

Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel

**FOOD CHEMISTRY MICROBIOLOGY TECHNOLOGY
CHIMIE MICROBIOLOGIE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE**

Wissenschaftlicher Beirat:

W. Baltes, Hamburg H.-D. Belitz, München H.-J. Bielig, Berlin J. F. Diehl, Karlsruhe W. Heimann, Karlsruhe
R. Heiss, München K. Heyns, Hamburg W. G. Jennings, Davis/USA F. Korte, Bonn L. Kotter, München
F. Krusen, Bonn J. M. de Man, Guelph/Canada H. J. Rehm, Münster H. Schildknecht, Heidelberg
W. Schmidt-Lorenz, Zürich Th. Severin, München H. Suomalainen, Helsinki/Finnland H. Thaler, Braunschweig

Schriftleitung: F. Drawert W. Postel R. Tressl

SONDERDRUCK
REPRINT
TIRÉ A PART

VERLAG HANS CARL D-8500 NÜRNBERG 1

Vergleich einer kolorimetrischen und titrimetrischen Zuckerbestimmung in Futtermitteln

W. KUHBAUCH und M. SCHMIDT

Institut für Grünlandlehre der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan

[Eingegangen am 14. 5. 1974]

Zusammenfassung: An 10 verschiedenen Futtersubstanzen wurde ein Methodenvergleich zur Zuckerbestimmung mit einem kolorimetrischen und titrimetrischen Verfahren angestellt.

Über die gesamte Breite des Probenmaterials wurde mit beiden Methoden praktisch 100%ige Übereinstimmung erzielt. Die Streubreite der hier als Mikromethode gehandhabten Kolorimetrie ist zwar größer als nach Titration, hohe Zeitersparnis zusammen mit einer Nachweismöglichkeit bis in den Gammabereich mit einem Variationskoeffizienten von weniger als 3% lassen jedoch die Kolorimetrie für die Makroanalyse und im besonderen für den Mikronachweis empfehlen.

Summary: 10 different food substances were analysed comparatively with the aid of a colorimetric and titrimetric method sugar determination. Both methods lead to nearly complete corresponding results. The colorimetric procedure were handled as microanalysis. In this way the variance were higher than with titration. Even though the colorimetric carbohydrate estimation seems to be more preferable because it can be carried out with much saving of time and the possibility of sugar determination down to quantities of millionths of gram with a variation coefficient of minor than 3 per cent.

Résumé: Comparaison d'une détermination colorimétrique et titrimétrique dans les matières fourragères.

La comparaison de la détermination des sucres a été effectuée au moyen d'une méthode colorimétrique et titrimétrique en utilisant dix diverses matières fourragères. Les deux méthodes montrent exactement les mêmes résultats. La déviation relative de la colorimétrie utilisée comme micro-méthode est plus haute qu'après la titration, mais les énormes économies de temps de même que la possibilité de l'identification jusqu'à la limite de microgrammes (déviations relative de moins de 3%) recommandent l'application de la colorimétrie en ce qui concerne la macroanalyse et surtout quant à la micro-méthode.

0 Einleitung

Die Bedeutung der Kohlenhydrate für die Futtermittelkonservierung und Tierernährung macht diese zu einem häufig untersuchten Objekt in der landwirtschaftlichen Forschung.

Standardverfahren ist derzeit in Westdeutschland eine Vorschrift von *Schoorl* und *Luff* [1], nach der Cu-II durch die Reduktionsäquivalente der Zucker nach vorhergehender Abtrennung der N-haltigen Verbindungen zu Cu-I reduziert und der Rest des Cu-II mit Natriumthiosulfat gegen Jod-Stärke zurücktitriert wird. Die Titration ist ein zeitaufwendiges Verfahren, und scheint darüber hinaus vor allem für Mikroanalysen bis in den Gammabereich auf Grund der Labilität des jodometrisch bestimmten Titrationsendpunktes ungeeignet. In dieser Arbeit wird daher unter Beibehaltung des Extraktions- und Proteinfällungsverfahrens der Standardmethode der Reduktionswert des Zuckers einmal mit der herkömmlichen Titration und zum anderen mit einem modifizierten kolorimetrischen Verfahren nach *Nelson* [2] und *Somogyi* [3], mit dem besonders zeitsparend gearbeitet werden kann, bestimmt.

Der Stabilität des Farbkomplexes und dessen Störanfälligkeit gegenüber den verwendeten Eiweißfällungsreagentien soll besonders Beachtung geschenkt werden.

