

UNIVERSITÄT HAMBURG

**LEBENSMITTELCHEMISCHES
PRAKTIKUM**

**Hamburg School of Food Science
Institut für Lebensmittelchemie
Grindelallee 117
20146 Hamburg**

Stand 12.06.14



Inhaltsverzeichnis

1	WASSER- UND FETTGEHALT IN LEBENSMITTELN SOWIE FETTANALYTIK	4
1.1	BESTIMMUNG DER TROCKENMASSE IN FLEISCH UND FLEISCHERZEUGNISSEN (INDIREKTE WASSERBESTIMMUNG)	4
1.2	WASSERBESTIMMUNG IN LEBENSMITTELN NACH KARL FISCHER	5
1.3	FETTEXTRAKTION	7
1.3.1	EXTRAKTION NACH SÄURE-AUFSCHLUSS (METHODE NACH WEIBULL-STOLDT)	7
1.3.2	EXTRAKTION NACH AMMONIAKALISCHEM AUFSCHLUSS (METHODE NACH RÖSE-GOTTLIEB)	9
1.4	FETTCHEMISCHE KENNZAHLEN	11
1.4.1	IODZAHL (METHODE NACH H. P. KAUFMANN)	11
1.4.2	VERSEIFUNGSZAHL (VZ) (EMULSIONSMETHODE)	13
1.4.3	HALBMIKRO-BUTTERSÄUREZAHL (HBSZ)	14
2	PROTEIN- UND KOHLENHYDRATGEHALT IN LEBENSMITTELN	16
2.1	STICKSTOFFBESTIMMUNG NACH KJELDAHL	16
2.2	HYDROXYPROLINGEHALT IN FLEISCH UND FLEISCHERZEUGNISSEN	29
2.3	NACHWEIS VON EI- UND MILCHPROTEINEN IN LEBENSMITTELN MITTELS DISKONTINUIERLICHER NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (DISK-SDS-PAGE)	22
2.4	MONO- UND OLIGOSACCHARIDE	27
2.4.1	BESTIMMUNG REDUZIERENDER ZUCKER NACH LUFF-SCHOORL	27
2.4.2	BESTIMMUNG DER SACCHAROSE NACH LUFF-SCHOORL	30
2.5	POLYSACCHARIDE	32
2.5.1	POLARIMETRISCHE BESTIMMUNG DES STÄRKEGEHALTES IN LEBENSMITTELN	32
3	MINERALSTOFFE, ZUSATZSTOFFE UND WASSERANALYSE	36
3.1	BESTIMMUNG UND UNTERSUCHUNG DER ASCHE	35
3.1.1	BESTIMMUNG DER GESAMTASCHE UND DES "SÄUREUNLÖSLICHEN"	35
3.2	BESTIMMUNG VON ANIONEN	37
3.2.1	BESTIMMUNG VON CHLORID (ARGENTOMETRISCH)	38
3.2.2	BESTIMMUNG VON PHOSPHAT (VIS-PHOTOMETRIE)	39
3.3	QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON SORBIN- UND BENZOESÄURE NACH WASSERDAMPFDESTILLATION (UV-PHOTOMETRIE)	41
3.3.1	ISOLIERUNG DURCH WASSERDAMPFDESTILLATION	41

3.3.2	UV-PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON BENZOESÄURE UND SORBINSÄURE	44
3.4	BITTERSTOFFE	48
3.4.1	CHININ IN TONIC-WÄSSERN (FLUORIMETRISCH)	48
3.5	PYKNOMETRISCHE ALKOHOLBESTIMMUNG	52
3.6	BESTIMMUNG DER KATIONEN MIT FLAMMENEMISSIONS- UND ATOM- ABSORPTIONSPEKTROMETRIE	54
3.6.1	FLAMMENEMISSIONSPEKTROMETRISCHE BESTIMMUNG VON NATRIUM UND KALIUM	55
3.6.2	ATOMABSORPTIONSPEKTROSKOPISCHE BESTIMMUNG VON EISEN, CALCIUM, MAGNESIUM, MANGAN	56
3.7	WEITERE BESTIMMUNGEN	58
4	EINFÜHRUNG IN DIE CHROMATOGRAPHIE	59
4.1	PAPIER-, DÜNNSCICHT- UND SÄULENCHROMATOGRAPHIE	59
4.1.1	IDENTIFIZIERUNG WASSERLÖSLICHER LEBENSMITTELFARBSTOFFE	63
4.1.2	IDENTIFIZIERUNG FETTLÖSLICHER LEBENSMITTELFARBSTOFFE	67
4.1.3	IDENTIFIZIERUNG VON ANTIOXIDANTIEN	69
4.1.4	IDENTIFIZIERUNG VON SÜßSTOFFEN SOWIE VANILLIN UND ETHYLVANILLIN	71
4.1.5	IDENTIFIZIERUNG VON KONSERVIERUNGSMITTELN	72
4.1.6	IDENTIFIZIERUNG VON ZUCKERN	74
4.1.7	IDENTIFIZIERUNG VON PHOSPHATEN	76
4.1.8	IDENTIFIZIERUNG VON ORGANISCHEN SÄUREN	77
4.2	SPEZIELLE PRÄPARATIONSTECHNIKEN IN DER DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE	78
4.2.1	IDENTIFIZIERUNG VON AMINOSÄUREN (ZWEIDIMENSIONALE DC)	78
4.2.2	HALBQUANTITATIVE BESTIMMUNG VON LEBENSMITTELINHALTSSTOFFEN	80
4.3	GASCHROMATOGRAPHIE DER FETTSÄUREMETHYLESTER	81
5	ALLGEMEINE HINWEISE	88
5.1	HINWEISE ZUM ZITIEREN VON LITERATUR (VORSCHLAG)	88
5.2	LINEARE REGRESSION	89
5.2.1	RECHNERISCHE ERMITTLUNG DER AUSGLEICHSGERADEN	90
5.2.2	VERFAHREN ZUR GRAPHISCHEN ERMITTLUNG DER AUSGLEICHSGERADEN	91
5.2.3	VORSCHLAG ZUR BERECHNUNG EINER ABGESCHÄTZTEN NACHWEISGRENZE	92
5.3	LEITFADEN ZUM ANFERTIGEN VON PROTOKOLLEN IM 1. SEMESTER HAUPTSTUDIUM	94
5.4	BÜCHERLISTE (LEBENSMITTELCHEMIE – HAUPTSTUDIUM)	97

1 Wasser- und Fettgehalt in Lebensmitteln sowie Fettanalytik

1.1 Bestimmung der Trockenmasse in Fleisch und Fleischerzeugnissen (Indirekte Wasserbestimmung)

Grundlagen

Die Probe wird nach Vermischen mit Seesand im Trockenschrank bei $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ getrocknet und aus der Gewichtsabnahme der Wassergehalt berechnet.

Geräte

Abdampfschale (Aluminium- oder Nickelschale)

Glasstab (ein Ende pistillartig flachgedrückt)

Chemikalien

Seesand, gereinigt und geglüht

Durchführung

Probe: Wurst (wird vom Assistenten ausgegeben)

3 - 5 g homogener Probe werden auf 1 mg genau in eine mit 30 - 35 g Seesand gefüllte, mit einem Glasstab versehene, zusammen mit dem Sand und dem Glasstab vorgetrocknete Abdampfschale eingewogen. Dann werden eingewogene Probe und Seesand in der Schale gleichmäßig verrieben und insgesamt 4 Stunden im Trockenschrank bei $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ getrocknet. Nach der Hälfte der Trocknungszeit wird die Probe erneut verrieben. Danach wird im Exsikkator abgekühlt und gewogen. Der Vorgang wird mit jeweils halbstündiger Trocknungszeit bis zum Erreichen der Massenkonstanz wiederholt (Massenänderung nicht mehr als 0,1 %). Eine Massenzunahme bleibt unberücksichtigt, da sie auf Oxidation des Fettes zurückzuführen ist.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 06.00-3

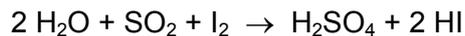
Rauscher, K.; Engst, R.; Freimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB Fachbuchverlag, Leipzig 1986, S. 75

1.2 Wasserbestimmung in Lebensmitteln nach Karl Fischer

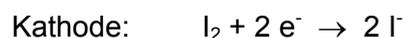
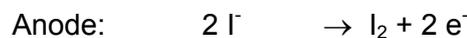
Grundlagen

Der Wasserbestimmung nach KARL FISCHER liegt die Bunsen-Reaktion zugrunde.

Durch einen Überschuss von Schwefeldioxid und die Anwesenheit einer Base wird das Gleichgewicht der Reaktion auf die rechte Seite verlagert und so für die maßanalytische Wasserbestimmung verwendbar.



Der Endpunkt wird elektrochemisch mittels eines so genannten biamperometrischen Verfahrens indiziert. Es wird ein kleiner konstanter Gleichstrom angelegt (1-2 μA). An der Platindoppelelektrode läuft folgende Reaktion ab:



Vor dem Erreichen des Endpunktes wird das zugeführte Iod an der Kathode vollständig zu Iodid reduziert. Es liegt ein irreversibles Redoxpaar vor, die Platinelektroden sind polarisiert (Polarisationsspannung ca. 200 - 500 mV). Am Titrationsendpunkt befindet sich überschüssiges Iod in der Lösung. Die Anwesenheit des reversiblen Redoxpaares Iod/Iodid führt zu einer Depolarisation der Platinelektroden, die sich in einem abrupten Spannungsabfall äußert. Als Endpunkt wird eine geringe Spannung, z.B. 25 mV gewählt. Da sich das Gleichgewicht der Karl-Fischer-Reaktion nur langsam einstellt, wird die Abschaltung am Endpunkt je nach Gerät, Matrix und Arbeitsmedium um 5 bis 20 Sekunden verzögert.

Geräte

Magnetrührstäbchen

Platindoppelelektrode (vom Assistenten)

Karl-Fischer-Titriergefäß (vom Assistenten)

Kolbenhubpipette, Nennvolumen 20 μL

Chemikalien

Karl-Fischer-Lösung, Einkomponentenreagenz, gebrauchsfertig (vom Assistenten)

Methanol, wasserfrei (vom Assistenten)

Durchführung

Probe: Mehl (vom Assistenten ausgegeben)

Es werden 0,7 bis 0,9 g Mehl genau in einen trockenen 50-mL-Messkolben eingewogen, der Messkolben wird mit dem getrockneten Methanol bis zur Marke aufgefüllt, verschlossen und durch kräftiges Schütteln gut durchmischt. (\rightarrow Probelösung)

**Vortitration**

Zur Beseitigung des Wassers im Titriergefäß, am Magnetrührstäbchen und der Elektrode werden 20 mL Methanol in das Titriergefäß einpipettiert und bis zum Endpunkt titriert. Der Verbrauch an Karl-Fischer-Lösung für diese erste Titration bleibt unberücksichtigt.

Bestimmung des Blindwertes (Wassergehalt des Lösungsmittels)

20 mL Lösungsmittel (Methanol) werden in das austitrierte Titriergefäß eingefüllt und bis zum Endpunkt titriert.

Bestimmung des Titers

Mit einer 20- μ L-Kolbenhubpipette werden 20 μ L (= 20 mg) Wasser in das austitrierte Medium einpipettiert. Die Lösung wird bis zum Endpunkt titriert.

Titration der Probelösung

20 mL der Probelösung werden in das austitrierte Medium einpipettiert. Die Lösung wird bis zum Endpunkt titriert.

Anmerkungen

- ✓ Vor Inbetriebnahme und Messung findet eine Einweisung am Gerät statt.
- ✓ Eine Bedienungsanleitung für das automatische Titriergerät befindet sich am Gerät.
- ✓ Alle benutzten Glasgeräte müssen unbedingt trocken sein.
- ✓ Zur Überprüfung der Kolbenhubpipette sollte mehrmals Wasser von Raumtemperatur in ein kleines Becherglas pipettiert und auf der Analysenwaage ausgewogen werden.
- ✓ Die Abfälle der Karl-Fischer-Titration sind gesondert zu entsorgen.

Literatur

Scholz, E.: Karl-Fischer-Titration, Springer Verlag, Berlin, 1984.

Riedel-de Haën: Hydranal[®]-Praktikum, Wasserreagenzien nach Eugen Scholz für die Karl-Fischer-Reaktion, Seelze, 1987.

Isengard, H.-D., Nowotny, M.: Extraktion als Vorbereitung für die Karl-Fischer-Titration; Dtsch. Lebensm. Rundschau, **88**, 246-251, 1992.

Maier, H. G.: Lebensmittel- und Umweltanalytik, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1990.

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1992.

Jander, G., Jahr, K. F.: Maßanalyse, 15. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 1989.

1.3 Fettextraktion

1.3.1 Extraktion nach Säure-Aufschluss (Methode nach Weibull-Stoldt)

Grundlagen

Durch den Säureaufschluss mit anschließender Soxhlet-Extraktion wird auch der Anteil des Fettes im Lebensmittel erfasst, welcher chemisch oder adsorptiv an Proteine oder Kohlenhydrate gebunden vorliegt.

Geräte und Hilfsmittel

Extraktionsapparatur nach Soxhlet mit 250-mL-Schliffkolben

Extraktionshülsen, entfettet

Faltenfilter, doppelt, mittlerer Porendurchmesser höchstens 5 μm

Watte, entfettet

Chemikalien

Extraktionsmittel: n-Hexan oder Petrolether (40-60 °C)

Salzsäure, reinst, etwa 25%ig

Durchführung

Probe: Wurst (wird vom Assistenten ausgegeben)

Der Kolben des Extraktionsapparates wird mit einigen Siedesteinchen beschickt und 1 h im Trockenschrank bei 103 ± 2 °C getrocknet, im Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt und auf 1 mg genau gewogen. Je nach dem zu erwartenden Fettgehalt (die Auswaage soll unter 3 g ergeben) werden bis zu 10 g der gut durchgerührten Probe in ein trockenes 600-mL-Becherglas auf 1 mg genau eingewogen, mit 100 mL Wasser und mit 150 mL Salzsäure (etwa 25%ig) versetzt. Nach Zugabe einiger Siedesteinchen und eines Glasstabes wird das Becherglas mit einer Uhrglasschale bedeckt, der Inhalt zum Sieden gebracht und unter mehrmaligem Umrühren 30 - 60 min auf kleiner Flamme bei schwachem Sieden gehalten; danach werden ca. 100 mL heißes Wasser zugegeben.

Ein Faltenfilter wird im Trichter gründlich mit heißem Wasser durchfeuchtet und anschließend die noch heiße Aufschlussflüssigkeit schnell filtriert. Becherglas, Uhrglasschale und Glasstab werden sorgfältig mit heißem Wasser nachgewaschen und im Trockenschrank getrocknet. Filtrationsrückstand und Filter werden mit heißem Wasser bis zur Säure- bzw. Chloridfreiheit ausgewaschen (Prüfung des Waschwassers mit pH-Indikatorpapier bzw. Silbernitratlösung) und 1 - 2 h in dem zum Aufschluss benutzten Becherglas bei 103 ± 2 °C im vorgeheizten Trockenschrank getrocknet. Auf gründliche Trocknung ist zu achten, da Feuchtigkeit das Ergebnis beeinträchtigen kann.

Die trockenen Filter mit dem Rückstand werden in eine Extraktionshülse gegeben. Fettsuren im Becherglas werden mit in Extraktionsmittel getränkter Zellstoffwatte aufgenommen und ebenfalls in die Hülse gefügt und diese in den Extraktionsapparat eingesetzt. Der Kolben des Extraktionsapparates wird mit dem Extraktionsmittel gefüllt, die Innenwand des zum Aufschluss verwendeten Becherglases sowie die Uhrglasschale werden mit Extraktionsmittel abgespült und dieses mit in den Extraktionskolben gegeben. Das Gesamtvolumen des Extraktionsmittels soll etwa das 1,5 - 2fache des Nennvolumens des Extraktionsaufsatzes betragen. Nach Zusammenetzen der Apparatur wird der Kolbeninhalt 2 - 4 h auf dem Sand- oder Wasserbad am Sieden gehalten (darauf achten, dass das Extraktionsmittel immer auf einmal vollständig „abhebt“ und in die Vorlage herunterfällt).

Nach der Extraktion wird das Extraktionsmittel abdestilliert. Der Kolben wird in waagerechter Stellung 1 h im Trockenschrank bei 103 ± 2 °C getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator auf Raumtemperatur auf 1 mg genau gewogen. Der Vorgang wird mit jeweils halbstündiger Trocknungszeit bis zum Erreichen der Massenkonstanz (Massenänderung nicht mehr als 0,1 %) wiederholt. Eine Massenzunahme bleibt unberücksichtigt; der Berechnung wird in jedem Falle der niedrigste erhaltene Auswaagewert zugrunde gelegt. Extraktion, Trocknung und Wägung müssen unmittelbar aufeinander folgen.

Das Ergebnis wird auf eine Stelle nach dem Komma gerundet angegeben.

Anmerkungen

Das Lösungsmittel wird gesammelt und kann zur Extraktion wieder verwendet werden.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 08.00-6

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1992.

Pardun, H.: Analyse der Nahrungsfette, Verlag Paul Parey, Berlin 1976

Rauscher, K.; Engst, R.; Freimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB Fachbuchverlag, Leipzig 1986

Schormüller, J. (Hrsg.): Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. III/2, Springer-Verlag, Berlin 1968

1.3.2 Extraktion nach ammoniakalischem Aufschluss (Methode nach RÖSE-GOTTLIEB)

Grundlagen

Die Eiweißstoffe werden durch Behandeln mit Ammoniak aufgeschlossen. Das Fett wird mit Hilfe organischer Lösungsmittel extrahiert, von diesen durch Abdampfen oder Destillation befreit und nach dem Trocknen gewogen.

Geräte

Extraktionsrohr nach Mojonnier (s. Abb.)

Korkstopfen

Chemikalien

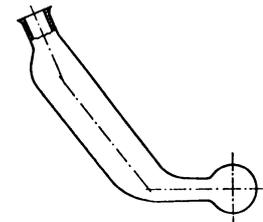
Ammoniaklösung, 25%ig

Ethanol, mindestens 94%ig

Diethylether, Siedepunkt 34 - 35 °C, peroxidfrei

Petrolether, Siedebereich 40 - 60 °C

Phenolphthaleinlösung



Extraktionsrohr nach
MOJONNIER

Durchführung

Probe: Kondensmilch (vom Assistenten ausgegeben)

Ein mit einigen Siedesteinchen versehener Rundkolben wird im Trockenschrank 1 h lang getrocknet. Nach 1 h Abkühlen an der Luft im Wägeraum wird er auf ± 1 mg gewogen. Von der zu untersuchenden Probe werden etwa 10 g auf ± 1 mg in das Extraktionsgefäß eingewogen.

Es werden 2 mL Ammoniaklösung zugegeben, innerhalb von 30 sec gemischt, dann 10 mL Ethanol zugegeben und erneut durchgemischt. Zum besseren Erkennen der Phasentrennung können 2 Tropfen Phenolphthaleinlösung zugegeben werden. Zum Durchmischen wird das Extraktionsrohr mit einem angefeuchteten Korkstopfen verschlossen (Die Korkstopfen werden in Wasser aufgekocht und stets unter Wasser aufbewahrt). Es werden 25 mL Diethylether und nach kurzem Schütteln 25 mL Petrolether zugegeben. Das Extraktionsgefäß wird wieder verschlossen und 30 s lang unter gelegentlichem Umstürzen geschüttelt. Es wird stehengelassen, bis die Diethylether/Petroletherphase klar geworden ist und sich vollständig von der wässrigen Phase getrennt hat. Nach Entfernen des Stopfens wird soviel wie möglich von der organischen Phase in den Rundkolben dekantiert. Es wird noch zweimal extrahiert, indem der beschriebene Arbeitsgang mit je 15 mL Diethylether und Petrolether wiederholt wird.

Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rundkolben wird liegend etwa 1 h im Trockenschrank bei $102 \pm 2,5$ °C getrocknet. Zum Abkühlen an der Luft wird der Kolben 1 h lang stehengelassen und anschließend auf ± 1 mg gewogen. Das Trocknen wird jeweils 60 min lang fortgesetzt, bis die Gewichtsabnahme weniger als 1 mg beträgt.



Zur Kontrolle der verwendeten Chemikalien ist nach der gegebenen Arbeitsvorschrift ein Blindversuch durchzuführen, wobei anstelle des Milchproduktes 10 mL Wasser zugegeben werden. Ein hierbei ermittelter Blindwert ist festzuhalten und bei der Analysenberechnung zu berücksichtigen. Er darf 1 mg nicht überschreiten.

Die Differenz der Ergebnisse der beiden Bestimmungen darf bei Vollmilch, teilentrahmter Milch, Magermilch, Buttermilch, Molke 0,03 g Fett in 100 g der Probe und bei Sahne und Schlagsahne 0,2 g Fett in 100 g der Probe nicht überschreiten (= Wiederholbarkeit $r / r = 0,20$ g für Sahne, Schlagsahne). Als Ergebnis ist das arithmetische Mittel der beiden Bestimmungen auf 2 Stellen hinter dem Komma anzugeben.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 01.00-9

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1992.

Rauscher, K.; Engst, R.; Ereimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB Fachbuchverlag, Leipzig 1986

Schormüller, J. (Hrsg.): Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. III/1, Springer-Verlag, Berlin 1968

1.4 Fettchemische Kennzahlen

Die Iod- und Verseifungszahl werden mit einem vom Assistenten ausgegebenen Öl/Fett durchgeführt, welches auch der gaschromatographischen Bestimmung der Fettsäuremethylester (FSME) (s. 8.3) dient. Zur Bestimmung der Halbmikrobuttersäurezahl wird ebenfalls eine Probe vom Assistenten ausgegeben.

1.4.1 Iodzahl (Methode nach H. P. KAUFMANN)

Grundlagen

Die Iodzahl (IZ) gibt die Teile Halogen (berechnet als elementares Iod) an, die 100 Teile Fett unter bestimmten Bedingungen zu binden vermögen. Sie beruht auf der Anlagerung von Halogen an die Doppelbindungen der Fettsäuren bzw. Fettsäurereste und bildet somit ein Maß für den Gehalt eines Fettes an ungesättigten Verbindungen. Zur Bestimmung der Iodzahl können verschiedene Vorschriften (Methode nach KAUFMANN, WIJS oder HANUSZ) angewandt werden. Je nach Methode variiert die erhaltene Iodzahl in gewissen Grenzen, weshalb das angewandte Verfahren stets anzugeben ist.

Chemikalien

Dichlormethan, p.a.

Natriumthiosulfat-Maßlösung, $c = 0,1 \text{ mol/l}$

Methanolische Bromlösung (ca. $0,1 \text{ mol/L}$): 5,2 mL Brom in 1000 mL wasserfreiem, mit Natriumbromid (vorgetrocknet bei $130 \text{ }^\circ\text{C}$) gesättigtem Methanol lösen; ABZUG!!!! (dunkel einen Monat haltbar)

TIPP: frisch ansetzen und 3 – 4 Tage vor der ersten Benutzung dunkel lagern

Kaliumiodidlösung (10% w/w)

Stärkelösung (1% w/w)

Durchführung

Erwartete Iodzahl	Einwaage in g
0 - 20	0,5 - 1,0
20 - 60	0,3 - 0,5
60 - 120	0,2
> 120	0,10 - 0,12

Die Halogenlösung muss in einem derartigen Überschuss vorhanden sein, dass die übrig bleibende Halogenmenge etwa der aufgenommenen entspricht. Deshalb richtet sich die Größe der Einwaage nach der zu erwartenden Iodzahl und ist oben genannter Aufstellung zu entnehmen.

Das Fett wird in einen Iodzahlkolben eingewogen und in 10 mL Dichlormethan gelöst. Dann lässt man genau 25 mL der Bromlösung zufließen, wobei ein Teil des Natriumbromids ausfällt. Hierauf lässt man 30 min, bei Fetten mit hoher Iodzahl 2 h, im Dunkeln stehen. Nach Hinzufügen von 15 mL Kaliumiodidlösung (10 %) titriert man mit 0,1 molarer Natriumthiosulfatlösung (Stärkelösung als Indikator). Gleichzeitig wird in gleicher Weise ein Blindversuch angesetzt.

Anmerkungen

Bei sehr niedrigen Iodzahlen (< 5) ist es oft ratsam, eine höhere Einwaage als angegeben zu wählen. Dabei kann es erforderlich werden, dass auch die Menge des Lösungsmittels erhöht werden muss, was bei dem Blindversuch entsprechend zu berücksichtigen ist.

Fettkennzahlen unterliegen starken regionalen und klimatischen Schwankungen, eine ermittelte Fettkennzahl ist stark von der angewandten Variante oder genauen Durchführung abhängig; dies muss bei der Beurteilung des Fettes berücksichtigt werden. Im Protokoll kann somit nur eine Auswahl möglicher Fette angegeben werden, weitere Fettkennzahlen (Hydroxylzahl, Säurezahl, Peroxidzahl, evtl. Gesamtzahl und Restzahl) sowie die Zusammensetzung und Menge des Unverseifbaren können zusätzliche Informationen über die Identität geben.

Literatur

Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (Hrsg.): DGF-Einheitmethoden C - V 11 b (53),
Wissenschaftl. Verlagsges., Stuttgart

Pardun, H.: Analyse der Nahrungsfette, Verlag Paul Parey, Berlin 1976

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag,
Berlin, 1992

Rauscher, K.; Engst, R.; Ereimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB
Fachbuchverlag, Leipzig 1986

1.4.2 Verseifungszahl (VZ) (Emulsionsmethode)

Grundlagen

Die Verseifungszahl (VZ) bezeichnet die Menge an KOH in mg, die notwendig ist, um die in 1 g Fett enthaltenen freien Fettsäuren zu neutralisieren und die Ester zu verseifen. Sie dient zur Charakterisierung und Reinheitsprüfung.

