lebensmittel		
Lebensmittel	Gewürzpulver, Gewürzmischungen, Soßen und Pasten		
Chromatographische Methode	HPLC	HPTLC	
Probenvorbereitung	GPC	- vereinfacht	
Betriebskosten/Lauf (Euro)		Quantitative Methode	Screeningmethode
Mobile Phase ⁽¹⁾	0,248	0,018	0,005
Stationäre Phase	0,417 ⁽²⁾	0,303 ⁽³⁾	0,152 ⁽⁴⁾
Abfallbeseitigung ⁽⁵⁾	0,008	<<0,001	<<0,001
Betrag (Euro)	0,673	0,321	0,158
Billiger um Faktor		2,1	4,3
Totalzeit/Lauf [min]			
Auftragung/Einspritzung	-	0,43	0,33
Chromatographie	45	1,04 ⁽⁵⁾	0,22
Auswertung	-	0,30	0,04 ⁽⁶⁾
Totalzeit [min]	45	1,78	0,59
Schneller um Faktor		25,2	76,7
Arbeitsaufwand/Lauf [min]	-	0,1	0,1

⁽¹⁾ Für den Kauf von 4 x 2,5 L (Angebotspaket) von Lösemittel (chromatography grade) (Kosten/L) gerechnet: Aceton 27 €, ACN 37 €, Isohexan 37 €, MeOH 20 € und MEK 22 €; Fließmittelgeschwindigkeit (mL/min): 0,3

⁽²⁾ Kosten von Säule und Vorsäule für 1000 Läufe/Säule mit Vorsäulenwechsel alle 200 Läufe: 290 € + 125 € gerechnet

⁽³⁾ Für 23 Proben (siehe Abb. 49)

⁽⁴⁾ Für 46 Proben (siehe Abb. 48)

⁽⁵⁾ 0,6 € pro kg halogenfreiem Lösemittel

⁽⁶⁾ Nur digitale Dokumentation

3. Zusammenfassung

Sudanrot I wurde im Mai 2003 in Frankreich in Cayennepfeffer nachgewiesen. Dies war die erste Warnung an die EU-Mitgliedstaaten durch das Schnellwarnsystem im Lebens- und Futtermittelbereich (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF). Danach wurden zunehmend Produkte (Gewürze, Soßen, Pasten und Palmöle) mit unerlaubt zugesetzten fettlöslichen synthetischen Azofarbstoffen gefunden wie z.B. Sudanrot IV, Sudanorange G und Pararot. Diese werden normalerweise zur Färbung zahlreicher Produkte wie Wachs, Schuhcreme, Poliermittel usw. verwendet. Die internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer, IARC) hat Sudanrot I-IV und Sudanrot 7B als Karzinogene der Kategorie 3 eingestuft. Deshalb ist ihre Anwendung als Zusatzstoff verboten. Im Jahr 2008 und im ersten Halbjahr 2009 wurden allerdings nicht weniger als 60 Fälle im RASFF dokumentiert.

Da nur wenige analytische Methoden es ermöglichen, mehr als die vier Farbstoffe Sudanrot I-IV in Gewürzen nachzuweisen, wurde eine schnelle und kostengünstige HPTLC-Methode zum Nachweis von Sudanrot I-IV, B, 7B, Sudanorange G und Pararot (selbst synthetisiert) in Gewürzen, Gewürzmischungen, Pasten, Soßen und Palmölen entwickelt. Zur Korrektur der Probenaufbereitung wurde ein interner Standard (4-Dimethylaminoazobenzol) für die Quantifizierung verwendet.

Die Trennung wurde auf unterschiedlichen stationären Phasen versucht: normale und alkylierte Aminophasen, Aluminiumoxid, irreguläres und sphärisches (LiChrospher®) Kieselgel sowie Coffein-imprägnierte Kieselgel Platten. Dabei wurden auch unterschiedliche mobile Phasen in verschiedenen Entwicklungskammern (Doppeltrog, Horizontal- und automatische Kammer (ADC2)) bei verschiedenen Luftfeuchtigkeiten getestet. Wie schon bemerkt, waren gemäß der gefundenen Literatur die zwei Isomere Sudanrot IV und B schwer zu trennen, auch auf RP-18-Schichten. Die beste Trennung konnte auf Coffein-imprägnierten HPTLC-Platten NANO-SIL-PAH bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 % erreicht werden (Fließmittel: Isohexan - Methylethylketon 5:1 (v/v)). Aus Gründen der Reproduzierbarkeit und zur Kontrolle der Luftfeuchtigkeit, wurde die Trennung in der automatischen Entwicklungskammer (ADC2) durchgeführt. Die densitometrische Detektion wurde, nach der Bestimmung des genauen Absorptionsmaximums jedes Farbstoffs durch Absorptionmessung via 5 Wellenlängen-Scan (390, 415, 500, 525 und 550 nm) und Spektrenaufnahme (320-600 nm) durchgeführt. Die Kalibration erfolgte durch eine polynomische bzw. lineare Regression entsprechend einem weiten (10-200 ng/Spot) bzw. engen (4-40 ng/Spot) Arbeitsbereich. Die Reproduzierbarkeit (n = 3) der Kalibrationskurven für den engen und weiten Bereich wird mit einem relativen Korrelationskoeffizienten $\geq 0,99878$ bzw. $\geq 0,99705$ und einer Standardabweichung $\leq 2,56$ % bzw. $\leq 5,69$ % beschrieben. Die LOD liegt für die untersuchten Farbstoffe im Bereich 1,7 – 3,2 ng/Spot.

Da versucht wurde, eine möglichst kosten- und zeitsparende Methode zu entwickeln, musste die Aufarbeitung möglichst kurz und einfach sein. Keine Aufreinigung wurde für Kurkumapulver, Öle, Pasten und Soßen benötigt, da die Basislinie schon frei von Matrixstörung war. Die Wirkung von Polyamid- und mit Silbernitrat oder Antimon(III)-chlorid imprägnierten Schichten wurde für Chilipulver getestet. Polyamid und Antimon(III)-chlorid hatten keinen besonderen Effekt auf die Matrix. Tests über die kombinierte und getrennte Wirkung einer 3 mm breiten Silbernitratbande auf Coffein-imprägnierten HPTLC-Platten und Bestrahlung unter UV-Licht (600 W/m^2) zeigen, dass nach

4 min Bestrahlung die Basislinie ausreichend sauber ist. Die Höchstgrenze der Extraktionsmethode ist 2000 ppm. Dies reicht aus, da sie viel höher als die bestimmte Konzentrationen in Lebensmitteln gemäß RASFF-Meldungen ist. Die Nachweisgrenzen (LOD) dieser Methode betragen für Gewürzpulver, Pasten, Öle und Soßen 10, 5, 5 und 1 ppm. Diejenigen von Kurkumapulver, Ölen, Pasten und Soßen können durch höhere Auftragungsvolumina weiter verringert werden. 10 ppm (Gewürzpulver) ist im Hinblick auf die zu erwartenden Zusätze zur gewünschten Farbkorrektur der Produkte ausreichend. Die Wiederfindung wurde für Sudanrot I, III, 7B und Sudanorange G bei zwei Konzentrationen in Chilisoße (30 und 5 ppm), Currypaste (150 und 25 ppm), Palmöl (150 und 25 ppm), Paprika-, Chili- und Kurkumapulver (300 und 50 ppm) bestimmt. Der Mittelwert der Wiederfindung ($n = 2$) liegen zwischen 75,6 % (Chilisoße dotiert mit 5 ppm Sudanrot III) und 139,5 % (Chilipulver dotiert mit 50 ppm Sudanorange G).

Parallel zur HPTLC-Methode zur Quantifizierung wurde eine schnelle Screeningmethode entwickelt. Bis zu 38 Proben können gleichzeitig mittels antiparalleler Entwicklung in einer horizontalen Entwicklungskammer untersucht werden. Verdächtige Proben können dann mit der beschriebenen HPTLC-Methode quantitativ bestimmt werden. Im Vergleich mit einer kürzlich veröffentlichten HPLC-Methode ist die quantitative bzw. Screening-HPTLC-Methode dieser Arbeit um den Faktor 2 bzw. 4 billiger und um den Faktor 25 bzw. 75 schneller.

Positive Befunde können durch Spektrenvergleich mit der selbst aufgebauten Spektrenbibliothek (3 Konzentrationen pro Azofarbstoff) abgesichert werden. Zur zweifelsfreien Bestätigung positiver Funde können Massenspektren von verdächtigen Zonen über das TLC-Interface aufgenommen werden. Die online HPTLC-HPLC-MS-Kopplung wurde zum ersten Mal vorgestellt. Die monolithische C18-Säule ermöglicht dank einer zweiten Selektivitätsrichtung (C18-Säule vs. Kieselgelplatte) die Trennung von mitextrahiertem Coffein (Schichtimprägnierung) und den Azofarbstoffen. Die Methode sollte allerdings noch weiter optimiert werden, da z.B. Sudanrot III mit dem Coffein coeluiert. Die C18-Säule zeigte allerdings den Ansatz, Sudanrot IV und B zu trennen (unterschiedliche Retentionszeit), auch wenn kein Mix von beiden Farbstoffen gleichzeitig von der Platte extrahiert wurde. Es bleibt anzumerken, dass sämtliche Absicherungen - UV/VIS-Spektren, Massenspektren und ein zweites chromatographisches System anderer Selektivität - nur einen einzigen HPTLC-Lauf benötigen und das bei bis zu 19 Proben gleichzeitig.

4. Experimenteller Teil

4.1 Allgemeine Geräte- und Softwareparameter

HPTLC

▪ Software

winCATS – Planar Chromatography Manager (Version 1.4.2.8121)

Software für ATS 4, TLC Scanner 3, Reprostar 3, Digistore 2, ADC 2, CAMAG, Muttenz, Schweiz

▪ Auftragung

Automatic TLC Sampler (ATS 4)

Probenautomat, CAMAG, Muttenz, Schweiz

- Abstand vom unteren Plattenrand : 8 mm
- Auftragungsform : bandenförmig, 6, 7 und 8 mm
- Anzahl der Banden : variabel

▪ Entwicklung

Twin through Glass Chamber, 20x10 cm und 10x10 cm

Doppeltrogentwicklungskammer, CAMAG, Muttenz, Schweiz

Horizontal Developing Chamber, 10x10 und 10x20 cm

Horizontalentwicklungskammer, CAMAG, Muttenz, Schweiz

- Sättigungszeit : 15 min

HPTLC Vario System, 10x10 cm

System mit Plattenlinienfräser und verschiedenen Kammern für relative Luftfeuchtigkeits- und Fließmitteltests, CAMAG, Muttenz, Schweiz

- Sättigungszeit : 15 min

Automatic Developing Chamber (ADC 2)

Automatische Entwicklungskammer, CAMAG, Muttenz, Schweiz

- Gesättigte Luftfeuchtigkeitsmittel (relative Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 20 °C)
 - : Magnesiumchlorid (33 %)
 - Kaliumthiocyanat (47 %)
 - Kaliumcarbonat (43 %)
- Luftfeuchtigkeitskontrollzeit : 4 min
- Sättigungszeit : 10 min
- Trocknungszeit : 1 min
- Entwicklungsdistanz : 60 mm

▪ Dokumentation

Reprostar 3, Digistore 2

Dokumentationssystem mit Digitalkamera, CAMAG, Muttenz, Schweiz

- Belichtungsart : White T, White RT, 366 nm

TLC Scanner 3

Scanner für densitometrische Auswertung, CAMAG, Muttenz, Schweiz

Scanmodus :

- Messmodus : Absorption
- Messtyp : Remission
- Lichtquelle : Deuterium- und Wolframlampe
- Wellenlänge : 390, 415, 500, 525, 550 nm
- Detektor : Photomultiplier
- Spaltgröße : 5.00 x 0.20 mm, Micro
- Scan-Geschwindigkeit : 20 mm/s
- Datei-Resolution : 50 µm/Stepp
- Optimierungssystem : Resolution

Spektrummodus :

- Messmodus : Absorption
- Spalt-Grösse : 6.00 x 0.40 mm, Macro
- Datei-Resolution : 1 nm/Stepp
- Spektrum-Geschwindigkeit : 20 nm/s
- Optimierungssystem : Licht
- Referenzmodus : pro Platte (Stelle: X: 20,0 mm, Y: 50,0 mm)
- Spektrendokumentation : winCATS Bibliothek

▪ Sonstiges

Immersion Device III

Automatische Tauchkammer, CAMAG, Muttenz, Schweiz

- Verweilzeit : 0 s
- Tauchgeschwindigkeit : speed 1 cm/s

Diffusions-Entfärbe-Apparatur

Färbekammer benutzt als horizontale Tauchkammer, DESAGA, Heidelberg

Heraeus Suntest CPS+[®]

Bestrahlungseinheit

- Bestrahlungsstärke : 600 W/m²
- Bestrahlungszeit : variabel

MS▪ **Software****HP 1100 LC/MSD Chemstation, Rev. B. 02.01-SR 2**

Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland

▪ **Geräte****TLC-MS Interface**

CAMAG, Muttenz, Schweiz

API-Electrospray LC/MSD SL Agilent G1946D/G1956B

Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

- Detektion : Dioden-Array-Detektor, G1315B
- Entgaser : Degasser, G1322A
- Pumpe : Quarternäre Pumpe, G1311A
- Probenautomat : Autosampler, G1313A
- Säule : Chromolith Speed ROD, RP-18^e, 50-4,6 cm
TG52-3RP/1 Nr. 2976.03 (experimentelle Säule,
zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht käuflich)

4.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

4.2.1 Reagenzien

Tab. 12 : Reagenzien

Substanz	Qualität	Hersteller
Ameisensäure	Hochschullieferung	divers
Ammoniak	25%ig	divers
Antimon(III)-chlorid	Zur Analyse	Merck, Darmstadt (D)
Anilin	>99.5%	Fluka, München (D)
Azophenol	-	synthetisiert
<i>trans</i> -Azobenzol	≥ 96%	Merck, Darmstadt (D)
4-Bromphenacylbromid	Zur Synthese	Merck, Darmstadt (D)
Coffein	> 99%	Fluka, München (D)
2,4-Dimethylanilin	99%	Acros Organics, Nidderau (D)
Eisessig	Hochschullieferung, 99 – 100%	divers
Fast Garnet GBC base (4'-Amino-2,3'- dimethylazobenzol)	97%	Acros Organics, Nidderau (D)
Kaliumcarbonat	> 98%	Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)
Kaliumthiocyanat	reinst	Fluka, München (D)
Magnesiumchlorid- Hexahydrat	99,0%	Fluka, München (D)
β-Naphtol	zur Analyse	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid Plätzchen	zur Analyse	Merck, Darmstadt (D)
Natriumnitrit krist.	99%	Merck, Darmstadt (D)
4-Nitroanilin	99%	Acros Organics, Nidderau (D)
Pararot	-	synthetisiert
Pentafluorbenzylbromid	99%	Fluka, München (D)
Pentafluorphenacylbromid	97%	Fluka, München (D)
Phosphorpentoxid	Hochschullieferung	divers
Salzsäure	Hochschullieferung	divers
Silbernitrat	ultrapure grade	Acros Organics, Nidderau (D)
Sudanrot I	anal. Standard, > 96%	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Sudanrot II	anal. Standard, > 96%	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Sudanrot III	anal. Standard, > 96%	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Sudanrot IV	anal. Standard, > 96%	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Sudanrot 7B	anal. Standard, > 96%	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Sudanrot B	Referenzmaterial für Spuranalyse, 90.5%	Labor Dr. Ehrenstorfer- Schäfers, Augsburg (D)
Sudanorange G	anal. Standard, > 96%	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Triethylamin	Hochschullieferung	divers
Trifluoroessigsäure	Hochschullieferung	divers

4.2.2 Lösemittel

Tab. 13 : Lösemittel

Substanz	Qualität	Hersteller
Aceton	destilierte Hochschullieferung	divers
Acetonitril	destilierte Hochschullieferung	divers
Chloroform	Hochschullieferung	divers
Diethylether	p.a.: Reinheit : $\geq 99,8\%$	Merck, Darmstadt (D)
Dichlormethan	Hochschullieferung	divers
Ethanol	destilierte Hochschullieferung	divers
Ethylacetat	destilierte Hochschullieferung	divers
Ethylmethylketon	99 %	Acros Organics, Nidderau (D)
n-Hexan	destilierte Hochschullieferung	divers
Isohexan	Min. 85 %	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Methanol	destilierte Hochschullieferung, LC-MS Chromasol	divers
Methylisobutylketon	Hochschullieferung	divers
Tert-butylmethylether	Hochschullieferung	divers
Toluol	p.a., destilliert	Merck, Darmstadt (D)

4.2.3 Platten

Tab. 14 : Platten

Plattenart	Artikelnummer	Hersteller
HPTLC-Alufolien, 20x20 cm, Kieselgel 60	1.05547.0001	Merck, Darmstadt (D)
HPTLC-Platten, 20x10 cm, Kieselgel 60	1.05641.0001	Merck, Darmstadt (D)
HPTLC-Platten, 20x10 cm, NH ₂	1.12572.0001	Merck, Darmstadt (D)
HPTLC-Platten Nano-SIL-PAH, 20x10 cm	811 051	Macherey-Nagel, Oensingen (CH)
HPTLC-Platten LiChrospher, 20x10 cm	1.15445	Merck, Darmstadt (D)
DC-Alufolie, 20x20 cm, Aluminiumoxid 60 F ₂₅₄ , neutral	105550	Merck, Darmstadt (D)
DC-Polyesterfolien, 20x20 cm, Polyamid-6 F ₂₅₄	803023	Macherey-Nagel, Oensingen (CH)

4.3 Methodenparameter

4.3.1 HPTLC-Trennungversuch und –optimierung

- **Fließmittelversuch auf Kieselgel**

Tab. 15 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Tests auf Kieselgel)

Plattenart	HPTLC-Alufolie, 20x20 cm Kieselgel 60
Referenzsubstanzen	Sudanrot I-VI, B, 7B und Sudanorange G wurden einzeln (1,5 mg) in je 2 mL Aceton gelöst. Die Lösungen wurden auf 10 mL mit ACN aufgefüllt (Stammlösungen von je 150 µg/mL).
Fließmittel	FM 1: Dichlormethan
	FM 2: Hexan/Ethylacetat (4 :0,5, v/v)
	FM 3: Hexan/Aceton (5:0,25, v/v)
	FM 4: n-Hexan/Toluol/Essigsäure (2,5:2,5:0,05, v/v/v)
	FM 5: Toluol
	FM 6: TBME
	FM 7: Hexan/Essigsäure (6:0,2, v/v)
	FM 8: Chloroform
	FM 9: n-Hexan/MEK (5:0,25, v/v)
	FM 10: Toluol/MEK (5:0,25, v/v)
	FM 12: n-Hexan/MEK/Salzsäure (5:0,25:0,01, v/v/v)
	FM 13: n-Hexan/MEK/Trifluoressigsäure (5:0,25:0,01, v/v/v)
	FM 14: Toluol/MEK (5:0,5, v/v)
	FM 15: n-Hexan/MEK (5:1, v/v)
	Sättigungslösungen
ATS4	Auftragungsvolumen: 0,5 µL sowie 75 ng/Band (übersprüht) Bandenlänge: 6 mm Auf eine 90 mm-Bande wurden 40 µL von einem Mix (M), 100 µL jeder Stammlösungen (21 µg/mL), somit 95 ng/cm Band) aufgetragen und im dem HPTLC Vario System entwickelt.
Entwicklung	Doppeltrogkammer 10x10 cm HPTLC Vario System (Platte der Abb. 13) Laufstrecke: 7 cm

▪ Vergleich der Selektivität von verschiedenen Schichten

Kieselgel vs. Aminophase

Tab. 16 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Kieselgel vs. Aminophase)

Plattenart	HPTLC-Platten, 20x10 cm Kieselgel 60 HPTLC-Platten, 20x10 cm NH ₂
Fließmittel	FM 5: Toluol
	FM 11: n-Hexan/Diethylether/Ammoniaklösung (25 %) (5:0,25:0,01, v/v/v)
	FM 13: n-Hexan/MEK/Essigsäure (5:0,25:0,01, v/v/v)
Referenzsubstanzen	siehe Tab. 15 (ohne HPTLC Vario System)
ATS4	
Entwicklung	

Aluminiumoxidschichten

Tab. 17 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Tests auf Aluminiumoxidplatte)

Plattenart	DC-Alufolie, 20x20 cm, Aluminiumoxid 60 F ₂₅₄ , neutral
Fließmittel	FM 9: n-Hexan/MEK (5:0,25, v/v)
Referenzsubstanzen	siehe Tab. 16
ATS4	
Entwicklung	

Alkylierte Aminophasen

Tab. 18 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Tests auf modifizierte Aminophasen)

Plattenart	HPTLC-Platten, 20x10 cm, NH ₂
Fließmittel	FM 9: n-Hexan/MEK (5:0,25, v/v)
Referenzsubstanzen	siehe Tab. 16
ATS4	
Entwicklung	

Ansatz für eine 20x10 cm NH₂-Platte (Aminobelegung: 2,9 µmol/m², Oberfläche: 500 m²/g) :

Die HPTLC-NH₂-Platten wurden mindestens zwei Stunden über P₂O₅ im Exsikkator getrocknet. Für die Reaktionslösung wurden in einen 100-mL Kolben 50 mL ACN, 15 µL TEA und 24 µL PFBB bzw. 22 µL PFP und 20 mg 4-Bromphenacylbromid gegeben und mit ACN aufgefüllt (Abb.53). Die Lösung wurde mit der Aminoplatte in eine horizontale Tauchkammer (Färbekammer) gegeben (mit PE-Folie abgedeckt und von Licht geschützt) und über Nacht geschüttelt. Die Platte wurde dann im Abzug trocknen gelassen und vor der Chromatographie mit ACN vorgewaschen.

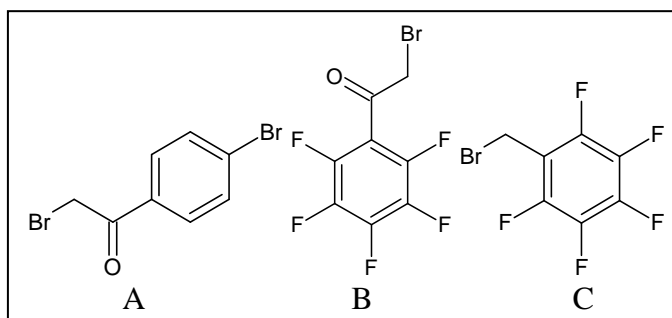


Abb. 53: Strukturformeln von A) 4-Bromphenacylbromid, B) PFP und D) PFBB

Der theoretische Mechanismus dieser Synthese direkt auf der Schicht wird in Abb. 54 veranschaulicht.

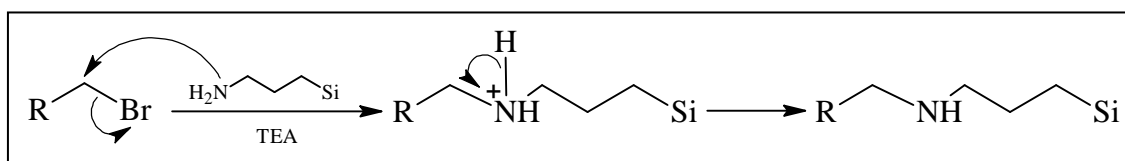


Abb. 54: Nukleophile Substitution (S_N2) zwischen der Aminogruppe der Schicht und den folgenden Substanzen: R steht für 4-Bromobenzaldehyd (4-Bromphenacylbromid), Pentafluorobenzaldehyd (PFBB) und Pentafluorobenzol (PFP). TEA wird benötigt, um das freigesetzte H⁺ abzufangen.

Coffein-impregnierete Kieselgel Platten

Tab. 19 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Coffein-impregnierete KG60-Platten)

Plattenart	HPTLC-Platten, 20x10 cm Kieselgel 60 HPTLC-Alufolie, 20x20 cm Kieselgel 60
Fließmittel	FM 5: Toluol FM 9: n-Hexan/MEK (5:0,25, v/v) FM 13: n-Hexan/MEK/Trifluoressigsäure (5:0,25:0,01, v/v/v) FM 14: Toluol/MEK (5:0,5, v/v) FM 15: n-Hexan/MEK (5:1, v/v) Für das HPTLC Vario System wurden 9 verschiedene n-Hexan/MEK-Lösungen hergestellt: 43, 33, 23, 17, 9 und 3,8 % MEK sowie 20, 15 und 12 % MEK.
Referenzsubstanzen	siehe Tab. 14
ATS4	
Entwicklung	

Ansatz für eine HPTLC-Platte, 20x10 cm Kieselgel 60

Die Platte wird für 20 Minuten in der automatischen Tauchkammer in eine Coffein-Lösung (1,7 g Coffein in 100 mL ACN) getaucht und 20 Minuten bei 120 °C getrocknet.

