

Methoden zur Untersuchung von Papier, Karton und Pappe für Lebensmittelverpackungen und sonstige Bedarfsgegenstände

5. Bestimmung von Einzelsubstanzen

5.8 D-Sorbit

1. Allgemeine Angaben

$C_6H_{14}O_6$ MG = 182,17

Bezeichnung in der Empfehlung XXXVI: Sorbit

Ordnungsnummer: C II 4, Feuchthaltemittel

Stand: März 1979

Analytisches Messprinzip: Photometrie

Bearbeiter: E. Petermann und I. Vetter*, G. Henniger**

* Herzberger Papierfabrik, Ludwig Osthusenrich GmbH & Co. KG, Andreasberger Straße 1, 3, 120 Herzberg/Harz.

** Boehringer Mannheim GmbH, Bahnhofstraße 9-15, 8132 Tutzing.

2. Grundlagen des Verfahrens

Die zu untersuchende Probe wird zerkleinert, mit Wasser extrahiert und der Extrakt auf Sorbit untersucht. Sorbit wird in Gegenwart von Sorbit-Dehydrogenase (SDH) durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) zu Fruktose oxidiert, wobei NAD zu NADH reduziert wird. Bei den in der Bestimmung vorliegenden Testbedingungen liegt das Gleichgewicht der Reaktion vollkommen auf der Seite von Fruktose und NADH. Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der Sorbit-Menge äquivalent. NADH ist die Messgröße und kann aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm bestimmt werden.

3. Chemikalien und Lösungen

Es sind ausschließlich Reagenzien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ und frisch bidestilliertes Wasser zu verwenden.

Chemikalie	Konzentration	Sonstige Angaben
Salzsäure	1 mol/l	k. A.
Pufferlösung aus Pyrophosphat	0,1 mol/l	pH 9,5; 4,46 g tetra-Natriumdiphosphat-10-hydrat ($Na_4P_2O_7 \cdot 10 H_2O$) werden in 80 ml Wasser gelöst, mit ca. 2 ml Salzsäure (2.2.1) auf pH 9,5 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt (Haltbarkeit: bei + 40 C unbegrenzt).
Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Lösung (NAD)	ca. 30 mmol/l	40 mg NAD werden in 2 ml Wasser gelöst

Sorbit-Dehydrogenase-Lösung 4 mg/l
(SDH)

(Haltbarkeit: bei +40 C mind.
4 Wochen)

24 mg Lyophilisat (= 4 mg
Enzymprotein) werden in 1
ml Wasser gelöst (Haltbar-
keit bei + 4°C mind. 2 Wo-
chen, eingefroren mind. 4
Wochen)

Polyamidpulver oder Polyvinyl- k. A.
polypyrrolidon (PVPP)

k. A.

Tabelle 1 Chemikalien und Lösungen

4. Geräte

- 4.1 Spektrallinienfilter-Photometer mit Messmöglichkeit bei 365 nm oder Spektral-
photometer (340 nm)
- 4.2 Glasküvetten, Schichtdicke 0,5 cm, 1,0 cm, DIN 58936, Teil 1
- 4.3 Analysenwaage, Messgenauigkeit 0,0001 g
- 4.4 Messkolben mit Kegelschliffhülse und Stopfen, 100 ml, DIN 12664
- 4.5 Messpipetten, 10 ml, 5 ml, 1 ml, 0,1 ml, DIN 12621
- 4.6 Trichter, DIN 12445
- 4.7 Glasfaserfilter (vor Gebrauch sind die Filter mehrmals mit heißem Wasser zu
waschen)
- 4.8 Aufschlaggerät, z. B. Ultra Turrax
- 4.9 Bechergläser, HF 250, DIN 12331
- 4.10 Messzylinder, 100 ml, DIN 12680
- 4.11 pH-Messgerät mit Glaselektrode
- 4.12 Beheizbarer Magnetrührer mit Rührkern

5. Probenahme und Probenvorbereitung

5.1 Probenahme

Die Probenahme erfolgt nach DIN 53101. Damit keine Veränderung der Probe bis zur
Durchführung der Prüfung eintritt, ist die Probe in Aluminiumfolie einzuschlagen.

5.2 Probenvorbereitung

Die Probe wird in Schnitzel von ca. 1 x 1 cm Kantenlänge zerschnitten. Außerdem sind
für die Bestimmung der Flächenmasse nach DIN 53104, Teil 1, und zur Bestimmung des
Trockengehaltes nach DIN 53103 gesondert mengengerechte Anteile zu entnehmen.

6. Bestimmung der Flächenmasse nach DIN 53104, Teil 1

7. Bestimmung des Trockengehaltes nach DIN 53103

8. Extraktion der Probe

Von der zerschnittenen Probe werden ca. 1 g auf 0,0001 g genau gewogen, in ein 250 ml-
Becherglas gegeben, mit ca. 50 ml Wasser übergossen und mit einem Aufschlaggerät zer-
fasert. Das Aufschlaggerät wird anschließend sorgfältig mit ca. 10 ml Wasser abgespült. Die
vorbereitete Probe wird mit einem beheizbaren Magnetrührer 15 min bei 60° C gerührt. Nach

dem Abkühlen wird die Probe quantitativ in einen 100 ml-Messkolben übergeführt und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Vor Durchführung der Bestimmung wird die Probe über Glasfaserfilter filtriert, und die klare Probelösung wird für die Untersuchung eingesetzt.

Anmerkung: Bei Färbung der Probelösung ist mit Polyamidpulver oder Polyvinylpyrrolidon zu behandeln und über Glasfaserfilter zu filtrieren.