Chemikalien

Ethanolische Kaliumhydroxidlösung: 35 g Kaliumhydroxid in 20 mL Wasser lösen + Ethanol ad 1 L Ethanol folgendermaßen reinigen: 10 g Kaliumhydroxid + max. 5 mL H₂O ad liq. + 1 L Ethanol + 5 g Zinkstaub, 2 h Rückfluss, destillieren. Einen Tag verschlossen stehen lassen, dann schnell in eine braune Flasche mit Gummistopfen dekantieren.

Salzsäure, c = 0,5 mol/L

Durchführung

Etwa 2 g Fett werden auf 5 mg genau eingewogen und mit 25 mL 0,5 M ethanolischer Kaliumhydroxidlösung 60 min lang unter Rückflusskühlung gekocht. Die noch heiße Lösung versetzt man mit einigen Tropfen Phenolphthalein-Lösung und titriert mit wässriger 0,5 M Salzsäure den Laugenüberschuss zurück. Unter gleichen Bedingungen wird ein Blindversuch durchgeführt.

Anmerkung

Wenn der Umschlagspunkt von Phenolphthalein schlecht zu erkennen ist (z. B. bei dunklen Fetten), kann als Indikator Thymolphthalein oder Alkaliblau-6-B eingesetzt werden.

Die Iodzahl und die Verseifungszahl müssen vor der gaschromatographischen Bestimmung der Fettsäuremethylester (8.3) bestimmt werden.

Literatur

Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (Hrsg.): DGF-Einheitsmethoden C - V 3 (77),
Wissenschaftl. Verlagsges., Stuttgart

Pardun, H.: Analyse der Nahrungsfette, Verlag Paul Parey, Berlin 1976

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag,
Berlin, 1992.

Schormüller, J. (Hrsg.): Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. IV, Springer-Verlag, Berlin 1969

1.4.3 Halbmikro-Buttersäurezahl (HBsZ)

Grundlagen

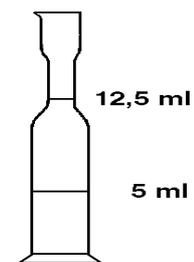
Die Halbmikro-Buttersäurezahl (HBsZ) gibt an, wie viel mL 0,01 M Alkalilauge zur Neutralisation der aus 0,5 g Fett erhaltenen, in mit Kaliumsulfat gesättigter schwefelsaurer Lösung löslichen, flüchtigen Fettsäuren erforderlich sind. Die Halbmikro-Buttersäurezahl erfasst nicht nur die Buttersäure, sondern auch einen kleinen Anteil der nächsthöheren Homologen. Buttersäure ist in Lebensmittelfetten ausschließlich in Milchfett enthalten, die HBsZ ist somit indirekt ein Maß für den Anteil an Milchfett in der Probe und damit ein Qualitätskriterium für Milchfetterzeugnisse.

Nach Verseifen des Fettes werden die durch Ansäuern der Seife freigesetzten wasserlöslichen, flüchtigen Fettsäuren abdestilliert und im Destillat mit Natronlauge titriert. Da die Fettsäuren sich in ihrer Löslichkeit und Flüchtigkeit gegenseitig beeinflussen, wird zur besseren Erhaltung konstanter Bedingungen gesättigte Kaliumsulfatlösung (zum Aussalzen der höheren Fettsäuren) und Kokosseifenlösung (zur Sättigung des Gemisches mit mittelkettigen Fettsäuren) hinzugefügt.

Geräte

Destillationsapparatur

Röhrchen nach BECKEL: 11,0 mL und 12,5 mL



12,5 mL-Röhrchen nach BECKEL

Chemikalien

Kieselgur

Glycerin

Phenolphthalein

Alkoholische Kaliumhydroxidlösung: 40 mL Kaliumhydroxidlösung (48 Gew.-%) und 40 mL Wasser mit 96%igem Ethanol auf 1000 mL auffüllen. Der Gehalt an Lauge muss unbedingt jedes Mal kontrolliert werden (Titration gegen Phenolphthalein; 5 mL Lauge soll 25 - 27 mL 0,1 M Salzsäure verbrauchen).

Gesättigte Kaliumsulfatlösung (bei 20 °C etwa 10 g K_2SO_4 in 100 g wässriger Lösung)

Kokosseifenlösung: 100 g Kokosfett mit 100 mL Glycerin und 40 mL Kaliumhydroxidlösung (75%ig) in einem 1-L-Kolben bis zur klaren Lösung erhitzen; nach kurzem Stehen mit Wasser auf 1 L auffüllen.

Natriumhydroxid-Maßlösung, $c = 0,01 \text{ mol/L}$

Durchführung

Probe: Butter (vom Assistenten ausgegeben)

Verseifung:

In einen 50-mL-Stehkolben (NS 29) werden 500 - 520 mg frisch geschmolzenes Fett genau eingewogen, 5,0 mL alkoholische Kaliumhydroxidlösung sowie Siedesteinchen hinzugefügt, und



unter Rückfluss 15 min lang zum leichten Sieden (Wasserbad) erhitzt. Das Fett muss gelöst und verseift sein. Dann wird 1,0 mL Glycerin hinzugefügt und weitergekocht, bis der Alkohol größtenteils verdampft ist (stärkeres Schäumen). Anschließend werden im Trockenschrank bei 100 °C letzte Alkoholreste aus dem liegenden Kolben verdampft.

Freisetzen der Fettsäuren:

Zur heißen Seife werden sofort 15,0 mL Kaliumsulfatlösung unter kräftigem Umschütteln zugefügt. Der Kolben wird verschlossen und umgeschwenkt bis die Seife gleichmäßig verteilt ist; bei zähen Seifen evtl. nochmals kurz im Trockenschrank erwärmen.

Nachdem der Kolben im Wasserbad bei 20 °C temperiert wurde, werden nacheinander unter Umschütteln 0,5 mL 25%ige Schwefelsäure, 1,0 mL Kokosseifenlösung und ca. 0,1 g Kieselgur hinzu gegeben. Daraufhin wird erneut 5 min in einem 20 °C-Wasserbad temperiert, der Kolbeninhalt ($V_1 = 17,5$ mL) kräftig geschüttelt und durch ein Faltenfilter ($\varnothing = 9$ cm) in ein Beckel-Röhrchen filtriert, bis das Filtrat 12,5 mL (= V_2) beträgt [der Filtrerrückstand darf etwas ausgepresst werden (vorsichtig mit Reagenzglas o.ä.)].

Destillation:

Das Filtrat wird in einen 100-mL-Stehkolben überführt und das Beckel-Röhrchen wird mit 5,0 mL frisch ausgekochtem Wasser nachgespült. Nach Zugabe einiger Siedesteine werden 11,0 mL in die Vorlage abdestilliert.

Titration:

Das Destillat wird quantitativ in einen Erlenmeyerkolben überführt, mit 1 - 2 Tropfen 1%iger Phenolphthaleinlösung versetzt und mit 0,01 M Natriumhydroxid-Maßlösung bis zur bleibenden Rosafärbung titriert.

Ein Blindversuch mit 500 mg Kakaofett wird ebenso wie der Hauptversuch behandelt.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 18.00-1

Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (Hrsg.): DGF-Einheitmethoden C - V 9a (51),
Wissenschaftl. Verlagsges., Stuttgart

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag,
Berlin, 1992.

Pardun, H.: Analyse der Nahrungsfette, Verlag Paul Parey, Berlin 1976

Rauscher, K.; Engst, R.; Ereimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB
Fachbuchverlag, Leipzig 1986

Schormüller, J. (Hrsg.): Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. IV, Springer-Verlag, Berlin 1968

2 Protein- und Kohlenhydratgehalt in Lebensmitteln

2.1 Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL

Grundlagen

Die Probe wird mit konzentrierter Schwefelsäure in Gegenwart von Katalysatoren (hier: Selenreaktionsgemisch) oxidativ aufgeschlossen, wobei Proteine und Aminosäuren zu Ammoniumsulfat umgesetzt werden. In alkalischem Medium wird aus dem Ammoniumsulfat Ammoniak freigesetzt. Dieses wird mittels Wasserdampfdestillation in eine borsäurehaltige Vorlage übergetrieben und durch acidimetrische Titration bestimmt. Aus dem Verbrauch lässt sich unter Berücksichtigung des Stickstoff-Äquivalentes und des proteinspezifischen Umrechnungsfaktors der Proteingehalt der Probe berechnen.

Geräte

Kjeldahlkolben

Aufschlussblock (Heizblock mit Spirale)

Destillationsapparatur nach PARNAS und WAGNER (s. Abb. nächste Seite)

Chemikalien

Selenreaktionsgemisch

Schwefelsäure, konzentriert

Natronlauge, 33% (g/v)

Borsäure, 4% (g/v)

Salzsäure-Lösung, 0,1M

Tashiro-Indikator: 10 mL 0,03%ige Lösung von Methylrot in 70%igem Ethanol und 1,5 mL 0,1%ige Lösung von Methylenblau in 70%igem Ethanol (nur etwa 1 Woche haltbar)

Durchführung

Probe: Wurst (wird vom Assistenten ausgegeben)

Vor der Durchführung ist die Absauganlage auf Funktionsfähigkeit zu überprüfen.

Aufschluss (im Abzug durchzuführen, Absauganlage ist aufgebaut)

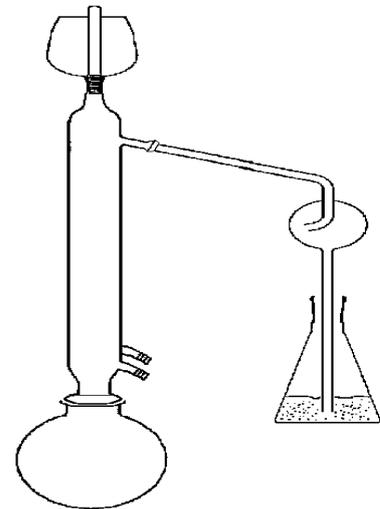
1 g homogenisierte Wurstprobe werden eingewogen und in den Kjeldahlkolben überführt. Nach Zugabe von ca. 2 g Selenreaktionsgemisch, 20 mL konz. Schwefelsäure und einigen Glasperlen wird die Glasbirne auf den schräg gestellten Kolben aufgesetzt. Der Kolben wird auf dem Heizblock erst langsam, bis das Schäumen nachlässt, dann stark erhitzt.

Der Aufschluss ist vollständig, wenn die Lösung klar und farblos oder hellgrün ist (mehrere Stunden bis Tage). Es wird weitere 30 min erhitzt und der Aufschluss dann zum Abkühlen stengelassen. Zum Aufschluss werden vorsichtig (!!) etwa 50 mL dest. Wasser zugegeben und

die Lösung dann unter Nachspülen mit Wasser quantitativ in einen 100 mL Messkolben überführt, der mit Wasser aufgefüllt wird.

Destillation

In die Destillationsapparatur nach PARNAS und WAGNER werden 25 mL der verdünnten Aufschlusslösung, 1 - 2 Tropfen Tashiro-Indikator sowie 100 mL Wasser gegeben und die Wasserkühlung eingeschaltet. Von oben werden 50 mL 33%ige Natronlauge zugeben. Dabei muss eine Unterschichtung vermieden werden, da es sonst zu heftigen Siedeverzügen kommen kann (evtl. etwas schütteln). Der Auslauf der Destillationsbrücke muss in die Vorlage eintauchen, welche ca. 50 mL 4%ige Borsäure und 2 Tropfen Tashiro-Indikator enthalten soll. Es werden 30 - 50 mL überdestilliert; die Destillationsdauer soll maximal 30 min betragen. Dann wird die Vorlage gesenkt, der Auslauf abgespült und noch 1 min destilliert.



Destillationsapparatur nach PARNAS und WAGNER

Titration

Die Vorlagenlösung wird mit 0,1M HCl bis zum Farbumschlag des Tashiro-Indikators nach grau titriert.

Abhängig vom Aminosäuremuster ergeben sich für verschiedene „Proteinarten“ unterschiedliche Anteile des Stickstoffs am Protein. Da aber der Stickstoffgehalt innerhalb einer „Proteinart“ nur in engen Grenzen schwankt, kann der Proteingehalt nach Aufschluss der Probe und Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes unter Zuhilfenahme eines proteinspezifischen Umrechnungsfaktors berechnet werden.

Tabelle der Umrechnungsfaktoren (U):

Protein	U
Uneinheitliche Proteingemische	6,25
Fleisch, Eier, Fisch, Mais, Leguminosen, Getreide, Gemüse, Obst	6,25
Milch- und Milchprodukte	6,38
Reis	5,95
Ölsaaten, Nüsse	5,40
Gelatine	5,55

Anmerkungen

Der Aufschluss nach KJELDAHL erfasst organisch gebundenen Stickstoff, d. h., er ist nicht spezifisch für Proteine und Aminosäuren. Es werden auch andere stickstoffhaltige Verbindungen (Nichtproteinverbindungen) aufgeschlossen, wobei deren Umsetzung aber nicht immer quantitativ verläuft und/oder nicht immer zum Ammoniumsalz führt. Der Anteil derartiger Substanzen in Lebensmitteln sollte aber vernachlässigbar gering sein, sodass diese Bestimmungsmethode ein hinreichend genaues Ergebnis für den Gesamtproteingehalt liefert.

Literatur

Rauscher, K., Engst, R., Freimuth, U.: Untersuchung von Lebensmitteln, 2.Auflage, VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1986

Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 06.00-7

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1992.

Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. **34**, 70-72, 1980

2.2 Hydroxyprolingehalt in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Grundlagen

Die Probe wird durch saure Hydrolyse aufgeschlossen. Das dadurch aus dem Bindegewebs-eiweiß freigesetzte Hydroxyprolin wird nach Abtrennung des Fettes unter Verwendung von Chloramin T oxidiert. Das Oxidationsprodukt bildet mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd eine rot gefärbte Verbindung. Die Absorption der diese Verbindung enthaltenden Messlösung wird bei 558 nm photometrisch vermessen. Sie ist der Hydroxyprolinkonzentration proportional.

Geräte

Wasserbad

Glasküvetten, Schichtdicke 1cm

Spektralphotometer

Schliffstopfenreagenzgläser, graduiert

Thermometer

Chemikalien

Salzsäure-Lösung, 6 M

Petrolether 60/80

Pufferlösung (pH 6,8): 26,0 g Citronensäure-Monohydrat, 14,0 g Natriumhydroxid-Plätzchen und 78,0 g Natriumacetat (wasserfrei) in 750 mL Wasser und 250 mL 1-Propanol (bei 4 °C etwa 2 Monate haltbar)

L-Hydroxyprolin-Stammlösung I: $c = 60 \text{ mg}/100 \text{ mL}$ in Wasser

L-Hydroxyprolin-Stammlösung II: aus Stammlösung I; $c = 3 \text{ mg}/500 \text{ mL}$ in Wasser

L-Hydroxyprolin-Standardlösungen: aus Stammlösung II; $c = 0; 30; 60; 90; 120 \text{ } \mu\text{g}/100\text{mL}$ in Wasser (bei 4 °C etwa 2 Monate haltbar)

Oxidationsreagenz: 0,7 g Chloramin T Trihydrat in 50 mL Pufferlösung (bei 4 °C und im Dunkeln etwa 1 Woche haltbar)

Farbreagenz: 4,0 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 14 mL 60%iger Perchlorsäure, langsam 26 mL 2-Propanol geben (Herstellung erst am Tag der Verwendung und nur soviel, wie benötigt wird)

Durchführung

Probe: Wurst (wird vom Assistenten ausgegeben)

Es wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Außerdem ist eine Kalibriergerade zu erstellen.

Hydrolyse

4 g der homogenisierten Probe werden in einen 100-mL-Rundkolben eingewogen. Nach Zugabe von 30 mL 6 M Salzsäure und einigen Siedesteinen wird der Ansatz auf dem Sandbad bis zum schwachen Sieden erhitzt und 8 h unter Rückfluss gekocht.

Entfettung

Das Hydrolysat wird quantitativ mit Wasser in einen 250-mL-Messkolben überführt und 5 mL Petrolether dazu gegeben. Der Kolben wird mit Wasser aufgefüllt, wobei die Petrolether-Schicht oberhalb der Marke liegen soll. Nach gründlicher Durchmischung und Absetzenlassen wird die Petrolether-Schicht durch Absaugen mit einer Pasteurpipette entfernt und verworfen. 5,0 mL des verdünnten Hydrolysates werden in einen 250-mL-Messkolben überführt und mit Wasser aufgefüllt.

Bei fettfreien Proben kann auf die Petrolether-Behandlung verzichtet werden.

Derivatisierung/Farbreaktion

4,0 mL der Verdünnung werden in ein Schliffstopfenreagenzglas pipettiert und 2 mL Oxidationsreagenz zugegeben. Nach gründlicher Durchmischung wird der Ansatz 20 ± 1 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann werden 2 mL Farbreagenz zugegeben und nach Mischung genau 15 min bei $60 \pm 0,5$ °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird das Schliffstopfenreagenzglas unter fließendem Leitungswasser mind. 3 min abgekühlt. Nach 30 min Standzeit bei Raumtemperatur erfolgt die photometrische Messung der Absorption der Lösung bei 558 nm in der Glasküvette. Die angegebenen Bedingungen sind genau einzuhalten. Ebenso müssen Derivatisierung, Farbreaktion und Messung ohne Unterbrechung in einem Arbeitsgang erfolgen.

Kalibriergerade

Durchführung wie oben beschrieben, anstelle des verdünnten Hydrolysates sind jeweils 4 mL der Hydroxyprolin-Standardlösungen einzusetzen.

Berechnung des Bindegewebsgehaltes

Vorbemerkung

Bindegewebsproteine (Elastin und Kollagen) weisen ein anderes Aminosäuremuster als die anderen Fleischproteine auf. Kennzeichnend für das Kollagen sind die hohen Gehalte an Glycin, Prolin, Hydroxyprolin sowie 5-Hydroxylysin. Hydroxyprolin kommt fast ausschließlich in Bindegewebe vor. In kollagenem Bindegewebe beträgt der mittlere Hydroxyprolinanteil 12,4 %. Der Hydroxyprolingehalt einer Probe kann daher als Maßstab für den Gehalt an Bindegewebe dienen und damit als Berechnungsgrundlage für den BEFFE-Wert (bindegeweesweißfreis Flescheweiß), welcher ein wichtiges Kriterium für die Qualität von Fleisch und Fleischerzeugnissen nach den entsprechenden Leitsätzen darstellt.

Der kollagene Bindegewebsanteil der Probe BG_{abs} errechnet sich nach:

$$BG_{abs} = 8 \cdot HyP$$

BG_{abs} = kollagener Bindegewebsanteil bezogen auf die Probe [%]

HyP = Hydroxyprolingehalt der Probe in %

Von größerer Bedeutung in Bezug auf eine Qualitätsbewertung sind der auf das Gesamtprotein bezogene Bindegewebsanteil BG_{rel} sowie der BEFFE-Wert. Sie berechnen sich nach:

$$BG_{rel} = \frac{BG_{abs}}{P} \cdot 100 \quad \text{bzw.} \quad BEFFE [\%] = P - BG_{abs}$$

BG_{rel} = kollagener Bindegewebsanteil in %, bezogen auf das Gesamtprotein

BG_{abs} = kollagener Bindegewebsanteil in %, bezogen auf die Probe

P = Gesamtproteingehalt der Probe in %, ermittelt nach 2.1

Anmerkung

Die aufgeführte BEFFE-Berechnung ist nur eine vereinfachte Näherung, da korrekterweise auch noch andere stickstoffhaltige Verbindungen wie Fremdproteine (Nichtfleischproteine, z.B. Sojaprotein) und stickstoffhaltige Nichteisweiß-Verbindungen (z.B. Harnstoff) zu berücksichtigen wären.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 06.00-8

Rauscher, K., Engst, R., Freimuth, U. (REF.): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1986

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1992.

Leitsätze für Fleisch- und Fleischerzeugnisse i. d. F. vom 31.1.1994, Beck'sche Textsammlung

2.3 Nachweis von Ei- und Milchproteinen in Lebensmitteln mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (Disk-SDS-PAGE)

Grundlagen

a) Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung des Proteingehaltes der Extrakte erfolgt nach einer photometrischen Methode. Als Farbreagenz wird Coomassie Brilliant Blue G 250 verwendet. Das Prinzip beruht auf der Anlagerung der negativ geladenen Farbstoffmoleküle an die Aminogruppe der Proteine. Der Protein-Farbstoffkomplex, der die Farbänderung von rot zu blau bewirkt, wird bei 590 nm photometrisch vermessen. Die quantitative Bestimmung erfolgt über eine Rinderserumalbumin-(BSA)-Kalibriergerade.

b) DISK-SDS-PAGE

Die Elektrophorese beruht auf der Wanderung elektrisch geladener Teilchen in einem elektrischen Gleichstromfeld. Die geladenen Teilchen wandern jeweils zu der Elektrode mit entgegengesetzter Ladung. Die so genannte SDS-Elektrophorese stellt eine spezielle Variante dar. Die Trennung erfolgt ausschließlich nach Molekülgröße. Die Eigenladung von Proteinen wird durch die Beladung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) so effektiv unterdrückt, dass für alle Proteine ein einheitliches Ladungs-Masse-Verhältnis resultiert. Durch reduzierende Thiolverbindungen (2-Mercaptoethanol) werden die Disulfidbrücken der Proteine gespalten, was zu einer Auffaltung der Proteine und somit zu einer einheitlichen Micellenform führt. Die elektrophoretische Trennung wird unter Verwendung eines so genannten restriktiven Gels durchgeführt. Aufgrund der engen Poren des Gels werden die kleineren Micellen weniger bei der Wanderung durch das Gel behindert als die größeren. Die Geschwindigkeit der Wanderung ist somit dem Molekulargewicht proportional. Das verwendete Gel ist ein Polyacrylamidgel, welches durch Copolymerisation von Acrylamid-Monomeren mit dem Vernetzer N,N'-Methylbisacrylamid hergestellt wird. Die für die Trennleistung des Gels maßgebende Porengröße kann sowohl über die Totalacrylamidkonzentration als auch über den Vernetzungsgrad exakt und reproduzierbar eingestellt werden. Bei dem hier verwendeten Trennsystem handelt es sich um ein diskontinuierliches System aus einem weitporigen Sammelgel (pH 6.8) und einem engporigen Trenngel (pH 8.8). Hierdurch wird zum einen das Aggregieren und Präzipitieren von Proteinen beim Eintritt in die Gelmatrix verhindert und zum anderen eine hohe Bandenschärfe erzielt. Die Proteinbanden können im Gel unspezifisch entweder durch eine kolloidale Coomassie-Färbung durch die Anlagerung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 als blaue Banden, oder mittels Silberfärbung als dunkle Banden sichtbar gemacht werden. Bei der Silberfärbung binden

zunächst Silberionen an die Proteine, welche anschließend zu elementarem Silber reduziert und somit als gelbbraune Banden sichtbar werden.

Reagenzien

Proteinbestimmung nach Bradford

Lösung 1	10 mL Ethanol (96 %) 20 mL Phosphorsäure (88 %) 35 mg Coomassie Serva Blue G
Lösung 2	3 mL Lösung 1 3 mL Phosphorsäure (88 %) 1,5 mL Ethanol (96 %) 42,5 mL bidest. Wasser Die Lösung wird bei RT unter Lichtausschluss aufbewahrt
Standardlösungen	400 µg BSA / mL 300 µg BSA / mL 200 µg BSA / mL 100 µg BSA / mL 50 µg BSA / mL

Probenvorbereitung

Probenpuffer (pH 6,8)	3,03 g Tris 2,5 mL β-Mercaptoethanol 5,0 mL Glycerin 2,0 g SDS 0,01 g Bromphenolblau 150 µL Pyronin Y-Lösung (1%ig in Wasser, w:v) 40 mL bidest. Wasser Lösung mit 4 M HCl auf pH 6,8, ad 50 mL mit bidest. Wasser
------------------------------	---

Molekulargewichtsmarker

Protein	Molekulargewicht [kDa]
α -Lactalbumin	14,4
Trypsininhibitor	20,1
Carboanhydrase	30,0
Ovalbumin	43,0
Rinderserumalbumin	67,0
Phosphorylase	94,0

Silberfärbung nach HEUKESHOVEN und DERNICK (1986)

Schritt	Lösung	V [mL]	Zeit [min]
Fixieren	15 mL Ethanol 5 mL Eisessig mit dest. Wasser ad 50 mL	50	30 min
Inkubieren	75 mL Ethanol 17,00 g Natriumacetat ad 250 mL mit dest. Wasser unmittelbar vor Anwendung zugeben: 0,50 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1,25 mL Glutardialdehyd	50	30 min oder über Nacht
Waschen	bideest. Wasser	5 • 50	5 • 5
Versilbern	0,5 g AgNO_3 50 μL Formaldehyd (37 Gew.-%)	50	20
Entwickeln	25 g Na_2CO_3 mit bideest. Wasser ad 1000 mL pH 11,8 (einstellen mit NaHCO_3) unmittelbar vor Anwendung: 300 mL Entwicklungslösung und 30 μL Formaldehyd (37 Gew.-%) zusammengeben	2 • 50	1, abgießen 3-10 (je nach Intensivität der Färbung)
Stoppen	18,6 g Titriplex (EDTA) mit bideest. Wasser ad 1000 mL	50	10

Durchführung*1. Probenvorbereitung*

Die Probe wird homogenisiert, in ein Pyrexglas eingewogen und mit PBS-Lösung extrahiert. Anhand von Proteingehalt-Literaturwerten für die jeweiligen Proben und Referenzsubstanzen sind entsprechend die Extrakte herzustellen. **Die Gesamtproteinkonzentration des Extraktes soll ca. 10 mg/mL betragen.** Die Aufarbeitung der Referenzproben erfolgt entsprechend.

Mittels Proteinbestimmung nach Bradford werden bei den Proben und den Referenzsubstanzen die Proteingehalte bestimmt und auf 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingestellt.



2. Reduktion der Proteine

Die mit Probenpuffer versetzten Proben und Referenzsubstanzen werden für 3 min in einem Wasserbad auf 90 °C erhitzt, um die Proteine zu reduzieren und mit dem Aniontensid SDS zu belegen.

3. Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE

Ein Fertigel wird in die Trennkammer eingesetzt und Trennpuffer dazugegeben. 20 µL Proben-, Referenz- und Markerlösung werden aufgegeben und die Elektrophoresekammer verschlossen. Der Lauf wird beendet, wenn der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff die Anode erreicht hat.

4. Silberfärbung

Die Durchführung der Färbung erfolgt nach obiger Beschreibung.

5. Auswertung

Beispielhafte Auswertung anhand von Milch- und Eiprodukten:

Milchproteine:

Bei 67 kDa ist das Rinderserumalbumin (BSA) zu erkennen. Anschließend folgen die Caseine mit α -Casein, β -Casein und γ -Casein. Im niedrigen Molekulargewichtsbereich sind die Molkenproteine β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin zu erkennen. Bei der untersuchten Probe kann durch Betrachten des Proteinmusters auf das eingesetzte Milchprodukt geschlossen werden. Wurde beispielsweise ausschließlich Molkenpulver eingesetzt, sind keine Caseine detektierbar.

Eiproteine:

In Abb. 3 sind folgende Eiklarproteine dargestellt: Bei 76 kDa ist das Ovotransferrin, bei 43 kDa das Ovalbumin, bei 30-40 kDa das Ovomuroid und bei 14 kDa ist das Lysozym zu erkennen. Die Eidotterproteine sind nicht klar detektierbar, da es sich hierbei um Lipoproteine handelt, die sich mittels SDS-PAGE nicht reproduzierbar trennen lassen. Meist werden auch bei ausschließlichem Einsatz von Eigelb die Eiklarproteine detektiert, da die verfahrenstechnische Trennung nicht von ausreichender Sauberkeit ist.

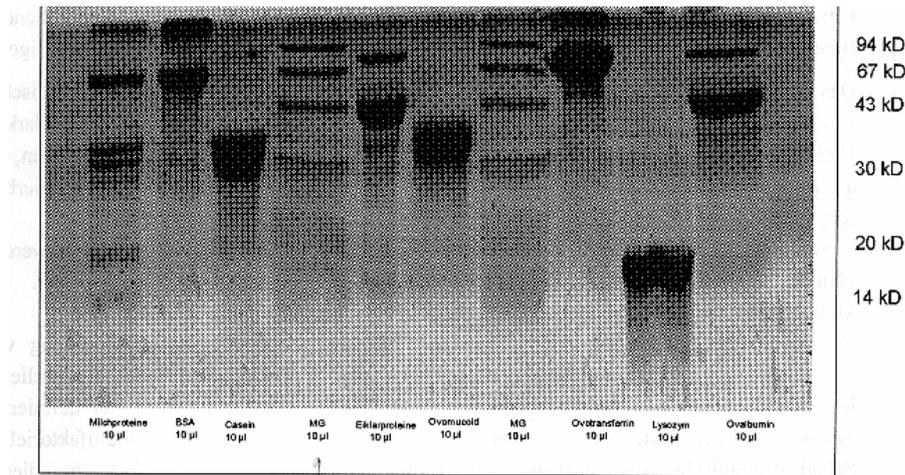


Abb. 3: Ei- und Milchstandardproteine nach Trennung mittels Disk-SDS-PAGE

Seite 7

Literatur

- Davis BJ: Disc-Electrophoresis II, Method and Application to Human Serum Protein, Ann. NY Acad. Sci., 121, 404-427 (1964)
- Lämmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685 (1970)
- Raymond S, Weintraub L: Science, 130, 711 (1959)
- Westermeier R: Elektrophorese-Praktikum, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim (1990)

2.4 Mono- und Oligosaccharide

2.4.1 Bestimmung reduzierender Zucker nach LUFF-SCHOORL

Grundlagen

Mit dieser reduktometrischen Methode werden alle reduzierenden Zucker in Summe erfasst. Die intramolekularen Halbacetale werden in alkalischer Lösung gespalten, was zu einer Freisetzung der reduzierenden Aldehydgruppen führt. Gleichzeitig finden Epimerisierungen der Zucker (über ihre Endiolformen) statt, wobei durch Kettenbruch an der Doppelbindung kurzkettige Hydroxyaldehyde und -ketone gebildet werden. Die genannten Verbindungen werden in der Siedehitze mit überschüssigen Kupfer(II)-Ionen oxidiert, die dabei selbst zu Kupfer(I) reduziert werden. Dabei fällt Cu_2O aus, während Cu^{2+} durch Citrat komplex in Lösung gehalten wird. Die Umsetzung erfolgt nicht stöchiometrisch. Daher müssen die Reaktionsbedingungen genau eingehalten werden. Es handelt sich hier um eine Konventionsmethode.

Die nicht verbrauchten Kupfer(II)-Ionen oxidieren überschüssiges Kaliumiodid zu Iod, das mit Natriumthiosulfat titriert wird. Nach Berücksichtigung eines Blindwertes kann aus dem Verbrauch an Thiosulfat der Gehalt an reduzierenden Zuckern anhand einer Tabelle ermittelt werden. Proteine und Aminosäuren müssen vorher durch Klärung entfernt werden, da sie die Fällung von Cu_2O beeinflussen.

Geräte

300-mL-Erlenmeyerkolben

Rückflusskühler

Stoppuhr

Chemikalien

Schwefelsäure, 25% (g/v)

Kaliumiodid

Stärke-Lösung, 1% (g/v), frisch angesetzt

Natriumthiosulfat-Maßlösung, $c = 0,1 \text{ mol/L}$

CARREZ-Lösung I: 15 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in 100 mL dest. Wasser lösen

CARREZ-Lösung II: 30 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 100 mL dest. Wasser lösen

LUFF'sche Lösung: 50 g Citronensäure in 50 mL lauwarmem dest. Wasser lösen, 143,7 g Na_2CO_3 (wasserfrei) in 350 mL lauwarmem dest. Wasser. Nach Abkühlen beide Lösungen vorsichtig in 1-L-Messkolben mischen. 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 100 mL dest. Wasser vorlösen, in den Messkolben geben und bis zur Marke mit dest. Wasser auffüllen. Die Lösung durch einen Faltenfilter in eine Braunglasflasche filtrieren. Die Lösung ist filtriert unbegrenzt haltbar.

Durchführung

Probe: flüssiges Lebensmittel (wird vom Assistenten ausgegeben)

Probenvorbereitung: Klärung nach CARREZ zur quantitativen Abtrennung der Proteine:

10 mL der Probe werden (je nach Zuckergehalt) in einen 100-, 200- oder 250-mL-Messkolben pipettiert und mit ca. 50 mL dest. Wasser versetzt. Nach Zugabe von 2 mL CARREZ-Lösung I und kräftigem Schütteln werden 2 mL CARREZ-Lösung II zugegeben und erneut gut umgeschüttelt. Der Messkolben wird mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt und nach 10 min Stehenlassen filtriert.

Oxidation der reduzierenden Zucker mit Kupfer(II)-Ionen

Die zur Bestimmung eingesetzte Probenlösung sollte nicht mehr als 50 mg reduzierende Zucker (als Glucose) in 25 mL enthalten, ansonsten ist entsprechend zu verdünnen.

25,0 mL LUFF'sche Lösung und 25,0 mL des evtl. verdünnten Probenfiltrats werden in einen 300-mL-Erlenmeyerkolben pipettiert, mit Siedesteinchen versetzt und sofort auf einem Drahtnetz über der Bunsenbrennerflamme unter Rückfluss in 2 min zum Sieden erhitzt. Nach genau 10 min Sieden (Stoppuhr!) wird sofort mit kaltem Wasser abgekühlt.

Sollte die über dem rotbraunen Niederschlag von Kupfer(I)-Oxid stehende Lösung keine hellblaue Färbung aufweisen, so ist der Überschuss an Kupfer(II)-Ionen verbraucht. Der Ansatz ist dann mit einer entsprechend verdünnten Lösung zu wiederholen.

Iodometrische Titration des Kupfer(II)-Überschusses

Der erkalteten, oxidierten Probenlösung werden 3 g Kaliumiodid und unter vorsichtigem Umschwenken 25 mL Schwefelsäure (25%) zugegeben. Nach Zugabe von 1 mL Stärkelösung wird mit Natriumthiosulfat-Maßlösung (0,1 mol/L) bis zum Verschwinden der Blaufärbung titriert.

Blindversuch

Der Blindversuch wird wie oben beschrieben durchgeführt. Statt der Probenlösung werden 25 mL dest. Wasser eingesetzt.

Die diesem Verbrauch entsprechende Menge an reduzierenden Zuckern im Probenansatz wird anhand einer Tabelle (siehe ASU nach § 64 LFGB, Nr. L 31.00-11) mittels Interpolation abgelesen. Unter Berücksichtigung der Verdünnungen und des Probenvolumens kann der Gehalt an direkt reduzierenden Zuckern in der Probe c_V berechnet werden. Die Angabe des Ergebnisses erfolgt in g/L Probe (bei festen Proben in %), gerundet auf eine Nachkommastelle.



Anmerkungen

Bei Verbräuchen unter 5 mL oder über 20 mL an Natriumthiosulfat-Maßlösung muss eine günstigere Verdünnung gewählt werden.

Wiederholbarkeit der Methode (in Fruchtsaft nach § 64 LFGB, Nr. L 31.00-11):

$$r = 0,47 \text{ g / L} + 0,012 \cdot cv \text{ [g / L]}$$

Dieses bedeutet, dass die Differenz der Ergebnisse der beiden Bestimmungen aus dem Fruchtsaft den nach der Formel berechneten Wert r (Wiederholbarkeit) nicht überschreiten darf.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 31.00-11

Maier, H. G.: Lebensmittel- und Umweltanalytik, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1990

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer, Berlin, 1992.

Rauscher, K., Engst, R., Freimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1986

2.4.2 Bestimmung der Saccharose nach LUFF-SCHOORL

Grundlagen

Bei nichtreduzierenden Zuckern sind alle latenten Carbonylfunktionen blockiert (Vollacetale). Sie sind in alkalischer Lösung stabil und müssen zunächst mit Salzsäure hydrolysiert werden. Saccharose hydrolysiert (ebenso wie andere Fructofuranoside) schneller als die meisten in der Natur vorkommenden Di- und Oligosaccharide. Bei exakter Einhaltung der Reaktionsbedingungen ist die Hydrolyse von Dextrinen daher noch vernachlässigbar. Da bei der Hydrolyse von rechtsdrehender Saccharose Glucose und Fructose entstehen, die die Ebene des polarisierten Lichtes nach links drehen, nennt man diesen Vorgang Inversion.

Die freigesetzten Zucker werden gemeinsam mit den in der Probe zusätzlich vorhandenen reduzierenden Zuckern reductometrisch bestimmt. Aus der Differenz der Bestimmung des Zuckergehaltes „nach der Inversion“ und „vor der Inversion“ lässt sich der Gehalt an Saccharose berechnen.

Geräte zusätzlich zu 2.4.1:

Wasserbad mit Thermometer

Chemikalien zusätzlich zu 2.4.1:

konz. Salzsäure, 32%

Essigsäure, mind. 96%

Kaliumhydroxid-Lösung, 30% (g/v)

Phenolphthalein-Lösung: 0,1% (g/v) in Ethanol

Durchführung

Probenvorbereitung: siehe 2.4.1

Hydrolyse der Saccharose (Inversion)

25,0 mL der geklärten Probenlösung werden in einen 100-mL- oder 200-mL-Messkolben (je nach Zuckergehalt) pipettiert und mit dest. Wasser auf 75 mL verdünnt. Nach Zugabe von 5 mL konz. HCl (32%) wird der Kolben im Wasserbad in maximal 5 min auf 67 - 70 °C gebracht (Temperaturkontrolle durch Thermometer im Messkolben). Die Inversionslösung wird genau 5 min bei 67 - 70 °C gehalten. Der Kolben muss dabei häufig umgeschwenkt werden. Nach der Inversion wird sofort auf 20 °C abgekühlt, das Thermometer abgespült und die Inversionslösung mit Kaliumhydroxidlösung (30%) gegen 1 Tropfen Phenolphthalein-Lösung neutralisiert. Anschließend wird sofort mit wenigen Tropfen Eisessig versetzt, bis die Färbung wieder verschwunden ist, und mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Hauptversuch nach der Inversion

25,0 mL der invertierten und entsprechend verdünnten Lösung werden wie unter 2.4.1 beschrieben für die reduktometrische Bestimmung der Zucker eingesetzt.

Blindversuch

Es kann der Verbrauch an Natriumthiosulfat-Maßlösung b aus 2.4.1 herangezogen werden.

Auswertung

Die Auswertung erfolgt wie unter 2.4.1. Man erhält die Summe aus direkt reduzierenden und nach Inversion reduzierenden Zuckern c_N . Aus der Differenz der gesamtreduzierenden und der direkt reduzierenden Zucker ergibt sich der Saccharosegehalt der Probe c_S nach folgender Berechnung:

$$c_S \text{ [g/L]} = (c_N - c_V) \cdot 0,95$$

c_N : Gehalt an reduzierenden Zuckern nach der Inversion in g/L

c_V : Gehalt an reduzierenden Zuckern vor der Inversion in g/L

0,95: Faktor zur Berücksichtigung des freigesetzten Wassers bei der Kondensation von Glucose und Fructose zu Saccharose

Die Angabe des Ergebnisses erfolgt in g/L Probe (bei festen Proben in %), gerundet auf eine Nachkommastelle.

Wiederholbarkeit der Methode (in Fruchtsaft nach § 64 LFGB, Nr. L 31.00-11): $r = 2,1$ g/L

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 31.00-11

Maier, H. G.: Lebensmittel- und Umweltanalytik, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1990

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1992.

Rauscher, K., Engst, R., Freimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2.Auflage, VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1986

2.5 Polysaccharide

2.5.1 Polarimetrische Bestimmung des Stärkegehaltes in Lebensmitteln

Grundlagen

Da die optisch aktive Stärke eine Ablenkung linear polarisierter Lichtstrahlen bewirkt, stellt die Polarimetrie eine einfache Methode der Stärkebestimmung dar, die für die meisten Lebensmittel hinreichend genau ist. Die häufig als Begleitstoffe auftretenden Hemicellulosen sind dagegen kaum optisch aktiv, andere optisch aktive Substanzen (z. B. Mono- und Oligosaccharide) können leicht abgetrennt werden.

Für den Hauptversuch wird die Stärke in Salzsäure gelöst, wobei auf strikte Einhaltung der Reaktionsbedingungen geachtet werden muss, da die Stärke sonst leicht hydrolysiert. Für den Blindversuch wird die Stärke aus dem Probenansatz entfernt, um den Drehwert der übrigen optisch aktiven Probeninhaltsstoffe zu bestimmen. Zur Entfernung löslicher (d.i. Stärke, die z.B. durch Sulfatieren oder Carboxylieren etc. chemisch modifiziert ist) und verkleisterter Stärke (Stärke nach dem Anteigen mit Kleberproteinen) ist hierfür eine Fällung mit Tannin/Bleieisig erforderlich.

Geräte

Polarimeter mit 10 cm- bzw. 20 cm-Polarimeterrohr

Wasserbad

Stoppuhr

Thermometer

Chemikalien

Salzsäure, 25%

Salzsäure, $c = 0,31 \text{ mol/L}$: 40 mL Salzsäure (25%) mit dest. Wasser auf 1000 mL auffüllen.

CARREZ-Lösung I: 15 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in 100 mL dest. Wasser lösen

CARREZ-Lösung II: 30 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 100 mL dest. Wasser lösen

bei Anwesenheit löslicher Stärke:

Tanninlösung, 10% (g/v) in dest. Wasser

gesättigte Natriumsulfatlösung (ca. 45 g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ /100 mL dest. Wasser)

Bleieisig-Lösung: 30,0 g $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und 10,0 g PbO mit 10 g Wasser verreiben und solange auf dem Wasserbad erhitzen, bis die Mischung weiß bis rötlich weiß geworden ist. Dann unter Umrühren 190 mL Wasser hinzufügen und filtrieren.

Durchführung

Probe: Backware (wird vom Assistenten ausgegeben)

Es kann auch eine andere Einwaage als die genannten 2,5 g gewählt werden, es ist nur darauf zu achten, dass sie für den Blindwert exakt doppelt so hoch ist wie für den Hauptversuch.

Hauptversuch

2,5 g Probe werden genau in einen 100-mL-Messkolben eingewogen, mit 25 mL Salzsäure (0,31 mol/L) versetzt und gut geschüttelt. Anschließend werden weitere 25 mL Salzsäure (0,31 mol/L) zugegeben. Der Messkolben wird im siedenden Wasserbad unter öfterem Umschwenken erhitzt, wobei während der ersten 3 min ununterbrochen geschüttelt werden muss, um Klumpenbildung zu vermeiden. Nach genau 15 min (Stoppuhr) Gesamterhitzungszeit werden sofort 30 mL möglichst kaltes dest. Wasser zugegeben und unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt.

Zur Klärung der Lösung werden nacheinander je 1 mL CARREZ-Lösung I und II unter Umschütteln zugegeben, der Messkolben mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt, die Lösung geschüttelt und durch ein trockenes Faltenfilter filtriert.

Blindversuch für Proben ohne verkleisterte oder lösliche Stärke (z. B. Mehle)

5 g Probe werden genau in einen 100-mL-Messkolben eingewogen, mit 70 - 75 mL dest. Wasser versetzt und 15 min lang durch Rühren auf dem Magnetrührer ausgelaugt. Nach Entfernen des Rührmagneten werden nacheinander je 2 mL CARREZ-Lösung I und II unter Umschütteln zugegeben, der Kolben bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Das Filtrat muss auf Stärkefreiheit geprüft werden (Iodreaktion: rotbraun, nicht tiefblau). Bei positivem Stärkenachweis muss die Probe mit Tannin/Bleiessig behandelt werden (s. Blindversuch für Proben mit verkleisterter oder löslicher Stärke).

50 mL des Filtrats werden in einen 100-mL-Messkolben pipettiert, mit 2 mL Salzsäure (25%) versetzt und im siedenden Wasserbad unter Umschwenken genau 15 min (Stoppuhr) erhitzt, anschließend abgekühlt und aufgefüllt.

Blindversuch für Proben mit verkleisterter oder löslicher Stärke (z. B. Backwaren)

5 g Probe werden genau in einen 100-mL-Messkolben eingewogen, mit 70 - 75 mL dest. Wasser versetzt und 1h durch Rühren auf dem Magnetrührer ausgelaugt. Nach Entfernen des Rührmagneten werden nacheinander je 5 mL Tannin- und 5 mL Bleiessig-Lösung unter Umschütteln zugesetzt. Der Messkolben wird mit gesättigter Natriumsulfatlösung aufgefüllt (um das Pb als PbSO_4 zu fällen), umgeschüttelt und durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Das Filtrat muss auf Stärkefreiheit geprüft werden (Iodreaktion: rotbraun, nicht tiefblau). Bei positivem Stärkenachweis muss die Stärkefällung mit einer größeren Menge Tannin/Bleiessig wiederholt werden.

50 mL des stärkefreien Filtrats werden in einen 100-mL-Messkolben pipettiert, mit 2 mL Salzsäure (25%) versetzt und im siedenden Wasserbad unter Umschwenken genau 15 min (Stoppuhr) erhitzt, nach dem Abkühlen mit je 1 mL CARREZ-Lösung I und II versetzt (unter Schütteln), mit dest. Wasser aufgefüllt und filtriert.

Polarimetrische Messung

Die Filtrate aus dem Haupt- und dem Blindversuch werden luftblasenfrei (!) in Polarimeterrohre gefüllt und die Drehwinkel am Polarimeter jeweils fünfmal abgelesen (arithmetischer Mittelwert).

Das Ergebnis wird auf eine Stelle nach dem Komma gerundet angegeben.

Anmerkungen

Nach der § 64 Methode (s.u.) betragen die stärke-spezifischen Drehwinkel (α^D) bei den angegebenen Reaktionsbedingungen für

Weizenstärke	182,7
Roggenstärke:	184,0
Reisstärke:	185,9
Kartoffelstärke:	185,7
Gerstenstärke	181,5
Haferstärke	181,3
andere:	184,0

Berechnung:

Es wird empfohlen, die Berechnung aus der § 64 Methode zu übernehmen.

Anmerkung: Fett-haltige Proben sind vor der Untersuchung zu entfetten.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 17.00-5

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 18.00-6

Baumann, C., Grossfeld, J.: Z. Unters. Nahrungs- und Genussm. **33**, 97 (1917)

Ewers, E.: Z. öffentl. Chem. **14**, 150 (1908)

Hadorn, H., Doevelaar, F.: Mitt. Gebiete Lebensm. Unters. Hyg. **51**, 64 (1960)

Maier, H. G.: Lebensmittel- und Umweltanalytik, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1990

Rauscher, K., Engst, R., Freimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB Fachbuchverlag, Leipzig, 1986

Schormüller, J. (Hrsg.): Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. II/2, Springer-Verlag, Berlin 1967, S. 443

3 Mineralstoffe, Zusatzstoffe und Wasseranalyse

3.1 Bestimmung und Untersuchung der Asche

3.1.1 Bestimmung der Gesamtasche und des "Säureunlöslichen"

Grundlagen

Der Begriff Asche bzw. Glührückstand bezeichnet den Rückstand, der bei der vollständigen Verbrennung (Veraschung) der organischen Bestandteile eines Lebensmittels unter festgelegten Bedingungen entsteht. Nach Abzug etwaiger Verunreinigungen und Kohlepartikel aus unvollständiger Verbrennung korreliert dieser Rückstand mit dem Mineralstoffgehalt des Lebensmittels. Der säureunlösliche Glührückstand („Säureunlösliches“) entspricht näherungsweise dem Sandgehalt.

Geräte

Trockenschrank
Muffelofen
Exsikkator
Quarzschalen
Wasserbad
aschefreie Papierfilter

Chemikalien

Wasserstoffperoxid-Lösung (30 %ig)
Salzsäure (37 %ig)
Salzsäure (1 mol/L)

Durchführung

Probe: Wurst, evtl. nach Absprache anderes Lebensmittel (wird vom Assistenten ausgegeben)

Zwei Quarzschalen (Doppelbestimmung!) werden zunächst über dem Bunsenbrenner gegläht, an der Luft vorgekühlt, dann zum endgültigen Abkühlen in einen Exsikkator gestellt und anschließend gewogen. Die Einwaage der Probe richtet sich nach der zu erwartenden Aschemenge: Diese sollte maximal 0,5 g an Auswaage betragen.

Zur Trocknung des Probenmaterials werden die Quarzschalen in einen Trockenschrank (ca. 120 °C) gestellt und danach mit Hilfe eines Bunsenbrenners vorsichtig weitgehend verkohlt. Sirupöse, stark schäumende Proben werden erst völlig entwässert und können dann gefahrlos verkohlt und verascht werden. Ein Verspritzen bei Proben mit hohem Salzgehalt kann man durch Bedecken der möglichst getrockneten Probe mit einem Rundfilter verhindern, bevor man glüht. Anschließend bringt man die

Schale in einen Muffelofen und verglüht die Kohle bei 500 °C (bis 550 °C). Am zweckmäßigsten stellt man die Probe schon beim Aufheizen in den Muffelofen. Nach zwei Stunden wird die abgekühlte Asche vorsichtig tropfenweise mit 30%igem Wasserstoffperoxid durchfeuchtet (Pasteurpipette!) und bis zum kohlefreien Rückstand weiter verascht.

Die Wasserstoffperoxid-Behandlung kann wiederholt werden (Gelegentlich wird es notwendig, zur vollständigen Beseitigung der Kohle einen wässrigen Auszug herzustellen und den Filtrückstand weiter zu veraschen). Der Ascherückstand kann nunmehr nach Auskühlen im Exsikkator ausgewogen werden und dient zur Angabe des Aschegehaltes.

Die gewonnene Asche wird mit konz. Salzsäure abgeraucht und mit 10 mL verdünnter Salzsäure aufgenommen. Digerieren auf dem siedenden Wasserbad (etwa 20 min) fördert das vollständige Abscheiden der Kieselsäure. Daraufhin wird die noch heiße Lösung durch ein aschefreies Filterpapier filtriert und das Filter mit heißem dest. Wasser ausgewaschen.

Bei der Mineralisierung von Proben zu Kationenbestimmung ist das Filtrat nicht zu verwerfen, da es die Kationen enthält.

Zur Bestimmung des "Säureunlöslichen" werden Filter und Rückstand in die Quarzschalen zurückgegeben, verkohlt, bei 550 °C verascht und ausgewogen.

Anmerkungen

Viele Aschen, besonders magnesiumreiche, sind sehr hygroskopisch. Sie müssen daher, wenn sie nicht unmittelbar weiterverarbeitet werden, vor einer analytischen Einwaage erneut geglüht werden.

3.2 Bestimmung von Anionen

Grundlagen

Zweckmäßigerweise erfolgt die Bestimmung von Anionen in komplexen Matrices nach Veraschung. Da Anionen wie Phosphat oder Chlorid ohne ausreichende Mengen an Gegenionen bei der Trockenveraschung (vgl. 5.1.1) nicht quantitativ im Glührückstand verbleiben, muss zu ihrer Bindung Magnesiumacetat-Lösung vor der Veraschung hinzugefügt werden. Dieses Veraschungshilfsmittel dient einerseits zur Bindung der Anionen an Magnesium und andererseits der Oberflächenvergrößerung durch Freisetzung von Kohlendioxid.

Chemikalien

Magnesiumacetat-Lösung: 50 g MgO in überschüssiger Essigsäure lösen, mit dest. Wasser ad 1 L auffüllen und filtrieren.

Wasserstoffperoxid-Lösung (30 %)

verd. Salpetersäure: Salpetersäure (min. 65 Gew%) / dest. Wasser (1:2, v:v)

Durchführung

Probe: Wurst, evtl. nach Absprache anderes Lebensmittel (wird vom Assistenten ausgegeben)

Zwei Quarzschalen (Doppelbestimmung!) werden zunächst über dem Bunsenbrenner geglüht, an der Luft vorgekühlt, dann zum endgültigen Abkühlen in einen Exsikkator gestellt und anschließend gewogen. Die Einwaage der Probe richtet sich nach der zu erwartenden Aschemenge: Diese sollte maximal 0,5 g an Auswaage betragen.