▪ Optimierung des Fließmittels auf mit Coffein imprägnierten Platten

Vergleich unterschiedlicher Schichten

Tab. 20 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Vergleich von Schichten)

Plattenart	HPTLC-Platten Nano-SIL-PAH, 20x10 cm HPTLC-Platten Kieselgel 60, 20x10 cm HPTLC-Platten LiChrospher®, 20x10 cm
Fließmittel	FM 15: n-Hexan/MEK (5:1, v/v)
Referenzsubstanzen	siehe Tab. 16
ATS4	
Entwicklung	

Ansatz für eine HPTLC-Platte, 20x10 cm Kieselgel 60 oder LiChrospher®

Die Platte wird für 20 Minuten in der automatischen Tauchkammer in eine Coffein-Lösung (1,7 g Coffein in 100 mL ACN) getaucht und 20 Minuten bei 120 °C getrocknet.

Reduzierung der Laufstrecke und Zugabe der Farbstoffe Pararot und des internen Standards

Tab. 21 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Zugabe von PR und IS)

Plattenart	HPTLC-Platten Nano-SIL-PAH, 20x10 cm
Fließmittel	siehe Tab. 20
Referenzsubstanzen	Sudanrot I-IV, 7B, B und Sudanorange G wurden wie beschrieben in Tab. 15 vorbereitet. Pararot und 4-Dimethylaminoazobenzol wurden einzeln (1,5 mg) in je 2 mL Aceton gelöst. Die Lösungen wurden auf 10 mL mit ACN aufgefüllt (Stammlösungen von je 150 µg/mL).
ATS4	siehe Tab. 16
Entwicklung	Doppeltrogkammer 10x10 cm Laufstrecke: 7 cm, dann 6 cm

Einfluss der Luftfeuchtigkeit**Tab. 22** : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Effekt der Luftfeuchtigkeit)

Plattenart	siehe Tab. 21
Fließmittel	
Referenzsubstanzen	siehe Tab. 21 (Abb. 23) Sudanrot I, II, B, Sudanorange G und 4-Dimethylaminoazobenzol (IS) wurden einzeln (10 mg) in je 5 mL Aceton gelöst, Sudanrot III, IV, 7B und Pararot in je 15 mL. Die Lösungen wurden auf 20 mL mit MeOH aufgefüllt (Stammlösungen von je 0.5 mg/mL). Für die Standardgemischlösung wurden je 200 µL der entsprechenden Stammlösungen gemischt und mit Methanol auf 10 mL aufgefüllt (M, Farbstoff je 10 ng/µL). Die interne Standardlösung zum Übersprühen wurde entsprechend 1:50 verdünnt. (Abb. 24-25)
Salzlösungen	Für jedes Salz (MgCl ₂ ·6 H ₂ O, KSCN und K ₂ CO ₃) wurde eine gesättigte 800 mL-Wasserlösung vorbereitet.
ATS4	Auftragsvolumen: 2 µL, sowie 20 ng/Band, von der Standardgemischlösung und Standardlösung (übersprüht) Bandenlänge: 6 (Abb. 23-24), dann 8 mm (Abb. 25)
Entwicklung	Doppeltrogkammer 10x10 cm (Abb. 23), dann ADC2 (Kammersättigungszeit: 10 min, Einstellungsdauer für die Luftfeuchtigkeit: 4min) (Abb. 24-25) Laufstrecke: 6 cm

4.3.2 Interner StandardTests dreier unterschiedlicher Substanzen**Tab. 23** : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Tests dreier Substanzen)

Plattenart	siehe Tab. 21
Fließmittel	
Referenzsubstanzen	
Testsubstanzen	Azophenol, <i>trans</i> -Azobenzol und 4-Dimethylaminoazobenzol (1,5 mg) wurde in je 5 mL Aceton gelöst und auf 10 mL mit MeOH aufgefüllt.
ATS4	Auftragsvolumen: 10 µL, sowie 100 ng/Band, von den Referenzsubstanzen und Testlösungen, Standardgemischlösung (übersprüht) Bandenlänge: 8 mm
Entwicklung	ADC2 mit Kaliumcarbonat als Salzlösung (siehe 22) Laufstrecke: 6 cm

Versuch der Synthese der deuterierten Farbstoffe

▪ **Vorschrift**

Ansatz für eine theoretische Ausbeute von 4 mmol. [38]

a) Diazotierung

In einem 10 mL Becherglas verdünnt man 365 μL Anilin (Sudanrot I), 495 μL 2,4-Dimethylanilin (Sudanrot II) oder löst man 900 mg 4'-Amino-2,3'-dimethylazobenzol (Sudanrot IV) oder 550 mg 4-Nitroanilin (Pararot) in 2 mL 5 N Salzsäure und lässt unter kräftigem Rühren und Kühlen bei einer Temperatur unter 5 °C (Eisbad) eine 8 N Natriumnitritlösung (270 mg Natriumnitrit in 500 μl Wasser) langsam zufließen, wobei die Temperatur nicht über 5 °C steigen darf. Die Ausbildung des Diazoniumsalzes geht mit einer starken Wärmeentwicklung einher und eine Temperatur über 10 °C kann den Zerfall des Diazoniumsalzes herbeiführen.

b) Azokupplung

In einem 20 mL Becherglas, das eine Lösung von 580 mg β -Naphthol in 8 mL 2 N Natronlauge enthält, lässt man bei 5 °C bis 10 °C (Eisbad) die Lösung des diazotierten Amins langsam unter Rühren zufließen. Der mit Indikatorpapier geprüfte pH-Wert der Lösung soll alkalisch sein. Eine rote Farbe erscheint. Am Ende der Reaktion wird die Lösung mit wenig destilliertem Wasser über eine Glasfritte unter Vakuum mittels einer Wasserstrahlpumpe filtriert. Das Produkt wird unter Vakuum getrocknet und im Exsikkator aufbewahrt. Die erwartete Ausbeute beträgt ungefähr 80 %.

c) Reinigung : Umkristallisation

Das Produkt wird in einem minimalen Volumen von MeOH oder EtOH erhitzt bis es siedet und in Eis gekühlt. Die ausgebildeten Kristalle werden danach in sehr wenig Umkristallisationslösung stehen gelassen. Wenn alles verdampft ist, wird das Produkt in einem Exsikkator aufbewahrt.

d) Reinheitsprüfung**Tab. 24 :** Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Reinheitsprüfung)

Plattenart	siehe Tab. 21
Fließmittel	
Referenzsubstanzen	
Produkte der Synthesen	Produkte der Synthesen wurden einzeln (1,5 mg) in je 2 mL Aceton gelöst. Die Lösungen wurden auf 10 mL mit MeOH aufgefüllt (150 µg/mL)
ATS4	Auftragsvolumen: 10 µL, sowie 100 ng/Band, von den Referenzsubstanzen und Testlösungen, Standardgemischlösung (übersprüht) Bandenlänge: 8 mm
Entwicklung	Siehe Tab. 23

UV/VIS- und MS-Spektren: siehe 4.3.3 und 4.6.1 .

4.3.3 Densitometrische Detektion : Bestimmung der Messwellenlänge

Die Spektren werden wie unter 2.3 beschrieben aufgenommen. Die verwendete Trennung ist die von Abb. 25 (A).

4.3.4 Quantitative Bestimmung

Tab. 25 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Quantitative Bestimmung)

Plattenart	siehe Tab. 21
Fließmittel	
Referenzsubstanzen	Sudanrot I, II, B, Sudanorange G und 4-Dimethylaminoazobenzen (IS) wurden einzeln (8 mg, außer IS: 4 mg) in je 5 mL Aceton gelöst, Sudanrot III, IV, 7B und Pararot in je 15 mL. Die Lösungen wurden auf 20 mL mit MeOH aufgefüllt (Stammlösungen von je 0,4 mg/mL, außer IS: 0,2 mg/mL). Die Azofarbstoffe wurden auf drei Mischungen verteilt: Sudanrot III und 7B (Mischung 1), Sudanrot I und IV und Sudanorange G (Mischung 2) und Sudanrot II und B und Pararot (Mischung 3). Die Lösungen für Endkonzentrationen von 200 bis 1 ng/Spot (Tab. 27) wurden gemäß Tab. 26 vorbereitet.
ATS4	Auftragungsvolumen: 2 µL Bandenlänge: 8 mm
Entwicklung	siehe Tab. 23

Die LOD wurde wie folgt berechnet (für a und b, siehe Tab. 43):

$$((3 \cdot \text{Rauschen [AU]} - b) / a = \text{LOD [ng/Spot]})$$

$$((10 \cdot \text{Rauschen [AU]} - b) / a = \text{LOQ [ng/Spot]})$$

Die Lösungen für die Kalibrierungskurven wurden nach Tab. 26 vorbereitet. Diese Tabelle gilt für alle drei Mischungen (M1, M2 und M3).

Tab. 26 : Verdünnungsschema der Kalibrierung: aus den Stammlösungen (400 ng/µL) wurden die Lösungen 2-6 und Lösung 6 (ohne IS) aus Lösung 1 (ohne IS) erstellt sowie Lösungen 7-12 aus Lösung 6 (ohne IS). Verdünnt wurde mit MeOH.

Lösung Nr.	1	1 (ohne IS)	2	3	4	5	6
Volumen ⁽¹⁾ zu pipettieren [mL]	5	5	4	3	2	2	1
Endvolumen [mL]	20	20	5	5	5	10	10
Endkonz. [ng/µl]	100	100	80	60	40	20	10
Auftragungsvolumen [µL]	2	2	2	2	2	2	2
Menge/Spot [ng]	200	-	160	120	80	40	20
IS	1	-	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5
Menge/Spot [ng]	20	-	20	20	20	20	20
Lösung Nr.	6 (ohne IS)	7	8	9	10	11	12
Volumen zu pipettieren [mL]	1	5	0,48	0,36	0,24	0,12	0,06
Endvolumen [mL]	10	10	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Endkonz. [ng/µl]	10	5	4	3	2	1	0,5
Auftragungsvolumen [µL]	2	2	2	2	2	2	2
Menge/Spot [ng]	20	-	8	6	4	2	1
IS	-	-	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Menge/Spot [ng]	-	-	20	20	20	20	20

⁽¹⁾ die Farbstoffe Sudanrot III und 7B für M1, Sudanrot I, IV und Sudanorange G für M2 und Sudanrot II, B und Pararot für M3

Die genaue Menge jedes Farbstoffs pro Spot (Auftragung: 2 μ L) ist in Tab. 27 gegeben. Die des internen Standards beträgt bei jeder Mischung 22 ng/Spot.

Tab. 27 : Kalibrierung: Genaue Menge pro Spot

Mischung	M1			M2			M3	
Farbstoffe	I	IV	G	II	B	PR	III	7B
Lösung Nr.	Menge/Spot [ng]							
1	202	203	202	214	206	203	216	205
2	161	163	161	171	165	162	173	164
3	121	122	121	128	124	122	129	123
4	81	81	81	86	82	81	86	82
5	40	41	40	43	41	41	43	41
6	20	20	20	21	21	20	22	21
7	10	10	10	11	10	10	11	10
8	8	8	8	9	8	8	9	8
9	6	6	6	6	6	6	6	6
10	4	4	4	4	4	4	4	4
11	2	2	2	2	2	2	2	2
12	1	1	1	1	1	1	1	1

4.3.5 Probenvorbereitung

Tab. 28 : Probenbezeichnung⁽¹⁾

	Produkt	Hersteller	Zutaten
P1	Chili und Knoblauch Gewürzmischung	Ostmann Gewürze	Chili, Paprika, Knoblauch, Curry, Muskat (Spuren : Sellerie, Senf)
P2	Chili Sauce	Kraft Food	Tomatenmark, Wasser, Branntweinessig, Zwiebeln, Glucosesirup, Paprikaschotten (4 %), modifizierte Stärke, Speisesalz, Chilies (1,5 %), Petersilie, Knoblauch, Rote Beete-Pulver, Gewürze, Süsstoffe (Aspartam, Acesulfam-K)
P3	Chili Powder Extra Hot	TRS Asia's finest foods	Chili gemahlen aus Indien
P4	Paprika	TRS Asia's finest foods	Paprika gemahlen aus Peru
P5	Aldi Turmeric Powder	TRS Asia's Finest Foods	Kurkuma gemahlen aus Indien
P6	Blue Bay, Cooking Red Palm Oil	Yadco Foods	Palmöl aus Ghana
P7	Red Curry Paste	Aroy-D, Thai Agri Foods	Produkt aus Thailand : Trockene Chili (21 %), Knoblauch (21 %), Zitronengras (18 %), Schalotte (16 %), Salz (14 %), Galanga (5 %), Kaffernlimetteschale (5 %)
P8	Mince Red Chili Paste	P&B Foods	Chili (87 %), Rapsöl, Zucker, Salz, Essigsäure, Zitronensäure
P9	Paprika	k. A.	Paprika gemahlen aus Ungarn
P10	Cayennepfeffer	k. A.	Cayennepfeffer und Chili gemahlen
P11	Kurkuma	k. A.	Kurkuma gemahlen aus Indien
P12	Spaghettigewürz	Gewürz Mayer	Paprika, Zwiebeln, Traubenzucker, Salz, Chilis, Petersilie, Knoblauch
P13	Pickle Masala	TRS Asia's Finest Foods	Rote Chili, Salz, Trigonella, Senf, essbares Pflanzenöl, Asafoetida

⁽¹⁾ Alle Produkte wurden im Juni und Juli im lokalen Handel gekauft.

Tab. 29 : Probenvorbereitung

	Extraktionsmethode
E1	<ul style="list-style-type: none"> - 2 g Probe - + 7 mL Aceton, + 13 mL ACN, Ultraschallbad (2 min) - zentrifugieren (4 min, 4000 rpm, 20 °C) - die überstehende Lösung in einen 50 mL Spitzkolben überführen - abrotieren, dann in 1 mL Aceton aufnehmen - durch 0,45 µm Einmalfilter filtrieren und in Vial füllen
E2	<ul style="list-style-type: none"> - 2 g Probe - + 4 mL Aceton, vortexen (1 min) - + 16 mL MeOH, schütteln (1 min) - zentrifugieren (4 min, 4000 rpm, 20 °C) - die überstehende Lösung durch 0,45 µm Einmalfilter filtrieren - Vial füllen
E3	<ul style="list-style-type: none"> - 2 g Probe - + 4 mL Aceton, vortexen (1 min) - + 16 mL MeOH, schütteln (1 min) - zentrifugieren (4 min, 4000 rpm, 20 °C) - die überstehende Lösung in einen 50 mL Spitzkolben überführen - abrotieren, dann mit 1 mL Aceton, dann 1 mL MeOH wieder lösen - durch 0,45 µm Einmalfilter filtrieren und in Vial füllen
E4	<ul style="list-style-type: none"> - 2 g Probe - + 4 mL Aceton, vortexen (1 min) - + 16 mL MeOH, schütteln (1 min) - abrotieren und zentrifugieren (4 min, 4000 rpm, 20 °C) - mit 1 ml Aceton, dann 1 mL MeOH wieder lösen - auf 0,45 µm Einmalfilter filtrieren und in Vial füllen
E5 (Pulver)	<ul style="list-style-type: none"> - 1 g Probe - + 4 mL Aceton, vortexen (1 min) - + 6 mL MeOH, schütteln (1 min) - zentrifugieren (4 min, 4000 rpm, 20 °C) - die überstehende Lösung durch 0,45 µm Einmalfilter filtrieren - in Vial füllen
E6 (Öle und Pasten)	<ul style="list-style-type: none"> - 2 g Probe - + 4 mL Aceton, vortexen (1 min) - + 6 mL MeOH, schütteln (1 min) - zentrifugieren (4 min, 4000 rpm, 20 °C) - die überstehende Lösung durch 0,45 µm Einmalfilter filtrieren - in Vial füllen
E7 (Soßen)	<ul style="list-style-type: none"> - 10 g Probe - + 100 mL ACN - Bis zur Trockene einengen (Rotavap: Wasserbadtemperatur: 75 °C, Vakuum: 650 bis 300 mbar) - + 4 mL Aceton, schütteln (1 min) - + 6 mL MeOH, schütteln (1 min) - In ein 20 mL-Zentrifugenglas umfüllen - zentrifugieren (4 min, 4000 rpm, 20 °C) - die überstehende Lösung durch 0,45 µm Einmalfilter filtrieren - in Vial füllen

▪ **Aufreinigungsvortests**

Wirkung von Polyamid

Tab. 30 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Wirkung von Polyamid)

Plattenart	DC-Polyesterfolien, 20x20 cm, Polyamid-6 F ₂₅₄
Fließmittel	FM 9
Referenzsubstanzen	Standardgemischlösung: siehe Tab. 22
ATS4	siehe Tab. 16
Entwicklung	

Wirkung von Silbernitrat und Antimon(III)-chlorid

Tab. 31 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Wirkung von AgNO₃ und SbCl₃)

Plattenart	HPTLC-Alufolie, 20x20 cm Kieselgel 60
Plattenvorbereitung	Die Platten wurden in AgNO ₃ - (0,2 % oder 3 %) bzw. in SbCl ₃ - (0,2 %) MeOH-Lösungen getaucht.
Fließmittel	siehe Tab. 30
Referenzsubstanzen	
ATS4	
Entwicklung	

▪ **Löslichkeit der Azofarbstoffe**

Vorschrift

100 mg je Farbstoff werden einzeln in ein 20 mL-Zentrifugenglas gegeben und 10 mL MeOH zupipettiert. Das Zentrifugenglas wird 30 min bei 40 °C im Wasserbad belassen, anschließend 20 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zentrifugation (4000 rpm) wird die überstehende Lösung abgehoben und der getrocknete Rückstand (24 h im Abzug, 24 h im Exsikkator) gewogen.

▪ Optimierung der Probenvorbereitung und weitere Aufreinigungstests mit Silbernitrat

Tab. 32 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Optimierung der Extraktionsmethode und weitere Aufreinigungstests mit Silbernitrat)

Plattenart	HPTLC-Platten Nano-SIL-PAH, 20x10 cm HPTLC-Platten, 20x10 cm Kieselgel 60
Fließmittel	siehe Tab. 21
Plattenvorbereitung	Die Platten wurden in 1,5%ige AgNO ₃ -MeOH-Lösungen getaucht oder es wurde ein 3 mm hohes Band (1,5%ige AgNO ₃ -MeOH-Lösung) 1,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt aufgetragen Auftragungsvolumen: 13 µL/cm Band (Abb.40), A und 42), 26 µL/cm (Abb. 41 A und 42) und 52 µL/cm (Abb. 41 B); Auftragungsgeschwindigkeit: 500 nL/s)
Probe	Für die mit 200 ppm dotierten Proben wurden gemäß E2, E3 und E4 je 800 µL bzw. gemäß E5 je 400 µL der Stammlösungen von Sudanrot 7B und IS verwendet. Für 500 ppm wurde mit 1 mL (E5) der Stammlösungen gearbeitet. Diese Mengen wurden direkt dem homogenen, gewogenen Produkt vor der Extraktion zugegeben.
Referenzsubstanzen	Standardgemischlösung: siehe Tab. 22
ATS4	siehe Tab. 23
Entwicklung	

▪ Azofarbstoffe vs. Matrix

Tab. 33 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Azofarbstoffe vs. Matrix)

Plattenart	siehe Tab. 21
Fließmittel	
Plattenvorbereitung	19 cm Band (3 mm hoch) einer 1,5%igen AgNO ₃ -Lösung (Auftragungsvolumen: 1,6 mL, Auftragungsgeschwindigkeit: 500 nL/s)
Probe	Chilipulver (P3, E5), dotiert (500 ppm) (siehe Tab.32)
Referenzsubstanzen	Standardgemischlösung: siehe Tab. 22
ATS4	Auftragungsvolumina: Referenzsubstanzen: 2 µL, Proben: 2 und 10 µL siehe Tab. 232
Entwicklung	

▪ Bestrahlung vs. Silbernitrat

Tab. 34 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Bestrahlung vs. Silbernitrat)

Plattenart	siehe Tab. 21
Fließmittel	
Plattenvorbereitung	3 Banden (3 mm hoch) à 3 cm (385, 750 und 1500 µg/cm Band bzw. 23, 45 und 90 µL von einer 5%igen AgNO ₃ -Lösung (MeOH/Wasser) pro 3 cm Band, Auftragungsgeschwindigkeit: 500 nL/s))
Probe	siehe Tab. 33
Referenzsubstanzen	Standardgemischlösung: siehe Tab. 22
ATS4	Auftragungsvolumen: 4 µL siehe Tab. 23
Entwicklung	
Bestrahlungszeit	0, 5 und 10 min

▪ Erweiterung der Tests auf Soßen, Pasten und Öle

Tab. 35 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Erweiterung der Tests auf Soßen, Pasten und Öle)

Plattenart	siehe Tab. 21
Fließmittel	
Probe	Abb. 46: P3-P8 (E5), nur mit IS (siehe Tab. 32) Abb. 47: P3 (E5), dotiert mit Sudanrot 7B und IS (siehe Tab.32)
Referenzsubstanzen	siehe Tab. 20
ATS4	siehe Tab. 34
Entwicklung	
Bestrahlungszeit	2 und 4 min

4.4 Wiederfindung

Tab. 36 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Wiederfindung)

Plattenart	siehe Tab. 21
Fließmittel	
Probe	P3-P8 (E5) Die Proben wurden in zwei Konzentrationen dotiert: 600 und 100 µL der Stammlösungen (siehe Referenzsubstanzen dieser Tabelle) und 375 µL des internen Standards.
Referenzsubstanzen	Sudanrot I, Sudanorange G und 4-Dimethylaminoazobenzol (IS) wurden einzeln (12 mg) in je 5 mL Aceton gelöst, Sudanrot III in je 15 mL. Die Lösungen wurden auf 25 mL mit MeOH aufgefüllt (Stammlösungen von je 0,5 mg/mL). Für die Standardgemischlösung wurden je 100 µL der entsprechenden Stammlösungen gemischt und mit Methanol auf 5 mL aufgefüllt (M, Farbstoff je 10 ng/µL). Die interne Standardlösung zum Übersprühen wurde entsprechend 1:10 verdünnt.
ATS4	siehe Tab. 23 Auftragungsvolumina:
Entwicklung	- Probe : 4 µL - Standardgemischlösung: 1, 5, 10 und 15 µL; IS: 1,5 µL (übersprüht)
Bestrahlungszeit	4 min

4.5 Schnelle Screeningmethode durch antiparallele Entwicklung

Tab. 37 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (Screeningmethode)

Plattenart	siehe Tab. 21
Fließmittel	
Probe	P9-P13 (E5) Die Proben wurden nur mit des internen Standards dotiert (30 ppm oder 600 µL der Stammlösung)
Referenzsubstanzen	Sudanrot I, II, B, Sudanorange G und 4-Dimethylaminoazobenzol (IS) wurden einzeln (10 mg) in je 5 mL Aceton gelöst, Sudanrot III, IV, 7B und Pararot in je 15 mL. Die Lösungen wurden auf 20 mL mit MeOH aufgefüllt (Stammlösungen von je 0.5 mg/mL). Für die Standardgemischlösung wurden je 200 µL der entsprechenden Stammlösungen gemischt und mit Methanol auf 10 mL aufgefüllt (M, Farbstoff je 10 ng/µL). Die interne Standardlösung zum Übersprühen wurde entsprechend 1:50 verdünnt. .
ATS4	Auftragungsvolumina: - Probe : 4 µL
Entwicklung	- Standardgemischlösung: 1, 2, 4 und 6 µL; IS: 3 µL (übersprüht) Rand von links: 1,8 cm Rand von unten: 1mm Bandenlänge: 6 mm
Bestrahlungszeit	siehe Tab. 36

4.5.1 Optimierte HPTLC-Parameter für quantitative Bestimmung

Tab. 38 : Verbrauchsmaterial und Methodenparameter (optimierte HPTLC-Parameter)

Plattenart	siehe Tab. 37
Probe	
Referenzsubstanzen	
ATS4	Auftragungsvolumina: - Probe : 4 µL
Entwicklung	- Standardgemischlösung: 1, 2, 4 und 6 µL; IS: 1 µL (übersprüht) Rand von links: 1,5 cm Rand von unten: 8 mm Bandenlänge: 6 mm
Bestrahlungszeit	siehe Tab. 36

4.6 Bestätigung positive Befunde

4.6.1 HPTLC-HPLC-MS

Tab. 39 : Verbrauchsmaterial und Methdenparameter (HPTLC-HPLC-MS)

