

# Freies Glycerin und Gesamtglycerin-Gehalt in Monoglyceriden und in Partialester-Gemischen

## Ein Vergleich der enzymatischen Glycerin-Bestimmung mit chemischen Methoden

Von Dr. G. Berner und Dipl.-Chem. G. Guhr

Aus dem Unilever Forschungslaboratorium Hamburg

Der Gehalt an freiem und gebundenem Glycerin in wasserlöslichen und/oder stark emulgierenden sowie in wasserunlöslichen Monoglyceriden wurde enzymatisch bestimmt. Die dabei gefundenen Werte werden mit den Ergebnissen chemischer Methoden verglichen; nur mit Hilfe der enzymatischen Glycerin-Bestimmung konnte in allen Proben freies Glycerin bestimmt werden. Eine gute Übereinstimmung der nach beiden Methoden erhaltenen Werte wurde nur bei der Bestimmung des Gesamtglycerins in wasserunlöslichen Monoglyceriden festgestellt. Die relativen Standardabweichungen der enzymatischen Glycerin-Bestimmung für mehrere Monoglycerid-Einwaagen liegen zwischen 0.86 und 1.26 %; der relative Streubereich  $x_{rel.}$  für eine statistische Sicherheit  $P$  von 95 % beträgt 1.9 bis 2.8 %. Das Lambert-Beer'sche Gesetz ist in einem weiten Bereich erfüllt.

### Free and Total Glycerol Content of Monoglycerides and Mixtures of Partial Esters. A Comparison of the Enzymatic Glycerol Estimation with Chemical Methods

The free and bound glycerol content of water-soluble and/or strongly emulsifying as well as of water-insoluble monoglycerides was determined enzymatically. The values thus observed were compared with those obtained by chemical methods. Free glycerol could be determined in all the samples only with the help of the enzymatic method. A good agreement between the values obtained by the two methods was found only in the determination of total glycerol in water-insoluble monoglycerides. In the enzymatic procedure for glycerol determination, the relative standard deviation for various weighings lies between 0.86 and 1.26 %; taking  $P = 95\%$ ,  $x_{rel.}$  amounts to 1.9–2.8 %. Lambert-Beer's law is valid for a wide range.

### Einleitung

Im allgemeinen bestimmt man freies Glycerin und  $\alpha$ -Monoglycerid in Monoglyceriden bzw. in Partialestergemischen nach M. Kruty<sup>1</sup> oder nach W. D. Pohle und V. C. Mehlenbacher<sup>2</sup>. Das freie Glycerin wird bei beiden Methoden im wäßrigen Extrakt bestimmt. Während aus Monoglycerid-Präparaten unsubstituierter langkettiger Fettsäuren nur das freie Glycerin in den wäßrigen Extrakt gelangt, werden bei entsprechenden Präparaten aus mittel- und kurzkettigen sowie polare Gruppierungen enthaltenden Fettsäuren auch Monoglyceride extrahiert. Diese Verbindungen und z. B. Glykole oder Diglycerin sind mit Perjodat oxydierbar und täuschen einen zu hohen Glycerin-Gehalt vor. Es werden auch mikrobiologische<sup>3</sup> und — für acetylierte Proben — auch

### Teneur en glycérine libre et en glycérine totale des monoglycérides et mélanges d'esters partiels. Une comparaison de la détermination enzymatique de la glycérine avec les méthodes chimiques

La teneur en glycérine libre et liée des monoglycérides hydrosolubles et/ou fortement émulsionnés et hydroinsolubles a été déterminée enzymatiquement. Les valeurs ainsi trouvées sont comparées avec les résultats des méthodes chimiques; la glycérine libre n'a pu être déterminée qu'à l'aide de la méthode enzymatique. Une bonne concordance des valeurs obtenues par les deux méthodes n'a été constatée que dans la détermination de la glycérine totale dans les monoglycérides hydroinsolubles. Les écarts standard relatifs de la détermination enzymatique se situent entre 0.86 et 1.26 %; le domaine de dispersion relatif  $x_{rel.}$  pour une probabilité  $P$  de 95 % représente 1.9–2.8 %. La loi de Lambert-Beer est réalisée dans un vaste domaine.

Свободный глицерин и содержание общего глицерина в моноглицеридах и в смесях парциальных сложных эфиров. Сравнение энзиматического определения глицерина с химическими методами.

Содержание свободных и связанных глицеринов в водорастворимых и/или в сильно эмульгирующих, а также в водонерастворимых моноглицеридах определялось энзиматически. Найденные при этом значения сравнивались с результатами химических методов. Только энзиматическим определением глицерина возможно было определение свободного глицерина во всех пробах. Хорошее совпадение результатов обоих методов наблюдалось только при определении общего глицерина водонерастворимых моноглицеридов. Относительные стандартные отклонения энзиматического определения глицерина в нескольких навесках моноглицеридов составляют 0.86–1.26%. Относительный диапазон отклонений  $x_{отн}$  для статистической достоверности  $P = 95\%$  составляет 1.9–2.8%. Закон Ламберта-Бэра соблюдается в широком диапазоне.

gas-chromatographische<sup>4</sup> Analysenmethoden empfohlen, die aber ebenso wie die Glycerinbestimmung nach J. Eisenbrand und M. Raisch<sup>5</sup> wegen ihres Aufwandes für eine Routine-Untersuchung nicht geeignet sind.

