

# Ethanol

## UV-Test

zur Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

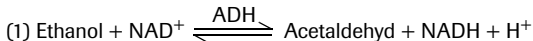
## Vereinfachtes Verfahren zur Bestimmung von Ethanol in alkoholischen Getränken s. Pkt. 13

Best. Nr. 10 176 290 035

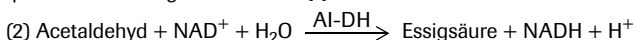
Test-Combination für 33 Bestimmungen

### Prinzip (Lit. 1)

Ethanol wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms Alkohol-Dehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd oxidiert (1).



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von Ethanol und NAD. Durch alkalisches Milieu und durch Abfangen des gebildeten Acetaldehyds kann das Gleichgewicht auf die rechte Seite verschoben werden. Acetaldehyd wird in Gegenwart von Aldehyd-Dehydrogenase (Al-DH) quantitativ zu Essigsäure oxidiert (2).



NADH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

### Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 100 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Kaliumdiphosphat-Puffer, pH ca. 9,0
2. Flasche 2 mit ca. 30 Tabletten; jede Tablette enthält: NAD, ca. 4 mg; Aldehyd-Dehydrogenase, ca. 0,8 U
3. Flasche 3 mit ca. 1,6 ml Suspension, ADH, ca. 7000 U
4. Flasche 4 mit Ethanol-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

1. Inhalt der Flasche 1 unverdünnt verwenden.
2. In einem Becherglas oder Zentrifugenglas je nach Anzahl der Bestimmungen für jeden Test (Leerwert und Proben) **eine** Tablette aus Flasche 2 mit **drei** ml Lösung aus Flasche 1 lösen (zur Entnahme der Tabletten aus Flasche 2 Pinzette benutzen), ergibt Reaktionsgemisch 2\*.
3. Inhalt der Flasche 3 unverdünnt verwenden.

### Stabilität der Lösungen

Lösung 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 1 vor Gebrauch auf 20°C bringen.

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

Reaktionsgemisch 2 ist bei 2-8°C 1 Tag haltbar.

Reaktionsgemisch 2 vor Gebrauch auf 20°C bringen.

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

### Bestimmungsansatz

Wellenlänge<sup>1</sup>: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm

Glasküvette<sup>2</sup>: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20°C

Testvolumen: 3,150 ml

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette), gegen Wasser oder Leerwert<sup>3</sup>.

Probelösung: 0,3-12 µg Ethanol/Testansatz<sup>4</sup> (in 0,100-0,500 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 Z. B. bei Verwendung eines Zweistrahlphotometers

4 S. Hinweise zur Testdurchführung

5 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG; Untersuchung von Lebensmitteln: Ermittlung des Ethanolgehaltes in Alkohol und alkoholhaltigen Erzeugnissen aller Art (ausser Wein und Bier), L 3700-1 (Nov. 1982). Siehe auch Literatur 3.9, Seite 783. Zu Temperaturkorrekturen siehe z. B. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 272 (3. Oktober 1990), Rechtsvorschriften, Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 der Kommission vom 17. September 1990 zur Festlegung gemeinsamer Analysemethoden für den Weinsektor.

## 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
Reaktionsgemisch 2 bidest. Wasser Probelösung*	3,000 ml 0,100 ml -	3,000 ml - 0,100 ml
mischen**, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E <sub>1</sub> ). Reaktion starten durch Zugabe von		
Suspension 3	0,050 ml	0,050 ml
mischen**, nach Ablauf der Reaktion (ca. 5-10 min) Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander messen (E <sub>2</sub> ).		

Es ist unbedingt notwendig, während der Messung die Küvetten, z.B. mit Parafilm, zu verschliessen (s. "Hinweise zur Testdurchführung"), um die Adsorption von Ethanol aus der Luft durch das Reaktionsgemisch zu vermeiden.

\* Vor der Dosierung der Probelösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mehrfach mit der Probelösung vorspülen; Probelösung stets direkt in das Reaktionsgemisch 2 pipettieren.

\*\* Z. B. mit Rührspatel oder durch Umschwenken nach Verschliessen z. B. mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA)

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

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).

### Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung von Konzentrationen in Reaktionen, bei denen die Substratmenge der doppelten NADH-Menge äquivalent ist, gilt:

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei:

$$340 \text{ nm} = 6.3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3.4 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6.18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

Hieraus ergibt sich für Ethanol:

$$c = \frac{3.150 \times 46.07}{\varepsilon \times 1.00 \times 0.100 \times 2 \times 1000} \times \Delta E = \frac{0.7256}{\varepsilon} \times \Delta E \text{ [g Ethanol/l Probe-lösung]}$$

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:

$$\text{Gehalt}_{\text{Ethanol}} = \frac{c_{\text{Ethanol}} \text{ [g/l Probe-lösung]}}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probe-lösung}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

Bei der Analyse alkoholischer Proben (Getränke, Arzneimittel, Kosmetika) werden die Volumen-Prozente bei 20 °C mit Hilfe der Dichte von Ethanol (bei 20 °C)  $d = 0,78924 \text{ g/ml}$  berechnet<sup>5</sup>:

$$\text{Prozent}_{\text{Ethanol}} = \frac{c_{\text{Ethanol}} [\text{g/l Probelösung}]}{10 \times 0,78924 [\text{g/ml}]} \quad [%; \text{v/v}]$$

### 1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Ethanol-Menge zwischen 0,5 µg und 12 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 0,3 µg und 6 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Ethanolkonzentration zwischen 0,02 und 0,12 g/l bzw. 0,01 und 0,06 g/l liegt.

**Bedingt durch die hohe Empfindlichkeit der Methode ist darauf zu achten, dass ethanolfreies Wasser verwendet und in ethanolfreier Atmosphäre gearbeitet wird.**

#### Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an Ethanol im Liter		Verdünnung mit Wasser (in Volumenteilen)	Verdünnungsfaktor F
340 oder 334 nm	365 nm		
< 0,06 g	< 0,12 g	-	1
0,06-0,6 g	0,12-1,2 g	1 auf 10	10
0,6-6,0 g	1,2-12 g	1 auf 100	100
6,0-60 g	12-120 g	1 auf 1000	1000
> 60 g	> 120 g	1 auf 10000	10000

Bedingt durch die Flüchtigkeit von Ethanol wird beim Verdünnen von Proben folgendes Vorgehen vorgeschlagen:

Messkolben etwa zur Hälfte mit bidest. Wasser (20°C) füllen und Probe (20°C) mit Enzymtest- oder Kolbenhubpipette unter die Wasseroberfläche pipettieren. Messkolben mit bidest. Wasser (20°C) bis zur Marke auffüllen und mischen.

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz ( $\Delta E$ ) 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 0,500 ml zu erhöhen. Das Volumen an Lösung 1 bzw. Reaktionsgemisch 2 bleibt dabei unverändert (3,000 ml). In gleichem Mass ist das in die Leerwert-Küvette zu pipettierende Volumen an bidest. Wasser zu erhöhen. Geändertes Probevolumen ( $v$ ) und Testvolumen ( $V$ ) sind in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

### 2. Technische Hinweise

2.1 Ethanol ist sehr flüchtig. Deshalb sind bei der Handhabung der Probe, bei der Herstellung von Verdünnungen und beim Pipettieren der Probelösung in die Küvette besondere Massnahmen zu ergreifen:

Beim Filtrieren von Lösungen Filtrat nicht in das Auffanggefäss tropfen, sondern an der Gefässwand herablaufen lassen.

Beim Dosieren von alkoholhaltigen Lösungen diese stets unter die Oberfläche von Wasser (beim Verdünnen) oder von Puffer (bei Bestimmungsansatz) pipettieren.

2.2 Beim Pipettieren stark verdünnter Probelösungen in den Testansatz Enzymtest-Messpipette mindestens 6-mal vorspülen. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mindestens 3-mal vorspülen.