Extraktionsmittel	MeOH/Ameisensäure (90:10, v/v)	
Extraktionszeit	30 s	
Fluss	0,2 mL/min	
Signal (DAD)	Wellenlängen	Farbstoffe: gemäß 2.3 Coffein: 254 nm
Signal (MS)	Ionisation Mode	API-ES
	Polarität	positiv (Pararot: negativ)
	Massenbereich	200-500
	Fragmentor	100 eV
	Verstärkung	1,0
	Schwellenwert	1
	Step size	0,05
Zerstäubung	Gastemperatur	300 °C
	Trocknungsgas	10 L/min
	Quad Temperatur	100 °C
	Kapillarspannung	4000 V
	Nebulizer pressure	30 psi

5 Literatur

- [1] BASF
http://worldaccount.basf.com/wa/EU~en_GB/Catalog/Chemicals/pi/BASF/Brand/sudan/brand_top/; abgerufen am 13.07.2009
- [2] International Agency for Research on Cancer (IARC)
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthgr03.php>; abgerufen am 13.07.2009
- [3] Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA)
<http://www.afssa.fr/Documents/RCCP2003sa0172.pdf>; abgerufen am 13.07.2009
- [4] Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)
http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm; abgerufen am 13.07.2009
- [5] Entscheidung der Kommission vom 20. Juni 2003 über Dringlichkeitsmaßnahmen hinsichtlich scharfer Chilis und scharfer Chilierzugnisse, *Amtsblatt der Europäischen Union*, L154: 114-115, 2003
- [6] Entscheidung der Kommission vom 21 Januar 2004 über Dringlichkeitsmaßnahmen hinsichtlich scharfer Chilis und scharfer Chilierzugnisse, *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 27: 52-54, 2004
- [7] Entscheidung der Kommission vom 23. Mai 2005 über Dringlichkeitsmaßnahmen hinsichtlich Chilis, Chilierzugnisse, Kurkuma und Palmöl, *Amtsblatt der Europäischen Union*, L135: 34-36, 2005
- [8] V. Rayner: European perspective on sudan dyes and the structure of food color legislation. *Color Quality of Fresh and Processed Foods*, ACS Symposium Series 983: 457-468, 2008
- [9] Ordonnance du DFI sur les additifs admis dans les denrées alimentaires du 22 juin 2007
<http://www.admin.ch/ch/f/rs/8/817.022.31.fr.pdf>; abgerufen am 25.05.2009
- [10] Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe, *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 354: 16-33, 2008
- [11] Richtlinie 2008/128/EG der Kommission vom 22. Dezember 2008 zur Festlegung spezifischer Reinheitskriterien für Lebensmittelfarbstoffe, *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 6: 20-63, 2009
- [12] H. Zollinger: *Color Chemistry, Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments*, Wiley-VCH, Third, revised edition, Zürich, 2003
- [13] H. Handler, M. Bleisch, V. Widmer, E. Reich: A Validated HPTLC Method for the Determination of Illegal Dyes in Spices and Spice Mixtures. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32: 1273-1288, 2009

- [14] H. Kazuo, T. Hisaya, N. Shoichiro, T. Yukio: Survey of illegal dyes such as Sudan dyes, para red and orange II in commercial foods. *Nagoya-shi Eisei Kenkyushoho*, 52: 45-53, 2006
- [15] A. Eiko, O. Tsutomu, M. Michiko, N. Toshiro: Analysis of sudan dyes in oyster sauce using TLC und HPLC. *Tokyo-to Kenko Anzen Kenkyu Senta Kenkyu Nenpo*, 56: 141-144, 2006
- [16] N. Strichow, W. Ruge: Qualitative Bestimmung von Sudanfarbstoffen mittels Dünnschichtchromatographie (Screening-Methode), *Lebensmittelchemie*, 58: 44-45, 2004
- [17] S. Dixit, S. K. Khana, M. Das: A simple 2-directional high-performance thin-layer chromatographic method for the simultaneous determination of curcumin, metanil yellow, and sudan dyes in turmeric, chili and curry powders. *Journal of AOAC International*, 91: 1387-1396, 2008
- [18] Manuel suisse des denrées alimentaires, 42A: 9-10, 1990
- [19] F. Tateo, M. Bononi: Fast Determination of Sudan I by HPLC/APCI-MS in Hot Chilli Spices, and Oven-Baked Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 655-658, 2004
- [20] V. Cornet et al.: Development of a Fast Analytical Method for the Determination of Sudan Dyes in Chili- and Curry-Containing Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 639-644, 2006
- [21] E. Ertas, H. Özer, C. Alasalvar: A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes and Para Red in red chilli pepper. *Food Chemistry*, 105: 756-760, 2006
- [22] C. Sproll et al.: Quantitative Analyse von Sudanfarbstoffen mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS in unterschiedlichen Lebensmittelmatrices. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 101 (11): 482-484, 2005
- [23] S. Ubben: Automatisierte Methode zur Bestimmung von Sudan-Farbstoffen in Lebensmitteln
<http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/gilson1.pdf>; abgerufen am 25.03.2009
- [24] H. G. Daood, P. A. Biacs: Simultaneous Determination of Sudan Dyes and Carotenoids in Red Pepper and Tomato Products by HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 43: 461-465
- [25] F. Calbiani et al.: Development and in-house validation of a liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli products. *Journal of Chromatography*, 1042: 123-130, 2004

- [26] L. He et al.: Determination of Sudan dyes residues in eggs by liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 594: 139-146, 2007
- [27] F. J. Green: *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*, Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, Wisconsin, 1990
- [28] Club de CCM, Journée du 23 Octobre 2008 chez Sanofi-Aventis à Neuville/Saône, Du dépôt à la séparation
http://www.clubdeccm.com/PDF/20081023_01.pdf; abgerufen am 16.09.2009
- [29] Gerda Morlock: HPTLC DC Vorlesung, 2009
- [30] CAMAG
www.camag.com, abgerufen am 16.09.2009
- [31] K. Bauer, L. Gros, W. Sauer: *Dünnschicht Chromatographie, Eine Einführung*, Hüthig, Leimen, 1989
- [32] L. Kraus, A. Koch, S. Hoffstetter-Kuhn: *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1996
- [33] F. Rouessac, A. Rouessac: *Analyse chimique, Methodes et techniques instrumentales modernes*, Dunod, 5e édition, Paris, 2000
- [34] T. Kowalska, K. Kaczmarek, W. Prus: *Handbook of Thin-Layer Chromatography: Theory and Mechanism of Thin-Layer Chromatography*, Dekker, 3rd Edition, 52, New York, Basel, 2003
- [35] Relative Luftfeuchte über gesättigte Salzlösungen
http://www.d-r-h.de/hilfstabellen/klima_def_luftfeuchte.html; abgerufen am 02.10.2009
- [36] Sigma-Aldrich
www.sigmaaldrich.com; abgerufen am 02.10.2009
- [37] H.w. Sun, F.c. Wang, L. f. Ai: Determination of banned 10 azo-dyes in hot chili products by gel permeation chromatography-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A* 1164: 120-128, 2007
- [38] H. G. Becker et al.: *Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum*, Wiley-VCH, 20. Auflage, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 1999

6 Anhang

6.1 Statistik 2008 bis Ende erstes Halbjahr 2009 gemäß RASFF

Die Alarm- und Informationsmeldungen sowie Einfuhrverbote von 2008 bis zum Ende des ersten Halbjahres 2009 gemäß RASFF sind in Tabelle 40, 41 und 42 gegeben. [4]

Alarmlmeldungen werden ausgerufen, wenn sich ein Lebensmittel, welches ein ernstzunehmendes Risiko darstellt, auf dem Markt befindet und sofortiges Handeln nötig ist.

Alarm wird von dem Mitgliedstaat ausgelöst, der das Problem entdeckt und die nötigen Maßnahmen ergriffen hat, wie z.B. Rücknahme oder Rückruf. Die Meldung zielt darauf ab allen Mitgliedern des Netzwerks die Informationen bereitzustellen, damit diese überprüfen können, ob sich das betroffene Produkt auf ihrem Markt befindet, so dass sie ebenfalls die nötigen Messungen durchführen können.

Informationsmeldungen betreffen ein Lebensmittel, das auf dem Markt angeboten wurde und bei dem ein Risiko festgestellt worden ist, aber bezüglich dessen die anderen Mitglieder des Netzwerks keine sofortigen Maßnahmen ergreifen müssen, weil sich das Produkt nicht oder nicht mehr auf ihrem Markt befindet oder weil die Art des Risikos keine sofortigen Maßnahmen erfordert.

Meldungen über Einfuhrverbote betreffen Lebensmittellieferungen die abgelehnt wurden, weil bei ihnen bei Untersuchungen an den Außengrenzen der EU ein Gesundheitsrisiko festgestellt wurde. Die Meldungen werden an alle EU-Grenzstellen übermittelt, um Kontrollen zu verstärken und um sicher zu stellen dass die abgelehnte Ware nicht durch eine andere Grenzstelle eingeführt wird.

Tab. 40 : RASFF Alarmmeldungen (originale Daten)

N°	Date	Notified by	Reference	Reason for notifying
1	03.01.2008	Poland	2008.0006	unauthorised colours Sudan 1 (> 25 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (5.14 mg/kg - ppm) in ground chilli from Poland, raw material from India
2	03.01.2008	Poland	2008.0007	unauthorised colours Sudan 1 (2.76 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (1.31mg/kg - ppm) in curry powder from Poland, raw material from India
3	24.07.2008	France	2008.0899	unauthorised colours Sudan 4 (51.3; 39.5 mg/kg - ppm) and Sudan Red G (4.8; 3.5 mg/kg - ppm) in palm oil from Senegal
4	08.09.2008	Germany	2008.1073	unauthorised colour Sudan 1 (3.9 mg/kg - ppm) in ground hot pepper from Turkey
5	22.09.2008	the Netherlands	2008.1116	unauthorised colour Sudan 1 (2.5 mg/kg - ppm) in ground mild red paprika powder from Turkey, via Germany
6	22.09.2008	the Netherlands	2008.1117	unauthorised colour Sudan 1 (3.3 mg/kg - ppm) in hot chilli powder from Turkey, via Germany
7	22.09.2008	the Netherlands	2008.1118	unauthorised colour Sudan 1 (3.5 mg/kg - ppm) in hot chilli powder from Turkey, via Germany
8	22.09.2008	the Netherlands	2008.1119	unauthorised colour Sudan 1 (3.8 mg/kg - ppm) in hot chilli powder from Turkey, via Germany
9	05.03.2009	the Commission Services	2009.0272	unauthorised colours Sudan 1 (80 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (4 mg/kg - ppm) in curry powder from Portugal
10	05.03.2009	the Commission Services	2009.0273	unauthorised colours Sudan 1 (90 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (7 mg/kg - ppm) in saffron from Portugal
11	06.03.2009	Ireland	2009.0277	unauthorised colour Sudan 4 (5.1 mg/kg - ppm) in cooking palm oil from Ghana
12	21.04.2009	Denmark	2009.0504	unauthorised colour Sudan 1 (0.74 mg/kg - ppm) in curry paste from India, via the United Kingdom
13	05.03.2009	the Commission Services	2009.0272	unauthorised colours Sudan 1 (80 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (4 mg/kg - ppm) in curry powder from Portugal
14	05.03.2009	the Commission Services	2009.0273	unauthorised colours Sudan 1 (90 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (7 mg/kg - ppm) in saffron from Portugal

Tab. 41 : Informationsmeldungen (originale Daten)

N°	Date	Notified by	Reference	Reason for notifying
1	15.01.2008	Germany	2008.0046	unauthorised colour Sudan 1 (3.1 mg/kg - ppm) in spice mixture with paprika from Germany
2	14.05.2008	Ireland	2008.056	unauthorised colours Sudan 1 (1.5 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (5.9 mg/kg - ppm) in chilli flakes from India
3	16.05.2008	Greece	2008.0572	unauthorised colour Sudan 1 (5.8 mg/kg - ppm) in pepper sauce from Albania
4	04.09.2008	the United Kingdom	2008.1064	unauthorised colour Sudan 4 (15.5 mg/kg - ppm) in pure unrefined palm oil from unknown origin, via the United Kingdom
5	02.10.2008	Greece	2008.1172	unauthorised colour Sudan 1 (2.3 mg/kg - ppm) in pepper sauce from Albania
6	13.11.2008	France	2008.1428	unauthorised colour Sudan 4 (50.6 mg/kg - ppm) in palm oil from Senegal
7	18.12.2008	Latvia	2008.1649	unauthorised colours Sudan 1 (710 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (18 mg/kg - ppm) in curcuma from India
8	15.01.2008	Germany	2008.0046	unauthorised colour Sudan 1 (3.1 mg/kg - ppm) in spice mixture with paprika from Germany
9	27.04.2009	Denmark	2009.0532	unauthorised colour Sudan 1 (3.8 mg/kg - ppm) in strong curry powder from India
10	25.05.2009	the United Kingdom	2009.0642	unauthorised colour Sudan 1 (340 mg/kg - ppm) in spice mixes from Pakistan
11	27.04.2009	Denmark	2009.0532	unauthorised colour Sudan 1 (3.8 mg/kg - ppm) in strong curry powder from India

Tab. 42 : RASFF Einfuhrverbote (originale Daten)

N°	Date	Notified by	Reference	Reason for notifying
1	03.01.2008	Greece	2008.AAP	unauthorised colours Sudan 1 (46 mg/kg - ppm) and Para Red (98; 327; 416 mg/kg - ppm) in seasonings from the Russian Federation
2	14.02.2008	Italy	2008.AHI	unauthorised colours Sudan 1 (0.02; 0.02; 0.1 mg/kg - ppm) and Sudan Orange G (1 mg/kg - ppm) in food preparations from India
3	21.04.2008	France	2008.AQG	unauthorised colour Sudan 4 (76.4; 97 mg/kg - ppm) in palm oil from Senegal, raw material from Guinea
4	29.05.2008	the United Kingdom	2008.AVD	unauthorised colours Sudan 1 (68 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (14 mg/kg - ppm) in curry powder from Turkey
5	14.07.2008	Germany	2008.BCI	unauthorised colours Sudan 1 (1.2 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (0.1 mg/kg - ppm) in red chilli pepper powder from Chile
6	11.09.2008	Italy	2008.BKQ	unauthorised colour Sudan 1 (0.04 mg/kg - ppm) in cooked fava beans from Egypt
7	24.09.2008	Germany	2008.BMR	unauthorised colour Sudan 4 (25.7; 2.1 mg/kg - ppm) in palmoil from Togo
8	13.10.2008	Ireland	2008.BPI	unauthorised colour Sudan 4 (4.6 mg/kg - ppm) in palm oil from Nigeria
9	05.12.2008	the United Kingdom	2008.BYC	unauthorised colour Sudan in chilli powder from Bangladesh
10	05.12.2008	the United Kingdom	2008.BYD	unauthorised colour Sudan in tumeric powder from Bangladesh
11	12.03.2009	Ireland	2009.ANI	unauthorised colour Sudan 4 (9.7 / 5.2 mg/kg - ppm) in palm oil from Nigeria
12	16.03.2009	Belgium	2009.ANV	unauthorised colour Sudan 4 (5.2 mg/kg - ppm) in palm oil in bottle from Senegal
13	21.04.2009	Spain	2009.AUC	unauthorised colour Sudan 4 (75.7 µg/kg - ppb) in ground pepper from Bolivia
14	23.04.2009	Germany	2009.AUO	unauthorised colours Sudan 1 (0.022 mg/kg - ppm) and Sudan 4 (0.220 mg/kg - ppm) in chilli powder from the United Arab Emirates

6.2 HPTLC-Trennungsversuch und -optimierung

6.2.1 Optimierung des Fließmittels auf Coffein-impregnierten Platten

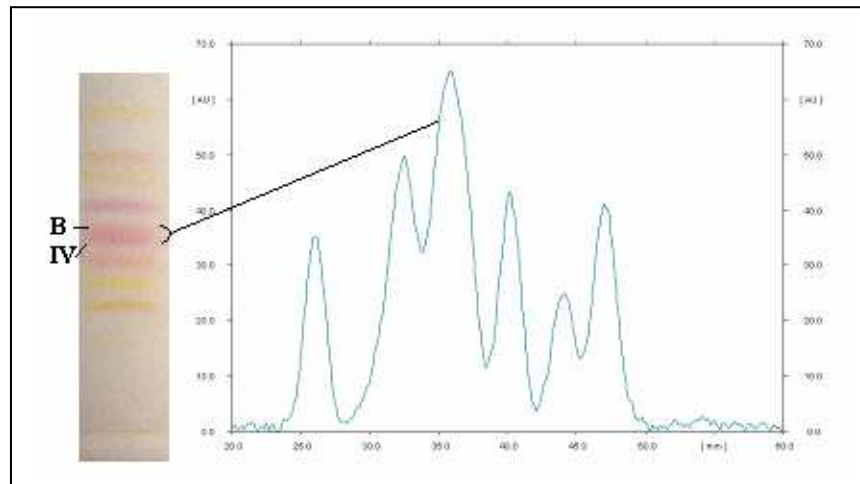
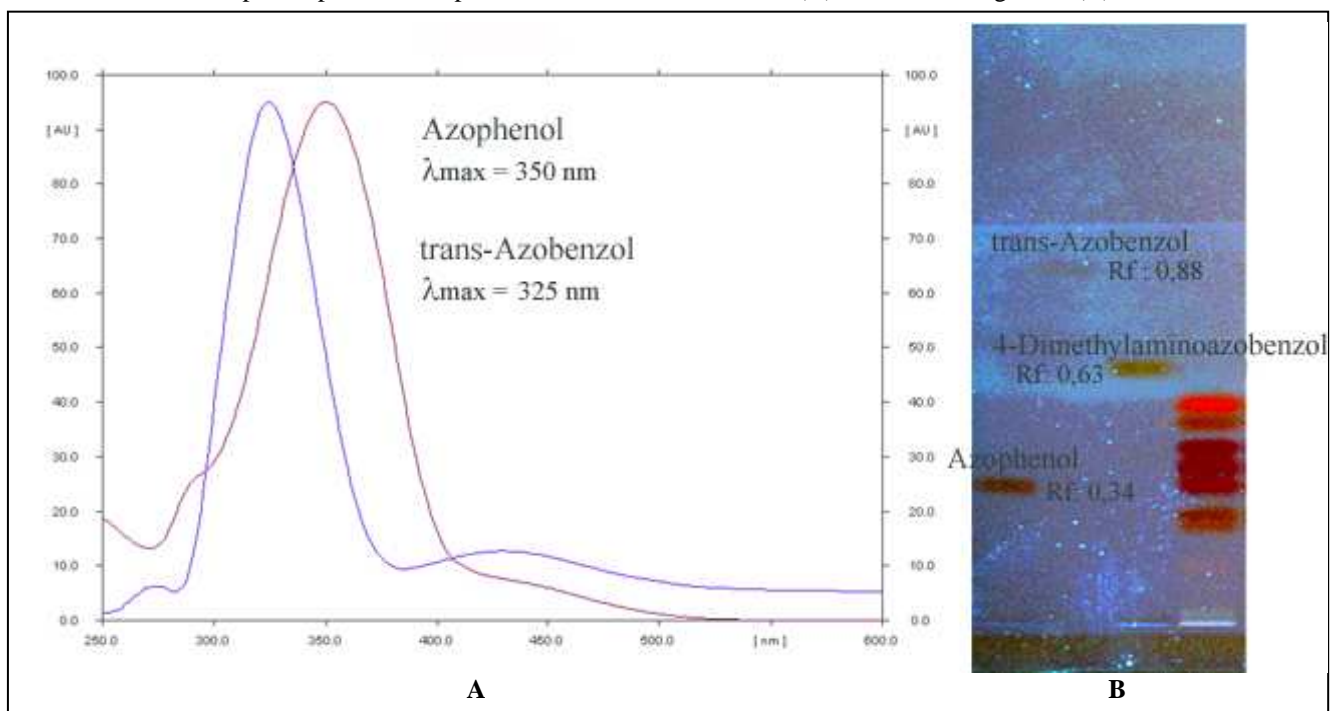


Abb. 55: Chromatogramm (525 nm): Coelution von Sudanrot IV und B

6.3 Interner Standard

6.3.1 Tests dreier unterschiedlicher Substanzen

Abb. 56: Absorptionsspektrum der potenziellen internen Standards (A) und Chromatogramm (B) bei 366 nm.



6.3.2 Versuch der Synthese der deuterierten Farbstoffe

▪ Reinheitsprüfung

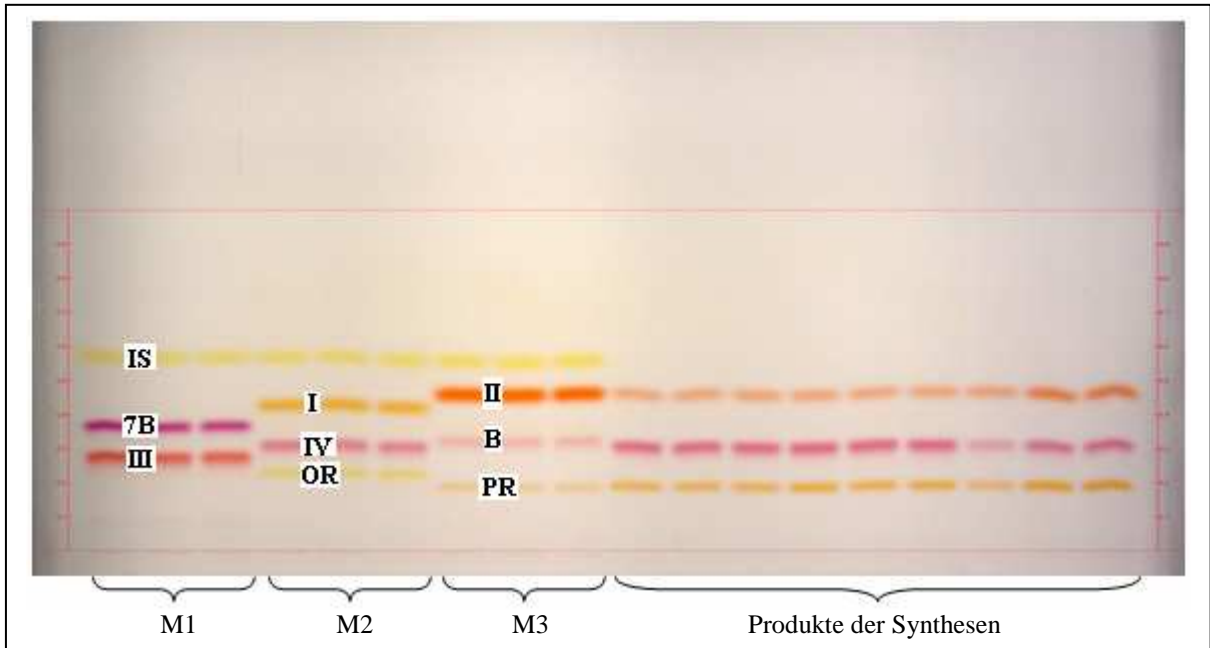


Abb. 57: Vergleich zwischen den Produkten der Synthesen (Sudanrot II, IV und Pararot) und den Referenzsubstanzen (außer Pararot)

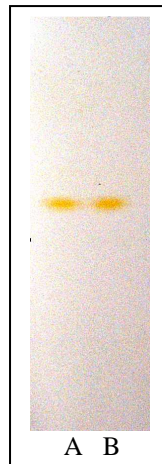


Abb. 58: Vergleich zwischen der Referenzsubstanz (A) und dem Produkt der Synthese (B) von Sudanrot I

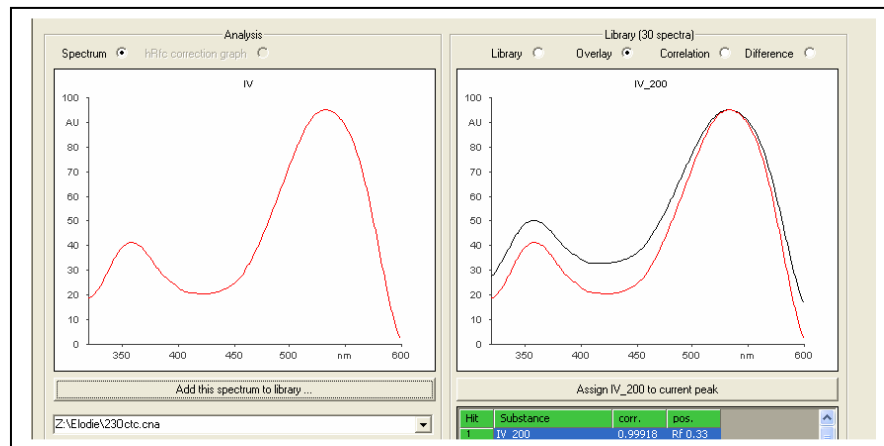


Abb. 59: Vergleich der Spektren des synthetisierten Sudanrot IV von Abb. 57 (Band N° 12) mit der Referenzsubstanz (Korrelation: 0,99918)

