

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

5. Bestimmung von Einzelsubstanzen

5.9 Glycerin

1. Allgemeine Angaben

$C_3H_8O_3$ MG = 92,1

Bezeichnung in der Empfehlung XXXVI: Glycerin

Ordnungsnummer: C II 1, Feuchthaltemittel

Stand: März 1979

Analytisches Meßprinzip: Photometrie

Bearbeiter: E. Petermann und 1. 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 zerfasert, mit Wasser extrahiert und der Extrakt auf Glycerin untersucht. Bei der Bestimmung wird das Glycerin durch Anwesenheit von Glycerokinase (GK) mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu Glycerin-3-phosphat phosphoryliert. Das entstandene Adenosin-5'-diphosphat (ADP) wird durch eine mit Pyruvat-Kinase (PK) katalysierte enzymatische Reaktion mit Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt. In Gegenwart des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) wird das gebildete Pyruvat durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) zu Lactat hydriert, wobei NADH zu NAD oxidiert wird. Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Glycerin-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 bis-destilliertes Wasser zu verwenden.

Chemikalie	Konzentration	Sonstige Angaben
Natronlauge	5 mol/l	k. A.
Pufferlösung aus Glycerin und Mg^{2+}	0,75 mol/l Glycerin 10 mmol/l	pH 7,6; 10,0 g Glycylglycin und 0,25 g Magnesiumsulfat ($Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$) werden in 80 ml Wasser gelöst, mit ca. 2,4 ml Natronlauge (2.2.1) auf pH 7,6 eingestellt und mit

Reduzierte Nicotinamid-adenin-
dinucleotid/Adenosin-5'-
triphosphat/Phosphoenolpyruvat-
Lösung (NADWATPIPEP)

8,2 mmol/l NADH
33 mmol/l ATP
46 mmol/l PEP

Pyruvat-Kinase/Lactat-
Dehydrogenase (PK/LDH)
Glycerokinase (GK)

3 mg PK/ ml
1 mg LDH/ ml
1 mg/ml

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

Wasser auf 100 ml aufgefüllt
(Haltbarkeit: bei +4° C mind.
3 Monate)

42 mg NADH-Na₂, 120 mg
ATP-Na₂H₂, 60 mg PEP-Na
und 300 mg Natrium- hydro-
gencarbonat (NaHCO₃) wer-
den mit 6 ml Wasser gelöst
(Haltbarkeit: bei +4° C mind.
14 Tage)

die Suspension ist bei +4° C
mind. 1 Jahr haltbar
die Suspension ist bei +4° C
mind. 1 Jahr haltbar
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, 0,1 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. 1X 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 zerkleinert. 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 Probenlösung wird für die Untersuchung eingesetzt.

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

9. Durchführung

Von der vorbereiteten Probelösung werden 2 ml in eine Küvette pipettiert, mit 1 ml Pufferlösung (siehe Tabelle 1), 0,1 ml NADH/ATP/PEP-Lösung (siehe Tabelle 1) und 0,01 ml PK/LDH (siehe Tabelle 1) versetzt und gut durchgemischt. Nach 10 min wird die Extinktion E_1 der Lösung gegen Luft gemessen und die Reaktion durch Zugabe von 0,01 ml GK (siehe Tabelle 1) gestartet. Nach Stillstand der Reaktion (10 min) wird die Extinktion E_2 gegen Luft gemessen. Parallel zur Bestimmung ist ein Reagenzienleerwert anzusetzen. Der Leerwert wird unter den gleichen Bedingungen wie beschrieben hergestellt, wobei anstelle der Probelösung Wasser eingesetzt wird. Von der Extinktionsdifferenz der Probelösung wird die Extinktionsdifferenz des Leerwertes abgezogen. Diese Differenz ist der in die Berechnung als ΔE einzusetzende Wert.

Pro Ansatz sollten nicht mehr als 2-50 μg Glycerin vorliegen. Falls mit einem höheren Glyceringehalt zu rechnen ist, ist das eingesetzte Probevolumen zu verringern, mit Wasser auszugleichen und entsprechend in der Berechnung zu berücksichtigen.

10. Auswertung

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

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

Hierin bedeuten:

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz (für Glycerin = 92,1)

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient (von NADH bei Hg 365 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

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

Hieraus ergibt sich für die Glycerinbestimmung unter den beschriebenen Bedingungen (d = 0,5 cm; λ = 365 nm):

$$c = \frac{3,12 \cdot 92,1}{3,4 \cdot 0,5 \cdot 2 \cdot 1000} \cdot \Delta E \text{ [g Glycerin / l Probenlösung]}$$

$$c = 0,0845 \cdot \Delta E \text{ [g/l]}$$

$$c = 8,45 \cdot \Delta E \text{ [mg/100 ml]}$$

Der Gehalt an Glycerin G_{Gl} beträgt

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

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

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

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

Hierin bedeuten:

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

m_E = Einwaage der Probe in g

c = 8,45 · Δ E in mg Glycerin

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 Glycerin in mg/kg bzw. mg/m² nach Abschnitt 10a oder 10b

Einzelwerte und Mittelwert

Gegebenenfalls Abweichungen von dieser Vorschrift

Prüfdatum

12. Wiederfindungsrate

ca. 99 %

13. Nachweisgrenze

1 mg Glycerin/kg Extrakt

14. Literatur

Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik 77178,

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

Eggstein, M., Kühlmann, E., in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,