Zur Bestimmung des Glycerin-Gehaltes vor und nach einer Verseifung in Seren hat sich besonders die enzymatische Methode von M. Eggstein und F. H. Kreutz<sup>6,7</sup> der Phosphorylierung des Glycerins auf Grund der genauen Endpunktbestimmung und des schnellen Reaktionsablaufes bewährt. F. Drawert und G. Kupfer<sup>8</sup> ermittelten nach dieser Methode den Glycerin-Gehalt in Weinen und Traubenmosten, J. Hölzl<sup>9</sup> den Triglycerid-Gehalt in Phosphatid-Präparaten.

<sup>1</sup> M. Kruty, J. B. Segur u. C. S. Miner, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **31**, 446 [1954].

<sup>2</sup> W. D. Pohle u. V. C. Mehlenbacher, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **27**, 54 [1950].

<sup>3</sup> E. Eidus, B. B. Diena, A. C. Maniar u. L. Gremberg, Canad. J. Microbiol. **6**, 283 [1960].

<sup>4</sup> K. S. Holla, L. A. Horrocks u. D. G. Cornwell, J. Lipid Res. **5**, 263 [1964].

<sup>5</sup> Z. analyt. Chem. **177**, 1 [1960].

<sup>6</sup> M. Eggstein u. F. H. Kreutz, Klin. Wschr. **44**, 262 [1966].

<sup>7</sup> M. Eggstein u. F. H. Kreutz, Klin. Wschr. **44**, 267 [1966].

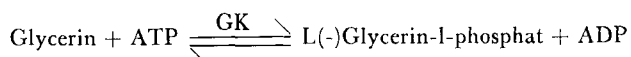
<sup>8</sup> F. Drawert u. G. Kupfer, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. **123**, 211 [1963].

<sup>9</sup> J. Hölzl, Fette · Seifen · Anstrichmittel **69**, 328 [1967].

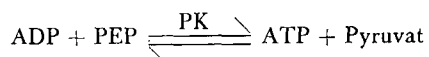
Die enzymatische Glycerinbestimmung sollte auf ihre Anwendbarkeit in der Fettanalytik hin überprüft werden.

#### Prinzip der enzymatischen Glycerinbestimmung<sup>6,7</sup>

Glycerin wird mittels Adenosintriphosphat (ATP) in Gegenwart von Glycerokinase (GK) phosphoryliert und in L(-)Glycerin-1-phosphat umgewandelt.



In einer Sekundärreaktion wird das entstandene Adenosindiphosphat (ADP) mit Hilfe von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase (PK) unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP übergeführt.



In der Indikatorreaktion wird das Pyruvat in Gegenwart einer Lactat-Dehydrogenase (LDH) durch hydriertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) reduziert. Die Abnahme des NADH wird spektrophotometrisch bei 340 oder 366 nm bestimmt. Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Glycerin-Menge äquivalent.



Weder Äthylenglykol, Polyhydroxy-Verbindungen (meso-Erythrit, L(+)-Arabinose), Mono-, Di- oder Triglyceride noch lineares 1,1-Diglycerin, 1,1,3,3-Triglycerin oder cyclisches Diglycerin reagieren mit ATP. Da außerdem Sekundär- und Indikatorreaktion streng spezifisch ablaufen, erübrigt sich bei genügender Wasserlöslichkeit der Proben eine Abtrennung von Begleitsubstanzen.

#### Analytische Bestimmungs-Methoden

##### Untersuchungsmuster

Glycerin\* und Essigsäure-monoglycerid (Gemisch der  $\alpha$ - $\beta$ -Isomeren)\*\* waren Handelsprodukte. Propionsäure-1-monoglycerid und Capronsäure-1-monoglycerid stellten wir durch Acylieren von 1,2-Isopropylidenglycerin<sup>10</sup> und Abspaltung der Isopropylidengruppe<sup>11</sup> her; gereinigt wurde über eine Silicagel-Säule<sup>12</sup>. Auch Ölsäure-1-monoglycerid wurde auf dem Syntheseweg<sup>10,11</sup> hergestellt\*\*\*.

Es wurden ferner Proben hochprozentiger Monoglyceride, die durch Um- oder Veresterungen hergestellt worden waren (siehe Tab. 4), auf ihren Gehalt an freiem bzw. gebundenem Glycerin analysiert.

##### Freies Glycerin und Gesamtglycerin nach Lit.<sup>1,2,13</sup>

Freies Glycerin<sup>1,2</sup>:

Bestimmung im wässrigen Extrakt nach Oxydation mit  $\text{HJO}_4$ . Gesamtglycerin (DGF-Einheitmethode)<sup>13</sup>:

Bestimmung im Spaltwasser durch Oxydation mit  $\text{HJO}_4$ .

Titration der gebildeten  $\text{HCOOH}$ .

\* Fa. Riedel de Haën, Hannover.

\*\* Fa. Schuchardt, München.

