

Afdeling AM

1984-05-10

RAPPORT 84.51

Pr.nr. 505.0200

Onderwerp: Kwantitatieve bepaling van  
synthetische kleurstoffen in  
"drinkyoghurt" en "karnedrank"  
met vruchten(smaak)

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afdeling AM  
(4x), afd. Normalisatie/Harmonisatie (Humme), Projekt-  
beheer, Projektleider (Hollman), Top (Direktie VKA),  
Sledsens.



Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van  
diverse additieven in levensmiddelen

Onderwerp: Kwantitatieve bepaling van synthetische kleurstoffen in  
"drinkyoghurt" en "karnedrank" met vruchten(smaak)

---

Doel:

De ontwikkeling van een bepalingsmethode voor de kwantitatieve analyse van synthetische kleurstoffen in z.g. drinkyoghurt en karnedrank.


Samenvatting:


Er werd een methode ontwikkeld voor de kwantitatieve isolatie van synthetische kleurstoffen in bovengenoemde produkten. Kwantificering werd uitgevoerd met behulp van HPLC. De methode werd toegepast op 25 commerciële monsters.

Conclusie:

De ontwikkelde methode is toepasbaar op drinkyoghurt en andere vloeibare zuivelprodukten.

---

Verantwoordelijk: ir P. Hollman 

Medewerker/Samensteller: J. van Oostrom, J. Slangen, H.v.d. Struijs-  
v.d. Putte 

Projectleider: ir P. Hollman

## 1. Inleiding

De laatste jaren heeft de zuivelindustrie zich toegelegd op de productie van een uitgebreid scala aan zuivelprodukten met vruchten of vruchtesap. Bij de presentatie van deze produkten wordt de nadruk gelegd op de combinatie van een zuivelprodukt met een echt vruchteprodukt. Voor de beoordeling van de kwaliteit van deze zuiveltoetjes is het daarom belangrijk te weten in hoeverre er gebruik gemaakt is van een echt vruchteprodukt.

De mogelijkheid bestaat dat de fabrikant door het gebruik van o.a. kleurstoffen meer vruchteprodukt kan suggereren dan in werkelijkheid toegevoegd is. Het is daarom noodzakelijk te beschikken over een methode voor het bepalen van kleurstoffen in deze produkten.

In onderstaande wordt een methode beschreven voor de bepaling van synthetische kleurstoffen in drinkyoghurt en karnedrank.

## 2. Extraktie van de kleurstoffen

Bij zuivelprodukten doen zich problemen voor vanwege de sterke binding van de kleurstoffen aan melkeiwitten. Bij toepassing van de gebruikelijke middelen (Carrez, acetaatbuffer, T.C.A., enz.) voor het verwijderen van eiwitten door precipitatie, hechten de kleurstoffen aan het precipitaat en wordt een vrijwel kleurloos filtraat verkregen.

In de literatuur worden diverse methodes beschreven voor de kwantitatieve extraktie van synthetische kleurstoffen uit eiwitrijke produkten. Zo beschrijft Puttemans (1) een methode voor rijstemelk, waarbij het produkt na drogen in een kolom overgebracht wordt en geëxtraheerd met methanol/ammonia, het eluaat wordt ingedampt tot droog en opgenomen in een fosfaatbuffer, waarin ionpaar vorming van de kleurstoffen met tri-n-ethanol-amine plaatsvindt. Zuivering is dan mogelijk door de kleurstoffen te extraheren met chloroform, waarna de kleurstoffen met behulp van een verdunde perchloraatoplossing terugkeren in de waterfase. Maslowska (2) extraheert puddingpoeder met ethanol/ammonia. Na centrifugeren wordt de alcohol afgedampt waarna, na aanzuren, de kleurstoffen geadsorbeerd worden aan een wollen draad. Elutie van de kleurstoffen geschiedt met ammonia. Boley (3) onderzoekt puddingpoeder, yoghurt en ijs en extraheert de kleurstoffen met de vloeibare ionwisselaar Amberlite LA-2. Deze methode wordt ook toegepast door Besling (4) voor de bepaling van synthetische kleurstoffen in ijs en puddingpoeder.

