

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène  
**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit  
**Band:** 54 (1963)  
**Heft:** 4

**Artikel:** Über eine enzymatische Glycerinbestimmung in Traubensaft und Wein  
**Autor:** Mayer, K. / Busch, Ingrid  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-982735>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 27.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

### Résumé

Description d'un mode opératoire amélioré pour le dosage de quantités d'arsenic de l'ordre du microgramme. Après désagrégation de l'échantillon à sec avec du nitrate de magnésium l'arsenic est extrait de la façon usuelle — après réduction — par le diéthylammoniumdiéthylthiocarbamate dans un entonnoir à séparation. L'extrait organique est ensuite détruit par oxydation et l'arsenic transformé, en une étape, en complexe bleu d'As et de Mo. Puis on mesure au spectrophotomètre l'intensité de la coloration pour un maximum d'absorption situé à 840 mμ et en déduit la teneur en As en se référant à une courbe d'étalonnage.

### Summary

Description of an improved method for the determination of micrograms of Arsenic. The sample is opened up in the dry state with magnesium nitrate; after reduction, As is extracted with diethylammoniumdiethylthiocarbamate, transformed — in one step — into the blue As — Mo — complex and spectrophotometrically determined.

### Literatur

- 1 Furrer H.: diese Mitt. **52**, 286 (1961).
- 2 Strafford N., Wyatt P. F. und Kershaw F. G.: Analyst **70**, 232 (1945).
- 3 Hahn F. L. und Luckhaus R.: Z. analyt. Chem. **149**, 172 (1956).
- 4 Methods of Analysis, AOAC (1960), 548.
- 5 Bode H. und Neumann F.: Z. analyt. Chem. **169**, 411 (1959).

## Über eine enzymatische Glycerinbestimmung in Traubensaft und Wein

Von K. Mayer und Ingrid Busch, Eidg. Versuchsanstalt Wädenswil

Im Zusammenhang mit Untersuchungen an Gärsubstraten interessierte uns eine einfache, für die routinemäßige Handhabung geeignete Glycerinbestimmung. Nachdem wir seit einiger Zeit zum quantitativen L-Äpfelsäurenachweis in Wein und Obstsaften mit gutem Erfolg eine enzymatische Methode<sup>1</sup> verwenden, lag uns daran, wenn möglich auch diese Verbindung mit einer ähnlich einfachen und spezifischen Methode zu erfassen.

Während rein chemische Glycerinbestimmungen in der Literatur recht häufig beschrieben sind — diese Methoden erfordern durchwegs einen großen Arbeitsaufwand und liefern gelegentlich eher unsichere Ergebnisse —, existieren über enzymatische Glycerinbestimmungen nur wenige Angaben. Dies vor allem deshalb, weil die für den enzymatischen Glycerinnachweis erforderlichen Enzyme bis vor kurzem noch nicht erhältlich waren. Erst seit einiger Zeit können die benötigten biolo-

---

Verwendete Abkürzungen:

- DPN: Diphosphopyridinnukleotid  
DPNH: Diphosphopyridinnukleotid reduziert  
ATP: Adenosintriphosphat  
ADP: Adenosindiphosphat

gischen Reagentien in Form hochgereinigter, verhältnismäßig stabiler Handelspräparate im Handel bezogen werden.

Die bisher beschriebenen enzymatischen Glycerinnachweise beruhen auf der Verwendung des «optischen Tests» nach *Warburg*<sup>2</sup>; hierbei werden die Reaktionen  $\text{DPN}^+ \longrightarrow \text{DPNH}$  bzw.  $\text{DPNH} \longrightarrow \text{DPN}^+$  als Indikatorreaktionen benutzt und spektrophotometrisch ausgewertet. *Kreutz*<sup>3</sup> bestimmte Glycerin in Neutralfetten und Phospholipiden unter Einsatz von Glycerokinase, Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase nach folgendem Prinzip (Summenreaktion):

$\text{Glycerin} + \text{Phospho-enolpyruvat} + \text{DPNH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L(-)-Glycerin-l-Phosphat} + \text{Lactat} + \text{DPN}^+.$

Eine von *Wieland*<sup>4</sup> beschriebene Methode basiert auf der Zweistufenreaktion

- 1)  $\text{Glycerin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{L(-)-Glycerin-l-Phosphat} + \text{ADP}$
- 2)  $\text{L(-)-Glycerin-l-Phosphat} + \text{DPN} \xrightleftharpoons{\text{GDH}} \text{Dihydroxyacetonphosphat} + \text{DPNH} + \text{H}^+$

Reaktion 1) wird dabei durch das Enzym Glycerokinase (GK), Reaktion 2) durch  $\alpha$ -Glycerophosphatdehydrogenase (GDH) katalysiert. *Boltralik* und *Noll*<sup>5</sup> bestimmten Glycerin mit der prinzipiell gleichen Methode wie *Wieland*; diese Autoren verwendeten jedoch zusätzlich Albumin als Schutz gegen eine rasche Inaktivierung der Glycerophosphatdehydrogenase; ferner wurde bei Reaktionsende DPNH durch Aethanolzusatz stabilisiert.