<sup>10</sup> M. S. Newman u. M. Renoll, J. Amer. chem. Soc. **67**, 1621 [1945].

<sup>11</sup> E. Baer u. H. O. L. Fischer, J. Amer. chem. Soc. **67**, 2031 [1945].

<sup>12</sup> P. Quinlin u. H. J. Weiser, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **35**, 325 [1958].

\*\*\* Herr Prof. Dr. Billek stellte uns freundlicherweise diese Substanz zur Verfügung.

<sup>13</sup> DGF-Einheitmethoden E III 3 a (55).

#### Enzymatische Glycerinbestimmung

Geräte:

Mikropipetten, Typ Marburg, der Fa. Gerätebau Eppendorf GmbH, Hamburg; Enzympipetten der Fa. Brandt, Wertheim, und das Spektralphotometer PMQ II der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen.

Reagentien:

Triäthanolamin-Puffer (TRA), 0.1 n, pH 7.6: 18.57 g Triäthanolaminhydrochlorid löst man in 800 ml bidest. Wasser, stellt den pH mit 0.1 n NaOH auf 7.6 ein und füllt mit bidest. Wasser auf 1000 ml auf.

Pufferlösung: 17.17 g Magnesiumchlorid (Merck 5833) werden in 100 ml bidest. Wasser gelöst. 41.8 ml TRA und 1 ml Magnesiumchlorid-Lösung ergeben 42.8 ml Pufferlösung.

Tricyclophosphoenolpyruvat (PEP): 23 mg PEP löst man in 2 ml bidest. Wasser.

Nicotin-adenin-dinucleotid red. (NADH red.): 14 mg NADH red. werden in 2 ml einer 1%igen wässrigen Natriumbicarbonat-Lösung gelöst.

Adenosintriphosphat (ATP): 60 mg ATP löst man in 2 ml bidest. Wasser. Pyruvatkinase (PK) — 2 mg/1 ml.

Lactat-Dehydrokinase (LDH) — 1 mg/1 ml.

Glycerokinase (GK): 1 ml der Enzymsuspension verdünnt man mit 1 ml bidest. Wasser. Die Substanzen werden, soweit nicht anders angegeben, von der Fa. Boehringer und Soehne Mannheim, bezogen. PK, LDH und GK sind auf Grund ihrer Instabilität nur in gelöster Form erhältlich.

Durchführung der enzymatischen Glycerinbestimmung: Direkt in eine Küvette gibt man

Pufferlösung	2.00 ml
PEP	0.05 ml
ATP	0.05 ml
NADH	0.05 ml
PK	0.01 ml
LDH	0.01 ml
	2.17 ml
TRA + Analysenlösung	0.5 ml
	2.67 ml
GK	0.01 ml
Endvolumen	2.68 ml

GK wird nach einer Wartezeit von ca. 10 Min. zugegeben; vorher wurde der Küvetteninhalt mit einem Plastikspatel umgerührt.

Gemessen wird kurz vor Zugabe der GK die Anfangsextinktion ( $E_A$ ) und nach beendeter Reaktion der Endwert ( $E_E$ ). Hierzu wird  $E_E$  zunächst nach 3 Min. und dann in Abständen von 2 Min. — bis ein konstanter  $E_E$ -Wert\*\*\*\* erreicht wird — abgelesen (Abb. 1). Die Eigenabsorption der Enzym-Lösungen liegt nach unseren Erfahrungen unter den angegebenen Bedingungen zwischen 0.070 und 0.100. Sollte der  $E_E$ -Wert < 0.100 sein, muß durch entsprechende Verdünnung der Analysenlösung korrigiert werden.

a) Freies Glycerin in wasserlöslichen Monoglyceriden:

In einen Meßkolben wägt man 20 bis 100 mg der Analysenprobe ein und füllt mit bidest. Wasser auf 10 ml auf. Mit einem aliquoten Teil der Lösung wird die Bestimmung durchgeführt.

b) Freies Glycerin in wasserunlöslichen bzw. stark emulgierenden Monoglyceriden:

In einen Meßzylinder wägt man 50 bis 100 mg Substanz ein und löst sie in 10 ml Dichlormethan. Man schüttelt mit 10.0 ml bidest. Wasser aus und zentrifugiert kurz. In

\*\*\*\* Beim Auftreten eines Nachschleich-Effektes muß extrapoliert werden (Abb. 1).

einem aliquoten Teil der klaren wäßrigen Phase bestimmt man das freie Glycerin.

Bei wasserunlöslichen Monoglyceriden ist aus meßtechnischen Gründen eine Abtrennung des freien Glycerins erforderlich, da bei der Zugabe des Puffers in der Küvette Trübungen auftreten, die den Meßvorgang stören.

