

Chemiepraktikum 376-0010-00P FS21

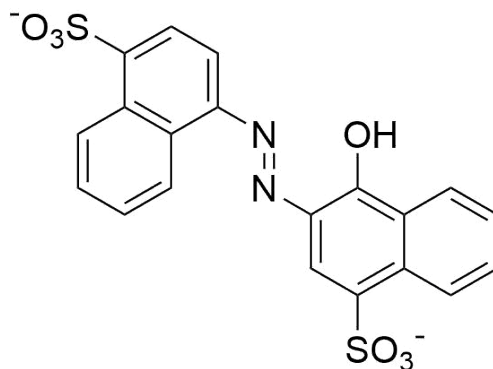
Kapitel 4

Lebensmittelfarbstoffe

Synthese von Azorubin

Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie

Assistenten:

Thomas Moragues (thomas.moragues@chem.ethz.ch)Chao Song (chao.song@chem.ethz.ch)

1 Theorie

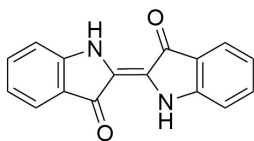
1.1 Allgemeines

1.1.1 Zusatzstoffe

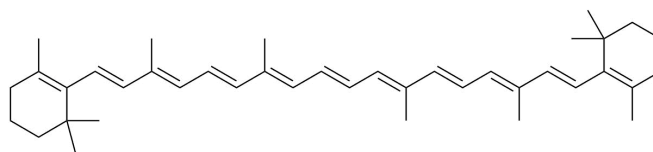
Zusatzstoffe werden Lebensmitteln bei der Verarbeitung zugesetzt, um deren Beschaffenheit zu beeinflussen oder bestimmte Eigenschaften wie Haltbarkeit, Stabilität oder Farbe zu erzielen. Zum Beispiel ersetzen Farbstoffe die bei der Verarbeitung verlorengegangene Farbe. Konservierungsmittel werden beigelegt, um die Lebensmittel vor schädlichen Bakterien und Schimmelpilzen zu schützen. Emulgatoren und Stabilisatoren ersetzen die durch die Fettreduktion verlorengegangene natürliche Sämigkeit einer Speise. Es dürfen nur gesetzlich zugelassene Zusatzstoffe bei der Lebensmittelverarbeitung verwendet werden. Diese sind in einer Positivliste zusammengefasst, d.h. nur die hier aufgeführten Stoffe dürfen Lebensmitteln zugesetzt werden. In dieser sogenannten E-Liste findet man viele Substanzen, die natürlicherweise in Lebensmitteln vorkommen, z.B. Carotine (E160a), Zitronensäure (E130) oder Pektin (E140), aber auch Stoffe, die überhaupt nicht in der Natur vorkommen, so z.B. Azofarbstoffe oder die Süsstoffe Aspartam (E951) und Cyclamat (E952). Das «E» steht dabei für EU. Die Schweiz hat sich dabei den europäischen Bestimmungen angeschlossen und die Nummerierung übernommen. Die Zusatzstoffe werden mit dem Buchstaben «E» bezeichnet, gefolgt von einer 3- bis 4-stelligen Zahl. Das E-Nummern-System dient auch dazu, um zugelassene Zusatzstoffe quer durch alle Sprachen zu kennzeichnen.

1.1.2 Farbstoffe

Als Farbstoff werden chemische Verbindungen bezeichnet, die die Eigenschaft haben, andere Materialien zu färben. Nach DIN 55934 sind es solche Farbmittel, die in ihrem Anwendungsmedium löslich sind. Unlösliche Farbmittel heissen Pigmente. Farbstoffe, die dazu verwendet werden Lebensmittel zu färben, werden als Lebensmittelfarben bezeichnet und sind Lebensmittelzusatzstoffe. Die Farbstoffe kann man in tierische und pflanzliche oder organische und anorganische Farbstoffe einteilen. Eine weitere Einteilung unterscheidet zwischen synthetischen und natürlichen Farbstoffen. Synthetische Farbstoffe sind zum Beispiel Azofarbstoffe. Tierische Farbstoffe sind solche, die von Tieren produziert werden. Das sind z.B. Purpur (von der Purpurschnecke) und Karmin (von der Cochenille-Schildlaus). Pflanzliche Farbstoffe werden aus Pflanzen produziert, z.B. Indigo, Chlorophyll (Blattgrün), Crocetin (Safran) oder Carotin (Karotten). Anorganische Farbstoffe enthalten keinen Kohlenstoff, z.B. Chromgelb (Blei(II)-chromat).



