

Prüfung von Papier und Pappe

Bestimmung des Gehaltes an Stärke

Enzymatische Bestimmung von nativer Stärke

DIN
54 604
 Teil 1

Testing of paper and board; determination of starch content; enzymatic analysis of native starch content
 Essai des papiers et cartons; détermination de la teneur en amidon; analyse enzymatique de la teneur en amidon natif

In dieser Norm bedeutet die Angabe % Massenanteile in Prozent.

Angaben der Dichte ρ beziehen sich auf die Dichte bei 20 °C.

1 Anwendungsbereich

In dieser Norm sind die Bedingungen für ein enzymatisches Verfahren zur Bestimmung von nativer Stärke in Papier und Pappe festgelegt.

Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 1 mg nativer Stärke je 100 ml Extrakt.

Das Verfahren ist nicht anwendbar für Wellpappen und kaschierte Papiere und Pappen, wenn Klebstoffe auf Basis von Stärke oder modifizierter Stärke verwendet wurden.

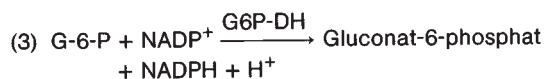
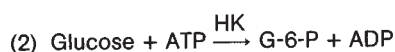
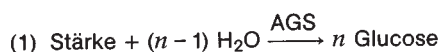
Anmerkung: In DIN 10 381 ist ein vergleichbares Verfahren beschrieben.

2 Begriff

In dieser Norm wird unter dem Stärkegehalt der genannten Erzeugnisse der nach dem hier beschriebenen Verfahren ermittelte Gehalt an Glucopolysaccharid verstanden, der durch Amyloglucosidase zu Glucose gespalten wird. Er ist der unter den gegebenen Versuchsbedingungen gebildeten Menge an NADPH äquivalent.

3 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Die Probe wird einem Dimethylsulfoxid-Salzsäure-Aufschluß unterworfen, in dem der durch enzymatische Spaltung der Stärke gebildete Glucosegehalt mit Hilfe der enzymatischen Analyse ermittelt wird, wobei in einer Photometer-Küvette folgende Reaktionen ablaufen:



Stärke wird durch das Enzym Amyloglucosidase (AGS) bei pH 4,6 zu D-Glucose gespalten (1).

Die gebildete D-Glucose wird bei pH 7,6 mit den Enzymen Hexokinase (HK) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) bestimmt. D-Glucose wird mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in Gegenwart von Hexokinase zu Glucose-6-phosphat (G-6-P) phosphoryliert unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) (2).

G-6-P wird von Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP) in Gegenwart von G6P-DH zu Gluconat-6-phosphat oxidiert, wobei reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) entsteht (3).

Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der durch Hydrolyse der Stärke gebildeten D-Glucose-Menge proportional. NADPH ist Meßgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei einer Wellenlänge von 334, 340 oder 365 nm bestimmt.

Die gebildete NADPH-Menge, zu messen an der Extinktionszunahme, ist der Stärkemenge äquivalent.

4 Geräte

Übliches Laborgerät sowie zusätzlich:

- Spektralphotometer, geeignet für Messungen bei einer Wellenlänge von 340 nm, mit einer spektralen Bandbreite von höchstens ± 5 nm

Anmerkung: Es können auch Spektrallinien-Filterphotometer mit Quecksilberdampf Lampe, die eine Messung bei 365 bzw. 334 nm gestatten, verwendet werden.

