

Glycerin

UV-Test

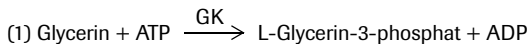
zur Bestimmung von Glycerin in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

Best. Nr. 10 148 270 035

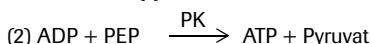
Test-Combination für 3 × 11 Bestimmungen

Prinzip (Lit. 1)

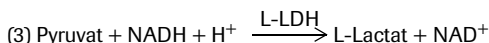
Glycerin wird in der durch Glycerokinase (GK) katalysierten Reaktion mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu L-Glycerin-3-phosphat phosphoryliert (1).



Mittels Pyruvat-Kinase (PK) wird das entstandene Adenosin-5'-diphosphat (ADP) durch Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt (2).



Pyruvat wird durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) in Gegenwart des Enzyms L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) zu L-Lactat hydriert, wobei NADH zu NAD oxidiert wird (3).



Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Glycerin-Menge äquivalent. NADH ist Messgrösse und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

Die Test-Combination enthält

- Drei Flaschen 1 mit je ca. 2,0 g Coenzym/Puffergemisch, zusammengesetzt aus: Glycylglycin-Puffer, pH ca. 7,4; NADH, ca. 7 mg; ATP, ca. 22 mg; PEP-CHA, ca. 11 mg; Magnesiumsulfat
- Flasche 2 mit ca. 0,4 ml Suspension, zusammengesetzt aus: Pyruvat-Kinase, ca. 240 U; L-Lactat-Dehydrogenase, ca. 220 U
- Flasche 3 mit ca. 0,4 ml Suspension Glycerokinase, ca. 34 U
- Flasche 4 mit Glycerin-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.). Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: s. Packungsetikett).

Herstellung der Lösungen für 10 Bestimmungen

- Inhalt einer Flasche 1 mit 11 ml bidest. Wasser lösen. Lösung vor Verwendung etwa 10 min bei 20-25°C stehen lassen.
- Inhalt der Flasche 2 unverdünnt verwenden.
- Inhalt der Flasche 3 unverdünnt verwenden.

Stabilität der Reagenzien

Der Inhalt der Flaschen 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 1 ist bei 2-8°C 4 Tage haltbar.

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

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

Bestimmungsansatz

Wellenlänge¹: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm

Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 3,020 ml

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

Probelösung: 1-40 µg Glycerin/Testansatz³ (in 0,100-2,000 ml Probevolumen)

¹ Das Absorptionsmaximum von NADH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektralphotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienspektrometern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.

² Anstelle von Glasküvetten sind ggf. auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.

³ Siehe Hinweise zur Testdurchführung

⁴ **Der Stillstand der Vorreaktion ist abzuwarten (es werden ADP in ATP und Pyruvat in PEP umgesetzt), da sonst zu hohe Ergebnisse erhalten werden.**

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)

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 1	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung*	-	0,100 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml
Suspension 2	0,010 ml	0,010 ml
mischen,** nach Stillstand der Vorreaktion ⁴ (ca. 5-7 min) Extinktionen der Lösungen messen (E ₁). Reaktion starten durch Zugabe von		
Suspension 3	0,010 ml	0,010 ml
mischen,** Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 5-10 min) und Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander messen (E ₂). Falls die Reaktion nach 15 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 2 min-Abständen messen, bis eine konstante Extinktionsabnahme pro 2 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)

Wurden bei E₂ konstante Extinktionsabnahmen festgestellt, werden die Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von Suspension 3 (GK) extrapoliert.

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E₁-E₂) bilden. 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).

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 Glycerin 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 Glycerin:

$$c = \frac{3,020 \times 92,1}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{2,781}{\epsilon} \times \Delta E \text{ [g Glycerin/l Probe-lösung]}$$

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:

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Glycerinmenge zwischen 1 µg und 40 µg betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Glycerinkonzentration zwischen 0,04 und 0,4 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an Glycerin im Liter	Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
< 0,4 g	-	1
0,4-4,0 g	1 + 9	10
4,0-40 g	1 + 99	100
> 40 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 die Probe und Leerwert das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probevolumen v ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

2. Technische Hinweise

Es ist unbedingt erforderlich, nach Zugabe von Suspension 2 (PK/L-LDH) den Ablauf der Vorreaktion abzuwarten.

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Die Bestimmung ist spezifisch für Glycerin. Dihydroxyaceton wird unter den angegebenen Bedingungen nicht umgesetzt.