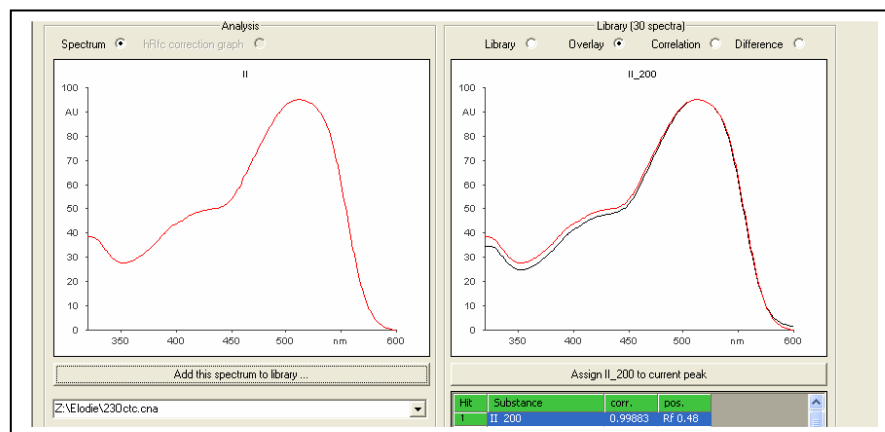


Abb. 60: Vergleich der Spektren des synthetisierten Sudanrot II von Abb. 57 (Band N° 12) mit der Referenzsubstanz (Korrelation: 0,99883)

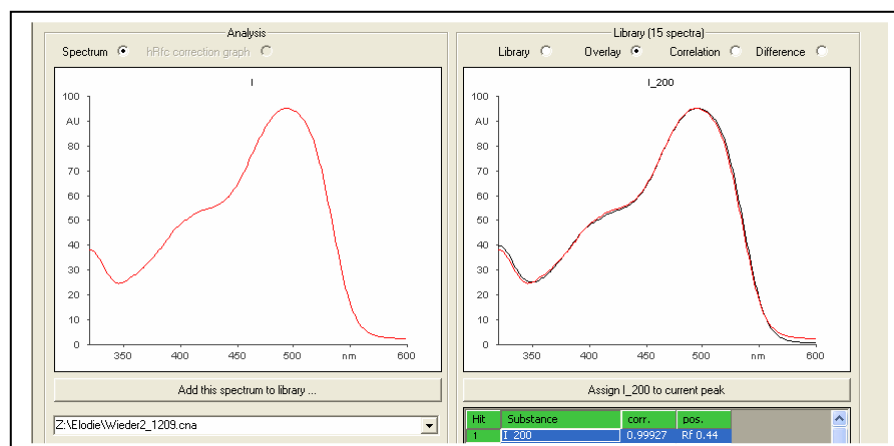


Abb. 61: Vergleich der Spektren des synthetisierten Sudanrot I von Abb. 57 (Band N° 12) mit der Referenzsubstanz (Korrelation: 0,99927)

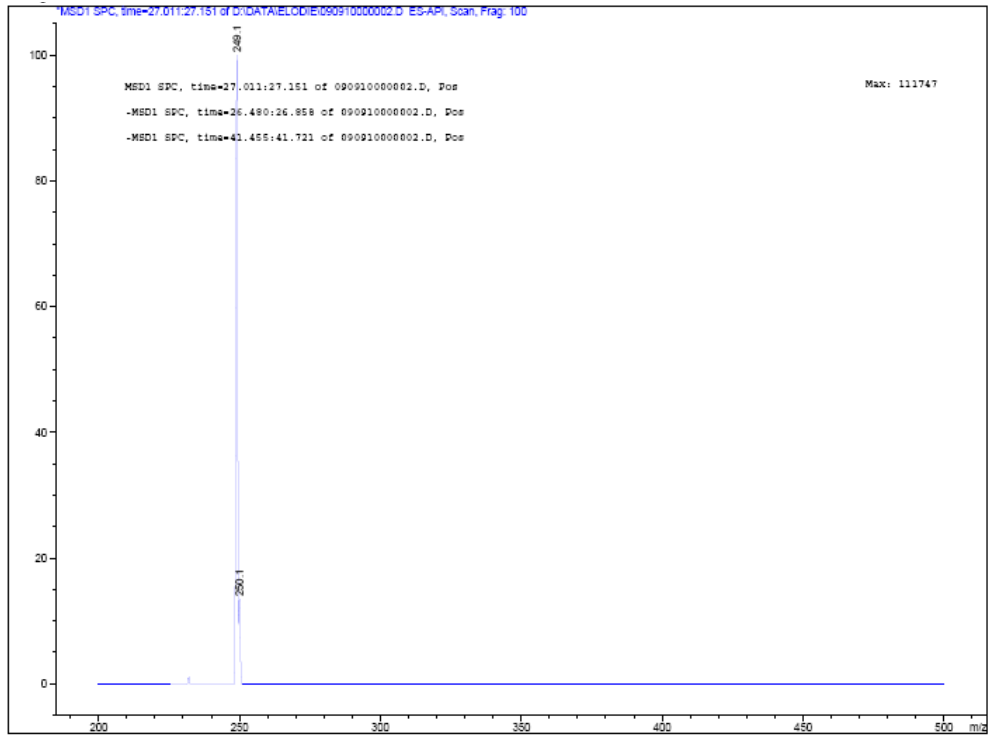


Abb. 62: Massenspektrum von Sudanrot I (MH^+): m/z 249,1 (gefunden), 249,1 (theoretisch)

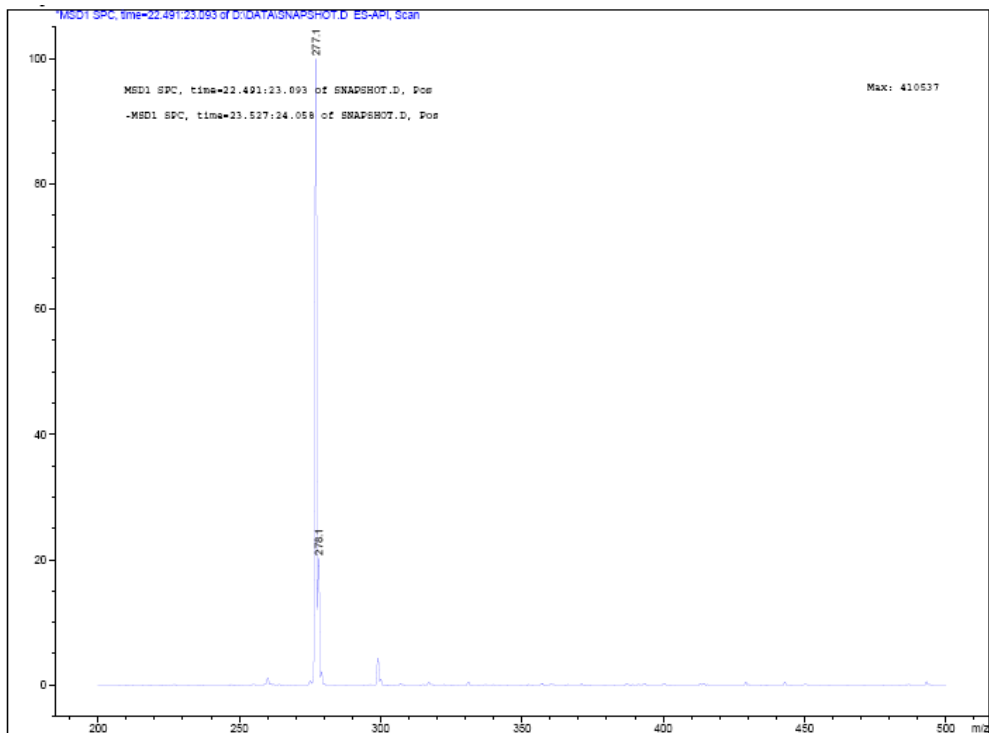


Abb. 63: Massenspektrum von Sudanrot II (MH^+): m/z 277,1 (gefunden), 277,1 (theoretisch)

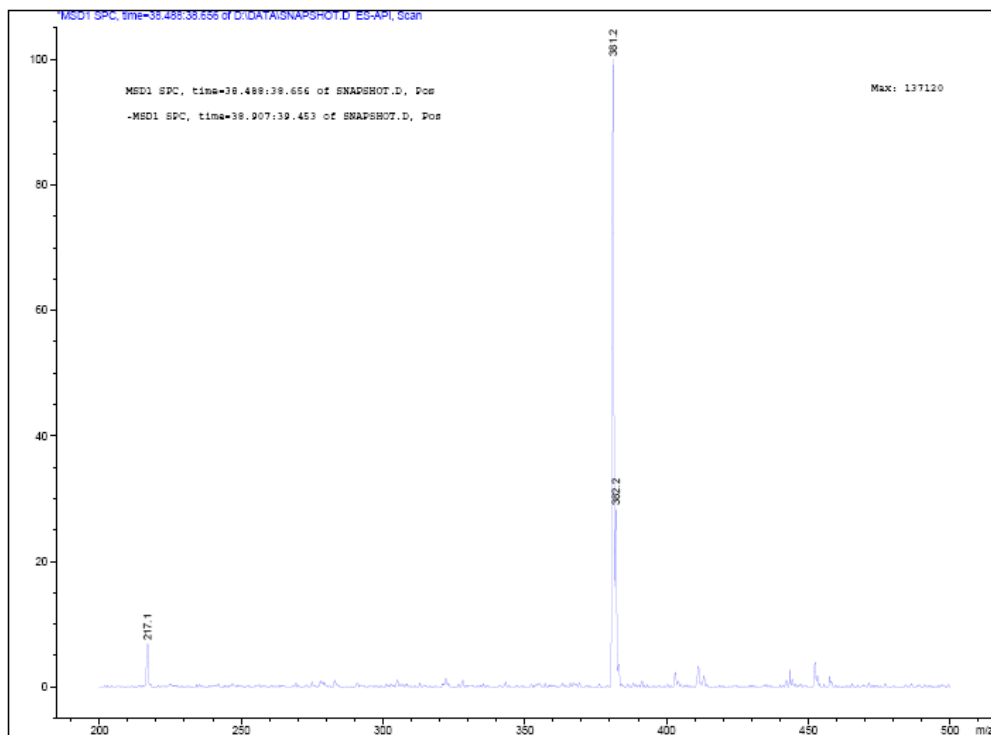


Abb. 64: Massenspektrum von Sudanrot IV (MH^+): m/z 381,2 (gefunden), 381,2 (theoretisch)

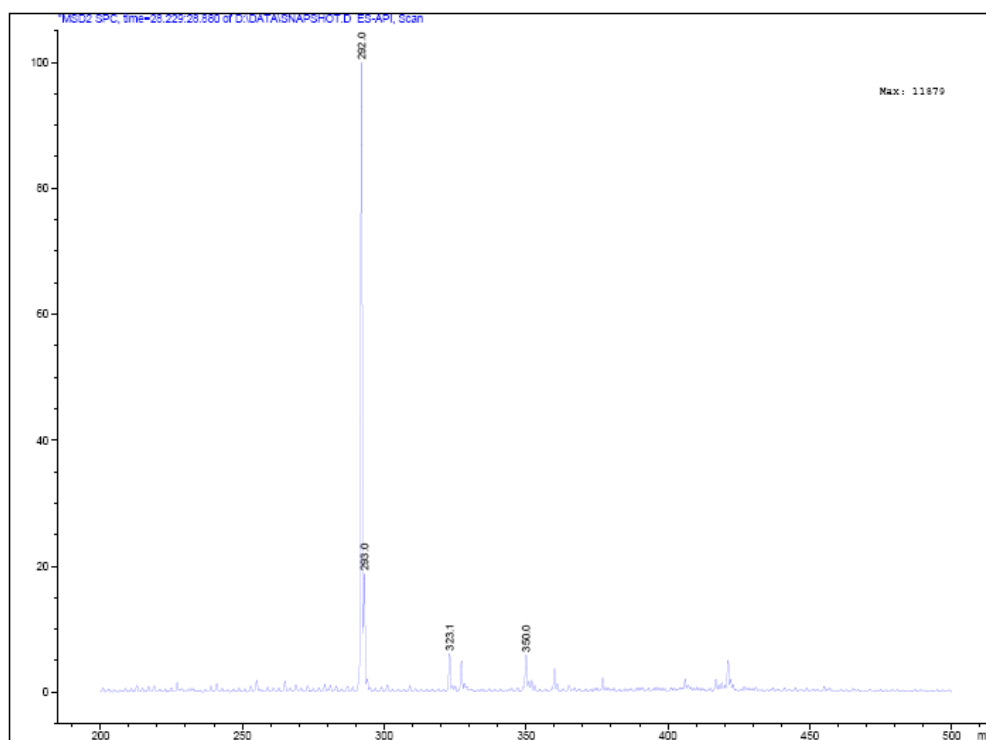


Abb. 65: Massenspektrum von Pararot (MH^+): m/z 292,0 (gefunden), 292,0 (theoretisch)

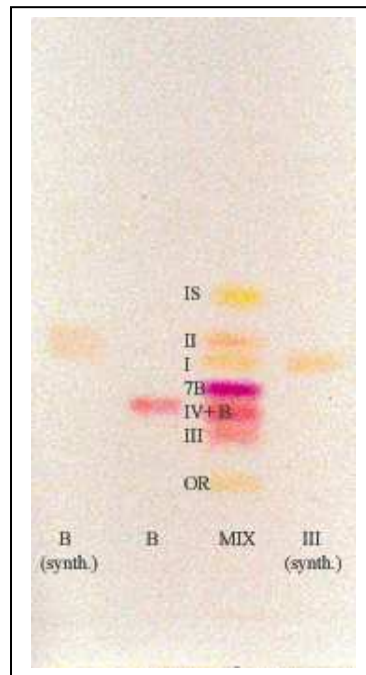


Abb. 66: Vergleich der Synthese von Sudanrot B und Sudanrot III

6.4 Quantitative Bestimmung

Tab. 43: Lineare Kalibrierfunktionen ($a \cdot \text{Konzentration [ng/spot]} + b = \text{Signalintensität [AU]}$) im engen Bereich

Farbstoffe	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	<i>sdv</i>
Sudanrot I	3,795	-0,855	0,99995	0,59
	3,606	-1,758	0,99914	2,02
	3,599	-1,146	0,99923	1,16
Sudanrot II	4,256	-0,883	0,99997	0,61
	4,330	-0,834	0,99994	0,62
	4,368	-0,816	0,99995	0,65
Sudanrot III	5,893	-8,581	0,99956	1,67
	4,887	5,849	0,99984	0,71
	4,769	-0,306	0,99995	0,45
Sudanrot IV	5,303	-5,126	0,99880	2,56
	4,386	2,253	0,99888	2,17
	4,785	1,789	0,99878	2,15
Sudanrot B	4,516	-0,280	0,99980	1,24
	4,389	1,284	0,99994	0,62
	4,217	1,451	0,99991	0,78
Sudanrot 7B	5,176	-1,408	0,99993	1,27
	4,076	4,954	0,99988	0,61
	4,102	5,922	0,99998	0,23
Sudanorange G	4,431	-0,343	0,99997	0,37
	3,44	7,341	0,99981	0,69
	4,091	2,561	0,99893	1,01
Pararot	5,246	0,201	0,99927	2,31
	5,038	0,260	0,99999	0,05
	5,114	0,254	0,99953	1,75

Tab. 44 : Polynomische Kalibrierfunktionen ($a \cdot (\text{Konzentration [ng/spot]})^2 + b \cdot \text{Konzentration [ng/spot]} + c = \text{Signalintensität [AU]}$) im weiten Bereich

Farbstoffe	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>r</i>	<i>sdv</i>
Sudanrot I	-0,009	4,775	-22,985	0,99974	2,06
	-0,006	4,175	-5,747	0,99988	1,41
	-0,007	4,452	-8,878	0,99986	2,34
Sudanrot II	-0,009	4,852	-17,729	0,99870	4,50
	-0,010	4,979	-19,583	0,99705	5,69
	-0,011	5,214	-15,417	0,99906	3,21
Sudanrot III	-0,009	5,704	-8,318	0,99909	3,74
	-0,006	6,547	-20,387	0,99989	1,20
	-0,010	5,189	-14,043	0,99906	3,75
Sudanrot IV	-0,012	6,343	-29,325	0,99957	2,62
	-0,009	5,837	-11,969	0,99978	1,89
	-0,011	6,109	-20,159	0,99982	1,67
Sudanrot B	-0,010	5,452	-20,447	0,99924	3,49
	-0,012	5,705	-22,410	0,99779	5,81
	-0,012	5,668	-21,588	0,99878	4,32
Sudanrot 7B	-0,010	5,383	-3,759	0,99897	3,85
	-0,008	5,984	-21,651	0,99988	1,26
	-0,011	5,299	-18,836	0,99880	4,22
Sudanorange G	-0,011	5,464	-18,571	0,99954	2,62
	-0,007	4,842	-9,372	0,99968	2,27
	-0,006	6,233	-20,781	0,99981	1,75
Pararot	-0,011	5,347	-11,278	0,99913	3,54
	-0,013	5,519	-16,669	0,99785	5,54
	-0,010	5,415	-20,411	0,99906	2,65

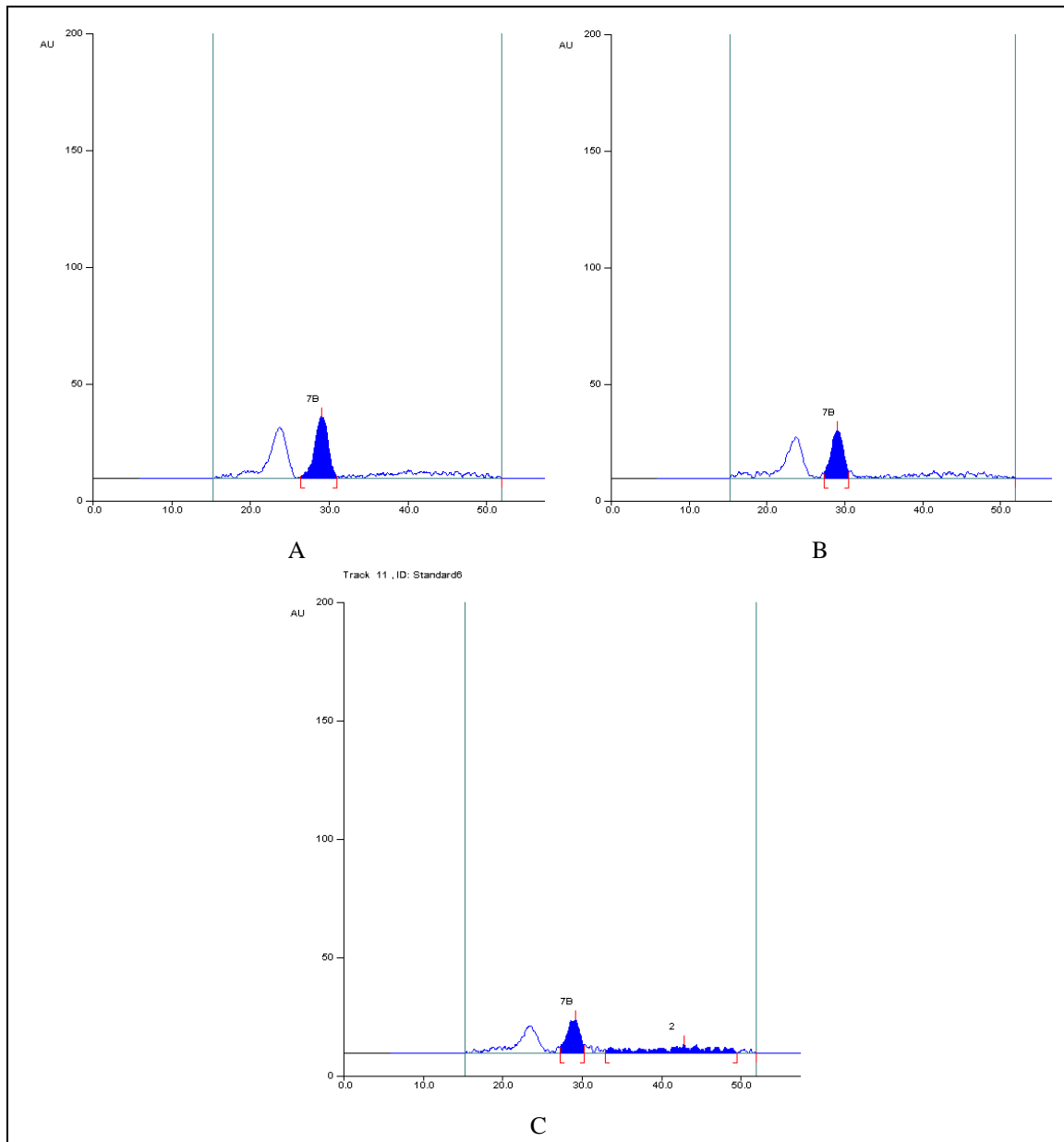


Abb. 67: Chromatogramme von Sudanrot 7B: A) 8 ng/Spot, B) 6 ng/Spot, C) 4 ng/Spot (Rauschen (2))

6.5 Kenngrößen der optimierten Trennung

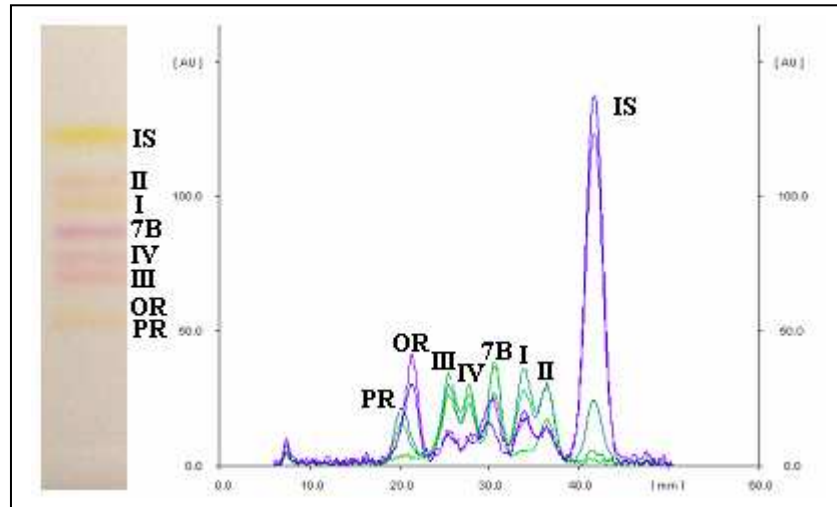


Abb. 68: Chromatogramm (alle Wellenlängen) der Trennung

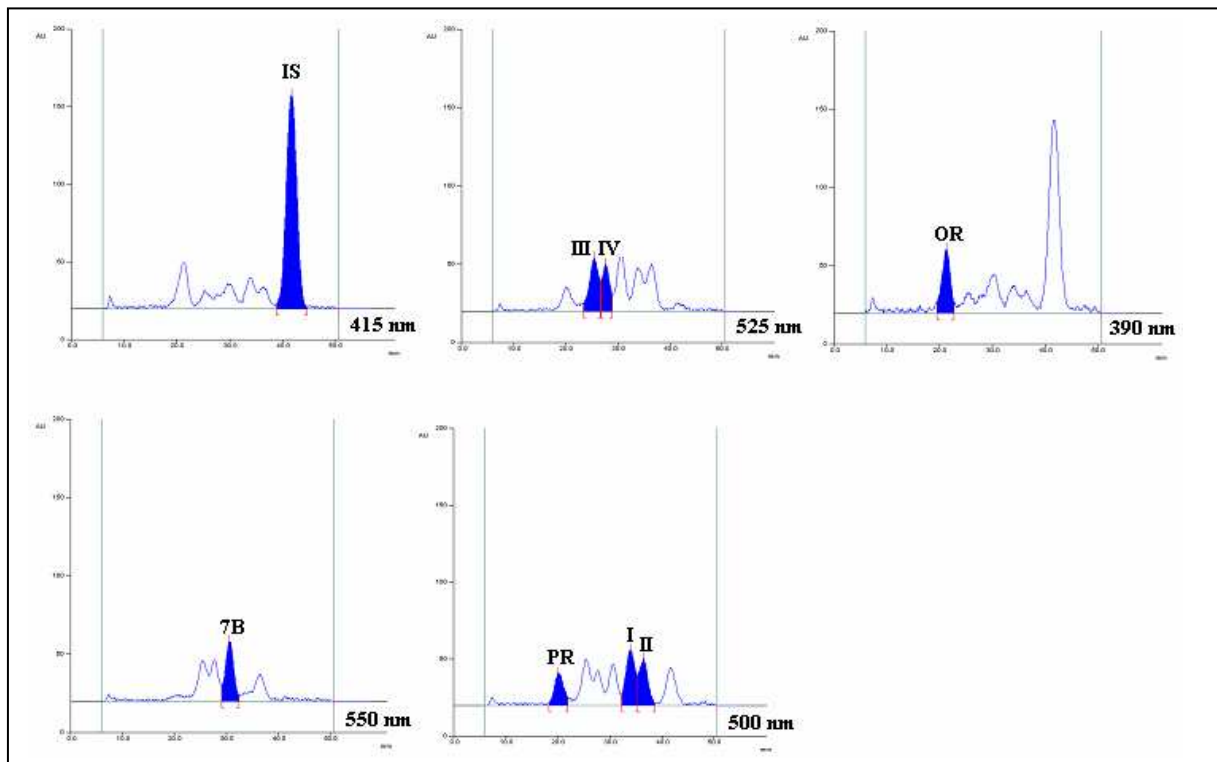


Abb. 69: Chromatogramme der Trennung Abb. 68 jeder Farbstoff bei seiner eigenen Messwellenlänge (Standards: 25 ng/Spot, IS 100 ng/Spot)

