

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

5. Bestimmung von Einzelsubstanzen

5.25 Wasserstoffperoxid

1. Allgemeine Angaben

H_2O_2 $M = 34,01 \text{ g/mol}$

Bezeichnung in der Empfehlung XXXVI: Wasserstoffperoxid

Ordnungsnummer: B VII 14, Schleimbekämpfungsmittel

Stand: August 1979

Analytisches Messprinzip: Photometrie

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

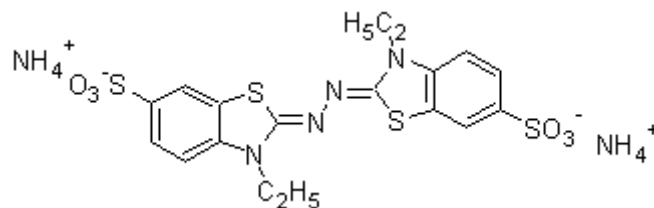
* Boehringer Mannheim GmbH, Bahnhofstraße 9-15, 8132 Tutzing.

** Verband Deutscher Papierfabriken e.V., Adenauerallee 55, 5300 Bonn 1.

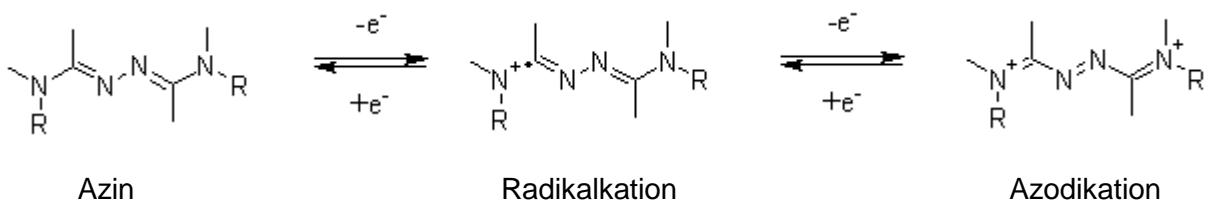
*** Herzberger Papierfabrik, Ludwig Osthusenrich GmbH & Co. KG, Andreasberger Straße 1, 3420 Herzberg/Harz.

2. Grundlagen des Verfahrens

Die zu untersuchende Probe wird der Kaltwasserextraktion unterworfen. Das im klaren Filtrat vorliegende Peroxid wird bei pH 7 mit Peroxidase umgesetzt, wobei 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure-6) (ABTS) als Wasserstoffdonator dient. Das entstehende grüne Reaktionsprodukt wird im Photometer bei 436 nm gemessen. Da der Extinktionskoeffizient von den Versuchsbedingungen abhängt, wird die gemessene Extinktion auf die Extinktion eines H_2O_2 -Standardwertes bezogen.



Ammoniumsalz der 2,2' -Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-sulfonsäure-6)
(ABTS)



3. Chemikalien und Lösungen

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

Chemikalie	Konzentration	Sonstige Angaben
Puffer- ABTS-Lösung	c = 0,12 mol/l	pH = 7,0 1,38 g di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,727 g di-Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und 0,100 g 2,2' -Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-sulfonat-6) (ABTS) werden in Wasser gelöst und im Messkolben mit Wasser auf 100 ml zur Marke aufgefüllt (Haltbarkeit: bei +4°C mind. 4 Wochen).
Peroxidase (POD) aus Meerrettich	c=10 mg/ml	EC 1.11.1.7: Donor hydrogen-peroxide oxidoreductase; Haltbarkeit: bei +4°C mind. 1 Jahr
Wasserstoffperoxid-Lösung	ca. 30 % m/m	H_2O_2
Schwefelsäure	c = 0,5 mol/l	H_2SO_4
Kaliumpermanganat-Lösung	c = 0,02 mol/l	KMnO_4
Polyamidpulver	oder k. A.	k. A.
Polyvinylpyrrolidon		

Tabelle 1 Chemikalien und Lösungen

4. Geräte

- 4.1 Spektrallinienfilter-Photometer mit Messmöglichkeit bei 436 nm oder Spektralphotometer
- 4.2 Glasküvetten, Schichtdicke 1,0 cm, DIN 58963
- 4.3 Analysenwaage, Messgenauigkeit 0,0001 g
- 4.4 Messkolben mit Kegelschliffhülse und Stopfen, 1000 ml, 250 ml, 100 ml, DIN 12664
- 4.5 Messpipetten, 10 ml, 5 ml, 1 ml, 0,2 ml, 0,1 ml, DIN 12696
- 4.6 Vollpipetten, 20 ml, 5 ml, 1 ml, DIN 12691
- 4.7 Trichter DIN 12445
- 4.8 Glasfaserfilter (vor Gebrauch sind die Filter mehrmals mit heißem Wasser zu waschen)
- 4.9 Messzylinder, 50 ml, DIN 12680 Teil 1
- 4.10 Erlenmeyerkolben, 250 ml, DIN 12385
- 4.11 Bürette, 25 ml, DIN 12 700

5. Probenahme und Probenvorbereitung

5.1 Probenahme

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

5.2 Probenvorbereitung

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

6. Bestimmung der Flächenmasse nach DIN 53104 Teil 1

7. Bestimmung des Trockengehaltes nach DIN 53103

8. Extraktion der Probe

Von der vorbereiteten Probe werden ca. 10 g auf 0,0001 g genau gewogen, in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben gegeben und mit 100 ml Wasser von 20°C übergossen. Man lässt den Ansatz unter gelegentlichem Umrühren 2 Stunden stehen. Vor Durchführung der Bestimmung ist die Probe über Glasfaserfilter zu filtrieren.