Indigo



β -Carotin

Abbildung 1 Strukturformeln der pflanzlichen Farbstoffe Indigo und β -Carotin.

Weisses Licht (Spektrum im Bereich 380-790 nm) ist eine Mischung von Licht mit verschiedensten Wellenlängen. Das Farbspektrum reicht hierbei von langwelligem Rotlicht (IR, ca. 790 nm) bis zu kurz- welligem Violettlicht (UV, ca. 380 nm). Die Wirkungsweise von Farbstoffen beruht nun darauf, bestimmte Teile des Lichtspektrums zu absorbieren. Die Komplementärfarbe der absorbierten Wellenlänge ist die Farbe, in welcher der Farbstoff erscheint (siehe Tab.1).

Tabelle 1 Ausgewählte Wellenlänge mit zugehöriger Farbe und Komplementärfarbe.

Wellenlänge	Farbe	Komplementärfarbe
410 nm	Violett	Grüngelb
450 nm	Blau	Gelb
530 nm	Grün	Purpur
580 nm	Gelb	Blau
600 nm	Orange	Blaugrün
640 nm	Rot	Grünblau

Die Absorption von elektromagnetischer Strahlung, zu der auch Licht gehört, beruht dabei auf der Anhebung des Energieniveaus von Elektronen in Molekülen oder Atomen (Erhöhung des Abstandes zwischen Elektronen und den Atomkernen). Die hierzu nötige Energie wird der einfallenden elektromagnetischen Strahlung, dem Licht, entnommen. Da sich diese Vorgänge auf der Quantenebene abspielen, ist diese Absorption nicht kontinuierlich, sondern erfolgt nur in bestimmten Stufen, die dem energetischen Unterschied zwischen den Elektronenkonfigurationen vor und nach der Absorption entsprechen. Dieser Energieunterschied ist umgekehrt proportional zu der absorbierten Wellenlänge des einfallenden Lichts und bestimmt somit die Farbe, in der der Farbstoff erscheint. Treten in den betrachteten Molekülen oder Atomen nur einfache σ -Bindungen auf, so ist die Energie, die benötigt wird, um die entsprechenden σ -Elektronen auf ein höheres energetisches Niveau zu heben, zu gross, als dass es zu einer Niveauerhöhung durch den sichtbaren Teil des elektromagnetischen Spektrums kommen könnte. Im Allgemeinen findet hier eine Absorption im Bereich des UV-Lichtes oder der Röntgenstrahlung statt, so dass diese Art von Verbindungen normalerweise als Farbstoff ungeeignet sind. Leichter gelingt die Anregung der Elektronen, die in π -Bindungen, z.B. ungesättigten Bindungen, auftreten. Diese absorbieren elektromagnetische Wellen im Bereich des langwelligen UV-Bereichs.