2.3 Zum Verdünnen alkoholhaltiger Proben und zum Dosieren von Reagenzien niemals dieselbe Kolbenhubpipette nehmen.

2.4 Immer in alkoholfreier Atmosphäre mit alkoholfreiem Wasser arbeiten.

### 3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Der Einfluss von Aldehyden und Ketonen wird durch die Reihenfolge der Reagenzienzugabe beim Test ausgeschaltet. Methanol wird wegen ungünstiger  $K_M$ -Werte der verwendeten Enzyme nicht umgesetzt.

n-Propanol und n-Butanol werden unter Testbedingungen quantitativ umgesetzt, höhere primäre Alkohole führen zu probeabhängigen Schleichreaktionen. Sekundäre, tertiäre und aromatische Alkohole reagieren nicht. Glycerin stört den Test auch bei höheren Konzentrationen nicht.

Bei der Analyse von Reinsubstanz Ethanol ist mit Ergebnissen von ca. 100% zu rechnen. (Eine Wiederfindung von weniger als 100% bedeutet nicht unbedingt eine unvollständige Umsetzung bei der enzymatischen Bestimmung, sondern ist eher ein Hinweis für den Verlust an Analyt während der Handhabung, dem Verlust an Analyten bei der Herstellung der Ethanollösung und beim Pipettieren der verdünnten Ethanollösung in den Testansatz.)

### 4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.3)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen  $v = 0,500 \text{ ml}$  bei einem Testvolumen  $V = 3,550 \text{ ml}$  und Messung bei 340 nm einer Konzentration an Ethanol von ca. 0,1 mg/l (bei  $v = 0,100 \text{ ml}$  und  $V = 3,150 \text{ ml}$  entsprechend 0,6 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,5 mg/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm), dem maximalen Probevolumen  $v = 0,500 \text{ ml}$  und dem Testvolumen  $V = 3,550 \text{ ml}$ .

### 5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von ca. 0,3 µg Ethanol/Ansatz (0,5 mg Ethanol/l Probelösung; Probevolumen  $v = 0,500 \text{ ml}$ ; Testvolumen  $V = 3,550 \text{ ml}$ ) bis 12 µg Ethanol/Ansatz (0,12 g Ethanol/l Probelösung; Probevolumen  $v = 0,100 \text{ ml}$ ; Testvolumen  $V = 3,150 \text{ ml}$ ).

### 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  $v = 0,100 \text{ ml}$  und einem Testvolumen  $V = 3,150 \text{ ml}$  einer Ethanol-Konzentration von ca. 0,5-1 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. 0,005-0,01 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

$x = 2,5 \text{ µg/Ansatz}$	VK = 1,2 %	$n = 16$ in Serie
$x = 5 \text{ µg/Ansatz}$	VK = 0,56 %	$n = 16$ in Serie
$x = 10 \text{ µg/Ansatz}$	VK = 0,79 %	$n = 16$ in Serie
$x = 5 \text{ µg/Ansatz}$	VK = 1,64 %	$n = 30$ Tag zu Tag

(Lit. 1.2)

Helles Bier	$x = 3,585 \text{ g/l}$	$r = 0,202 \text{ g/l}$	$s_{(r)} = \pm 0,071 \text{ g/l}$
		$R = 0,368 \text{ g/l}$	$s_{(R)} = \pm 0,130 \text{ g/l}$
Malztrunk	$x = 4,755 \text{ g/l}$	$r = 0,243 \text{ g/l}$	$s_{(r)} = \pm 0,086 \text{ g/l}$
		$R = 0,591 \text{ g/l}$	$s_{(R)} = \pm 0,209 \text{ g/l}$

(Lit. 2.13)

Weitere Daten: s. Literatur

### 7. Störungen

Ethanol im verwendeten bidest. Wasser oder in der Laborluft führt zu erhöhten Leerwerten, bzw. zu Schleichreaktionen. Deshalb ist das Verschliessen der Küvetten beim Testansatz erforderlich.

### 8. Erkennen von Störungen

8.1 Ist die Umsetzung von Ethanol nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.

8.2 Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von Ethanol (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.

8.3 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 bei konstantem Testvolumen 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.

8.4 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.

8.5 Verluste während der Vorbereitung der Probe können durch Wiederfindungsversuche erkannt werden: Die Probe wird mit und ohne zugegebenem Standardmaterial vorbereitet und anschließend gemessen. Der Zusatz muss (innerhalb des Analysenfehlers) quantitativ wiedergefunden werden.