Bei der Analyse der Reinsubstanz Glycerin sind Ergebnisse von ca. 100% bezogen auf die wasserfreie Substanz zu erwarten.

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

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

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

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von ca. 1 µg Glycerin/Ansatz (0,4 mg Glycerin/l Probelösung; Probevolumen $v = 2,000$ ml) bis 40 µg Glycerin/Ansatz (0,4 g Glycerin/l Probelösung; Probevolumen $v = 0,100$ 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 $v = 0,100$ ml und Messung bei 340 nm einer Konzentration von ca. 2-5 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. 0,02-0,05 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

VK = 2,5 %	in Serie	Serum	
VK = 2,59 %	von Tag zu Tag	Serum	(Lit. 1.2)
Pastillen	$m = 1,482 \text{ g}/100 \text{ g}$	$r = 0,0393 \text{ g}/100 \text{ g}$	$R = 0,1484 \text{ g}/100 \text{ g}$
Standard	$m = 0,206 \text{ g/l}$	$r = 0,0047 \text{ g/l}$	$R = 0,0115 \text{ g/l}$
Traubensaft:			
weiss	$m = 0,613 \text{ g/l}$	$r = 0,0138 \text{ g/l}$	$R = 0,0337 \text{ g/l}$
rot	$m = 0,907 \text{ g/l}$	$r = 0,0251 \text{ g/l}$	$R = 0,0511 \text{ g/l}$
Wein:			
weiss	$m = 6,050 \text{ g/l}$	$r = 0,1154 \text{ g/l}$	$R = 0,5002 \text{ g/l}$
rot	$m = 16,57 \text{ g/l}$	$r = 0,3166 \text{ g/l}$	$R = 1,124 \text{ g/l}$

(Lit. 3.8)

7. Störungen

Die langsame Hydrolyse von ATP und Phosphoenolpyruvat, sowie die Luftoxidation von NADH führen zu einer geringfügigen Schleichreaktion, die durch Extrapolation rechnerisch berücksichtigt werden kann. Eine Extrapolation ist nicht unbedingt erforderlich, wenn die Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander gemessen werden.

8. Erkennen von Störungen

- Ist die Umsetzung von Glycerin nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.
- Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von Glycerin (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.
- 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.
- 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.
- 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 Glycerin enthalten gefährliche Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinien 67/548 und 99/45 und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Weitere Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern und auf dem Etikett der betroffenen Flaschen.

10. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

- Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben** direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 2,000 ml zum Test einsetzen;
- trübe Lösungen** filtrieren;
- 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, Natronlauge oder durch Zugabe von Natriumbicarbonat 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 oder Polyamid (z.B. 1 g/100 ml) behandeln;
- feste und halbfeste Proben** zerkleinern oder homogenisieren, mit Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren; ggf. Trübstoffe und Farbstoffe mit Carrez-Reagenzien (s.u.) entfernen;
- Protein-haltige Proben** mit Carrez-Reagenzien (s.u.) klären;
- Fett-haltige Proben** mit heissem Wasser 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; alternativ nach Extraktion mit heissem Wasser mit Carrez-Reagenzien klären.

Carrez-Klärung:

Geeignete Probemenge in einen 100 ml-Messkolben genau einwägen, ca. 60 ml bidest. Wasser hinzufügen. Flüssige Probe in einem 100 ml-Messkolben, der ca. 60 ml bidest. Wasser enthält, pipettieren. Anschliessend 5 ml Carrez-I-Lösung (Kaliumhexacyanoferrat(II) (Ferrocyano)id) 85 mM = 3,60 g $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100 \text{ ml}$) und 5 ml Carrez-II-Lösung (Zinksulfat, 250 mM = 7,20 g $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100 \text{ ml}$) sorgfältig dosieren. Mit Natronlauge (0,1 M; z.B. 10 ml) pH 7,5-8,5 einstellen. Nach jeder Zugabe mischen, Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von Glycerin in Fruchtsäften

Die Probe ist soweit zu verdünnen, dass die Glycerinkonzentration unter 0,4 g/l liegt (siehe Verdünnungstabelle).

Trübe Säfte filtrieren. Klare Lösung zum Test einsetzen, auch wenn diese leicht gefärbt ist.

Bei **stark** gefärbten Säften (z. B. Sauerkirschsaft, rotem Traubensaft) ist die Probe wie folgt zu entfärben:

10 ml Saft mit etwa 0,1 g Polyamidpulver oder Polyvinylpyrrolidon (PVPP) versetzen, etwa 1 min rühren und anschliessend filtrieren. Klare, auch leicht gefärbte Lösung zum Test einsetzen.

