

Fotometrische Bestimmung von DL-Äpfelsäure

1 Aufgabe

- Erstellen sie mit Hilfe einer DL-Äpfelsäure-Stammlösung eine Kalibrierkurve und stellen sie die fotometrisch ermittelten Daten auf Millimeterpapier grafisch dar.
- Ermitteln sie durch eine Doppelbestimmung, anhand ihrer Grafik, die Massenkonzentration an DL-Äpfelsäure in [g/L] in der vorliegenden Probe.
- Ein sauberes, übersichtliches Protokoll wird verlangt, wobei alle Rohdaten und Resultate im beigelegten Rohdaten- und Resultateblatt einzutragen sind.

2 Prinzip

Nach Abtrennung mittels Anionenaustauscher reagiert Äpfelsäure mit Chromotropsäure unter Bildung einer Gelbfärbung, die fotometrisch ausgewertet wird. Der Einfluss störender Säuren lässt sich durch vorgängige Zugabe von Natriumborhydrid eliminieren.

3 Probe

- GA 1.2.X liegt auf / KandidatIn

4 Reagenzien

- Carrez-I-Lösung (36 g Kaliumhexacyanoferrat Trihydrat / L) liegt auf / Labor
- Carrez-II-Lösung (72 g Zinksulfat Heptahydrat / L) liegt auf / Labor
- DL-Äpfelsäure liegt auf / Labor
- Konz. Schwefelsäure liegt auf / Labor
- Ionenaustauscher Acetat-Form, liegt in Essigsäure 30 % vor liegt auf / KandidatIn
- Essigsäure 100 % liegt auf / Labor
- Essigsäure verdünnt herzustellen / KandidatIn
2.5 mL Essigsäure 100 % mit entionisiertem Wasser auf 500 mL auffüllen.
- Natriumsulfat wasserfrei liegt auf / Labor
- Natriumsulfat-Lösung herzustellen / KandidatIn
142 g Natriumsulfat wasserfrei in 1000 g entionisiertem Wasser lösen.
- Chromotropsäure Dinatriumsalz Dihydrat liegt auf / Labor
- Schwefelsäure ($c = 0.5 \text{ mol/L}$) liegt auf / Labor
- Chromotropsäure-Lösung herzustellen / KandidatIn
500 mg Chromotropsäure Dinatriumsalz Dihydrat in 5 mL Schwefelsäure ($c = 0.5 \text{ mol/L}$) lösen
→ diese Lösung unmittelbar vor Gebrauch herstellen!
- Natriumborhydrid liegt auf / Labor
- Natriumhydroxid ($c = 1 \text{ mol/L}$) liegt auf / Labor
- Natriumborhydridlösung herzustellen / KandidatIn
100 mg Natriumborhydrid in 5 mL NaOH ($c = 1 \text{ mol/L}$) lösen
→ diese Lösung unmittelbar vor Gebrauch herstellen!

5 Geräte und Materialien

- Wasserbad 85 °C
- Fotometer, Wellenlänge 420 nm
- Einwegkunststoffküvetten Halbmikro (Schichtdicke = 1 cm)
- Faltenfilter 595½
- Reagenzgläser 10 mL mit Schraubverschluss und Teflondichtung

6 Ausführung

6.1 Probenvorbehandlung

Es ist eine Doppelbestimmung durchzuführen.

- 10.0 mL Probe in einen 50 mL Messkolben pipettieren und mit ca. 20 mL entionisiertem Wasser verdünnen.
- Zur Klärung zuerst 5 mL Carrez-I-Lösung zupipettieren und mischen, anschliessend 5 mL Carrez-II-Lösung zupipettieren und wieder mischen.
- Den Messkolben mit entionisiertem Wasser zur Marke auffüllen und die Lösung durch einen Faltenfilter 595½ filtrieren wobei der erste Milliliter Filtrat zu verwerfen ist.

6.2 Abtrennung der Säuren

→ Den Ionenaustauscher nie trocken laufen lassen!

→ Im Ionenaustauscher dürfen sich keine Luftblasen befinden!

