HPLC-Bestimmung primärer aromatischer Amine in synthetischen Farbstoffen für Lebensmittel = HPLC determination of primary aromatic amines in synthetic food colours

Autor(en): **Hunziker, H.R. / Miserez, A.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **72 (1981)**

Heft 2

PDF erstellt am: **28.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-984615

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 72, 216–223 (1981)
Eingegangen 20. März 1981. Angenommen 27. April 1981

HPLC-Bestimmung primärer aromatischer Amine in synthetischen Farbstoffen für Lebensmittel

HPLC Determination of Primary Aromatic Amines in Synthetic Food Colours

H. R. Hunziker und *A. Miserez*
Bundesamt für Gesundheitswesen, Abteilung Lebensmittelkontrolle, Bern

Einleitung

Richtlinien Großbritanniens (1), der Europäischen Gemeinschaften (2) sowie Reinheitsnormen der FAO/OMS (3) fordern synthetische Farbstoffe für Lebensmittel, die nicht mehr als 0,01% (100 ppm) freie aromatische Amine enthalten. Des weiteren sollen die Farbstoffe aufgrund der EG-Richtlinien β-Naphtylamin, Benzidin und 4-Aminobiphenyl sowie deren Derivate nicht enthalten. Dies bedeutet mit anderen Worten eine Nulltoleranz für die drei letztgenannten Amine, was praktisch jedoch wenig sinnvoll ist, da eine Nulltoleranz eine Frage der verwendeten Methode ist.

Eine spektrophotometrische Gesamtbestimmung primärer aromatischer Amine durch Herstellung eines Diazofarbstoffes (3) ergab nach eigenen Untersuchungen eine Nachweisgrenze von 20 ppm Anilin und Wiederfindungsraten von 100 bis 115%. Als Screening-Test zur Prüfung des Höchstwertes von 0,01% (100 ppm) freier aromatischer Amine ist diese Methode durchaus geeignet, was man von der Methode von *E. J. Dixon* et al. (4) (DC, Spektrophotometrie) nicht behaupten kann. Eigene Untersuchungen ergaben, daß diese Methode schlecht reproduzierbare Meßwerte und ungenügende Wiederfindungsraten liefert. Eine Identifizierung der aromatischen Amine ist mit dieser DC-Methode möglich, doch sind die erreichten Nachweisgrenzen ungenügend.

J. Mefford et al. (5) gelang es, 0,1 ng α-Naphthylamin neben β-Naphthylamin mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einem elektrochemischen Detektor zu bestimmen.

J. Schulze et al. (6) war es weder mittels Dünnschichtchromatographie (DC) noch mittels Gaschromatographie (GC) möglich, in einer einzigen Analyse alle zu berücksichtigenden aromatischen Amine in Lebensmittelfarbstoffen zu bestimmen. Die Detektionslimite wird dabei mit 0,01% je aromatisches Amin angegeben, was sicher nicht genügt, wenn der Höchstwert freier aromatischer Amine in Farbstoffen total 0,01% beträgt.

B. Stavric et al. (7) gelang es, in Amaranthproben mittels GC/MS α- bzw. β-Naphthylamin noch bis zu 0,5 ppb nachzuweisen. Wie weit sich die anderen zu berücksichtigenden aromatischen Amine mit dieser Methode bestimmen lassen, geht aus dieser Arbeit nicht hervor.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine schnelle, quantitative Methode zur Bestimmung von Anilin, 4-Aminobiphenyl, α- und β-Naphthylamin im Spurenbereich (ppm bis ppb) in Lebensmittelfarbstoffen zu erarbeiten.

Methode

U. Baumann und *B. Marek* (8) bestimmten aromatische Amine in Kunststoff-Migrationsversuchen. Das dabei verwendete HPLC-Trennsystem konnte mit kleinen Änderungen übernommen werden. Als Detektor wurden sowohl ein UV-Detektor als auch ein elektrochemischer Detektor verwendet.

