

Sulfit

UV-Test

zur Bestimmung von schwefliger Säure ("Gesamt-SO₂") in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

Best. Nr. 10 725 854 035

Test-Combination für 31 Bestimmungen

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

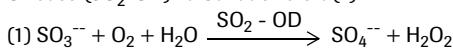
Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

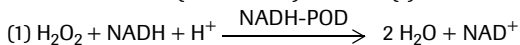
Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren siehe unter Literatur (2)

Prinzip (Lit. 1)

Sulfit (schweflige Säure) wird in Gegenwart von Sauerstoff durch Sulfit-Oxidase (SO₂-OD) zu Sulfat oxidiert (1).



Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird in Gegenwart von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) durch das Enzym NADH-Peroxidase (NADH-POD) reduziert (2).



Die in der Reaktion (2) verbrauchte NADH-Menge ist der Sulfit-Menge - auch der chemisch an Aldehyd gebundenen Sulfit-Menge - äquivalent. NADH ist Messgrösse und wird aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm bestimmt.

(Hinweis: Intermediär gebildetes Wasserstoffperoxid reagiert nicht mit dem noch nicht umgesetzten Sulfit.)

Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 30 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Triethanolamin-Puffer, pH ca. 8,0
2. Flasche 2 mit ca. 30 Tabletten; jede Tablette enthält: NADH, ca. 0,4 mg
3. Flasche 3 mit ca. 0,3 ml Suspension, zusammengesetzt aus: NADH-POD, ca. 3 U
4. Flasche 4 mit ca. 1,6 ml Suspension, zusammengesetzt aus: SO₂-OD, ca. 4 U¹

Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 unverdünnt verwenden.
2. In einem Becher- oder Zentrifugenglas je nach Anzahl der Bestimmungen für jeden Test (Leerwert und Proben) **eine** Tablette aus Flasche 2 mit **einem** ml Lösung aus Flasche 1 lösen (zur Entnahme der Tabletten aus Flasche 2 beiliegende Pinzette benutzen), ergibt Reaktionsgemisch 2.
3. Inhalt der Flasche 3 unverdünnt verwenden.
4. Inhalt der Flasche 4 unverdünnt verwenden.

Stabilität der Reagenzien

Lösung 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flasche 2 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Reaktionsgemisch 2 ist bei 2-8°C 1 Woche haltbar.

Reaktionsgemisch 2 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flaschen 3 und 4 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Bestimmungsansatz

Wellenlänge²: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm

Glasküvette³: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 3,060 ml

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser

Probelösung: 0,6-30 µg Sulfit/Testansatz⁴ (als SO₂; in 0,100-2,000 ml Probevolumen)

Besonderer Hinweis

Zum Test nur frisch bidestilliertes Wasser verwenden oder demineralisiertes Wasser mit Aktivkohle (z.B. 1 g/100 ml) behandeln: Aktivkohle in Wasser einrühren, nach ca. 3 min filtrieren. Bentonit kann ebenfalls verwendet werden.

1 Aktivität gemessen als O₂-Verbrauch, 1 µmol/min.

2 Das Absorptionsmaximum von NADH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektralphotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm **oder** 334 nm gemessen.

3 Anstelle von Glasküvetten sind ggf. auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.

4 Siehe Hinweise zur Testdurchführung

5 Zu beziehen von Roche Applied Science, Best.-Nr. 236 314

6 Zu beziehen von Roche Applied Science, Best.-Nr. 736 619

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Reaktionsgemisch 2	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung*	-	0,100 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml
Suspension 3	0,010 ml	0,010 ml
mischen**, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E ₁). Reaktion starten durch Zugabe von		
Suspension 4	0,050 ml	0,050 ml
mischen**, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 30 min), Extinktionen der Lösungen messen (E ₂). Falls die Reaktion nach 30 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen in 5 min-Abständen messen, bis eine konstante Extinktionsabnahme pro 5 min erreicht ist.		

* Vor der Dosierung der Probelösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mit der Probelösung vorspülen.