9. Durchführung

Von der vorbereiteten Probelösung werden 0,5 ml in eine Küvette pipettiert, mit 2,50 ml Pufferlösung (siehe Tabelle 1) und 0,10 ml NAD-Lösung (siehe Tabelle 1) versetzt und gut durchgemischt. Die Extinktion E_1 der Lösung wird gegen Luft gemessen und die Reaktion durch Zugabe von 0,05 ml SDH-Lösung (siehe Tabelle 1) gestartet. Nach Stillstand der Reaktion (ca. 60-70 min) wird die Extinktion E_2 der Lösung gegen Luft gemessen. Ein Reagenzienleerwert wird unter den gleichen Bedingungen wie beschrieben hergestellt, wobei anstelle der Probelösung 0,5 ml Wasser eingesetzt werden. Von der Extinktionsdifferenz der Probelösung wird die Extinktionsdifferenz des Leerwerts abgezogen.

Pro Ansatz sollten nicht mehr als 3-80 μg Sorbit vorliegen. Falls mit einem höheren Sorbitgehalt zu rechnen ist, ist das eingesetzte Probevolumen zu verringern, mit Wasser auszugleichen und in der Berechnung entsprechend zu berücksichtigen.

Anmerkung: SDH katalysiert auch mit wesentlich geringerer Reaktionsgeschwindigkeit Xylit, das z. B. im Holzschliff enthalten sein kann und einige andere Polyalkohole, wie z. B. Butylenglykol. Erst ab einer Konzentration dieser Substanzen von mehr als 40 mg/l ist eine Schleichreaktion zu beobachten, die durch Extrapolation eliminiert werden kann. Erfahrungsgemäß ist der Xylitgehalt in Papier jedoch so gering, dass die Xylit-Schleichreaktion nicht berücksichtigt werden muss. Butylenglykol darf in Papieren für die Lebensmittelverpackung nicht enthalten sein. Ketosen stören erst dann, wenn das Verhältnis Ketose: Sorbit $V \ 1$ ist. Die Oxidation verläuft dann zwar etwas langsamer, aber trotzdem quantitativ.

10. Auswertung

Es sind Parallelbestimmungen von mindestens zwei Proben durchzuführen. Die Auswertung erfolgt nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentrationen:

$$c = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E \quad [g/l]$$

Hierin bedeuten:

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz (für D-Sorbit = 182,17)

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient (von NADH bei $\lambda = 365 \text{ nm}$ = 3,4 [$\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] bzw. 6,3 [$\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] bei 340 nm)

ΔE = berechnete Extinktionsdifferenz somit $\Delta E = (E_2 E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 E_1)_{\text{Leerwert}}$

Hieraus ergeben sich für die Sorbitbestimmung unter den beschriebenen Bedingungen ($d = 0,5 \text{ cm}$; $\lambda = 365 \text{ nm}$):

$$c = \frac{3,15 \cdot 182,17}{3,4 \cdot 0,5 \cdot 1000} \cdot \Delta E \quad [g \text{ Sorbit} / l \text{ Probelösung}]$$

$$c = 0,6751 \cdot \Delta E \text{ [g/l]}$$

$$c = 67,51 \cdot \Delta E \text{ [mg/100 ml]}$$

Der Gehalt an Sorbit G_{Sor} beträgt

a) bezogen auf die Trockenmasse der Probe in mg/kg:

$$G_{\text{Sor 1}} = \frac{c \cdot 1000}{m_{\text{Tr}}}$$

b) bezogen auf die Flächenmasse der Probe in mg/m²:

$$G_{\text{Sor 2}} = \frac{m_A \cdot c}{m_E}$$

Hierin bedeuten:

m_A = Flächenmasse der Probe nach DIN 53104, Teil 1, in g/m²

m_E = Einwaage der Probe in g

c = 67,51 · Δ E in mg Sorbit

m_{Tr} = Einwaage der Probe in g, berechnet auf Trockengewicht nach DIN 53103

11. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf diese Vorschrift anzugeben:

Art und Bezeichnung der Probe

Anzahl der Parallelbestimmungen

Trockengehalt der Probe nach DIN 53103

Flächenmasse der Probe in g/m² nach DIN 53104, Teil 1

Gehalt an Sorbit in mg/kg bzw. mg/m² nach Abschnitt 10 a oder 10 b

Einzelwerte und Mittelwert

Gegebenenfalls Abweichungen von dieser Vorschrift

Prüfdatum

12. Wiederfindungsrate

ca. 93 %

13. Nachweisgrenze

6 mg Sorbit/kg Extrakt

14. Literatur

Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik 77/78,

Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Postfach 31 01 20, 6800 Mannheim 31

Bergmeyer, H. U., Gruber, W., Gutmann, I., in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.), Bd.2, S.1368-1371 (1974), Verlag Chemie, Weinheim

Williams-Ashman, H. G., Banks, J., Arch. Biochem. Biophys. 50, p. 513 (1954)

15. Anmerkung

Für Routineuntersuchungen hat sich folgendes Pipettierschema bewährt:

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Probe	-	0,50 ml
Puffer	2,50 ml	2,50 ml
NAD	0,10 ml	0,10 ml
Wasser	0,50 ml	-
Mischen, Extinktion der Lösungen gegen Luft messen (E_1) und Reaktion starten durch Zugabe von		
SDH	0,05 ml	0,05 ml

Mischen und nach Stillstand der Reaktion (ca. 60-70 min) erneut Extinktionen der Lösungen gegen Luft messen. Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen bilden. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von der Extinktionsdifferenz der Probe abziehen = ΔE .