Apparate

Pumpe	Altex 110 mit Pulsationsdämpfer Modell 811 (Kontron)
Einspritzventil	Rheodyne 1720
Trennsäule	Supercosil LC 8 150 x 4,6 mm (Supelco, Crans)
Detektor	UV: Uvikon LCD (Kontron)
	Elektrochemischer Detektor: TL-5/LC-4 (Bioanalytical Systems, P. Bucher, Basel) mit einer Arbeitselektrode aus glasartiger Kohle («glassy carbon») und einer Referenzelektrode aus Ag/AgCl/KCl 3 m
	Detektorpotential auf 0,9 V eingestellt

Mobile Phase

Acetonitril/0,15 m Phosphatpuffer pH 6,0 (siehe Reagenzien):
a) 20/80 $^{v}/_{v}$ bzw.
b) 30/70 $^{v}/_{v}$
Fließgeschwindigkeit 1,0 ml/min

Standardlösungen

Die käuflichen Amine wurden in Methanol gelöst. Stammlösungen: 5—20 mg/100 ml. Verdünnungen daraus mit dem Fließmittel (bis 20 μg/100 ml).

Reagenzien

Acetonitril	p. a. Merck
Phosphatpuffer	0,15 m $NaH_2PO \cdot H_2O$ p. A. Merck (20,7 g in ca. 800 ml H_2O gelöst, mit NaOH 10% auf pH 6,0 eingestellt und auf 1 Liter mit H_2O aufgefüllt)
Diethylether	p. A. Merck
Extrelutsäulen	Merck No 11737
Natriumhydroxid	p. A. Merck
Salzsäure	p. A. Merck, Herstellung ca. 0,1 n Lösung
Amine	4-Aminobiphenyl purum (Fluka)
	Benzidin p. A. Merck
	α-Naphthylamin p. A. Merck
	β-Naphthylamin reinst (Serva, Heidelberg)
	p-Toluidin zur Synthese (Merck)

Bestimmung der Nachweisgrenze und Überprüfung der Linearität

10 μl Stammlösung bzw. deren Verdünnung wurden injiziert und aus dem Signal-Rauschverhältnis (2 : 1) die in Tabelle 1 aufgeführten Detektionslimiten bestimmt. Daraus ist ersichtlich, daß mit dem elektrochemischen Detektor die Nachweisgrenzen 9- bis 75mal je nach Amin tiefer liegen als mit dem UV-Detektor (mobile Phase b).

Tabelle 1. Nachweisgrenze

	Mobile Phase a)	Mobile Phase b)		
	UV 240 nm	UV 240 nm	UV 272 nm	Elektrochem. Det. 0,9 V
4-Aminobiphenyl	31 ng	1,7 ng	—	0,2 ng
Anilin	2,3 ng	2,3 ng	—	0,03 ng
Benzidin	7,5 ng	5 ng	0,5 ng	0,2 ng
α-Naphthylamin	1,5 ng	1 ng	—	0,1 ng
β-Naphthylamin	2,1 ng	1 ng	—	0,1 ng
o-Toluidin	3 ng	—	—	0,1 ng

Die Linearität wurde für Anilin mit dem UV-Detektor (240 nm) im Bereich 6 bis 300 ng Amin (entspricht 3 bis 150 ppm bezüglich Farbstoff) bestimmt. Die Peakhöhe ist in diesem Bereich eine lineare Funktion der Aminkonzentration (Korrelationskoeffizient 0,9959).

Für die Linearität des elektrochemischen Detektors wird auf die Arbeit von *U. Baumann* und *B. Marek* (8) verwiesen.

Trennung der Amine

Das Trennsystem mit dem Fließmittel a) erlaubt Anilin, p-Toluidin (interner Standard), Benzidin, α- und β-Naphthylamin sowie 4-Aminobiphenyl in ca. 27 Minuten zu trennen (Abb. 1). Durch die große Retentionszeit der beiden letzten Peaks sind die Nachweisgrenzen dieser zwei Komponenten relativ hoch (siehe Tabelle 1).