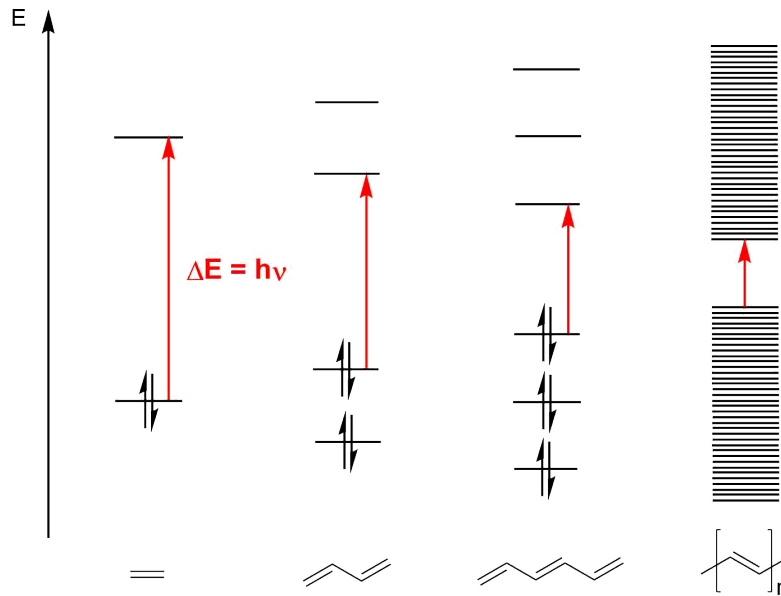


Abbildung 2 Mit zunehmender Anzahl an Doppelbindungen wird die Energiedifferenz, welche für die Anregung eines Elektrons überwunden werden muss, immer kleiner. Dieser Energieunterschied entspricht dem energetischen Abstand zwischen dem höchstliegenden gefüllten (HOMO) und dem tiefstliegenden ungefüllten (LUMO) Orbital.

Arrangiert man mehrere solcher ungesättigter Bindungen (Mehrfachbindungen) abwechselnd mit Einfachbindungen, so kommt es zu einer Delokalisierung der π -Elektronen, wodurch der Abstand zwischen dem höchsten besetzten Orbital (engl. highest occupied molecular orbital, HOMO) und dem niedrigsten unbesetzten Orbital (engl. lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) abnimmt. Man spricht von konjugierten Doppelbindungen. Dadurch ist weniger Energie nötig, um ein Elektron aus dem HOMO ins LUMO anzuregen. Diese Anregungsenergie entspricht einer bestimmten Wellenlänge. Mit zunehmender Anzahl konjugierter Doppelbindungen nimmt also diese Anregungsenergie zunehmend ab und der Absorptionsbereich wird zunehmend in den langwelligeren, sichtbaren Bereich des Lichts verschoben (siehe Abb. 2).

Eine weitere Anhebung kann erreicht werden, indem solche Stoffe mit besonders geeigneten anderen Atomgruppen oder Atomen kombiniert werden, die als Elektronenakzeptoren oder Elektronendonoren fungieren und/oder mesomeriefähig sind. Elektronendonoren werden dabei als Auxochrome und Elektronenakzeptoren als Antiauxochrome bezeichnet. Beispiele dafür sind in Tabelle 2 zu finden. Die Wirkung dieser Auxo- bzw. Antiauxochrome beruht dabei auf einer Polarisierung des Moleküls und einer daraus folgenden Verschiebung der vorhandenen delokalisierten Elektronen, die durch die ungesättigten Verbindungen im Rest des Moleküls zur Verfügung stehen. Die Gruppen, die entsprechende delokalisierte Elektronen zur Verfügung stellen, werden auch als Chromophore bezeichnet. Beispiele für Chromophore sind ebenfalls in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2 Beispiele für funktionelle Gruppen, die zu den Auxochromen, Antiauxochromen oder Chromophoren gehören.

Auxochrome	Antiauxochrome	Chromophore
------------	----------------	-------------

R-OH	R ₂ -C=O	R-C=C-C-R
R-NH ₂	R-NO ₂	R-N=N-R
R-SO ₃ H	R-CHO	R-C=O
R-COOH	R-C=N-R	R-N=O
		R-C=N-H

1.1.3 Lebensmittelfarbstoffe

Lebensmittelfarbstoffe sind natürliche oder synthetische Farbstoffe, die laut Lebensmittelgesetz zum Färben von Nahrungs-, Genuss- und Arzneimitteln zugelassen sind. Unansehnliche Waren erhalten durch Lebensmittelfarben ein verkaufsförderndes farbiges und appetitanregendes Aussehen.

Bedenklich kann dabei sein, dass der Eindruck guter Qualität vermittelt wird, auch wenn dies nicht der Fall ist. Ausserdem gewöhnen sich die Verbraucher an Färbungen, die mit dem natürlichen Aussehen der Produkte unter Umständen nicht mehr viel zu tun haben. Grundsätzlich kann man davon ausgehen, dass von Lebensmittelfarbstoffen keine Gesundheitsgefährdung ausgeht. Bei einigen Farbstoffen besteht jedoch aufgrund der chemischen Verwandtschaft mit den zum Teil giftigen Azofarbstoffen der Verdacht auf gesundheitsschädigendes Potential.