Nach dem Trocknen des Analysenmaterials bei 120 °C in einem Trockenschrank wird das Trockengut mit 5 mL Magnesiumacetat-Lösung durchtränkt (Halbfesten, breiigen Proben setzt man die 5 mL Magnesiumacetat-Lösung besser vor der Trocknung zu.). Zur weiteren Veraschung verfährt man wie zur Herstellung der Kationenasche, wobei allerdings eine Veraschungstemperatur von 500 °C nicht überschritten werden darf.

Die Asche wird hier in 20 mL verdünnter Salpetersäure gelöst und die saure Lösung 1 - 2 h auf dem Wasserbad zur Abscheidung der Kieselsäure digeriert, dann heiß in einen 50-mL-Messkolben filtriert. Nach gründlichem Nachwaschen mit heißem dest. Wasser wird der abgekühlte Messkolben aufgefüllt. Dieses ist die **Grundlösung II**. Aus ihr erfolgt die Bestimmung der Anionen. (s. Versuche 3.2.1 & 3.2.2) Der Filtrierrückstand wird verworfen.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 06.00-4.

Forstners, P.: Z. Unters. Lebensm. 51, 300 (1926).

Rauscher, K., Engst, R., Freimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB Fachbuchverlag Leipzig (1986).

3.2.1 Bestimmung von Chlorid (argentometrisch)

Grundlagen

Das in der Probe vorhandene Chlorid wird argentometrisch titriert. Der Titrationsendpunkt wird mittels einer Silber/-Silberchlorid-Einstabmesskette potentiometrisch indiziert.

Geräte

Silber/-Silberchlorid-Einstabmesskette (vom Assistenten)

Magnetrührstäbchen

Chemikalien

Silbernitrat-Maßlösung, 0,01 N

Salpetersäure, 2 N

Natriumchlorid-Eichlösung zur Titerbestimmung der Silbernitratlösung, 0,01 N (Vor der Einwaage
Glühen des Natriumchlorids bei 500 °C bis zur Massenkonstanz)

Durchführung

Die Chloridbestimmung erfolgt sowohl aus der **Grundlösung II** (s. Versuch 5.2) als auch aus einem wässrigen Auszug. Für den wässrigen Auszug werden ca. 10 g Wurst in einen Erlenmeyerkolben genau eingewogen, mit 100 mL heißem Wasser versetzt und 15 Minuten auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wird durch ein angefeuchtetes Faltenfilter in einen 200 mL-Messkolben filtriert; Erlenmeyerkolben und Filter werden mehrfach mit heißem Wasser nachgespült.

Zur Titration wird ein Aliquot der Grundlösung II bzw. des wässrigen Auszuges eingesetzt, mit 2 mL Salpetersäure angesäuert und mit soviel destilliertem Wasser versetzt, dass das Diaphragma der Silber/Silberchlorid-Einstabmesskette vollständig in die Lösung taucht. Es wird mit Silbernitratlösung bis zum Endpunkt titriert. Der Titer der Silbernitrat-Maßlösung wird auf gleiche Weise bestimmt.

Anmerkungen

Silberhaltige Abfälle (sauer!) werden in einem separaten Kanister gesammelt.

Es erfolgt eine Einweisung am Gerät.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren § 64 LFGB: Nr. L 03.00-11 bzw. L 03.42-4

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren § 64 LFGB: Nr. L 26.11.03-2

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren § 64 LFGB: Nr. L 13.05-4 bzw. L 13.06-4

Maier, H.G.: Lebensmittel- und Umweltanalytik, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1990.

3.2.2 Bestimmung von Phosphat (VIS-Photometrie)

Grundlagen

Die Reaktion beruht auf der Bildung eines Phosphor-Vanadin-Molybdat-Komplexes, der photometrisch vermessen wird. Die Berechnung des Phosphatgehaltes erfolgt als Phosphorpentoxid (P_2O_5).

Geräte

Spektralphotometer
Glasküvetten (1 cm)
Wasserbad

Chemikalien

Salpetersäure (min. 65 Gew%)

verd. Salpetersäure: Salpetersäure (min. 65 Gew%) / dest. Wasser (1:2, v:v)

Ammoniumheptamolybdat-Lösung: 50 g Ammoniumheptamolybdat, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$, in 800 mL dest. Wasser von etwa 50 °C lösen. Nach dem Abkühlen die Lösung auf 1000 mL auffüllen, evtl. filtrieren.

Ammoniumvanadat-Lösung: 2,5 g Ammoniummonovanadat, NH_4VO_3 , in 500 mL siedendes dest. Wasser geben und lösen. Nach dem Erkalten die Lösung mit 20 mL Salpetersäure (min. 65 Gew%) versetzen und mit dest. Wasser ad 1000 mL auffüllen.

Reagenzlösung: Je 1 Volumenteil verdünnte Salpetersäure, Ammoniumvanadat-Lösung und Ammoniumheptamolybdat-Lösung in der angegebenen Reihenfolge mischen. Die Reagenzlösung muss vollständig klar und schwach gelblich sein.

Phosphat-Stammlösung, aus Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 , 3 h bei 103 °C getrocknet, Größenordnung der P_2O_5 - Konzentration ca. 500 mg/L (genaue Konzentration festhalten)

Durchführung

Probe: Wurst, evtl. nach Absprache anderes Lebensmittel (wird vom Assistenten ausgegeben)

Von der Phosphat-Stammlösung werden 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL bzw. 60 mL in 100-mL-Messkolben pipettiert. Nach Zusatz von jeweils 10 mL verdünnter Salpetersäure wird mit dest. Wasser zur Marke aufgefüllt. Je 20 mL dieser salpetersäurehaltigen Kalibrierlösungen sowie jeweils 30 mL Reagenzlösung werden in 100-mL-Messkolben pipettiert und mit dest. Wasser zur Marke aufgefüllt (Kontrolle: Phosphorgehalte hier ca. 1 - 6 mg / 100 mL, berechnet als Phosphorpentoxid).

Für die Blindprobe werden 2 mL verdünnte Salpetersäure mit 30 mL Reagenzlösung versetzt und mit dest. Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

Nach frühestens 15 min werden die Extinktionen dieser Lösungen im Photometer bei 430 nm gemessen.

20 mL der **Grundlösung II** (s. Versuch 5.2) werden in einem 100-mL-Messkolben mit 30 mL Reagenzlösung versetzt. Die Lösung wird mit dest. Wasser zur Marke aufgefüllt. Nach frühestens 15 min wird die Absorption dieser Lösung im Photometer bei 430 nm gemessen.

Auswertung

Mit den 6 Messwerten aus den Phosphat-Kalibrierlösungen wird die Kalibrierfunktion mit Hilfe der linearen Regression errechnet. Zusätzlich ist eine graphische Auswertung vorzunehmen. Der Gesamtphosphorgehalt in g/100 g der Probe wird als Phosphorpentoxid auf drei Stellen nach dem Komma gerundet angegeben.

Anmerkungen

SiO₂, Citronensäure, Oxalsäure und H₂O₂ führen zu erheblichen Störungen. Alkalien, Erdalkalien und bis zu 10 mg Fe³⁺ pro Ansatz stören die Bestimmung nicht (Gericke und Kurmies, 1952). Pyrophosphate ergeben keine Reaktion. Da sich beim Veraschungsprozess Meta- und Pyrophosphate bilden, ist die Behandlung der Asche mit Säure (kurzes Aufkochen mit verdünnter Schwefelsäure) zur vollständigen Hydrolyse der kondensierten Phosphate notwendig.

Ein Phosphatzusatz kann über die Ermittlung der „P-Zahl“ nachgewiesen werden. Die P-Zahl ist eine empirische Kennzahl, der das im Fleisch relativ konstante Verhältnis Phosphatgehalt zu Rohprotein (Kjeldahl) zugrunde liegt.

$$\text{P-Zahl} = \frac{\% \text{ P}_2\text{O}_5 \cdot 100 \%}{\% \text{ Rohprotein}}$$

Die durchschnittliche P-Zahl bei Fleischerzeugnissen liegt bei 2,2. Bei Brühwürsten gilt ein Phosphatzusatz als erwiesen, wenn die P-Zahl über 2,4 liegt.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 06.00-9

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 08.00-9

Gericke, S.; Kurmies, B.: Z. Anal. Chemie **137**, 15 (1952).

Kiermeier, F.; Möhler, K.: Z. Unters. Lebensm. **106**, 35 (1957).

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1992.

Thile, E. et al.: Z. Anorg. Chem. **272**, 182 (1953).

Watzel, R.: Angew. Chem. **55**, 356 (1942).

Winkler, Z.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **100**, 113 (1955).

3.3 Quantitative Bestimmung von Sorbin- und Benzoesäure nach Wasserdampfdestillation (UV-Photometrie)

Allgemeines

Konservierungsstoffe sind Zusatzstoffe im Sinne des § 2 LFGB. Anwendungsbereiche und Höchstmengen sind in Artikel 2 der VERORDNUNG (EG) NR. 1333/2008 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES VOM 16. DEZEMBER 2008 ÜBER LEBENSMITTELZUSATZSTOFFE und in den Anhängen I und II geregelt.

3.3.1 Isolierung durch Wasserdampfdestillation

Grundlagen

Die beiden Konservierungsstoffe werden aus der Lebensmittelmatrix durch Wasserdampfdestillation abgetrennt. Die Säuren sind erst nach Protonierung im sauren Medium wasserdampfflüchtig. Zur Destillation hat sich die Schliffapparatur nach Antonacopoulos (1960) bewährt.

Geräte

Schliffapparatur nach Antonacopoulos

Siedesteine

Chemikalien

Kochsalz (Handelsware)

Magnesiumsulfat

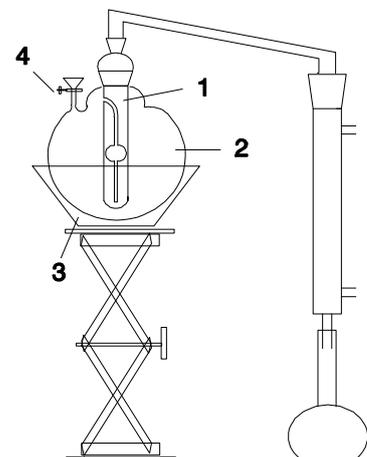
Tartratpuffer, pH 3.0: 8,0 g Natriumhydroxid und 43,3 g Weinsäure in einem 1-L-Messkolben mit ca. 800 mL dest. Wasser lösen, den pH-Wert überprüfen (ggf. einstellen) und die Lösung bis zur Eichmarke mit dest. Wasser auffüllen

Schwefelsäure, 20 % (v/v)

Durchführung (nach LORENZEN UND SIEH (1962))

Probe: wird vom Assistenten ausgegeben.

10 - 20 mL bzw. 1 - 5 g der Probe werden mit 30 g Magnesiumsulfat und 10 mL Tartratpuffer vermischt und der pH-Wert überprüft (ca. pH 3,0) und ggf. eingestellt. Das Gemisch wird in das Destillationsgefäß (1) überführt und der 2-L-Kochkolben (2) im Heizpilz (3) mit 1,5 L Wasser und Siedesteinen versetzt. Nach Jäckl (1963) erhöht sich die Intensität der Wasserdampfdestillation wesentlich, wenn überhitzter Wasserdampf von 105 °C durch die



Apparatur nach Antonacopoulos

Probe geleitet wird. Das erreicht man durch Zugabe von ca. 100 g Kochsalz zu dem Wasser im Kochkolben.

Achtung! Das Kochsalz sollte zu jeder Zeit gelöst vorliegen, da es sonst zu Siedeverzügen kommen kann.

Der Kolben ist bei geöffnetem Trichterhahn (4) bis zum Sieden des Wassers zu erhitzen und dann der Dampfablass zu schließen. Danach sind ca. 900 mL in einen 1000-mL-Messkolben abzudestillieren. Nach beendeter Destillation wird zunächst der Trichterhahn (4) geöffnet und erst dann der Heizpilz abgestellt, da sonst der Inhalt des Destillationskolbens in den Kochkolben zurück steigt. Das Destillat wird mit 5 mL Schwefelsäure (20 %) angesäuert, mit dest. Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt und direkt zur Messung eingesetzt.

Anmerkungen

Wasserdampfvlüchtige Konservierungsstoffe sind neben Sorbinsäure und Benzoesäure auch Ameisensäure, Propionsäure, p-Chlorbenzoesäure, o-Phenylphenol (OPP), Diphenyl (DP), pHB-Ester (nicht quantitativ, die p-Hydroxybenzoesäure selbst ist nicht wasserdampfvlüchtig), Hexamethylentetramin (als Formaldehyd) und Salicylsäure (DIEMEYER UND POSTEL, 1967).

Bei kohlenhydratreichen Lebensmitteln kann bei Hitzeeinwirkung in saurem Medium das UV-aktive, wasserdampfvlüchtige 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) entstehen, das eine photo-metrische Bestimmung der Konservierungsstoffe stört. Deshalb sollte zur Vermeidung seiner Bildung ein pH von 3 eingestellt werden. Für qualitative Zwecke kann der Puffer jedoch auch z.B. durch 2 g Citronensäure ersetzt werden.

Bei Störungen durch andere Stoffe (Aromastoffe, etherische Öle) in Form von Absorption oder Trübung des Destillates wird das saure Destillat mit Diethylether extrahiert, die organische Phase mit 0,1 N Natriumhydroxidlösung reextrahiert und die wässrige Phase vor der Messung mit Schwefelsäure angesäuert.

Für dünn-schichtchromatographische Identifizierungen (s. 8.1.5) ist in der Regel eine Konzentrierung des Destillates nötig. Dazu werden 100 - 200 mL des sauren Destillates zweimal mit 25 mL Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird mit 1 mL Ethanol aufgenommen.



Literatur

Antonacopoulos, N.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 113, 113 - 116 (1960).

Courtial, W.: Die spektralphotometrische Bestimmung der Konservierungsstoffe Sorbinsäure, Benzoessäure und PHB-Ester, Dt. Lebensm. Rundschau, 66, 220 - 223 (1970).

Frede, W.: Konservierungsstoffe in Lebensmitteln. In: Fresenius, W., Günzler, H. Huber, W., Kelker, H., Lüderwald, I., Tölg, G., Wissler, H. (Hrsg.): Analytiker-Taschenbuch, Band 7, Springer-Verlag Berlin (1988).

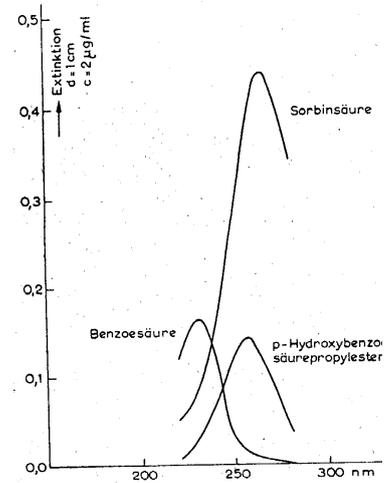
Verordnung über Lebensmittelzusatzstoffe: Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe

3.3.2 UV-Photometrische Bestimmung von Benzoesäure und Sorbinsäure

Grundlagen

Durch Messung der UV-Absorption an zwei verschiedenen Wellenlängen und die Anwendung eines einfachen mathematischen Verfahrens (Lösen einer Gleichung mit zwei Unbekannten) können zwei UV-aktive Substanzen, deren UV-Spektren überlappen - in diesem Fall Benzoesäure (B) und Sorbinsäure (S) (siehe Abb.) - nebeneinander bestimmt werden. Voraussetzung ist, dass keine weiteren UV-aktiven Substanzen in der Lösung enthalten sind.

Als Wellenlängen λ_1 und λ_2 für die Messung der Absorption der Probenlösung werden in der Regel die Absorptionsmaxima der beiden zu bestimmenden Substanzen gewählt. Die gemessenen



Absorptionen bei λ_1 und λ_2 setzen sich additiv aus den Teilabsorptionen der Benzoe- und Sorbinsäure zusammen. Bei Kenntnis des molaren Absorptionskoeffizienten beider Substanzen bei beiden Wellenlängen (ϵ_{λ_1} und ϵ_{λ_2}) gilt:

$$E_{\lambda_1} = \epsilon_{\lambda_1}^B \cdot c^B + \epsilon_{\lambda_1}^S \cdot c^S \quad (\text{Gl.1}) \quad \text{und} \quad E_{\lambda_2} = \epsilon_{\lambda_2}^B \cdot c^B + \epsilon_{\lambda_2}^S \cdot c^S \quad (\text{Gl.2})$$

E_{λ_1} Absorption der Probenlösung beim Absorptionsmaximum von Benzoesäure (Wellenlänge λ_1)

E_{λ_2} Absorption der Probenlösung beim Absorptionsmaximum von Sorbinsäure (Wellenlänge λ_2)

c Konzentration in mol/L

ϵ molarer Absorptionskoeffizient für die jeweilige Substanz (B = Benzoesäure oder S = Sorbinsäure) bei der gewählten Wellenlänge (λ_1 oder λ_2)

Es liegen zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten vor (Gl. 1,2), die man nach der Eliminationsmethode (Auflösen nach c^S , Gleichsetzen beider Ausdrücke für c^S und Auflösen nach c^B , siehe Zachmann, 1977) lösen kann:

$$c^B = \frac{E_{\lambda_1} - \frac{\epsilon_{\lambda_1}^S \cdot E_{\lambda_2}}{\epsilon_{\lambda_2}^S}}{\epsilon_{\lambda_1}^B - \frac{\epsilon_{\lambda_1}^S \cdot \epsilon_{\lambda_2}^B}{\epsilon_{\lambda_2}^S}} \quad (\text{Gl.3}) \quad \text{und} \quad c^S = \frac{E_{\lambda_2} - \epsilon_{\lambda_2}^B \cdot c^B}{\epsilon_{\lambda_2}^S} \quad (\text{Gl.4})$$

Dieses Verfahren lässt sich auf beliebige andere Substanzen übertragen, sofern sich ihre spektroskopischen Eigenschaften (Lage der Absorptionsmaxima) unterscheiden.

Geräte

Spektralphotometer
Quarzküvetten (1 cm)
10 mL Messpipette

Chemikalien

Natriumhydroxidlösung, 0,1 M

Schwefelsäure, 20 % (v/v)

Benzoessäurestammlösung (ca. $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L): Einwaage Benzoessäure in einem 1-L-Messkolben mit etwa 100 mL dest. Wasser suspendieren und mit wenig Natriumhydroxidlösung vollständig lösen. Anschließend mit dest. Wasser bis zur Eichmarke auffüllen.

Benzoessäure-Kalibrierlösungen I (ca. $1,0 - 8,0 \times 10^{-5}$ mol/L): 5 verschiedene Volumina [mL] der Benzoessäurestammlösung in 100-mL-Messkolben füllen, mit 2 mL Schwefelsäure ansäuern und mit dest. Wasser zur Eichmarke auffüllen.

Benzoessäure-Kalibrierlösungen II (ca. $10 - 80 \times 10^{-5}$ mol/L): Die jeweils gleichen Mengen Stammlösung (s.o.) in je einen 10-mL-Messkolben füllen, mit wenigen Tropfen Schwefelsäure ansäuern und mit dest. Wasser zur Eichmarke auffüllen.

Sorbinsäurestammlösung (ca. $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L): Einwaage Sorbinsäure in einem 1-L-Messkolben mit etwa 100 mL dest. Wasser suspendieren und mit wenig Natriumhydroxidlösung vollständig lösen. Anschließend mit dest. Wasser bis zur Eichmarke auffüllen.

Sorbinsäure-Kalibrierlösungen (ca. $0,5 - 10 \times 10^{-5}$ mol/L): 5 verschiedene Volumina [mL] der Sorbinsäurestammlösung in je einen 100-mL-Messkolben füllen, mit 2 mL Schwefelsäure ansäuern und zur Eichmarke mit dest. Wasser auffüllen.

Durchführung

Aufnahme eines UV-Spektrums aus dem Wasserdampfdestillat

Aus dem sauren Destillat wird ein UV-Spektrum (z.B. 200 - 300nm) aufgenommen und im Protokoll dokumentiert (evtl. ist eine Verdünnung anzufertigen).

Bestimmung der Absorptionsmaxima von Sorbinsäure und Benzoessäure

Aus einer Kalibrierlösung von Sorbinsäure bzw. Benzoessäure ist je ein Spektrum aufzunehmen und daraus das jeweilige Absorptionsmaximum zu bestimmen ($\lambda_{\max}(\text{Benzoessäure}) = \lambda_1$; $\lambda_{\max}(\text{Sorbinsäure}) = \lambda_2$)

Bestimmung der molaren Absorptionskoeffizienten Benzoe- und Sorbinsäure

Mit Hilfe der Kalibrierlösungen sind durch Messung der UV-Absorption bei λ_1 und λ_2 Kalibriergeraden aufzunehmen und die molaren Absorptionskoeffizienten von Sorbin- und Benzoessäure bei beiden Wellenlängen zu ermitteln.

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz gilt: $E = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$ (Gl. 5)

E: gemessene Absorption (AU = Absorptionseinheiten)

ε_{λ} : molarer Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge λ [L/(mol·cm)]

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

c: Konzentration [mol/L]

Trägt man die erhaltenen Absorptionen gegen die jeweilige Konzentration des Konservierungsstoffes (in mol/L) auf, so entspricht die Steigung der Ausgleichs- oder Regressionsgeraden dem molaren Absorptionskoeffizienten. Man erhält $\varepsilon_{\lambda 1}^S$, $\varepsilon_{\lambda 2}^S$, $\varepsilon_{\lambda 1}^B$, $\varepsilon_{\lambda 2}^B$.

Absorptionsmessung des Probendestillates

Die Absorption des sauren Destillats wird bei $\lambda 1$ und $\lambda 2$ gemessen. Man erhält $E_{\lambda 1}$ und $E_{\lambda 2}$.

Berechnung der Gehalte von Sorbin- und Benzoesäure in der Messlösung

Durch Einsetzen von $\varepsilon_{\lambda 1}^S$, $\varepsilon_{\lambda 2}^S$, $\varepsilon_{\lambda 1}^B$ und $\varepsilon_{\lambda 2}^B$ sowie $E_{\lambda 1}$ und $E_{\lambda 2}$ in Gleichung 3 und 4 lassen sich die Konzentrationen von Benzoe- und Sorbinsäure in der Probenlösung (c^B und c^S) berechnen.

Berechnung der Gehalte in der Probe

Der Konservierungsstoffgehalt der Probe wird wie folgt berechnet:

$$c_{Pr} = \frac{c \cdot MG \cdot F \cdot 100}{E} \quad (\text{Gl.6})$$

c_{Pr} Konzentration von Benzoe- oder Sorbinsäure in der Probe [g/100g]

E Probeneinwaage [g] zur Wasserdampfdestillation

F Faktor falls verdünnt wurde; entsprechend einem Liter Destillat → Einheit: [L]

c berechnete Gehalte von Sorbin- und Benzoesäure in der Messlösung [mol/L]

MG Molmasse des betreffenden Konservierungsstoffes [g/mol]

$MG_{(\text{Benzoesäure})} = 122,12 \text{ g/mol}$

$MG_{(\text{Sorbinsäure})} = 112,13 \text{ g/mol}$

Anmerkungen

Die Lage eines Absorptionsmaximums sowie der jeweilige Absorptionskoeffizient ist bei Substanzen, deren Chromophor protonierbar oder deprotonierbar ist, abhängig vom pH-Wert der Lösung. Auch die Verwendung protischer / aprotischer Lösungsmittel kann hierbei eine Rolle spielen.

Bei $\lambda 1$ und $\lambda 2$ sind nur die Kalibrierlösungen des jeweiligen Konservierungsstoffes zu berücksichtigen, deren Absorptionswert sich im Messbereich des UV-Photometers befinden.

Die Lage des Absorptionsmaximums sowie die Werte für die molaren Absorptionskoeffizienten sind in UV-Atlanten (Perkampus et al., 1971) mit den jeweiligen Spektren dokumentiert und können zum Vergleich mit den selbst bestimmten Werten herangezogen werden.



Literatur

Lorenzen, W., Sieh, R.: Spektroskopische Schnellbestimmung von Konservierungsstoffen in Lebensmitteln, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 118, 223 - 233 (1962).

Perkampus, H.H., Sandemann, I., Timmons, C.J. (Hrsg.): UV-Atlas organischer Verbindungen, Band I - V, Verlag Chemie, Weinheim (1971).

Zachmann, H.G.: Mathematik für Chemiker, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, S. 52 ff. (1977).

3.4 Bitterstoffe

3.4.1 Chinin in Tonic-Wässern (fluorimetrisch)

Fluorimetrie

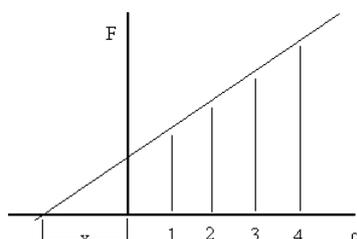
Eine Reihe von Molekülen - in der Regel mit einem ausgeprägtem π -Elektronensystem - kann durch Photonen ganz bestimmter Energie zur Emission von Strahlung angeregt werden. Die Anregungsstrahlung vermag die Elektronen im Molekül vom Grundzustand in den angeregten Zustand zu heben. Beim Zurückkehren in den Grundzustand wird die Energiedifferenz zwischen dem angeregten und dem Grundzustand in Form von Lichtenergie abgegeben. Die emittierte Strahlung ist dabei immer langwelliger (energieärmer) als die absorbierte Strahlung (Stoke'sche Wellenlängenverschiebung), da ein Teil der Energie durch Kollision, Schwingung etc. „verloren geht“. Gemessen wird die Emissionsintensität, nicht das Verhältnis I/I_0 wie bei absorptionspektrometrischen Verfahren. Die Fluoreszenz-Intensität ist direkt proportional der Konzentration. Die Fluorimetrie benötigt eine stärkere Anregungsenergie als z. B. die UV-Spektrometrie. Es werden z.B. Hg-Dampfentladelampen oder Xe-Hochdrucklampen verwendet.