Bestimmung von Glycerin in Wein

Die Probe wird je nach dem zu erwartenden Glyceringehalt (gemäss Verdünnungstabelle) verdünnt.

Auch Rotwein kann im allgemeinen ohne Entfärbung analysiert werden.

Bestimmung von Glycerin in Bier

Etwa 5-10 ml Bier zur Entfernung der Kohlensäure durch Faltenfilter filtrieren oder etwa 1 min mit einem Rührstab rühren; die weitgehend CO₂-freie Bierprobe gemäss Verdünnungstabelle verdünnen und zum Test einsetzen.

Bestimmung von Glycerin in Marzipan

Etwa 1 g Marzipan (Schokoladen-Kuvertüre gegebenenfalls entfernen) in ein Porzellanschälchen mit etwa 2 g Seesand genau einwiegen, gründlich verreiben, mit 50 ml Wasser vermischen und 20 min bei ca. 60°C halten. Überstehende Lösung in 100 ml-Messkolben giessen. Rückstand (Seesand) 2 mal mit je 10 ml Wasser waschen und Waschlösung in den Messkolben füllen. Lösung im Messkolben auf 20-25°C abkühlen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Zur besseren Abscheidung des Fettanteils 15 min in den Kühlschrank stellen. Lösung filtrieren, gegebenenfalls bei 3000 U/min zentrifugieren. Weitgehend klare Lösung zum Test einsetzen, gegebenenfalls verdünnen (s. Verdünnungstabelle).

Bestimmung von Glycerin in Tabak-Erzeugnissen

Probe gründlich mischen und zerkleinern (Korngrösse max. 0,2 mm). Ca. 1 g in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen. Nach Zugabe von ca. 70 ml Wasser etwa 1 h bei 20-25°C kräftig rühren (Magnet-Rührer). Mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.

25 ml Filtrat in einen 50 ml-Messkolben pipettieren, anschliessend der Reihe nach zugeben und nach jeder Zugabe mischen: 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g K₄[Fe(CN)₆] × 3 H₂O/100 ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g ZnSO₄ × 7 H₂O/100 ml) und 10 ml NaOH (0,1 M). Mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Filtrat zur Bestimmung einsetzen (0,100-0,500 ml).

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Papier (Lit.2.1), Kosmetika (Lit. 4.1), Pharmaka (Lit. 4.5, 4.6) und in der Forschung bei der Analytik biologischer Proben; zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Lit.1.2.

12.1. Bestimmung von Glycerin in Kosmetika

Bestimmung von Glycerin in Gesichtswasser (Skin Tonic)

Die Probe soweit verdünnen, dass die Glycerin-Konzentration unter 0,4 g/l liegt. Unverdünnte oder verdünnte Probe zum Test einsetzen.

Bestimmung von Glycerin in Rasierwasser (Pre Shave, After Shave)

Ist das Rasierwasser mit Wasser mischbar, ohne dass eine Trübung auftritt, so ist wie bei "Gesichtswasser" zu verfahren. Tritt nach Verdünnen des Rasierwassers mit Wasser eine Trübung auf, so ist diese Trübung mit Polyamid oder Aktivkohle zu entfernen:

1,0 ml Rasierwasser mit 9,0 ml Wasser versetzen, mischen, 100 mg Polyamid oder Aktivkohle zugeben, mischen und filtrieren (Verdünnungsfaktor: 10).

Ist die Glycerin-Konzentration im Filtrat geringer als 0,02 g/l, so kann das in die Küvette zu pipettierende Probenvolumen bis zu 2,000 ml erhöht werden. Die hinzuzufügende Wassermenge ist entsprechend zu reduzieren.

Bestimmung von Glycerin in Hautcreme

Ca. 1g Hautcreme in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 70 ml Wasser zugeben und 30 min unter gelegentlichem Umschütteln bei 60°C stehen lassen bzw. in siedendem Wasserbad mit Magnetrührer kräftig rühren. Nach Abkühlen auf 20-25°C Messkolben mit Wasser bis zur Eichmarke auffüllen. Messkolben 15 min in den Kühlschrank oder besser in ein Eisbad stellen. Lösung filtrieren oder zentrifugieren.

Filtrat oder Überstand gegebenenfalls verdünnen und zum Test einsetzen.