1.1.4 Azofarbstoffe

Mit über 2000 organischen Verbindungen stellen die Azofarbstoffe die grösste Gruppe der Farbstoffe dar. Sie zeichnen sich durch besonders lichtechte, stabile und kräftige Farben aus, die sich gut mischen lassen. Viele Azoverbindungen werden im menschlichen Körper durch Enzyme in ihre Ausgangsverbindungen aufgespalten, die als stark krebserregend gelten. Während Azofarbstoffe zu Beginn des 19. Jahrhunderts ein breites Anwendungsspektrum hatten, ist ihre Verwendung heute hauptsächlich auf die Färbung von Fetten, Holz und Papier beschränkt. Nur einige wenige sind auch zum Färben von Lebensmitteln, Kosmetikartikeln und Textilien zugelassen. Viele Azofarbstoffe stehen noch immer unter Verdacht, Allergien und Pseudoallergien auszulösen, sowie an den Ursachen für das hyperkinetische Syndrom («Zappel-Philipp») beteiligt zu sein.

1.2 Herstellung von Azofarbstoffen

1.2.1 Diazotierung

Die Diazotierung bezeichnet die Nitrosierung primärer, aromatischer Amine mit salpetriger Säure, was zur Bildung von Diazonium-Kationen führt. Die Diazotierung findet im Prinzip auch bei primären aliphatischen Aminen statt, jedoch sind deren Diazonium-Ionen im Allgemeinen so instabil, dass sie sofort unter Stickstoffabspaltung in Carbenium-Ionen übergehen. Diazoniumsalze sind wichtige Zwischenstufen für organische Synthesen, beispielsweise für die Azokupplung und die Sandmeyer Reaktion.

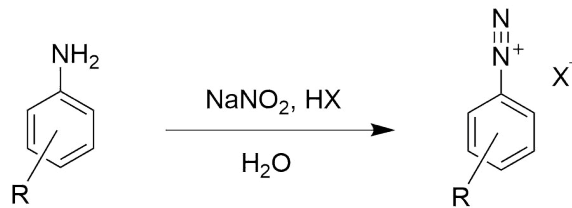


Abbildung 3 Herstellung eines Diazoniumsalzes aus einem Anilin-Derivat.

Mechanismus

Durch Zugabe einer Säure wird aus dem Nitrit-Ion ein Nitrosonium-Ion als Elektrophil gebildet.

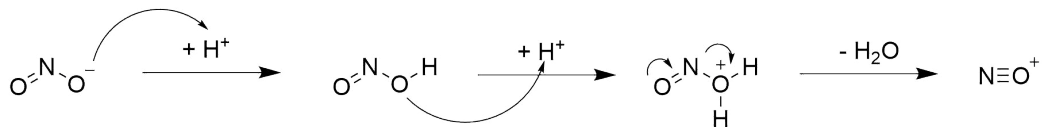


Abbildung 4 Mechanismus der Bildung des Nitrosonium-Ions aus dem Nitrit-Ion.

Die Reaktion des Anilins mit dem Nitrosonium-Ion verläuft anschliessend über mehrere Stufen, wobei am Schluss die Diazonium-Verbindung gebildet wird:

