

**Werner-Heisenberg-Gymnasium Garching**

**Oberstufe 2010/2012**

**Seminararbeit im Fach Biologie**

## **Qualitative und quantitative Analyse von Azofarbstoffen in Süßwaren**



**Verfasser: Philipp Schuster**

**Kursleiter: Hr. Dr. Ralf Laupitz**

**Abgabe: 8. November 2011**

# Abkürzungsverzeichnis

AR	Allurarot
c	Konzentration
d	Schichtdicke
DC	Dünnschichtchromatographie
DFA	Deutsche Forschungsanstalt
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
GO	Gelborange S
I	Intensität des durchgelassenen Lichtes
$I_0$	Intensität des auftreffenden Lichts
$\Delta I$	relative Intensitätsabnahme
PaP	Polyamidpulver
RV	Rotationsverdampfung
SC	Säulenchromatographie
TUM	Technische Universität München

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Köhler, der mir das Praktikum an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie ermöglichte. Dies ist heutzutage nicht mehr selbstverständlich, denn Praktikanten bedeuten oft einen erhöhten Arbeitsaufwand für mehrere Mitarbeiter.

Ich bedanke mich bei Frau Graß für ihre Betreuung bei allen praktischen Versuchsdurchführungen während des kompletten Praktikums.

Auch Herrn Brunnbauer danke ich vor allem für die Unterstützung bei der Durchführung der Photometrie und für die Beantwortung all meiner weiteren Fragen.

Herrn Dr. Laupitz danke ich recht herzlich für die Unterstützung während meines Praktikums, obwohl Ferien waren, opferte er seine Zeit und fuhr mich zur DFA für Lebensmittelchemie.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1. Allgemeine Informationen zu Azofarbstoffen.....	6
1.2. Gefahrenpotenzial mancher Azofarbstoffe.....	6
1.2.1. Krebsrisiko.....	6
1.2.2. Warnhinweis: „Kann Aktivität und Aufmerksamkeit bei Kindern beeinträchtigen!“.....	7
1.3. Zielsetzung der Arbeit.....	7
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>9</b>
2.1. Material.....	9
2.1.1. Geräte.....	9
2.1.2. Chemikalien.....	10
2.2. Methoden.....	11
2.2.1. Säulenchromatographie.....	11
2.2.1.1. Aufbau einer Säulenchromatographie.....	11
2.2.1.2. Prinzip der Säulenchromatographie.....	13
2.2.1.3. Trennung des synthetischen Farbstoffes der Probe durch Säulenchromatographie.....	13
2.2.1.3.1. Vorbereitung der Proben für Microsäulenchromatographie.....	14
2.2.1.3.2. Durchführung der Microsäulenchromatographie.....	15
2.2.2. Rotationsverdampfung.....	16
2.2.2.1. Aufbau des Rotationsverdampfers.....	16
2.2.2.2. Wirkungsweise der Rotationsverdampfung.....	17
2.2.2.3. Einengung mittels Rotationsverdampfung.....	17

2.2.3. Dünnschichtchromatographie.....	18
2.2.3.1. Aufbau einer Dünnschichtchromatographie.....	18
2.2.3.2. Prinzip der Trennung durch Dünnschichtchromatographie.....	19
2.2.3.3. Identifikation mittels Dünnschichtchromatographie.....	20
2.2.4. Photometrie.....	21
2.2.4.1. Prinzip der Photometrie.....	21
2.2.4.2. Ermittlung der Konzentration mittels Photometrie.....	22
2.2.4.3. Ermittlung der Konzentration der Azofarbstoffe mittels Photometrie.....	22
<b>3. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>24</b>
3.1. Qualitativer Nachweis.....	24
3.1.1. Ergebnis der Microsäulenchromatographie.....	24
3.1.2. Probleme bei der Extraktion der Farbstoffe aus Probe 1-8.....	24
3.1.3. Test der Proben 1-8 auf natürliche Farbstoffe.....	26
3.1.4. Identifikation der Azofarbstoffe in Probe 9 und 10.....	27
3.2. Quantitativer Nachweis durch Photometrie.....	28
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>31</b>
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>32</b>
5.1. Literaturquellen.....	32
5.2. Internetquellen.....	33

## 1. Einleitung

In Süßwaren werden oft Azofarbstoffe verwendet, denn diese haben teilweise knallbunte Farben und werben das Produkt, vor allem gegenüber der Ziel-Kaufgruppe „Kinder“, optisch stark auf. Dabei wird leider meist außer Acht gelassen, dass diese synthetisch hergestellten Lebensmittelfarbstoffe nicht immer ganz ungefährlich sind.

### 1.1. Allgemeine Informationen zu Azofarbstoffen

Charakteristisch für einen Azofarbstoff sind die Azogruppen ( $-N=N-$ ). Neben der strukturellen Charaktereigenschaft, ist die Azogruppe ein Teil des Chromophors im Molekül, beispielhaft an der Strukturformel von Azorubin in Abbildung 1 zu erkennen, und beeinflusst neben den Auxochromen und Antiauxochromen die Farbgebung des Moleküls.

Durch die 3 Gruppen (Auxochrom und Antiauxochrom sind nur optional enthalten) absorbiert das Molekül elektromagnetische Wellen aus dem sichtbaren Spektrum des Sonnenlichts, wodurch das Farbstoffmolekül in der Komplementärfarbe zum absorbierten Lichtspektrum erscheint.

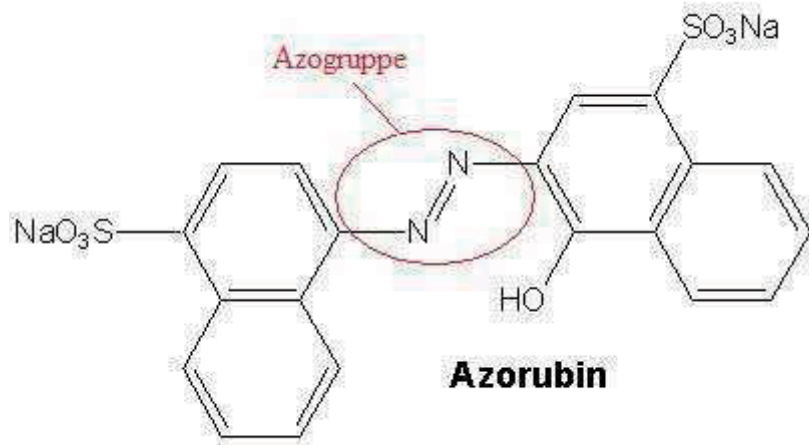


Abbildung 1: Strukturformel von Azorubin (6I/bearbeitet mit Paint)

### 1.2. Gefahrenpotenzial mancher Azofarbstoffe

#### 1.2.1. Krebsrisiko mancher Azofarbstoffe

Die in der Nahrung aufgenommen Azofarbstoffe sind als inaktive Farbstoffmoleküle biologisch anfangs noch inaktiv. In lebenden Organismen können sie jedoch durch die

Enzyme der Azoreduktasen der Darmbakterien und der Azoreduktasen, die vorwiegend in der Leber, aber auch in anderen Geweben vorhanden sind, reduziert werden. Diese reduktive Spaltung setzt die aromatischen Amine frei, die als Kupplungskomponenten bei der Herstellung dieser Azofarbstoffe benutzt wurden. Weil die freigesetzten aromatischen Amine nun gut bioverfügbar sind, muss im Organismus mit einer biologischen Wirkung dieser Amine gerechnet werden, welche krebserregend wirken können (5L).