Es gelang uns trotz zahlreicher Versuche nicht, mit der von *Wieland* empfohlenen Methode befriedigende Ergebnisse zu erhalten; meist wurden nur etwa 80 % des eingesetzten Glycerins wiedergefunden. Bei der darauffolgenden Überprüfung des von *Boltralik* et al. beschriebenen Verfahrens ließen sich dagegen rasch akzeptable Werte erzielen und zwar sowohl in wässrigen Lösungen wie auch in Traubensaft und Wein.

### Prinzip

Unter geeigneten Bedingungen katalysieren die beiden Fermente Glycerokinase und  $\alpha$ -Glycerophosphatdehydrogenase die Phosphorylierung von Glycerin zu L(-)-Glycerin-l-Phosphat und die darauffolgende Dehydrierung zu Dihydroxyacetonphosphat. Die Dehydrierung von Glycerin-l-Phosphat durch die DPN-abhängige Glycerophosphatdehydrogenase dient dabei als Indikatorreaktion: die gebildete DPNH-Menge ist der vorhandenen Glycerinmenge äquivalent und läßt sich spektrophotometrisch einfach erfassen. Voraussetzung für den quantitativen Ablauf der Reaktionen innerhalb einer kurzen Zeitspanne (z. B. 60 min.) ist die Verlagerung des Reaktionsgleichgewichts auf die rechte Seite. Man arbeitet deshalb bei pH 9,1 und fängt das anfallende Dihydroxyaceton durch Hydrazin ab. Gemäß den Versuchen von *Boltralik* et al. erweist sich ferner ein Zusatz von Rinderalbumin als vorteilhaft, da hiedurch eine vorzeitige Zerstörung der Glycerophosphatdehydrogenase durch Hydrazin verhindert wird. Schließlich wirkt ein Zusatz von Aethanol (50 %) bei Reaktionsende stabilisierend auf das entstandene DPNH.



## Experimentelles

### Reagentien und Lösungen

1. Albumin (Rinder-Serumalbumin, kristallisiert [Fa. Sigma Chemical Comp., St. Louis, USA]): 12,5 mg/ml.
2. Adenosintriphosphat (ATP [Fa. C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, Deutschland\*]): 50 mg/ml, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.
3. Diphosphopyridinnukleotid (DPN, freie Säure [Fa. Boehringer]): 66 mg/ml, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.
4. Hydrazinhydrat (pur. [Fa. Siegfried, Zofingen]): 2 g/10 ml, pH mit HCl auf 9,1 eingestellt.
5.  $\text{KF} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (z. A. [Fa. J. T. Baker Chemical Comp., Phillipsburg, USA]): 235 mg/10 ml.
6.  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (z. A. [Fa. Merck AG, Darmstadt, Deutschland]): 20 mg/10 ml.
7. Glycerokinase (aus *Candida mycoderma* [Fa. Boehringer]).
8. Glycerophosphatdehydrogenase (aus Skelettmuskel [Fa. Boehringer]).

Die Reagentien 1, 2, 3, 7 und 8 sind in der Kälte aufzubewahren.

### Arbeitsweise

In kleine Reagensröhrchen werden einpipettiert: je 0,1 ml der Reagentien 1–6, 0,1 ml Probelösung (enthaltend höchstens 100  $\mu\text{g}$  Glycerin), je 0,1 ml der beiden Enzyme (7,8), dest.  $\text{H}_2\text{O}$  ad 1 ml (0,28 ml). Die Röhrchen werden geschwenkt, während 60 min. bei 37 ° C im Wasserbad inkubiert, worauf 9 ml Aethanol (50 Vol. %) einpipettiert werden. Nach gründlichem Durchmischen wird die optische Durchlässigkeit der Proben in Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke bei  $\lambda = 340 \text{ m}\mu$  gegen dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gemessen. Eine Blindprobe, deren Reaktionsgemisch anstelle der Enzyme 0,02 ml  $\text{H}_2\text{O}$  enthält, wird ebenfalls bestimmt.