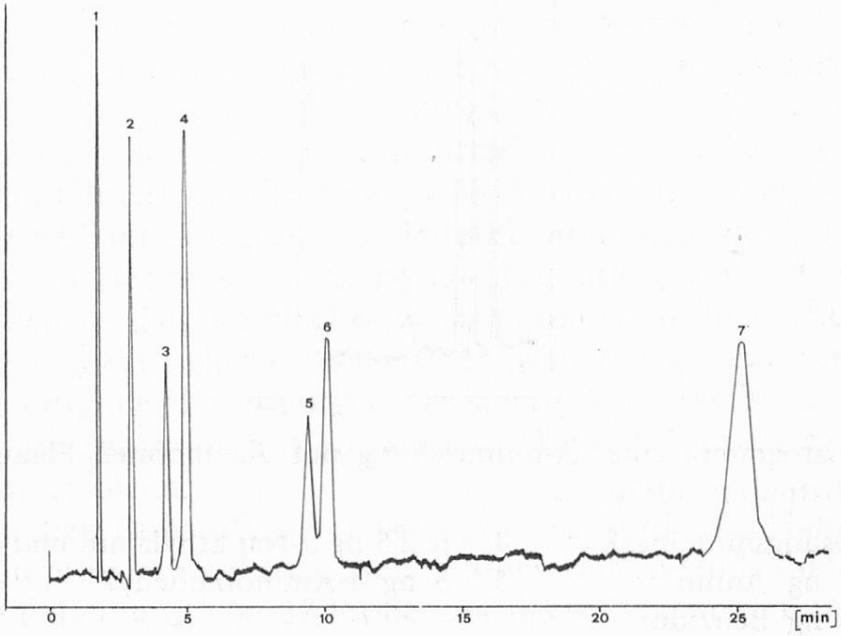

Abb. 1. Chromatogramm einer Aminmischung mit der mobilen Phase a) Acetonitril/ Phosphatpuffer 20/80 $^{v}/_{v}$

1 = Lösungsmittelpeak	4 = 100 ng Benzidin
2 = 30 ng Anilin	5 = 10 ng α-Naphthylamin
3 = 20 ng p-Toluidin (interner Standard)	6 = 10 ng β-Naphthylamin
	7 = 200 ng 4-Aminobiphenyl

UV-Detektion 240 nm (E = 0,01 Vollausschlag)

Wird durch Anwendung des Fließmittels b) auf die Trennung zwischen α- und β-Naphthylamin verzichtet, so ist die der anderen drei Amine schon nach ca. 9 Minuten beendet und die Nachweisgrenzen für die beiden letzten Peaks (4-Aminobiphenyl und Naphthylamine) werden tiefer (Abb. 2).

Extraktion der Amine aus dem Farbstoff

Prinzip

Der Farbstoff wird in H_2O gelöst, alkalisch gestellt und auf eine Extrelutsäule gegeben. Die Amine werden anschließend mit Ether eluiert und getrennt.

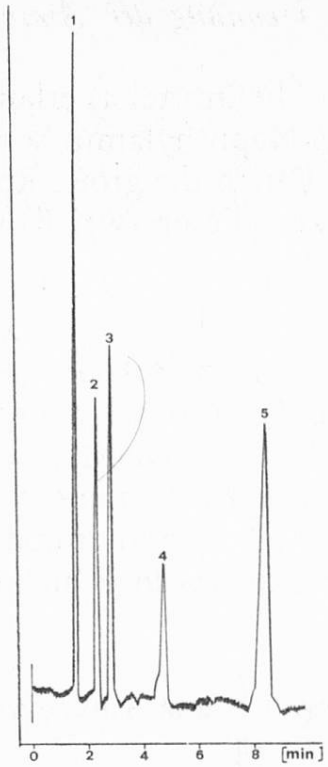

Abb. 2. Chromatogramm einer Aminmischung mit der mobilen Phase b) Acetonitril/Phosphatpuffer 30/70 $^{v}/_{v}$

1 = Lösungsmittelpeak
2 = 15 ng Anilin
3 = 50 ng Benzidin
4 = je 2,5 ng α-Naphthylamin und β-Naphthylamin
5 = 5 ng 4-Aminobiphenyl

UV-Detektion 240 nm (E = 0,01 Vollausschlag)

Arbeitsvorschrift

1 g Farbstoff wird in 15 ml H_2O gelöst. Man gibt 1 ml NaOH 20% zu, mischt, gibt die alkalische Farbstofflösung auf eine Extrelutsäule und spült mit ca. 5 ml verdünnter NaOH nach. Nach 15 Minuten eluiert man die Amine mit 40 ml Ether. Man gibt 5 ml 0,1 n HCl zum Ethereluat, schüttelt und dampft den Ether am Rotovap ohne zu erwärmen ab (Wasserstrahlvakuum). Der salzsaure Rückstand wird quantitativ in einen 5-ml-Meßkolben überführt. Als Spüllösung dient 0,1 n Salzsäure. Man füllt bis zur Marke mit 0,1 n Salzsäure auf. Vor dem Aufgeben der Probelösung auf die HPLC-Kolonne wird durch 0,2 μm Milliporefilter (Celluloseester) filtriert.