6.6 Probenvorbereitung

6.6.1 Silbernitrat und Bestrahlung

▪ Bestrahlung: Azofarbstoffe vs. Matrix

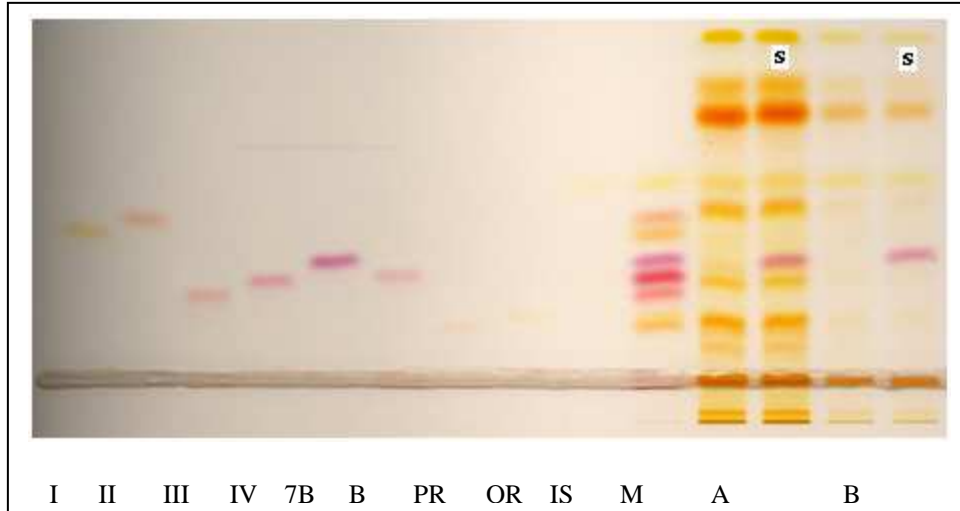


Abb. 70: Farbstoffe und Chilipulver (P3, E5) vor Bestrahlung; Auftragungsvolumina: A) 2 μ L, B) 10 μ L; (s: dotiert mit Sudanrot 7B und IS, 500 ppm)

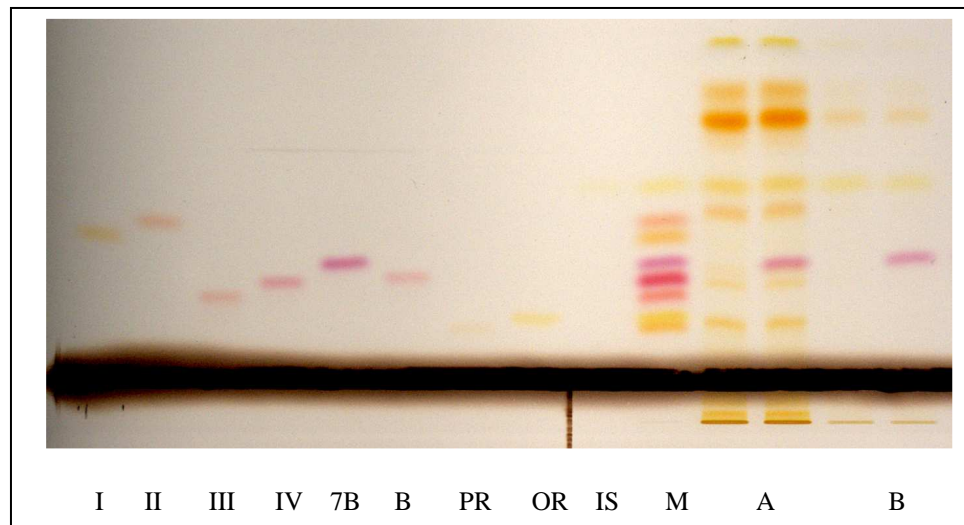


Abb. 71: Abb. 70, nach 5 min Bestrahlung

Tab. 45 : Wirkung der Bestrahlung auf die Peakfläche der Azofarbstoffe

Bestrahlungszeit [min]	Farbstoffe								
	I	II	III	IV	7B	B	Para	Or	IS
	Peakfläche [AU]								
0	3592	3805	3310	4661	8503	3357	1344	4484	3158
5	3526	3805	2981	4594	7561	3310	1027	3822	2651
10	3503	3792	2964	4470	7153	3268	966	3550	2635
15	3499	3721	2955	4450	6858	3235	962	3292	2381
25	3478	3675	2844	4410	6419	3232	999	3152	1993
	Normalisierte Peakfläche								
0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
5	0.98	1.00	0.90	0.99	0.89	0.99	0.76	0.85	0.84
10	0.98	1.00	0.90	0.96	0.84	0.97	0.72	0.79	0.83
15	0.97	0.98	0.89	0.95	0.81	0.96	0.72	0.73	0.75
25	0.97	0.97	0.86	0.95	0.75	0.96	0.74	0.70	0.63

▪ Bestrahlung vs. Silbernitrat

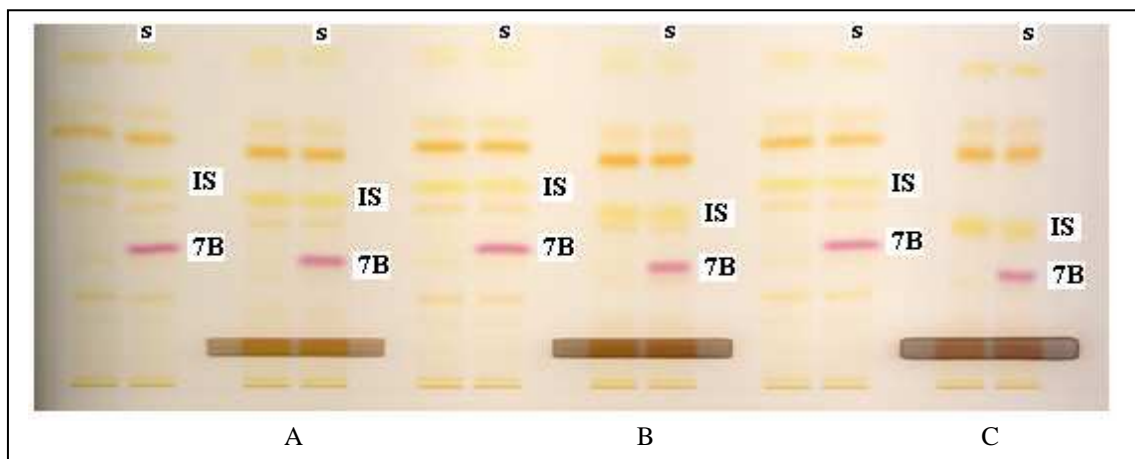


Abb. 72: Farbstoffe und Chilipulver (P3, E5) vor Bestrahlung; Auftragungsvolumina: A) 2 μ L, B) 10 μ L; (s: dotiert mit Sudanrot 7B und IS, 500 ppm); 3 cm Silbernitratbande : 115 (A), 225 (B) und 450 (C) ng AgNO_3/cm Band

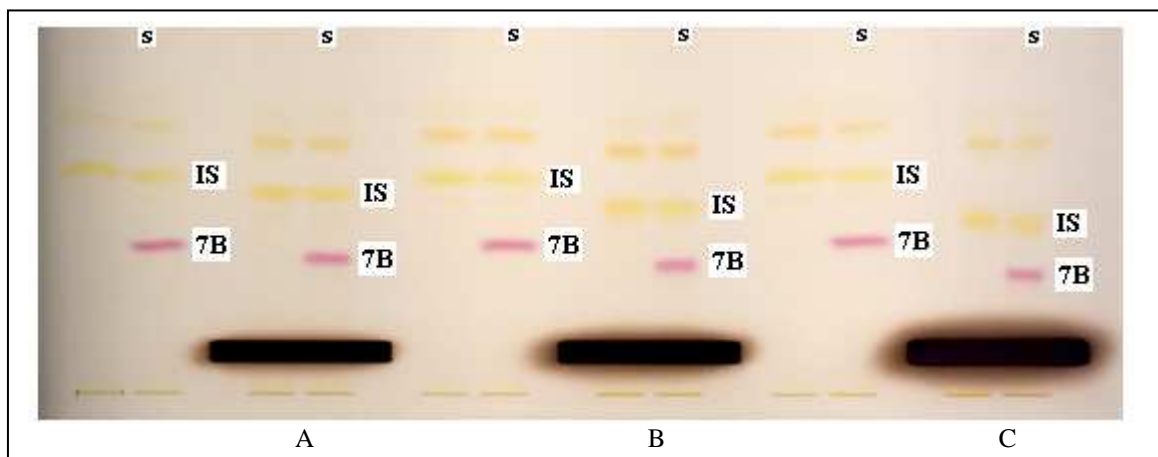


Abb. 73: Abb. 72, nach 5 min Bestrahlung

6.7 Wiederfindung

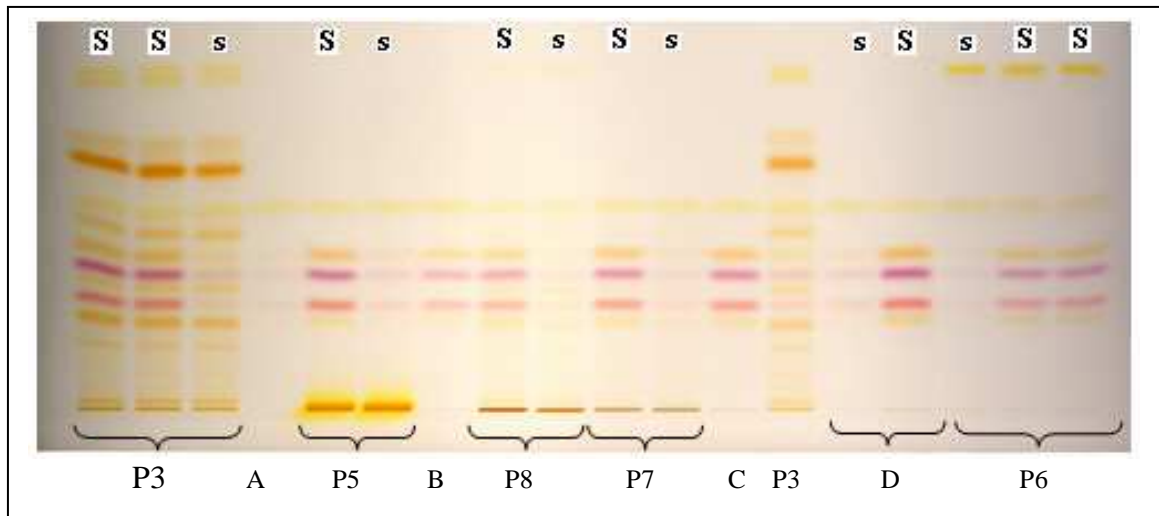


Abb. 74: Platte der Wiederfindungstests; Stammlösungsmischung von 10 (A), 50 (B), 100 (C) und 150 (D) ng/Spot; S (höher konzentrierte Dotierung), s (niedrig konzentrierte Dotierung)

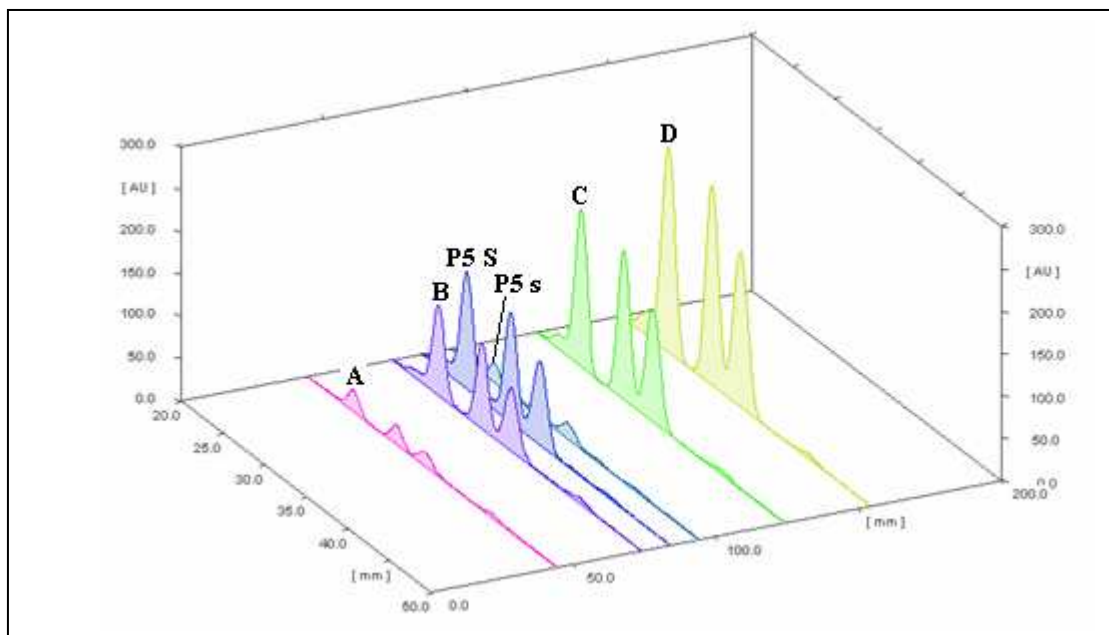


Abb. 75: Peaks von Sudanrot III (525 nm) der Kalibrierungskurve (A-D) und des Kurkumapulvers der hohen (300 ppm) und niedrigen (50 ppm) Konzentrationen

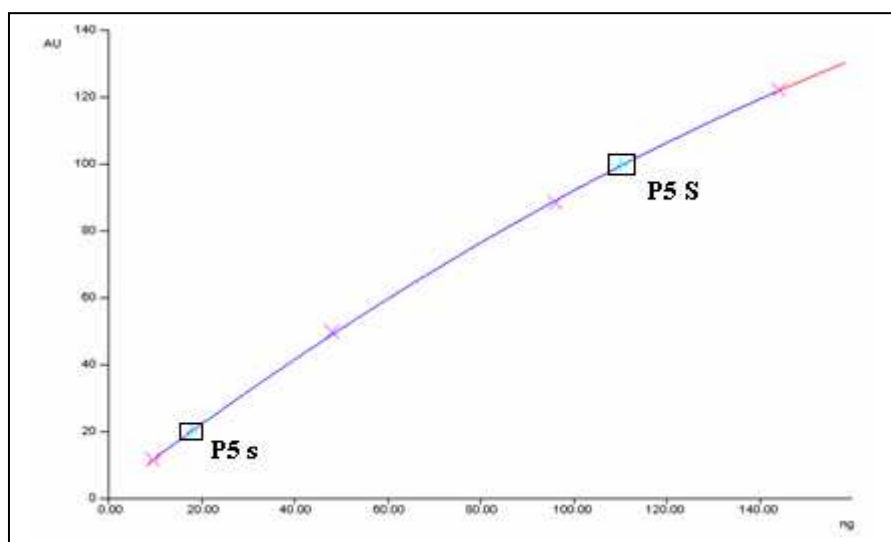


Abb. 76: Kalibrierkurve von Sudanrot III gemäß Abb. 74 und 75 $\text{Intensität [AU]} = -0,001568 \cdot (\text{Menge von Sudanrot III [ng/Spot]}^2 + 1,06 \cdot (\text{Menge von Sudanrot III [ng/Spot]} + 1,671$ ($r = 0,99993$, $\text{sdv} = 1,42\%$)

Tab. 46 : Wiederfindung in Kurkumapulver (P5, E5), gemäß Abb. 74, 75 und 76

	Höher konzentrierte Dotierung (300 ppm)	Niedrig konzentrierte Dotierung (50 ppm)
Theoretische Menge [ng/Spot]	115,68	19,28
Peakfläche [AU]	99,52	19,04
Bestimmte Menge [ng/Spot]	110,23	16,80
Wiederfindung [%]	104,9	114,8
Wiederfindung (2. Mal) [%]	106,5	112,4

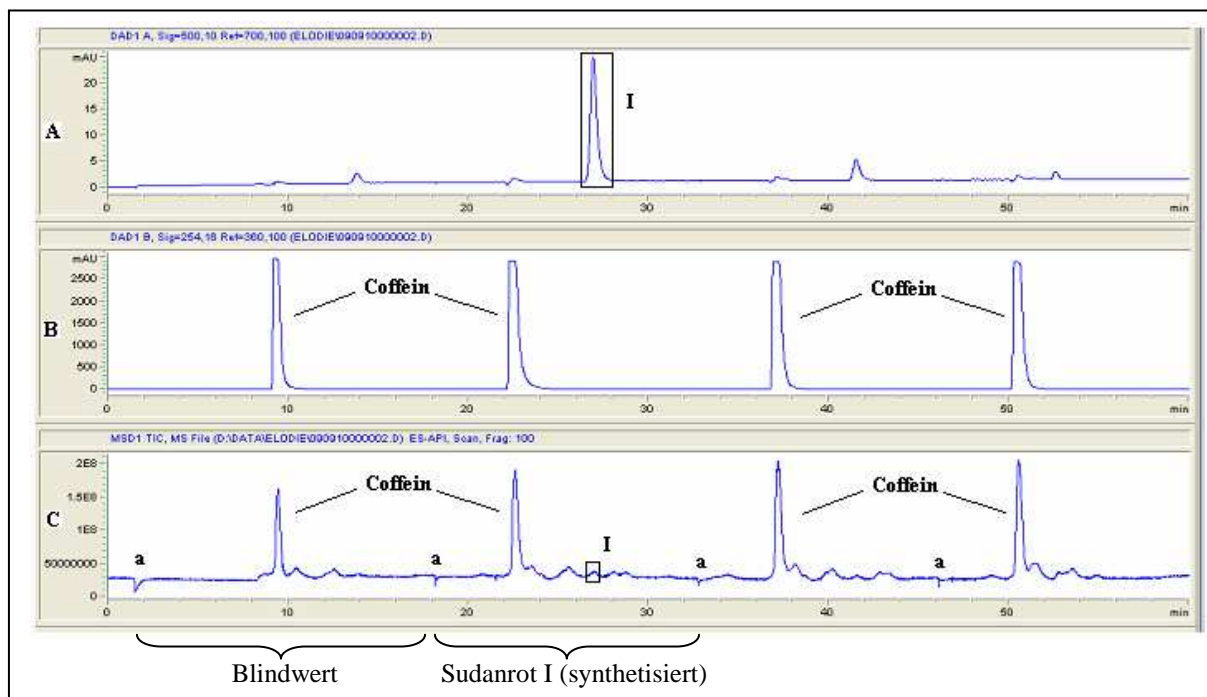


Abb. 77: Typisches Chromatogramm (A, 500 nm, B, 254 nm) und Totalionenstrom von einem Blindwert und Sudanrot I (synthetisiert), (a: Injektionspeak)

CBS

CAMAG BIBLIOGRAPHY SERVICE



**Ein hoch aktuelles Thema:
HPTLC zur Untersuchung von Lebensmitteln
auf unerlaubte Farbzusätze**

CAMAG 103

Nr. 103, September 2009

CAMAG Literaturdienst
Planar-Chromatographie
Herausgegeben von Gerda Morlock
cbs@camag.com
Eigenverlag CAMAG Schweiz

IN DIESER AUSGABE

Verfahren, Anwendungen

HPTLC-Bestimmung
verbotener Farbstoffe in Chili,
Paprika und Curry 2–4

Analyse wasserlöslicher
Farbstoffe in Lebensmitteln..... 5–9

Screening unbekannter
Pflanzenextrakte mittels
Planar-Chromatographie 10–12

HPTLC-Bestimmung
von unerlaubt zugesetzten,
fettlöslichen Azofarbstoffen
in Gewürzen 13–15

In dieser Ausgabe hervorgehobene Produkte und Dienstleistungen

Chromatogramm-
Tauchvorrichtung..... 11

DC-Plattenheizer 11

TLC-MS Interface
Neu: Jetzt auch mit ovalem
Elutionskopf 16

Rubrik: Kennen Sie CAMAG?

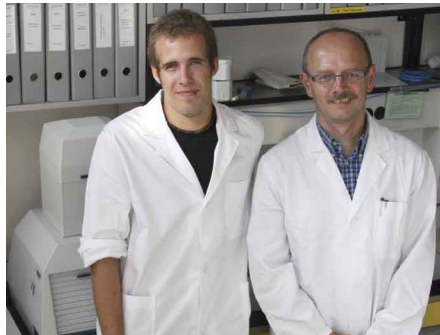
Wechsel im Bereich Finanzen..... 8



CAMAG (Schweiz)
Sonnenmattstr. 11 • CH-4132 Muttenz 1
Tel. +41 61 4673434 • Fax +41 61 4610702
info@camag.com

CAMAG (Deutschland)
Bismarckstr. 27–29 • D-12169 Berlin
Tel. +49 30 516 55 50 • Fax +49 30 795 70 73
info@camag-berlin.de
www.camag.com

HPTLC-Bestimmung verbotener Farbstoffe in Chili, Paprika und Curry



Von links nach rechts: Matthias Bleisch und Dr. Helmut Kandler

Als offizielle Lebensmittelkontrollbehörde ist das Kantonale Labor Zürich interessiert an neuen und/oder optimierten, zuverlässigen analytischen Methoden. Dr. Helmut Kandler, Abteilungsleiter Lebensmittelanalytik, und seine Mitarbeiter setzen seit mehreren Jahren HPTLC als wertvolle Ergänzung zu anderen Techniken ein. In Zusammenarbeit mit Dr. Eike Reich und Valeria Widmer vom CAMAG Labor in Muttenz wurde nun eine schnelle und zuverlässige HPTLC-Methode zur Bestimmung verbotener Farbstoffe in Gewürzen entwickelt und validiert.

Einleitung

Verschiedene Länder der Europäischen Union haben in den letzten Jahren in Proben von Chilipulver die Azofarbstoffe Sudan I–IV nachgewiesen. Diese synthetischen orangen und roten Farbstoffe sind für die Verwendung in Lebensmitteln nicht zugelassen, werden aber verbotenerweise eingesetzt, um die natürliche Farbe der Gewürze künstlich zu verstärken und damit mangelhafte Qualität zu kaschieren.

Die vorgestellte validierte RP-HPTLC Methode wird seit 2007 vom Kantonalen Labor Zürich erfolgreich in der Routine eingesetzt. Vor allem Chili-, Paprika-, Currypulver und Gewürzmischungen wurden auf die verbotenen Farbstoffe Sudan I, II, III, IV, Sudanrot B, Sudanrot 7B, Sudanrot G, Pararot, FD&C Orange 2, Buttergelb, Citrusrot 2, Toluidinrot und Dispers Orange 11 visuell gescreent. Eine zusätzliche Bestätigung und/oder Quantifizierung erfolgte im Falle von positiven Proben densitometrisch unter Anwendung einer Matrixkalibration. Verfälschte Gewürzprodukte zeigten typischerweise Kontaminationen über 100 mg/kg.

Standardlösungen

Je 20 mg Pararot, Sudan III, Sudan IV, Toluidinrot und Sudanrot 7B und je 20 mg Sudan I, Sudan II, Citrusrot 2, Buttergelb, Sudanrot B, FD&C Orange 2, Sudanrot G und Dispers Orange 11 wurden in Aceton bzw. Acetonitril gelöst und auf 100 mL aufgefüllt (200 µg/mL). Je 5 mL der Lösungen der entsprechenden Mischung wurden zur Trockne eingedampft (50 °C, 120 hPa) und in 10 mL Acetonitril aufgenommen (Farbstoff je 100 µg/mL in Mix 1- bzw. Mix 2-Standardlösung).

Probenvorbereitung

5 g homogenisierte Probe wurden mit 50 mL Acetonitril unter Rühren 10 min extrahiert und danach filtriert. Zu 10 mL Filtrat wurde tropfenweise Eisen(III)-chloridlösung (5 mg/mL in Acetonitril) bis zum Farbumschlag von rot nach grün (ca. 0.3–0.8 mL) zugegeben. Die Lösung wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 1 mL alkalischem Dichlormethan (250 mL Methylenchlorid mit 10 mL Ammoniak 25% ausgeschüttelt und abgetrennt) aufgenommen und über eine Festphasenextraktionssäule mit Kieselgel gereinigt. Das Eluat wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1 mL Acetonitril aufgenommen.