### 1.2.2. Warnhinweis: „Kann Aktivität und Aufmerksamkeit bei Kindern beeinträchtigen!“

„Im Jahr 2007 hat eine von der britischen Food Standards Agency (FSA) in Auftrag gegebene klinische Studie festgestellt, dass der Verzehr bestimmter künstlicher Lebensmittelfarbstoffe hyperaktives Verhalten bei Kindern hervorrufen kann. McCann und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss von künstlichen Farbstoffen auf das Verhalten von 153 Dreijährigen und 144 Acht- bis Neunjährigen. Die Kinder bekamen einen Testdrink, der sowohl Natriumbenzoat als auch einen von zwei Farbmixturen (A: E 110, E102, E122, E124 / B: E110, E104, E122, E129) oder einen Placebomix enthielt. Während bei den Dreijährigen nur Mix A einen signifikanten Effekt hatte, zeigten bei den Acht- bis Neunjährigen Mix A und B einen signifikanten Einfluss auf das Verhalten, wenn die Kinder mehr als 85 Prozent des Safts getrunken hatten. Das Fazit der Forscher lautete: „Künstliche Farbstoffe oder Natriumbenzoat oder beides in der Ernährung erhöht die Hyperaktivität bei dreijährigen und acht- bis neunjährigen Kindern in der Normalbevölkerung (1I).“

Die deutschen Behörden sahen zwar ein, dass die Azofarbstoffe möglicherweise Einfluss auf die Aktivität von Kindern haben, aber sie sahen keinen deutlichen Zusammenhang zwischen den aufgenommenen Stoffen und den beobachteten Effekten. Das Europaparlament war jedoch anderer Meinung und beschloss, dass der Warnhinweis „Kann Aktivität und Aufmerksamkeit bei Kindern beeinträchtigen!“ ab dem 20. Juli 2010 auf Produkten mit den betreffenden Azofarbstoffen vorhanden sein muss (1I).

Beispiele für diese in Frage stehenden Azofarbstoffe sind:

Tartrazin (E 102), Azorubin (E 122), Cochenillerot A (E 124), Allurarot (E 129) (2I).

### 1.3. Zielsetzung der Arbeit

Bei der Suche nach einem interessanten Thema für meine Seminararbeit stieß ich im Zuge einer Internetrecherche auf das Thema „Azofarbstoffe in Süßwaren“. Wie in 1.2.2. schon erwähnt, muss seit dem 20. Juli 2010 ein Warnhinweis bei den entsprechenden Produkten aufgebracht werden. Wenn man jedoch heutzutage durch den Supermarkt geht, sieht man auf keinem einzigen Produkt auch nur eine Anmerkung über das Vorhandensein von Azofarbstoffen, sondern es wird mit der Verwendung von natürlichen Farbstoffen geworben.

Da stellt sich die Frage, ob die Hersteller es tatsächlich in nur einem Jahr geschafft haben, die als bedenklich eingestuften Azofarbstoffe durch natürliche Farbstoffe zu ersetzen, oder, ob sie durch die Bezeichnung „natürliche Farbstoffe“ nur den gesetzlich vorgeschriebenen Hinweis auf ihren Verpackungen umgehen wollen und trotzdem noch Azofarbstoffe in ihren Produkten verwenden. Deswegen testete ich stichprobenweise 10 Proben von Süßwaren aus Supermärkten auf Azofarbstoffe, um herauszufinden, ob sich nun trotz fehlendem Warnhinweis immernoch Azofarbstoffe in diesen Süßwaren befinden.

Alle praktischen Versuche führte ich an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie der TUM in Weihenstephan durch.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Geräte**

Bei der praktischen Versuchsdurchführung wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Geräte verwendet.

<b><u>Gerät</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
diverse Glasbehälter	Unbekannter Hersteller
Magnetrührer	IKA
Wasserbad auf Magnetrührer	Unbekannter Hersteller
Einwegspritze 10ml	Terumo
mg- Waage	Sartorius
µg- Waage	Sartorius
Kieselgelplatte	Merck
Micropipette 2µg	Blaubrand
Micropipette 5µg	Blaubrand
Eppendorf-Pipette P10	Brand
Eppendorf-Pipette P20	Brand
Eppendorf-Pipette P100	Brand
Eppendorf-Pipette P200	Brand
Eppendorf-Pipette P1000	Brand
Eppendorf-Pipette P5000	Brand
Glaspipette 10ml	Blaubrand
Glaspipette 40ml	Blaubrand
Pileusball	VWR
Eppendorf Caps	Unbekannter Hersteller
Reaktionsgefäßständer	Brand
Zentrifuge	Unbekannter Hersteller
pH-Streifen pH 4-7	Merck
pH-Streifen pH 0-6	Merck
pH-Streifen pH 5-10	Merck
Parafilm	Bemis
Rotationsverdampfer	Büchi
Minishaker	IKA
Photometer	Unbekannter Hersteller
Messer	Unbekannter Hersteller

*Tabelle 1: Verwendete Geräte (erstellt durch OpenOffice Calc)*

### 2.1.2. Chemikalien

Bei der praktischen Versuchsdurchführung wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Chemikalien verwendet.

<b><u>Chemikalie</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Probe 1 = Mini-Burger „Fleisch mit Brötchen“	Trolli
Probe 2 = Mini-Burger „Brötchen“	Trolli
Probe 3 = Lachgummi „Auge“	Nimm 2
Probe 4 = Lachgummi „Orange“	Nimm 2
Probe 5 = Fruchtige Bärchen „Rotes Bärchen“	Rewe
Probe 6 = Fruchtige Bärchen „Gelbes Bärchen“	Rewe
Probe 7 = Saftfrüchte „Rote Frucht“	Sugarland
Probe 8 = Saftfrüchte „Gelbe Frucht“	Sugarland
Probe 9 = Jelly Beans „Orange Bohne“	Jelly Belly
Probe 10 = Jelly Beans „Rote Bohne“	Jelly Belly
Natriumhydrogencarbonat	Unbekannter Hersteller
dest. Wasser	Unbekannter Hersteller
Methanol	Unbekannter Hersteller
Methansäure	Unbekannter Hersteller
Kaliumhydrogensulfat	Unbekannter Hersteller
Polyamid	Macherey-Nagel
Seesand	Unbekannter Hersteller
Glaswolle	Unbekannter Hersteller
Gelborange S E110	Unbekannter Hersteller
Allurarot AC E129	Unbekannter Hersteller
Natriumhydroxid	Unbekannter Hersteller
Ammoniaklösung 25%	Merck
Curcumin E100	Unbekannter Hersteller
Tartrazin E102	Unbekannter Hersteller
Chinolingelb E104	Unbekannter Hersteller
Azorubin E122	Unbekannter Hersteller
Ethylacetat	Unbekannter Hersteller
Pyridin	Unbekannter Hersteller
Kieselgel G 60 F254	Unbekannter Hersteller

*Tabelle 2: Verwendete Chemikalien (erstellt durch OpenOffice Calc)*

## 2.2. Methoden

In diesem Teil der Arbeit wird zu jeder Methode zuerst eine allgemeine Vorgehensweise bzw. Durchführung beschrieben und dann wird in einem zweiten Teil die Vorgehensweise dargestellt, die bei der praktischen Arbeit genutzt wurde.

### 2.2.1. Säulenchromatographie

Eine SC wird dazu genutzt, um aus einer Probe eine oder mehrere Bestandteile zu eluieren, damit man die Probe in ihre einzelnen Bestandteile zerlegt hat und mit diesen dann weiter arbeiten kann.

#### 2.2.1.1. Aufbau einer Säulenchromatographie

Das wichtigste Element bei einer SC ist die zu trennende Probe, die in einem Adsorbens gelöst vorliegt. Ein geeignetes Säulenrohr (auch als Trennrohr bezeichnet), welches „*im unteren konisch verengt und mit einem Hahn versehen*“ (8L, S.31) ist, wird vorerst über eine Halterung so befestigt, dass es senkrecht ungefähr 10 cm über dem Boden hängt. Darunter wird ein geeignetes Sammelgefäß, wie z.B. ein Erlenmeyerkolben gestellt. Der untere Teil des Säulenrohrs wird mit Wolle oder Seesand abgedichtet, damit das feinkörnige Adsorptionsmittel nicht austreten kann. Auf die Wolle folgt dann das Adsorbens, das am besten mit einem Lösungsmittel leicht aufgeschlämmt und so dann in das Säulenrohr gegeben wird. Anschließend wird die Probe auf das Adsorbens aufgebracht und sickert in jenes ein. Wie man in Abbildung 2 erkennen kann, sollte diese gesamte Schicht der trennaktiven Säulenfüllung ca. 2/3 des Trennrohres einnehmen. Nun kann von oben das Elutionsmittel hinzugegeben werden, um mit der SC zu beginnen (8L).