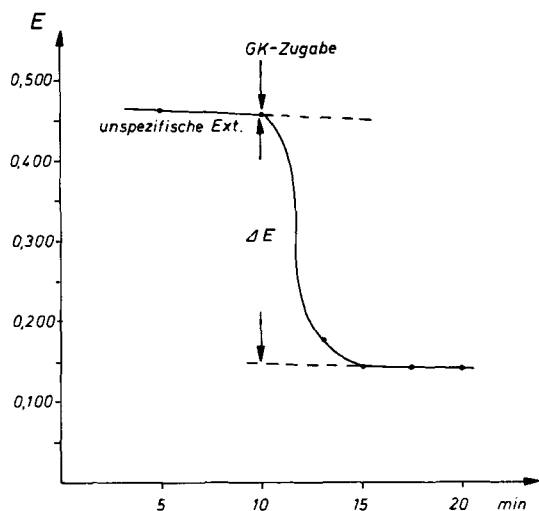


Abb. 1. Änderung der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit

Eine Gehaltsbestimmung des Glycerins ist nur im Bereich zwischen 0.004 und 0.3  $\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$  möglich, so daß bei extrem niedrigen ( $< 0.08$ ) und hohen ( $> 20\%$ ) Glycerin-Gehalten die angegebenen Einwaagen bzw. das Verhältnis Dichlormethan : Wasser entsprechend geändert werden müssen.

#### c) Gesamtglycerin:

Man löst 50 mg Substanz in 10 ml 70%igem Äthanol. Davon werden 0.5 ml mit 2.5 ml einer 0.5 n äthanolischen Kalilauge bei 70° C verseift. Es wurde überprüft, daß die Verseifung bereits nach 30 Min. quantitativ verlaufen ist. Nach dem Abkühlen des Verseifungsansatzes fügt man 10  $\mu\text{l}$  einer 0.5%igen äthanolischen Phenolphthalein-Lösung und 2.5 n Perchlorsäure bis zur vollständigen Entfärbung des Indikators\* zu. Die Lösung wird mit 3 ml Pufferlösung verdünnt und das Reaktionsgefäß 30 Min. lang in ein Eisbad gestellt. Man filtriert das Reaktionsgemisch in einen 10-ml-Meßkolben, wäscht den Niederschlag mit Pufferlösung und füllt mit bidest. Wasser auf 10 ml auf. Mit einem aliquoten Teil der Lösung wird die Glycerinbestimmung durchgeführt.

#### Auswertung:

$\Delta E^+ = (E_A - E_E) - \text{Blindwert}$  gibt direkt den Gehalt an Glycerin pro Ansatz an, da die spektrophotometrisch verfolgbare Konzentrationsänderung des NADH's der umgesetzten Glycerinmenge entspricht. Unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten für NADH und einer Küvetten-schichtdicke ( $d = 1 \text{ cm}$ ) folgt nach dem *Lambert-Beer'schen* Gesetz:

#### Freies Glycerin

$$\frac{\Delta E^+ \cdot \text{Endvolumen} \cdot F}{3.3} = \mu\text{Mol Glycerin/Einwaage}$$

bzw.

$$\frac{\Delta E^+ \cdot 2.68 \cdot F \cdot 92.05}{3.3} = \mu\text{g Glycerin/Einwaage}$$

F = Verdünnungsfaktor

\* Der Phenolphthalein-Zusatz stört die enzymatische Glycerinbestimmung nicht.

#### Gesamtglycerin

$$\frac{\Delta E^+ \cdot 2.68 \cdot F}{3.3} = \mu\text{Mol Glycerin/Einwaage}$$

bzw.

$$\frac{\Delta E^+ \cdot 2.68 \cdot 92.05 \cdot F}{3.3} = \mu\text{g Glycerin/Einwaage}$$

#### Gebundenes Glycerin

Der Gehalt an gebundenem Glycerin wird wie folgt ermittelt:

$$\text{Gesamtglycerin} - \text{freies Glycerin} = \text{gebundenes Glycerin.}$$

#### Erfassungsgrenzen:

Die Ablesegenauigkeit der Extinktion beträgt  $\pm 0.001$ ; das entspricht einer relativen Standardabweichung von 0.12 %. Die untere Erfassungsgrenze der enzymatischen Glycerinbestimmung liegt bei 0.004  $\mu\text{Mol}$  pro Ansatz, da mit dem Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss gerade noch ein  $\Delta E^+$ -Wert von 0.005 ermittelt werden kann. Andererseits lassen sich unter Beibehaltung der angegebenen Substanzmengen bis zu 0.3  $\mu\text{Mol}$  Glycerin pro Ansatz bestimmen. Dies entspricht einem  $\Delta E^+ \sim 0.4$  und liegt im günstigsten Meßbereich des Spektralphotometers.

#### Ergebnisse

##### Glycerin-Standardlösungen

Die Genauigkeit der enzymatischen Analyse wurde an Hand von Glycerin-Standardlösungen überprüft.

Aus Zehnfachbestimmungen von drei Glycerin-Einwaagen (Tab. 1) erhielt man Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), deren Abweichung vom tatsächlichen Wert nicht größer als 2 % war.