1 Material und Methodik

Die untersuchten Futtersubstanzen: Gräser, Gräser-Leguminosen-Kräuter-Gemische unterschiedlicher Zusammensetzung, mit Melasse versehene mineralische Futtermittel, Mais und Weizenschrot. Die frisch geernteten Gräser bzw. Gräser-Leguminosen-Kräuter-Gemische wurden gefriergetrocknet; bei den mineralischen Futtermitteln, Mais und Weizenschrot handelte es sich um luftgetrocknetes lagerfähiges Material. Alle Proben wurden pulverisiert (Siebporen < 1 mm). Die Kohlenhydratanalyse: 5 g Probensubstanz wurden mit ca. 200 ml Wasser 30 Minuten im Schüttler extrahiert, anschließend mit 5 ml einer 15%igen Kaliumferrocyanidlösung, $K_3[Fe(CN)_6]$, die Proteinfällung durchgeführt und überschüssiges Fällungsreagens mit 5 ml 23%igem Zinkacetat, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O$, entfernt.

In dem auf 250 ml ergänzten Extrakt wurde die Zuckerbestimmung alternativ nach *Schoorl* und *Luff* [1] titrimetrisch bzw. nach Verdünnung 1:100 kolorimetrisch in Anlehnung an ein Verfahren von *Nelson* [2] und *Somogyi* [3] vorgenommen.

Die Titration wurde nach der Verbandsmethode der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalten [1] durchgeführt und soll hier nicht im einzelnen beschrieben werden.

In der kolorimetrischen Vergleichsanalyse kamen folgende Reagentien zur Anwendung: 1. Kupferreagens nach *Somogyi* [3] mit 4 g Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), 24 g wasserfreies Natriumcarbonat (Na_2CO_3), 12 g Kalium-Natrium-Tartrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), 180 g wasserfreies Natriumsulfat (Na_2SO_4), 16 g Bicarbonat (NaHCO_3) in 1000 ml Wasser. Das Kupferreagens sollte vor Gebrauch eine Woche abstehen und unmittelbar vor Verwendung filtriert werden. Es wird damit vermieden, daß Ausfällungen des Salzgemisches im kolorimetrischen Ansatz erscheinen. 2. Farbreagens nach *Nelson* [2] mit 6 g Natriumhydrogenarsenat ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), 42 ml Schwefelsäure (H_2SO_4) konzentriert, 50 g Ammoniummolybdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) in 1000 ml Wasser. Das Farbreagens muß vor dem ersten Gebrauch 24 bis 48 Stunden bei 37°C gehalten werden. Kupferreagens und Farbreagens sind gleichermaßen vor Lichteinfluß zu schützen. Es wurden stets Reagentien des Reinheitsgrades p. a. der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Die Handhabung der Kolorimetrie: 1 ml verdünntes Filtrat wurde zur Hydrolyse mit 1 ml 1 n HCl in ein graduiertes 25-ml-Röhrchen gegeben und 5 Minuten im Wasserbad auf 70°C temperiert. In Gestellen $30 \times 11 \text{ cm}$ konnten 24 dieser Röhrchen bequem handhabbar untergebracht werden. Nach Hydrolyse wurde mit 1 ml 1,1 n NaOH neutralisiert. Die Stabilität des Kupferkomplexes im alkalischen Bereich erlaubt einen geringfügigen Überschuß an Natronlauge und sichert darüber hinaus die Alkalität der Probenlösung. Unmittelbar anschließend können 3 ml des Kupferreagens nach *Somogyi* [3] in die Röhrchen zugegeben werden. Es folgt die Reduktion des Kupfersulfates durch zehminütiges Kochen im Wasserbad. Nach Abkühlen der Röhrchen kann mit 3 ml Arsenmolybdat-Reagens nach *Nelson* [2] ein blauer Farbkomplex hergestellt werden. Mit Wasser wurde auf das Endvolumen von 15 oder 25 ml, je nach optischer Dichte der Farblösung, ergänzt und nach etwa einer Stunde bei 520 nm gemessen. Die Zuckergehalte wurden schließlich mit Glukose- oder Fruktosestandards nach identischer Vorbehandlung aus einer Eichkurve berechnet.

Zur Absicherung der Streubreite und zur Ermittlung der Regression beider Verfahren wurden sämtliche Untersuchungen der Futtersubstanzen jeweils in sechsfacher Wiederholung angesetzt.