Standardaddition

Um Fehler bei der Messung wie z. B. durch Fremdstoffquenching zu verhindern, arbeitet man bei der Fluorimetrie häufig mit der Methode der Standardaddition:

Zur Durchführung teilt man die Probe in fünf aliquote Anteile. Vier dieser Probenanteile setzt man ein definiertes Volumen einer Kalibrierlösung unterschiedlicher Konzentration des zu bestimmenden Stoffes hinzu. Dem fünften Teil setzt man das gleiche Volumen an dest. Wasser zu. Nach dem Durchmischen haben alle Teile exakt die gleiche Matrixzusammensetzung. Darüber hinaus wird ein Reagenzienblindwert erstellt und die Fluoreszenzintensität dieses Blindwertes von allen Messwerten abgezogen. Zur Auswertung trägt man die gemessene und gegebenenfalls korrigierte Fluoreszenzintensität gegen die zugesetzte Konzentration des zu bestimmenden Stoffes auf.

Man erhält eine Kalibriergerade, die nicht durch den Nullpunkt geht, sondern die Y-Achse in einem Punkt größer Null schneidet (= Fluoreszenzintensität der Lösung ohne Standardaddition). Durch Extrapolation der erhaltenen Kalibriergerade durch die Konzentrationsachse lässt sich der tatsächliche Gehalt der Probe an dem zu bestimmenden Stoff ablesen.



- F: Fluoreszenzintensität
- c: Konzentration
- 1 - 4: zur Lösung zugesetzte bekannte Konzentration
- x: Konzentration der zu bestimmenden Probe

Geräte

Spektralfluorimeter

1-cm-Fluoreszenzquarzküvette

Chemikalien

Chininsulfat Dihydrat

Schwefelsäure 96%ig

0,5 M Schwefelsäure-Lösung

27 mL Schwefelsäure 96%ig werden mit Wasser auf 1 L aufgefüllt.

Chinin-Stammlösung: ca. 50 mg Dichininmonosulfat Dihydrat auf 0,1 mg genau einwiegen und in 100 mL 0,5 M Schwefelsäure lösen.

Chinin-Aufstocklösung: 3 mL der Chinin-Stammlösung mit 0,5 M Schwefelsäure auf 100 mL verdünnen. Die Konzentration der Lösung wird als freie Chininbase [mg/L] berechnet.

Durchführung

Probe: Tonic-Wasser (vom Assistenten ausgegeben)

Bestimmung des Emissions- und Anregungsmaximums

Aus der Aufstocklösung wird eine 1:100-Verdünnung hergestellt und ein Emissions- sowie Anregungsspektrum aufgenommen. Damit wird die maximale Anregungs- und Emissions-Wellenlänge ermittelt. Hierfür wird zunächst der Emissionsmonochromator am Fluorimeter auf Null gestellt und das Anregungsspektrum aufgenommen. Hieraus wird diejenige Wellenlänge ermittelt, die die stärkste Anregung bewirkt (Anregungsmaximum). Anschließend wird mit dieser Wellenlänge ein Emissionsspektrum aufgenommen und so das Emissionsmaximum ermittelt.

Standardaddition

Für die Standardaddition werden in fünf 100 mL Messkolben je 1 mL der ggf. verdünnten Probenlösung vorgelegt. Die Probenlösung in den Messkolben 2-5 wird vor dem Auffüllen mit 0,5 M Schwefelsäure in aufsteigender Konzentration mit Chinin dotiert. Hierzu werden 1, 2, 3 und 4 mL der Chinin-Standardlösung (Aufstocklösung) in die Messkolben 2 - 5 pipettiert. Die Lösung in Messkolben 1 bleibt undotiert.

Nr. des 100 mL Messkolben	Zu 1 mL Probenlösung in 100 mL Messkolben zugegebene Menge Chinin-Standard-lösung [mL]	Dotierte freie Chininbase [mg/100mL Kolben]
1	0	0,000
2	1	
3	2	
4	3	
5	4	ca. 0,5

Probenvorbereitung

Bei kohlenstoffhaltigen Proben ist es zunächst nötig, diese zu entgasen. Hierzu wird ein Teil der Probe in einen Iodzahlkolben gefüllt und im Ultraschallbad entgast (anfangs starkes Schäumen!). Von dieser Lösung wird je 1 mL in fünf 100-mL-Messkolben pipettiert. Zu den Kolben zwei bis fünf wird je 1, 2, 3 und 4 mL der Aufstocklösung zupipettiert. Die Messkolben werden mit 0,5 M Schwefelsäure aufgefüllt und gut geschüttelt.

Messung

Die Messung erfolgt gegen die 0,5 M Schwefelsäurelösung. Hierzu wird eine Quarzküvette mit dieser Lösung in das Gerät gestellt und die Anzeige auf Null gebracht. Anschließend werden die Probenlösung und die aufgestockten Lösungen in aufsteigender Konzentration vermessen.

Auswertung

Die Auswertung erfolgt graphisch und durch lineare Regression:

x-Werte	y-Werte
Dotierte freie Chininbase [mg/100 mL] Nr. 1-5	Messwert 1-5

Man erhält die Geradensteigung b , den Achsenabschnitt a und den Regressionskoeffizienten r . Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse entspricht dem Gehalt an freier Chininbase in der verdünnten Probe in mg/100 mL. Anschließend erfolgt eine Rückrechnung bzw. der Bezug auf das eingesetzte Probenvolumen und die Verdünnung. Das Ergebnis wird als Chinin (berechnet als freie Chininbase) in mg/L auf eine Stelle nach dem Komma gerundet angegeben.

Anmerkung

Vor der Inbetriebnahme und Messung erfolgt eine Einweisung am Gerät.

Das Fluoreszenzspektrum einer Substanz ist stark vom Lösungsmittel abhängig. Ein Problem bei der Fluoreszenz ist das Quenching (Fluoreszenz-Löschung) wie z. B. Konzentrations- oder Fremdstoffquenching.



Literatur

- Müller, A.: Bestimmung von Chinin in Lebensmitteln, SOP Nr. 1998/17, Praktikumsmethodensammlung, Universität Hamburg, Abteilung für Lebensmittelchemie
- Nuijens, J.M.; van der Velden, H.: Rapid fluorimetric determination of quinine in softdrinks, Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 153, 97-98 (1973)
- Textsammlung Lebensmittelrecht: Aromen-VO i.d.F vom 20.12.1993, C.H. Beck Verlag, München, 1998
- Schwedt, G.: Fluorimetrische Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 1981
- Maier, H.G.: Lebensmittel- und Umweltanalytik, Methoden und Anwendungen, Steinkopff Verlag, Darmstadt 1990

3.5 Pyknometrische Alkoholbestimmung

Grundlagen

Der Ethanolgehalt wird aus der Dichte bei 20 °C einer Alkohol-Wasser-Mischung oder eines Destillates ermittelt. Der Einfluss geringer Mengen eventuell vorhandener Begleitstoffe wie z.B. Methanol, 1-Propanol, 2-Propanol usw. bleibt unberücksichtigt. Sind größere Mengen (> 0,1%) vorhanden, müssen die Begleitstoffe ermittelt und bei der Berechnung des Ethanolgehaltes berücksichtigt werden.

Geräte

- Wasserbad mit Thermostat (20.0 ± 0.1 °C)
- Pyknometer, Inhalt 50 cm³ nach Reischauer
- Einfülltrichter für Pyknometer
- Destillationsapparatur

Durchführung

Probe: wird vom Assistenten ausgegeben

Bestimmung des Leerwertes (LW) des Pyknometers

Es ist eine Doppelbestimmung durchzuführen. Die Pyknometer werden zunächst gereinigt, äußerlich abgetrocknet und innerlich durch Ausblasen mit Luft oder Stickstoff getrocknet. Nachdem die Pyknometer 30 min im Waagenraum gestanden haben, werden sie verschlossen und leer gewogen (= Leerwert LW).

Bestimmung des Wasserwertes (WW) des Pyknometers

Die Pyknometer werden mittels Einfülltrichter mit frisch ausgekochtem Wasser von ca. 20 °C bis über die Marke aufgefüllt, verschlossen und 20 - 30 min bei 20 °C im Thermostaten temperiert. Sie werden dann aus dem Thermostaten genommen, wobei nur der obere, leere Teil des Halses anzufassen ist. Dann stellt man den unteren Rand des Meniskus auf die Marke ein und trocknet den Hals z.B. mit Filterpapier von innen ab. Die Pyknometer werden außen gut getrocknet, 20 - 30 min in den Waagenkasten gestellt und dann gewogen (Wasserwert WW). Der Wasserwert (WW) wird dreimal bestimmt und der Mittelwert der drei Wägungen gebildet.

Aus Leergewicht und Wasserwert lässt sich das Volumen (V) der Pyknometer berechnen:

$$V = \frac{WW - LW}{\rho_W - \rho_L}$$

Dabei wird die Dichte des Wassers (ρ_W) mit 998.20 kg/m³ und die Dichte der Luft (ρ_L) mit 1.2 kg/m³ angenommen.

Bestimmung des Alkoholgehaltes

Die zu untersuchende Lösung wird mittels Einfülltrichter in die Pyknometer bis über die Marke eingefüllt, verschlossen und 20 - 30 min bei 20 °C im Thermostaten temperiert. Die Pyknometer werden dann aus dem Thermostaten genommen, wobei nur der obere, leere Teil des Halses anzufassen ist. Dann stellt man den unteren Rand des Meniskus auf die Marke ein und trocknet den Hals von innen ab. Nun wird der Inhalt quantitativ in die Destillierkolben überführt und dreimal mit 5-10 mL Wasser nachgespült. Nach Zusatz von Siedesteinen und gegebenenfalls Entschäumer werden die Destillierkolben an die Destillierapparatur angeschlossen. Als Vorlage dienen die Pyknometer mit Einfülltrichter.

Es wird langsam unter guter Kühlung destilliert bis die Pyknometer ungefähr bis zum Ansatz der Halsverjüngung gefüllt sind. Nun wird mit Wasser bis kurz unter die Marke aufgefüllt und 20 - 30 min im Thermostaten temperiert. Die Pyknometer werden dann aus dem Thermostaten genommen und mit temperiertem Wasser auf die Marke eingestellt. Der Hals ist von innen abzutrocknen. Die Pyknometer werden von außen gut getrocknet, 20 - 30 min in den Waagenkasten gestellt und dann gewogen. Die Destillation und Wägung wird dreimal durchgeführt und der Mittelwert der drei Wägungen (WD) gebildet.

Hieraus lässt sich die Dichte des Destillates (ρ_D) berechnen:

$$\rho_D = \frac{WD - LW}{V} + \rho_L$$

Aufgrund der Dichte des Destillates lässt sich der Alkoholgehalt aus der „Amtlichen Alkoholtafel“ entnehmen. Er ist auf eine Dezimale gerundet in %vol anzugeben.

Anmerkungen

Pyknometer sind empfindliche Messinstrumente und erfordern eine pflegliche Behandlung. Sie sind stets sorgfältig zu reinigen. Die Trocknung muss bei Zimmertemperatur erfolgen. Erwärmung im Trockenschrank ist unzulässig!

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 37.00-1

Rauscher, K., Engst, R., Freimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1986.

3.6 Bestimmung der Kationen mit Flammenemissions- und Atomabsorptionsspektrometrie

Grundlagen

Jede Materie absorbiert nur Licht der Wellenlängen, die sie auch emittieren kann (Kirchhoff'sches Gesetz).

Gerät

Kombiniertes Atomabsorptionsspektrometer bzw. Flammenphotometer

Probenvorbereitung

Probe: Wasser (wird vom Assistenten ausgegeben)

Wird ein klares Wasser untersucht, so kann es direkt bzw. verdünnt eingesetzt werden. Trübe Wässer oder andere Proben müssen vor der Bestimmung der Kationen mineralisiert werden (siehe 3.1.1), ggf. muss ein Wasser vor einer qualitativen Prüfung auf ein geeignetes kleineres Volumen eingeeengt werden.

3.6.1 Flammenemissionsspektrometrische Bestimmung von Natrium und Kalium

Grundlagen

Bei der Flammenemissionsspektrometrie (FES) wird das Emissionsspektrum von angeregten Atomen gemessen. Regt man Atome thermisch oder elektrisch an, so senden diese aufgenommene Energie in Form eines Emissionsspektrums aus; durch die Verwendung eines Monochromators wird nur das Licht einer bestimmten Wellenlänge gemessen.

Die Probelösung wird z.B. in einer Flamme verdampft und die Salze dissoziieren zu einem geringen Teil in die Atome. Durch die Flamme werden ein Teil dieser Atome bzw. ihre Valenzelektronen angeregt und beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Energieniveau wird Licht emittiert. Diese Strahlungsenergie wird mittels eines Photomultipliers gemessen und über eine Kalibriergerade der Gehalt der Probe an dem untersuchten Metall bestimmt. Die Ionisation von Proben und Kalibrierstandards wird durch Zugabe von Lithiumsalzen zurückgedrängt, da diese sehr leicht in die Ionen zerfallen und durch den damit verbundenen Elektronen-„Überschuss“ das Ionisationsgleichgewicht des zu bestimmenden Elementes zum „Atom“ hin verschieben.

Chemikalien

Zum Herstellen der Stammlösungen können folgende Salze verwendet werden:

Für die Erstellung des Blindwertes und zur Verhinderung der Ionisation: LiCl p.a. (oder CaCl₂)

NaCl p.a. sicc.

KCl p.a.

Durchführung

Kalibrierstandards: alle Angaben in [$\mu\text{g/mL}$]

Kalium*	1	2	3	4
Natrium*	1	2	3	4

*Alle Kalibrierstandards sollten 0,5% (g/v) LiCl enthalten

Geräteeinstellungen

Element	Spalt [mm]	Wellenlänge [nm]
Kalium	0,5	764,9
Natrium	0,5	589,0

Auswertung

Die Auswertung erfolgt sowohl graphisch als auch rechnerisch durch lineare Regression!

Anmerkung

Vor der Inbetriebnahme und Messung erfolgt eine Einweisung am Gerät.

3.6.2 Atomabsorptionsspektroskopische Bestimmung von Eisen, Calcium, Magnesium, Mangan

(in Absprache mit dem Assistenten können statt der vier genannten abweichend andere Kationen bestimmt werden: z.B. Pb, Cd, Cu, Zn, Sr, Ba, Cr, Co, Ni, und evtl. andere, soweit AAS-Lampen vorhanden)

Grundlagen

Bei der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) wird die Resonanz-Absorption von Strahlungsenergie durch Atome gemessen. Die Probelösung wird z.B. in einer Flamme verdampft und die Salze dissoziieren zu einem geringen Teil in die Atome. Durch eine Hohlkathodenlampe, die das Metall enthält, das untersucht werden soll, wird Licht einer bestimmten Wellenlänge in die verdampfte Probe gestrahlt. Es erfolgt eine Anregung der Atome und damit verbunden eine Absorption/Schwächung des eingestrahlt Lichtes. Diese Schwächung der Strahlungsenergie wird mittels eines Photomultipliers gemessen. Aufgrund der Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes lässt sich der Gehalt der Probe mittels einer Kalibriergerade ermitteln.

Chemikalien

Zum Herstellen der Stammlösungen können folgende Salze verwendet werden:

CaCO_3 sicc. p.a.

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ p.a.

$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ p.a.

$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ p.a.

Die Stammlösungen sollten eine Konzentration von jeweils ca. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ des zu bestimmenden Metalls enthalten. Es muss darauf geachtet werden, dass nicht hygroskopische Substanzen verwendet werden und dass die Angabe des Hydratwassers stimmt; eine gute Möglichkeit ist auch, nur wasserfreie Substanzen zu verwenden und diese dann bei $100 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ zu trocknen und immer im Exsiccator aufzubewahren.

Durchführung

Kalibrierstandards*: alle Angaben in [$\mu\text{g}/\text{mL}$]

Calcium	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Eisen	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0
Magnesium	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0
Mangan	0,5	0,75	1,25	1,5	2,0

*Die Kalibrierstandards sollen verdünnte HCl enthalten.

Geräteeinstellungen

Element	Hohlkathoden-Lampe	Maximaler Lampenstrom	Spalt [mm]	Wellenlänge [nm]
Ca	Ca	6 mA	0,2 - 0,5	422,7
Fe	Fe	10 mA	0,2 - 0,5	248,3
Mg	Mg	4 mA	0,2 - 0,5	285,2
Mn	Mn	12 mA	0,2 - 0,5	279,5

Auswertung

Die Auswertung erfolgt rechnerisch durch lineare Regression!

Anmerkung

Vor der Inbetriebnahme und Messung erfolgt eine Einweisung am Gerät.

Zur Eliminierung von Matrixeinflüssen wird bei der AAS häufig mit der Standardadditionsmethode (siehe 3.4.1) gearbeitet.

3.7 Weitere Bestimmungen

Es ist auf die Einheitsmethoden zur Wasseruntersuchung und evtl. Jander Blasius „Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie“ oder „Einführung in das anorganisch chemische Praktikum“ zurückgreifen.

- Prüfung auf die Anwesenheit von Anionen (Chlorid, Fluorid, Nitrit, Nitrat, Hydrogencarbonat, Phosphat, Sulfat, Borat; in Absprache Silikat, Cyanid, Kieselsäure als SiO_2) mittels geeigneter Vorproben
- Quantitative Bestimmung von zwei der Anionen in Absprache mit dem Assistenten.
- Permanganatzahl (Oxidierbarkeit) oder Sauerstoffgehalt nach Winkler.
- Berechnung der Gesamthärte (aus Magnesium- und Calciumbestimmung), der Carbonathärte (aus Säurekapazität bis pH 4,3 vor CaCO_3 -Sättigung) und der Nichtcarbonathärte (Differenz).
- Diese und weitere Bestimmungen (Säurekapazität bis pH 4,3 nach CaCO_3 -Sättigung, Basenkapazität bis pH 8,2 vor CaCO_3 -Sättigung, Basenkapazität bis pH 8,2 nach CaCO_3 -Sättigung, können in Absprache mit dem Assistenten erforderlich sein, genaue Vorschriften und Berechnungsgrundlagen vom Assistenten erhältlich.
- Erstellen einer Ionenbilanz: Angabe aller in der Probe gefundenen Kationen und Anionen inkl. der Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen in mg/L bzw. g/L und in mmol/L bzw. mol/L. Diskussion der Ionenbilanz, v.a. im Hinblick auf die Ausgeglichenheit etc.

Literatur

- Maier, H.G.: Lebensmittel- und Umweltanalytik, Methoden und Anwendungen, Steinkopff Verlag, Darmstadt 1990
- Merck: Die Untersuchung von Wasser, E. Merck, Darmstadt
- Höll, K.: Wasser, Untersuchung, Beurteilung, Aufbereitung, 4. Auflage, Verlag Walter de Gruyter & Co, 1968
- Trinkwasserverordnung: Verordnung über die Beschaffenheit von Trinkwasser und Wasser für Lebensmittelbetriebe vom 5. Dezember 1990 in der jeweils gültigen Fassung

4 Einführung in die Chromatographie

4.1 Papier-, Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Die verschiedenen Aufgaben aus dem Bereich der Lebensmittel-Analytik sollen in die Technik der Papierchromatographie (PC), der Dünnschichtchromatographie (DC) und der Säulenchromatographie (SC) einführen. Der gesamte Themenkreis 8 (außer 2-dim.-Aminosäure-DC (hier Fleischextrakt)) wird an einer vom Assistenten ausgegebenen Probe durchgeführt.

Herstellung von DC-Platten

Die DC-Platten können im Praktikum selbst hergestellt werden: (Pulver beim Assistenten erhältlich). Vor der Beschichtung der Glasplatten (20×20 cm) müssen diese gründlich gereinigt werden. Die stationäre Phase wird mit Wasser oder Ethanol intensiv vermengt (z. B. Schütteln im Iodzahlkolben) und dann als Suspension mit einem Streichgerät (DESAGA; ist im Praktikumsatz (Labor 554) enthalten) möglichst gleichmäßig aufgetragen. Nach dem Trocknen an der Luft können die DC-Platten im Trockenschrank aktiviert werden. Dabei wird Wasser von den aktiven Zentren des Sorptionsmittels entfernt - die Trenneigenschaften des Systems ändern sich.

HINWEIS: Stäube von Substanzen, die als stationäre Phasen für DC-Platten verwendet werden, sind lungengängig. Daher ist bei der Herstellung von DC-Platten und beim Umgang mit ihnen auf Sorgfalt und Sauberkeit zu achten.

Kieselgel

50 g Kieselgel 60 G oder Kieselgel 60 GF₂₅₄ für die DC (MERCK) werden mit 100 mL dest. Wasser zu einer homogenen Suspension vermengt. Es werden 5 Glasplatten mit einer Schichtdicke von ca. 300 µm bestrichen. Die Platten sollten 20 Minuten an der Luft trocknen, dann 30 Minuten im Trockenschrank bei 105 °C aktiviert und anschließend im Exsikkator gelagert werden.

Polyamid

15 g Polyamid DC-6 oder Polyamid DC-6 UV₂₅₄ zur DC (Macherey & Nagel) werden mit 65 mL Ethanol zu einer homogenen Suspension vermengt. Es werden 5 Glasplatten mit einer Schichtdicke von ca. 300 µm bestrichen. Nach dem Trocknen an der Luft können die Platten 10 Minuten im Trockenschrank bei 70 °C aktiviert werden - dann im Exsikkator aufbewahren.

Cellulose

5 g Cellulosepulver MN 300 für die DC (MACHEREY & NAGEL) werden mit 90 mL dest. Wasser zu einer homogenen Suspension vermengt. Es werden 5 Glasplatten mit einer Schichtdicke von ca. 300 µm bestrichen. Nach 10 Minuten Trocknen bei 105 °C sind die Platten gebrauchsfertig.

Probenaufgabe

Die zur DC eingesetzten Lösungen sollten 0,01 - 1 % des jeweiligen Analyten in einem möglichst flüchtigen Lösungsmittel enthalten. Die Untersuchungslösungen sollten in mehreren kleinen Anteilen nacheinander aufgetragen werden, wobei vor dem erneuten Auftragen jeweils getrocknet werden sollte - dabei ist ein Fön hilfreich. Die Lösungen müssen in gleichem Abstand (ca. 15 mm) vom unteren Rand der DC-Platte aufgetragen werden und dabei möglichst kleine Substanzflecken (\varnothing 3 mm) ergeben. Es sollten nicht viel mehr als 12 Proben auf einer 20 cm langen Platte aufgetragen werden um Ineinanderlaufen zu verhindern; es muss unbedingt verhindert werden dass sich das Plattenmaterial auflöst und Löcher die die Chromatographie beeinflussen entstehen; mehr als ca. 25 μ L (abhängig von Lösungsmittel / stat. Phase) sollten nicht aufgetragen werden.

Zum Auftragen können Einmal-Mikropipetten verschiedener Volumina oder „DC-Spritzen“ (10- μ L-Spritzen mit stumpfer Kanüle) eingesetzt werden.

Entwicklung

Es gibt verschiedene Methoden, mit denen man DC-Platten entwickeln kann. Im Praktikum ist eine Methode gängig, bei der die Platte senkrecht in die DC-Kammer gestellt wird und das Laufmittel „aufsteigt“. Die DC-Kammer sollte höchstens einen Zentimeter hoch mit Laufmittel gefüllt werden.

Vor der Entwicklung der ersten DC-Platte sollten mindestens 30 Minuten bis zur Äquilibrierung des Gasraumes verstreichen. Fließmittel müssen nach spätestens einem Tag bzw. einigen Läufen frisch angesetzt werden! (Veränderung der Zusammensetzung!). Um bessere Fließgeschwindigkeiten zu erreichen, ist es sinnvoll, die Kammer mit Filterpapier auszukleiden, welches mit dem Lösungsmittel getränkt ist. Es kann auch sinnvoll sein (Zucker-DC) die Platte einfach eine begrenzte Zeit (sonst zu starke Diffusionserscheinungen!) „überlaufen“ zu lassen bzw. nach Zwischentrocknen noch mal im selben oder anderen Fließmittel laufen zu lassen.

Die Laufstrecke sollte, je nach Trennproblem, 5 - 15 cm betragen. Die benötigte Zeit ist unter anderem vom Sorptionsmittel, der Schichtdicke und der Laufmittel-Zusammensetzung abhängig. Ist die Entwicklung abgeschlossen, wird die (gesamte) Laufmittelfront markiert, die DC-Platte aus der Kammer genommen und bis zur Trockne unter einem Abzug oder in einem Trockenschrank (Warnhinweis anbringen!) belassen. Bei einer Mehrfach-Entwicklung muss die DC-Platte ebenfalls nach jeder Entwicklung vollständig getrocknet werden.

Da viele der zur Entwicklung eingesetzten Lösungsmittel flüchtig sind, sollte der Deckel der DC-Kammer stets geschlossen bleiben. Nachts sind die Lösungsmittelkammern in geschlossene Abzüge zu stellen!

Es sollten ggf. weitere im Skript nicht angegebene Systeme ausprobiert werden (bes. bei Farbstoffen bei speziellen Trennproblemen) siehe dazu Lit.: Stahl, Matissek etc..

Detektion

Die Lage der Substanzflecken kann prinzipiell durch folgende Möglichkeiten bestimmt werden: Die Eigenfärbung der Substanzen, ihre Eigenfluoreszenz, die Fluoreszenzlöschung (bei Platten mit Fluoreszenzindikator) und die Detektion mit Sprühreagenzien. Welche Methode angewandt wird, ist von der jeweiligen Anwendung abhängig. Es bietet sich jedoch an, auch Platten, die mit Detektionsreagenzien besprüht werden sollen, vorher unter UV-Licht zu betrachten.