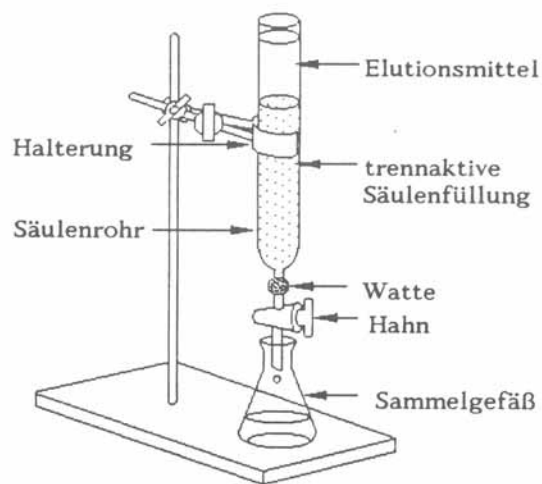


Abbildung 2: "Trennsäule für die Säulenchromatographie" (8L, S.29)

Wenn man eine SC mit kleineren Probenmengen durchführen möchte, kann man alternativ zum Säulenrohr auch eine Einwegspritze, aus der man den Spritzenkolben herausgezogen hat, benutzen; der Aufbau ist in Abbildung 3 beschrieben. Die Kanüle kann man gegebenenfalls aufsetzen, um die Tropfgeschwindigkeit zu vermindern (8L, S. 29-33).

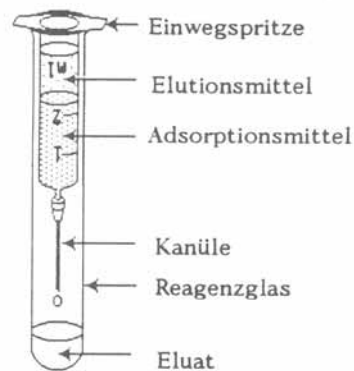


Abbildung 3: "Einwegspritze als Säulenrohr benutzt" (8L, S.32)

#### 2.2.1.2. Prinzip der Säulenchromatographie

Bevor man mit der SC beginnt, muss man sich erst einmal entscheiden, welches Adsorbens am geeignetsten für die betreffende Probe ist. Man unterteilt in polare und unpolare Adsorptionsmittel. Je nachdem, wie polar die Adsorptionsmittel sind, absorbieren sie stärker (sehr polar) oder schwächer (wenig polar). Die am häufigsten benutzten und universellsten polaren Lösungsmittel sind Silicagel und Aluminiumoxid. Unpolare Adsorbentien sind u. a. Aktivkohle und Polyamide. Bei der Trennung mit Aktivkohle spielt eher die Molekülmasse als die Polarität der Stoffe eine Rolle. Bei der Chromatographie mit Polyamiden werden die Bildungen von Wasserstoffbrückenbindungen zur Trennung genutzt. Um am Ende in den Eluatens jeweils die richtigen Bestandteile der Probe zu haben, muss man bei mehreren zu eluierenden Stoffen die Sammelgefäße unter dem Säulenrohr rechtzeitig wechseln. Bei Farbstoffen lässt sich besonders gut erkennen, wann ein Farbstoff komplett eluiert wurde und der nächste Farbstoff anfängt, sich vom Adsorbens zu lösen. Das Adsorptionsmittel wird bei der SC als stationäre Phase bezeichnet. Das fließende Elutionsmittel nennt man mobile Phase. Die Trennung der einzelnen Bestandteile voneinander und von dem Adsorbens ist nur aufgrund der unterschiedlichen Polarität der einzelnen Stoffe und der verschiedenen Bindungsmöglichkeiten untereinander möglich. So entzieht das Elutionsmittel dem Adsorbens beim Vorbeifließen nach und nach die absorbierten Bestandteile der Probe. Anfangs wird vom Elutionsmittel der am stärksten bindende Bestandteil der Probe aus der stationären Phase gelöst und gebunden, bis am Ende der am schwächsten bindende Bestandteil adsorbiert wird. Weil allerdings immer erst ein Bestandteil komplett herausgelöst und gebunden wird, ist es wichtig, die Sammelgefäße rechtzeitig zu wechseln, um eine bestmögliche Trennung der Bestandteile zu erzielen (8L, S.29-33; 3I).

#### 2.2.1.3. Trennung des synthetischen Farbstoffes der Probe durch Säulenchromatographie

Bei dieser Trennung durch SC wird die Probe nicht, wie vorher beschrieben, erst im Säulenrohr zum Adsorbens hinzugegeben, sondern der nachzuweisende Bestandteil der Probe wird schon vorher an das Adsorptionsmittel gebunden. Um dies zu erreichen, sind noch ein paar Arbeitsschritte vor der SC nötig.

#### 2.2.1.3.1. Vorbereitung der Proben für Microsäulenchromatographie

Der erste Schritt besteht darin, die Probe in einem Milieu von Wasser und Kaliumhydrogensulfat zu lösen. Dafür werden von jeder Probe exakt 5 g abgewogen und in 40 ml Wasser und 10 ml Kaliumhydrogensulfat gelöst. Da die Proben ziemlich groß sind, kann man sie mit einem Messer in kleinere Stücke zerschneiden, siehe Abbildung 4, damit der Lösungsvorgang schneller abläuft.



*Abbildung 4: Zerkleinerung der Probe 7*

Außerdem kann man den Lösungsvorgang noch weiter beschleunigen, indem man die Suspension, wie in Abbildung 5 gezeigt, in ein isoliertes Wasserbad auf einen Magnetrührer stellt, um so die Temperatur zu erhöhen und das gleichmäßige Auflösen der Probe durch Rotation des Magnetfisches zu optimieren.



*Abbildung 5: Probe 2 in isoliertem Wasserbad auf Magnetrührer*

Nachdem sich alle Proben aufgelöst haben, gibt man jeweils 1-2 g PaP zu den Suspensionen hinzu, rührt diese ausgiebig und lässt die Proben mind. 2 Stunden stehen. Das PaP sollte danach den Farbstoff komplett adsorbiert haben und die überstehende Lösung sollte komplett farblos sein (7L).

#### 2.2.1.3.2. Durchführung der Microsäulenchromatographie

Weil das PaP nur eine geringe Masse von 1-2 g und ein geringes Volumen hat, reicht in diesem Fall eine Microchromatographiesäule, deren Aufbau man in Abbildung 3 gut erkennen kann(siehe 2.2.1.1.). Der einzige Unterschied zur oben beschriebenen Vorgehensweise ist, dass als Sammelgefäße keine Reagenzgläser, sondern Bechergläser und Rundkolben benutzt wurden.

Die Micro-SC wurde bei den Proben 7,9 und 10 durchgeführt.

Als erstes wurde die farblose überstehende Lösung abgeschüttet und abpipettiert, dann wurde das mit Farbstoff adsorbierte PaP in die Einwegspritze auf den Seesand gegeben. Um die Trennung des Farbstoffes vom PaP zu erleichtern, wurde die PaP-Suspension erst mit 80 ml heißem Wasser und 15 ml Methanol gespült. Im Sammelgefäß sollte jetzt eine farblose Flüssigkeit zurückbleiben, die weggeschüttet werden kann. Als Nächstes werden die Farbstoffe mit 10 ml methanolischer Ammoniaklösung ( Verhältnis von Methanol zu Ammoniaklösung 25% : 95/5) und 10 ml methanolischer NaOH-Lösung (1 g NaOH in 1 Liter Methanol 70%) eluiert. Das Eluat wird in einem Rundkolben aufgefangen, der später direkt in den Rotationsverdampfer eingesetzt werden kann (7L).