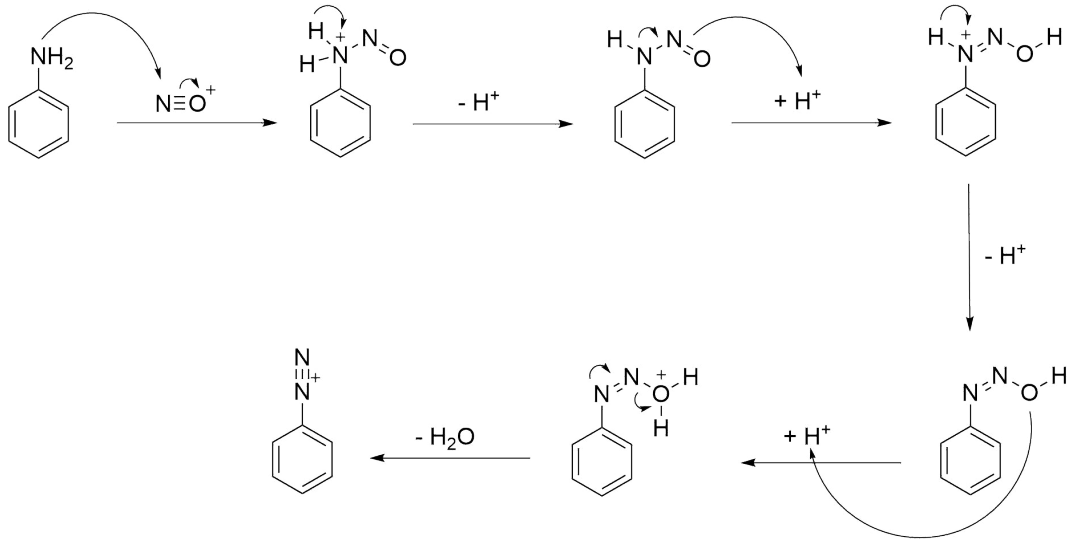


Abbildung 5 Mechanismus der Diazotierung von Anilin.

Die relative Stabilität aromatischer Diazonium-Ionen beruht auf Resonanzstabilisierung durch den aromatischen Ring:

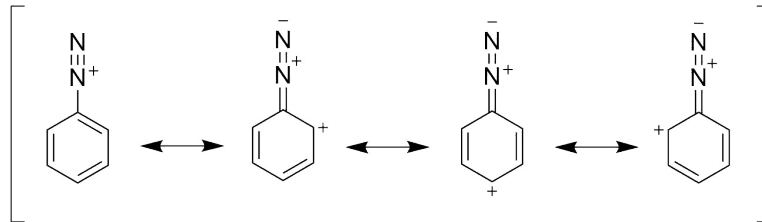


Abbildung 6 Die verschiedenen Resonanzstrukturen des aromatischen Diazonium-Ions.

Wässrige Lösungen von Arendiazoniumionen sind unter Eiskühlung stabil. Salze mit nicht-nukleophilen Gegenionen (z.B. Sulfate, Tetrafluoroborate oder Hexafluorophosphate) sind am stabilsten. Sie fallen aus und können so isoliert werden.

1.2.2 Azokupplung

Die Darstellung von Azoverbindungen geschieht durch Umsetzung eines Diazoniumsalzes mit einem elektronenreichen Aromaten. Y steht dabei für einen Donorsubstituenten.

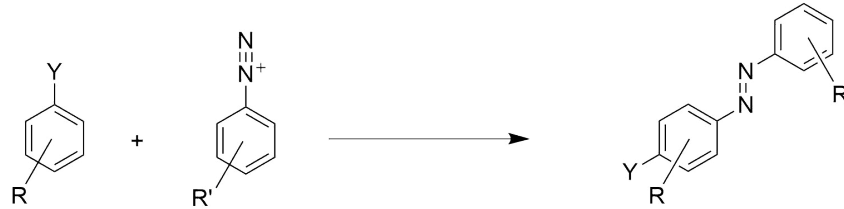


Abbildung 7 Die Azokupplung beruht auf der Reaktion eines Diazoniumsalzes mit einem elektronenreichen Aromaten.

Da Aryldiazoniumsalze schwache Elektrophile sind, gehen sie nur mit aktivierten Aromaten Reaktionen ein. So sind erst Phenolate genügend reaktiv. Die Azokupplung erfolgt selektiv in para-Position, ausser an dieser Stelle ist bereits ein Substituent vorhanden (dann ortho), da in para-Stellung meist weniger sterische Hinderungen auftreten. Die Azo-Kupplung funktioniert nur bei aktivierten Aromaten. Daher wird die Kupplungskomponente, meist ein aromatischer Alkohol, zunächst deprotoniert.

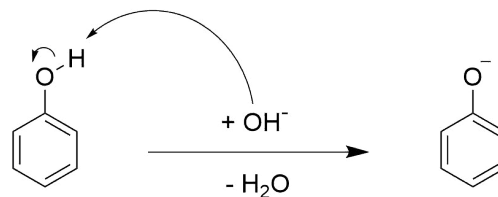


Abbildung 8 Die Deprotonierung und gleichzeitige Aktivierung von Phenol.

Dadurch wird die Elektronendichte im Ring erhöht, da die negative Ladung durch Resonanz in den aromatischen Ring verlagert werden kann. Die Kupplungskomponente wird dadurch aktiviert.