Aufgestockte Proben

In einem 100 mL Erlenmeyerkolben wurden je 5 g einer unkontaminierten Blindprobe mit 0.5, 1.5, 3, 4.5 und 6 mL der Mix 1- oder Mix 2-Standardlösung in Doppelbestimmung dotiert, mit Acetonitril auf 50 mL aufgefüllt und wie oben beschrieben extrahiert (Konzentration der dotierten Probe: 10–120 mg/kg).

Schicht

HPTLC-Platten Kieselgel RP18 F_{254s} 10 × 10 cm und 20 × 10 cm, Merck

Probenauftragung

Bandförmig mit Linomat 5, Bandlänge 8 mm, unterer Randabstand 8 mm, seitlicher Randabstand mind. 15 mm, Bahnabstand mind. 10 mm, Auftragevolumina 10 µL für Proben und 1–12 µL für Standardlösungen bzw. 3–15 µL nach 1:10 Verdünnung

Chromatographie

In der Automatischen Entwicklungskammer ADC2 mit Acetonitril – 25 % Ammoniak 19:1, Laufstrecke (vom unteren Plattenrand) 60 mm

Dokumentation

Mit DigiStore 2 oder TLC Visualizer unter Weisslichtbeleuchtung

Mix 1	R _F	R _{rel}			R _{rel}	R _F	Mix 2
Pararot	0.60	1.22			1.38	0.66	Disp. Orange 11
Citrusrot 2	0.54	1.10			1.23	0.59	Buttergelb
Sudan I*	0.49	1.00			1.10	0.53	Toluidinrot
Sudan II	0.33	0.67			1.00	0.48	Sudanrot G*
Sudan III	0.23	0.47			0.83	0.40	FD&C Orange 2
Sudan IV	0.16	0.33			0.44	0.21	Sudanrot 7B
-	-	-			0.31	0.15	Sudanrot B
-	-	-					

*Willkürlich gewählt als Bezugspunkt für den relativen R_F-Wert

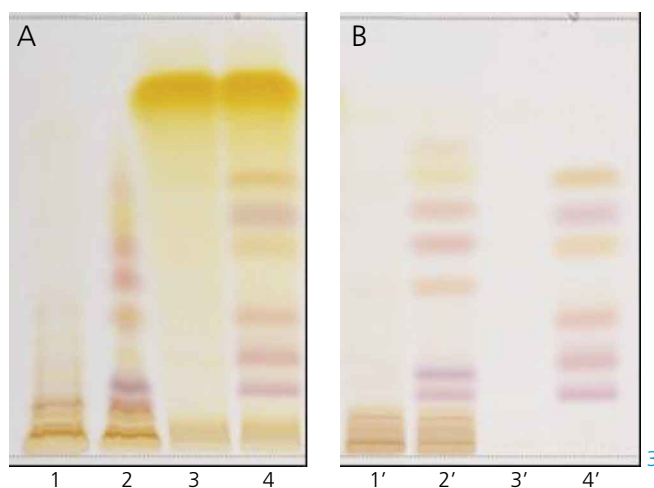
Densitometrie

Mehrwellenlängenscan mit dem TLC-Scanner 3 und winCATS Software beim jeweiligen Absorptionsmaximum der einzelnen Farbstoffe:

Farbstoff	λ _{max} (nm)	Farbstoff	λ _{max} (nm)
Sudan I	495	Sudanrot G	514
Sudan II	508	Sudanrot B	533
Sudan III	523	FD&C Orange 2	502
Sudan IV	534	Buttergelb	453
Pararot	498	Toluidinrot	522
Citrusrot 2	529	Dispers Orange 11	488
Sudanrot 7B	551		

Ergebnisse und Diskussion

Die Probenvorbereitung erwies sich als entscheidender Schritt der Analyse. Selektive Extraktion der synthetischen Farbstoffe wurde durch Zugabe einer Eisen(III)-chloridlösung erreicht, wodurch die natürlichen Gewürzpigmente zu farblosen Derivaten oxidiert wurden. Mit einer zusätzlichen Reinigung über Festphasenextraktion konnte der Einfluss der Probenmatrix weiter reduziert werden.

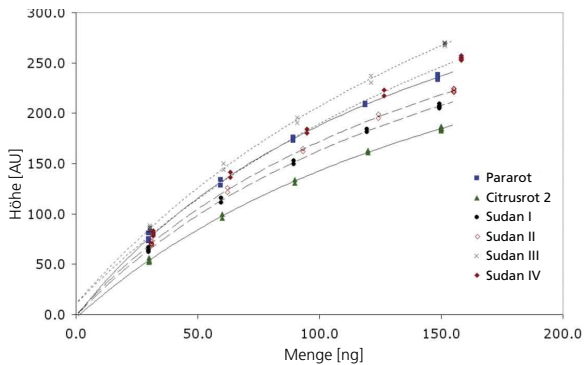


Einfluss des Oxidationsschrittes auf die Chromatographie: A: ohne Oxidation; B: Oxidation mit Eisen(III)-chlorid 1, 1': Paprika; 2, 2': Paprika dotiert mit 50 mg/kg der Standardlösung Mix 2; 3, 3': Curry; 4, 4': Curry dotiert mit 50 mg/kg der Standardlösung Mix 1

Die in der Routine angewendete Methode wurde bezüglich Güte der Kalibrierfunktion, Matrixkalibrierfunktion, Methodenpräzision und Nachweisgrenzen validiert. Zunächst wurden Kalibrierkurven im unteren (30–150 ng/Zone) und oberen (100–1200 ng/Zone) Konzentrationsbereich erstellt und mit einer Michaelis-Menten 2-Funktion ausgewertet.



4 Chromatogramm von Mix 1: Die tiefste und die höchste Konzentration wurden jeweils 5-mal aufgetragen (Mitte der Platte) sowie doppelt der gesamte Konzentrationsbereich (links und rechts).

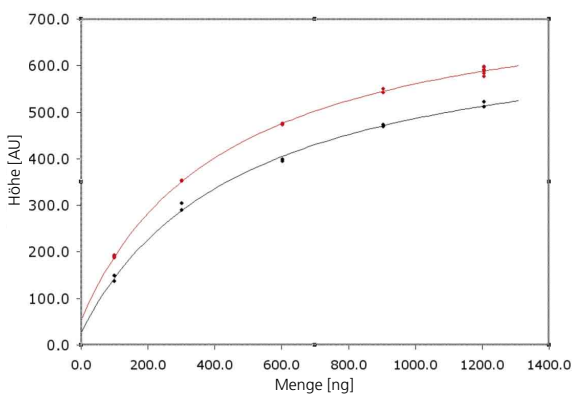


5 Kalibrationskurven der Mix 1-Farbstoffe im unteren Konzentrationsbereich

Kalibration von 13 Farbstoffen (Mix1, Mix2)	%RSD bei tiefster Konzentration	%RSD bei höchster Konzentration	sdv* (%)
Unterer Konzentrationsbereich	2.3–6.7	0.5–2.9	1.2–3.8
Oberer Konzentrationsbereich	0.7–6.4	0.3–4.3	0.5–4.8

*sdv= Relative Reststandardabweichung der Kalibrierkurven

Die Matrixkalibration wurde mit aufgestockten Paprika- und Curryproben im Bereich von 10–120 mg/kg geprüft. Die erhaltenen Matrixkalibrationskurven waren vergleichbar mit direkter Kalibration der Standards, die etwas tieferen Werte lassen sich durch einen gewissen Probenverlust während der Aufarbeitung erklären. In einzelnen Fällen wurden aufgrund schwacher Matrixinterferenzen etwas höhere Werte gemessen (Bsp. Sudan I in Paprikapulver).



6 Vergleich der Kalibrationskurven: Standardlösung Sudanrot B (rote Kurve) und Sudanrot B in Currypulver (schwarze Kurve)

Aufgrund der festgestellten Matrixeffekte lassen sich Wiederfindungen nur bedingt bestimmen. Eine detaillierte Prüfung und Bestimmung der einzelnen Wiederfindungen wurde daher nicht durchgeführt.

Zur Bestimmung der Präzision der Methode (0.4–7.0 %) wurden jeweils 6 Proben Paprika und Curry mit 50 mg/kg der Standardlösungen Mix 1 bzw. Mix 2 aufgestockt und unter Anwendung einer Matrixkalibration quantifiziert.

Die realen Nachweisgrenzen wurden aus einer Matrixkalibration (Bereich: 1–17 mg/kg) aufgestockter Paprika und Curryproben abgeschätzt. Mit densitometrischer Auswertung wurde im Vergleich zur visuellen Beurteilung eine um den Faktor 2 tiefere Nachweisgrenze für Paprika und Curry erreicht.

	Nachweisgrenze (visuell)	Nachweisgrenze (densitometrisch)
Curry	ca. 3 mg/kg (5 mg/kg Sudan I, 7 mg/kg Buttergelb, 13 mg/kg Dispers Orange)	1–3 mg/kg (7 mg/kg Dispers Orange)
Paprika	ca. 3 mg/kg (5 mg/kg Sudan I und Buttergelb, 12 mg/kg Dispers Orange)	1–3 mg/kg

Bei der Untersuchung auf dem Markt erhältlicher Produkte wurde festgestellt, dass mit verbotenen Farbstoffen verfälschte Gewürze typischerweise mit mehr als 100 mg/kg belastet sind. Eine Kontamination im tieferen mg/kg-Bereich war nicht Gegenstand dieser Untersuchungen, da in diesen Mengen die gewünschte Farbverstärkung nicht erreicht wird. Die vorgestellte Methode erwies sich damit als geeignet für den schnellen, empfindlichen und reproduzierbaren Nachweis einer Verfälschung von Gewürzen mit verbotenen Farbstoffen.

Weitere Informationen sind bei den Autoren auf Anfrage erhältlich.

[1] H. Kandler, M. Bleisch, V. Widmer, E. Reich, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 32 (2009) 1273

Kontakt: Dr. Eike Reich, CAMAG Labor, Sonnenmattstr. 11, 4132 Muttenz, Schweiz, eike.reich@camag.com

Analyse wasserlöslicher Farbstoffe in Lebensmitteln



Claudia Oellig

Am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim in Stuttgart wird die Planar-Chromatographie aufgrund ihrer Vorteile in der Lebensmittelanalytik eingesetzt. Claudia Oellig nutzte diese Technik im Rahmen ihrer Wissenschaftlichen Abschlussarbeit.

Einleitung

In den vergangenen Jahren wurde die Anzahl zugelassener Lebensmittel-Farbstoffe aus Gründen der Lebensmittelsicherheit deutlich reduziert. Durch die EG-Verordnung 94/36 werden die etwa 40 zugelassenen Lebensmittel-Farbstoffe hinsichtlich ihrer Einsatzbereiche und ihrer Höchstmengen geregelt. Zur Sicherung des Verbraucherschutzes sind schnelle und effiziente quantitative Bestimmungsmethoden notwendig, da manche Farbstoffe ein kanzerogenes Gefährdungspotential besitzen. Bisherige DC/HPTLC-Methoden waren für die Trennung von 9–12 Lebensmittel-Farbstoffen ausgerichtet. Ziel war es, eine Methode zu entwickeln, bei der die wichtigsten wasserlöslichen Lebensmittel-Farbstoffe quantifiziert werden können.

Im Vergleich zu vorhandenen Methoden zur Farbstoffanalytik ist die neue HPTLC-Methode eine zuverlässige, schnelle und kosteneffektive quantitative Alternative [1–3]. Sie ermöglicht einen Durchsatz von 1000 Proben/Tag mit geringen laufenden Kosten. Für eine Probe berechnet sich die gesamte Analysenzeit auf 1.5 min mit einem Lösungsmittelverbrauch von 200 µL. Der analytische Aufwand kann graduell nach Notwendigkeit gewählt werden – von

visueller Auswertung über die spektrale Korrelation der Absorptionsspektren bis hin zur Aufnahme von Massenspektren.

Probenvorbereitung

Kommerziell erhältliche Lebensmittel wurden entsprechend mit Methanol – Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.8) 1:1 verdünnt und bei Bedarf entgast.

Standardlösungen

Die Farbstoffe wurden in Methanol – Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.8) 1:1 in folgenden Konzentrationen gelöst:

Mix 1			Mix 2			Mix 3		
Farbstoffe	Konzentr. [ng/µL]	hR_f	Farbstoffe	Konzentr. [ng/µL]	hR_f	Farbstoffe	Konzentr. [ng/µL]	hR_f
E 100	30	93	E 103	50	86	E101	30	72
E 101b	45	5	E 104	100	55	E102	20	19
E 110	20	57	E 120	70	0	E 105	25	53
E 122	20	71	E 121	125	93	E 129	15	60
E 124	15	27	E 123	8	25	E 133	8	26
E 126	30	10	E 125	60	72	E 141Na	860	86
E 127	10	93	E 151	15	15	E 141Cu	200	97
E 131	10	40				E 163	300	0
E 132	200	0						
E 142	8	23						

Schicht

HPTLC-Platten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), 20 x 10 cm, vorgewaschen durch Chromatographie mit Methanol – Wasser 4:1

Probenauftragung

Bandförmig mit DC-Probenautomat 4, 18 Bahnen, Bandlänge 7,5 mm, Bahnabstand 9 mm, seitlicher Randabstand 24 mm, unterer Randabstand 8 mm (bei beidseitiger Auftragung 5 mm), Auftragevolumen 2 µL (Proben) bzw. 1–4 µL (Standardgemische)

Chromatographie

In der Doppeltrogkammer 20x10 cm mit 8 mL Ethylacetat – Methanol – Wasser – Essigsäure 65:23:11:1, Laufstrecke max. 50 mm, Laufzeit 12 min; alternativ kann auch die ADC2 oder HDC eingesetzt werden, insbesondere, wenn ein hoher Probendurchsatz gefordert wird.

Dokumentation

Mit TLC-Visualizer bei UV 254, UV 366 nm und Weisslicht-Beleuchtung

Densitometrische Auswertung

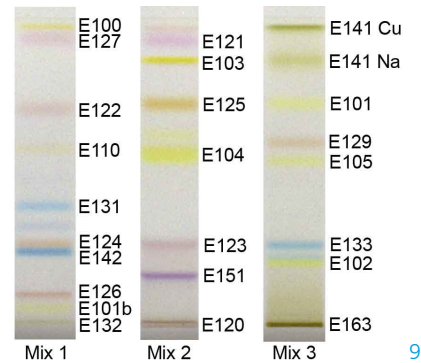
- Digitale Bildauswertung mit VideoScan-Software (Savitsky Golay-Filterweite: meist 7 oder 9, Basislinienkorrektur: geringste Steigung, Einsatz unterschiedlicher elektronischer Filter) oder
- Auswertung mit TLC-Scanner 3 und winCATS-Software, Absorptionsmessung über den Mehrwellenlängen-Scan bei 11 verschiedenen Wellenlängen [1]

Spektrenaufnahme (Vis, MS)

- Aufnahme der Vis-Spektren (400–800 nm) und Berechnung der Spektrenkorrelationen (Probe versus Standard) mit TLC-Scanner 3 und winCATS-Software und/oder
- Aufnahme der HPTLC/ESI-Massenspektren mit einem Prototyp des TLC-MS-Interface (Extraktionsmittel Methanol, Flussrate 0,2 mL/min)

Ergebnisse und Diskussion

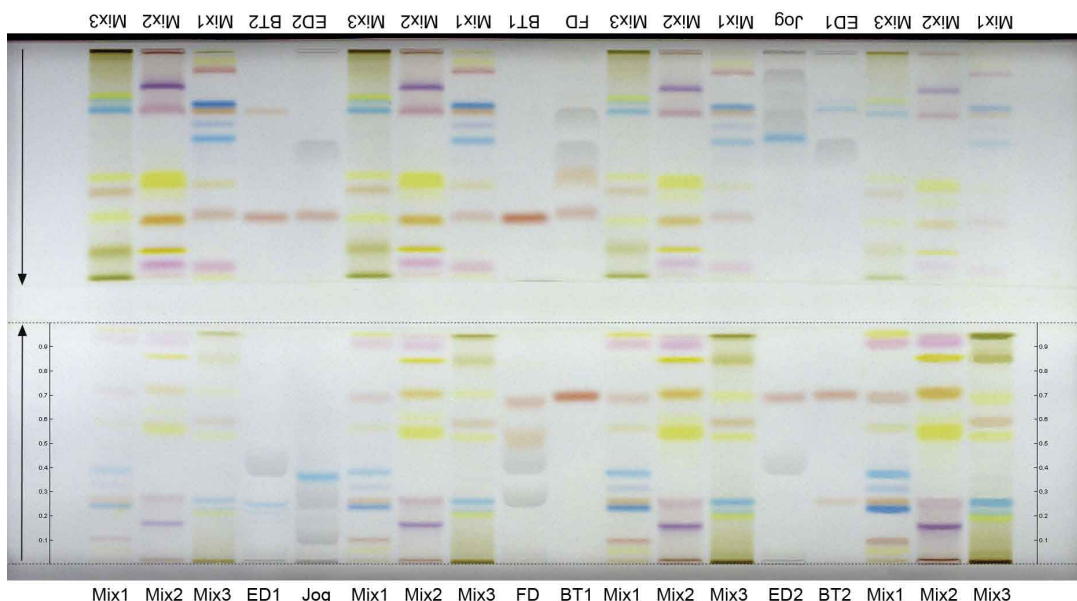
Die Trennung auf Kieselgel-Platten war mit Ethylacetat – Methanol – Wasser – Essigsäure 65:23:11:1 als Fließmittel optimal. Der Säuregehalt von 1% erwies sich für die Fokussierung der Zonen als entscheidend. Wie in der Literatur üblich, wurden die Lebensmittelfarbstoffe zur besseren Quantifizierung in Farbstoffgemische aufgeteilt.



Trennung von 25 wasserlöslichen Lebensmittelfarbstoffen, aufgeteilt in 3 Farbstoff-Mischungen (Farbstoffe zum Teil nur zu 50 bzw. 85 % rein)

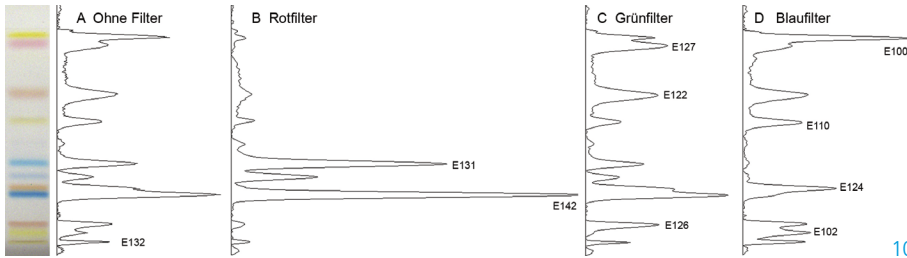
Bei einer Laufstrecke von max. 50 mm betrug die benötigte Trennzeit 12 min. Bei Entwicklung in der HDC wurden 36 Läufe simultan unter identischen Bedingungen entwickelt. Pro Probe berechneten sich die Chromatographiezeit auf 20 s und der Lösemittelverbrauch auf 220 µL; die Entsorgungskosten lagen deutlich unter 0,01 Cent. Die gesamte Analysenzeit (inkl. Probenvorbereitung, Auftragung und digitaler Bildauswertung) betrug 1,5 min – im Zeitalter ultraschneller Chromatographie-Methoden ein Spitzenwert.

Bei hoher Matrixbelastung waren die Flächenauftragung und/oder ein Verdünnen der Probe samt einer guten digitalen Bildauswertung *conditio sine qua non*. Im Falle von Proben mit Farbstoffen vom hR_f -Wert 0 (E120, E132, E163) wurde die Platte mit einem elutionsstärkeren Fließmittel, z.B. im Verhältnis 45:35:18:2 zweimal auf 1 cm entwickelt (je 6 s).



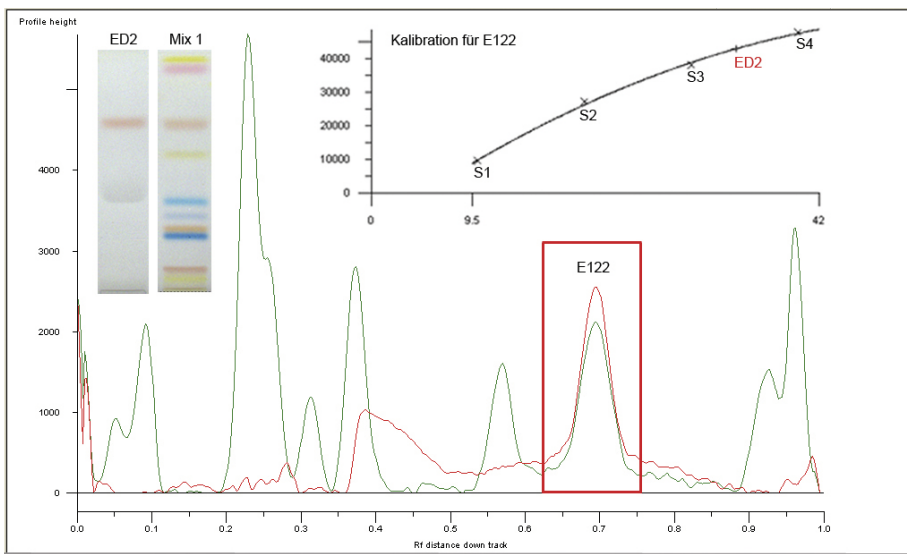
Analytik von 12 Lebensmittelproben (Energydrink (ED), Joghurt (Jog), Fruchtgetränk (FD), Bäckereitinten-Formulierung (BT)) auf 25 wasserlösliche Lebensmittelfarbstoffe durch anti-parallele Entwicklung in 12 min

Die Quantifizierung erfolgte mittels Mehrwellenlängen-Scan durch Absorptionsmessung im ultravioletten und sichtbaren Bereich oder über die digitale Quantifizierung des Plattenfotos.



Digitale Bildauswertung unter Einsatz von elektronischen Filtern (B–D) zur verbesserten post-chromatographischen Auflösung von Farbzonen (Mix 1)

10

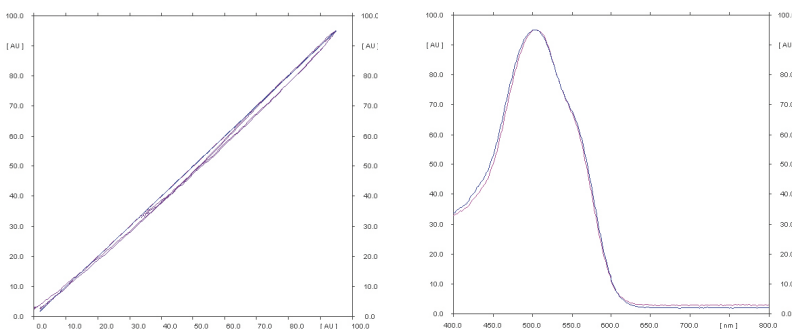


Digitale Bildauswertung (ohne Filter) der verdünnten Energydrink-Probe 2 (ED2), die den roten Farbstoff E122 (Mix 1) enthält; Überlagerung der Analogkurven von Probe (rot) und Mix 1 (grün) sowie polynome Kalibrierfunktion (Peakfläche)

11

Exemplarisch die Auswertung für einige Lebensmittel, wobei die Identität über die Spektrenkorrelation und das Massensignal abgesichert wurde.

Bezeichnung	Ermittelte Farbstoffe	Bestimmte Konzentration	%RSD (n=2)	Identität	
				Spektrenkorrelation (400–800 nm) von Standard und Probe	Massensignal(e) (full scan, m/z 100–900)
Bäckerei-Tinte	122	66,4 g/L	0,0	$\geq 0,99996$	228 [M-2Na] ²⁻
	124	13,3 g/L	2,1	$\geq 0,99957$	279 [M-2Na] ²⁻ 178 [M-3Na] ³⁻
Energydrink 1	133	9,1 mg/L	0,1	$\geq 0,99964$	373 [M-2Na] ²⁻
Energydrink 2	122	76,2 mg/L	3,6	$\geq 0,99958$	228 [M-2Na] ²⁻



Korrelation der Vis-Spektren von Standardzone E122 und der entsprechenden Zone in Energydrink 2

12

Fortsetzung auf Seite 9

Kennen Sie CAMAG?



13

Wechsel im Bereich Finanzen



14

Herr Christian Gfeller ist seit 1966 bei CAMAG. 42 Jahre lang hat er als Leiter des Bereichs Finanzen (CFO) die Geschicke des Unternehmens in guten und in schwierigen Zeiten massgebend mitbestimmt. Seit 1992 ist er Mitglied des Verwaltungsrates und seit 2003 dessen Präsident. Mitte 2008 gab er seine Funktion als CFO an Frau Sabine Bühler weiter.