Tabelle 1

##### Statistische Daten der enzymatischen Glycerin-Analyse

#### Glycerin-

Einwaage: 0.211 $\mu\text{Mol}$		0.338 $\mu\text{Mol}$		0.489 $\mu\text{Mol}$	
$\Delta E^+$	$\mu\text{Mol}$	$\Delta E^+$	$\mu\text{Mol}$	$\Delta E^+$	$\mu\text{Mol}$
0.231	0.210	0.373	0.339	0.539	0.489
0.235	0.213	0.369	0.335	0.540	0.490
0.233	0.212	0.371	0.337	0.543	0.493
0.238	0.216	0.372	0.338	0.547	0.496
0.235	0.213	0.363	0.329	0.545	0.495
0.237	0.215	0.361	0.328	0.545	0.495
0.236	0.214	0.368	0.334	0.543	0.493
0.238	0.216	0.363	0.329	0.546	0.496
0.233	0.212	0.366	0.332	0.538	0.488
0.234	0.212	0.374	0.339	0.540	0.490
$\bar{x}$	0.213		0.334		0.492
s	$\pm 0.002$		$\pm 0.004$		$\pm 0.003$
$s_{\text{rel}}$	0.93 %		1.29 %		0.61 %
$x_{\text{rel}}$	2.07 %		2.88 %		1.36 %

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$$

$$s_{\text{rel}} = s \cdot \frac{100}{\bar{x}}$$

$$\Delta x_{\text{rel}} = s_{\text{rel}} \cdot t(P, n)$$

$$t(P, n) = 2.23 \text{ für } P = 95\%$$

Die  $\Delta E^+$ -Werte dieser Messung beziehen sich, abweichend von der angegebenen Auswertung, auf ein Endvolumen von 2.995 statt 2.68 ml.

Das *Lambert-Beer'sche* Gesetz ist über einen weiten Bereich erfüllt.

In Abb. 2 ist die Einwaage mit dem Mittelwert von  $\Delta E^+$  verglichen. Die relativen Standardabweichungen<sup>14</sup> liegen zwischen 0.60 und 1.29 % und die relativen Streubereiche  $\Delta x_{rel}$ <sup>14</sup> für eine statistische Sicherheit P von 95 % zwischen 1.36 und 2.88 %.

Die Methode der enzymatischen Glycerinbestimmung ist im Mikromaßstab für Routine-Analysen durchaus geeignet. Die enzymatische Reaktion verläuft mit einer hohen Substratspezifität. Sie ist nach 6 bis 10 Min. beendet, an vorbereitender Arbeit ist lediglich mehrfaches

Tabelle 3

*Bestimmung des Gesamtglycerins*

Monoglycerid- Präparate Ausgangs- material	Gesamtglycerin [%]				
	nach Lit. 13	$\bar{x}$	enzymatisch	$\bar{x}$	
	Einzel- bestimmung		Einzel- bestimmung		
Cocosfettsäure		28.3 *	28.2	28.2	28.8
				30.0	
Olivenölfettsäure		20.7 *	20.5	20.1	20.3
Ölsäure		20.6 *	20.8	20.2	20.8
				21.3	
Ricinusöl		22.2 *	21.7	22.3	22.0
				22.0	
epoxyd. Leinöl	17.8	16.8	17.3	16.2	16.5
epoxyd. Sojaöl	21.7	17.5	19.6	16.0	16.0
epoxyd. Sojaöl	16.0	15.2	15.6	15.6	15.0
epoxyd. Sojaöl	17.4	17.1	17.3	16.8	16.8
epoxyd. Sojaöl	16.2	16.8	16.5	15.7	15.7
epoxyd. Sojaöl	17.9	17.6	17.7	16.8	16.3
epoxyd. Sojaöl	17.6	17.0	17.3	17.9	17.9
epoxyd. Sojaöl			19.0 *	18.8	18.5
Vernonia-Öl			10.1 *	10.4	10.0
epoxyd. Leinöl			14.8 *	14.2	14.0
epoxyd. Leinöl			14.6 *	13.7	13.7

\* Mittelwert einer Doppelbestimmung am Spaltwasser.

Tabelle 2

*Wasserlösliche Monoglyceride*

Probe	freies Glycerin [%]	Glycerin- Zusatz [%]	freies Glycerin + Zusatz ber. gef. [%]	
Essigsäure- monoglycerid ( $\alpha + \beta$ )	16.5	6.6	23.1	22.8
Propionsäure-1- monoglycerid	0.4	19.5	19.9	20.0
Capronsäure-1- monoglycerid	0.1	15.6	15.7	16.0

<sup>14</sup> K. Doerffel, Beurteilung von Analysenverfahren und -ergebnissen, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, J. F. Bergmann, München 1962.