- Analysenwaage, auf 0,0001 g ablesbar
- Wasserbad, heizbar, geeignet für den Temperaturbereich von 50 bis 60 °C
- Magnetrührer, mit Heizplatte
- pH-Meßgerät mit Glaselektrode
- Meßkolben mit Kegelschliffhülse und Schliffstopfen, Volumen 250 ml, z. B. nach DIN 12 664 Teil 1
- Glasfilter, die vor Gebrauch mehrmals mit heißem Wasser zu waschen sind
- Küvetten aus Glas oder Kunststoff, Schichtdicke 1 cm
- Enzymtest-Meßpipetten, Klasse AS, auf teilweisen Ablauf justiert, nach DIN 12 699
- Weithals-Erlenmeyerkolben mit Kegelschliffhülse und Schliffstopfen, Volumen 100 ml

5 Chemikalien und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien zu verwenden.

Das Wasser muß entweder frisch bidestilliert oder von entsprechender Reinheit sein. Unter „Lösung“ ist eine wäßrige Lösung zu verstehen.

- Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 8 \text{ mol/l}$ ¹⁾
- Dimethylsulfoxid ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)

¹⁾ c = Stoffmengenkonzentration
 w = Massenanteil
 ρ = Massenkonzentration bei 20 °C

Fortsetzung Seite 2 bis 5

Normenausschuß Materialprüfung (NMP) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
 Normenausschuß Papier und Pappe (NPa) im DIN

- Spezielle Aktivkohle ²⁾
- Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 5 \text{ mol/l}$
- Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol/l}$
- β -Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat-Dinatriumsalz (β -NADP- Na_2), $w =$ mindestens 98% ¹⁾
- Adenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz ($\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), $w =$ mindestens 98% ¹⁾
- Amyloglucosidase (EC. 3.2.1.3), aus *Aspergillus niger*, Lyophilisat, 6 U/mg ³⁾
Die Substanz ist bei 4 °C, trocken gelagert, stabil.
- Enzymsuspension (HK/G6P-DH): Hexokinase (EC 2.7.1.1) aus Hefe, $\rho_{\text{HK}} = 2 \text{ mg/ml}$ ¹⁾, etwa 280 U/ml ³⁾ und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) aus Hefe, $\rho_{\text{G6P-DH}} = 1 \text{ mg/ml}$ ¹⁾, etwa 140 U/ml ³⁾, in Ammoniumsulfat-Lösung $c[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = 3,2 \text{ mol/l}$ ¹⁾.
Die Suspension ist bei 4 °C mindestens 1 Jahr haltbar.
- Triethanolamin-Pufferlösung:

Lösung I:

17,5 g Triethanolamin-hydrochlorid und 0,30 g Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, werden in 80 ml Wasser gelöst, mit etwa 5 ml Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 5 \text{ mol/l}$, auf $\text{pH} = 7,6$ eingestellt und mit Wasser auf 100,0 ml aufgefüllt.

Lösung II:

60 mg β -NADP- Na_2 werden in 6 ml Wasser gelöst.

Lösung III:

300 mg $\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und 300 mg Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3 , werden in 6 ml Wasser gelöst.

Die Lösungen I, II und III sind bei 4 °C mindestens 4 Wochen haltbar.

Zum Herstellen der Triethanolamin-Pufferlösung werden 8 ml Lösung I mit je 1 ml Lösung II und III gemischt.

Die Pufferlösung ist bei 4 °C mindestens 1 Woche, bei -20 °C etwa 2 Monate, haltbar.

- Citrat-Pufferlösung:

Lösung I:

6,9 g Citronensäure, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, und 9,1 g Trinatriumcitrat, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, werden in 150 ml Wasser gelöst, mit Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol/l}$, auf $\text{pH} = 4,6$ eingestellt und mit Wasser auf 200,0 ml aufgefüllt.

Die Lösung ist bei 4 °C mindestens 1 Jahr haltbar.

Lösung II:

30 mg Amyloglucosidase werden in 2 ml Wasser gelöst.

Die Lösung ist bei 4 °C etwa 6 Wochen, bei -20 °C etwa 3 Monate haltbar.

Zur Herstellung der Citrat-Pufferlösung werden 5 ml Lösung I und 1 ml Lösung II gemischt.

Die Pufferlösung ist bei 4 °C etwa 6 Wochen, bei -20 °C etwa 3 Monate haltbar.