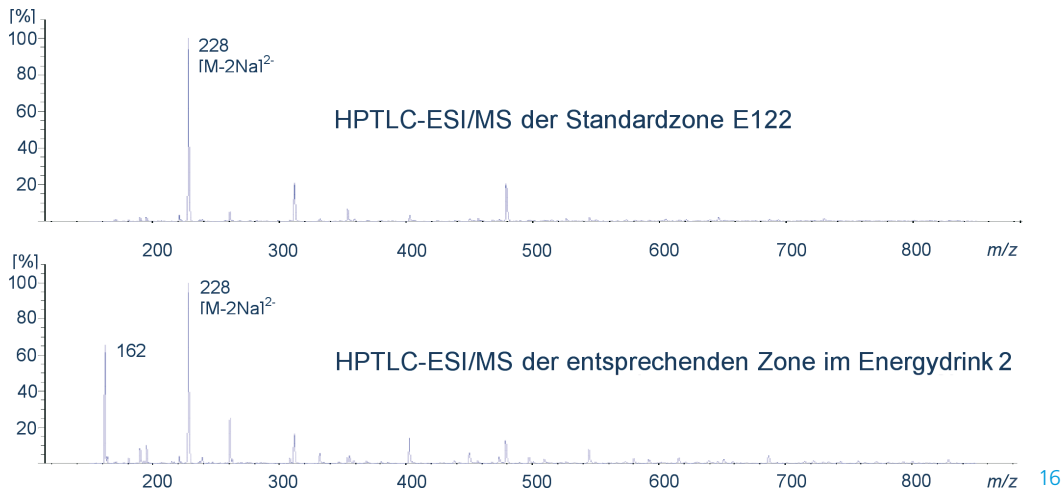
Wir wünschen uns, dass Herr Christian Gfeller noch lange Zeit als Präsident des Verwaltungsrats der CAMAG zur Verfügung steht.



15

Frau Sabine Bühler ist seit 1. Dezember 2007 bei CAMAG. Sie besitzt das Handelsdiplom der École Supérieure de Commerce in Neuchâtel seit 1987 und absolvierte in den darauf folgenden Jahren Weiterbildungen in den Bereichen Betriebswirtschaft, Personalführung, Controlling und Unternehmensführung. Fachliche Erfahrungen erwarb sie sich bei Schweizer und internationalen Unternehmen als Leiterin Administration, Finanzen und Personal.

Seit ihrem Eintritt bei CAMAG zeichnete sie sich aus durch Kompetenz, schnelle Auffassungsgabe in unserem sehr speziellen technischen Arbeitsgebiet sowie vor allem durch ihre absolute Vertrauenswürdigkeit. So kann Herr Gfeller guten Gewissens den Stab an Frau Sabine Bühler übergeben.



HPTLC-ESI/MS-Spektren der Standardzone E122 (m/z 228 $[M-2Na]^{2-}$) und der entsprechenden Zone in Energydrink 2 (m/z 162 aus der Matrix, Chromatographie ohne Essigsäure)

Je nach vorliegender Analyse kann der Grad der Auswertung von visueller Begutachtung über die Aufnahme von Vis-Spektren bis hin zur Aufnahme von Massenspektren erfolgen. Daher ist das offline-Prinzip optimal um Kosten zu minimieren und ein sehr hohes Probenaufkommen leicht zu bewältigen.

	HPLC [4]	HPTLC
Mobile Phase	0,58	0,003
Stationäre Phase	0,64	0,11
Entsorgung	0,04	0,0001
Kosten/Lauf (€)	1,26	0,11
		=> 11 x günstiger
Auftragen/Injektion		0,50
Laufzeit	43	0,20
Detektion		0,10
Zeit/Lauf (min)	43	0,80
		=> 54 x schneller
davon Arbeitszeit/40 Läufe	keine	5 min

Weitere Informationen sind vom Autor auf Anfrage erhältlich.

- [1] G. Morlock, C. Oellig, J AOAC Int 92 (2009) 745
- [2] G. Morlock, W. Schwack, Die Aktuelle Wochenschau der GDCh (2009) Woche 21 und 26, www.aktuelle-wochenschau.de/index09.htm
- [3] G. Morlock, W. Schwack, GIT 9 (2009) 489–492
- [4] K. Miniotti et al., Anal Chim Acta 583 (2007) 103

Kontakt: Dr. G. Morlock, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim, 70599 Stuttgart, gmorlock@uni-hohenheim.de

Screening unbekannter Pflanzenextrakte mittels Planar-Chromatographie



Von links nach rechts: M. Schulz, S. Minarik, C. Wirth und M. Oberle

Nicht nur bei der Herstellungskontrolle der DC/HPTLC-Schichten, auch in der Routineanalytik verwendet Merck die Planar-Chromatographie. Dieser Beitrag entstand durch eine Zusammenarbeit der Laboratorien Dünnschicht-Chromatographie und Kosmetik in der Forschungsabteilung Performance & Life Science Chemicals.

Einleitung

Die Planar-Chromatographie findet Anwendung in einer Vielzahl kosmetischer Applikationen. Typische Anwendungen sind Wirkstoff-Screening, Applikationen mit schwer aufzuschliessenden Proben und auch Quantifizierungen von Wirkstoffen wie z. B. UV-Filtersubstanzen. In dieser Arbeit wird die HPTLC als Screening-Methode zur Erstanalyse potentieller Wirkstoffe auf Pflanzenextraktbasis beschrieben. Dazu liegt einerseits der Schwerpunkt bei Substanzen, die durch ihre kosmetische Relevanz und ihren hohen Gehalt in der Pflanze auffallen und andererseits bei der Substanzklasse der Flavonoide, die in der Kosmetik als wirksame Naturstoffe anerkannt sind.

Die Vorteile der Planar-Chromatographie können hier hervorragend genutzt werden. Es werden viele Proben auf einer Platte parallel analysiert und damit geringe Analysezeiten und -kosten erreicht. Eine hohe Flexibilität in der Detektion wird durch den Einsatz verschiedener Derivatisierungsreagenzien gewährleistet. Potentielle Wirkstoffkandidaten lassen sich schnell und einfach identifizieren und im nächsten Schritt mit strukturaufklärenden Methoden weitergehend charakterisieren.

Standardlösung

Chlorogensäure, Hyperosid, Rutin, Quercetin und Kaempferol in Methanol (0.1 %ig)

Probenvorbereitung

Die Pflanze wird zerkleinert und zu einem Rohextrakt verarbeitet. Aus dem Rohextrakt werden durch flüssig/flüssig-Extraktion drei weitere Extrakte unterschiedlicher Polarität hergestellt.

Schicht

HPTLC-Platten Kieselgel 60 F_{254s} Merck, 20 x 10 cm

Probenauftragung

Bandförmig mit dem DC-Probenautomat 4, Bandlänge 5 mm, Bahnabstand 10 mm, Abstand vom unteren Rand 10 mm, Auftragevolumen 5 µL

Chromatographie

In der Doppeltröckammer 20 x 10 cm mit Ethylacetat – Ameisensäure – Eisessig – Wasser 100:11:11:27

Postchromatographische Derivatisierung

Mit dem DC-Sprühgerät werden folgende Derivatisierungen durchgeführt*:

- Naturstoffreagenz nach Neu (NSR): 1 % Diphenylbor-säure-2-aminoethylester in Methanol → UV 366 nm
- Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (AAS): 0,5 mL Anisaldehyd in 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 8 mL konzentrierter Schwefelsäure (zugesezt unter Eiskühlung) → Platte bei 90–125 °C für max. 15 min erhitzen → Weisslicht
- Diphenyl-2-picrylhydrazyl-Reagenz (DPPH): 0,1 % Diphenyl-2-picrylhydrazyl in Methanol → Platte bei 40 °C für max. 2 min erwärmen → Weisslicht
- Rhodamin B-Reagenz (RDB): 0,1 % Rhodamin B in Methanol → UV 366 nm
- Dragendorff-Reagenz (DRR): Merck Fertiglösung → Platte bei 40 °C für max. 2 min erwärmen → Weisslicht

*Anmerkung: Das Tauchen sollte dem Sprühen aus vielfältigen Gründen vorgezogen werden, wie z. B. homogenere Aufbringung des Reagenzes auf die Schicht, weitaus geringere Laborluftbelastung und sauberer Arbeitsplatz.

Ergebnisse und Diskussion

In den zwei folgenden Beispielen wurde jeweils der Rohextrakt einer Pflanze (Bahn 1) und deren drei Extrakte von unterschiedlicher Polarität (A–C in steigender Polarität, Bahn 2–4) chromatographiert und mit unterschiedlichen Derivatisierungsreagenzien detektiert.

Reagenz	detektiert
NSR (Naturstoffreagenz nach Neu)	Flavonoide, Penicillinsäure, Kohlenhydrate, Anthocyanidine
AAS (Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz)	Ätherische Ölkomponten, Terpene, Steroide, Sapogenine, Prostaglandine, Antioxidanzien, Antibiotika
DPPH (Diphenyl-2-picrylhydrazyl-Reagenz)	Ätherische Öle
RDB (Rhodamin B-Reagenz)	Lipophile Substanzen, Lipide, Phenole, Polyphenole, Flavonole, Tenside
DRR (Dragendorff-Reagenz)	Alkaloide

Beispiel 1

Mit dem NSR-Reagenz wurden z. B. im Extrakt A (Bahn 2) die unpolaren Chlorophyll-Verbindungen als rote Bande im Frontbereich und im Extrakt C (Bahn 4) Pflanzensäuren detektiert.

Als Hauptkomponente wurde eine Pflanzensäure angenommen, deren R_f -Wert über dem der Chlorogensäure (Bahn 5, blaue Bande bei R_f 0,5-0,6) liegt. Diese Verbindung ist in den Extrakten B und C (Bahn 3 und 4) angereichert. Sie reagiert mit dem AAS- und sehr intensiv mit dem DPPH-Reagenz, was auf eine antioxidative Wirkung deutet. Weiterhin ist der Chlorophyllanteil im Rohextrakt (Bahn 1) und in den Extrakten A und B (Bahn 2 und 3) zu erkennen. Dieser zeigt auch mit DRR eine Farbreaktion. Ausser im Extrakt A können weitere Verbindungen sowohl mit höherem als auch mit niedrigerem R_f -Wert nachgewiesen werden, welche mit NSR hellblaue und mit AAS bräunliche Zonen ergeben.

Beispiel 2

Im zweiten Pflanzenbeispiel liegen als Hauptkomponenten neben Pflanzensäuren auch Flavonoide vor. Mit dem NSR-Reagenz ist dies erkennbar (1) am R_f -Bereich, (2) der gelben, grünen bzw. hellblauen Färbung der Banden und (3) der Anreicherung in den Extrakten B und C (Bahn 3 und 4). Weiterhin sieht man im Extrakt B (Bahn 3) die grüngelbe Bande, welche für ein Kaempferol-Derivat spricht, und die gelbe Bande an der Front, welche das Quercetin



18

Chromatogramm-Tauchvorrichtung

Die Derivatisierung durch automatisiertes Tauchen hat gegenüber dem manuellen Sprühen in vielen Fällen eindeutige Vorteile. Durch die Einstellung einer gleichmässigen, vertikalen Tauchgeschwindigkeit (wählbar zwischen 30 und 50 mm/s) und Verweilzeit (wählbar von 1 bis 8 s sowie unendlich) lassen sich die Tauchbedingungen standardisieren. Durch die homogene Reagenzaufbringung werden Fließmittelfront-ähnliche Tauchlinien vermieden, die bei der densitometrischen Auswertung störend wirken. Das batteriebetriebene Gerät ist auf eine Eintauchtiefe für 10 und 20 cm hohe Platten einstellbar.

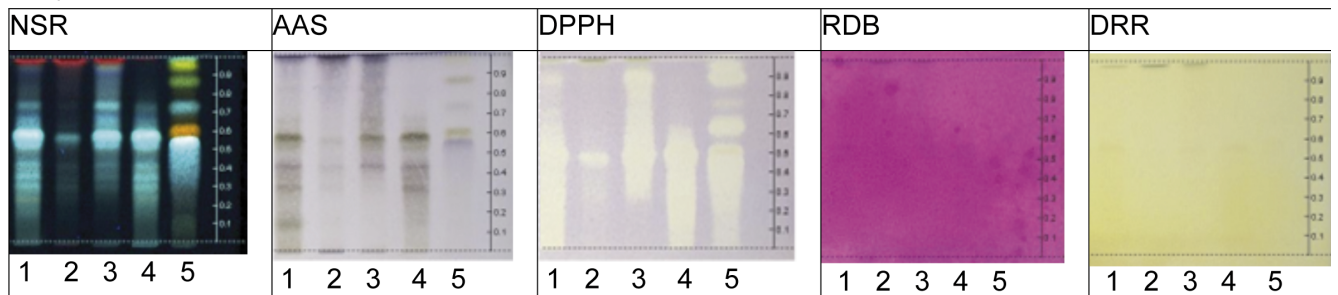


19

DC-Plattenheizer

Für viele Reaktionen ist eine kontrollierte Temperaturerhöhung erforderlich. Der Temperatur-Regelbereich des DC-Plattenheizers beträgt 25–200 °C und ermöglicht eine gleichmässige Erhitzung über die ganze Platte. Das CERAN®-Keramikfeld ist mit einem Raster versehen, der die richtige Platzierung der Platte erleichtert. Es ist beständig gegenüber allen üblichen Reagenzien und leicht zu reinigen.

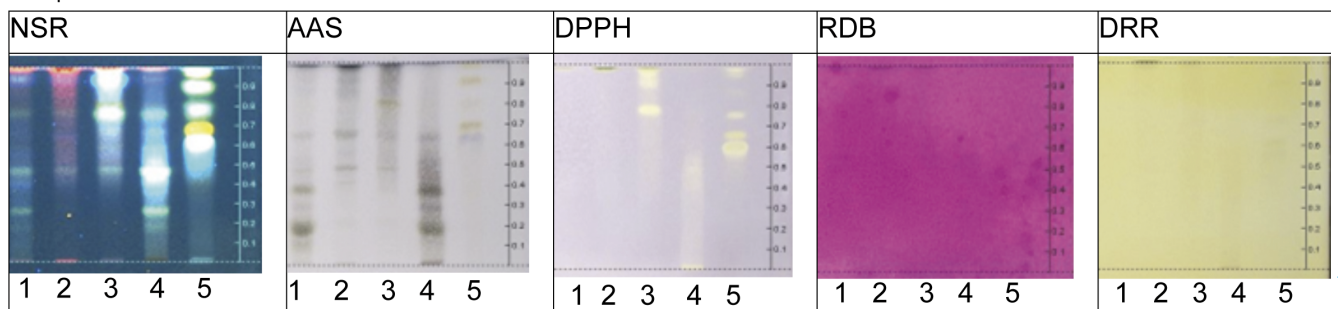
Beispiel 1



20

Bahn 1: Rohextrakt
 Bahn 2: Extrakt A (unpolar)
 Bahn 3: Extrakt B (mittelpolar)
 Bahn 4: Extrakt C (polar)
 Bahn 5: Standardmischung (nach aufsteigenden R_F geordnet: Chlorogensäure, Hyperosid, Rutin, Kaempferol und Quercetin)

Beispiel 2



21

Bahn 1: Rohextrakt
 Bahn 2: Extrakt A (unpolar)
 Bahn 3: Extrakt B (mittelpolar)
 Bahn 4: Extrakt C (polar)
 Bahn 5: Standardmischung (nach aufsteigenden R_F geordnet: Chlorogensäure, Hyperosid, Rutin, Kaempferol und Quercetin)

zeigt. In Extrakt C (Bahn 4) sind ausserdem mit blauer Bande mehrere Pflanzensäuren detektiert. Potentielle Flavonoide zeigen mit DPPH-Reagenz eine intensive Reaktion.

Im Screening von Pflanzenextrakten, d.h. für die analytische Erstcharakterisierung der zu bewertenden Pflanzenextrakte auf angereicherte Inhaltsstoffe und Nebenkomponenten hat sich die Planar-Chromatographie bei Merck etabliert. Der hohe Probandurchsatz und die Vielzahl möglicher Derivatisierungen machen sie zu einem leistungsfähigen und sehr wichtigen Baustein im eingesetzten Methodenpool. Zur weiteren Bewertung wird der Wellenlängenbereich von 210–400 nm mit einem HPLC-DAD-System ausgewertet und ein Aktivitätsscreening durchgeführt, z. B. ein Schnelltest auf antioxidativ wirkende Substanzen. Nach Auswertung der Screening-Ergebnisse wird entschieden, welche Wirkstoffkandidaten weitergehend untersucht werden, z. B. zur Struktur-

aufklärung mit HPLC-MS* und NMR.

*Anmerkung: Mit dem neuen TLC-MS-Interface wird von der Zone auf der Platte durch online Extraktion das Massenspektrum innerhalb einer halben Minute direkt erhalten.

Weitere Informationen sind von den Autoren auf Anfrage erhältlich.

Kontakt: Michael Schulz, Merck KGaA, PC-RLP-SIL, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt

HPTLC-Bestimmung von unerlaubt zugesetzten fettlöslichen Azofarbstoffen in Gewürzen



22

Prof. Dr. Wolfgang Schwack und Elodie Pellissier

Sowohl der Beitrag Kandler et al. (S. 2 ff - Kantonales Labor Zürich) als auch der vorliegende gehen dasselbe Thema an, jedoch auf unterschiedliche Weise. Beide bieten gegenüber dem Status quo der Analytik von Azofarbstoffen deutliche Vorteile. Der Anwender mag entscheiden, welchen Weg er bevorzugt.

Die Untersuchungen wurden während der Bachelorarbeit von Elodie Pellissier (Fachhochschule Westschweiz) am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim in Stuttgart durchgeführt.

Einleitung

Sudan I wurde 2003 in Frankreich in einer indischen Chili-Lieferung nachgewiesen. Dies war die erste Warnung an die EU-Mitgliedstaaten durch das Schnellwarnsystem im Lebens- und Futtermittelbereich (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF). Danach wurden zunehmend Produkte mit unerlaubt zugesetzten, fettlöslichen Azofarbstoffen gefunden, z. B. mit Sudanrot B, Sudanorange G und Pararot sowie die von der internationalen Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer, IARC) als Kanzerogene der Kategorie 3 eingestuft Farbstoffe Sudan I bis IV und Sudanrot 7B. Im Jahr 2008 und im ersten Halbjahr 2009 wurden nicht weniger als 60 Fälle im RASFF dokumentiert. [1]

HPTLC ist konkurrenzlos im schnellen und matrix-robusten Screening von vielen Proben parallel. Im Falle von Azofarbstoffen mit einer starken Absorption im Weißlicht ist eine gute Detektierbarkeit zu erwarten. Neben der Biblio-

theksuche der UV/Vis-Spektren bietet die Kopplung mit der Massenspektrometrie eine verbesserte Möglichkeit, positive Funde zu bestätigen. Mit MassWorks-Software kann der Analytiker sogar von niedrig auflösenden Massenspektrometern die exakte Masse und Elementarzusammensetzung erhalten. Aufgrund dieser Vorteile wurde eine schnelle und verlässliche HPTLC-Methode zur Identifizierung und Quantifizierung der relevanten Farbstoffe in verschiedenen Gewürzpulvern und Gewürzpulvermischungen (Chili, Curry, Paprika etc.) entwickelt. Die auf Pasten und Saucen erweiterte Methode ist momentan in der Validierung.

Standardlösungen

Sudan I (I), Sudan II (II), Sudanrot B (B), Sudanorange G (OR) und 4-Dimethylaminoazobenzen (interner Standard, IS) wurden einzeln (10 mg) in je 5 mL Aceton gelöst, Sudan III (III), Sudan IV (IV), Sudanrot 7B (7B) und Pararot (PR) in je 15 mL. Die Lösungen wurden auf 20 mL mit Methanol aufgefüllt (Stammlösungen von je 0.5 mg/mL). Für die Standardgemischlösung wurden je 200 µL der entsprechenden Stammlösungen gemischt und mit Methanol auf 10 mL aufgefüllt (Farbstoff je 10 ng/µL). Die interne Standardlösung zum Übersprühen wurde entsprechend 1:50 verdünnt.

Probenvorbereitung

Die homogenisierte Gewürzprobe (1 g) wurde in ein 20 mL Zentrifugenglas mit Schraubkappe eingewogen. Nach Zugabe von 1 mL der Stammlösung des internen Standards und 4 mL Aceton wurde das Zentrifugenglas mit dem Vortex für 1 min homogenisiert. Nachfolgend wurden 5 mL Methanol hinzugefügt. Das Zentrifugenröhrchen wurde von Hand 1 min geschüttelt und bei 4000 rpm zentrifugiert. Ohne weitere Cleanup-Schritte wurde der Überstand direkt zur HPTLC eingesetzt.

Schicht

HPTLC-Platten NANO-SIL-PAH, 20x10 cm, Macherey-Nagel (Coffein-imprägniert)

Anmerkung: Der Einsatz von bereits imprägnierten Fertigplatten ist sehr benutzerfreundlich. Notfalls kann die Imprägnierung der Schicht selbst hergestellt werden durch 20 minütiges

Tauchen einer HPTLC-Platte Kieselgel 60 in eine Coffeinlösung (1.7 g Coffein in 100 mL Acetonitril) und abschliessendes Trocknen für 20 min bei 120 °C.

Probenauftragung

Bandförmig mit ATS4, Bandlänge 8 mm, Bahnabstand 10 mm, Abstand vom unteren Plattenrand 8 mm, Abstand vom seitlichen Plattenrand min. 15 mm, Auftragevolumen 1–20 µL der Standardlösung (übersprüht mit 10 µL interner Standardlösung) und 4 µL der Probenextrakte

Chromatographie

In der ADC2 mit Isohexan – Methylethylketon 5:1 nach Kammersättigung für 10 min über eine Laufstrecke von 68 mm. Die Plattenaktivität wurde mit der Option Feuchtekontrolle über eine gesättigte Kaliumcarbonatlösung (45 % relative Luftfeuchtigkeit) für 4 min eingestellt.

Dokumentation

Im DigiStore 2 unter Weisslicht (Reflektion und Transmission)

Densitometrie

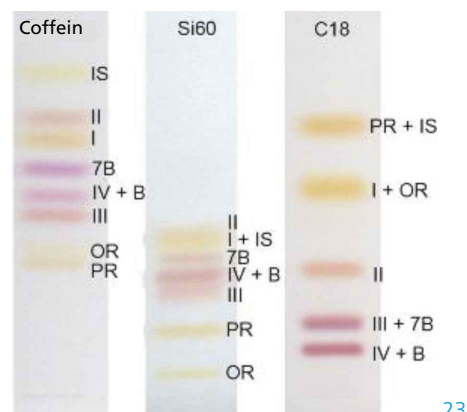
Absorptionsmessung via Mehrwellenlängen-Scan (390, 415, 500, 525 und 550 nm) und Spektrenaufnahme (320–600 nm) mit TLC-Scanner 3 und win-CATS-Software.

Massenspektrometrie

Mit dem TLC-MS-Interface ausgerüstet mit dem ovalen Elutionskopf (4 × 2 mm) und verbunden mit einem Agilent 1100 LC/MSD-System, Aufnahme im positiven ESI-Modus, Zonenextraktion durch Methanol – 0.1 % Ameisensäure 95:5 bei 0.2 mL/min. Eine Chromolith RP 18-Säule (50 × 4.6 mm, Merck) wurde in die Verbindungskapillare zwischen TLC-MS-Interface und MSD eingebaut. Exakte Massen wurden mit MassWorks-Software (Cerno Bioscience, Danbury, CT, USA) berechnet.

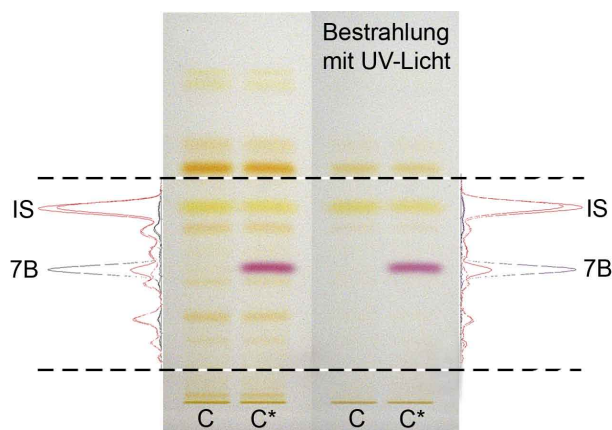
Ergebnisse und Diskussion

Obwohl unterschiedliche chromatographische Systeme im Normal- und Umkehrphasenmodus während der Methodenentwicklung benutzt wurden, war die Chromatographie der in Gewürzen und Pflanzenölen in den letzten Jahren am häufigsten gefundenen acht Azofarbstoffe [1] auf Coffein-impregnierten Schichten vergleichsweise am besten. Die Regioisomeren Sudan IV und Sudanrot B sind generell schwer zu trennen, auch mittels LC/MS-MS [2].