** Z.B. mit Rührspatel oder durch Umschwenken nach Verschliessen z.B. mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA)

Bei konstanter Extinktionsabnahme von E₂ wird die Extinktion auf den Zeitpunkt der Zugabe von Suspension 4 (Sulfit-Oxidase) extrapoliert.

Für Probe und Leerwert Extinktionsdifferenzen (E₁-E₂) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen.

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

Die gemessene Extinktionsdifferenz sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen (s. "Hinweise zur Testdurchführung" und "Empfindlichkeit und Nachweisgrenze", Pkt. 4).

Gelegentlich resultiert bei (E₁-E₂)_{Leerwert} ein negativer Wert. Dieser Wert muss dann entsprechend dem Berechnungsschema zu (E₁-E₂)_{Probe} addiert werden.

Ist die Extinktionsdifferenz der Probe (ΔE_{Probe}) grösser als 1,000 (gemessen bei 340 bzw. Hg 334 nm) bzw. 0,500 (gemessen bei Hg 365 nm), so ist die Konzentration von Sulfit in der Probelösung zu hoch. Die Probelösung ist dann gemäss Verdünnungstabelle zu verdünnen.

Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

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

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei:
340 nm = 6,3 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]
Hg 365 nm = 3,4 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]
Hg 334 nm = 6,18 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

Hieraus ergibt sich für Sulfit (als SO₂):

$$c = \frac{3,060 \times 64,06}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{1,960}{\epsilon} \times \Delta E \text{ [g SO}_2\text{/l Probelösung]}$$

Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.



Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Vorbereitung der Probe eingewägt werden, wird das Analysenergebnis auf die Einwaage bezogen:

$$\text{Gehalt}_{\text{Sulfit}} = \frac{c_{\text{Sulfit}} [\text{g/l Probelösung}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \times 100 [\text{g}/100 \text{ g}]$$

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Sulfit-Menge zwischen 0,6 µg und 30 µg betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Sulfit-Konzentration zwischen 0,03 und 0,3 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an Sulfit im Liter	Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
< 0,3 g	-	1
0,3-3,0 g	1 + 9	10
3,0-30 g	1 + 99	100
> 30 g	1 + 999	1000

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz (ΔE) zu klein (z.B. < 0,100), so ist die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung), oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen (v) ist bis auf 2,000 ml zu erhöhen. In diesem Fall ist das Volumen der hinzuzufügenden Wassermenge entsprechend zu verringern, so dass in den Ansätzen für Probe und Leerwert das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probevolumen v ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

2. Technische Hinweise

Bei der Bestimmung von Sulfit im unteren Messbereich (Spurenanalytik) sind einige Punkte zu beachten, damit befriedigende Ergebnisse erhalten werden:

2.1 Durch Inhaltsstoffe von z.B. Gewürzen oder Tee können mehr oder weniger grosse, von den Proben abhängige Schleichreaktionen auftreten. Werden diese Schleichreaktionen, insbesondere bei geringen Sulfitgehalten der Proben, nicht oder falsch berücksichtigt, so werden falsche Ergebnisse berechnet.

Deshalb wird empfohlen, E_2 10 min nach Zugabe von Suspension 4 (Sulfit-Oxidase) zu messen und die Messungen in Abständen von 10 min zu wiederholen, bis eine konstante Extinktionsabnahme pro 10 min beobachtet wird. Anschliessend Extinktion auf den Zeitpunkt der Zugabe von Suspension 4 (Sulfit-Oxidase) extrapolieren.

2.2 Schweflige Säure ist sehr flüchtig, sehr reaktionsfreudig und leicht oxidabel. Diese Eigenschaften des Analyten müssen in Betracht gezogen werden bei der Beurteilung von Analysenergebnissen oder beim Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen Methoden.

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Sulfit-Oxidase reagiert mit Sulfit, mit Isothiocyanaten und mit deren Glycosiden, so dass bei der Analyse z.B. von Senf, Lauch, Knoblauch, Meerrettich und Zwiebeln zu hohe Ergebnisse erhalten werden.

Organische Sulfonsäure-Verbindungen verursachen eine geringe Schleichreaktion.