- Diese Schritte sind in der Kapelle durchzuführen!
 - Ionenaustauscher Acetat-Form im Vorratsgefäss aufwirbeln und mittels Trichter gleichmässig auf beide mit einem Glaswollstopfen versehenen Glassäulen verteilen.
 - Glaswollstopfen leicht an die Ionenaustauscher-Oberfläche drücken und überstehende Essigsäure bis knapp über den Glaswollstopfen abfliessen lassen.
 - Ionenaustauscher mit total 50 mL Essigsäure verdünnt spülen und am Schluss bis knapp über den Glaswollstopfen abfliessen lassen.
- 10.0 mL Filtrat auf die Ionenaustauschersäule geben und mit einer Geschwindigkeit von ca. 1 Tropfen pro Sekunde bis knapp über den Glaswollstopfen abfliessen lassen, Durchlauf verwerfen.
- Ionenaustauscher ohne Unterbruch zuerst mit 50 mL Essigsäure verdünnt und anschliessend mit 100 mL entionisiertem Wasser mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 Tropfen pro Sekunde spülen, am Schluss bis knapp über den Glaswollstopfen abfliessen lassen und den Durchlauf verwerfen.
- 100 mL Messkolben unter die Säule stellen und die Äpfelsäure mit der Natriumsulfat-Lösung eluieren bis knapp 100 mL aufgefangen sind (ca. 2 Tropfen pro Sekunde). Messkolben mit Natriumsulfat-Lösung zur Marke auffüllen.

6.3 Herstellung der Kalibrierlösungen

6.3.1 DL-Äpfelsäure-Stammlösung

0.15 g DL-Äpfelsäure auf 0.1 mg genau in einen 100 mL Messkolben einwiegen, in Natriumsulfat-Lösung lösen und mit dieser zur Marke auffüllen.

6.3.2 DL-Äpfelsäure -Kalibrierlösungen

Je 5.00 mL DL-Äpfelsäure-Stammlösung in einen 50 mL-, 100 mL- und 250 mL-Messkolben pipettieren und diese mit der Natriumsulfat-Lösung zur Marke auffüllen.

6.4 Farbreaktion und fotometrische Messung

Zur Farbreaktion und fotometrischen Messung sind Blindwert, Kalibrierlösungen und Probelösungen in jedem Fall in einer Serie anzusetzen.

- 1.00 mL Eluat, Kalibrierlösung bzw. Natriumsulfat-Lösung als Blindwert in ein 10 mL Reagenzglas mit Schraubverschluss und Teflondichtung pipettieren.
- Mit einer Glaspasteurpipette genau 7 Tropfen (oder 250 μ L) Natriumborhydrid-Lösung zugeben und mischen, anschliessend genau 7 Tropfen (oder 250 μ L) Chromotropsäure-Lösung zugeben und mischen, Reagenzglas verschliessen und 2-5 Min. stehen lassen.
- Mittels Dispensor (für alle Lösungen den gleichen Dispensor einsetzen) **langsam** 5 mL konz. Schwefelsäure zugeben wobei das Gemisch sehr heiss wird. Reagenzgläser wieder verschliessen und 10-15 Sekunden kräftig schütteln.
- Verschlossene Reagenzgläser während genau 70 Minuten in ein Wasserbad von 85 °C und anschliessend in ein Eis/Wasserbad stellen. Die Kühldauer soll mind. 30 bis max. 60 Minuten betragen. Die Extinktionen der Messlösungen sind gekühlt praktisch konstant. Die Messlösungen 3 – 4 mal vorsichtig schwenken (**nicht schütteln!**) und mittels Pasteurpipette in Halbmikroküvetten überführen, wobei jede Lösung 2 mal zu messen und für jede einzelne Messung eine separate Küvette zu verwenden ist . Die Lösungen sofort, noch kalt bei 420 nm gegen Luft messen.

7 Entsorgung

- Schwefelsäure, Chromotropsäurelösung, Natriumborhydridlösung
→ Behälter "Abfall Fotometrie"
- Ionenaustauscher → Behälter "Abfall Ionenaustauscher"

Fotometrische Bestimmung von DL-Äpfelsäure

Rohdaten- und Resultateblatt

Anhang zum Protokoll

Name / Datum :

Kalibrierreihe

Rohdaten

Konzentration	Extinktion

Probe

Rohdaten

	Extinktion

Resultat

--

Expertenblatt

8 Herkunft der Methode

Schweizerisches Lebensmittelbuch 1989, 28A Frucht- und Gemüsesäfte
Untersuchungsmethode 7.7

9 Vorbereitung des Ionenaustauschers

Ionenaustauscher III (Merck 1.04767) in einem Becherglas mit NaOH 1mol/L bedecken und, unter gelegentlichem Rühren mittels Flügelrührer, 2h stehen lassen. Ionenaustauscher über ein Sieb abschütten und mit Reinwasser abspülen. Anschliessend in einem Becherglas mit Wasser bedecken, ~5 Min. rühren und wieder über einem Sieb abschütten, diesen Schritt wiederholen bis das Spülwasser neutral ist. Ionenaustauscher mit Essigsäure 30 % bedecken, 15 Min. rühren und unter Essigsäure 30 % lichtgeschützt aufbewahren.