Anmerkung: Es ist bei der Interpretation der Platten darauf zu achten, wie selektiv aufgearbeitet wurde und wie selektiv das verwendete Detektionsmittel ist (vgl. hierzu Lit.: Jork, Funk, Fischer, Wimmer – dort auch genaue Vorschriften zur Herstellung bestimmter Detektionsmittel).

VORSICHT: Viele der genutzten Sprühreagenzien sind Gefahrstoffe!

Identifizierung (qualitative Analyse) Die Identifizierung von Verbindungen erfolgt durch Vergleich der R_f -Werte mit denen von Vergleichssubstanzen, welche auf der gleichen Platte mit aufgetragen werden. Positive Befunde werden durch Dotierung der Probe mit der entsprechenden Vergleichssubstanz bestätigt. Die Dotierung erfolgt durch Auftragen der Probe und des Vergleiches auf demselben Punkt der DC. Dabei ist das Auftragevolumen der dotierten und undotierten Probe identisch zu wählen. Trennen sich die beiden Substanzen nicht, so gilt der Befund als bestätigt.

Dokumentation

Auf einer entwickelten DC-Platte werden Startpunkte, Laufmittelfront und alle detektierten Spots mit einem weichen Bleistift (Vorsicht bei Cellulose!) markiert. Die DC-Platte wird dann z.B. auf Transparentpapier in Originalgröße dargestellt oder eingescannt (möglichst zeitnah, manche Detektionen verblassen sehr schnell). Chromatographie-Bedingungen wie stationäre Phase, mobile Phase, Detektionsmethode sowie Auftragsmengen und Konzentrationen der aufgetragenen Lösungen müssen bei der Dokumentation aufgezeichnet und im Anhang zu jedem Chromatogramm angegeben werden.

Abschätzen der Nachweisgrenze und Berechnung eines abgeschätzten Gehaltes

Siehe Punkt 5.2.3 „Vorschlag zur Berechnung einer abgeschätzten Nachweisgrenze“



Literatur

- Gritter, R. J., Bobbitt, J. M., Schwarting, A. E.: Einführung in die Chromatographie. Springer Verlag, Berlin 1987
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H.: Dünnschicht-Chromatographie. VCh Verlagsgesellschaft, Weinheim 1989
- Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie. Springer-Verlag, Berlin 1967
- Abbott, D., Andrews, R. S.: Chromatographische Methoden. Umschau Verlag, Frankfurt/M. 1973
- Otto, M.: Analytische Chemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1995
- Schwedt, G.: Chromatographische Trennmethode. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1986

4.1.1 Identifizierung wasserlöslicher Lebensmittelfarbstoffe

Grundlagen

Die wasserlöslichen Farbstoffe werden nach Ansäuern eines wässrigen Probenextraktes an einen dicken Wollfaden (farbstofffreie Strickwolle o.ä.) oder an Polyamidpulver adsorbiert. Nach Desorption der Farbstoffe mit ammoniakalischer Lösung erfolgt die dünn- oder papierchromatographische Trennung an Cellulose-Platten bzw. Chromatographiepapier. Aufgrund ihrer Eigenfärbung sind die Farbstoffe direkt erkennbar (Allerdings: Es können sich Mischfarben bilden und die Farbqualität ist z.T. konzentrationsabhängig!).

Durchführung

Probenvorbereitung

30 - 50 mL wässriger Probenextrakt werden mit 5 mL 10%iger Kaliumhydrogensulfatlösung ($pK_s = 1,96$) angesäuert. Zur Isolierung der wasserlöslichen Farbstoffe wird a) nach der Wollfadenmethode oder b) nach der Polyamidmethode verfahren. Abhängig vom Lebensmittel bzw. der Probenmatrix können umfangreichere Aufarbeitungen erforderlich sein.

Proteinhaltige Lebensmittel: Die Probe wird zunächst mit methanolischer Ammoniaklösung (25%iges NH_3 Methanol, 5/95 v/v) extrahiert (Hinweis: bei Proben, welche auch Fette enthalten, muss zuvor eine Entfettung mit Petrolether erfolgen). Der Ansatz wird zentrifugiert und der klare gefärbte Überstand in eine Porzellanschale dekantiert. Das Lösungsmittel wird unter leichtem Erwärmen abgedampft und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Die Lösung wird mit 10%iger Kaliumsulfatlösung angesäuert (pH-Wert prüfen!). Weiter nach a) oder b).

Fetthaltige Lebensmittel: Die Probe wird zunächst mit Petrolether entfettet und anschließend mit heißem Wasser behandelt. Der wässrige Extrakt wird mit 10%iger Kaliumsulfatlösung angesäuert (pH-Wert prüfen!). Weiter nach a) oder b).

Kohlenhydrathaltige Lebensmittel: Ein wässriger Probenextrakt wird mit 10%iger Kaliumsulfatlösung angesäuert. Der Extrakt muss deutlich sauer sein, anderenfalls tritt bei der weiteren Isolierung eine störende Karamelisierung der Zucker auf. Nach Zentrifugation wird der klare gefärbte Überstand abdekantiert. Weiter nach a) oder b). Für stärkehaltige Lebensmittel ist die Aufarbeitung für proteinreiche Lebensmittel (Stärkefällung mit Methanol) geeigneter.

a) Wollfadenmethode

Die etwa 10 cm langen, weißen, Wollfäden werden in der Soxhlet-Apparatur mit Petrolether entfettet (25 - 30 Abläufe), an der Luft getrocknet, dann im Becherglas 1 h mit 5%iger Ammoniaklösung unter häufigem Rühren auf ca. 80 °C erwärmt, gründlich mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet.

Die Adsorption der Farbstoffe erfolgt durch Kochen des angesäuerten Extraktes mit mehreren entfetteten Wollfäden im bedeckten Becherglas für 10 min. Die Wollfäden werden mehrmals mit

Wasser gewaschen. Durch Erwärmen in 25%igem Ammoniak/Methanol (5/95, v/v) für 30 min werden die Farbstoffe von der Wolle desorbiert. Diese Lösung wird auf dem Wasserbad oder am Rotationsverdampfer auf 0,5 - 1 mL eingeeengt und zur chromatographischen Trennung eingesetzt.

Malachitgrün und Brillantgrün lassen sich nur mit verdünnter Essigsäure ($pK_s = 4.75$) vom Faden ablösen. Rhodamin B färbt nicht auf Wolle auf. Die Anwesenheit synthetischer Farbstoffe (früher Anilin- oder Teerfarbstoffe), wie Azo- oder Triphenylmethanfarbstoffe, kann nach der Desorption der Farbstoffe und nach Vertreiben des Ammoniaks durch „Umfärben“ nachgewiesen werden, da diese Farbstoffe auch aus schwach saurer Lösung an Wollfäden adsorbieren. Es wird mit Weinsäure ($pK_{s1} = 2.98$) angesäuert und erneut 10 min mit Wollfäden im bedeckten Becherglas gekocht.

b) Polyamidmethode

Die Adsorption der Farbstoffe erfolgt durch kurzes Aufkochen des angesäuerten Extraktes mit ca. 1 g Polyamidpulver. Es wird 10 min stehengelassen. Die Suspension wird z.B. in eine Pasteurpipette (oder Glassäule mit Hahn), welche mit wenig Glaswolle oder Watte nach unten verschlossen wurde, überführt.

Anschließend wird mit heißem dest. Wasser (10 - 20 mL) und zweimal mit 5 mL Methanol gewaschen. Die Desorption der Farbstoffe erfolgt mit 25%igem Ammoniak/Methanol (5/95, v/v). Das Eluat wird auf dem Wasserbad oder am Rotationsverdampfer auf 0,5 - 1 mL eingeeengt und zur chromatographischen Trennung eingesetzt.

Chromatographiebedingungen (nur für allgemeinen Überblick ausreichend)

Methode:	Dünnschichtchromatographie (Papierchromatographie)
Trennproblem:	Diverse wasserlösliche Lebensmittelfarbstoffe
Stationäre Phase:	Cellulose (oder Chromatographiepapier)
Mobile Phase:	2.5%ige Natriumcitratlösung /25%iges Ammoniak (4/1, v/v)
Vergleichslösungen:	0,1 - 0,15 %ig in Wasser (Substanzen siehe unten)
Aufgabevolumen:	bis gut sichtbar
Detektion:	Eigenfärbung

Anmerkung:

Die Farbstoffe sind chemisch unterschiedlichste Verbindungen! Es gibt kein System dass alle Farben, Farbstoffarten (fett- /wasserlösliche, synthetische/natürliche) einwandfrei trennen wird; es ist im Vorfeld zu planen welches System die gewünschten Trennungen bestmöglich erzielen kann (siehe SOPs auf der LC-Homepage oder diverse DC-Bücher, (z.B. DGF-Ringbuch für Farbstoffe, Stahl, Matissek etc.) und bereits durchgeführte Trennungen anderer Studenten) auch im Hinblick auf das Sparen von DC-Platten!

Verwendete Farbstoffe

Alicerin Brillant Violett	
Allurarot AC	E 129
Alpha Naphtholorange	
Amaranth	E 123
Annatto/Bixin/Norbixin	E 160b
Azorubin/Carmoisin	E 122
Blütenorange	
Brillantblau FCF	E 133
Brillantblau R/Serva Blue R	
Brillantschwarz PN	E 151
Buttergelb/Methylgelb	
Caramelbraun G	
Carotin	E 160a
Ceresorange/Sudanorange G	
Ceresrot	
Chinolingelb	E 104
Chlorophylle und Chlorophylline	E 140
Cochenillerot A/Ponceau 4R	E 124
Curcumin	E 100
Echtes Karmin	E 120
Echtgelb AB	
Echtgrün FCF	
Eisenoxide und Eisenhydroxide	E 172
Erythrosin	E 127
Fuchsin basisch	
Gelb extra	
Gelborange S	E 110
Grün S	E 142
Grüngelb,fluoreszierend	
Hellgelb extra	
Indigo/Indigoblau	
Indigotin/Indigocarmin	E 132
Kupferkomplexe der Chlorophylle und Chlorophylline	E 141
Lichtgrün SF	
Litholrubin BK	E 180
Lutein	E 161b
Methylviolett B	
Naphtholgrün B	
Patent Blue VF oder Disulfonblau VN 150	
Patentblau A/Acid Blue No. 7	
Patentblau V	E 131
Pflanzenkohle	E 153
Phloxin B/Pyranine	
Ponceau 6R/Acid Leather	
Riboflavine	E 101
Rot 2G/Brillantrosa	
Säurefuchsin	
Serva Violett 17	
Sudan Blau II	
Sudan Rot G	
Tartrazin	E 102
Thioninacetat	
Titangelb	

Tropaeolin O	
Türkis extra	
Ultramarinviolett	
Uranin/Fluorescein-Natrium	
Viktoriablau B	
Zuckerulör	E 150a

Weitere zugelassene Farbstoffe lt. Verordnung über Lebensmittelzusatzstoffe (Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008): weitere Zuckerulöre (E 150b-c), Braun HT (E 155), Paprikaextrakt (E 160c), Lycopin (E 160 d), Beta-apo-8'-Carotinal (E 160e), Canthaxanthin (E 161g), Betanin (E 162), Anthocyane (E 163), Calciumcarbonat (E 170), Titandioxid (E 171), Aluminium (E 173), Silber (E 174), Gold (E 175).

Achtung! Farbstoffe können viele unterschiedliche Namen haben! Eine eindeutige Nomenklatur ist nur nach IUPAC oder mittels der Colour Indices (CI...) möglich, für erlaubte Lebensmittel-Farbstoffe die E-Nummern, aber eine Angabe wie „C 5“ ist nicht eindeutig!

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 26.11.03-14

Arata, N.: Z. Anal. Chem. **28**, 639 (1889)

Lehmann, G.; Eich, H. (Hrsg.): Anleitung zur Abtrennung und Identifizierung von Farbstoffen in gefärbten Lebensmitteln, Farbstoff-Kommission (DFG), Mitteilung XIV, H. Boldt Verlag, Boppard 1980

Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie, 2. Auflage, Springer, Berlin 1967, S. 588 ff.

Matissek, R.; Schnepel, F.-M.; Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer, Berlin 1992

4.1.2 Identifizierung fettlöslicher Lebensmittelfarbstoffe

Grundlagen

Die fettlöslichen Farbstoffe werden mit Aceton und Petrolether aus der Probe extrahiert. Die Abtrennung von Lipiden erfolgt säulenchromatographisch an Aluminiumoxid. Die Farbstoffe werden auf Kieselgel-Platten dünnschichtchromatographisch getrennt.

Durchführung

Probenvorbereitung

Es werden 10 - 20 g der Probe mit ca. 50 mL Aceton unter Rühren extrahiert. Nach Filtration wird mit 10 mL dest. Wasser versetzt und das Aceton am Vakuumrotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wird die wässrige Lösung dreimal mit je 20 mL Petrolether ausgeschüttelt. Die vereinigten Petroletherphasen werden über eine Aluminiumoxidsäule gereinigt.

Herstellung der Aluminiumoxidsäule

In ein Mikrochromatographierohr mit Fritte (Länge ≥ 15 cm, Innen- \emptyset 7 - 10 mm) wird etwas Petrolether gegeben. Der Ablaufhahn wird zur Entfernung von Luftblasen kurz geöffnet, wobei die Fritte mit Petrolether bedeckt sein soll. Eine Aufschlämmung von getrocknetem Natriumsulfat in Petrolether wird bis zu einer Schichthöhe von ca. 2 cm in die Säule überführt. Am Säulenrand haftendes Natriumsulfat wird mit wenig Petrolether heruntergespült. Durch Öffnen des Ablaufhahnes wird soviel Petrolether abgelassen, dass die Natriumsulfatschicht bedeckt bleibt. Anschließend wird mit der gleichen Schlämntechnik eine ca. 10 cm hohe Schicht von Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe II nach Brockmann, Lit. s. Schwedt et al.) und darüber wieder eine etwa 2 cm hohe Natriumsulfatschicht gegeben.

Reinigung der Probenlösung

Der Petroletherspiegel in der Säule wird bis zur Oberfläche der Packung abgelassen. Der Probenextrakt (in Petrolether) wird auf die stationäre Phase gegeben. Ist die Probenlösung vollständig eingesickert, wird die Säule mit ca. 30 mL Petrolether gewaschen, um die Lipide zu entfernen. Die Farbstoffe werden mit 96%igem Ethanol eluiert. Das Eluat wird auf 0,5 - 1 mL eingengt und zur dünnschichtchromatographischen Trennung eingesetzt.

Anmerkungen

Zur Extraktion

Der Acetonextrakt enthält die fettlöslichen und gegebenenfalls Reste wasserlöslicher Farbstoffe, die nach Ausschütteln mit Petrolether in der wässrigen Phase verbleiben. Nach Ansäuern auf pH 5 - 6 können aus dieser die wasserlöslichen Farbstoffe mit der unter 4.1.1 beschriebenen Methode analysiert werden.

Zur Säulenchromatographie

Die Oberfläche des Säulenmaterials sollte nicht trockenlaufen. Zu achten ist auf waagerechte Grenzschichten zwischen Aluminiumoxid und Natriumsulfat.

Falls einzelne Farbstoffe säulenchromatographisch getrennt werden sollen, ist eine möglichst schmale Probenaufgabezone erforderlich. Hierzu können die Petroletherextrakte vor der Aufgabe eingengt werden, um eine konzentrierte Probenlösung zu erhalten. Beim Waschen mit Petrolether kann Buttergelb eluiert werden.

Chromatographiebedingungen (nur für allgemeinen Überblick ausreichend)

Methode:	Dünnschichtchromatographie
Trennproblem:	Diverse fettlösliche Lebensmittelfarbstoffe
Stationäre Phase:	Kieselgel 60 G
Mobile Phase:	Dichlormethan (Kammersättigung)
Vergleichslösungen:	0,1 – 0,15%ig in 96%igem Ethanol oder Dichlormethan (siehe oben)
Aufgabevolumen:	bis gut sichtbar
Detektion:	Eigenfärbung

Literatur

Farbstoff-Kommission der DFG (Hrsg.): Farbstoffe für Lebensmittel, Loseblatt-Sammlung, H. Boldt Verlag, Boppard 1978

Lehmann, G.; Eich, H. (Hrsg.): Anleitung zur Abtrennung und Identifizierung von Farbstoffen in gefärbten Lebensmitteln, Farbstoff-Kommission (DFG), Mitteilung XIV, H. Boldt Verlag, Boppard 1980

Matissek, R.; Schnepel, F.-M.; Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer, Berlin 1992

Montag, A.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **116**, 413 (1961)

4.1.3 Identifizierung von Antioxidantien

Grundlagen

Mit einem Lösungsmittelgemisch aus Ethanol, 2-Propanol und Acetonitril werden die Antioxidationsmittel aus der Probe extrahiert. Nach dem Ausfrieren der Begleitstoffe werden die Anti-oxidationsmittel dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel getrennt und können mit verschiedenen Sprühreagenzien detektiert werden.

Durchführung

Probenvorbereitung

5 g der Probe werden mit 10 g Natriumsulfat verrieben und in einem Zentrifugenglas dreimal mit je 25 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Ethanol/2-Propanol/Acetonitril (25/25/50, v/v/v) extrahiert. Nach jeder Zugabe des Lösungsmittelgemisches wird die Suspension gut durchmischt und anschließend 10 min zentrifugiert. Die organischen Phasen werden über einen Faltenfilter filtriert, in einem Jodzählkolben gesammelt und verschlossen 2 h bei -18 °C gekühlt. Der Extrakt wird dann über einen Faltenfilter dekantiert, wobei zuerst möglichst wenig der lipophilen Phase in den Filter gelangen sollte, und das Lösungsmittelgemisch am Vakuumrotationsverdampfer bei 30 °C abdestilliert. Der Rückstand wird in 1 mL Ethanol aufgenommen (eventuell kurz im Ultraschallbad lösen).

Chromatographiebedingungen

Methode:	Dünnschichtchromatographie
Trennproblem:	Nordihydroguaiaret-Säure (NDGA), Propylgallat (PG), Octylgallat (OG), Dodecylgallat (DG), Butylhydroxyanisol (BHA), Butylhydroxytoluol (BHT), Ascorbylpalmitat, Tocopherol
stationäre Phase:	Kieselgel 60 G
mobile Phase:	Toluol/ Eisessig (80/20, v/v)
Vergleichslösung:	0,2%ig in Aceton
Aufgabevolumen:	5 μ L
Detektion:	a) mit 20%iger Lösung von Molybdätosphorsäure in Ethanol besprühen, ca. 1,5 min warten und dann mit NH_3 begasen (blaue Flecken) oder b) mit 2%iger Lösung von 2,6-Dichlorchinonchlorimid in Ethanol besprühen und die Platte dann vorsichtig mit NH_3 begasen (verschiedenfarbige Flecken) oder c) mit 1%iger Lösung von Cer(IV)-sulfat in 5N Schwefelsäure besprühen und trocknen lassen, mit einer 2%igen Lösung von 2-Hydrazono-2,3-dihydro-3-methylbenzothiazolhydrochlorid in Wasser besprühen (verschiedenfarbige Flecken)

Anmerkungen

Zum Begasen der besprühten Platte wird diese im Abzug über einer offenen Ammoniak-Flasche geschwenkt.

Einige Antioxidantien (Tocopherole, Ascorbylpalmitat) werden durch das Ausfrieren teilweise mit ausgefällt. Dieser Aufarbeitungsschritt eignet sich daher nur bedingt für solche Analyten.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 00.00-11

Matissek, R.; Schnepel, F.-M.; Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer, Berlin 1992

Praktikumsmethodensammlung Nr. 1995/02

4.1.4 Identifizierung von Süßstoffen sowie Vanillin und Ethylvanillin

Grundlagen

Die Substanzen werden durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Essigsäureethylester aus dem Lebensmittel isoliert und auf Polyamid dünnenschichtchromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgt durch Betrachtung unter UV-Licht nach Besprühen mit einer Dichlorfluorescein-Lösung.

Durchführung

5 - 10 g Probe werden in ca. 20 mL Wasser suspendiert. Wenn nötig, wird mit Kaliumhydrogensulfat oder Weinsäure auf $\text{pH} < 3$ angesäuert. Nach Überführen in einen Scheidetrichter wird dreimal mit je 20 mL Essigsäureethylester (alternativ: Methanol) ausgeschüttelt. Die Essigesterphasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und durch Natriumsulfat filtriert. Die Lösung wird am Vakuumrotationsverdampfer bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Trockne gebracht und der Rückstand mit 1 mL Methanol/ Wasser (1/1, v/v) aufgenommen.

Chromatographiebedingungen

Methode:	Dünnschichtchromatographie
Trennproblem:	Süßstoffe (z.B. Saccharin, Dulcin, Cyclamat, Acesulfam K) sowie Vanillin und Ethylvanillin
stationäre Phase:	Polyamid
mobile Phase:	Xylol/1-Propanol/Eisessig/Ameisensäure (45/6/7/2, v/v/v/v)
Vergleichslösung:	0,2%ig in Wasser/Methanol (1/1, v/v)
Aufgabevolumen:	5-10 μL
Detektion:	nach dem Trocknen mit einer 0,2%igen Lösung von Dichlorfluorescein in Ethanol besprühen, vor und nach dem Besprühen unter UV-Licht betrachten

Anmerkungen

Von fetthaltigen Lebensmitteln wird durch Aufkochen der Probe mit Wasser und heißer Filtration ein wässriger Extrakt hergestellt.

Aspartam ist mit dieser Detektion nicht nachweisbar. Für diesen Süßstoff kann die Detektion nach 4.2.2 verwendet werden.

Literatur

Matissek, R.; Schnepel, F.-M.; Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer, Berlin 1992

4.1.5 Identifizierung von Konservierungsstoffen

Grundlagen

Die Konservierungsstoffe werden mittels Flüssig-Flüssig Extraktion durch ein Petrolether/Ether-Gemisch aus dem Lebensmittel im sauren Milieu ($\text{pH} < 3$) extrahiert. Anschließend werden sie auf Polyamid F₂₅₄ dünn-schichtchromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgt durch Fluoreszenzlöschung bei Betrachtung unter UV-Licht.

Durchführung

Ca. 1 g Probe wird mit 4 g Kieselgel für die Säulenchromatographie verrieben und in die Säule gefüllt. Es wird mit 40 mL eines 1:1-Gemisches aus Petrolether und Diethylether eluiert. Das Ethergemisch wird mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in 4 mL Ethanol aufgenommen.

Chromatographiebedingungen

Methode:	Dünnschichtchromatographie
Trennproblem:	Sorbinsäure, Benzoesäure, Chlorbenzoesäure, p-Hydroxybenzoesäureester (Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Butyl-) p-Hydroxybenzoesäure, Salicylsäure, 2-Phenoxyethanol und Phenoxypropan-2-ol
stationäre Phase:	Kieselgel 60 F 254
mobile Phase:	Petrolether (40/60) / Dichlormethan / Ameisensäure/ Eisessig (50/60/8/2; v/v/v/v)
Vergleichslösung:	je 0,2 % bzw. 0,5 % ^(*) in Aceton
Aufgabevolumen:	5 μL der Standards / 10 μL der Probenaufarbeitung
Detektion:	nach dem Trocknen unter UV-Licht betrachten

Anmerkungen

Statt der hier beschriebenen Lösungsmittelextraktion kann bei wasserdampf-flüchtigen Konservierungsstoffen zur Isolierung auch die Wasserdampfdestillation angewandt werden (W. DIEMAIR und W. POSTEL, 1967).

Zur photometrischen Quantifizierung kann es erforderlich sein, Ester und Säuren zu trennen. Dies ist möglich, indem man den mit Wasser neutral gewaschenen organischen Probenextrakt zunächst mit 0,05 M Natriumhydrogencarbonatlösung I ($\text{pH} \sim 8,4$; Abtrennung der Säuren) und anschließend mit 0,1 M Natriumhydroxidlösung II (Abtrennung der phenolischen Ester) extrahiert. Nach Ansäuern mit Schwefelsäure (20 %) werden die Konservierungsstoffe aus den Lösungen I und II mit dem Extraktionsgemisch extrahiert und weiter wie oben beschrieben (waschen, trocknen, einengen, aufnehmen in Ethanol) behandelt.



Die ethanolische Lösung des Rückstandes kann auch zur photometrischen Bestimmung der Konservierungsstoffe verwendet werden.

Literatur

- Courtial, W.: Die spektralphotometrische Bestimmung der Konservierungsstoffe Sorbinsäure, Benzoessäure und PHB-Ester, Dt. Lebensm. Rundschau, 66, 220-223 (1970).
- Diemair, W., Postel, W.: Nachweis und Bestimmung von Konservierungsstoffen in Lebensmitteln, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1967.
- Frede, W.: Konservierungsstoffe in Lebensmitteln in Fresenius, W., Günzler, H. Huber, W., Kelker, H., Lüderwald, I., Tölg, G., Wisser, H. (Hrsg.): Analytiker-Taschenbuch, Band 7, Springer-Verlag Berlin, 1988
- Rauscher, K., Engst, R., Freimuth, U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB Fachbuchverlag Leipzig (1986).

4.1.6 Identifizierung von Zuckern

Grundlagen

Die Zucker werden mit einem Ethanol/Wasser-Gemisch aus der Probe extrahiert. Nach Zentrifugieren und Filtration erfolgt die dünnschichtchromatographische Trennung an Kieselgel bzw. die papierchromatographische Trennung. Zur Detektion werden die Zucker mit Sprühreagenzien zu Verbindungen unterschiedlicher Farben umgesetzt. Es werden Monosaccharide, Disaccharide und Oligosaccharide erfasst.

Durchführung

Probenvorbereitung

Etwa 5 g Probe werden unter Rühren im Wasserbad mit 50 mL 70%igem Ethanol heiß extrahiert. Das Unlösliche wird abzentrifugiert, anschließend wird filtriert und das Filtrat gegebenenfalls am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Diese Lösung wird zur dünnschicht-chromatographischen und zur papierchromatographischen Identifizierung eingesetzt.