Anmerkung: Bei Färbung der Probelösung ist mit Polyamidpulver oder Polyvinylpyrrolidon (siehe Tabelle 1) zu behandeln und über Glasfaserfilter zu filtrieren.

9. Durchführung

9.1 Herstellung der Wasserstoffperoxid-Standardlösung

9.1.1 Bestimmung des Wasserstoffperoxid-Gehaltes:

1 ml der Wasserstoffperoxid-Lösung (siehe Tabelle 1) wird in einen 250 ml-Messkolben pipettiert, es wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und gut durchgemischt. 20 ml dieser Lösung werden in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben pipettiert, mit 30 ml Wasser verdünnt, mit 5 ml H₂SO₄ (siehe Tabelle 1) angesäuert und mit KMnO₄-Lösung (siehe Tabelle 1) bis zur bleibenden Rosafärbung titriert. 1,00 ml der KMnO₄-Lösung entspricht 1,7 mg Wasserstoffperoxid.

9.1.2 Von der Lösung, deren Wasserstoffperoxid-Gehalt nach 9.1.1 bestimmt worden ist, wird die Menge, die 20 mg Wasserstoffperoxid enthält, abpipettiert, in einen 1000 ml-Messkolben gegeben und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Die so hergestellte Standardlösung enthält 20 µg H₂O₂/ml.

Die H₂O₂-Standardlösung ist immer kurz vor Gebrauch durch Verdünnen der haltbaren ca. 30%igen (m/m) Lösung herzustellen.

9.2 Bestimmung des Wasserstoffperoxid-Gehaltes

Von dem nach Abschnitt 8 hergestellten Extrakt werden 0,2 ml in eine Küvette pipettiert, mit 3,00 ml Puffer-ABTS-Lösung (siehe Tabelle 1) versetzt und gut durchgemischt. Die Extinktion E₁ der Lösung wird bei 436 nm gegen Luft gemessen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,02 ml Peroxidase (siehe Tabelle 1) gestartet. Nach Stillstand der Reaktion (ca. 5-10 min) wird die Extinktion E₂ der Lösung gegen Luft gemessen. Ein Reagenzienleerwert und eine Standardprobe werden unter den gleichen Bedingungen hergestellt,

nur werden für den Reagenzienleerwert anstelle der Probelösung 0,2 ml Wasser und für die Standardprobe 0,2 ml H₂O₂-Standardlösung (9.1.2) eingesetzt.
 Die Extinktionsdifferenz des Leerwertes (E₂ – E₁) wird von der Extinktionsdifferenz der Probelösung bzw. der des Standards abgezogen.

10. Auswertung

Es sind Parallelbestimmungen von mindestens zwei Proben durchzuführen. Der Gehalt an Wasserstoffperoxid G_{Per} beträgt dann

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

$$G_{Per1} = \frac{\Delta E_{Probe} \cdot C_{Standard} \cdot 100}{\Delta E_{Standard} \cdot m_{Tr}}$$

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

$$G_{Per2} = \frac{\Delta E_{Probe} \cdot C_{Standard} \cdot 100 \cdot m_A}{\Delta E_{Standard} \cdot m_E \cdot 1000}$$

Hierin bedeuten:

ΔE _{Probe}	= berechnete Extinktion der Probe
ΔE _{Standard}	= berechnete Extinktion der Standardlösung
C _{Standard}	= Wasserstoffperoxid-Gehalt der Standardlösung in µg/ml (20 µg/ml)
m _A	= Flächenmasse der Probe nach DIN 53104 Teil 1 in g/m ²
m _E	= Einwaage der Probe in g
m _{Tr}	= Einwaage der Probe in g, berechnet auf Trockengewicht nach DIN 53103

11. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf diese Vorschrift anzugeben:

Art und Bezeichnung der Probe
 Anzahl der Parallelbestimmungen
 Trockengehalt der Probe nach DIN 53103
 Flächenmasse der Probe in g/m² nach DIN 53104 Teil 1
 Gehalt an Wasserstoffperoxid in mg/kg bzw. mg/m² nach Abschnitt 10 a oder 10 b
 Einzelwerte und Mittelwert
 Gegebenenfalls Abweichungen von dieser Vorschrift
 Prüfdatum

12. Wiederfindungsrate

94%

13. Nachweisgrenze

25 mg Wasserstoffperoxid/kg (0,5 µg H₂O₂ im Ansatz)

14. Literatur

Gallati, H., Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien sowie Optimierung der Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure-6) (ABTS), J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, p. 1-7 (1979)

Bergmeyer, H. U., Methoden der enzymatischen Analyse, S. 633-635 (1962), Verlag Chemie, Weinheim

Diemair, W., Postel, W., Nachweis und Bestimmung von Konservierungsstoffen in Lebensmitteln, S. 84 (1967), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

9. Mitteilung der Kunststoffkommission des Bundesgesundheitsamtes zur Untersuchung

von Kunststoffen, Methoden zur Prüfung von Papieren, Kartons und Pappen, 1. A | Herstellung von Wasserextrakten, Bundesgesundheitsblatt **10**, S.101 (1967)

15. Anmerkung

Für Routineuntersuchungen hat sich folgendes Pipettierschema bewährt:

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Standard	Probe
Probe	-	-	0,20 ml
Standard	-	-	0,20 ml
Wasser	20 ml	-	-
Puffer/ABTS	3,00 ml	3,00 ml	3,00 ml

Mischen, Extinktion der Lösungen bei 436 nm gegen Luft messen und Reaktion starten durch Zugabe von

Peroxidase	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
------------	---------	---------	---------

Mischen, nach Stillstand der Reaktion (ca. 5-10 min) Extinktion der Lösungen gegen Luft messen.

Extinktionsdifferenz des jeweiligen Leerwertes von der Extinktionsdifferenz des Standards bzw. der Probe abziehen.