10 Analysenmuster

- Analysenmuster: Äpfelsäurelösung in dest. Wasser getrübt; β (Äpfelsäure) \approx 6 g/L + ca 1 g/L Kaolin

11 Bemerkungen zur Ausführung

- Natriumsulfatlösung 0.5 mol/L: Natriumsulfat in 1000 mL Glasflasche einwiegen und in ca. 1000 g dest. Wasser lösen (löst sich nur langsam, Magnetrührer).
- Das Füllen der Säule mit dem Ionenaustauscher und der erste Spül-Schritt mit Essigsäure verdünnt hat wegen dem starken Geruch in der Kapelle stattzufinden.
- Der Ionenaustauscher soll nicht trocken laufen. Kein Notenabzug bei Nachbezug von Ionenaustauscher.
- Beim Eluieren mit der Natriumsulfatlösung fällt der Ionenaustauscher etwas zusammen.
- Trübe Probelösung sollen vor der Entnahme immer gut gemischt werden.
- Probe- und Kalibrierlösungen können (zusammen) über Nacht bei RT stehen gelassen werden.
- Chromotropsäure Dinatriumsalz und Natriumborhydrid direkt in 25 mL Glasflaschen einwiegen und Säure bzw Lauge mittels Messpipette zugeben.
- Schäumt bei Zugabe der Chromotropsäure-Lösung.
- Das Mischen nach der Zugabe von Chromotropsäure- und Natriumborhydridlösung sowie nach der Schwefelsäure kann nach jeder einzelnen Zugabe oder jeweils nach der Zugabe zur ganzen Serie erfolgen.
- Beim Umgang mit konz. Schwefelsäure müssen Handschuhe getragen werden.
- Achtung, heftige exotherme Reaktion bei der Zugabe der Schwefelsäure. Die Säure muss unbedingt langsam zugegeben werden, das Gemisch wird sehr heiss. → Dieser Schritt soll überwacht werden!
- Zeit Farbreaktion → weniger als 70 Min. bedeutet eine tiefere Extinktion, mehr als 70 Min. eine höhere.
- Eisgekühlte Lösungen nicht schütteln da die viskosen Lösungen sonst voller Luftblasen sind → evt. wieder ins Eis/Wasserbad stellen (Dauer der gesamten Kühlzeit sollte dabei nicht zu stark überschritten werden), oder Farbreaktion neu ansetzen.
- Lösungen für die fotometrische Messung: Blank ist leicht rosa, alle anderen Lösungen sind gelb.
- Die kalten Lösungen können in die Küvetten verteilt und anschliessend (sofort) in Serie gemessen werden.

Beurteilungskriterien für das Ergebnis

Als Grundlage dient der Medianwert der ausreisserfreien Daten sowie dessen resultierende Standardabweichung aus den Daten der Kandidaten.

Note	Bereich
6	± 2 s
5.5	± 2.5 s
5	± 3 s
4.5	± 3.5 s
4	± 4 s
3.5	± 4.5 s
3	> 4.5 s
2	Resultat unbrauchbar, Fehler nicht rückverfolgbar
1	Nicht durchgeführt, Resultat und Rohdaten nirgends ersichtlich

Sind nur Rohdaten vorhanden: 1.5 Noten Abzug des von uns berechneten Resultates, basierend der obigen Tabelle. Endnote jedoch nicht tiefer als 2.

Beurteilungskriterien für die Arbeitstechnik

Bewertung: sehr gut = 6; gut = 5; knapp genügend = 4; schwach/unvollständig = 3; sehr schwach = 2; unbrauchbar/nicht ausgeführt = 1; nicht gesehen (-)

Allgemeine Kriterien	Bemerkungen
1) Arbeitsdisposition	
2) Ordnung und Sauberkeit, inkl. Beschriftungen	
3) Umweltverhalten, inkl. korrekte Entsorgung	
4) Sicherheitsverhalten, inkl. Einsatz der pers. Schutzausrüstung und Umgang mit Chemikalien Zugabe der konz. Schwefelsre. überwachen!	
5) Manuelle Geschicklichkeit	
6) Methodik, inkl. Literatureinsatz	
Aufgabenspezifische Kriterien	Bemerkungen
1) Probe vor Entnahme durchmischen	
2) Handhabung Ionenaustauscher u.a.: - gleichmässig auf beide Säulen verteilen - keine Luftblasen - Ionenaustauscher darf nie trocken laufen	
3) Füllen der Säule und erster Spül-Schritt mit Essigsäure verd. muss in der Kapelle stattfinden.	
4) Chromotropsäurelsg. und Natriumborhydridlsg. unmittelbar vor Gebrauch hergestellt? Wie zugegeben?	
5) Wurden Reaktionstemperatur (85°C), Reaktionszeit (70 min.) und Kühlzeit (30-60 min.) im Eis/Wasserbad eingehalten?	
6) Farblösungen mittels Pasteurpipette und Luftblasen frei in Küvette überführt und kalt gemessen?	