Das verwendete Rechenprogramm stammte aus dem Institut für Acker- und Pflanzenbau.*

1.1 Stabilität des Farbkomplexes

An zwei Proben (a und b) ist in *Abbildung 1* dargestellt, daß die in der kolorimetrischen Analyse erhaltenen Transmissionswerte über 60 Stunden nahezu unverändert bleiben und erst bis 300 Stunden nach der Anfärbung eine stärkere Verringerung der Transmission eintritt.

Zu beachten ist, daß die Stabilität der Färbung erst eine Stunde nach Zugabe des Arsen-Molybdat-Reagens erzielt wird. Über die chemische Beschaffenheit des Molybdat-Farbkomplexes ist bei *Woods und Mellon* [4] diskutiert. Daraus geht die Beeinträchtigung dieses Farbkomplexes durch Mineralsalze hervor. Wir sahen uns deshalb veranlaßt, die verwendeten Eiweißäl-

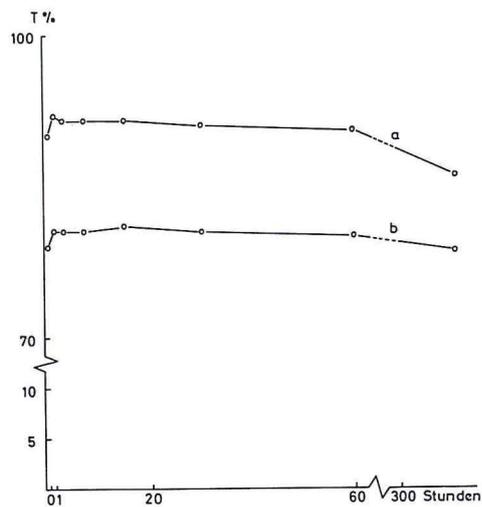


Abb. 1 Veränderungen des Molybdat-Farbkomplexes in Stunden nach Herstellung der „Färbung“.

lungsreagentien Kaliumferrocyanid und Zinkacetat auf ihren Einfluß in Hinblick auf Lage und Intensität des Molybdat-Farbkomplexes zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde ein Überschuß an Kaliumferrocyanid und Zinkacetat von 2 % bzw. 6 % der ursprünglichen Anwendungsmenge untersucht. In 15 ml Meßvolumen entspricht das einem Anteil von 0,0066 % bzw. 0,0200 %.

Mit einem Überschuß von 2 % Ferrocyanid ändert sich bereits die Intensität des Molybdat-Farbkomplexes. Es wird eine höhere optische Dichte angezeigt. Die Lage der 100 % Transmissionsbande bleibt unverändert bei 520 nm. Mit einem Überschuß von 6 % Ferrocyanid wird sowohl die Farbintensität als auch die Lage des Spektrums deutlich verändert, mit einer maximalen Durchlässigkeit zwischen 600 bis 700 nm. Zinkacetat verändert dagegen selbst mit dem höheren Überschuß weder die Lage noch die Intensität des Farbkomplexes.

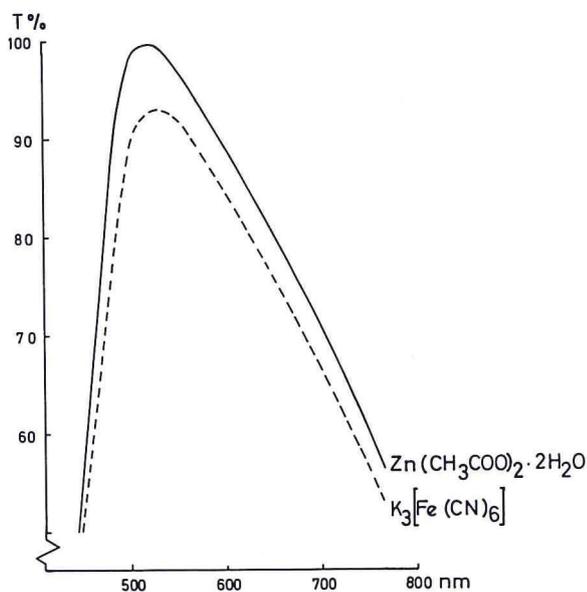


Abb. 2 Lage und Intensität des Molybdat-Farbspektrums mit 2 %igem Überschuß von Kaliumferrocyanid bzw. Zinkacetat im enteiweißten Extrakt.

* Herrn Dr. Reiner soll an dieser Stelle für seine freundliche Unterstützung gedankt sein.

Tabelle 1 Zuckergehalte in 10 Futtersubstanzen nach titrimetrischer und kolorimetrischer Bestimmung (g in 100 g Trs.)