### 2.2.2. Rotationsverdampfung

Die Methode der RV wird angewendet, um flüssige Stoffgemische effizient und schonend thermisch zu trennen (4I).

#### 2.2.2.1. Aufbau des Rotationsverdampfers

Generell kann man sagen, dass der Rotationsverdampfer eine besonders ausgeklügelte Form einer normalen Destillationsapparatur darstellt.



*Abbildung 6: Rotationsverdampfer, bearbeitet mit Paint*

Der Grundaufbau, in Abbildung 6 veranschaulicht, besteht aus einem Verdampferkolben, der in einem Wasserbad erwärmt wird. Dieser wird über ein Dampfrohr mit dem Kühler verbunden, den eine Spirale mit kaltem Wasser durchläuft und an dessen unterem Ende ein Auffangkolben montiert ist. Das komplette System ist luftdicht verschlossen.

Das Besondere an einem Rotationsverdampfer ist, wie der Name schon sagt, dass der Verdampferkolben im warmen Wasserbad um seine eigene Achse rotiert. Dadurch ist eine gleichmäßige Erwärmung der flüssigen Probe garantiert. Durch die gleichmäßige Erwärmung ergibt sich der Vorteil, dass die freie Konvektion innerhalb der Probe verhindert wird und so das Blasensieden ausbleibt. Außerdem kann man bei manchen Rotationsverdampfern auch ein Vakuum herstellen (in Abbildung 6 ist die Vakuumpumpe im Hintergrund zu erkennen), um so eine niedrigere Siedetemperatur des zu siedenden Lösungsmittels zu erzielen und so das Risiko der Zersetzung der Lösungsbestandteile zu vermindern (4I; 5I).



#### 2.2.2.2. Wirkungsweise der Rotationsverdampfung

Die in der Probe enthaltenen Bestandteile haben alle eine unterschiedliche Siedetemperatur. Dieser Unterschied wird bei der Destillation zur Trennung der Stoffe genutzt. Durch das erzeugte Vakuum reichen geringe Temperaturen aus, um die meisten Stoffe zu Verdampfen. Diese Stoffe steigen dann im gasförmigen Zustand über das Dampfrohr in den Kühler auf. Der Dampf kondensiert dann innerhalb des Kühlers an der Oberfläche der Spirale, die mit kaltem Wasser gefüllt ist und tropft dann in den Auffangkolben. Je nachdem auf welches Volumen man die Probe mit dem gewünschten Stoff einengen will, muss man die RV nach einer bestimmten Zeit beenden (4I; 5I).

#### 2.2.2.3. Einengung mittels Rotationsverdampfung

Die mittels SC isolierten Azofarbstoffe lagen nun in einem Lösungsmittel mit den Elutionsmitteln methanolische Ammoniaklösung und methanolische Natriumhydroxidlösung vor. Um die Konzentration der Azofarbstoffe in der Lösung auf ein Maximum zu erhöhen, wurden die Proben 9 und 10 nun durch RV auf ein Volumen von 1ml eingeengt. Dazu wurden die 2 Rundkolben, in denen die Elutionsmittel mit den Azofarbstoffen nach der SC aufgefangen wurden, an den Rotationsverdampfer montiert und die RV wurde durchgeführt. In Abbildung 6 kann man am Wasserbad ein Rädchen sehen, mit dem manuell die Temperatur auf ca. 80°C gestellt wurde und über dem Dampfrohr ist ein weiteres Rädchen, mit dem eine mittlere Rotationsgeschwindigkeit des Verdampferkolbens eingestellt wurde. Nachdem nun das Volumen auf ca. 1ml eingeengt war, wurde die RV gestoppt und die Rundkolben mit den Proben wurden entnommen (7L).

### 2.2.3. Dünnschichtchromatographie

Wie die SC, ist die DC eine Art der Chromatographie. Daher steht auch bei der DC die Trennung einzelner Bestandteile eines Stoffes im Vordergrund. Ergänzend dazu ist noch der direkte Vergleich verschiedener Substanzbestandteile möglich.

#### 2.2.3.1. Aufbau einer Dünnschichtchromatographie

Die zwei elementaren Bestandteile einer DC sind die stationäre Phase und die mobile Phase. Durch diese 2 Phasen ist eine Auftrennung der Probe in ihre verschiedenen Bestandteile möglich. Die stationäre Phase besteht aus einem Adsorbens, das „üblicherweise auf eine Glasplatte oder Folien aus unterschiedlichem Material wie z.B. Kunststoff oder Aluminium aufgebracht“ (2L, S.51) ist. In der Regel sind diese Adsorbentien stark polar. Die mobile Phase bildet ein Fließmittel, welches dagegen meist unpolare Charaktereigenschaften aufweist. Die Proben werden nun auf das Adsorbens aufgetragen. Dazu werden kleinste Micropipetten benutzt, deren Aufzugsvolumen zwischen 1 µl und 10 µl liegt. Die Spitze dieser Micropipetten gibt man nun in die Probe und durch die Kapillarkräfte wird die Probe in die Pipette hochgezogen. Vor dem Auftragen auf das Adsorbens muss man noch beachten, dass man einen ganz bestimmten räumlichen Abstand zwischen den einzelnen aufgetragenen Proben einhält.

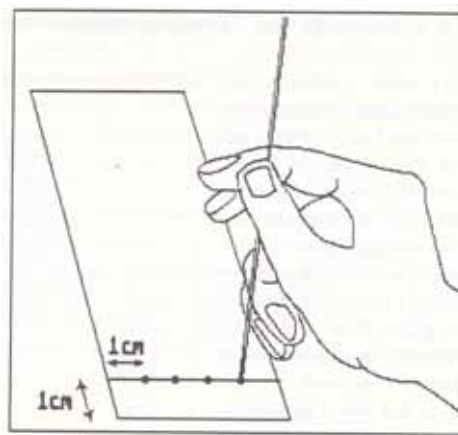


Abbildung 7: Auftragung einer Probe auf DC-Platte (8L, S.69)

In Abb.7 kann man erkennen, dass die Abstände von den Proben zum unteren und zum seitlichem Rand jeweils 1 cm betragen. Auch der Abstand zwischen den einzelnen Proben beträgt beim Auftragen 1 cm. Diese Abstände können gegebenenfalls mit einem Bleistift vor dem Auftragen markiert werden. Um nun das Probenvolumen aus der Micropipette

aufzutragen, hält man diese senkrecht und drückt sie leicht auf das Adsorbens. Dieses adsorbiert die Probe sofort und es bildet sich ein kleiner runder Kreis am Auftragungspunkt, der die Probe enthält. Als nächstes gibt man nun das Fließmittel in eine Chromatographiekammer. Es darf allerdings nur eine Menge bis zu einer max. Höhe von 3-4 mm hineingeschüttet werden, damit später die Auftragungspunkte der Proben nicht schon zu Beginn in dem Fließmittel stehen. Anschließend stellt man die DC-Platte mit den Proben nach unten in die Chromatographiekammer und lehnt sie, wie in Abbildung 8 gezeigt, an der Wand an. Dann kann der Vorgang der DC beginnen (2L, S.23-25 + S.51; 8L, S.65-70).