Tabelle 4

*Bestimmung des freien Glycerins*

Monoglycerid- Präparate Ausgangsmaterial	freies Glycerin [%]										enzymatisch		
	nach Lit. 1					nach Lit. 2					Einzel-		
	Einzelbestimmung ausgeführt an:					Einzelbestimmung ausgeführt an:					bestimmung *		
	0.12 bis 0.26 g		ca. 2 g			0.47 bis 0.61 g		ca. 2.5 g					
Cocosfettsäure	0.31	0.30	0.27	0.27	0.29	0.17	0.21	0.11	0.11	0.15	0.06	0.06	0.06
Olivenölfettsäure	0.18	0.19	0.13	0.15	0.16	0.10	0.11	0.06	0.06	0.08	0.03	0.04	0.04
Ölsäure	0.10	0.15	0.15	0.17	0.14	0.14	0.11	0.09	0.09	0.11	0.05	0.04	0.05
Ricinusöl	0.43	0.47	0.36	0.36	0.41	0.29	0.28	0.30	0.30	0.29	0.30	0.27	0.29
epoxyd. Leinöl											0.15	0.16	0.16
epoxyd. Sojaöl											0.10	0.10	0.10
epoxyd. Sojaöl											0.05	0.05	0.05
epoxyd. Sojaöl											0.04	0.04	0.04
epoxyd. Sojaöl											0.04	0.05	0.05
epoxyd. Sojaöl											0.09	0.10	0.10
epoxyd. Sojaöl											0.04	0.04	0.04
Vernonia-Öl											0.03	0.03	0.03
epoxyd. Leinöl											0.60	0.60	0.60
epoxyd. Leinöl											0.02	0.02	0.02
Cocosvorlaufettsäure											0.02	0.02	0.02
"											0.05	0.04	0.05
"											0.05	0.05	0.05
"											0.04	0.04	0.04
"											0.03	0.03	0.03
"											0.03		0.03
"											0.03		0.03
"											0.02		0.02
"											0.02		0.02

\* Die angegebenen Einzelwerte wurden von verschiedenen Einwaagen erhalten. Jeder Einzelwert ist der Mittelwert aus einer Doppelbestimmung gleicher Einwaage.

Pipettieren notwendig. Es können von einer eingearbeiteten Fachkraft 8 bis 10 Messungen pro Stunde durchgeführt werden.

### Freies Glycerin in wasserlöslichen Monoglyceriden

Der Gehalt an freiem Glycerin wurde im Handelsprodukt Essigsäuremonoglycerid zu 16 %, in synthetisiertem Propionsäure-1-monoglycerid und Capronsäure-1-monoglycerid zu < 1 % ermittelt (Tab. 2). Bei diesen Proben wurde zur Kontrolle die Zumischtechnik eingesetzt.

### Vergleich der enzymatischen Glycerinbestimmung und der chemischen Methoden

In Tab. 3 sind die Werte der enzymatischen Bestimmung des Gesamtglycerins an einigen Monoglycerid-Proben den Ergebnissen der Analyse nach der DGF-Einheitmethode<sup>13</sup> gegenübergestellt.

Die meisten dieser Muster emulgieren stark. Eine Bestimmung des freien und somit auch des gebundenen Glycerins durch Titration<sup>1,2</sup> war nur bei 4 Proben mög-

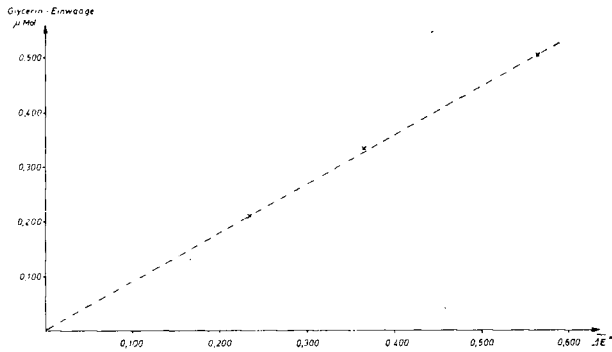


Abb. 2. Vergleich der Glycerin-Einwaage mit dem Mittelwert von  $\Delta E^+$

Tabelle 5

### Überprüfung der Glycerin-Analyse von Monoglycerid-Proben mit Hilfe der Zumischtechnik

Muster	1		2		3		4	
Einwaage								
[mg]	12.782	11.264	12.912	1.291	1.836	4.774	2.603	
freies								
Glycerin								
[μg]	3.42	3.28	3.45	0.25	0.35	7.40	15.03	
Glycerin-								
Zusatz								
[μg]	1.25	2.48	4.92	13.31	18.29	27.65	16.59	
freies								
Glycerin								
+ Zusatz								
berechnet								
[μg]	4.67	5.76	8.37	13.56	18.64	35.05	31.62	
gefunden								
[μg]	4.81	5.89	8.51	13.05	17.93	35.57	32.5	

1: Monoglyceride aus Cocosvorlauffettsäuren; 2: Monoglyceride aus Cocosvorlauffettsäuren; 3: Monoglyceride aus epoxidiertem Leinöl; 4: Monoglyceride aus Vernonia-Öl

lich. Enzymatisch konnte der Gehalt an freiem und gebundenem Glycerin ohne Schwierigkeiten bestimmt werden (Tab. 3 und 4).

### Überprüfung der enzymatischen Bestimmung des freien Glycerins mittels der Zumischtechnik

Zu einigen ausgewählten Monoglycerid-Proben wurde zum Beweis der Richtigkeit der enzymatischen Glycerinbestimmung eine definierte Menge an freiem Glycerin zugegeben und die Mischung erneut analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 aufgeführt.