## 9. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von Ethanol sind keine gefährlichen Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinie 67/548/EWG und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Die beim Umgang mit Chemikalien üblichen Vorsichtsmaßnahmen sollten jedoch beachtet werden.

Nach Gebrauch können die Reagenzien unter Beachtung der örtlichen Vorschriften zum Abwasser gegeben werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

## 10. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

**Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben** direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle (zur Vermeidung von Ethanol-Verlusten ist die zu verdünnende Lösung immer unter die Oberfläche des Verdünnungsmittels zu pipettieren) oder mit einem Probevolumen bis 0,500 ml zum Test einsetzen;

**trübe Lösungen** filtrieren (es können hierbei geringe Verluste an Ethanol auftreten);

**Kohlensäure-haltige Proben** (z. B. durch Filtration) entgasen (es können hierbei geringe Verluste an Ethanol auftreten) oder mit Ätzkali (KOH) oder Ätznatron (NaOH) alkalisieren, um CO<sub>2</sub> in Form von Bicarbonat zu binden; **saure Probe** durch Zugabe von Natronlauge oder Kalilauge auf pH 8-9 einstellen;

**saure und schwach gefärbte Proben** durch Zugabe von Natronlauge oder Kalilauge auf pH 8-9 einstellen und ca. 15 min stehen lassen;

**„stärker gefärbte“ Proben** (falls erforderlich auf pH 8-9 eingestellt) gegen Probeleerwert (= Puffer bzw. bidest. Wasser + Probe) messen (Photometer mit Probeleerwert im Strahlengang auf 0,000 einstellen);

**stark gefärbte Proben**, mit Polyamid oder Polyvinylpyrrolidon, PVPP (z.B. 2 g/100 ml Probe) behandeln (es können hierbei geringe Verluste an Ethanol auftreten);

**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 oder mit Perchlorsäure enteiuweissen;

**Fett-haltige Proben** mit warmen Wasser (Temperatur über dem Schmelzpunkt des Fettes) in einem Kölbchen mit Steigrohr extrahieren, zur Abscheidung des Fettes abkühlen lassen, Steigrohr mit Wasser nachspülen, filtrieren; alternativ nach Extraktion mit warmen Wasser mit Carrez-Reagenzien klären.

### Carrez-Klärung:

Geeignete Probemenge in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, 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 (Kalium-hexacyanoferrat(II) (Ferrocyanid) 85 mM = 3,60 g K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] × 3 H<sub>2</sub>O/100 ml) und 5 ml Carrez-II-Lösung (Zinksulfat, 250 mM = 720 g ZnSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O/100 ml) sorgfältig dosieren. Mit Natronlauge (0,1 mM; 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 Ethanol in Fruchtsäften (Lit. 3.1, 2.6, 2.9, 2.12)

a) Klare, helle Säfte nach Neutralisation und je nach Alkoholgehalt verdünnt (s. Verdünnungstabelle) zum Test einsetzen.

b) Dunkle Säfte zur Entfärbung am günstigsten mit 2% Polyamid oder Polyvinylpyrrolidon (PVPP) (z.B. 5 ml Saft + 100 mg Polyamid oder PVPP) 2 min lang (Gefäss verschlossen halten) rühren und filtrieren; die meist klare Lösung nach Neutralisation zum Test einsetzen. Bei Verdünnen der Probe erübrigt sich oft eine Entfärbung.

c) Trübe Säfte filtrieren, ggf. mit Carrez-Lösungen klären: 10 ml Saft in einen 25 ml-Messkolben pipettieren, 1,25 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kaliumhexacyanoferrat(II), K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] × 3 H<sub>2</sub>O/100 ml), 1,25 ml Carrez-II-Lösung (720 g Zinksulfat, ZnSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O/100 ml) und 2,50 ml NaOH (0,1 M) zufügen, nach jeder Zugabe mischen, mit bidest. Wasser auf 25 ml auffüllen, filtrieren (Verdünnungsfaktor F = 2,5). Klare, höchstens schwach opaleszierende Probelösung zum Test, ggf. nach weiterem Verdünnen, einsetzen.