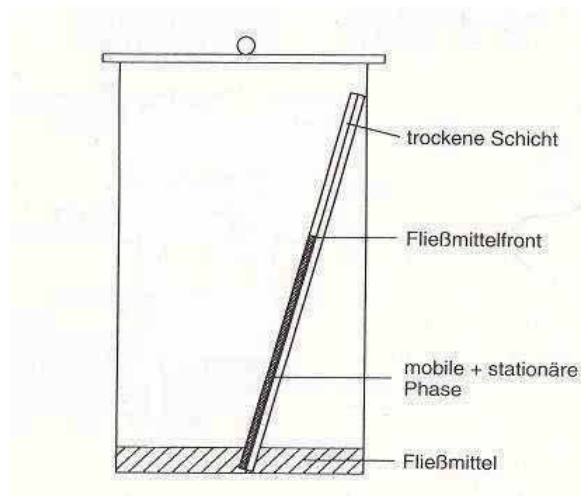


Abbildung 8: Chromatographiekammer  
(2L, S.41/bearbeitet mit Paint)

#### 2.2.3.2. Prinzip der Trennung durch Dünnschichtchromatographie

Für die Auftrennung der Probe in ihre Bestandteile sind die mobile und stationäre Phase verantwortlich. Wie vorher beschrieben, nimmt das Adsorbens die Probe auf und die DC-Platte wird in das Fließmittel der Chromatographiekammer gestellt. Das Laufmittel wird nun vom Adsorbens aufgenommen und wird aufgrund der Kapillarkräfte an der stationären Phase nach oben gezogen. Das Laufmittel nimmt nun die aufgetragenen Substanzen auf und transportiert sie in Fließrichtung vorwärts. Je nachdem, welche Wechselwirkungen ein Bestandteil der Probe mit der stationären Phase eingeht, bleibt er auf unterschiedlichster Strecke am Adsorbens hängen. So wird die Probe in ihre einzelnen Bestandteile aufgeteilt. Man lässt die DC-Platte nun die vorgeschriebene Zeit ruhen und danach kann man auf der DC-Platte die Ergebnisse ablesen. Farbige Stoffe kann man gleich auf der DC-Platte erkennen, bei farblosen Stoffen muss man die DC-Platte beispielsweise unter eine UV-Lampe halten, um die Stoffe zu erkennen. Wenn man nun noch zusätzlich die einzelnen Stoffe

identifizieren möchte, lässt man Referenzsubstanzen auf der DC-Platte mitlaufen und nach der DC kann man dann die Probenstoffe mit den Referenzsubstanzen vergleichen, ob sie gleich weit gelaufen sind, was darauf zurückzuführen ist, dass es sich um den selben Stoff handeln muss (2L, S.23-25; 8L, S.65-70).

#### 2.2.3.3. Identifikation mittels Dünnschichtchromatographie

Da durch die SC schon alle anderen Stoffe von den Proben getrennt wurden, befand sich in den zwei Proben voraussichtlich nur noch ein Farbstoff in gelöster Form. Deswegen lag der Schwerpunkt bei der DC nicht in der Auftrennung der Probe in ihre verschiedenen Bestandteile, sondern im Vergleich mit anderen Referenzfarbstoffen, um herauszufinden, welcher Farbstoff sich in den Proben befindet. Als stationäre Phase wurde eine Kieselgel-G-60-F254-Platte und für die mobile Phase ein Stoffgemisch aus Ethylacetat-Pyridin-Wasser im Verhältnis 55-25-20 benutzt. Als Referenzfarbstoffe wurden die Farbstoffe Gelborange S (E110), Allurarot AC (E129), Curcumin (E100), Tartrazin (E102), Chinolingelb (E104) und Azorubin (E122) gewählt. Um eine geeignete Probe der Farbstoffe zu bekommen, welche man auf die DC-Platte auftragen kann, wurde von jedem Farbstoff eine Stammlösung (2mg auf 1ml) hergestellt. Die jeweils passenden Lösungsmittel für die Stammlösung wurden aus der Quelle 2L entnommen. Aus jeder Stammlösung wurde dann noch eine Lösung im Verhältnis 1:5 hergestellt, welche dann auch auf die DC-Platte aufgebracht wurde. Es wurden nun von Probe 9 und 10 und von den 6 Referenzfarbstoffen jeweils ein Volumen von 5 µl mit den Micropipetten auf die DC-Platte aufgetragen. Anschließend wurde die DC-Platte in die Chromatographiekammer mit dem Laufmittel gestellt. Nach 45 Minuten war die DC vollendet (2L, S.23-25; 7L).

#### 2.2.4. Photometrie

Die Photometrie ist eine Methode, mit der man in verschiedenen Proben die Konzentration eines Stoffes quantitativ feststellen kann.

##### 2.2.4.1. Prinzip der Photometrie

Bei der Photometrie wird die unterschiedliche Fähigkeit verschiedenster Stoffe elektromagnetisches Licht zu absorbieren genutzt, um so auf die vorliegende Konzentration eines Stoffes in einer Probe schließen zu können.

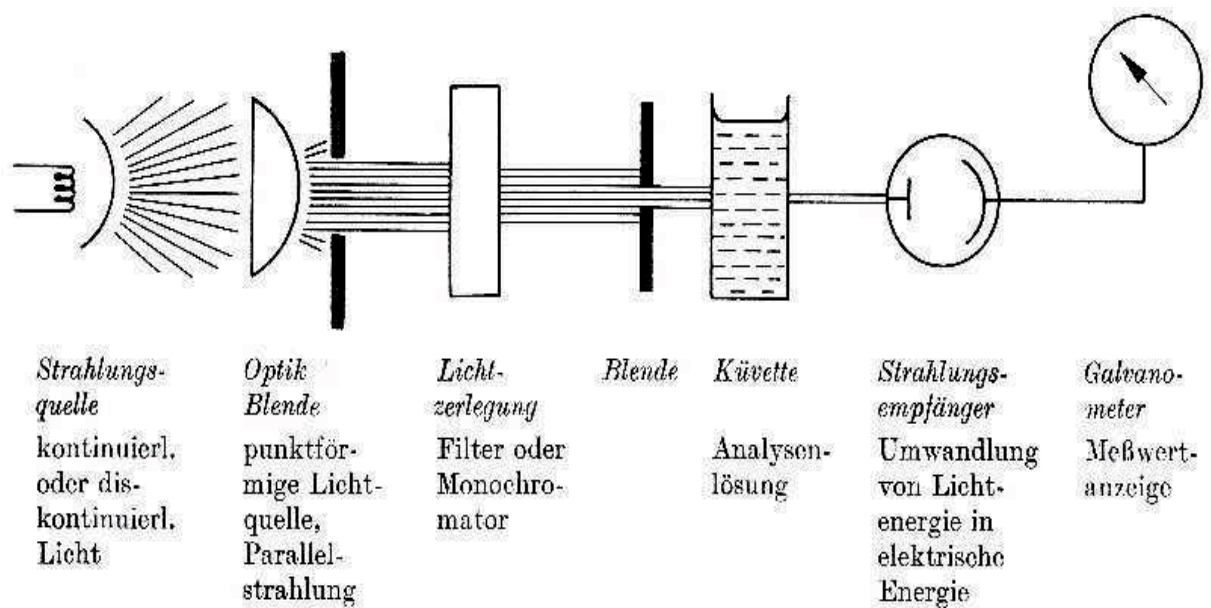


Abbildung 9: "Schematische Darstellung eines Photometers" (3L, S.9)

In Abbildung 9 kann man den schematischen Aufbau eines Photometers mit seinen wesentlichen Bauelementen erkennen. Damit lässt sich das Prinzip der Photometrie erklären. Als erstes benötigt man eine Strahlungsquelle, die Licht erzeugt. Im nächsten Schritt wird dieses Licht, welches noch in alle Richtungen scheint, mittels Optik und Blende auf einen punktförmigen Lichtkegel reduziert. Das von der Strahlungsquelle produzierte Licht ist polychromatisch. Um nun ein passendes Lichtspektrum zur Analyse der Probe zu bekommen und um später die Konzentration eines Stoffes ausrechnen zu können, wird das Licht mittels eines Filters oder Monochromators in monochromatisches Licht umgewandelt. Eine Blende reduziert das monochromatische Licht nun auf einen noch kleineren Lichtkegel, dessen Größe genau bekannt ist, um später die genaue Absorption der Probe berechnen zu können. Dieser punktförmige Lichtkegel trifft nun auf die Küvette, die mit der Probe gefüllt ist. Jeder Stoff weist charakteristische Absorptionseigenschaften auf, die diese Stoffe identifizieren. Durch

die Absorption von Licht werden Elektronen in einen energetisch höheren, erregten Zustand versetzt. Je nachdem, in welchem Zustand die Elektronen in einem Molekül vorliegen, wird weniger (langwellige elektromagnetische Wellen) oder mehr Energie (kurzwellige elektromagnetische Wellen) benötigt. Ein großes delokalisiertes Elektronensystem, sowie Auxochrome und Antiauxochrome setzen die benötigte Energie zum Erregen der Elektronen herunter. Das nicht absorbierte Licht tritt aus der Küvette aus und trifft auf den Strahlungsempfänger. Dieser wandelt die Lichtenergie in elektrische Energie um. Vom Galvanometer wird dieser Wert gemessen und angezeigt. Man bezeichnet ihn als Extinktion (E). (3L).