Bestimmung von Glycerin in Zahnpasta

Ca. 1 g Zahnpasta in ein 100 ml-Becherglas genau einwiegen, ca. 70 ml Wasser zugeben und unter Rühren (beheizbarer Magnetrührer) 30 min bei 60°C extrahieren. Suspension in Zentrifugengläser überführen. Nach Zentrifugation klaren Überstand in 250 ml-Messkolben giessen. Niederschlag mit Wasser in ein Becherglas überspülen und Extraktion ein bis zweimal wiederholen. Messkolben bis zur Marke auffüllen, gegebenenfalls filtrieren.

Je nach Glycerin-Konzentration klare Lösung bzw. Filtrat direkt oder nach Verdünnen mit Wasser zur Bestimmung einsetzen. Ist die Glycerin-Konzentration in klarer Lösung bzw. Filtrat geringer als 0,02 g/l, so kann das in die Küvette zu pipettierende Probenvolumen bis zu 2,000 ml erhöht werden. Die hinzuzufügende Wassermenge ist dann entsprechend zu reduzieren.

Alternativ kann auch die Carrez-Klärung zur Vorbereitung der Zahnpasta-Probe verwendet werden.

Bestimmung von Glycerin in Seife

Ca. 1 g geriebene Seife in ein Becherglas genau einwiegen, ca. 50 ml HCl (0,1 M) zugeben und auf beheizbarem Magnetrührer unter starkem Rühren bis zum Sieden erhitzen. Wässrige Phase mit Pipette in einen 100 ml-Messkolben überführen. Extraktion mit ca. 30 ml HCl (0,1 M) wiederholen.

Messkolben auf 20-25°C bringen und mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen. Messkolben 15 min in ein Eisbad oder in den Kühlschrank stellen. Durch ein Faltenfilter filtrieren. Filtrat, je nach erwarteter Glycerin-Konzentration verdünnt oder unverdünnt zur Bestimmung einsetzen.

Ist die Glycerin-Konzentration geringer als 0,02 g/l, so kann das in die Küvette zu pipettierende Volumen bis zu 2,000 ml erhöht werden. In diesem Fall ist das Volumen der hinzuzufügenden Wassermenge entsprechend zu reduzieren.

12.2 Bestimmung von Glycerin in Fermentationsproben und Zellkulturmedien

Analysenprobe, ggf. nach Zentrifugation, zum Abstoppen enzymatischer Vorgänge 15 min in Wasserbad (80°C) stellen und anschliessend zentrifugieren. Überstand, ggf. gemäss Verdünnungstabelle verdünnt, zur Bestimmung einsetzen. (Alternativ kann auch eine Enteiweissung mit Perchlorsäure oder mittels Carrez-Lösungen erfolgen. Siehe die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele.)

Gallertartige Agar-Medien mit Wasser homogenisieren und wie oben beschrieben weiterbehandeln.