Weidelgras		Knautgras		Pflanzengemisch						Mais		Mineralische Futtermittel *						Weizenschrot		
T	K	T	K	a		b			c		T	K	T	K	T	K	T	K	T	K
18,80	17,75	10,50	10,70	4,10	4,00	10,85	10,63	21,40	22,25	1,25	1,36	5,30	5,35	5,10	3,95	7,25	5,90	2,70	3,10	
18,55	17,50	10,55	10,70	4,10	4,00	10,90	10,63	21,40	22,25	1,35	1,33	5,18	5,20	5,10	4,05	7,35	6,15	2,65	2,95	
18,55	18,25	10,55	10,40	4,05	3,95	10,90	10,88	21,40	21,75	1,25	1,36	5,03	5,20	5,00	4,15	7,35	5,90	2,65	3,10	
18,70	17,75	10,50	10,50	4,10	4,15	10,93	11,25	21,20	21,75	1,35	1,31	5,20	5,28	4,98	4,20	7,25	5,90	2,60	3,10	
18,55	16,75	10,60	10,70	4,10	4,15	10,85	10,88	21,90	22,75	1,35	1,31	5,10	5,30	5,10	3,85	7,25	5,90	2,65	2,95	
18,60	18,25	10,70	10,70	4,00	3,95	10,98	10,63	21,60	22,75	1,25	1,38	5,03	5,30	4,93	3,95	7,25	6,00	2,60	2,98	
Mittelwert																				
18,62	17,70	10,57	10,62	4,07	4,03	10,90	10,81	21,48	22,25	1,30	1,34	5,14	5,20	5,03	4,03	7,28	5,96	2,64	3,03	

a Zusammensetzung: 42% Klee, 17% Löwenzahn, 41% Gräsergemisch; b Zusammensetzung: 58% Klee, 6% Löwenzahn, 36% Gräsergemisch; c Zusammensetzung: 31% Klee, 17% Löwenzahn, 61% Gräsergemisch. — T = Titration, K = Kolorimetrie. — * 3 verschiedene Mineralfuttermittel mit unterschiedlichen Zusätzen an Melasse.

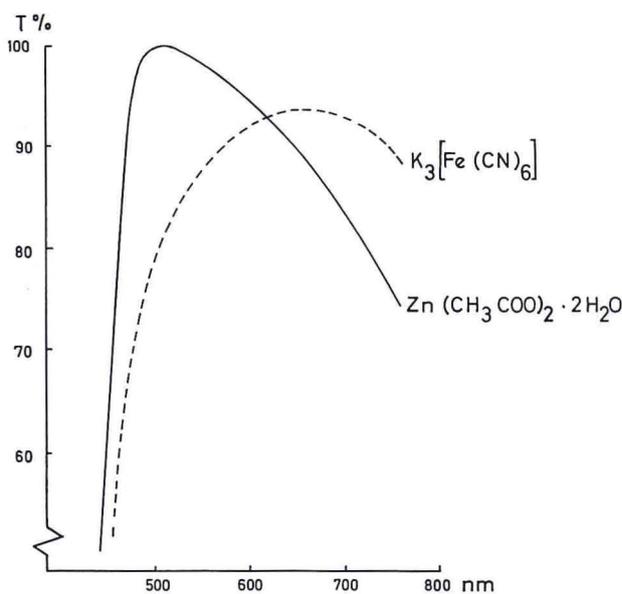


Abb. 3 Lage und Intensität des Molybdat-Farbspektrums mit 6% igem Überschuß von Kaliumferrocyanid bzw. Zinkacetat im enteiweißten Extrakt.

In der kolorimetrischen Analyse, der eine Proteinfällung mit Kaliumferrocyanid vorausgeht, muß deshalb besonders darauf geachtet werden, daß kein Überschuß an Kaliumferrocyanid in der zu messenden Lösung enthalten ist. Man kann dem vorbeugen, indem von vornherein Ferrocyanid mit einem geringen Überschuß von Zinkacetat nachgefällt wird.

1.2 Mittelwerte, Streubreite und Regression

Die mit 6maliger Untersuchung erhaltenen Meßwerte der Zuckergehalte bewegen sich mit Titration und Kolorimetrie in der selben Größenordnung. Sie umfassen einen Bereich von 1,36% (Maisschrot) bis 21,48% Gesamtzucker (Pflanzengemisch c) nach Bestimmung mit Hilfe der Titration bzw. 1,34% bis 22,25% nach der kolorimetrischen Analyse. Abweichungen der Mittelwerte in einigen Futtersubstanzen um maximal 1,3% lassen keine Aussage über die relative Vorzüglichkeit des einen oder anderen Verfahrens zu (Tab. 1).