Resultate und Diskussion

Elektrochemische Detektoren sind noch nicht in jedem HPLC-Labor anzutreffen, so daß nach Möglichkeit mit dem UV-Detektor gearbeitet wurde, um eine möglichst generell verwendbare Methode zu beschreiben.

Bestimmungen der Wiederfindungsrate durch Extraktion ergaben für je 20,0 µg (= 20 ppm) zugesetzten Amins im Mittel (3 parallele Bestimmungen) folgende Werte (UV-Detektor)

4-Aminobiphenyl	111%	(22,2; 21,8; 25,2 µg)
Anilin	102%	(19,2; 21,2; 20,8 µg)
Benzidin	118%	(22,4; 24,4; 24,2 µg)
α-Naphthylamin	96%	(19,0; 18,8; 20,0 µg)

Der elektrochemische Detektor ist wie schon erwähnt bis zu 75mal empfindlicher als der UV-Detektor. Bedingt durch die Spezifität des elektrochemischen Detektors (10) werden basische Verbindungen wie Chinaldin und 2,6-Dimethylchinolin (Ausgangsprodukte von Chinolingelb) nicht nachgewiesen. Die tertiären Amine N,N-Dimethylanilin bzw. N,N-Diethylanilin, welche als Ausgangsmaterialien für Brillantsäuregrün bzw. Patentblau dienen, werden aber auch vom elektrochemischen Detektor angezeigt. Die Retentionszeiten dieser Verbindungen liegen jedoch so, daß der Nachweis der primären aromatischen Amine nicht gestört wird. Ein spezifischer Nachweis der primären aromatischen Amine und somit eine Bestätigung der erhaltenen Resultate kann nach *Baumann* (8) durch Vorkolonnenderivatisierung mit Fluram und HPLC-Bestimmung mit dem Fluoreszensdetektor erfolgen.

Je synthetischer Farbstoff der Positivliste (9) wurden 2 Handelsproben auf ihren Gehalt an primären aromatischen Aminen mit einem UV-Detektor geprüft. Anilin konnte dabei in 12 von 22 Proben nachgewiesen werden (Nachweisgrenze ≃ 1 ppm).

Brillantsäuregrün und Indigotin weisen die höchsten Werte für Anilin auf. Die erhaltenen Werte verteilen sich wie folgt:

Anilingehalt	Anzahl Proben
< 1 ppm	10
1 bis < 10 ppm	6
10 bis < 20 ppm	2
20 bis < 30 ppm	3
30 bis < 50 ppm	1

Peaks mit gleicher Retentionszeit wie Benzidin wurden nur in Patentblauproben beobachtet. Diese wurden mittels eines elektrochemischen Detektors bestimmt; sie entsprechen 0,1 und 0,3 ppm Benzidin. 4-Aminobiphenyl sowie Naphtylamine konnten mit dem UV-Detektor in keiner Probe nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 0,5 ppm).

Die Nachweisgrenzen im Farbstoff ließen sich noch um den Faktor 100 erniedrigen, wenn nach der Methode von *B. Stavric* (7) 10 g Farbstoff eingesetzt und der Extrakt auf 0,5 ml konzentriert würde. Des weiteren ließen sich ohne Verschlechterung der Auflösung 2- bis 3mal höhere Einspritzmengen verwenden, so daß die Nachweisgrenze dieser primären aromatischen Amine in Farbstoffen mit einem elektrochemischen Detektor unter 1 ppb liegen würde.

Dank

Frau *J. Schmid* danken wir für ihre Mitarbeit bei den praktischen Arbeiten.