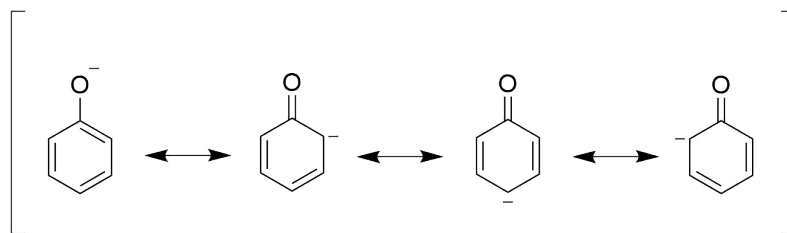


Abbildung 9 Die verschiedenen Resonanzstrukturen von Phenol.

Die Kupplung zum Farbstoff erfolgt nun nach dem Mechanismus einer elektrophilen aromatischen Substitution, wobei das Diazoniumsalz als Elektrophil und die Kupplungskomponente als Nucleophil agieren.

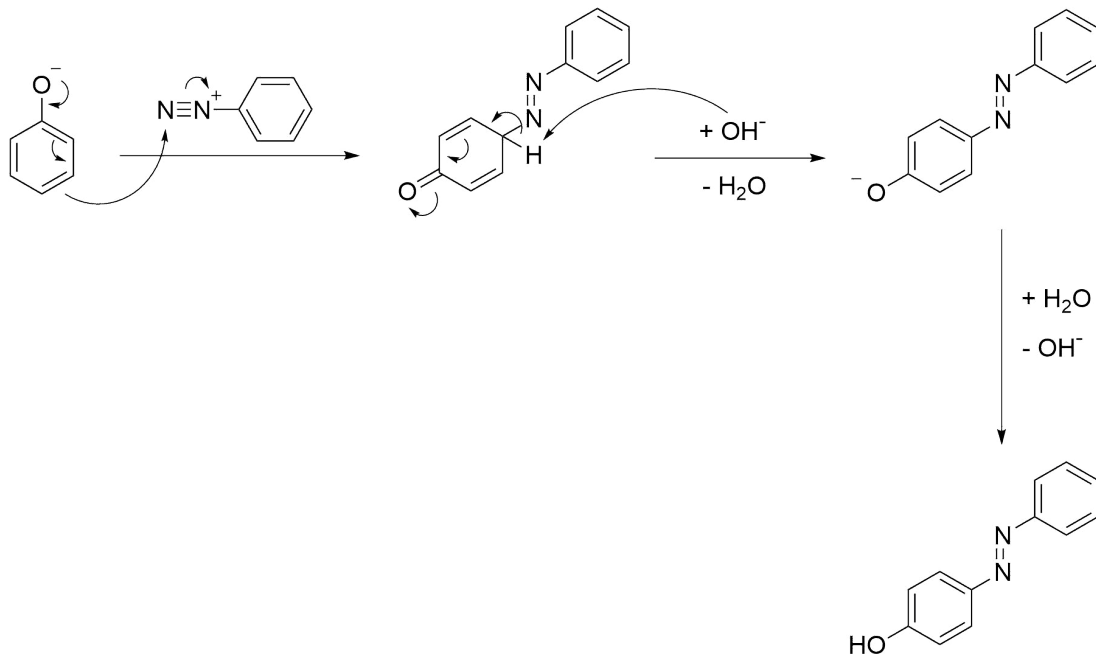


Abbildung 10 Mechanismus der Azokupplung.

1.3 Dünnschichtchromatographie

Die Chromatographie ist eine sehr leistungsfähige und verbreitete Trennmethode. Sie wurde erstmals vom russischen Botaniker Tswett 1903 zur Trennung von Blattfarbstoffen angewendet (chroma, gr. = Farbe). Für die Dünnschichtchromatographie verwendet man Plättchen aus Kunststoff, Aluminium oder Glas, die mit einer dünnen Schicht eines sehr feinkörnigen Stoffes (z.B. Kieselgel- oder Aluminiumoxidpulver) beschichtet sind. Diese Schicht nennt man stationäre Phase. Das zu trennende Gemisch wird nun in der Nähe des unteren Randes des Plättchens punktförmig aufgetragen. Anschliessend wird das Plättchen in ein Gefäss gestellt, das eine geringe Menge Flüssigkeit enthält. Diese Flüssigkeit bezeichnet man als Fliessmittel oder mobile Phase. Der Füllstand muss tiefer als der aufgetragene Punkt auf dem Kieselgel sein, damit das Lösemittel das unbekannte Gemisch nicht auflöst. Das Fliessmittel steigt nun durch die Kapillarkraft im Schichtmaterial hoch. Sobald die Flüssigkeit den «Gemischfleck» erreicht hat, sind die Teilchen des Gemisches der Anziehungskraft der stationären Phase einerseits und der Anziehungskraft der mobilen Phase andererseits ausgesetzt. Je nach Kräfteverhältnis bleibt ein Teilchen eher am Startpunkt oder es wandert eher mit der mobilen Phase nach oben.