Literatur

- 1.1 Kreutz, F.H. (1962) Enzymatische Glycerinbestimmung, *Klin. Wochenschrift* **40**, 362-363
- 1.2 Eggstein, M. & Kuhlmann, E. (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1871-1877, Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 4, pp. 1825-1831; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- 1.3 Wieland, O.H. (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U. ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 504-510, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Untersuchung von Papieren, Kartons und Pappe für Lebensmittel-Verpackungen (gem. Empf. XXXVI der Kunststoffkommission des Bundesgesundheitsamtes) Kapitel 8 (Methoden), Pkt. 3.5.2. (März 1979)
- 2.2 Methodenbuch für Weinanalysen in Österreich (1980), herausgegeben von Arbeitsgemeinschaft der Landw. Versuchsanstalten in Österreich (ALVA)
- 2.3 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **77**, 8
- 2.4 Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 553-556 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- 2.5 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/2.2 (1985), Kapitel 28A (Frucht- und Gemüsesäfte, Fruchtnektare, Fruchtsirupe, Konzentrate und Pulver)/12.3 (1994), Kapitel 30 (Wein)/40 (1967), Kapitel 30A (Wein)/40 (1973)
- 2.6 *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, Complément n° 1 à l'édition officielle de juin 1990, OFFICE INTERNATIONAL DELA VIGNE ET DU VIN*, S. 149-151
- 3.1 Drawert, F. & Kupfer, G. (1963) Enzymatische Analysen, I. Mitteilung: Bestimmung von Glycerin in Weinen und Traubenmosten, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **123**, 211-217
- 3.2 Berner, G. & Guhr, G. (1969) Freies Glycerin und Gesamt-Glycerin in Monoglyceriden und in Partialester-Gemischen; ein Vergleich der enzymatischen Glycerin-Bestimmung mit chemischen Methoden, *Fette-Seifen-Anstrichmittel-Die Ernährungsindustrie* **71**, 459-464
- 3.3 Holbach, B. & Woller, R. (1976) Über den Zusammenhang zwischen Botrytisbefall von Trauben und den Glycerin- sowie Gluconsäuregehalt von Wein, *Weinwissenschaft* **31**, 202-214
- 3.4 Holbach, B. & Woller, R. (1977) Vergleichende Glycerinbestimmung im Wein nach der Methode Rebelein und der enzymatischen Methode, *Weinwissenschaft* **32**, 212-218
- 3.5 Wagner, K. & Kreutzer, P. (1978) Beitrag zur Glycerinbestimmung in Wein, Likörwein und weinhaltigen Getränken, *Weinwissenschaft* **33**, 109-113
- 3.6 Mändl, B., Wullinger, F., Fischer, A. & Piendl, A. (1970) Weitere Ergebnisse über den Gehalt verschiedener Biersorten an Glycerin, Pyruvat, Citrat und Malat, *Brauwissenschaft* **23**, 11-18
- 3.7 Klopfer, W. J., Angelino, S.A.G.F., Tuning, B. & Vermeire, H.A. (1986) Organic acids and glycerol in beer, *J. Inst. Brew.* **92**, 225-228
- 3.8 Walter, E. & Kohler, P. (1985) Ringversuch für die enzymatische Bestimmung von Glycerin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **180**, 121-125
- 3.9 Plessi, M., Monzani, A., & Coppini, D. (1988) Determination of the Monosaccharide and Alcohol Content of Balsamic and Other Vinegars by Enzymatic Methods, *Agric. Biol.Chem.* **52**, 25-30
- 3.10 Tamminga-Groenveld, T., Westra, A.M. & Strikwerda, K. (1989) Enzymatisch en Hogedruk Vloeistofchromatografisch Onderzoek van de Gehalten aan Glycerol in Jenever, Vieux en Beerenburg, *De Ware(n)-Chemicus* **19**, 109-120
- 3.11 Huidobro, J.F., Rea, M.E., Branquinho de Andrade, P.C., Sancho, M.T., Muniategui, S. & Simal-Lozano, J. (1993) Enzymatic determination of glycerol in honey, *J.Agric.Food Chem.* **41**, 557-559
- 3.12 Russmann, H. (1998) Hefen und Glycerin in Blütenhonigen - Nachweis einer Gärung oder einer abgestoppten Gärung, *Lebensmittelchemie*, **52**, 116-117
- 4.1 Henniger, G. & Boos, H. (1978) Anwendung der enzymatischen Analyse bei der Untersuchung kosmetischer Präparate, dargestellt an einigen Beispielen; Seifen - Öle - Fette - Wachse **104**, 159-164
- 4.2 Schmidt, F. H. & von Dahl, K. (1968) Zur Methode der enzymatischen Neutralfettbestimmung in biologischem Material, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **6**, 156-159
- 4.3 Wieland, O. (1957) *Biochem. Z.* **329**, 313
- 4.4 Wieland, O. & Witt, I. (1974), Dihydroxyaceton, in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Auflage, Bd. 2, S. 1487, Verlag Chemie, Weinheim, und Wieland, O. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 4, pp. 1404; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- 4.5 Michal, G. (1976) Enzymatische Analyse in der Pharmazie, *Acta Pharmaceutica Technologica, Suppl. 1*, S. 151-162
- 4.6 Pfandl, A. & Menschig, D. (1984) Ein Beitrag zur enzymatischen Glycerin- und Ethanolbestimmung, *Pharm. Ind.* **46**, 403-407

Glycerin-Testkontroll-Lösung (Flasche 4)

Konzentration: siehe Flaschenetikett

Glycerin-Testkontroll-Lösung ist eine stabilisierte wässrige Lösung von Glycerin. Sie dient als Testkontroll-Lösung für die enzymatische Bestimmung von Glycerin in Lebensmitteln und anderen Probematerialien.

Anwendung:

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

Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt.

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. 15 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 der Angabe des Flaschenetiketts ab.

3. Interner Standard:

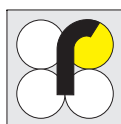
Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

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

mischen, **nach ca. 7 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:

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



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