#### 2.2.4.2. Ermittlung der Konzentration mittels Photometrie

*„Bei der Absorptionsphotometrie wird die Lichtschwächung gemessen, die von der gewählten Wellenlänge des Lichts und der Substanz des Prüflings abhängt.“ (3L, S.4)*

Diese Lichtschwächung lässt sich berechnen, indem man aus der Intensität des auftreffenden Lichts ( $I_0$ ) und der Intensität des durchgelassenen Lichtes (I) einen Quotienten bildet: Diesen „bezeichnet man als Transmissionsgrad:  $T = I/I_0$ “ (3L, S.5). Die Wissenschaftler Bouger, Lambert und Beer beschäftigten sich früher mit den Parametern, welche die Lichtschwächung beeinflussen und fanden heraus, dass die relative Intensitätsabnahme ( $\Delta I$ ) sowohl zur Schichtdicke (d) als auch zur Konzentration (c) proportional ist. Aus diesen Zusammenhängen entwickelten die Wissenschaftler das Lambert-Beersche-Gesetz:  $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ . Mit diesem Gesetz lässt sich eine lineare Kalibriergerade erstellen, mit der man die Konzentration eines Stoffes ermitteln kann, wenn die E bekannt ist (3L; 7I).

#### 2.2.4.3. Ermittlung der Konzentration der Azofarbstoffe mittels Photometrie

Um wie in 2.2.4.2. beschrieben die c der Azofarbstoffe in den Proben herauszufinden, benötigte man eine Kalibriergerade, die sowohl zu jeder E eine c, als auch zu jeder c eine E definiert. Damit man diese Gerade bestimmen konnte, mussten zumindest 2 Werte von einer c, deren genaue E bekannt ist, erhoben werden. Für ein genaueres Ergebnis wurden 3 Werte gewählt. Diese wurden erzielt, indem man zu jeweils 3 Proben mit bekannter c durch Photometrie die zugehörige E ermittelte. Beim Azofarbstoff GO wurden jeweils 3 Verdünnungen der Stammlösung (2mg auf 1ml) im Verhältnis von 1:200, 1:100 und 1:50 gewählt. Auch die 3 Proben zum Azofarbstoff AR wurden als Verdünnung aus der Stammlösung gewonnen. Dieses mal im Verhältnis 1:200, 1:100 und 1:70. Die E der Proben 9

und 10 wurden auch bestimmt. Die unbekannten Konzentrationen ließen sich nun über die Kalibriergeraden bestimmen. In Abbildung 10 ist der Überblick über die verschiedenen Proben für das Photometer zu sehen (6L).



Abbildung 10: Proben für Photometrie



### **3. Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.1. Qualitativer Nachweis der Farbstoffe**

Alle Versuchsdurchführungen mit der entsprechenden Auswahl und Menge der gewählten Chemikalien sind darauf abgestimmt, synthetische Azofarbstoffe nachzuweisen. Deswegen können durch diese Versuche keine anderen Farbstoffe nachgewiesen werden.

##### **3.1.1. Ergebnis der Microsäulenchromatographie**



*Abbildung 11: Elution Probe 9*



*Abbildung 12: Elution Probe 10*

In Abbildung 11 und 12 kann man schön erkennen, wie sich bei Probe 9 und 10 die Farbstoffe beim Eluieren vom PaP lösen. Bei Probe 9 und 10 verlief die Micro-SC einwandfrei, dagegen gab es bei Probe 7 Probleme.

##### **3.1.2. Probleme bei der Extraktion der Farbstoffe aus Probe 1-8**

Das erste Problem, welches sich bei den Proben 1-8 ergab, war die fehlende Adsorption des Farbstoffes vom PaP. Deswegen wurde auch ein beträchtlicher Teil des vorhandenen Farbstoffes vor der Micro-SC durch Abschütten der überstehenden Lösung entfernt. Exemplarisch zeigt dies der Vergleich der Proben 6 und 7 mit 9 und 10 in Abbildung 13.





*Abbildung 13: Vergleich der Proben 6 und 7 mit 9 und 10  
(mit Polyamidpulver)*

Die nächste Problematik stellte sich dann bei der Micro-SC der Probe 7 beim Spülvorgang mit 80 ml heißem Wasser und 15 ml Methanol. Der adsorbierte Farbstoff löste sich schon bei diesem Vorgang vom PaP. In Abbildung 14 kann man erkennen, dass sich beim Spülvorgang der Farbstoff komplett vom Adsorbens gelöst hat und sich nun im Auffangbehälter befindet.



*Abbildung 14: fehlgeschlagene  
Microsäulenchromatographie mit  
Probe 7*

### 3.1.3. Test der Proben 1-8 auf natürliche Farbstoffe

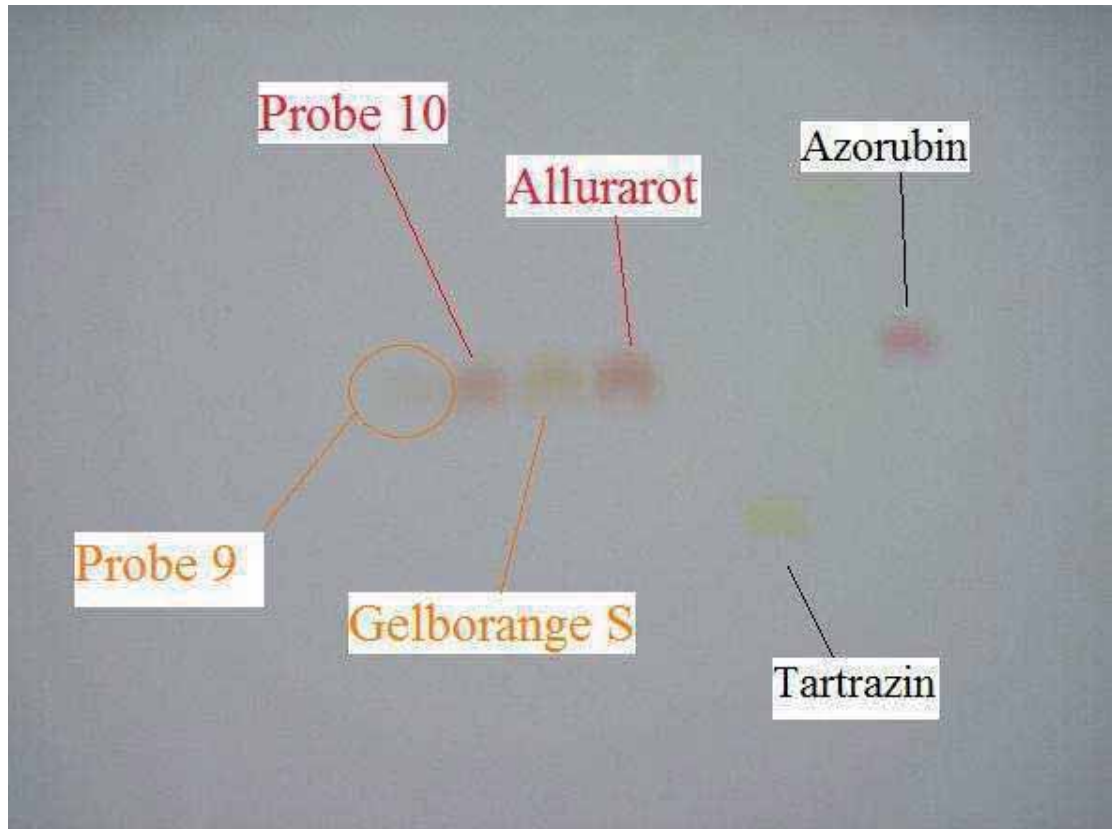
Da beim bisherigen Versuchsverlauf bei den Proben 1-8 ein paar Probleme aufgetreten waren, wurden diese Proben nun auf das Vorhandensein natürlicher Farbstoffe getestet. Dazu wurde den Proben, als sie als Suspension mit dem PaP vorlagen, jeweils 8-12 ml NaOH (1 mol/l) zugegeben. Nach Änderung des pH-Wertes der überstehenden Lösung von 1,5 auf 5-10 konnte man bei jeder Probe eine stärkere oder schwächere Farbänderung erkennen. Diese Farbänderung ließ vermuten, dass es sich bei den eingesetzten Lebensmittelfarbstoffen in den Produkten um sogenannte Anthocyane handelt, die vielen Blüten und Früchten ihre Färbung geben. Denn diese Anthocyane zeigen bei einer pH-Wert-Änderung eine Farbänderung nach grün/blau. Diese Färbung ins Bläuliche lässt sich sehr gut in Abbildung 15 erkennen, wo sich die vorerst rote überstehende Lösung bei der pH-Wert-Änderung mehr und mehr zur bläulichen Färbung änderte. Mit diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Farbstoffen der Proben 1-8 nicht um synthetische, sondern um natürliche Farbstoffe handelte. Man konnte diese allerdings durch den Versuch nicht eindeutig bestimmen (1L).