### Bestimmung von Ethanol in Alkohol-armem und Alkohol-freiem Bier (Lit. 2.1, 2.10, 2.11, 2.13)

Ca. 100 ml Probe im Becherglas unter vorsichtigem Rühren mit festem Ätzkali (KOH) oder Ätznatron (NaOH) versetzen, bis pH-Wert von ca. 8-9 erreicht ist. Lösung, ggf. nach Verdünnen, zum Test einsetzen.

### Bestimmung von Ethanol in Essig

Essig ggf. filtrieren und neutralisieren. Wenn stärker verdünnt wird, ist Neutralisieren nicht erforderlich.

## Bestimmung von Ethanol in alkoholhaltigen Getränken

a) *Wein* (Lit. 2.2, 2.8): Weine werden mit bidest. Wasser auf die geeignete Konzentration (s. Verdünnungstabelle) verdünnt. Entfärben und Neutralisieren sind nicht erforderlich.

b) *Bier*: Etwa 5-10 ml Bier filtrieren oder im Becherglas ca. 30 s lang mit einem Glasstab zur Entfernung der Kohlensäure rühren. Probe mit Wasser 1 : 1000 (1 + 999) verdünnen und zum Test einsetzen.

c) *Likör*: Dünflüssige Liköre zum Verdünnen in entsprechenden Messkolben pipettieren und mit Wasser bis zur Marke auffüllen.

Dickflüssige Liköre (z.B. Eierlikör): ca. 1 g Likör in einen 100 ml Messkolben genau einwiegen, mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen, zur Fettabcheidung in den Kühlschrank stellen, filtrieren. Klare Lösung mit Wasser 1 : 100 (1 + 99) verdünnen und zum Test einsetzen. Ergebnis in g/100 g berechnen.

d) *Branntwein*: Bei Verdünnung auf geeignete Konzentration (z. B. 1 + 9999, z.B. in zwei Schritten) die üblichen Massnahmen bei der Probeentnahme von alkoholischen Getränken beachten. Messwerte (g Ethanol/l Lösung) anhand von Tabellen oder mit der Dichte von Ethanol<sup>9</sup> in Volumenprozent (v/v) umrechnen.

## Bestimmung von Ethanol in Pralinen, Bonbons und anderen alkoholhaltigen Schokoladen-Erzeugnissen

*Pralinen mit dünnflüssigen Füllungen (Weinbrandbohnen,-kirschen):*

Eine Praline vorsichtig öffnen; 0,50 ml der Füllung in einen mit ca. 25 ml Wasser gefüllten 50 ml-Messkolben pipettieren, Pipettenspitze dabei in das Wasser eintauchen. Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen. Lösung 1 : 20 (1 + 19) mit Wasser verdünnen. 0,100 ml der verdünnten Lösung zum Test einsetzen (Verdünnungsfaktor F = 2000).

*Schokoladenerzeugnisse mit dickflüssigen Füllungen:*

Die Füllung von einem oder mehreren Bonbons oder Pralinen in einen mit ca. 5 ml Wasser gefüllten 50 ml-Messkolben genau einwiegen (wenn mit Hilfe einer Pipette eingewogen wird, soll die Pipettenspitze den Wasserspiegel **nicht** berühren); mit Wasser bis zur Marke des Messkolbens auffüllen; mischen, gegebenenfalls filtrieren und soweit verdünnen, dass der Alkoholgehalt der Probe unter 0,12 g/l liegt.

## Bestimmung von Ethanol in Konfitüren (Lit. 2.7)

Probe gut homogenisieren (Mixer etc.) und ca. 10-20 g in ein Becherglas genau einwiegen. Mit etwas Wasser verrühren und Mischung ggf. mit Kalilauge neutralisieren, quantitativ in einen 100 ml-Messkolben überspülen, mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen.

Lösung ggf. mit 2% Polyamid oder PVPP entfärben (s. oben), filtrieren, Filtrat unverdünnt zum Test einsetzen.