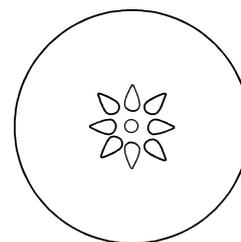
a) dünnschichtchromatographische Identifizierung

Chromatographiebedingungen

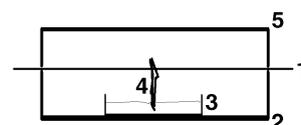
Methode:	Dünnschichtchromatographie
Trennproblem:	Mono- und Oligosaccharide (z.B. Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Maltose, Lactose, Xylose, Raffinose, Mannose)
Stationäre Phase:	Kieselgel 60 G
Mobile Phase:	a) Acetonitril/Wasser (85/15, v/v) oder b) Ethylacetat/Methanol/Wasser (68/23/9, v/v/v) oder c) Dichlormethan/Eisessig/Wasser (30/35/5, v/v/v)
Vergleichslösungen:	1%ig in Ethanol/Wasser (70/30, v/v)
Aufgabevolumen:	5 - 10 µL
Detektion:	Diphenylamin (2%ig in Ethanol)/p-Anisidin (2%ig in Ethanol)/ 85%ige Phosphorsäure (10/10/2, v/v/v); nach Besprühen auf 120 °C erwärmen (2 - 15 min), bis die Flecken sichtbar werden

b) papierchromatographische Identifizierung Entwicklung

Verwendet werden Rundfilter nach POTTERAT für die Papierchromatographie. Die Proben bzw. Standards werden jeweils an den engsten Stellen zwischen den hinkelsteinförmigen Ausschnitten aufgetragen. Der Rundfilter (1) wird auf einen geeigneten Behälter (2), z.B. eine große Petrischale, gelegt. Die mobile Phase befindet sich in einem Reservoir (3), z.B. eine kleine Petrischale, auf dem Boden des Behälters. Der Kontakt zwischen Rundfilter und mobiler Phase wird durch einen Wollfaden oder einen zusammengerollten Filter (4) hergestellt, welcher in das zentrale Loch des Rundfilters gesteckt wird und in die mobile Phase eintaucht. Auf den Rundfilter wird ein Deckel (5), z.B. eine umgedrehte Petrischale, aufgesetzt. Die Entwicklung dauert ca. 14-18 Std. und sollte daher über Nacht durchgeführt werden.



PC-Rundfilter nach
POTTERAT



Kammer für die Papier-
chromatographie

Chromatographiebedingungen

Methode:	Papierchromatographie, circular
Trennproblem:	Mono- und Oligosaccharide (z. B. Glucose, Fructose, Galactose, Maltose, Saccharose, Lactose)
Stationäre Phase:	Rundfilter nach POTTERAT für die Papierchromatographie
Mobile Phase:	n-Propanol/Ethylacetat/Wasser (65/10/25, v/v/v)
Vergleichslösungen:	1%ig in Ethanol/Wasser (70/30, v/v)
Aufgabevolumen:	5 - 10 μ L
Detektion:	Diphenylamin (2%ig in Ethanol)/p-Anisidin (2%ig in Ethanol)/85%ige Phosphorsäure (10/10/2, v/v/v); nach Besprühen 2 - 15 min auf 100 °C erwärmen

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 44.00-5

Matissek, R.; Schnepel, F.-M.; Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2.Auflage, Springer, Berlin 1992

Merck (Hrsg.): Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, Darmstadt 1984

4.1.7 Identifizierung von Phosphaten

Grundlagen

Die Phosphate werden mit Wasser aus der Probe extrahiert und mittels Papierchromatographie bestimmt. Die Detektion erfolgt durch Reduktion mit Aminonaphtholsäure und Natriumbisulfit als Phosphomolybdänblau.

Durchführung

Probenvorbereitung

50 g homogenisierte Probe werden im Wasserbad bei 40 °C mit 15 mL Wasser und 10 g Trichloressigsäure zur Proteinfällung bei proteinreichen Lebensmitteln versetzt. Bis zur Abscheidung des Serums wird der Ansatz im Wasserbad stehengelassen. Das Serum wird durch einen schwach angefeuchteten Filter filtriert, das Filtrat wird direkt zur Chromatographie eingesetzt.

Chromatographiebedingungen (siehe auch 4.1.6)

Methode:	Papierchromatographie, circular
Trennproblem:	Phosphate, höhere Homologe
stationäre Phase:	Cellulose (Rundfilter Schleicher & Schüll SS 2043b)
mobile Phase:	2-Propanol Wasser / 0,1 N EDTA/ 20%ige Trichloressigsäure / 25%iges Ammoniak (71/5/4/20/0,15, v/v/v/v/v)
Vergleichslösung:	0,5%ig in Wasser
Aufgabevolumen:	10 µL der Probe, Standardlösungen 5 µl
Detektion:	Besprühen mit 7,5%iger Ammoniummolybdät-Lösung und Salpetersäure (c = 14 mol/L) (9/1, v/v) und bei 105 °C im Trockenschrank die Salpetersäure restlos entfernen, anschließend mit einer Mischung aus 0,6 g Aminonaphtholsulfonsäure in 195 mL 15%iger Natriumbisulfit-Lösung und 5 mL 20%iger Natriumsulfit-Lösung besprühen

Anmerkungen

Schnellere Alternative zur oben aufgeführten Methode mit ca. 12h Laufzeit:

stationäre Phase: Cellulose (Rundfilter, Ø 10 cm)

mobile Phase: 1-Butanol/ Methanol/ Wasser/ 20%ige Trichloressigsäure/ 25%iges Ammoniak/ 0,1N EDTA (35/35/20/5/0,3/5, v/v/v/v/v)

Literatur

Peltzer, J.: Mitt. Bl. GDCh-Fachgr. LMCh **11**, 31 u. 109 (1957)

Wurziger, J.: Mitt. Bl. GDCh-Fachgr. LMCh **16**, (1962)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Nr. L 06.00-15

4.1.8 Identifizierung von organischen Säuren

Grundlagen

Die organischen Säuren wie z.B. Äpfel-, Citronen-, Milch-, Wein-, Ascorbin-, Glutamin- und Oxalsäure werden aus dem wässrigen Extrakt der Probe über einen stark basischen Anionenaustauscher isoliert und dünnschichtchromatographisch auf Polyamid getrennt. Die Detektion der Säuren erfolgt durch Besprühen mit einer pH-Indikatorlösung.

Durchführung

Probenvorbereitung

Ca. 10 g des stark basischen Anionenaustauschers lässt man über Nacht in 100 mL Wasser quellen. 5 mL des Anionenaustauschers werden in einem Messzylinder abgemessen und in eine Chromatographiesäule gegeben. Der Anionenaustauscher wird mit 100 mL 0,1M NaOH aktiviert und mit 100 mL 0,1M Essigsäure gewaschen. Von der Probe wird ein wässriger Extrakt hergestellt, filtriert und auf die Chromatographiesäule aufgegeben. Der Anionenaustauscher wird mit 200 mL Wasser gewaschen, und die organischen Säuren werden mit 200 mL 3M Ameisensäure eluiert (Tropfgeschwindigkeit 1-2 Tropfen/s). Das Ameisensäureeluat wird am Vakuumrotationsverdampfer bei 60 °C bis zur Trockne eingeeengt und der Rückstand mit wenig Ethanol aufgenommen. Das zur Säulenfüllung verwendete Anionenaustauscher-Material wird zur Wiederverwendung regeneriert (= aktivieren mit Natronlauge, waschen mit Essigsäure).

Chromatographiebedingungen

Methode:	Dünnschichtchromatographie
Trennproblem:	Äpfel-,Citronen-,Milch-, Wein-, Ascorbin-, Bernstein-, Glutamin-, Oxalsäure
stationäre Phase:	Polyamid
mobile Phase:	Acetonitril/ Essigester/ Ameisensäure (82/9/9, v/v/v)
Vergleichslösung:	1%ig in Ethanol
Aufgabevolumen:	1-3 µL
Detektion:	Ameisensäure bei 105 - 130 °C im Trockenschrank vollständig abdampfen, mit einer Bromkresolgrün-Lsg besprühen (40 mg Bromkresolgrün in 100 mL Ethanol lösen, mit 0,1M NaOH bis zur ersten Blaufärbung versetzen)

Literatur

Jork, H., Funk, W., Fischer, W.,Wimmer, H.: Dünnschicht-Chromatographie Band 1a, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim 1989

Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie, 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin 1967

Praktikumsmethodensammlung Nr. 1995/04

4.2 Spezielle Präparationstechniken in der Dünnschichtchromatographie

4.2.1 Identifizierung von Aminosäuren (zweidimensionale DC)

Grundlagen

Die Aminosäuren werden aus einem Proteinhydrolysat direkt ohne weitere Aufarbeitung an Kieselgel getrennt und mit Ninhydrin-Lösung als farbige Flecken detektiert. Es wird die Technik der zwei-dimensionalen Dünnschichtchromatographie verwendet. Dabei wird die Probe in einer Ecke der DC-Platte aufgetragen, die Vergleiche werden in beiden benachbarten Ecken aufgetragen. Daraufhin wird die Platte zweimal entwickelt, wobei die Laufrichtung um neunzig Grad gedreht wird (siehe Abbildung).

Durchführung

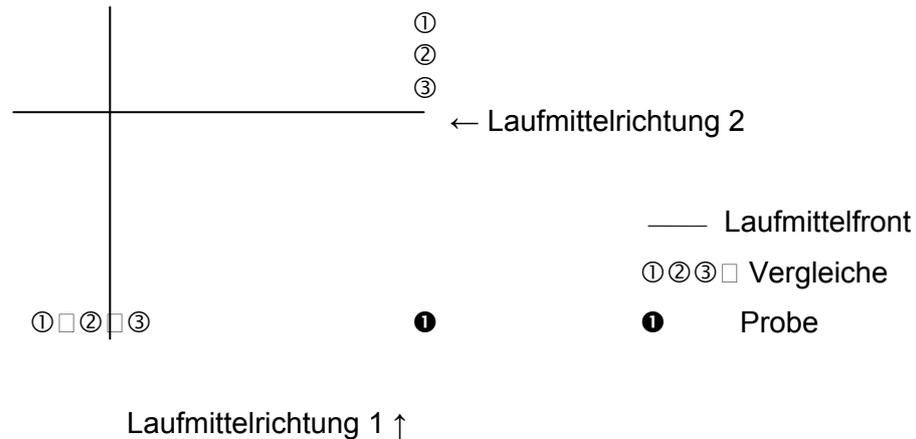
Probe: Wurstprobe

Hydrolyse des Proteins

300 - 400 mg Fleisch werden mit 10 mL 6 N Salzsäure im Pyrex-Schraubdeckelglas 4 h bei 145 °C hydrolysiert. Nach Abdampfen der Salzsäure wird der Rückstand dreimal mit Wasser aufgenommen und erneut abgedampft, schließlich mit 0,5 mL Wasser aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie

Das Proteinhydrolysat wird zweidimensional auf 10 x 10 cm Fertigplatten getrennt. Dazu wird die Probe auf die linke untere Ecke der DC-Platte mit ca. 1 cm Abstand von beiden Rändern aufgetragen. Drei Vergleiche (z. B. Glycin, Prolin, Tyrosin) werden 1 cm vom unteren Rand entfernt rechts auf der Platte aufgetragen. Nun wird die Platte so gedreht, dass die Vergleiche rechts oben und die Probe rechts unten auf der Platte sind. Es werden erneut die drei Vergleiche aufgetragen, diesmal jedoch auf der (neuen) linken unteren Ecke. Die Platte wird so in die DC-Kammer gestellt, dass die Probe unten links ist und mit Laufmittel 1 entwickelt. Nach dem Trocknen an der Luft wird die Platte um 90° gedreht und mit Laufmittel 2 entwickelt, so dass die zweiten Vergleiche diesmal mitlaufen. Es ist dabei darauf zu achten, dass bei der ersten Entwicklung die Laufmittelfront die zweiten Vergleiche nicht erreicht. Nach dem Trocknen wird mit Ninhydrinlösung detektiert. Die Auswertung erfolgt wie über einem Koordinatensystem.



Chromatographiebedingungen

Methode:	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie
Trennproblem:	Trennung von Aminosäuren aus einem Proteinhydrolysat
Stationäre Phase:	Kieselgel 60 G
Mobile Phase:*	1. Methanol/Dichlormethan/25%iges Ammoniak (40/40/20, v/v/v) 2. Phenol/Wasser (75/25, w/w); Phenol auf Wasserbad schmelzen, dann Wasser zusetzen, abkühlen.
Vergleiche:	3 verschiedene proteinogene Aminosäuren (ca. 0.5% in Wasser) nach Wahl
Aufgabevolumen:	1-10 µL
Detektion:	Mit Ninhydrin-Reagenz besprühen (0,3 g Ninhydrin in 100 mL 1-Butanol und 3 mL Eisessig gelöst). Flecken werden nach Trocknung bei 100 °C sichtbar.
* aufgrund zu giftiger/nicht verfügbarer Substanzen wird das System im Matissek empfohlen!	

ACHTUNG: Es ist nicht sinnvoll, eine 2D-Entwicklung mit zweimal derselben mobilen Phase durchzuführen!

Anmerkungen

In diesem Versuch soll lediglich die Technik der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie kennen gelernt werden. Daher wird auf eine vollständige Identifizierung der Aminosäuren im Hydrolysat verzichtet, um den Arbeitsaufwand in Grenzen zu halten.

Literatur

Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin 1967

Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1992.

4.2.2 Halbquantitative Bestimmung von Lebensmittelinhaltsstoffen

Grundlagen

Die Intensität und Größe von dünn-schichtchromatographisch getrennten Substanzflecken hängen von der Konzentration und dem Aufgabevolumen der Analysenlösungen ab. Es ist daher möglich mittels der Dünnschichtchromatographie eine Konzentrationsabschätzung eines Analyten in einer Probelösung vorzunehmen. Unter der Voraussetzung gleichen Aufgabevolumens werden Intensität und Größe der Probenflecken mit denen von Standardlösungen bestimmter Konzentrationen verglichen.

Durchführung

Probe: siehe 4.1

Die Probenvorbereitung und Chromatographiebedingungen entsprechen denen der im vorigen Abschnitt 4.1 beschriebenen Verfahren (z. B. Identifizierung von Konservierungsstoffen, Zuckern, organischen Säuren). Die Probe wird genau eingewogen und der gewonnene Probenextrakt in definiertem Volumen aufgenommen, um Verdünnungs- bzw. Konzentrierungsfaktoren zu berechnen.

Es werden mindestens zwei unterschiedlich konzentrierte Probenextrakte und fünf unterschiedlich konzentrierte Standardlösungen hergestellt. Auf die DC-Platte werden abwechselnd gleiche Volumina von Standardlösungen und Probenlösungen aufgegeben. Nach Entwicklung und Detektion des Chromatogramms wird über den Vergleich der Probenflecken mit den entsprechenden Standards eine halbquantitative Abschätzung des Gehaltes in den Probenextrakten vorgenommen. Unter Berücksichtigung der Probeneinwaage und des Extraktvolumens wird der Gehalt des Stoffes in der Probe abgeschätzt.

Anmerkungen

Die Konzentration des Analyten in den Probelösungen muss innerhalb des Konzentrationsbereiches der Standardlösungen liegen. Die Angabe des Ergebnisses sollte mit nach „Augenmaß“ vertretbarer Genauigkeit erfolgen.

Literatur

Gritter, R.; Bobbitt, J. .M.; Schwarting, A. E.: Einführung in die Chromatographie, Springer Verlag, Berlin 1987

4.3 Gaschromatographie der Fettsäuremethylester

Grundlagen

Zur Identifizierung bzw. Unterscheidung von Fetten und Ölen (insbesondere zum Nachweis von Fremdfett) bedient man sich des Fettsäuremusters. In einer Ein-Schritt-Carbonylreaktion werden die Fettsäuren mittels methanolischer Kalilauge (genauer: mittels des Kalium-Methanolats) aus den Triacylglyceriden zu den jeweiligen Fettsäuremethylestern (FSME) umgesetzt, da diese im Gegensatz zu den freien Fettsäuren ausreichend flüchtig sind und mittels Gaschromatographie (GC) getrennt werden können.

Geräte

Schraubreagenzgläser mit teflonbeschichteter Dichtung ("Pyrexglas")

10- μ L-GC-Spritze

Kapillar-GC mit Flammenionisations-Detektor (FID)

Chemikalien

n-Hexan p.a. (frisch destilliert)

11%ige methanolische Kaliumhydroxidlösung (g/v); Diese Lösung wird in einem Schlifferrlenmeyerkolben angesetzt und sollte keine Trübung aufweisen. Sie ist im gut verschlossenen Gefäß wochenlang haltbar.

2 M Salzsäure

Methylorange

Durchführung

Probe: Öl oder Fett (wird vom Assistenten ausgegeben)

Probenvorbereitung:

Fettextraktion:

Für Proben, die neben Fett auch noch andere Bestandteile – v.a. Wasser – enthalten:

Je nach Fettgehalt ist eine Probenmenge, die ca. 3 g Gesamtfett entspricht, einzuwiegen und unter Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat im Mörser zu verreiben. (Bei sehr wasserreichen Proben vorher Probe mit Seesand verreiben, 1 h bei 105° C in den Trockenschrank stellen.) Es wird mit Diethylether oder Petrolether (Sdp. 40 - 60 C) extrahiert, ggf. in der Soxhlet-Apparatur. Nach Filtration (Faltenfilter) durch wasserfreies Natriumsulfat wird der Diethylether bzw. Petrolether am Vakuumrotationsverdampfer entfernt. Diese Methode ist besonders schonend und kann auch bei Milcherzeugnissen angewendet werden.

Bei reinen Ölen oder Fetten erübrigt sich die vorstehende Behandlung. Für komplexe Lebensmittelmatrices (insbesondere bei Mischungen aus pflanzlichen und tierischen Fetten) sollte das nach Säureaufschluss gewonnene Fett (s. 1.3.2) zur Umesterung eingesetzt werden.

Umesterung mit methanolischer Kaliumhydroxidlösung (PFALZGRAF et al.)

100 - 200 mg Fett werden genau eingewogen und in 10 mL n-Hexan gelöst, davon wird 1 mL zur Umesterung in das Pyrexglas pipettiert. Es werden 0,2 mL 11%ige methanolische Kaliumhydroxidlösung zugefügt. Das Pyrexglas wird fest verschlossen, die Lösung kräftig geschüttelt und 10 min stengelassen (zwischendurch noch mal umschütteln). Dann wird mit 0,25 mL 2 M Salzsäure neutralisiert (Methylorange dient als Indikator) sowie mit 4 mL n-Hexan verdünnt. Nach kräftigem Schütteln wird von der oberen Phase 1 µL in den GC injiziert. Für die Auswertung nach der "Methode mit Internem Standard" wird ein definierter Teil der aufgearbeiteten Lösung mit einem definierten Volumen der Internen-Standard-Lösung (Heptadecansäuremethylester in n-Hexan, meist 200 µL) versetzt (verwendete Volumina notieren!!!).

Freie Fettsäuren werden mit dieser Methode nicht erfasst.

Gaschromatographie

GC-Bedingungen: siehe Gerät

Je 1 µL einspritzen:

- Standardgemisch, welches alle unten genannten Fettsäuremethylester in bekannter Konzentration enthält. Das Gemisch ist fertig beim GC-Assistenten erhältlich.
- Proben-Lösung exklusive Internem Standard
- Proben-Lösung inklusive Internem Standard.

Die Fettsäuremethylester eluieren in folgender Reihenfolge:

C _{8:0}	Caprylsäuremethylester
C _{10:0}	Caprinsäuremethylester
C _{12:0}	Laurinsäuremethylester
BHT	(Butyl-hydroxy-toluol; Antioxidans)
C _{14:0}	Myristinsäuremethylester
C _{16:0}	Palmitinsäuremethylester
C _{16:1}	Palmitoleinsäuremethylester
C _{17:0}	Heptadecansäuremethylester (Interner Standard)
C _{18:0}	Stearinsäuremethylester
C _{18:1}	Ölsäuremethylester
C _{18:2}	Linolsäuremethylester
C _{18:3}	Linolensäuremethylester
C _{20:0}	Arachinsäuremethylester

C _{22:0}	Behensäuremethylester
C _{22:1}	Erucasäuremethylester
C _{24:0}	Lignocerinsäuremethylester

Auswertung

Auswertung nach der 100 %-Methode:

a) Auswertung des Standards

Nicht berücksichtigt bei den folgenden Berechnungen werden BHT und C₁₇-Methylester!

Für den Externen Standard werden in einer Tabelle die Retentionszeiten *R_t* der Fettsäuremethylester eingetragen und daneben die Gewichtsprozent (Gew-%, berechnet aus dem Standard), die Flächenprozent (A-%, berechnet aus dem Standard-Chromatogramm) und die resultierenden Korrekturfaktoren KF:

FSME	<i>R_t</i>	M	Gew.-%	A	A.-%	KF
C8:0						
...						
C24:0						

Berechnung der Gewichtsprozent der relevanten Peaks:

$$\text{Gew.-%} = \frac{m \cdot 100}{\sum m_i} \quad m: \text{Menge des entsprechenden Methylesters}$$

Berechnung der Flächenprozent der relevanten Peaks:

$$\text{A.-%} = \frac{A \cdot 100}{\sum A_i} \quad A: \text{Area des entsprechenden Methylesters}$$

Berechnung des Korrekturfaktors KF für jeden Peak:

$$\text{KF} = \frac{\text{Gew.-%}}{\text{A.-%}}$$

b) Auswertung der Probe

Für die Probe werden in einer weiteren Tabelle die Areas des Proben-Chromatogramms (*A_P*), die mit den entsprechenden KF multiplizierten Areas für die Probe und die daraus berechneten Gewichtsprozent (Gew-%_P) eingetragen:

FSME	<i>R_t</i>	KF	<i>A_P</i>	KF * <i>A_P</i>	Gew.-% _P
C8:0					
...					
C24:0					

Die Gewichtsprozentage jeder Komponente in der Probe errechnen sich nach:

$$\text{Gew-\%}_P = \frac{\text{KF} * A_P * 100\%}{\sum (\text{KF} * A_P)_i}$$

Die Identifizierung der Öle/Fette erfolgt durch Vergleich des ermittelten Fettsäuremusters mit Daten der Literatur, z. B. anhand der Tabellen in den Leitsätzen der Deutschen Lebensmittelbuch-Kommission, in HADORN & ZÜRCHER (1967), in SOUCL, FACHMANN, KRAUT oder im Skript der TU Berlin.

Bei Schwierigkeiten mit der Identifizierung empfiehlt es sich, Gewichtsverhältnisse einzelner Fettsäuremethylester zu ermitteln und mit Literaturwerten vergleichen, z. B. Verhältnis $C_{16:0}/C_{18:0}$ oder $C_{18:1}/C_{18:2}$.

Quantitative Auswertung nach der Methode mit Internem Standard:

Dies ist eine der gebräuchlichsten Auswertungsmethoden in der Chromatographie. Sie ist besonders wichtig, wenn es nicht auf das Mengenverhältnis der chromatographierten Substanzen zueinander ankommt wie im vorliegenden Fall, sondern auf die absoluten Mengen. Durch Zugabe des Internen Standards werden z.B. Aufarbeitungsverluste oder Injektionsfehler rechnerisch eliminiert.

Benötigt werden die Chromatogramme der Probenlösung (in bekannter Konzentration, die die zu bestimmenden Substanzen sowie eine definierte Menge des Internen Standards enthält) und der externen Standardlösung.

Zunächst wird mit Hilfe des Chromatogramms des Externen Standards für jede zu bestimmende Substanz ein Korrekturfaktor KF bestimmt:

$$\text{KF} = \frac{m_{\text{ES}} * A_{\text{IS}}}{m_{\text{IS}} * A_{\text{ES}}}$$

m_{ES} : Menge der zu bestimmenden Substanz in der **Externen Standardlösung**

m_{IS} : Menge des Internen Standards ($C_{17:0}$) in der **Externen Standardlösung**

A_{ES} : Peakfläche der zu bestimmenden Substanz im **Standard-Chromatogramm**

A_{IS} : Peakfläche des Internen Standards im **Standard-Chromatogramm**

FSME	A	Menge FSME im Ext. Std [ng/μL]*	KF
C8:0			
...			
C24:0			

* Die Konzentrationen der einzelnen FSME des Externen Standards können mit Hilfe des Aushangs am GC ermittelt werden.

Zur Bestimmung der Korrekturfaktoren sollte die externe Standardmischung mehrfach eingespritzt und ein Mittelwert der Areas der jeweiligen FSME gebildet werden.

Die Menge m_P [ng/μL] der zu bestimmenden Substanz(en) in dem μL injizierter Probenlösung errechnet sich nach:

$$m_P = \frac{KF * m_{IS} * A_P}{A_{IS}} \quad m_{IS}, A_P \text{ und } A_{IS} \text{ sind jetzt bezogen auf das Proben-Chromatogramm!!!}$$

Anschließend wird die m_P der einzelnen FSME in [ng/μL] injizierter Probenlösung unter Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte inklusive der Zugabe des Internen Standards (ACHTUNG: der Interne Standard ist ebenfalls in Hexan gelöst, hier erfolgt also unter Umständen ebenfalls eine Verdünnung) auf die Probeneinwaage bezogen.

Der komplette Rechnungsweg wird beispielhaft anhand einer Fettsäure nachvollziehbar aufgeschlüsselt, die restlichen Ergebnisse können in Form einer Tabelle angegeben werden. Die Gehalte der einzelnen Fettsäuren in der Probe werden als Fettsäuremethylester in [mg/100 mg] oder [g/100 g] Probe dargestellt:

FSME	A_P	KF	m_P [ng/μL]	m_P [mg/100 mg]
C8:0				
...				
C24:0				

→ Anhand von m_P [mg/100 mg] bzw. [g/100 g] und den Gew.-% aus der 100%-Methode kann ein Vergleich der Aussagekraft der beiden Methoden sowie ein Vergleich mit den Literaturwerten erfolgen. z.B.:

FSME	c [mg/100 mg]	Gew.-% _{IS-Methode}	Gew.-% _{100%-Methode}	Literaturwerte
C8:0				
...				
C24:0				
Summe				

Zur Diskussion gehört auch ein Kommentar, wenn m_P [mg/100 mg] stark von 100 mg abweicht.