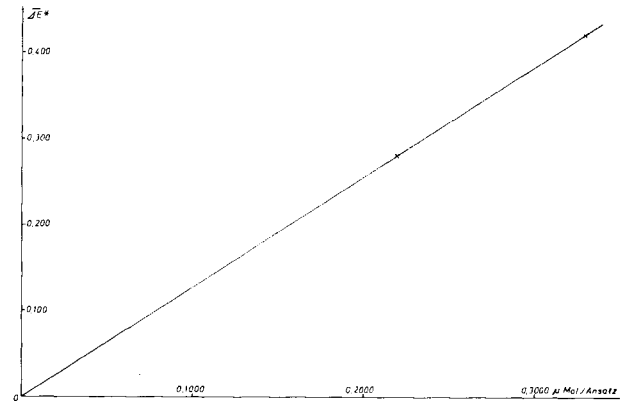


Abb. 3. Vergleich der Monoglycerid-Einwaage mit dem Mittelwert von  $\Delta E^+$

Tabelle 6

### Ermittlung der statistischen Daten der enzymatischen Glycerinbestimmung an zwei Ölsäure-1-monoglycerid Einwaagen\*

Einwaage in μMol: 0.219 $\Delta E^+$ μMol Ölsäure-1-monoglycerid pro Ansatz		Einwaage in μMol: 0.330 $\Delta E^+$ μMol Ölsäure-1-monoglycerid pro Ansatz	
0.285	0.226	0.423	0.335
0.279	0.221	0.419	0.332
0.283	0.224	0.421	0.334
0.283	0.224	0.420	0.333
0.277	0.220	0.421	0.334
0.277	0.220	0.415	0.329
0.276	0.219	0.424	0.336
0.282	0.224	0.424	0.336
0.275	0.218	0.414	0.328
0.282	0.224	0.416	0.330
$\bar{x}$ 0.280	0.222	0.420	0.333
s	± 0.003		± 0.003
$s_{rel}$	1.26 %		0.86 %
$\Delta x_{rel}$	2.81 %		1.92 %

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$$

$$s_{rel} = s \cdot \frac{100}{\bar{x}}$$

$$\Delta x_{rel} = s_{rel} \cdot t(P, n)$$

$$t(P, n) = 2.33, \text{ für } P = 95 \%$$

Die  $\Delta E^+$ -Werte dieser Messung beziehen sich, abweichend von der angegebenen Auswertung, auf ein Endvolumen von 2.616 statt 2.68 ml und auf ein Auffüllvolumen nach der Verseifung von 3.44 statt 10.0 ml.

\* Ölsäure-1-monoglycerid enthält kein freies Glycerin (enzymatisch bestimmt).

### *Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Monoglyceridbestimmung*

Aus Zehnfachbestimmungen von 2 Monoglycerid-Einwaagen erhielten wir Mittelwerte, deren Abweichung vom tatsächlichen Wert nicht mehr als 1.45% beträgt (Tab. 6). Das *Lambert-Beer'sche* Gesetz ist in einem weiten Bereich erfüllt (Abb. 3). Es ergeben sich relative Standardabweichungen zwischen 0.86% und 1.26% sowie relative Streubereiche  $\Delta x_{rel}$  für eine statistische Sicherheit P von 95% zwischen 1.92% und 2.81% (Tab. 6).

### Diskussion

Die enzymatische Glycerinbestimmung verläuft so spezifisch, daß selbst in Gemischen freies Glycerin bestimmt werden kann. Dies ermöglicht eine Gehaltsbestimmung des freien und gebundenen Glycerins in wasserlöslichen bzw. stark emulgierenden Monoglyce-

riden, während mit chemischen Methoden hier nur der Gesamtglycerin-Gehalt bestimmt werden kann.

Eine Gegenüberstellung der Analysenmethoden zeigen die Tab. 3 und 4. Bei der Bestimmung des Gesamtglycerins (Tab. 3) ist die Übereinstimmung der enzymatisch bestimmten mit den nach Lit. 13 durch Titration erhaltenen Werten sehr gut. Die Bestimmung des freien Glycerins nach Lit. 1 und Lit. 2 (Tab. 4) konnte nur an 4 Proben durchgeführt werden und lieferte stark streuende Werte. Mit einer strengen Substratspezifität und hoher Empfindlichkeit verläuft hingegen die enzymatische Gehaltsbestimmung des Glycerins vor und nach einer Verseifung. Weitere Vorteile sind der geringe Zeitaufwand und Substanzbedarf.

Für die sorgfältige Durchführung der analytischen Arbeiten danken wir Fr. R. Kröger, Fr. M. Kröpelin, Fr. H. Haack und Frau B. Schmidt.

## Buchbesprechungen

F. Rossner, Jahrbuch für das Textil-Reinigungsgewerbe 1969. Bussesse Verlagshandlung GmbH, Herford 1969. 360 S., 56 Abb., zahlreiche Tab., Preis DM 18.80.