Zusammenfassung

Es wird eine HPLC-Methode zur Bestimmung von primären aromatischen Aminen als Verunreinigungen (Anilin, 4-Aminobiphenyl, Benzidin, Naphthylamine) in synthetischen Farbstoffen für Lebensmittel beschrieben. Eine Extraktion der Amine erfolgt quantitativ mit Ether auf einer Extrelutsäule®. Die HPLC-Trennung der Amine erfolgt auf einer Säule mit Umkehrphase (C_8) und einem 0,15 Phosphatpuffer pH 6,0/Acetonitril. Mit dem UV-Detektor werden Nachweisgrenzen von 1 bis 5 ng (0,5—2,5 ppm) und mit dem elektrochemischen Detektor solche von 0,03 bis 0,2 ng (15—100 ppb) je nach Amin erreicht. Anilin konnte in 12, Benzidin in 2, 4-Aminobiphenyl und Naphthylamine in keiner der untersuchten 22 Farbstoffproben nachgewiesen werden.

Résumé

Il est décrit une méthode HPLC de dosage des résidus d'amines aromatiques primaires dans les colorants synthétiques pour denrées alimentaires. L'extraction quantitative des amines est faite à l'éther sur colonne Extrelut. La séparation des amines est ensuite effectuée sur colonne LC_8 à l'acétonitrile/tampon 0,15 m phosphate de pH 6,0. Avec un détecteur-UV la limite de détection se situe entre 1 et 5 ng (0,5—2,5 ppm) et avec un détecteur électrochimique elle atteint 0,03 à 0,2 ng (15—100 ppb) selon l'amine. L'aniline, la benzidine, le 4-aminobiphénile, l'α- et β-naphthylamine ont été recherchées. L'aniline a été décelée dans 12 colorants et la benzidine dans 2 sur 22 examinés (1—50 ppm).

Summary

A method for determination of primary aromatic amines (aniline, 4-aminobiphenyl, benzidine, naphthylamines) in synthetic colours for foodstuffs is described. The extraction of the amine is performed with ether on an Extrelut-column®. HPLC separation is realised on a reversed phase column (C_8) with 0.15 m phosphate buffer pH 6.0/acetonitrile. Detection limits of 1 to 5 ng (0.5—2.5 ppm) are reached by UV measurements, and such of 0.03 to 0.2 ng (15 to 100 ppb) are achieved with the electrochemical detector. 4-aminobiphenyl and naphthylamines have not been detected in any of the 22 tested food colours. Aniline was found in 12 and benzidine in 2 samples.

Literatur

1. Food additives and contaminants committee. Interim report on the review of the colouring matter in food regulation 1973, FAC/Rep/29. London, Her Majesty's Stationery Office 1979.

2. EEC Directive 2645/62, 23. Oktober 1962. Off. J. No 115, 11. 11. 62.
3. Normes d'itentité et de pureté pour divers additifs alimentaires dont des antioxigènes, colorants, épaissisants et autres substances. Réunions de la FAO sur la nutrition No 57. FAO, Rome 1977.
4. *Dixon, E. J.* and *Groffman, D. M.:* The determination of unsulphonated primary aromatic amines in water-soluble food dyes and other food additives. Analyst **100**, 476–481 (1975).
5. *Mefford, I., Keller, R. W.* and *Adams, R. N.:* Liquid chromatographic determination of picolomole quantities of aromatique amine carcinogens. Anal. Chem. **49**, 683 (1977).
6. *Schulze, J., Ganz, Ch.* and *Parkes, Douglas:* Determination of trace quantities of aromatic amines in dyestoffs. Anal. Chem. **50**, 171–174 (1978).
7. *Stavric, B., Klassen, R.* and *Miles, W.:* Gas-liquid chromatographicmass spectrometric determination of α- and β-naphthylamines in FD&C red No (amaranth). J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists. **62**, 1020–1026 (1979).
8. *Baumann, U.* und *Marek, B.:* Bestimmung migrierter aromatischer Amine in Lebensmittelsimulantien. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **71**, 468–483 (1980).
9. Verordnung über die in Lebensmitteln zulässigen Zusatzstoffe, 31. Oktober 1979. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern.
10. *Bratin, K., King, W. P., Kissinger, P. T.* and *Rice, J. R.:* Electrochemical detection of picomole amounts of oxidizable and reducible residues separated by liquid chromatography. To be published in Recent Advances in Pesticide Analytical Methodology: A Symposium by the American Chemical Society Symposium Series, John C. Harvey, ed.

Dr. H. R. Hunziker
Dr. A. Miserez
Bundesamt für Gesundheitswesen
Abteilung Lebensmittelkontrolle
Haslerstraße 16
CH-3008 Bern