Het principe van deze methode is als volgt: het monster wordt gemengd met Celite, en ontvet met hexaan, de kleurstoffen worden geëxtraheerd met Amberlite LA-2 in n-butanol. Met behulp van ammonia worden daarna de kleurstoffen uit de butanol geëxtraheerd en vervolgens na aanzuren gezuiverd op polyamide.

De extraktiemethode beschreven door Boley en Besling werd getest op een aantal yoghurts. Deze methode bleek zeer bewerkelijk te zijn. De analyseresultaten vertoonden een grote spreiding. De recovery van toegevoegde standaarden azorubine (E 122) en cochenillerood (E 124) bleek slechts 75% te bedragen (niveau toevoeging: 25 ppm op produktbasis). Uit nader onderzoek bleek dat de grootste verliezen optraden bij de extractie van de kleurstoffen van het Celite. Gezien bovenstaande problemen werd het onderzoek gericht op een eenvoudige extraktiemethode zonder gebruik van Celite.

Aangezien melkeiwitten door organische oplosmiddelen gemakkelijk geprecipiteerd kunnen worden, werd aan een aantal drinkyoghurts alcohol, methanol, acetonitril en aceton toegevoegd. Na mengen werden de oplossingen gecentrifugeerd. Het bleek dat aceton de beste resultaten gaf, omdat hierbij de precipitatie van de eiwitten het meest volledig was. Als dan aan de aceton 2,5% ammonia (25%) wordt toegevoegd blijven de kleurstoffen in oplossing. Bij het onderzoek van de drinkyoghurts en karnedranken werd daarom de volgende eenvoudige extraktiemethodiek gehanteerd:

Weeg af 25 g yoghurt in een maatkolf van 50 ml. Vul aan met een mengsel van aceton en 2,5% ammonia (25%). Meng en breng over in een centrifugebuis en centrifugeer.

### 3. Zuivering van het extrakt

De op bovengenoemde wijze verkregen vloeistof bevat naast de synthetische kleurstoffen verder nog aceton,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , water, alle oplosbare componenten uit drinkyoghurt en bovendien de eventueel toegepaste verdikkingsmiddelen en/of emulgatoren. Waarschijnlijk zijn deze laatste verbindingen verantwoordelijk voor de meer of mindere troebelheid van het supernatant.

Voor de zuivering werd gebruik gemaakt van een polyamide kolom, waarbij de volgende methode gebruikt werd:

Damp 10 ml supernatant in tot aceton- en  $\text{NH}_3$  vrij op een waterbad, los het residu op in ca. 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  en breng eventueel op pH (neutraal of licht zuur). Breng de vloeistof op een polyamide kolom en was uit met water. Elueer de geadsorbeerde kleurstoffen met methanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$ , vang op in een 10 ml maatkolf, neutraliseer en vul aan met  $\text{H}_2\text{O}$ . Deze oplossing kan na filtreren over een microfilter (0,45  $\mu\text{m}$ ) geïnjecteerd worden in de HPLC.

Naast deze vrij bewerkelijke methode is gezocht naar een eenvoudige en rechtstreekse manier om een heldere oplossing te verkrijgen. De volgende werkwijze werd gevolgd:

Damp 25 ml supernatant in tot aceton- en  $\text{NH}_3$ -vrij op een waterbad, breng indien nodig op pH (6-7) en spoel met  $\text{H}_2\text{O}$  over in een maatkolf van 25 ml. Vul aan met  $\text{H}_2\text{O}$  en meng. Deze kleurstofoplossing kan na filtreren over een microfilter (0,45  $\mu\text{m}$ ) geïnjecteerd worden in de HPLC.

Beide zuiveringsstappen werden, voorafgegaan door de bovenbeschreven extraktiemethode, getest op een aantal produkten (zie punt 5).

#### 4. Detectie

De kleurstoffen werden gekwantificeerd met behulp van een HPLC-methode beschreven door Besling (4).

De kleurstoffen werden gescheiden op een Lichrosorb 5 RP 8 kolom. Als eluens werden twee verschillende water-acetonitril mengsels gebruikt met tetrabutylammoniumchloride als tegenion, het eluens werd gebufferd met Titrisol pH 7.

De gele kleurstoffen werden gedetecteerd bij 430 nm, de loopvloeistof bestond uit water-acetonitril-buffer 60-30-10.