*Abbildung 15: Farbänderung der Probe 7 bei pH-Wert-Änderung*

#### 3.1.4. Identifikation der Azofarbstoffe in Probe 9 und 10

Nachdem die DC mit den Proben 9 und 10 (die erfolgreich auf 1 ml mittels RV eingeeengt wurden) und den Referenzfarbstoffen vollständig abgelaufen war, konnte man die einzelnen Farbstoffe der Proben gut erkennen.



*Abbildung 16: Ergebnis der DC-Platte*

In Abbildung 15 sieht man, dass die 4 mittleren Proben bis auf ein identisches Level gelaufen sind. Von links nach rechts sieht man Probe 9, Probe 10, GO und AR. Probe 9 konnte man auf der DC-Platte kaum erkennen, deswegen ist sie in Abbildung 16 schlecht sichtbar. Da Probe 9 und GO die identische Farbe und Laufweite aufwiesen, lag der Schluss nahe, dass der in Probe 9 enthaltene Farbstoff der Azofarbstoff GO ist. Das Gleiche gilt für Probe 10 und AR.

### 3.2. Quantitative Nachweis durch Photometrie

Bei der Photometrie wurden die Extinktionen zu jeweils 3 Proben des Azofarbstoffes GO und AR als auch zu den Proben 9 und 10 bestimmt. Diese lauteten:

GO: c: 1:200  $\Rightarrow$  E = 0,4599  
c: 1:100  $\Rightarrow$  E = 0,8860  
c: 1:50  $\Rightarrow$  E = 1,6631

Probe 9: E = 0,3891

AR: c: 1:200  $\Rightarrow$  E = 0,5696  
c: 1:100  $\Rightarrow$  E = 1,1115  
c: 1:70  $\Rightarrow$  E = 1,4826

Probe 10: E = 1,2055

Als Nächstes werden diese Werte in ein Koordinatensystem eingefügt. Als x-Werte nimmt man die c und als y-Werte die E. Die Gerade, auf der nun annähernd alle Punkte liegen, ist die Kalibriergerade. Die Punkte liegen nicht exakt auf der Geraden, weil man beim Arbeiten nie alle Konzentrationen 100%ig herstellen kann und so Abweichungen entstehen. Diese Gerade ordnet jeder E eine bestimmte c, sowie jeder c eine bestimmte E zu. Deswegen ist diese Kalibriergerade ein linearer Graph mit zugehöriger Funktion.

### Kalibriergerade zu Gelborange S

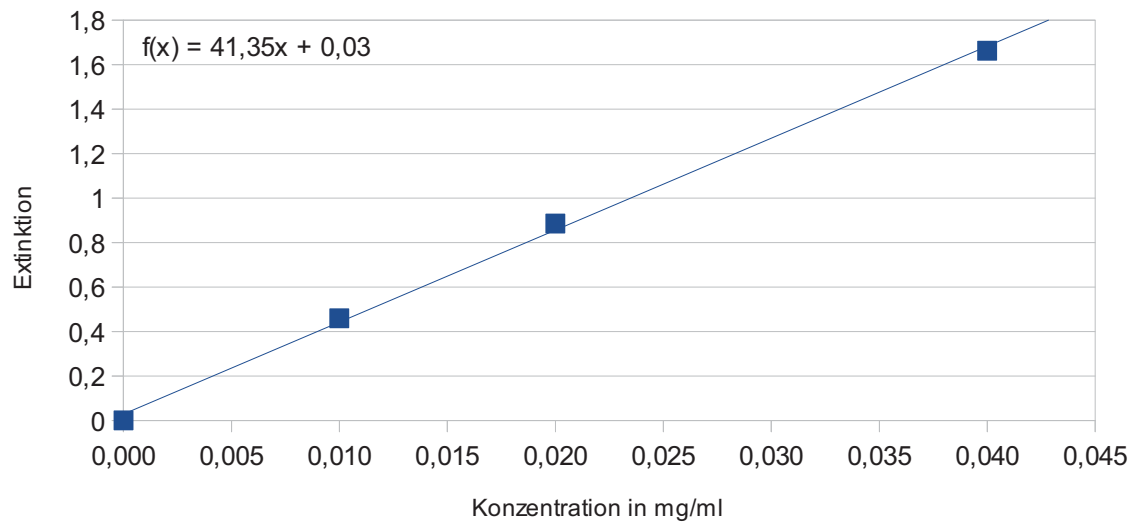


Abbildung 17: Kalibriergerade zu Gelborange S (erstellt durch OpenOffice Calc)

Im Falle der Proben von GO ergibt sich aus der Kalibriergeraden in Abbildung 17 die Funktion:  $f(x) = 41,35x + 0,03$ .

Um nun auf die Konzentration von GO in Probe 9 schließen zu können, muss man nur die E von Probe 9 als  $f(x)$  bzw. den y-Wert in die Gleichung einsetzen und nach x auflösen.

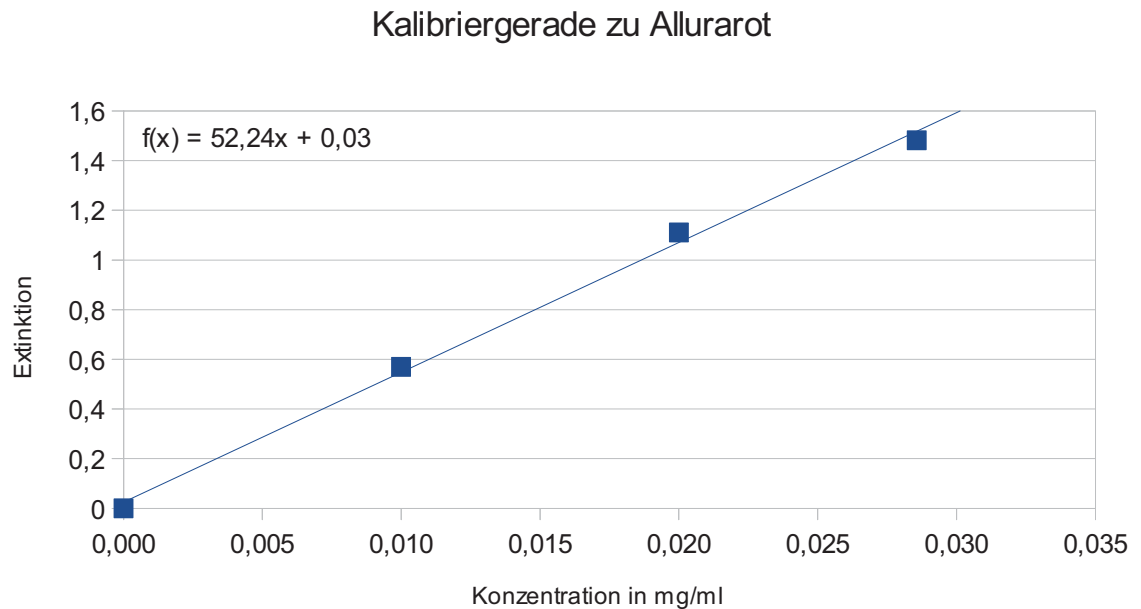
$$0,3891 = 41,35x + 0,03 \quad | -0,03$$