Sulfide, Thiosulfat, Sulfat und organische Sulfinsäure-Verbindungen reagieren unter Testbedingungen nicht.

Natriumsulfit, sowie Natrium- und Kalium-disulfit (-pyrosulfit, -metabisulfit) sind mehr oder weniger feuchtigkeitsempfindlich und neigen zur Oxidation (Bildung von Sulfat). Wässrige Lösungen sind instabil, so dass bei der analytischen Bestimmung Ergebnisse von unter 100% zu erwarten sind. Bei der Verwendung von demineralisiertem Wasser zur Herstellung von (Di-) Sulfit-Lösungen werden z.T. sehr grosse Verluste an Sulfit beobachtet.

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.4)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen $v = 2,000 \text{ ml}$ und Messung bei 340 nm einer Konzentration an Sulfit von 0,1 mg/l (bei $v = 0,100 \text{ ml}$ entsprechend ca. 1,5 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,3 mg/l errechnet sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen $v = 2,000 \text{ ml}$.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 0,6 µg Sulfit/Ansatz (0,3 mg Sulfit/l Probelösung; Probevolumen $v = 2,000 \text{ ml}$) bis 30 µg Sulfit/Ansatz (0,3 g Sulfit/l Probelösung; Probevolumen $v = 0,100 \text{ ml}$).

6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen $v = 0,100 \text{ ml}$ einer Sulfit-Konzentration von 1,5-3 mg/l. (Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, ist mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren. Bei einer Einwaage von 1 g Probe/100 ml = 10 g/l sind die zu erwartenden Unterschiede ca. 0,015-0,03 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

5 µg/Test	n = 15	VK = 5,71 % (in Serie)	
10 µg/Test	n = 15	VK = 2,79 % (in Serie)	
20 µg/Test	n = 15	VK = 3,21 % (in Serie)	(Lit. 1.1)

Sultaninen:

x = 260 mg/kg	r = 45 mg/kg	$s_{(r)} = \pm 16 \text{ mg/kg}$
	R = 129 mg/kg	$s_{(R)} = \pm 46 \text{ mg/kg}$

Bier:

x = 4,9 mg/l	r = 0,8 mg/l	$s_{(r)} = \pm 0,3 \text{ mg/l}$
	R = 1,6 mg/l	$s_{(R)} = \pm 0,6 \text{ mg/l}$

(Lit. 2.1)

7. Störungen

Sulfit-Oxidase wird durch L-Ascorbinsäure ($> 20 \text{ µg/Ansatz}$) deutlich gehemmt (Reaktionszeit: ca. 40 min), jedoch wird der Sulfit-Gehalt in der zu messenden Lösung noch voll wiedergefunden.

Die Anwesenheit höherer L-Ascorbinsäure-Konzentrationen im Test ($> 50 \text{ µg L-Ascorbinsäure/Ansatz}$) lösen nicht nur eine Hemmwirkung aus, sondern liefern auch eine geringe Wiederfindung von Sulfit (ca. 80% Wiederfindung) wegen der Reaktion mit intermediär gebildetem H_2O_2 . L-Ascorbat-haltige Proben sind demgemäss mit Ascorbat-Oxidase zu behandeln (s. Sulfit in Fruchtsäften, Pkt. 11.).

8. Erkennen von Störungen

8.1 Ist die Umsetzung von Sulfit nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.

8.2 Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von Sulfit (qualitativ oder quantitativ) die Reaktion wieder gestartet werden: Die erneute Änderung der Extinktion nach Zugabe des Standardmaterials ist ein Beweis für den störungsfreien Ablauf der Bestimmung.

8.3 Grobe Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können auch erkannt werden, wenn aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probevolumina (z.B. 0,100 ml und 0,200 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein.

Bei der Analytik fester Proben wird die Einwägung verschiedener Mengen (z.B. 1 g und 2 g) in 100 ml-Messkolben empfohlen. Bei gleichen Probevolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.

8.4 Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können weiterhin durch Mitführen eines internen Standards erkannt werden: Neben Probe-, Leerwert- und Standardansatz wird ein weiterer Ansatz mit Probe- und Testkontroll-Lösung analysiert. Aus den ermittelten Extinktionsdifferenzen wird die Wiederfindung berechnet.