Bei der *Berechnung* des erfaßten Glycerins müssen der Extinktionskoeffizient für DPNH ( $6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$  bei 340  $\text{m}\mu$ ) und der Verdünnungsgrad der Probe berücksichtigt werden; es ergibt sich:

$$\mu\text{Mole Glycerin in 0,1 ml Probe} = \frac{\Delta E \cdot 0,1 \cdot 100}{6,22}$$

$$\text{bzw. } \mu\text{g Glycerin in 0,1 ml Probe} = \frac{\Delta E \cdot 0,1 \cdot 100 \cdot 92,1}{6,22}$$

$$*) \Delta E = E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blindprobe}}$$

Für die im folgenden beschriebenen Versuche mit Substraten verschiedenen Glyceringehaltes verwendeten wir Glycerin z. A. (*Merck*), das durch Destillation praktisch wasserfrei erhalten wurde.

\* Schweizer Vertretung: Fa. Laevosan AG, Zürich.

## A. Glycerinbestimmungen in wässrigen Lösungen

Wir überprüften die Methode vorerst an verschiedenen wässrigen Glycerinlösungen. Aus einer Anzahl Bestimmungsserien wird nachstehend ein für diese Versuche typisches Ergebnis wiedergegeben.

*Tabelle 1*  
*Glycerinbestimmungen in wässrigen Lösungen*

Glycerin vorgelegt $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$	$\Delta E$ 340 m $\mu$	Glycerin gefunden	
		$\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$	%
5	0,033	7,4	148,0
10	0,064	9,5	95,0
25	0,166	24,6	98,4
50	0,327	48,4	96,8
75	0,490	72,6	96,8
100	0,640	94,8	94,8
125	0,792	117,3	93,8

Die im Bereich 10–100  $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$  erhaltenen Werte dürfen als akzeptabel bezeichnet werden; der durchschnittliche Fehler betrug 3,6 %. Bei Glyceringehalten hingegen von unter 10  $\mu\text{g}$  und über 100  $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$  wird der Nachweis, wie sich bei verschiedenen Parallelversuchen bestätigte, ungenau.

## B. Glycerinbestimmungen in Traubensaft und Wein

Einige Bestimmungen an Handelstraubensäften ergaben, daß diese Getränke bis zu 800 mg Glycerin/l enthielten. Wir zogen deshalb vor, unsere Versuche mit einem frisch abgepressten, filtrierten Saft weißer Trauben, dessen Glyceringehalt unter 10 mg/l lag, durchzuführen. In Tabelle 2 ist wiederum ein für eine ganze Anzahl derartiger Bestimmungen typisches Resultat aufgeführt.

*Tabelle 2*  
*Glycerinbestimmungen in Traubensaft verschiedenen Glyceringehalts*

Traubensaft	$E$ 340 m $\mu$	$\Delta E$	Glycerin	
			$\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$	% wieder gefunden
	0,113			
+ 10 $\mu\text{g}$ Glycerin	0,181	0,068	10,07	100,7
+ 25 $\mu\text{g}$ Glycerin	0,280	0,167	24,7	98,8
+ 50 $\mu\text{g}$ Glycerin	0,438	0,325	48,6	97,2
+ 75 $\mu\text{g}$ Glycerin	0,600	0,487	72,1	96,1
+ 100 $\mu\text{g}$ Glycerin	0,760	0,647	95,8	95,8

Der mittlere Fehler betrug in obigem Versuch 2,5 ‰; die erhaltenen Werte können somit wiederum als befriedigend betrachtet werden. Es geht daraus, wie auch aus dem Ergebnis einer ganzen Anzahl ähnlicher Messungen hervor, daß die Bestimmung durch keine traubensaft eigenen Substanzen gestört wird. Bei einem weiteren Versuch setzten wir dem gleichen Traubensaft neben 50 µg Glycerin/0,1 ml noch je 1 g 2,3-Butylenglykol, Sorbit und Mannit sowie 300 mg SO<sub>2</sub> pro Liter – letzteres unmittelbar vor der Bestimmung – zu. Es ließen sich 48,7 µg Glycerin/0,1 ml (entsprechend 97,4 ‰ der vorgelegten Glycerinmenge) nachweisen. Daraus ergibt sich, daß diese Substanzen nicht störten.