## Bestimmung von Ethanol in Bienenhonig

Ca. 20 g Honig in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, mit etwas Wasser unter leichtem Schwenken (Steigrohr!) bei ca. 50°C lösen, auf 20°C abkühlen und mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen. Lösung zum Test einsetzen, ggf. mit Carrez-Lösungen wie unter Pkt. 10 beschrieben, klären (Verdünnungsfaktor F = 2,5). Filtrieren, klare Lösung zum Test einsetzen.

## Bestimmung von Ethanol in Milch-Erzeugnissen (z.B. Quark, Kefir)

Ca. 10 g der homogenisierten Probe in einen 100 ml-Messkolben einwiegen, etwa 50 ml Wasser hinzufügen und den Kolben (Steigrohr!) unter leichtem Schwenken 15 min bei ca. 50°C halten. Zur Eiweissfällung 5 ml Carrez-I-Lösung (siehe Pkt. 10), 5 ml Carrez-II-Lösung und 10 ml NaOH (0,1 M) hinzufügen, nach jeder Zugabe mischen. Auf 20°C abkühlen und Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Klare, evtl. leicht trübe Lösung zum Test einsetzen.

## Bestimmung von Ethanol in Protein-haltigen Proben

Protein-haltige Proben oder Probelösungen mit Perchlorsäure (1M) im Verhältnis 1:3 (1+2) enteiuweissen, dann zentrifugieren und ein Aliquot vom Überstand mit Kalilauge (2 M) neutralisieren.

## 12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Kosmetika (Lit. 3.3), pharmazeutischen Produkten (Lit. 3.4) und in der Forschung bei der Analytik von biologischen Materialien.

Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Bernt, E. & Gutmann, I. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1546, Verlag Chemie, Weinheim

**Bestimmung von Ethanol in Fermentationsproben/ Zellkulturmedien**  
Analysenprobe, ggf. nach Zentrifugation, zum Abstoppen enzymatischer Vorgänge 15 min in Wasserbad (80°C) stellen, dabei Zentrifugenglas verschliessen; und anschliessend zentrifugieren. Überstand, ggf. gemäss Verdünnungstabelle verdünnt, zur Bestimmung einsetzen. (Alternativ kann auch eine Enteiuweissung mit Perchlorsäure oder mittels Carrez-Lösungen erfolgen. Siehe die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele.)

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



# 13. Vereinfachtes Verfahren zur Bestimmung von Ethanol in alkoholischen Proben mit mindestens 6 g Ethanol/l

## Herstellung der Reagenzlösung für 10 Bestimmungen

In 30 ml Lösung aus der Flasche 1 10 Tabletten aus Flasche 2 lösen. 0,5 ml Suspension aus der Flasche 3 hinzufügen und mischen.

**(Achtung: Reagenzlösung in alkoholfreier Atmosphäre mit alkoholfreiem Wasser herstellen. Gefäss mit Reagenzlösung stets geschlossen halten).**

## Stabilität

Die Reagenzlösung ist bei 20°C 8 Stunden haltbar.

## Vorbereitung der Proben

Bier, Wein, Branntwein und andere ethanolhaltige Proben entsprechend Verdünnungstabelle verdünnen.

Im Testansatz soll die Ethanol-Menge zwischen 0,6 µg und 12 µg betragen. Die Probelösung ist also soweit zu verdünnen, dass die Ethanolkonzentration zwischen 0,006 und 0,12 g/l liegt.

**Bedingt durch die hohe Empfindlichkeit der Methode ist darauf zu achten, dass ethanolfreies Wasser verwendet und in ethanolfreier Atmosphäre gearbeitet wird.**

## Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an Ethanol im Liter	Verdünnung mit Wasser (in Volumenteilen)	Verdünnungsfaktor F
6 - 120 g	1 auf 1000	1000
> 120 g	1 auf 10000	10000

Bedingt durch die Flüchtigkeit von Ethanol wird beim Verdünnen von Proben folgendes Vorgehen vorgeschlagen:

Messkolben etwa zur Hälfte mit bidest. Wasser füllen und Probe mit Enzymtest- oder Kolbenhubpipette unter die Wasseroberfläche pipettieren. Messkolben mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen und mischen.