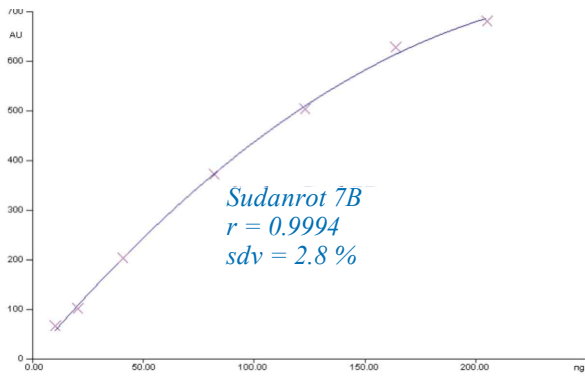
Trennung der 8 Azofarbstoffe auf Coffein-impregnierten HPTLC-Platten NANO-SIL-PAH, HPTLC-Platten Kieselgel 60 und HPTLC-Platten RP 18 gemäß [3]

Statt zeitaufwändiger, in der Literatur beschriebener Cleanup-Schritte wurden die Probenextrakte direkt auf die HPTLC-Platten aufgetragen und nach der Chromatographie einer Bleichung unterworfen. Bleichung mit starkem UV-Licht (600 W/m²) für max. 5 min führte zu einer von Matrixstörungen nahezu freien Basislinie.

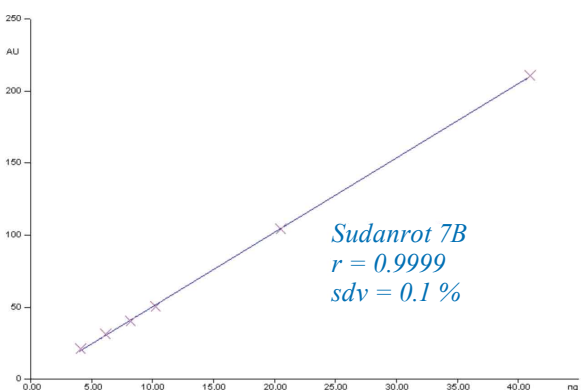


Effekt der UV-Bestrahlung auf den Matrix-Hintergrund im Chromatogramm eines originalen (C) und dotierten (C*, Sudan Red 7B, 500 mg/kg) Chilipulver-Extraktes

Nach dem Mehrwellenlängen-Scan bei 5 ausgewählten Wellenlängen wurde zur Quantifizierung die Mehrbereichskalibration mit interner Standardauswertung (zur Korrektur der Probenvorbereitung) verwendet. Die Kalibration erfolgte nach einer polynomen bzw. linearen Regression entsprechend einem weiten bzw. engen Arbeitsbereich. Gemäss der angegebenen Probenvorbereitung lagen die Nachweisgrenzen (LOD) im Bereich von 10 mg/kg, was im Hinblick auf die zu erwartenden Zusätze zur gewünschten Farbkorrektur der Produkte ausreichend war.

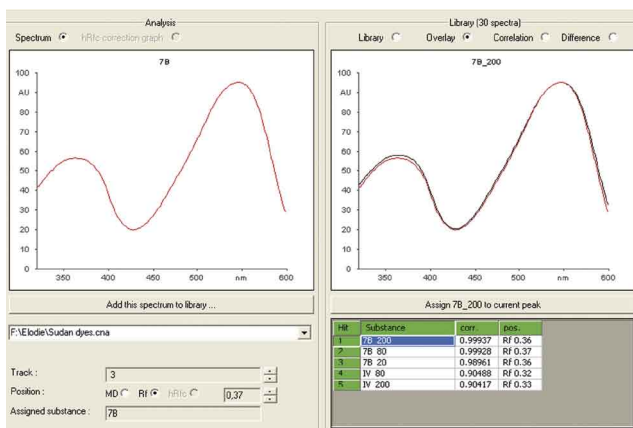


25



Polynome und lineare Kalibration über einen weiten (10 - 200 ng/Band) bzw. engen (4 - 40 ng/Band, ab LOD) Kalibrationsbereich am Beispiel von Sudanrot 7B

In einer Spektrenbibliothek (aufgebaut auf 3 Konzentrationen pro Azofarbstoff) kann nach passenden UV/Vis-Spektren gesucht werden, um einen verdächtigen Fund in einer Probe zu bestätigen.

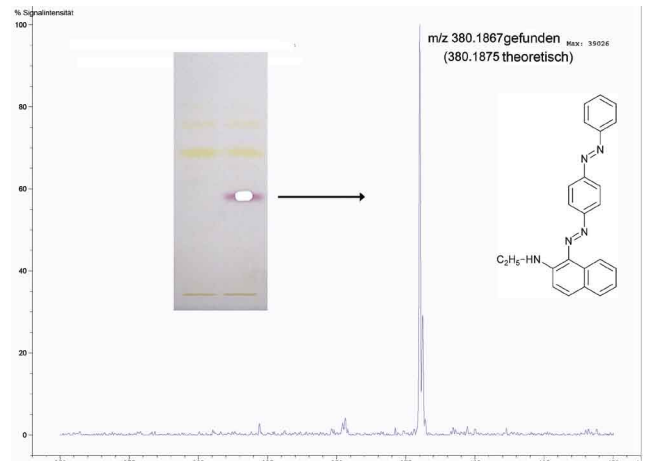


27

Spektrenvergleich von Sudanrot 7B in einer dotierten Probe (rot, 500 mg/kg Sudanrot 7B) und dem besten Treffer in der Spektrenbibliothek (Korrelation: 0.9994).

Zur zweifelsfreien Bestätigung positiver Funde können Massenspektren von verdächtigen Zonen mit dem TLC-MS-Interface aufgenommen werden. Die

Massengenauigkeit inklusive der Elementarzusammensetzung kann durch die Verwendung der MassWorks-Software verbessert werden, sogar bei niedrig auflösenden Massenspektrometern.



28

Als zweite Bestätigung des Sudanrot 7B-Fundes, das HPTLC-MS Spektrum der verdächtigen Zone mit Berechnung der »exakten« Masse durch MassWorks-Software

Die orthogonale online HPTLC-HPLC-MS-Kopplung wurde hier zum ersten Mal vorgestellt. Neben der Trennung von coextrahiertem Coffein (Schichtimpregnierung) und dem Azofarbstoff ermöglicht diese einfache Kopplung eine zweite Selektivitätsrichtung (C18-Säule versus Kieselgelplatte). Demzufolge können Azofarbstoff-Funde leicht bestätigt werden durch (1) UV/Vis-Spektren, (2) Massenspektren und (3) ein zweites chromatographisches System unterschiedlicher Selektivität. All diese Absicherungen bietet je nach Anforderung ein einziger HPTLC-Lauf - und das für viele Proben parallel.

[1] Rapid Alert System for Food and Feed, http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm

[2] H. San, F. Wang, L. Ai, J Chromatogr A 1164 (2007) 120

[3] H. Kandler, M. Bleisch, V. Widmer, E. Reich, J Liq Chromatogr Rel Technol 32 (2009) 1273

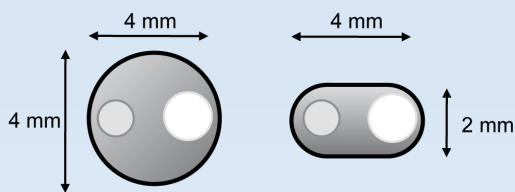
Weitere Informationen sind vom Autor auf Anfrage erhältlich.

Kontakt: Prof. Dr. W. Schwack, Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelchemie, Garbenstrasse 28, 70599 Stuttgart, wschwack@uni-hohenheim.de

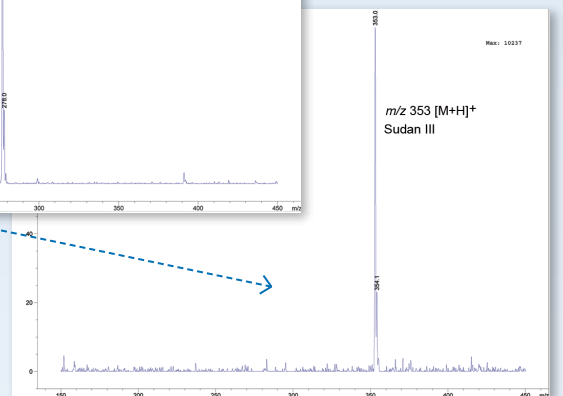
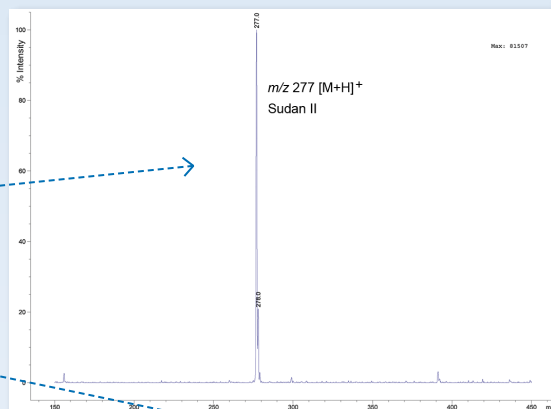
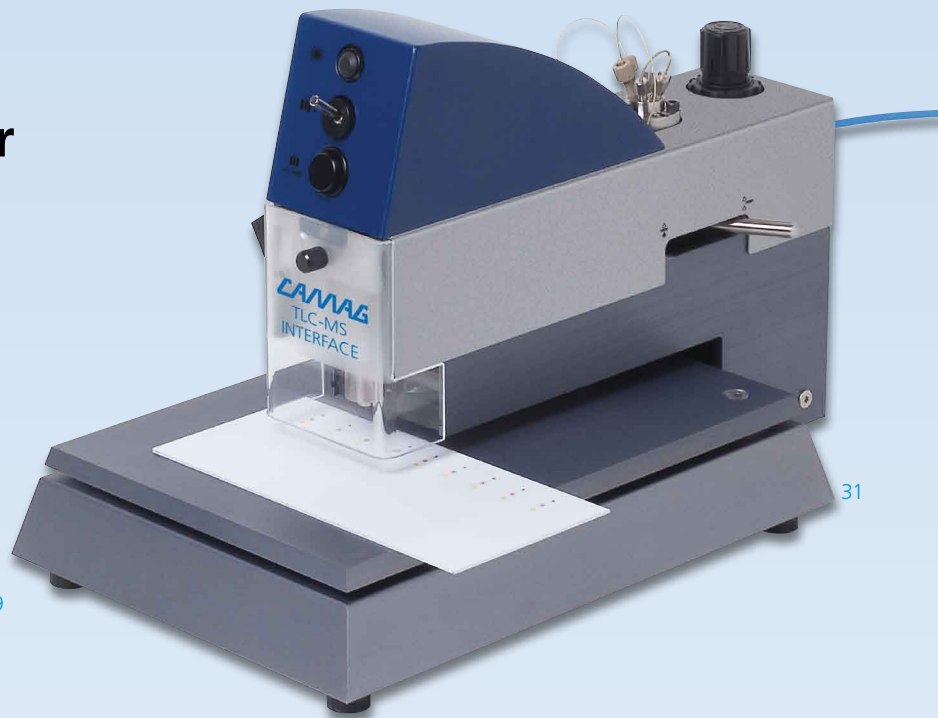
NEU

TLC-MS Interface jetzt mit rundem und ovalem Elutionskopf

**Komfortabler Transfer
von Trennzonen
direkt von der Platte
in Ihr MS**



Abmessungen des runden und
ovalen Elutionskopfes

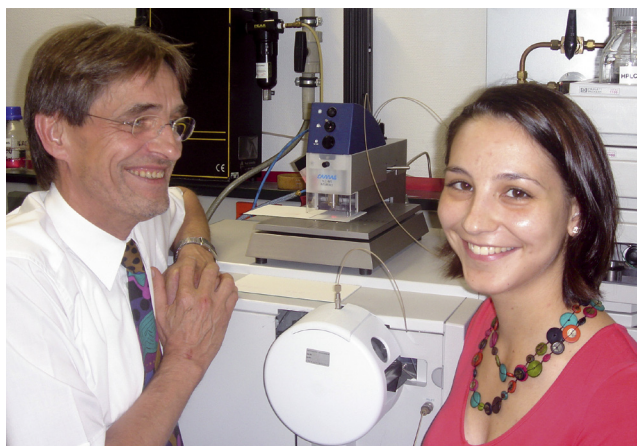


Der ovale Elutionskopf ist zur Extraktion eng nebeneinander liegender Banden optimal.

CAMMAG

**Weltweit führend in der
Planar-Chromatographie**

Determination of unauthorised fat-soluble azo dyes in spices by HPTLC



22

Prof. Dr. Wolfgang Schwack and Elodie Pellissier

The article on pages 2-4 from the State Laboratory in Zürich and this article address the same objective but use different approaches. However, both approaches show clear advantages in comparison to the status quo for the analysis of azo dyes in foods. The analyst may decide which suits best to his task.

The work was performed during the bachelor thesis of Elodie Pellissier (University of Applied Sciences, Western Switzerland) at the Institute of Food Chemistry, University of Hohenheim in Stuttgart, Germany.

Introduction

In 2003 Sudan I was detected by the French in a consignment of hot chili from India. This was the first alert to the EU Member States via the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Subsequently, more and more products were found to contain unauthorised fat-soluble azo dyes such as Sudan I-IV and Sudan Red 7B, classified as a category 3 carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC), Sudan Red B, Sudan Orange G and Para Red. For the year 2008 and the first semester of 2009, no less than 60 cases were reported by RASFF. [1]

HPTLC is unrivaled in rapid and matrix-robust screening of many samples in parallel. In the case of azo dyes with strong absorption of visible light, a good capability of detection is generally given. Besides library UV/Vis spectra

comparison, coupling to mass spectrometry offers an improved chance to verify positive findings. Using MassWorks software enables the analyst to calculate exact masses and elemental compositions even from low resolution mass spectrometers. Therefore, a rapid and reliable HPTLC method for the identification and quantification of the relevant dyes was developed and tested on powders of individual spices and spice mixes (chili, curry, paprika etc.). The method is currently being validated, while expanding the sample source to pastes and sauces.

Standard solutions

Sudan I (I), Sudan II (II), Sudan Red B (B), Sudan Orange G (OR) and 4-dimethylaminoazobenzene (internal standard, IS) were individually (10 mg) dissolved in 5 mL acetone, and Sudan III (III), Sudan IV (IV), Sudan Red 7B (7B) and Para red (PR) in 15 mL acetone. The solutions were filled up to 20 mL with methanol (stock solutions of 0.5 mg/mL each). The standard mix solution was prepared by mixing 200 μ L each of the stock solutions and filling up to 10 mL with methanol (10 ng/ μ L of each dye). The same 1:50 dilution was applied for the internal standard solution used for overspraying.

Sample preparation

The homogenized spice sample (1 g) was weighed into a 20-mL screw-capped centrifuge tube. After the addition of 1 mL internal standard stock solution and 4 mL acetone, the tube was vortexed for 1 min followed by the addition of 5 mL methanol. The tube was manually shaken for another minute and centrifuged at 4000 rpm. Without further cleanup, the supernatant was directly used for HPTLC.

Layer

HPTLC plates NANO-SIL-PAH, 20 x 10 cm, Macherey-Nagel (impregnated with caffeine)

Note: Ready-to-use plates are convenient and highly recommended. In case of need, caffeine-impregnation can be self-made by dipping HPTLC plates silica gel 60 in a caffeine solution (1.7 g caffeine in 100 mL acetonitrile) for 20 min, followed by drying for 20 min at 120 °C.

Sample application

Bandwise with ATS4, band length 8 mm, track distance 10 mm, distance from lower plate edge 8 mm, distance from the left and right edges min. 15 mm, application volume 1–20 μL for standard solutions, overspraying with 10 μL internal standard solution, and 4 μL for sample extracts.

Chromatography

In the ADC2 with isohexane – methyl ethyl ketone 5:1 up to a migration distance of 68 mm, after tank saturation for 10 min. Plate activity was controlled by saturated potassium carbonate solution (45% relative air humidity) for 4 min.

Documentation

In DigiStore 2 under white light illumination (reflectance and transmission)

Densitometry

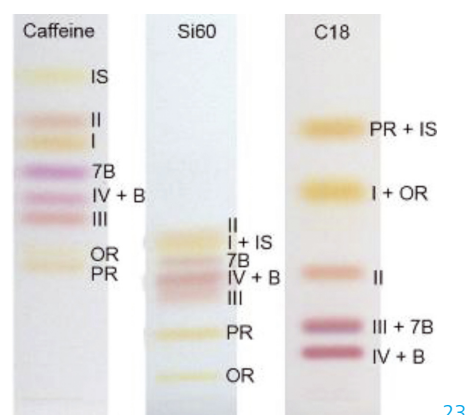
Absorption measurement via multi wavelength scan (390, 415, 500, 525 and 550 nm) and spectra recording (320–600 nm) with TLC Scanner 3 and winCATS software.

Mass spectrometry

TLC-MS interface equipped with the oval elution head (4 x 2 mm) coupled to an Agilent 1100 LC/MSD system operating in positive ESI mode; zone extraction by methanol – 0.1% formic acid 95:5 at 0.2 mL/min. A Chromolith RP 18 column (50 x 4.6 mm, Merck) was connected between TLC-MS interface and MSD. Exact masses were calculated by MassWorks software (Cerno Bioscience, Danbury, CT, USA).

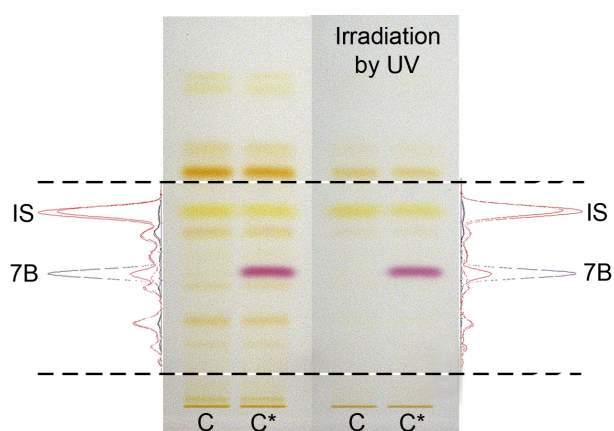
Results and Discussion

The eight dyes most frequently found in spices and vegetable oils during the last few years [1] were best separated on caffeine impregnated silica gel plates. During method development, different chromatographic systems were investigated, nevertheless, chromatography was far superior on caffeine impregnated phases to the best separation obtained on normal and reversed phase layers. The regioisomers Sudan IV and Sudan Red B are hardly separated, however, this separation generally is highly challenging, even by LC/MS-MS [2].



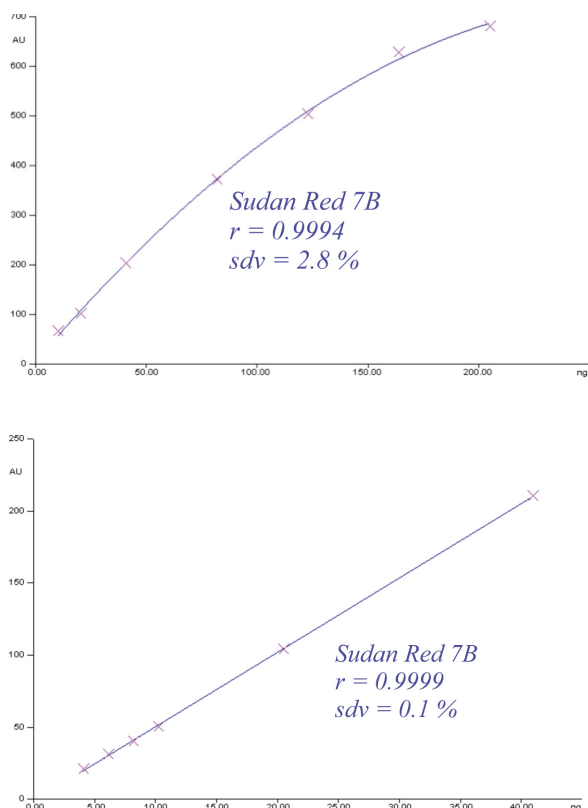
23
Separation of 8 azo dyes on caffeine-impregnated HPTLC plates NANO-SIL-PAH, HPTLC plates silica gel 60, and HPTLC plates RP 18 following [3]

Instead of time consuming cleanup steps described in literature, sample extracts were directly applied onto HPTLC plates and subjected to bleaching by exposing developed plates to strong UV light (600 W/m^2) for max. 5 min, resulting in baselines nearly free of matrix interferences.



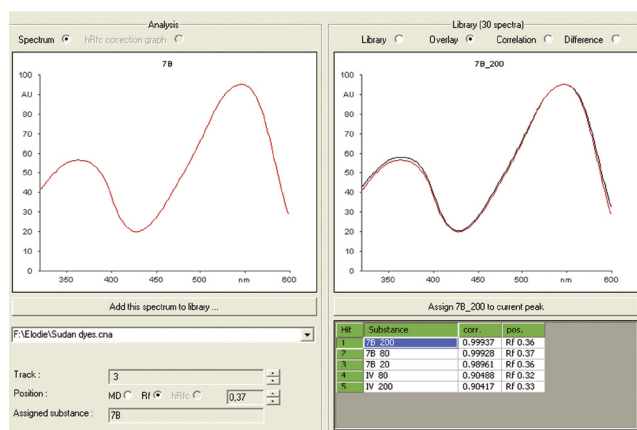
24
Effect of UV irradiation on the matrix background of the chromatogram for a native (C) and spiked (C*, Sudan Red 7B, 500 mg/kg) chili powder extract

After multi wavelength scan at five selected wavelengths, a multi-level calibration using the internal standard mode, mainly for correction of the sample preparation, was used for quantification. The polynomial and linear regression was used for the high and low level working range, respectively. Following this sample preparation method, limits of detection (LOD) of approximately 10 mg/kg can be achieved, which is quite sufficient regarding unauthorized additions to be expected for color improvement of spices and spice mixtures. LOD can still be lowered applying samples volumes higher than 4 μL .



Polynomial and linear calibration over a wide (10 to 200 ng/band) and narrow, low (4 to 40 ng/band, starting at LOD) calibration range, respectively, exemplarily shown for Sudan Red 7B

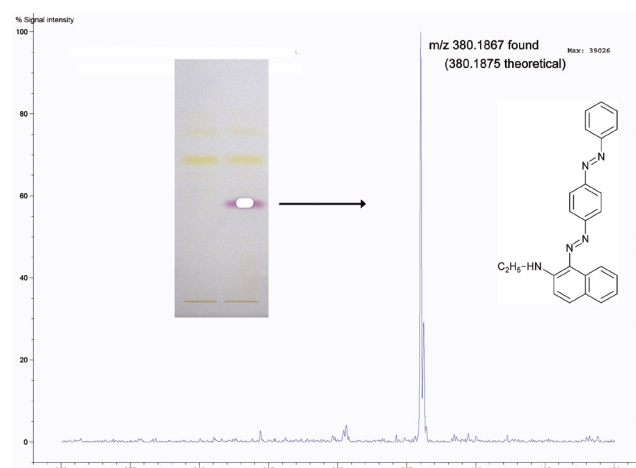
In order to prove the presence of suspected compounds in a sample, UV/Vis spectra can be compared to the spectra library elaborated from three concentration levels of each dye.



Spectra comparison of Sudan Red 7B in a spiked sample (in red, 500 mg/kg Sudan Red 7B) against the first hit of the spectra library (correlation: 0.9994).

Additionally, mass spectra can be recorded from suspected zones by the TLC-MS interface to undoubtedly support positive findings. To extend mass

assignment confidence including empirical molecular formulae, exact masses can finally be calculated by MassWorks software, even using a single-quadru-pole mass spectrometer.



HPTLC-MS spectrum of the suspected zone with exact mass calculated by MassWorks software as a second proof of the presence of Sudan Red 7B

An orthogonal online HPTLC-HPLC-MS coupling was employed here for the first time. Apart from separating co-extracted caffeine of the layer impregnation from the azo dye, this simple hyphenation enabled a second dimension with regard to selectivity (C18 column versus silica gel plate). Hence, azo dye findings can be confirmed with ease by (1) UV/Vis spectra, (2) mass spectra and (3) a second chromatographic system of a different selectivity. All these confirmations can be obtained on demand from a single HPTLC run with many samples in parallel.

[1] Rapid Alert System for Food and Feed, http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm

[2] H. San, F. Wang, L. Ai, J Chromatogr A 1164 (2007) 120

[3] H. Kandler, M. Bleisch, V. Widmer, E. Reich, J Liq Chromatogr Rel Technol 32 (2009) 1273

Further information is available from the authors on request.

Contact: Prof. Dr. W. Schwack, University of Hohenheim, Institute of Food Chemistry, Garbenstrasse 28, 70599 Stuttgart, Germany, wschwack@uni-hohenheim.de