Schließlich überprüften wir die Methode an verschiedenen Weinen. Bei einem Versuch mit zwei Getränken, die bereits 6,45 (Rotwein) bzw. 8,0 g (Weißwein) Glycerin pro Liter enthielten, wurde nach Verdünnung 1 : 10 mit Wasser Glycerin so dosiert, daß pro 0,1 ml 20 bzw. 50 µg Glycerin zusätzlich vorlagen. Als Blindproben dienten die verdünnten Rot- bzw. Weißwein enthaltenden Reaktionsgemische ohne zugesetztes Glycerin. Das Ergebnis ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

*Tabelle 3*  
*Bestimmung von zugesetztem Glycerin in 2 Weinen (10fach verdünnt)*

	E 340 mµ	Δ E	Glycerin	
			µg/0,1 ml	‰
Rotwein	0,685	—		
+ 20 µg Glyc./0,1 ml	0,818	0,133	19,7	98,5
+ 50 µg Glyc./0,1 ml	1,020	0,335	49,6	99,2
Weißwein	0,565	—		
+ 20 µg Glyc./0,1 ml	0,700	0,135	20,0	100,0
+ 50 µg Glyc./0,1 ml	0,885	0,320	47,4	94,8

Der durchschnittliche Fehler lag somit in diesem Versuch – wie auch bei anderen ähnlichen Messungen an Weiß- und Rotweinen – unter 5 ‰. Daraus darf geschlossen werden, daß die angewendete Bestimmung auch in Wein spezifisch und ungestört verläuft.

Unsere Erfahrungen mit dieser Methode lassen sich dahin zusammenfassen, daß in den geprüften Substraten regelmäßig mindestens 95 ‰ des eingesetzten Glycerins wieder nachgewiesen werden konnte. Bei 50 µg/0,1 ml übersteigenden Konzentrationen wären gelegentlich noch etwas bessere Ausbeuten erwünscht gewesen, in dessen gelang es weder durch Verdoppelung der Enzym- und DPN-Mengen noch durch Änderung der Inkubationsdauer, günstigere Ergebnisse zu erzielen.

Der Reaktionsverlauf mit zwei Glycerinkonzentrationen wird durch Abbildung 1 veranschaulicht. Zwei Reaktionsgemische wurden aufeinanderfolgend direkt im auf 37 ° C gehaltenen Küvettenraum des Photometers inkubiert; so ergab sich die Möglichkeit, den Verlauf der DPN-Reduktion wie auch das Ergebnis Δ E graphisch festzuhalten.



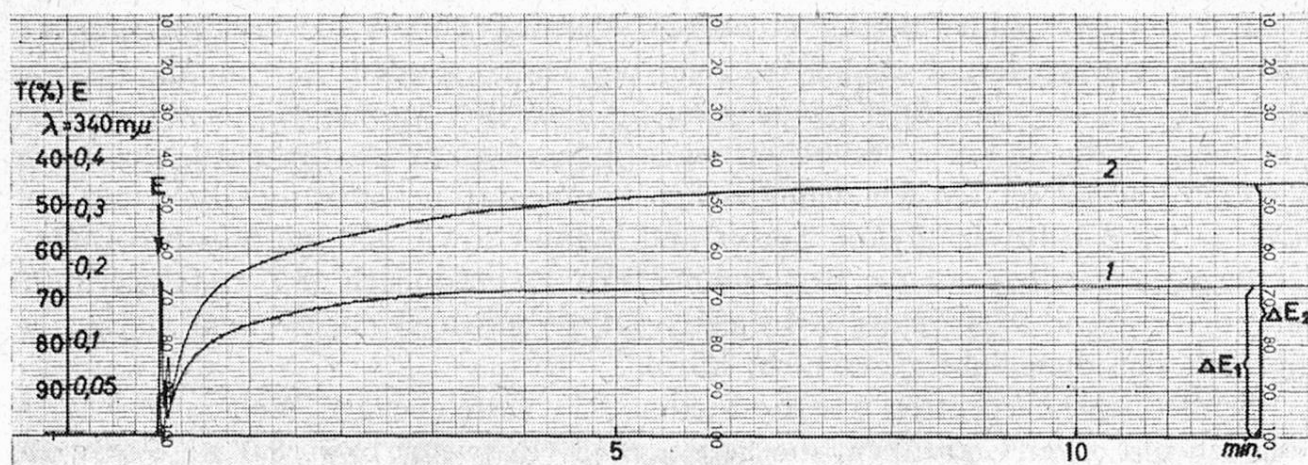


Abbildung 1

*Enzymatische Glycerinbestimmung in Traubensaft*

Spektrophotometer: Beckman DB    Schreibgerät: Beckman Recorder

Küvettenansatz: (2 ml Reaktionsvolumen)