8.5 Verluste während der Vorbereitung der Probe können durch Wiederfindungsversuche erkannt werden: Die Probe wird mit und ohne zugesetztem Standardmaterial vorbereitet und anschliessend gemessen. Der Zusatz muss (innerhalb des Analysenfehlers) quantitativ wiedergefunden werden.

9. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von Sulfit sind keine gefährlichen Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinie 67/548/EWG und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Die beim Umgang mit Chemikalien üblichen Vorsichtsmassnahmen sollten jedoch beachtet werden.

Nach Gebrauch können die Reagenzien unter Beachtung der örtlichen Vorschriften zum Abwasser gegeben werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

10. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben direkt, unverdünnt nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 2,000 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren;

Kohlensäure-haltige Proben (z.B. durch Filtration) entgasen;

saure Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf ca. pH 8 einstellen;

saure und schwach gefärbte Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf ca. pH 8 einstellen und ca. 15 min stehen lassen;

stark gefärbte Proben, die unverdünnt oder mit einem höheren Probevolumen zum Test eingesetzt werden, mit Polyvinylpyrrolidon, PVPP, behandeln;

feste und halb feste Proben zerkleinern oder homogenisieren, mit Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren;

Fett-haltige Proben mit heissem Wasser in geschlossenem Gefäss extrahieren (Extraktionstemperatur über dem Schmelzpunkt des jeweiligen Fettes), zur Abscheidung des Fettes abkühlen lassen, Messkolben bis zur Marke auffüllen, 15 min in Eisbad stellen und filtrieren oder zentrifugieren.

Probelösungen immer unverzüglich zum Test einsetzen.

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von Sulfit (Gesamt-SO₂) in Weisswein

Weisswein mit einem Probevolumen von $v = 0,100$ ml direkt zum Test einsetzen.

Bestimmung von Sulfit in Rotwein

25 ml Rotwein mit Natronlauge (2 M) auf pH 7,5-8,0 einstellen und mit bidest. Wasser auf 50 ml verdünnen (Messkolben) (Verdünnungsfaktor $F = 2$). Lösung etwa 10 min bei 20-25°C stehen lassen. 0,100 ml zum Test einsetzen.

Bestimmung von Sulfit in Spirituosen

Branntwein unverdünnt mit einem Probevolumen von $v = 0,500$ ml direkt zum Test einsetzen.

Bestimmung von Sulfit in Bier

Bierprobe auf 20-25°C bringen, Flasche öffnen und Bierprobe sofort filtrieren. In 50 ml-Becherglas 0,7 g Bentonit zu 10 ml Bier geben, 1 min rühren und filtrieren. 1,000 ml Filtrat zum Test einsetzen.

Die auftretende "Schleichreaktion" mit $\Delta mE/min < 2$ rechnerisch, wie im Pipettierschema angegeben, berücksichtigen.

Bestimmung von Sulfit in Absinth- und Cola-Getränken

Probe direkt zur Bestimmung einsetzen, Probevolumen ggf. auf 0,500 ml erhöhen (auftretende Schleichreaktionen sind durch Extrapolation zu berücksichtigen).

Bestimmung von Sulfit in Fruchtsäften

Trübe Säfte zentrifugieren (ca. 4000 Upm). Zur Entfernung von L-Ascorbinsäure (erforderlich bei > 100 mg L-Ascorbinsäure/l Probe) 2,0 ml klaren Saft mit Natronlauge (2 M) auf pH 5-6 einstellen (das Volumen der benötigten Natronlauge messen und als Verdünnung berücksichtigen), mit ca. 20 U Ascorbat-Oxidase⁵ (ca. 0,1 mg Lyophilisat) versetzen, mischen und 10 min stehen lassen. Es kann die L-Ascorbinsäure auch entfernt werden, indem 2,0 ml Saft mit einem Ascorbat-Oxidase-Spatel⁶ etwa 3 min gerührt werden. Anschliessend Probe mit Natronlauge (2 M) auf pH 7,5-8,0 einstellen (das Volumen der benötigten Natronlauge messen und als Verdünnung berücksichtigen), mit 0,1 g Polyvinylpyrrolidon (PVPP) versetzen (nur bei Buntsäften erforderlich), 1 min rühren und filtrieren. 0,100 ml (ggf. bis zu 1,000 ml) der weitgehend entfärbten Probe zum Test einsetzen.