$$0,3591 = 41,35x \quad | /41,35$$

$$x \approx 0,00868$$

=> Die verwendete c von GO in Probe 9 beträgt demnach 0,00868 mg/ml.

Um die c von AR in der Probe 10 herauszufinden, muss man identisch verfahren. Als erstes werden die Werte wieder in ein Koordinatensystem eingetragen und eine Kalibriergerade zu diesen Werten erstellt.



*Abbildung 18: Kalibriergerade zu Allurarot (erstellt durch OpenOffice Calc)*

Die Kalibriergerade aus Abbildung 18 hat die Funktion:  $f(x) = 52,24x + 0,03$ .

Als Nächstes wird die E der Probe 10 für  $f(x)$  eingesetzt.

$$1,2055 = 52,24x + 0,03 \quad | -0,03$$

$$1,1755 = 52,24x \quad | /52,24$$

$$x \approx 0,0225$$

=> Die verwendete c von AR in Probe 10 beträgt demnach 0,02250 mg/ml (6L).

#### **4. Zusammenfassung**

Viele Azofarbstoffe, die vor allem zur Farbgebung in Süßwaren verwendet werden, stehen unter Verdacht die Aktivität und Aufmerksamkeit bei Kindern zu beeinträchtigen.

Seit dem 29. Juni 2010 müssen auf Produkten, in denen die betroffenen Azofarbstoffe verwendet wurden, mit dem Warnhinweis „Kann Aktivität und Aufmerksamkeit bei Kindern beeinträchtigen“, versehen sein, beschloss das Europaparlament.

Diese Seminararbeit beschäftigt sich damit, herauszufinden, wie viele dieser Azofarbstoffe heutzutage noch in Süßwaren verwendet werden. Dafür wurden stichprobenartig 10 verschiedene Proben von Süßwaren gewählt und auf die vorhandenen Lebensmittelfarbstoffe untersucht.

Den ersten Schritt stellte die qualitative Analyse der Farbstoffe. Dafür wurden die Proben erst gelöst und dann wurden die Azofarbstoffe durch Micro-Säulenchromatographie von den restlichen Bestandteile der Probe getrennt. Um nun die Farbstoffe über den Vergleich mit bekannten Farbstoffen auf einer Dünnschichtchromatographie-Platte ermitteln zu können, wurde davor das Volumen mittels Rotationsverdampfung stark eingengt. Nun konnten die Farbstoffe verglichen und identifiziert werden.

Als nächstes folgt die qualitative Analyse mittels Photometrie. Dabei wurde von dem bekannten Farbstoff durch Messen mehrerer Konzentrationen eine Kalibriergerade erstellt, mit der man auf die Konzentration des Farbstoffes in der Probe schließen konnte.

Am Ende der Arbeit stand fest, dass nur 2 der 10 Proben definitiv Azofarbstoffe verwendet haben. In den anderen 8 Proben wurden vermutlich natürliche Farbstoffe verwendet, dies wurde aber nicht nachgewiesen, sondern nur gedeutet.

Das Ergebnis ist sehr positiv ausgefallen, da jetzt schon in vielen Produkten keine Azofarbstoffe mehr verwendet werden und vielleicht wird in Zukunft in allen Produkten auf die Verwendung von Azofarbstoffen verzichtet.

## **5. Literaturverzeichnis**

### **5.1. Literaturquellen**

- (1L) Frane, Markus B., Versuch: DC Anthocyane, Praktikumsskript, DFA für Lebensmittelchemie, Technische Universität München
- (2L) Kraus Ljubomir, Koch Angelika, Hoffstetter-Kuhn Sabrina, Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1996, Seiten 23-25; 41; 51
- (3L) Lange, Bruno, Vejdelek, Zdenek, Photometrische Analyse, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1987. Seiten. 3-9
- (4L) Larissa, Christian, DC Farbstoffe, 02.05.2006, Praktikumsskript, DFA für Lebensmittelchemie, Technische Universität München
- (5L) Mysalk, Zdzislaw, Azofarbmittel auf der Basis krebserzeugender und -verdächtiger aromatischer Amine, Verlag für neue Wissenschaft GmbH, Dortmund, 1990, Seiten: 1-4
- (6L) Unbekannter Verfasser, Analysenvorschrift III -5.2 Photometrische Farbestimmung, Praktikumsskript, DFA für Lebensmittelchemie, Technische Universität München
- (7L) Unbekannter Verfasser, Praktikum III 5-1 DC Farbstoffe, Praktikumsskript, DFA für Lebensmittelchemie, Technische Universität München
- (8L) Wollrab, Adalbert, Chromatographie, Aulis Verlag Deubner & CO KG, Köln 1991, Seiten: 29-33; 65-70



## 5.2. Internetquellen

- (1I) Clausen Angela, 05.2009, in: Azofarbstoffe in Lebensmitteln, URL:  
<<http://www.ugb.de/zentraleElemente/pdf/F95-F08.pdf>> [Stand: 21.03.2011]
- (2I) DailyGreen, 21.11.2010, in: Warnhinweis bei Azofarbstoffen fehlt oft, URL:  
<<http://www.dailygreen.de/2010/11/21/warnhinweis-bei-azofarbstoffen-fehlt-oft-10137.html>>  
[Stand: 21.03.2011]
- (3I) Kohlmann H. , 16.01.2005, in: Säulen-Chromatographie: Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC), URL:  
<[http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/chromatographie/lbef\\_chromatographie\\_hplc\\_gc.htm](http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/chromatographie/lbef_chromatographie_hplc_gc.htm)> [Stand: 01.10.2011]
- (4I) Platthaus Marc, 01.02.2006, in: Rotationsverdampfer mit mehr Nutzen für den Anwender, URL:  
<<http://www.laborpraxis.vogel.de/labortechnik/probenvorbereitung/rotationsverdampfer/articles/106105/>> [Stand: 31.10.2011]
- (5I) Unbekannter Verfasser, 17.08.2011, in: Rotationsverdampfer, URL:  
<<http://de.wikipedia.org/wiki/Rotationsverdampfer>> [Stand: 31.10.2011]
- (6I) Unbekannter Verfasser, unbekanntes Datum, in: 10.6 – Lebensmittelfarbstoffe. URL:  
<<http://www.kst-chemie.ch/chicd/kap10/bild/azorubin.gif>> [Stand: 13.10.2011]
- (7I) Unbekannter Verfasser, unbekanntes Datum, in: Kleine Einführung in die Photometrie, URL:  
<[http://www.faes.de/MKA/MKA\\_Photometrie-einfuehrung/mka\\_photometrie-einfuehrung.html](http://www.faes.de/MKA/MKA_Photometrie-einfuehrung/mka_photometrie-einfuehrung.html)>

**Erklärung:**

„Ich erkläre, dass ich die vorliegende Seminararbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benützt habe“

.....,den .....

.....

(Unterschrift der Schülerin/des Schülers)