Je 0,1 ml Albumin,  $MgCl_2$ , KF, Hydrazinpuffer, DPN, ATP (Konzentration siehe vorher)  
1,26 ml dest.  $H_2O$

\* 0,1 ml Probelösung (20%iger Traubensaft mit 5 [Kurve 1] bzw. 10  $\mu g$  Glycerin [Kurve 2])  
0,02 ml Glycerophosphatdehydrogenase  
0,02 ml Glycerokinase (im Zeitpunkt «E» einpipettiert)

\* Die in diesen Ansätzen vorliegenden Glycerinkonzentrationen (5 bzw. 10  $\mu g/2$  ml) entsprechen den vorherigen (s. Tabellen 1—3) Meßkonzentrationen 25 bzw. 50  $\mu g/10$  ml.

Der Verlauf der Reaktionskurven 1 und 2 zeigt, daß die vorgelegten Glycerinmengen vollständig erfaßt wurden. Es ergibt sich nach 12 min. Reaktionsdauer:

*Kurve 1:*

Glycerin vorgelegt: 5  $\mu g/2$  ml  
Glycerin gefunden:  $\Delta E_1 = 0,172$  entspr. 5,07  $\mu g/2$  ml  
(= 25,45  $\mu g/10$  ml = 101,8 %) )

*Kurve 2:*

Glycerin vorgelegt: 10  $\mu g/2$  ml  
Glycerin gefunden:  $\Delta E_1 = 0,340$  entspr. 10,07  $\mu g/2$  ml  
(= 50,35  $\mu g/10$  ml = 100,7 %) )

*Zusammenfassung*

Eine einfache, von Boltralik et al.<sup>4</sup> für biologische Substrate vorgeschlagene Glycerinbestimmung wird auf ihre Anwendbarkeit in Traubensaft und Wein überprüft. Bei der auf einer enzymatischen Phosphorylierung und Dehydrierung beruhenden Zweistufenreaktion wird

die daran gekoppelte DPN<sup>+</sup>-Reduktion spektrophotometrisch ermittelt. Die sehr spezifische Methode gestattet, 10—100 µg Glycerin/0,1 ml Traubensaft, Wein bzw. deren wässrigen Verdünnungen genau zu erfassen. Bei Glycerinbestimmungen in Wein (Glycerin-gehalt normalerweise 2—10 g/l) empfiehlt sich der Einsatz 10- bis 20fach verdünnter Proben, damit die quantitative Erfassung gesichert ist und die Messung im günstigen Skala-bereich erfolgt.

### *Résumé*

On a examiné l'application au jus de raisin et au vin de la méthode enzymatique simple de *Boltralik* et al. pour le dosage de la glycérine dans les substrats biologiques. Cette méthode, qui est spécifique, repose sur la phosphorylation de la glycérine et la déshydrogénation du produit phosphorylé, en présence de DPN. Le DPNH formé, qui correspond à la glycérine présente, est dosé par spectrophométrie. On peut ainsi doser avec une erreur moyenne de 3,6 %, de 10 à 100 µg de glycérine dans 0,1 ml de jus de raisin ou de vin. Pour des concentrations en glycérine plus élevée (le vin en contient normalement de 2 à 10 g/l) il convient de diluer l'échantillon de 10 à 20 fois.

### *Summary*

Examination of the application to grape juice and wine of the enzymatic method described by *Boltralik* et al. for the determination of glycerol in biological substrates. This method is specific for glycerol and it has been found to give good results when applied to grape juice and wine.

### *Literatur*

- 1 *K. Mayer und Ingrid Busch*: 1963 Über eine enzymatische Äpfelsäurebestimmung in Wein und Traubensaft. *Diese Zeitschr.* **54**, 60.
- 2 *O. Warburg und W. Christian*: 1936 Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridinnukleotide). *Biochem. Z.* **287**, 291.
- 3 *F. H. Kreutz*: 1962 Enzymatische Glycerinbestimmung. *Klin. Wochenschr.* **40**, 362.
- 4 *O. Wieland*: 1962 Glycerin. In: H. U. Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse*, S. 211. Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
- 5 *J. Boltralik und H. Noll*: 1960 A specific, sensitive assay of Glycerol and L- $\alpha$ -Glycerophosphate. *Analyt. Biochem.* **1**, 269.