## Literatur

- Bücher, T. & Redetzki, H. (1951) Eine spezifische photometrische Bestimmung von Ethylalkohol auf fermentativem Wege, *Klinische Wochenschrift* **29**, 615-616
- Beutler, H.-O. & Michal, G. (1977) Neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln, *Z. Anal. Chem.* **284**, 113-117
- Beutler, H.-O. (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 598-606, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- MONITEUR BELGE - BELGISCH STAATSBLAD: Bestimmung von Ethanol in alkoholarmen Bier, S. 14610-14613 (26. September 1979)
- Methodenbuch für Weinanalysen in Österreich (1980), herausgegeben von Arbeitsgemeinschaft der Landw. Versuchsanstalten in Österreich (ALVA)
- Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/2.1 (1981), Kapitel 2B (Sauer Milchprodukte)/22 (1980), Kapitel 9 (Speiseeis)/5.4 (1983), Kapitel 28A (Frucht- und Gemüsesäfte, Fruchtnektare, Fruchtsirupe, Konzentrate und Pulver)/12.2 (1994), Kapitel 31 (Bier)/3.2 (1991), Kapitel 34 (Gärungssessig)/6.2 (1994)
- Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuelo, F. (1981) *Deutsche Lebensmittel Rundschau* **77**, 8
- Brautechnische Analysemethoden, Band III, S. 550-553 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- Methoden-Sammlung der Internationalen Fruchtsaft-Union (IFU-Analysen-Methode Nr. 52-1983); enthalten in "Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices" (1996) edited by Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community (A.I.J.N.)
- Österreichisches Lebensmittelbuch (Codex Alimentarius Austriacus), Kapitel B5 (Marmelade und andere Erzeugnisse), Erlas vom 28. April 1985 (s. ERNÄHRUNG/NUTRITION, 348-353 (1985); Kapitel B7 (Alkoholfreie natürliche Fruchtsäfte und Fruchtgetränke) (1982)
- Die Methode ist zugelassen bei der Untersuchung von Wein im Rahmen der Qualitätsweinprüfung in Rheinland-Pfalz (1985; Landwirtschaftskammer Bad Kreuznach) und in Hessen (1986; Ministerium für Landwirtschaft und Forsten).
- Norme Française NF V 05-131 (Septembre 1986) Fruits, légumes et produits dérivés: Détermination de la teneur en éthanol, *Méthode enzymatique*
- Buckee, G.K. & Baker, C.D. (1986) Enzymatic Determination of Ethanol in Alcohol-Free and Low Alcohol Beers, *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **39**, 257-259
- European Brewery Convention, *Analytica*, 4th ed., Method 9.2, Ethanol in alcohol-free and low alcohol beers, E153 (1987)
- RSK-Werte, die Gesamtdarstellung, Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen für Fruchtsäfte und Nektare einschliesslich überarbeiteter Analysemethoden (1987), 1. Auflage, Verlag Flüssiges Obst, D-56370 Eschborn, S. 77-79
- Amtlische Sammlung von Untersuchungsverfahren nach 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Ethanol in Bier mit geringem Alkoholgehalt, 36.00-12 (Dezember 1992)

## Durchführung

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Reagenzlösung	3,000 ml	3,000 ml
Extinktionen der Lösungen messen (E <sub>1</sub> ). Reaktion starten durch Zugabe von		
Probelösung*)	-**)	0,100 ml
mischen, nach Ablauf der Reaktion (ca. 5-10 min) Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander messen (E <sub>2</sub> ).		

\*) Wichtige Hinweise:

Beim Pipettieren stark verdünnter Probelösungen in den Testansatz Enzymtest-Messpipette mindestens 6-mal vorspülen. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mindestens 3-mal vorspülen. Es wird ebenfalls empfohlen, die Probelösung **unter** die Oberfläche der Reagenzlösung in der Küvette zu pipettieren.

Es ist unbedingt notwendig, während der Messung die Küvetten, z.B. mit Parafilm (Warenzeichen von American Can Company, Greenwich, Ct., USA) zu verschliessen, um die Adsorption von Ethanol aus der Luft durch das Reaktionsgemisch zu vermeiden.

\*\*) Die Dosierung von 0,100 ml bidest. Wasser kann entfallen.