Die Streubreite innerhalb der 6 parallelen Unter-

suchungen ist bei dem kolorimetrischen Verfahren durchweg höher als mit Titration (Tab. 2).

$$\text{Nach der Formel } s = \sqrt{\frac{\sum A}{m-n}}$$

$$\begin{aligned} \sum A &= \text{Summe der Abweichungen} = \\ &= (\sum x_1^2 - \frac{(\sum x_1)^2}{m} + \dots + (\sum x_n^2 - \frac{(\sum x_n)^2}{m_n})) \\ n &= \text{Anzahl der untersuchten Proben} \\ m &= \text{Gesamtzahl der Untersuchungen} \end{aligned}$$

ergibt sich über die gesamte Breite des Versuchsmaterials eine Streuung von 0,104% nach Titration und 0,253% nach Kolorimetrie; entsprechend einem Variationskoeffizienten, gleichbedeutend mit dem relativen Meßfehler, von 1,21% bzw. 2,98%. Das Bestimmtheitsmaß (r^2) beträgt für beide Verfahren 99,5%. D. h., daß nahezu eine 100%ige Übereinstimmung beider Verfahren gegeben ist. Die Titration erweist sich damit als voll ersetzbar durch die Kolorimetrie. Dementsprechend errechnet sich eine

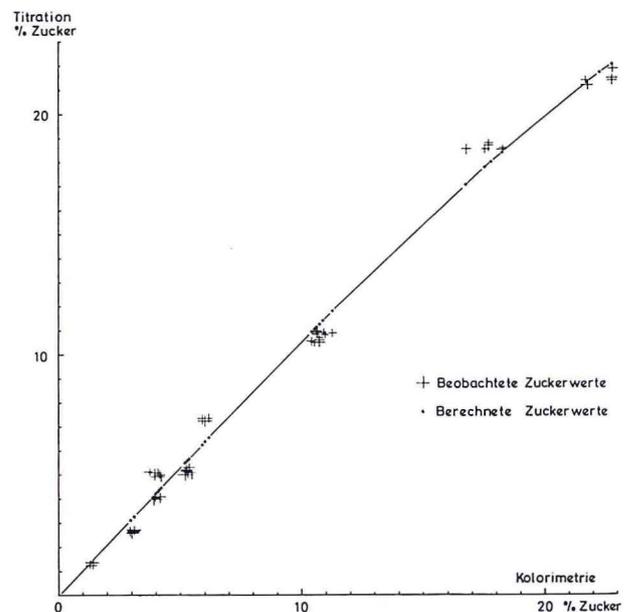


Abb. 4 Regression zwischen den mittels Titration und Kolorimetrie bestimmten Zuckergehalten sämtlicher Proben.

Tabelle 2 Streubreite, Streuung und Varianz der Zuckergehalte nach titrimetrischer und kolorimetrischer Bestimmung

	Weidelgras		Knaulgras		Pflanzengemisch			Mais		Mineralische Futtermittel *			Weizen- schrot
	a	b	c										
Streu- breite	18,55—18,80	10,50—10,70	4,00—4,10	10,85—10,98	21,20—21,90	1,25—1,35	5,03—5,30	4,93—5,10	7,25—7,35	2,60—2,70			
s	0,1034	0,0748	0,0412	0,0489	0,2400	0,0547	0,1063	0,0748	0,0509	0,0374			
s ²	0,0107	0,0056	0,0017	0,0024	0,0576	0,0030	0,0113	0,0056	0,0026	0,0014			
Titration gesamt: s = 0,1040; s ² = 0,0109													
Streu- breite	16,75—18,25	10,40—10,70	3,95—4,15	10,63—11,25	21,75—22,75	1,31—1,38	5,20—5,35	3,85—4,20	5,90—6,15	2,95—3,10			
s	0,5571	0,1326	0,0927	0,2449	0,4472	0,0282	0,0600	0,1334	0,1019	0,0774			
s ²	0,3104	0,0176	0,0086	0,0600	0,2000	0,0008	0,0036	0,0178	0,0104	0,0060			
Kolorimetrie gesamt: s = 0,2533; s ² = 0,0642													

a Zusammensetzung: 42 % Klee, 17 % Löwenzahn, 41 % Gräsergemisch; b Zusammensetzung: 58 % Klee, 6 % Löwenzahn, 36 % Gräsergemisch; c Zusammensetzung: 31 % Klee, 17 % Löwenzahn, 61 % Gräsergemisch. — * 3 verschiedene Mineralfuttermittel mit unterschiedlichen Zusätzen an Melasse.

