

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

5. Bestimmung von Einzelsubstanzen

5.5 Ameisensäure

1. Allgemeine Angaben

HCOOH MG = 46,03

Bezeichnung in der Empfehlung XXXVI: Ameisensäure

Ordnungsnummer: B VIII 3, Konservierungsstoffe

Stand: März 1979

Analytisches Messprinzip: Photometrie

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

* Herzberger Papierfabrik, Ludwig Osthusenrich GmbH & Co. KG, Andreasberger Straße 1, 3420 Herzberg/Harz .

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

2. Grundlagen des Verfahrens

Die zu untersuchende Probe wird zerkleinert, mit Wasser extrahiert und im Extrakt Ameisensäure bestimmt. Ameisensäure (Formiat) wird mit Nicotinamidadenin-dinucleotid (NAD) durch eine mit Formiat-Dehydrogenase (FDH) katalysierte enzymatische Reaktion quantitativ zu Kohlendioxid oxidiert, wobei NAD zu NADH reduziert wird. Die gebildete NADH-Menge ist der Ameisensäuremenge 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
Pufferlösung	$c = 0,15 \text{ mol/l}$ Kaliumphosphat, pH 7,5)	Lösung A: 2,04 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) werden in 100 ml Wasser gelöst. Lösung B: 2,61 g diKaliumhydrogenphosphat-3-hydrat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$) werden in 100 ml Wasser gelöst. Zur Herstellung der Pufferlösung werden 14 ml von Lösung A mit Lösung B auf 100 ml aufgefüllt (Haltbarkeit: bei

Nicotinamid-adenin-dinucleotid- c = ca. 42 mmol/l
Lösung (NAD)

+4° C mind. 4 Wochen)
330 mg NAD-Li (frei von
Formiat) werden mit 11 ml
Wasser unter Rühren bei
Raumtemperatur gelöst
(Haltbarkeit: bei +4° C mind.
4 Wochen)

Formiat-Dehydrogenase (FDH) k. A.

80 U/ml:
Lyophilisat (ca. 80 U) wird
mit 1 ml Wasser gelöst
(Haltbarkeit: bei + 4° C mind.
5 Tage)

Aktivkohle oder Clarocarbon F® k. A.

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, 2 ml, 1 ml, 0,2 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, 250 ml, 100 ml, DIN 12680
- 4.11 Beheizbarer Magnetrührer mit Rührkern
- 4.12 pH-Messgerät mit Glaselektrode

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 I

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 zerfa

sert. 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 der Durchführung der Bestimmung wird die Probe über Glasfaserfilter filtriert, und die Lösung wird für die Untersuchung eingesetzt.

Anmerkung: Bei Färbung der Probelösung ist mit Aktivkohle oder Clarocarbon F[®] zu behandeln und über Glasfaserfilter zu filtrieren.

9. Durchführung

Von der vorbereiteten Probelösung werden 2,0 ml in eine Küvette pipettiert, mit 1,0 ml Pufferlösung (siehe Tabelle 1) und 0,5 ml NAD-Lösung (siehe Tabelle 1) versetzt und gut durchgemischt. Nach 2 min wird die Extinktion E_1 der Lösung gegen Luft gemessen, die Reaktion durch Zugabe von 0,05 ml FDH (siehe Tabelle 1) gestartet und die Küvette verschlossen. Nach Stillstand der Reaktion (30 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 Wasser eingesetzt wird. Die Extinktionsdifferenz des Leerwerts wird von der Extinktionsdifferenz der Probe abgezogen und geht als $\Delta E_{\text{Ameisensäure}}$ in die Berechnung ein.

Pro Ansatz sollten nicht mehr als 2-20 µg Ameisensäure vorliegen. Falls mit einem höheren Ameisensäuregehalt zu rechnen ist, ist das eingesetzte Probevolumen zu verringern, mit Wasser auszugleichen und in der Berechnung zu berücksichtigen.

Anmerkung: Bei Anwesenheit von reduzierenden Substanzen in der Probelösung kann es zur Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit kommen. Der Einfluss von SO₂ lässt sich z. B. durch Zusatz von 10 µl Wasserstoffperoxid (30 % m/m) vollständig beseitigen. Auch bei Anwesenheit von Methanal kann es zu Reaktionsverzögerungen kommen. Schon 5 µg Methanal verzögern die Reaktion beachtlich, 10 µg führen zu einer leichten und 100 µg Methanal zu einer starken Hemmung des Enzyms FDH. In diesem Fall ist die Reaktionszeit zu verlängern und die Zeit durch Vorversuche an Vergleichslösungen zu ermitteln (Methanal-Bestimmung siehe DIN 54281).

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 Ameisensäure = 46,03)

d = Schichtdicke [cm]

E = Extinktionskoeffizient

(von NADH bei Hg 365 nm 3,4 [1 · mmol⁻¹ · cm⁻¹] bzw.

6,3 [1 · mmol⁻¹ · cm⁻¹] bei 340 nm

ΔE = berechnete Extinktionsdifferenz

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

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

$$c = \frac{3,55 \cdot 46,03}{3,4 \cdot 0,5 \cdot 2 \cdot 1000} \cdot \Delta E \text{ [g Ameisensäure/l Probelösung]}$$

$$c = 0,0481 \cdot \Delta E \text{ [g/l]}$$

$$c = 4,81 \cdot \Delta E \text{ [mg/100 ml]}$$

Der Gehalt an Ameisensäure G_A beträgt

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

$$G_{A1} = \frac{c \cdot 1000}{m_{Tr}}$$

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

$$G_{A2} = \frac{m_A \cdot c}{m_E}$$

Hierin bedeuten:

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

m_E = Einwaage der Probe in g

c = $4,81 \cdot \Delta E$ mg Ameisensäure

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 Ameisensäure 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. 92 %

13. Nachweisgrenze: 1 mg Ameisensäure/kg Extrakt

14. Literatur

UV-Test zur Bestimmung von Ameisensäure in Lebensmitteln, Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Postfach 31 01 20, 6800 Mannheim 31

15. Anmerkung

Für Routineuntersuchungen hat sich folgendes Pipettierschema bewährt:

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Probe	-	2,00 ml
Puffer	1,00 ml	1,00 ml
NAD	0,50 ml	0,50 ml
Wasser	2,00 ml	-

Mischen nach 2 min. Extinktion der Lösungen gegen Luft messen (E_1) und Reaktion starten durch Zugabe von:

FDH	0,05 ml	0,05 ml
-----	---------	---------

Mischen, Küvetten verschließen und nach Stillstand der Reaktion (30 min) Extinktionen der Lösungen gegen Luft messen (E_2). Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen $E_2 - E_1$ bilden. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von der Extinktionsdifferenz der Probe abziehen = ΔE .