Bestimmung von Sulfit in Konfitüren

Ca. 100 g Konfitüre in einem Homogenisator 30 s homogenisieren. Etwa 5 g der homogenen Probe in einen 50 ml-Messkolben genau einwiegen, 40 ml bidest. Wasser hinzufügen. Messkolben verschliessen und 5 min bei 60°C halten. Kolben gelegentlich umschwenken. Nach dem Abkühlen auf 20-25°C mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Klare Lösung zum Test einsetzen, ggf. vorher gemäss Verdünnungstabelle verdünnen.

Bestimmung von Sulfit in Kartoffel-Erzeugnissen

Getrocknete Kartoffel-Erzeugnisse mit einem geeigneten Gerät (Mörser, Mixer) zerkleinern und homogenisieren. Ca. 5 g zerkleinerte und gemahlene Kartoffelchips (bzw. ca. 2 g gemahlene Kartoffelflocken, zur Herstellung von Klößen vorgesehen) in einem 100 ml-Messkolben genau wiegen, 80 ml heisses (65°C) bidest. Wasser hinzufügen. Messkolben verschliessen und 5 min kräftig schütteln bzw. mit Magnetrührer rühren, anschliessend 15 min stehen lassen. Nach dem Abkühlen auf 20-25°C mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und zentrifugieren (10 min; 4000 Upm). Klare Lösung mit einem Probevolumen bis zu 0,500 ml zum Test einsetzen, ggf. vorher gemäss Verdünnungstabelle verdünnen.

Hinweis

Inhaltsstoffe von Kartoffelprodukten, z.B. (Poly-) Phenole, können zu Vorreaktionen führen. Daher ist E₁ erst 20 min nach Zugabe der Probelösung abzulesen, E₂ 30 min nach Zugabe von Sulfit-Oxidase und E₃ nach weiteren 30 min.

Die Extinktionsdifferenz wird berechnet aus: $\Delta E = (E_1 - E_2) - (E_2 - E_3)$.

Bestimmung von Sulfit in Obst- und Gemüse-Erzeugnissen

Es wird empfohlen, wie bei "Bestimmung von Sulfit in Kartoffel-Erzeugnissen" vorzugehen.

Bestimmung von Sulfit in Gewürzen und Kaffee-Erzeugnissen

Gewürzprobe mit geeignetem Gerät (Mörser, Mixer) zerkleinern und homogenisieren. Ca. 100 mg Probe in einen 50 ml-Messkolben genau einwiegen, 30 ml bidest. Wasser hinzufügen. Messkolben verschliessen und 5 min bei ca. 60°C halten. Kolben gelegentlich umschwenken. Nach dem Abkühlen auf 20-25°C mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Klare Lösung zum Test einsetzen, ggf. vorher gemäss Verdünnungstabelle verdünnen.

Bestimmung von Sulfit in Hopfen-Erzeugnissen

Probe mit geeignetem Gerät zerkleinern und mischen (kühlbarer Homogenisator; Überhitzung vermeiden: Temperatur der Probe darf ca. 30°C nicht überschreiten). Ca. 3 g pulverisiertes Probematerial in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, mit ca. 60 ml bidest. Wasser versetzen, mischen und 10 min bei 20-25°C (nicht höher als 25°C) stehen lassen, mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Die ersten ml des Filtrats verwerfen; weitere 10 ml Filtrat mit 0,1 g EDTA versetzen, 2 min rühren, ggf. filtrieren. Klares Filtrat zum Test einsetzen.

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Sulfit in Wasser, Abwasser, Luft und Rauchgas.