## Berechnung

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von der Extinktionsdifferenz der Probe abziehen.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

$$c = \frac{0,714}{\epsilon} \times \Delta E \times F \text{ [g Ethanol/l Probe]}$$

$$\begin{aligned} \epsilon = \text{Extinktionskoeffizient von NADH bei} \\ 340 \text{ nm} &= 6,30 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \\ \text{Hg } 365 \text{ nm} &= 3,40 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \\ \text{Hg } 334 \text{ nm} &= 6,18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \end{aligned}$$

F = Verdünnungsfaktor

$$\text{Prozent}_{\text{Ethanol}} = \frac{c_{\text{Ethanol}} \text{ [g/l Probelösung]}}{10 \times 0,78924 \text{ [g/ml]}} \text{ [%; v/v]}$$

- American Society of Brewing Chemists (1991) *Enzymatic Method for Low Alcohol Concentrations in Malt Beverages*; *ASBC Journal* **49**, 185-187
- Tanner, H. & Brunner, E. M. (1965) Zur Bestimmung des in alkoholfreien Getränken und in Aromadestillaten enthaltenen Ethylalkohols, *Mitt. Gebiete Lebensm. Unters. u. Hyg.* **56**, 480-487
- Quast, P. (1978) Weitere Notwendigkeiten und Möglichkeiten der Fruchtanalyse beim Apfel, *Mitt. Obstbauversuchsring des Alten Landes* **9**, 293-301
- 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
- Henniger, G. & Hoch, H. (1981) Enzymatische Substratbestimmungen in der pharmazeutischen Analytik, dargestellt an den Bestimmungen von L-Ascorbinsäure, Ethanol und Lactose, *Deutsche Apotheker Zeitung* **121**, 643-649
- Kohler, P. (1982) Enzymatische Ethanol-Bestimmung in Glace- und Schokoladeprodukten, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **73**, 44-49
- Pfandl, A. & Menschig, D. (1984) Ein Beitrag zur enzymatischen Glycerin- und Ethanolbestimmung, *Pharm. Ind.* **46**, 403-407
- 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
- Henniger, G. (1987) A Fast Enzymatic Method for the Determination of Ethanol in Alcoholic Products, Poster-Präsentation bei Association of Official Analytical Chemists Annual International Meeting, San Francisco, CA, USA
- Würidg, G. & Woller, R. (1989) *Chemie des Weines*, Verlag Eugen Lehner, Stuttgart
- Krüger, E. & Harms, J. (1995) Neue amtlische Methode zur Bestimmung von Ethanol in Bier mit geringem Alkoholgehalt, *Monatsschrift für Brauerei*, **48**, 160-161.
- Rehbein, H. (1993) Assessment of fish spoilage by enzymatic determination of ethanol, *Archiv für Lebensmittelhygiene* **44**, 1-2
- Huidobro, J.F., Rea, M.E., Branquinho de Andrade, P.C., Sanchez, M.P., Sanch, M.T., Muniategui, S. & Simal-Lozano, J. (1994) Enzymatic determination of primary normal alcohols as apparent ethanol content in honey, *J.Agric.Food Chem.* **42**, 1975-1978
- Saalfeld, U. & Freund, W. (1998) Quantitative Ethanolbestimmung als Gärprüfverfahren hefegeleckerter Weizenteige, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **94**, 292-296

# Ethanol-Testkontroll-Lösung (Flasche 4)

**Konzentration:** siehe Flaschenetikett

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

**Anwendung:**

- Zusatz der Ethanol-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:**  
Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt.
- “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. 5-10 min) wird die Extinktion  $E_3$  gemessen. Aus der Differenz ( $E_3 - E_2$ ) 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.

**Interner Standard:**

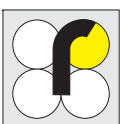
Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

In Küvette pipettieren	Leerwert	Probe	Standard	Probe + Standard
Reaktiongemisch 2	3,000 ml	3,000 ml	3,000 ml	3,000 ml
bdest. Wasser	0,100 ml	-	-	-
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lösung	-	-	0,100 ml	0,050 ml

mischen, nach ca. 3 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