Regression nach der Gleichung:

$$y = -0,1188 + 1,0867 x - 0,0002 x^3$$

wie in *Abbildung 4* dargestellt.

Beachtet man, daß die Kolorimetrie hier als Mikroanalyse gehandhabt wurde, und demnach alle hier gewonnenen Ergebnisse samt den Analysefehlern mit einem hohen Multiplikatoren errechnet wurden, so wird klar, daß dieses Verfahren gegenüber der Titration recht gut abschneidet. Darüber hinaus scheint die Kolorimetrie mit einem Variationskoeffizienten von weniger als 3 % für Mikroanalysen besonders geeignet zu sein.

2 Diskussion

Die Ergebnisse der Zuckerbestimmung mit Hilfe der Titration und der Kolorimetrie stimmen weitgehend überein. Deutliche und über 6 Wiederholungen einheitliche Abweichungen von einem zum anderen Verfahren lassen keine Beurteilung zu über die relative Vorzüglichkeit oder Treffsicherheit der titrimetrischen oder kolorimetrischen Zuckerbestimmung. Es kommt darin vielmehr eine mit konventionellen Kohlenhydratanalysen meist ungelöste Problematik zum Vorschein, die darin besteht, daß die Reduktionsäquivalente von Kohlenhydraten unterschiedlicher Qualität in einem nach Zeit, Lösungsmittelkonzentration bzw. Alkalität und Temperatureinwirkung konventionierten Verfahren nicht gleichermaßen erfaßt werden können [5, 6]. Das unterschiedliche Verhalten der Kohlenhydrate gegenüber den Oxidationsmitteln führt einerseits wie hier im Falle der vergleichsweise träge reagierenden Maltose in den mineralischen Futtermitteln zu Schwierigkeiten bei der Einschätzung des tatsächlichen Zuckergehaltes einer Substanz [7], andererseits wird in einigen Verfahren dieser Umstand sogar zur spezifischen Trennung der Kohlenhydrate herangezogen [8]. Die hier geprüfte kolorimetrische Methode weist nach unseren Untersuchungen trotz hoher Verdünnungen — sie wurde hier als Mikromethode gehandhabt und erlaubt einen Nachweis von Zuckermengen im Gamma-Bereich —, einen Variationskoeffizienten von weniger als 3 % auf. Sie liegt damit zwar schlechter als die Titration (s = 1,2 %); der Umstand, daß mit der Kolorimetrie mit dem halben bis einem Drittel des Zeitaufwandes die selbe Probenleistung zu bewältigen ist, läßt uns jedoch dieses Verfahren auch für Makroanalysen bevorzugen. Diese Möglichkeit scheint um so mehr gerechtfertigt, als die Regressionsanalyse über die gesamte Breite des Versuchsmaterials eine nahezu 100 %ige Übereinstimmung beider Verfahren ergibt. Für die Mikrokohlenhydratbestimmung bietet schließlich der beobachtete Variationskoeffizient die Gewähr, daß auch im Gamma-Bereich mit einem hier vergleichsweise nur sehr geringen Fehler der Kohlenhydratnachweis gelingt.

3 Literatur

[1] Schoorl, N., und Luff, K., in Nehring, K., *Agricul-turchemische Untersuchungsmethoden für Dünge- und*

Futtermittel, Böden und Milch. Verlag P. Parey, Berlin und Hamburg 1960.

[2] Nelson, N., J. Biol. Chem. **153**, 375 (1944).

[3] Somogyi, M., J. Biol. Chem. **195**, 19 (1952).

[4] Woods, J. T., and Mellon, M. G., Industrial and Engineering Chemistry **13**, 760 (1941).

[5] Shaffer, P. A., and Somogyi, M., J. Biol. Chem. **100**, 695 (1933).

[6] Heinze, P. H., and Murneek, A. E., Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull. **314**, 3 (1940).

[7] Somogyi, M., J. Biol. Chem. **160**, 61 (1945).

[8] Hessler, L. E., Anal. Chem. **31**, 1234 (1959).

Anschrift der Verfasser:

Dr. W. Kühbauch, Dr. M. Schmidt, Institut für Grünlandlehre der Technischen Universität München
D-8050 Freising-Weihenstephan