De rode kleurstoffen werden gedetecteerd bij 510 nm en de blauwe bij 610 nm.

Voor deze beide groepen kleurstoffen was de water-acetonitril-buffer verhouding 51-39-10.

Met buffer wordt hier bedoeld een volgens voorschrift samengestelde buffer Titrisol pH 7 welke 8,88 gram tetrabutylammoniumchloride per 500 ml bevat. De reden dat voor de gele kleurstoffen een langzamer eluens gebruikt werd, is dat deze groep kleurstoffen anders te snel en niet voldoende gescheiden door de kolom loopt.

Opgemerkt moet worden dat zonnegeel FCF zowel met de gele als de rode kleurstoffen mee bepaald kan worden, de respons is bij 510 nm (rood) echter ca. twee maal zo groot.

### 5. Resultaten

De in het voorafgaande beschreven methode werd getoetst op een aantal produkten. Hiervoor werden monsters drinkyoghurt perzik en framboos gebruikt. Aan deze monsters werden verschillende hoeveelheden E 122 (azorubine) en E 124 (cochenillerood A) toegevoegd.

De yoghurt met framboos gaf geen problemen, de yoghurt met perzik wel. Hierbij ontstond tijdens het indampen een film die zeer moeilijk weer in oplossing te krijgen was (ðf componenten uit de eventueel gebruikte vruchten ðf eventueel toegepaste stabilizatoren). Het indampen dient derhalve niet te ver te gebeuren (tot ca. 10 ml).

	Toevoeging *	Recovery	
		over poly-amide	rechtstreeks
drinkyoghurt framboos	E 124 10 ppm	95,8%	99,8%
	E 122 10 ppm	97,5%	95,1%
	E 122 20 ppm	99,5%	96,9%
drinkyoghurt perzik	E 124 10 ppm	100,3%	99,6%
	E 124 10 ppm	92,4%	98,3%
	E 124 20 ppm	103,1%	100,4%
	E 122 10 ppm	79,5%	103,2%

\* op produktbasis.

Het is duidelijk dat zuivering over poly-amide geen wezenlijke verbetering betekent voor de recovery. Aangezien, door gebruik te maken van een microfilter, de te injecteren oplossing zeer goed helder te krijgen is, is het gebruik van een poly-amide kolom bij drinkyoghurt niet noodzakelijk.

### 6. Onderzoek 25 monsters drinkyoghurt e.d.

Een 25-tal monsters, gekocht in diverse winkels en supermarkten, werd met behulp van de in het voorafgaande beschreven methode onderzocht.

Het monstermateriaal bestond uit:

- 20 drinkyoghurts van 6 verschillende merken met de volgende smaken:  
sinas (3x), perzik (5x), framboos (5x), aardbei (3x), naturel (3x),  
banaan (1x)

- 3 karnedranken van 1 merk met de volgende smaken: perzik, aardbei, braam
- 2 "vruchtendrinks" van 1 merk met de volgende smaken: aardbei, banaan.

Alle monsters zijn onderzocht op gele kleurstoffen, de produkten met aardbei, framboos en braam zijn tevens onderzocht op rode kleurstoffen. De resultaten van dit onderzoek zijn verzameld in onderstaande tabel.

RIKILT- nummer	Soort/Merk	Smaak	Kleurstoffen in ppm				
			E 102	E 110	E 122	E 123	E 124
41678	Merk A Drinkyoghurt	sinas	-	-			
41679	"	perzik	-	-			
41680	"	framboos	-	-	-	-	-
41681	"	naturel	-	-			
41682	Merk B Drinkyoghurt	sinas	-	-			
41683	"	perzik	-	4,6			
41684	"	framboos	-	5,6	4,0	-	3,2
41685	"	naturel	-	-			
41686	Merk C Drinkyoghurt	sinas	-	14			
41687	"	framboos	-	-	-	-	-
41688	Merk D Drinkyoghurt	perzik	8,5	2,8			
41689	"	framboos	-	1,0	12	-	-
41690	"	aardbei	-	11	<u>+ 0,3</u>	11	-
41691	Merk E Drinkyoghurt	perzik	2,6	3,8			
41692	"	framboos	-	-	-	-	5,3
41693	"	aardbei	-	-	-	-	10
41694	Merk F Karnedrank	perzik	-	7,6	-	-	-
41695	"	aardbei	-	-	-	-	10
41696	Merk H Vruchtendrank op melkbasis	aardbei	-	-	9,1	-	6,1
41697	"	banaan	-	-			
41698	Merk G Drinkyoghurt	aardbei	-	-	-	-	-
41699	"	banaan	-	-			
42079	"	perzik	-	-			
42080	Merk E Drinkyoghurt	naturel	-	-	-	-	-
42081	Merk F Karnedrank	braam	-	-	<u>+ 0,2</u>	-	4,1