Weitere Umesterungsmethoden (nach PARDUN und IUPAC Standard Methods):

- Umesterung mit Natriummethylat in methanolischer Lösung; freie Fettsäuren werden hierbei nicht erfasst.
- Umesterung mit Schwefelsäure/Methanol: Die Umesterung erfolgt in gleicher Weise wie bei der IR-Spektroskopie der trans-Fettsäuren. Freie Fettsäuren werden verestert.
- Umesterung mit Bortrifluorid in Methanol; bei dieser Methode werden freie Fettsäuren verestert.

Vollständigkeit der Umesterung

Die Vollständigkeit der Umesterung kann mittels DC kontrolliert werden (KALUZNY et al.):

Stationäre Phase: Kieselgel

Mobile Phase: n-Hexan/Diethylether/Eisessig 90/10/1 (v/v/v)

oder: n-Hexan/Diethylether/Eisessig 70/30/1 (v/v/v)

Detektion: 10 %ige Phosphormolybdänsäure



Literatur

- Bertsch, W.; Jennings, W. G.; Kaiser, R. E. (Ed.): Chromatographic Methods, Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg
- Hadorn, H.; Zürcher, K.: Beitrag zur gaschromatographischen Analyse von Fetten und Ölen, Mitt. Gebiete Lebensm. Unters. Hyg. **58**, 351 - 384 (1967)
- Hinshaw, J. V.: A compendium of GC terms and techniques, *LC-GC International* **5**(10), 22 - 26 (1992)
- Kaiser, R.: Chromatographie in der Gasphase, Bd.1: Gas-Chromatographie, 2.Auflage und Bd.2: Kapillar-Chromatographie - Dünnfilm- und Dünnschichtkapillar-GC, 3.Auflage, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim 1973 und 1975
- Kaluzny, M. A.; Duncan, L. A.; Merritt, M.V.; Epps, D.E.: Rapid Separation of Lipid Classes in High Yield and Purity Using Bonded Phase Columns, *J. Lipid Res.* **26**, 135 - 140 (1985)
- Kenndler, E.; Huber, J.F.K.: Methodische Fortschritte der Gaschromatographie, In: Analytiker-Taschenbuch, Bd. 8, S. 3 - 33, Springer-Verlag, Berlin 1989
- Paquot, C.; Hautfenne, A.: IUPAC Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987
- Pardun, H.: Analyse der Nahrungsfette, 1.Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1976
- Pfalzgraf, A.; Timm, M.; Steinhart, H.: Gehalte von trans-Fettsäuren in Lebensmitteln, *Z. Ernährungswiss.* **33**, 24 - 43 (1994)
- Schomburg, G.: Gaschromatographie - Grundlagen, Praxis, Kapillartechnik -, 2.Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1987
- Skript der TU Berlin
- Souci, S. W.; Fachmann, W.; Kraut, H.: Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen 1981/82, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1981

5 Allgemeine Hinweise

5.1 Hinweise zum Zitieren von Literatur (Vorschlag)

Es müssen alle Literaturstellen in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet werden. Dabei müssen alle Autoren namentlich inkl. Abkürzung der Vornamen erwähnt werden. Zitiert werden Primär- und Sekundärliteratur; hierzu gehören Veröffentlichungen in Zeitschriften und Tagungsbänden, Patentschriften und Fachbücher. Folgende Reihenfolge ist einzuhalten:

Name des Autors/der Autoren, Titel des Artikels, Abkürzung der Zeitschrift und wenn vorhanden, die offizielle Abteilung, Band (unterstrichen oder fett), erste und letzte Seite des Artikels, Erscheinungsjahr. Werden mehrere Artikel eines Autors zitiert, so wird die Auflistung nach aufsteigender Jahreszahl vorgenommen. Werden mehrere Artikel eines Jahres zitiert, so gelten folgende Regeln: Differenzierung der Textzitate mit einem kleinen lateinischen Buchstaben nach der Jahreszahl. Aufsteigende Reihenfolge nach Anzahl der Autoren. Ansonsten nach aufsteigendem Datum.

Beispiel Buch oder Sammelwerk:

Meister, M.: Biochemistry of the Amino Acids, Vol. II, Second Edition, Academic Press, New York 1965.

Kochen, W., Steinhart, H., Malinka, J., Simat T.: What can we learn from the tryptophan disaster? Proposal of a new strategy in drug safety. In: W. Kochen, H. Steinhart (ed.): L-Tryptophan - current prospects in medicine and drug safety, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1994.

Beispiel im Text

Meister (1995)

Kochen et al.
(1994)

Beispiel Zeitschrift:

Lippert, T.: Gummibärchen - Herausforderung für die Wissenschaft, Nachr. Chem. Tech. Lab., **44**, 399-401 (1996).

Herbel, W., Montag, A.: Bestimmung niedermolekular gebundener Purin- und Pyrimidinbasen in Lebensmitteln nach gelchromatographischer Isolierung und hydrolytischem Druckaufschluss, Z. Lebens. Unters. Forsch., **183**, 12-17 (1987).

Jahreis, G., Richter, G.H., Ochrimenko, W., Flachowsky, G., Steinhart, H., Pfalzgraf, A., Rudolph, B., Leiterer, M.: Einsatz von Rapskuchen in der Milchviehfütterung und Einfluss auf die Milchqualität, Schriftenreihe Thüringer Landesanstalt für Land-wirtschaft 11, 59-75 (1994).

Lippert (1996)

Herbel und Montag
(1987)

Jahreis et al.
(1994)

Beispiel Internet:

<http://www.chemie.uni-hamburg.de/lc/index.html>, 15.03.2006

www.chemie.uni-hamburg.de

5.2 Lineare Regression

Voraussetzungen:

1. Es sind mehr als zwei Wertepaare x_i, y_i gemessen worden.
2. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Merkmalskonzentration x und dem Messwert y .

Zur Prüfung, ob eine lineare Abhängigkeit gegeben ist, wird eine Korrelationsanalyse durchgeführt und der Korrelationskoeffizient r berechnet.

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad \begin{array}{l} \bar{x}, \bar{y} = \text{Arithmetische Mittel aller } x\text{- bzw. } y\text{-Werte} \\ r = \text{Korrelationskoeffizient} \end{array}$$

$r = 0$	keine Korrelation zwischen x und y
r wenig kleiner 1	lineare Korrelation
r wenig größer -1	reziproke lineare Korrelation

Bei Vorliegen einer linearen Abhängigkeit wird diese mathematisch durch die Funktion einer Geraden beschrieben:

$$y(x) = bx + a \quad (\text{Geradengleichung})$$

Kenngößen der Geraden sind: $a =$ Ordinatenabschnitt (Konstante)

$B =$ Steigung der Gerade

Ziel ist die Ermittlung von a und b und damit die Beschreibung der sog. Ausgleichsgeraden. Mit deren Kenngößen kann zu jedem Wert x_i der zugehörige Wert y_i berechnet werden. Je besser die Übereinstimmungen der berechneten y_i mit den gemessenen y_i sind, desto besser spiegelt die durchgeführte Analytik den linearen Zusammenhang zwischen der Merkmalskonzentration x und dem Messwert y wieder.

Zur Ermittlung der Ausgleichsgeraden bzw. von a und b gibt es einen rechnerischen Lösungsansatz sowie mehrere graphische Ansätze.

5.2.1 Rechnerische Ermittlung der Ausgleichsgeraden

Ist eine lineare Abhängigkeit gegeben, können die Kenngrößen der Ausgleichsgeraden nach folgenden Formeln berechnet werden:

$$b = \frac{m \cdot \sum x_i \cdot y_i - \sum x_i \cdot \sum y_i}{m \cdot \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad a = \frac{\sum y_i - b \cdot \sum x_i}{m}$$

5.2.2 Verfahren zur graphischen Ermittlung der Ausgleichsgeraden

Die nachfolgend vorgestellten Verfahren unterscheiden sich in der zeichnerischen Konstruktion der Ausgleichsgeraden. Bei allen Verfahren werden die Messwerte zunächst in einem Koordinatensystem aufgetragen. Aus der zu konstruierenden Geraden werden dann die Kenngrößen ermittelt. Hierzu wird die Ausgleichsgerade bis zur y-Achse verlängert.

Zeichnerische Konstruktion der Ausgleichsgeraden

1. Mit einem (transparenten) Lineal wird eine Gerade so durch die Punkte gelegt, dass diese gleichmäßig ober- und unterhalb der Geraden liegen. Diese Gerade entspricht dann in grober Näherung der Ausgleichsgeraden. (siehe Abbildung a)
2. Bei stark streuenden Messpunkten werden die Messpunkte paarweise gradlinig verbunden (1. Näherung). Durch die Mitten der Strecken werden wieder Verbindungslinien gezogen (2. Näherung). Dieses wird solange wiederholt, bis durch wenige Punkte eine Gerade (Ausgleichsgerade) gezogen werden kann. (siehe Abbildung b)

Abbildung a)

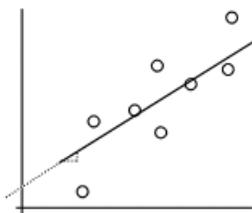
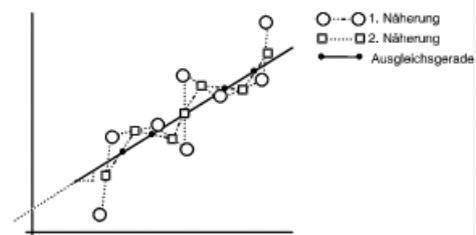
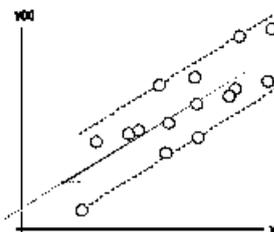


Abbildung b)



3. Bei sehr vielen Messpunkten werden die jeweils oben und unten am weitesten entfernten Messpunkte durch eine Gerade verbunden. Durch die Mitte des entstehenden Kanals wird die Ausgleichsgerade gelegt. (siehe Abbildung c):



5.2.3 Vorschlag zur Berechnung einer abgeschätzten Nachweisgrenze

Eine Nachweisgrenze zu bestimmen ist sehr zeitaufwändig und innerhalb eines Praktikums nicht für jede Substanz durchführbar. Es ist aber sinnvoll abzuschätzen, ob die durchgeführten Nachweise empfindlich genug sind, einen bestimmten Stoff in dem untersuchten Lebensmittel / Bedarfsgegenstand nachzuweisen. Betrachtet man zunächst einen Standard des bestimmten Stoffes, so stellt man fest, dass bei einer gegebenen Konzentration c dieser Stoff noch einen Spot auf der DC (einen Peak am GC, ein Signal am Photometer...) erzeugt. Von dieser Konzentration c ausgehend, lässt sich die Nachweisgrenze für diesen Stoff abschätzen. Grundvoraussetzung ist, dass von Probe und Standard die gleichen Volumina eingesetzt (aufgetragen, eingespritzt...) worden sind.

Schätzung: $1/x$ (z. B. die Hälfte oder $1/10$) des Stoffes hätte sich von dem Nullwert (Eigenfärbung DC-Platte, Grundrauschen GC...) noch deutlich unterschieden. Ist in der aufgearbeiteten Probe (Lebensmittel, Bedarfsgegenstand) der Stoff nicht nachgewiesen worden, so ist die abgeschätzte Nachweisgrenze:

$$NG = \frac{c}{x}$$

Beispiel: Auf einer Konservierungsstoff DC ist der Spot der Benzoesäure ($5 \mu\text{L}$ einer 1%igen Standard-Lösung) noch gut zu erkennen. Schätzung: Die Hälfte wäre auch noch zu erkennen gewesen. Dann ist die abgeschätzte Nachweisgrenze für Benzoesäure in dem aufgearbeiteten Lebensmittel 0,5%, vorausgesetzt von der aufgearbeiteten Probe sind ebenfalls $5 \mu\text{L}$ aufgetragen worden. Sind von der Probe jedoch $10 \mu\text{L}$ aufgetragen worden, so sinkt die abgeschätzte Nachweisgrenze auf 0,25%!

Diese abgeschätzten Nachweisgrenzen gelten für den Proben-Extrakt (die aufgearbeitete Probe)! Bei jeder Aufarbeitung findet in der Regel eine Konzentrierung der Inhaltstoffe der Probe statt. Bei der Berechnung der abgeschätzten Nachweisgrenze ist dieser Konzentrierungsfaktor zu berücksichtigen. Durch ihn wird die abgeschätzte Nachweisgrenze kleiner.

Beispiel: Zum Nachweis der Konservierungsstoffe werden 10 g Lebensmittel eingesetzt, extrahiert und in 2 mL Ethanol aufgenommen. Damit ergibt sich ein Konzentrierungsfaktor von 5. Die abgeschätzte Nachweisgrenze sinkt damit auf 0,05%. D. h., wenn bei der aufgearbeiteten Probe kein Benzoesäure-Spot zu detektieren ist, ist Benzoesäure nicht nachweisbar. Die abgeschätzte Nachweisgrenze beträgt 0,05 g/100 g Lebensmittel.

$$\text{Abgeschätzte Nachweisgrenze } N \text{ [g/100g bzw. \%]} = \frac{c_S \cdot V_S \cdot V_{\text{Ex}}}{x \cdot V_P \cdot E_P} \cdot 100$$

c_S	Konzentration des Standards [g/mL]	x	geschätzter Faktor des Standardspots
V_S	Aufgabevolumen des Standards [μL]	E_P	Probeneinwaage [g]
V_{Ex}	Volumen des Probenextraktes [mL]	V_P	Aufgabevolumen des aufgearbeiteten Probenextraktes [μL]

Ausgehend von der abgeschätzten Nachweisgrenze kann ein abgeschätzter Gehalt des zu bestimmenden Stoffes berechnet werden.

$$\text{Abgeschätzter Gehalt } G \text{ [g/100g bzw. \%]} = N \cdot x_P$$

N	abgeschätzte Nachweisgrenze	x_P	geschätzter Faktor des Probenspots
-----	-----------------------------	-------	------------------------------------

5.3 Leitfaden zum Anfertigen von Protokollen im 1. Semester Hauptstudium

Allgemeines

- Wissenschaftlicher Ausdruck, kein Laborjargon, wie z.B. „abrotieren“, keine Füllwörter, präzise Formulierung
- Vermeidung von Wortwiederholung und Rechtschreibfehlern → Selber Korrektur lesen!
- eindeutige Verweise bei Bezugnahme auf andere Bereiche des Protokolls
- Belegen von Aussagen im theoretischen Teil mit Literaturangaben, z.B. LFGB, Römpp-Lexikon, Souci-Fachmann-Kraut ⇔ Verweis auf Literaturverzeichnis
- im praktischen Teil genügt in der Regel die Literaturangabe zu Beginn oder Ende des Absatzes
- Tabellen werden mit einer ausführlichen Überschrift, Abbildung mit einer Unterschrift versehen (z.B. „Benzoessäure“ reicht nicht aus)
- Sinnvolle Beschriftung von Tabellenspalten (z.B. „Konzentration“ reicht nicht aus)
- Sensorische Beschreibungen von Proben oder allgemeine Formeln nur einmal pro Protokoll, danach Verweis

(mögliche) Gliederung des Protokolls

- *Titelblatt*
- *Inhaltsverzeichnis* (mit Seitenzahlen)
- *Allgemeiner oder Theoretischer Teil*
 - kurze Definition der zu untersuchenden Substanzen; Eigenschaften, Vorkommen in Lebensmitteln, Bedeutung der Untersuchungsparameter für die Lebensmittelbeurteilung
 - Grundlagen der verwendeten Geräte, z.B. Fluorimeter, Photometer, Chromatographie, Prinzip Karl-Fischer-Titration
- *Sensorik*
 - Geruch, Aussehen, Textur (Farbe, Attribute wie z.B. staubig, grob, fettig, zäh-/dünnflüssig, faserig...); generell wird von einer Verkostung zur Beurteilung des Geschmacks abgeraten, da es sich um mit Laborchemikalien versetzte Lebensmittelmatrices handeln kann
- *Versuchsprinzip*
 - kurz Probenvorbereitung, Trennung, Messung, Detektion darlegen
 - Reaktionsgleichungen und Formeln angeben

➤ *Durchführung*

- kurze, aber nachvollziehbare Beschreibung
- Soweit nicht vom Skript abgewichen oder eine amtliche Methode verwendet wurde, reicht der Verweis auf die entsprechende Analysenvorschrift: „siehe Literatur [x]“.

➤ *Geräteparameter*

- Typenbezeichnung + Hersteller sowie verwendete Parameter, z.B. Fluorimeter: Wellenlängen, Küvettenmaterial, Schichtdicke; AAS: Lichtquelle, Atomisierungseinrichtung, verwendetes Gas, Gasdruck, Untergrundkompensationsart, GC: Trägergas, Detektorart, Temperaturprogramm, etc.

➤ *Auswertung*

- Nachvollziehbare Berechnungen, auch ohne Nachschlagen in der Analysenvorschrift; d.h. Angabe aller Einwaagen von Standardsubstanzen und Proben, sowie evtl. angefertigte Verdünnungen
- Angabe sowie Kommentar eines Rechenbeispiels
- Bildung des Mittelwertes bei einer Mehrfachbestimmung erst zum Schluss der Berechnung aus den Einzelergebnissen, und nicht vorher aus z.B. den Titrationsvolumina
- Sinnvoller Verweis auf alle Anhänge des Protokolls, wie z.B. AAS-Ausdrucke, Titrationskurven sowie DC/GC-Chromatogramme an geeigneter Stelle
- Kommentar aller Abbildungen sowie Anhänge
- Im TK Trinkwasser: eigenständige Erstellung der Regressionsgeraden zusätzlich zu den AAS-Ausdrucken
- Im TK Chromatographie: ausführliche Beschreibung der DC-Platten unter Angabe aller R_f -Werte; d.h. nicht nur „schöne“ DCs sondern der Weg zum Ergebnis evtl. über mehrere Platten, Fehlinterpretationen, Schwierigkeiten bei der Einschätzung oder Deutung von Probenspots und problematische Trennungen von Substanzen sowie die Störung durch Matrixeffekte

➤ *Ergebnis*

- Formulierung eines abschließenden Satzes; Angabe des Ergebnisses mit sinnvoll gewählten Nachkommastellen unter Berücksichtigung welche Genauigkeit die gewählte Methode leisten kann

➤ *Diskussion*

- Hinweis auf besonders fragwürdige oder schwankende Werte inkl. theoretischer Lösungsvorschläge
- Rechtliche Bewertung der Probe unter Berücksichtigung des ermittelten Analytgehaltes; Verwendung und Beurteilung von Leitsätzen, sowie horizontalen (z.B. LFGB, Verordnung über Zusatzstoffe) und vertikalen Verordnungen (z.B. Milcherzeugnis-VO, Streichfettnormen EG 2991/94, Trinkwasser-VO)

- Beurteilung über die Verkehrsfähigkeit bzw. gesundheitliche Unbedenklichkeit der Probe unter Berücksichtigung aller Parameter
- Im TK Trinkwasser: Toxikologische Einordnung sowie Beschreibung von Krankheitsbildern; Vorschläge zu möglichen Aufarbeitungsverfahren bezogen auf die gefundenen Substanzen.

Tipp: In die Diskussion gehört die Erörterung von Fragen wie z.B.:

- Ist der Fett-/ Zucker-/ Alkoholgehalt in diesem LM sinnvoll oder nicht?
- Wie gut stimmt der ermittelte Wert mit dem Literaturwert überein?
- Ist ein Wassergehalt von 5% in einem Puddingpulver gut / schlecht / zu erwarten? Warum?
- Was machen Eiweiße in einer Suppe? Ist das völlig unnormal / normal? Warum?
- Wie passt der ermittelte (und Literatur-) Wert zu ähnlichen Produkten (Vergleich des Fettgehaltes von Salami mit z.B. Cervelatwurst oder anderen Wurstprodukten). Woran könnten starke Abweichungen liegen?

➤ *Chemikalienliste*

- Auflistung aller verwendeten Chemikalien inkl. aktueller Gefahrensymbole sowie R- und S-Sätzen

➤ *Literaturverzeichnis*

- Siehe 5.1 Hinweise zum Zitieren von Literatur

➤ *Anlagen / Anhang*

- Durchnummerierung und vernünftige Beschriftung jedes angehängten Blattes (z.B. „AAS Na⁺“ reicht nicht aus), evtl. Legende für Abkürzungen (v.a. bei AAS), Achsenbeschriftungen
- In den TK Wasser/Fette (Wasserbestimmung nach Karl-Fischer) und Mineral- / Zusatzstoffe (Chloridbestimmung): Abbildung sowohl der gesamten Titrationskurve, als auch eines Ausschnittes, auf dem der Titrationsendpunkt genau ablesbar ist
- Im TK Chromatographie: Abbildung aller erstellten DC-Chromatogramme, SINNVOLLE Darstellung inkl. Laufmittelfront! Was nützt ein Farbdruck eines Scans, wenn man darauf nichts erkennen kann? → Fotografien und Scans, aber auch Schemata (z.B. mit Microsoft Paint) oder abgepauste Abbildungen werden akzeptiert (dies gilt evtl. nicht für spätere Diplomarbeiten!)
In GC-Chromatogrammen: Kennzeichnung aller Peaks mit den entsprechenden Substanzen (Fettsäuren)

5.4 Bücherliste (Lebensmittelchemie – Hauptstudium)

Nur Ratschläge, kein Anspruch auf Vollständigkeit!!!

1. Lebensmittelchemie:

für Kolloquien, während Praktikum und Abschlusskolloquium

- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P.; „Lehrbuch der Lebensmittelchemie“, Springer Verlag
(wichtig v.a. die Einzelkapitel zu Lebensmittelinhaltsstoffen; Wasser, Fette, Proteine, Kohlenhydrate, Mineralstoffe, Zusatzstoffe)
- Schwedt, Taschenatlas der Lebensmittelchemie (nur als Repitorium, nur Kurzlehrbuch)
- Baltés, W., „Lebensmittelchemie“, Springer Verlag
- Römpp Lexikon der Lebensmittelchemie (Thieme Verlag)
- Themengebiet Fette:
 - „Pardun“ (= Autor), grünes Buch oben in der LC-Bibliothek (wichtig für Fettkennzahlen und FS-Verteilung etc...)
- Themengebiet Trinkwasser:
 - Höll (Trinkwasser) steht in veralteter Form in Englisch in der LC-Bibliothek, evtl. Fachbereichs-Bibliothek?
 - DEV – Trinkwasser (Fa. Merck) steht in der LC-Bibliothek
- Themengebiet Zusatzstoffe:
 - Behrs Verlag Schriften (oranges Heft) für Zusatzstoffe
 - Behrs Verlag Schriften (oranges Heft) für Phosphate
 - Behrs Verlag Schriften (oranges Heft) für Dickungsmittel
 - Lebensmittelrecht
 - Zumindest LFGB (nur ein kleiner, übergeordneter Teil des ganzen Lebensmittelrechts (C.H. Beck)) §§ 1,2 und 17; auch wichtig zur Beurteilung (für Protokolle Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe und Zusatzstoffverkehrsverordnung) aber für Lebensmittelrechts-Vorlesung natürlich noch anderes wichtig... (z.B. A.H. Meyer „Lebensmittelrecht“ WVG Stuttgart)

2. Lebensmittelanalytik:

- Matissek, Steiner, Fischer „Lebensmittelanalytik“ (v.a. Praktikumsbuch aber Prinzipien der Methoden auch oft wichtige Grundlagen für die Kolloquien!) 5. Auflage, Springer Spektrum; Auflage: 5., vollst. überarb. u. akt. Aufl. 2014 (25. Oktober 2013); ISBN-10: 3642348289; ISBN-13: 978-3642348280



- Rauscher, Engst, Freimuth „Untersuchung von Lebensmitteln“ (reines Praktikumsbuch, oft wichtig für genaue Durchführungen, Variationsmöglichkeiten von Praktikumsskriptvorschriften, Details zu allen möglichen lebensmittelanalytischen verfahren!)
- § 64 LFGB – Vorschriften (Achtung viele verschiedene Bände; im ersten Band Liste der verschiedenen Analyten bzw. Lebensmittel) = orange Plastikordner in LC-Bibliothek
- Dünnschichtchromatographie:
 - Stahl, Egon; „Dünnschichtchromatographie“ (steht in der LC-Bibliothek graues Buch bei Chromatographie-Regal (von der Tür rechts ganz vorne)
(reines Praktikumsbuch, genaue Angaben von Fließmittelsystemen, Auswertungen und Bedingungen bei der DC, farbige Bilder)
 - Jork, Funk, Fischer, Wimmer; „Dünnschichtchromatographie“ (reines Praktikumsbuch; gut zur Herstellung von Detektionsmitteln, genaue Reaktions- und Selektivitätsangaben)
- Gaschromatographie:
 - (viele gute Bücher) evtl.: Schomburg „Gaschromatographie“
- Elektrophorese:
 - Westermeier (Westermaier?) „Elektrophorese-Praktikum“
- Spektroskopische Methoden:
 - Hesse, Maier, Zeh...
 - Cammann „Instrumentelle analytische Chemie“
 - u.v.a (in der Vorlesung instrumentelle Analytik nachfragen...)
- für Toxikologie (gut: Macholz Lewerenz (oranges Buch oben in der LC-Bibliothek), Botanik, Mikrobiologie und Biochemie gibt es in den Vorlesungen bestimmt noch genauere Literaturangaben;
- für Grundlagen, z.B. Chromatographie, Elektrophorese etc. ist das Internet oft auch eine gute Quelle ⇔ Achtung: in Protokollen Zitat nur ungern aus dem Internet, für Grundlagenrecherche aber oft hilfreich!