1) Siehe Seite 1

2) Über Bezugsquellen gibt Auskunft: DIN-Bezugsquellen für normgerechte Erzeugnisse im DIN, Burggrafenstraße 6, 1000 Berlin 30.

3) Auf Empfehlung der International Union of Biochemistry (IUB) Commission of Enzymes (CE) von 1972 wird die Enzymaktivität in Internationalen Einheiten (U) angegeben.

Mit 1 International Unit (1 U) wird die Enzymmenge(-aktivität) angegeben, die unter Standardbedingungen – unter anderem Temperatur 25 °C – die Umsetzung von 1 μmol Substrat je min katalysiert.

6 Probenahme

Nach DIN ISO 186. Damit bis zur Durchführung der Prüfung keine Veränderung der Probe eintritt, ist diese in Aluminiumfolie einzuschlagen.

7 Probenvorbereitung

Die nach Abschnitt 6 erhaltene Probe wird zerkleinert, z.B. in Schnitzel von etwa 2 mm \times 2 mm Kantenlänge zerschnitten. Außerdem sind für die Bestimmung der flächenbezogenen Masse nach DIN ISO 536 und zur Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes nach DIN ISO 287 gesondert mengengerechte Anteile zu entnehmen.

8 Bestimmung der flächenbezogenen Masse

Nach DIN ISO 536.

9 Bestimmung der Trockenmasse

Nach DIN ISO 287.

10 Durchführung

Es sind Parallelbestimmungen von mindestens 2 Proben durchzuführen.

10.1 Aufschluß

Etwa 2 g der nach Abschnitt 7 vorbereiteten Probe, auf 3 Stellen nach dem Komma gewogen, werden in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben mit 5 ml Salzsäure, 8 mol/l, durch kräftiges Schütteln gut suspendiert. Nach Zugabe von 20 ml Dimethylsulfoxid wird 30 min in einem 60 °C warmen Wasserbad mit einem Magnetrührer kräftig gerührt. Um Überhitzungen am Boden des Kolbens zu vermeiden, ist der Erlenmeyerkolben mit einer Stativklammer so zu befestigen, daß direkter Bodenkontakt vermieden wird. Die Mischung wird dann auf Raumtemperatur abgekühlt, mit etwa 50 ml Wasser versetzt, mit Natriumhydroxid-Lösung, 5 mol/l, auf einen pH-Wert von 4 bis 5 eingestellt (keinesfalls höher!) und aus dem Erlenmeyerkolben quantitativ unter Nachspülen mit Wasser in einen 250-ml-Meßkolben übergeführt.

Nach erneutem Temperieren auf Raumtemperatur und Entfernen des Rührmagneten wird bis zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und filtriert, wobei die ersten Milliliter des Filtrats verworfen werden.

Das Filtrat wird in einem Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen gesammelt (Probelösung = V_1). Von dieser Probelösung werden 0,5 ml **sofort** zur Prüfung eingesetzt (V_2).

Schwache Trübungen stören die Bestimmung in der Regel nicht.

Anmerkung: Ist die Probenlösung gefärbt, so wird mit spezieller Aktivkohle ²⁾ versetzt und über Glasfaserfilter filtriert. (1 g/100 ml Probelösung, 1 bis 5 min unter mehrfachem Umschütteln einwirken lassen).

10.2 Bestimmung

Das Absorptionsmaximum von NADPH liegt bei einer Wellenlänge von 340 nm. Bei Verwendung eines Spektralphotometers wird nur im Absorptionsmaximum gemessen. Bei Verwendung eines Spektrallinien-Filterphotometers mit Quecksilberdampfampe wird bei einer Wellenlänge von 365 nm oder 334 nm gemessen.

Zum nachfolgenden Pipettieren dürfen keine Vollpipetten verwendet werden. Enzym-, Coenzym- und Pufferlösung können auch mit Kolbenhubpipetten zudosiert werden. Für die Probelösung ist grundsätzlich eine Enzymtest-Meßpipette (siehe Abschnitt 4) zu verwenden.