12.1 Bestimmung von Sulfit in Abgas, Rauchgas und Luft (Lit. 3.1)

Gasprobe mit geeigneter Sonde oder Gasdosiereinrichtung entnehmen und in 2 hintereinander geschaltete Gaswaschflaschen, jeweils mit 80 ml Natronlauge (1 M) gefüllt, einleiten (ca. 3 l/min; ca. 10 min). Aus der ersten Gaswaschflasche Probe entnehmen und ggf. nach Verdünnung gemäss Verdünnungstabelle sofort zum Test einsetzen.

Bei der Berechnung der Sulfit-Konzentration sind Temperatur, Luftdruck, Sauerstoffgehalt der Probe, Strömungsgeschwindigkeit und Waschkdauer, ggf. auch fremde Luftanteile, zu berücksichtigen.

12.2 Bestimmung von Sulfit in Sulfit-Zellstoffablaugen

Probematerial homogenisieren (Mixer, Rührgerät, etc.). Ca. 5 g Probematerial in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, 60 ml bidest. Wasser hinzufügen und mischen. 100 mg EDTA zugeben und 10 min bei 20-25°C (nicht höher als 25°C) stehen lassen. Anschliessend pH-Wert mit Natronlauge (2 M) auf 7,5-9,5 einstellen, mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. 10 ml Filtrat mit 1 g Polyvinylpyrrolidon (PVPP) versetzen und 2 min mit Magnetrührer rühren. Filtrieren, die ersten ml des Filtrats verwerfen. Filtrat zum Test einsetzen.

Bei hohem Gehalt an Schwermetallen (z.B. > 100 mg Blei/100 g Probematerial) muss der Zusatz an EDTA erhöht werden.

Literatur

1. Beutler, H.-O. & Schütte, I. (1983) Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Sulfit in Lebensmitteln, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **79**, 323-330
2. Beutler, H.-O. (1984) A new enzymatic method for determination of sulphite in food, Food Chemistry **15**, 157-164
3. Beutler, H.-O. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VII, pp. 585-591, Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
4. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Sulfit (schwefliger Säure) in Frischobst, 29.00-2 (November 1991); Bestimmung von Sulfit (schwefliger Säure) in Obstprodukten, 30.00-1 (November 1986); Bestimmung von Sulfit in Bier, 36.00-8 (Januar 1991); Bestimmung von Sulfit in Lebensmitteln, Teil 2: Enzymatisches Verfahren, 00.00-46/2 (Nov. 1999)
5. Brautechnische Analysemethoden, Band II, 2. Auflage, S. 133-136 (1988), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
6. Nordisk Metodikkomité for Livsmedel - Nordic Committee on Food Analysis UDC 546.224:577.152.1 No 135 (1990) Sulphite, Enzymatic Determination in Foodstuffs
7. Deutsche Norm DIN EN 1988-2 (Mai 1998) Lebensmittel, Bestimmung von Sulfit, Teil 2: Enzymatisches Verfahren
8. European Standard EN 1988-2 (Mai 1998) Foodstuffs - Determination of sulfite - Part 2: Enzymatic method
9. von Stetten, E., Beutler, H.-O & Otte, H. (1985) Ein neuartiges Verfahren zur enzymatischen Bestimmung von SO₂ (Sulfit) in Rauchgasen, Staub Reinhaltung der Luft **45**, 418-422
10. Edberg, U. (1993) Enzymatic Determination of Sulfite in Foods: NMKL Interlaboratory Study, Journal of AOAC International **76**, 53-58
11. Littmann-Nienstedt (2000) Enzymatische Bestimmung von Sulfit in tiefgefrorenen Krustentieren, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **96**, 17-18

Sulfit-Testkontroll-Lösung

Die Testkontroll-Lösung dient zur Kontrolle für die enzymatische Bestimmung von Sulfit in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien.