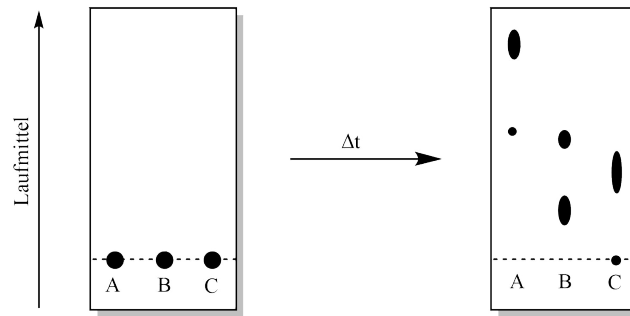


Abbildung 11 Schematische Darstellung einer Dünnschichtchromatographie.

Die Kräfte und somit das Wanderverhalten eines Teilchens hängen sowohl von der Art des Schichtmaterials und des Fließmittels, als auch von der Art des Teilchens ab. In den meisten Fällen lassen sich Schichtmaterialien und Fließmittelgemische so kombinieren, dass die verschiedenen Teilchensorten eines Gemisches verschieden weit wandern, sodass sie sich voneinander trennen lassen (siehe Abb. 11).

2 Experimente

2.1 Synthese von Azorubin

Azorubin (E122)

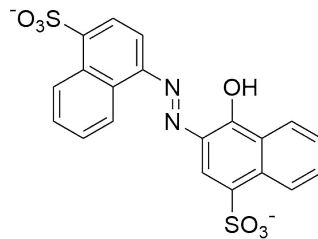


Abbildung 12 Strukturformel des Azorubins.

Charakteristik Azorubin ist ein roter, wasserlöslicher Azofarbstoff. Er ist beständig gegen Licht und Hitze, jedoch nicht gegen Fruchtsäuren.

Verwendung Azorubin wird verwendet für Getränke, Süß- und Zuckerwaren, Marzipan, Puddingpulver, Kunstspeiseeis, Biskuit, Fruchtkonserven, Fertigsuppen, braune Saucen, Paniermehl sowie bei Arzneimitteln zur Färbung von Dragees.

Sicherheit Das Risiko von Azorubin ist bis heute nicht abschliessend geklärt. Es besteht der Verdacht auf Auslösung von Pseudoallergien bei empfindlichen Menschen, besonders bei Personen, die empfindlich auf Aspirin oder Benzoesäure reagieren. Im Tierversuch wurden bei höherer Dosierung verschiedene Nebenwirkungen auf Blutbild, Lunge, Lymphsystem und Bauchspeicheldrüse beobachtet.

Reaktionsgleichung

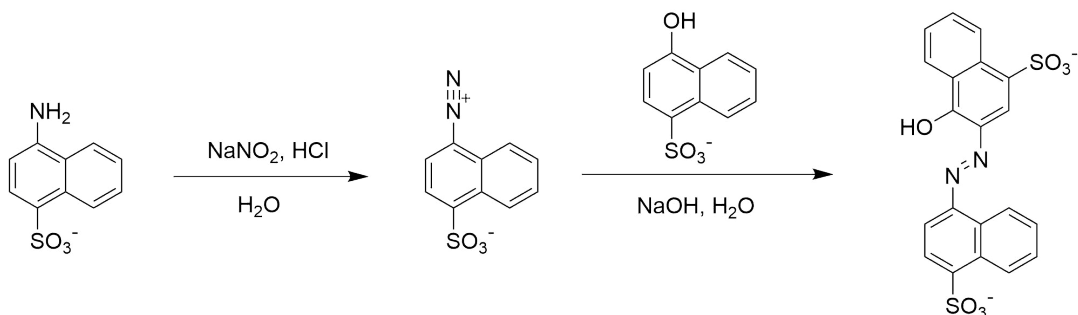


Abbildung 13 Synthese des Azofarbstoffs Azorubin.