- = niet aantoonbaar, dat wil zeggen < 0,1 ppm.



De gevonden gehalten werden toegevoegd aan naturel produkten en de kleurindrukken werden vergeleken met die van de oorspronkelijke monsters. Voor alle produkten werd hierbij een goede overeenstemming verkregen. Een uitzondering hierop vormden de monsters met de smaken framboos, aardbei en braam. Deze werden onderzocht op blauwe kleurstoffen (RIKILT-nrs. 41680, 41687, 41698 en 42081). In deze monsters werd geen der volgende kleurstoffen E 131, E 132 en E 151 aangetoond. De al of niet gedeklareerde kleurstof komt overeen met de uitkomsten van de analyses. Opvalt dat als een gehalte gedeklaard wordt dit meestal veel hoger is dan de geanalyseerde gehalten (40-60 ppm). Op een aantal verpakkingen werden natuurlijke kleurstoffen gedeklaard.

Monster 41697 E 101 (riboflavine = vitamine B<sub>2</sub>).

Monster 41698 bietenrood (E 162).

Het riboflavine kon bepaald worden volgens intern voorschrift DV 1 (Spectrofluorimetrische bepaling van riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>) in mengvoeders en voedingsmiddelen 1e oplage 1980-10-20).

Monster 41697 bleek 17,4 mg/kg te bevatten. In drie andere monsters is eveneens E 101 bepaald, hierin kon alleen het natuurlijke gehalte worden vastgesteld.

Monsternummers	E 101 mg/kg
41678	1,2
41679	1,6
41699	1,1

Geconcludeerd kan worden dat aan monster 41697 inderdaad E 101 is toegevoegd.

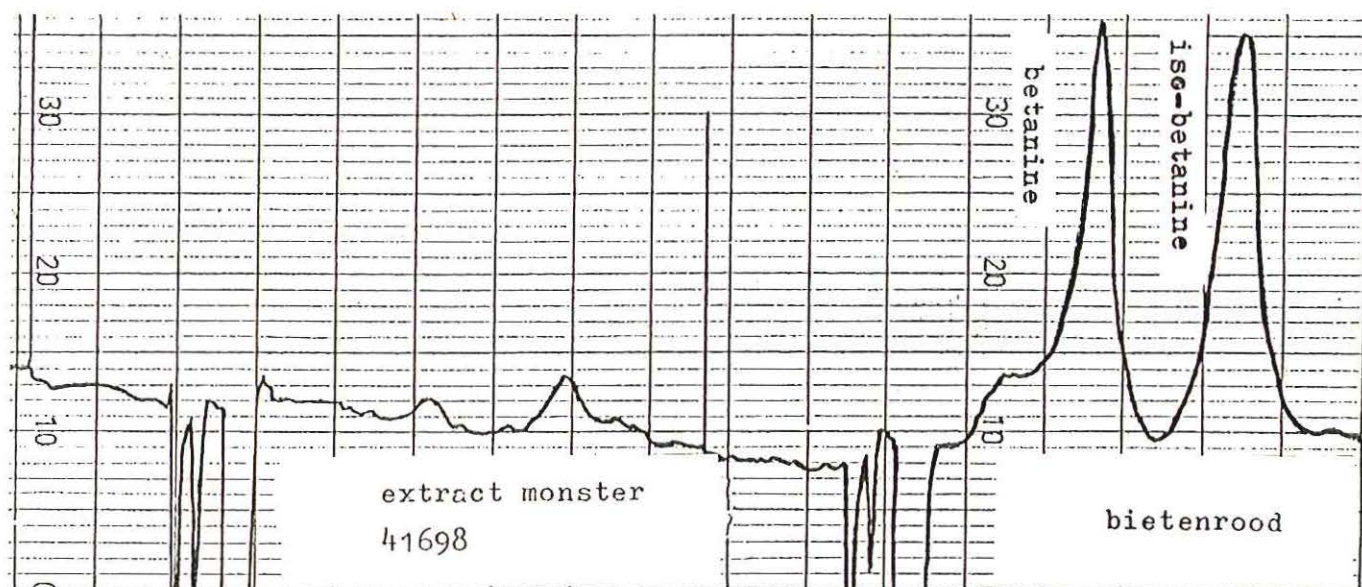
In monster 41698 is getracht het eventuele bietenrood aan te tonen volgens een voorschrift van Besling (5).