Reagenzien

Natrium-Sulfit, wasserfrei, p.A. (Na_2SO_3 ; $M = 126,04 \text{ g/mol}$; enthält 50,8 % SO_2), oder

Natrium-di-sulfit (Natrium-meta-bisulfit, Natriumpyrosulfit), p.A. ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; $M = 190,10 \text{ g/mol}$; enthält 67,4 % SO_2), oder

Kalium-di-sulfit, p.A. ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$; $M = 222,33 \text{ g/mol}$; enthält 57,6 % SO_2)

Herstellung der Testkontroll-Lösung

60 mg Natrium-sulfit (bzw. 45 mg Natrium-di-sulfit, bzw. 50 mg Kalium-di-sulfit) auf 0,1 mg genau einwiegen und im Messkolben mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen und gründlich mischen (entspricht ca. 0,3 g Sulfit/l).

Lösung unmittelbar vor Gebrauch mit frisch destilliertem Trinkwasser herstellen. (s. "Besonderer Hinweis")

Anwendung:

1. Zusatz der Sulfit-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt (zur Berechnung der Wiederfindung ist die Molmasse des entsprechenden Standardmaterials zu verwenden). Die Messung der Testkontroll-Lösung ist zur Berechnung von Ergebnissen nicht erforderlich.

Die Wiederfindung der Testkontroll-Lösung liegt in der Regel unter 100%, da:

- die verschiedenen Sulfit Standardmaterialien hygroskopisch sind und zur Oxidation neigen.
- die Sulfit-Konzentration in den handelsüblichen Standardmaterialien mit einer iodometrischen Titration ermittelt wird. Die Ergebnisse des enzymatischen Tests können davon abweichen, da es sich um eine prinzipiell andere Methode handelt.

2. "Quantitativer Nachstart":

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von E_2 werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 30 min) wird die Extinktion E_3 gemessen. Aus der Differenz ($E_2 - E_3$) wird nach der allgemeinen Berechnungsformel die Konzentration berechnet. Hierbei ist das geänderte Gesamtvolumen zu berücksichtigen. Wegen der Verdünnung des Testansatzes durch die Zugabe der Testkontroll-Lösung weicht das Ergebnis geringfügig von dem Ergebnis ab, das gemäss Pkt. 1 ermittelt wurde.

3. Interner Standard:

Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe	Standard	Probe + Standard
Reaktionsgemisch 2	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lösung	-	-	0,100 ml	0,050 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,900 ml
Suspension 3	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml

mischen, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E_1). Weiter verfahren wie im Arbeitsschema bei "Bestimmungsansatz" angegeben. Die entsprechenden Fussnoten und "Hinweise" zur Testdurchführung sind zu beachten.

Die Wiederfindung des Standards berechnet sich nach:

$$\text{Wiederfindung} = \frac{2 \times \Delta E_{\text{Probe + Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times 100 [\%]$$

4. Wiederfindungsversuch mit Originalproben:

Zur Absicherung der Messung einschliesslich Vorbereitung der Probe können Wiederfindungsversuche durchgeführt werden. Hierfür werden entweder die oben genannten Testkontroll-Lösungen verwendet oder aber eine andere Testkontroll-Lösung mit einer geeigneten Konzentration.

Die Originalprobe wird mit und ohne Zusatz von Sulfit gemessen, wobei der Zusatz an Sulfit entsprechen soll

- der in der Originalprobe erwarteten Sulfit-Menge, oder
- der Menge, die z.B. gemäss Standards oder sonstiger Regelungen in der Originalprobe enthalten sein darf.

Bei der Bewertung der Ergebnisse ist die Instabilität wässriger Sulfit-Lösungen/die leichte Oxidierbarkeit von Sulfit zu berücksichtigen.

Bei der Berechnung der Wiederfindung zugesetzten Standardmaterials werden die folgenden Umrechnungsfaktoren benötigt:

Berechnung von Sulfit als Natrium-sulfit:

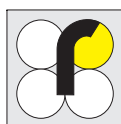
$$F = 126,04 : 64,06 = 1,968$$

Berechnung von Sulfit als Natrium-di-sulfit:

$$F = (190,10/2) : 64,06 = 1,484$$

Berechnung von Sulfit als Kalium-di-sulfit:

$$F = (222,33/2) : 64,06 = 1,735$$



R-BIOPHARM AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
Telefon + 49 61 51 / 81 02-0
Fax + 49 61 51 / 81 02-20
www.r-biopharm.com