2.1.1 Vorgehen

Ansatz

- 0.25 g 4-Aminonaphthalin-1-sulfonsäure-Natriumsalz
- 0.35 g 1-Naphthol-4-sulfonsäure-Natriumsalz
- 0.10 g Natriumnitrit gelöst in H₂O, sodass w = 14 % → ausrechnen, wieviel deion. Wasser nötig ist
- 5 mL NaOH 2 M (mol·L⁻¹)
- 4.5 mL HCl 2 M (mol·L⁻¹)

Herstellung der Diazonium-Lösung

VORSICHT: Feste Diazoniumsalze sind explosiv! Gebrauchte Gegenstände sofort gut waschen.

- In einem Becherglas das 4-Aminonaphthalin-1-sulfonsäure-Natriumsalz in 5 mL deion. Wasser lösen.
- Unter Rühren einige Tropfen NaOH 2 M hinzugeben, bis sich das Salz komplett gelöst hat.
- Den pH-Wert prüfen.
- Natriumnitrit-Lösung langsam mithilfe einer Pasteurpipette hinzugeben.
- In einem zweiten Becherglas die 4.5 mL HCl 2 M in einem Eisbad abkühlen.
- Sobald die Temperatur maximal 5°C beträgt, die erste Lösung unter Rühren langsam mithilfe einer Pasteurpipette hinzugeben.
- Für 10 min weiter rühren (auf Eis).
- Um sicherzugehen, dass die Reaktion vollständig abgelaufen ist, wird mithilfe von KI-Stärkepapier getestet, ob überschüssiges Natriumnitrit vorhanden ist:
 - Einen Tropfen aus dem zweiten Becherglas auf einen Teststreifen auftragen.
 - Sollte sich das Papier blau/lila verfärben, deutet dies auf das Vorhandensein von Natriumnitrit hin. Die Reaktion ist abgeschlossen.
 - Ansonsten noch wenige Tropfen Natriumnitrit hinzufügen.

Vorbereiten der Kupplungskomponente

- Das 1-Naphthol-4-sulfonsäure-Natriumsalz in 5 mL deion. Wasser in einem weiteren Becherglas unter Rühren lösen.
- Sobald alles gelöst ist, die Lösung mit 5 mL NaOH 2 M versetzen und im Eisbad auf ca. 0 °C kühlen.

Kupplung zum Farbstoff

- Zur Kupplungskomponente wird unter Rühren im Eisbad die Diazoniumsalzlösung mittels Pasteurpipette zugetropft.
- Danach das Gemisch bei Raumtemperatur 10-15 Minuten nachrühren lassen.

2.2 Nachweis von Azorubin

Der Farbstoff Azorubin soll aus rotem Sirup mittels Wollfadenmethode extrahiert und qualitativ mittels Dünnschichtchromatographie (DC) bestimmt werden.

Ansatz

- 4 Pasteurpipetten roter Essig
- 10 mL Essigsäure in 5%-iger wässriger Lösung
- 10 mL Ammoniak in 5%-iger wässriger Lösung

Aufbereitung

- Den Essig in einem Becherglas vorgelegen und 10 mL der wässrigen 5%-igen Essigsäure hinzugeben.
- Die Lösung unter Rühren auf 70° C erhitzen.
- Einen ca. 10-15 cm langen Wollfaden in die Lösung legen und rühren.
- Wenn die Lösung fast farblos ist, den Wollfaden mit Wasser gut spülen.
- Den gespülten Wollfaden in ein Becherglas mit 10 mL der 5%-igen wässrigen Ammoniak-Lösung legen und rühren, bis sich der Wollfaden wieder ganz entfärbt hat (durch Erhitzen auf 70 °C).
- Den Wollfaden entfernen und die Lösung erhitzen, damit sie auf einige mL konzentriert wird.
- Die konzentrierte Probe wird mittels Dünnschicht-Chromatographie qualitativ bestimmt.