De hierin beschreven isolatiemethode bleek minder geschikt voor dit monster, waarschijnlijk als gevolg van het zeer lage gehalte bietenrood in deze drinkyoghurt. Bovendien bevatte het gecentrifugeerde monster nog te veel eiwit in het supernatant om dit door een Sep-pak C 18 patroon te voeren.

De isolatie uit drinkyoghurt is derhalve als volgt uitgevoerd:  
Breng 20 gram drinkyoghurt met 15% NaOH op pH 4,8. Voeg toe 20 ml 5% smeltzoutoplossing (Joha S4), centrifugeer. Breng 20 ml over geaktiveerde Sep-pak C 18, was het Sep-pak met water en elueer het bietenrood met 4 M azijnzuur.

De chromatografische condities zijn overgenomen uit het eerder genoemde artikel van Besling, met dien verstande dat de verhouding buffer-methanol gewijzigd is in 84-16 en dat als kolom gebruikt is een Lichrosorb 5 RP 8 (150 x 4,6) kolom.

Op deze manier bleek het mogelijk om bietenrood kwalitatief aan te tonen in monster 41698.



Bij het onderzoek naar synthetische kleurstoffen werd bij monster 41678 een zeer geel extract verkregen, een synthetische gele kleurstof werd echter niet gevonden. Ook bij het onderzoek naar E 101 (riboflavine) werd niet een hoeveelheid aangetroffen die verantwoordelijk kon zijn voor deze intense gele kleur.

Controle op  $\beta$ -caroteen leverde geen resultaat op zodat gecontroleerd werd op annatto.

Het monster werd ca. 1 op 1 verdund met water, aangezuurd met enkele ml HAc en uitgeschud met pentaan-ether (4:1). De bovenstaande organische fase (zeer geel) werd gedroogd op watervrij natriumsulfaat en ingedampt na toevoegen van 4 ml methanol.

Deze geconcentreerde kleurstofoplossing werd met een standaard oplossing van annatto in methanol opgebracht op een kiezelgel dunne-laagplaat.

Na ontwikkelen in amylacetaat-HAc 99:1 kwam zowel de kleur als de rf-waarde van de monstervlek overeen met standaard annatto waarmee de aanwezigheid van annatto E 160<sup>b</sup> in monster 41678 bevestigd werd.

#### 7. Conclusie

De ontwikkelde en in dit verslag beschreven methode is geschikt om synthetische kleurstoffen in drinkyoghurt e.d. te bepalen.

In de onderzochte monsters konden de synthetische kleurstoffen met behulp van bovenomschreven methode aangetoond en gekwantificeerd worden. De op één der monsters gedeklareerde kleurstof E 101 kon worden bepaald met een bestaand voorschrift voor de analyse van vitamine B<sub>2</sub>.

Het op één der monsters gedeklareerde bietenrood kon kwalitatief bevestigd worden. In één monster is annatto aangetoond.

#### 8. Literatuur

1. Puttemans M.L., Dryon L., Massart D.L.; J. Assoc. Off. Anal. Chem., 60 (1982), 730.
2. Masłowska V.J., Marszał K.; Dtsch. Lebensm. - Rundsch.; 77, (1981), 275.
3. Boley N.P., Bunton N.G., Crosby N.T.; Analyst, 105 (1980), 589.
4. Besling J.R., Van der Burg J.L.M.; Kleurstoffenrapporten 81-2 en 81-3, Keuringsdienst van Waren Rotterdam.
5. Besling J.R., Van der Burg J.L.M.; De Ware(n)-Chemicus, 12, (1982), 193.