Das im elften Jahrgang vorliegende Jahrbuch für das Wäscherei- und Chemischreinigungsgewerbe gibt wie auch in früheren Jahren einen interessanten Querschnitt über aktuelle Probleme der Textilreinigung und ist in erster Linie für den Praktiker bestimmt. Das Buch gliedert sich in fünf Abschnitte. Der Aufsatzteil enthält 23 Originalbeiträge von Fachleuten aus Wissenschaft und Praxis. Den thematischen Schwerpunkt bilden Lösungsmittel für die Chemischreinigung. Wirtschaftliche und technische Aspekte werden ebenfalls ihrer Bedeutung entsprechend in zahlreichen Aufsätzen behandelt. An den Hauptteil schließt sich ein ABC des Textilreinigers, das gegenüber der letzten Ausgabe ergänzt und erweitert wurde. Der dritte Teil bringt, teils in Tabellenform, eine Materialsammlung für die Praxis (pH-Wert und pH-Messungen; Wasseruntersuchung; Bestimmung der Alkalität, Bleichlaugen; Wärmeenergie-Fragen für Wäschereien und Chemischreinigungen; Fette, Seifen und Syndets; Lösungsmittel; Textilfasern und Gewebe; Wasch- und Reinigungsgut; physikalische Größen; amerikanische und englische Maßgrößen). Literaturhinweise (Bücher; Jahrbücher und sporadische Veröffentlichungen; Fachzeitschriften) und ein Kapitel über Verbände und Institutionen bilden den Abschluß des Jahrbuches, das dem Praktiker bestens empfohlen werden kann. Druck und Ausstattung sind gut.

R. Grau, Fleisch und Fleischwaren, Band 7 der Schriftenreihe „Grundlagen und Fortschritte der Lebensmitteluntersuchung“, herausgegeben von J. Schormüller, Berlin, und H. Melchior, Berlin. 2., neubearbeitete und erweiterte Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1969. 312 S., 30 Abb., 108 Tab., Preis DM 44.—.

Die Forschung über Fleisch wurde in den letzten Jahren stark intensiviert, so daß die einschlägige Literatur über dieses Hauptnahrungsmittel stark angewachsen ist. Deshalb erfuhr die zweite Auflage des bewährten Buches, zu deren Gelingen namhafte Wissenschaftler des In- und Auslandes durch wichtige Mitteilungen und Hinweise beigetragen haben, eine fast völlige Neubearbeitung. Das Buch behandelt nun in übersichtlicher Darstellung die Chemie, Biochemie und Analytik des Fleisches, seine Behandlungsverfahren und Fleischerzeugnisse. Nach einem allgemeinen Teil, in dem u. a. die Verwendung von Antioxydantien, Antibiotica und Hormonen als Futterzusätze erläutert wird, beschreibt der Verfasser aus-

föhrlich den chemischen Aufbau des Muskelfleisches und der übrigen Teile des Schlachtkörpers. Nach diesem Kapitel folgen die Abschnitte „Biochemie des Fleisches und Chemie der Behandlungsverfahren“ sowie „Analytik des Fleisches und der Fleischerzeugnisse“. Ein ausführliches Literatur- und Sachverzeichnis bilden den Abschluß des Buches.

H. Rudy, Fruchtsäuren. Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg 1967. 134 S., 25 Abb., 32 Tab., Preis DM 38.—.

Das vorliegende Buch gibt einen umfassenden Überblick über Fruchtsäuren, die heute bereits in großem Maßstab technisch hergestellt werden. Man verwendet sie nicht nur in der Lebensmittel-, Getränke- und Süßwarenindustrie, sondern auch auf dem technischen Sektor, so z. B. bei der Metallbehandlung, in der Leder-, Textil- und Papierindustrie sowie für pharmazeutische und kosmetische Artikel. In dem Buch behandelt der Verfasser das Vorkommen der Fruchtsäuren, die physikalischen und chemischen Eigenschaften, Analysemethoden, die physiologische Bedeutung, die Herstellung und die Verwendung der Säuren und ihre Derivate. Die Gliederung erfolgte in die Kapitel über Weinsäure, Citronensäure, Äpfelsäure, Fumarsäure und Bernsteinsäure. Die zwei letztgenannten Säuren sind zwar keine eigentlichen Fruchtsäuren; sie haben jedoch ähnliche Eigenschaften wie Fruchtsäuren und werden daher für bestimmte Verwendungszwecke an ihrer Stelle eingesetzt. Das Buch wird dem Chemiker, Ingenieur, Ernährungsspezialisten, Wirtschaftler und Unternehmer, die sich mit dem Vertrieb und der Verwendung von Fruchtsäuren zu befassen haben, eine wertvolle Hilfe sein.

H.-J. Schlüßler und H. Mrozek, Praxis der Flaschenreinigung, aus den Anwendungstechnischen Laboratorien der Firma Henkel & Cie., Düsseldorf.

Das vorliegende Handbuch gibt eine Übersicht über die Chemie und Technologie der Flaschenreinigung sowie über die in diesem Zusammenhang wichtigen mikrobiologischen Fragen. In anschaulicher und verständlicher Weise werden alle in der Praxis vorkommenden Reinigungsaufgaben mit den dazu verwendeten Anlagen und Produkten erläutert. Die bakteriologischen Probleme werden an Hand von praktischen Beispielen erklärt. Somit gibt dieses Handbuch dem Praktiker wertvolle Hinweise, wie er auftretende Schwierigkeiten bei der Flaschenreinigung schnell erkennen und die richtigen Entscheidungen zu ihrer Beseitigung treffen kann. Interessenten erhalten die Neuerscheinung auf Anforderung von der Abteilung P 3, Henkel & Cie. GmbH, 4 Düsseldorf, Postfach 1100, zugestellt.