Enzymatische Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose in Gewässern

(Beiträge zur chemischen Wasser- und Abwasseranalyse, Nr. 3)

Von JÜRGEN RUCHTI und DORIS KUNKLER

Eidg. Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz an der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, Direktion: Prof. Dr. O. Jaag.

1. Einleitung

Im Zusammenhang mit Versuchen über die Selbstreinigung von Fließgewässern (vgl. [1]) war eine Methode zur Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose zu entwickeln. Der bei diesen Versuchen zu erwartende Konzentrationsbereich lag zwischen 0,5 und 5 μMol Zucker pro Liter.

Mit Hilfe enzymatischer Reaktionen lassen sich diese Zucker ohne vorherige Trennung quantitativ nebeneinander erfassen. Die untere Grenze der von BERGMEYER [2] mitgeteilten Methode liegt allerdings bei einer Konzentration von etwa 50 $\mu\text{Mol/l}$. Die Anpassung der Methode an niedrigere Zuckerkonzentrationen und die Beseitigung besonderer Einflüsse (bakterieller Abbau, Adsorption von Zuckern an ausfallende Salze beim Konzentrieren) bilden den Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2. Methodik

Proben aus natürlichen Gewässern enthalten Mikroorganismen. Der dadurch mögliche Abbau der zu bestimmenden Zucker in der Zeit zwischen Probenahme und Analyse wird durch Zusatz von Ammoniak und Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTE) verhindert. Warburgversuche zeigten, dass die Atmung von Belebtschlamm in ammoniakalischer Lösung bei $\text{pH} \geq 11$ vollständig unterdrückt wird. Das flüchtige Ammoniak lässt sich später beim Konzentrieren der Proben leicht entfernen. Ein saures Vergiftungsmittel fällt wegen der damit verbundenen Hydrolyse von Saccharose ausser Betracht. Die Zugabe von ÄDTE ist aus zwei Gründen notwendig:

- a) Metallkomplexe, die Zucker katalytisch zerstören (vgl. [3]), werden nach unseren Beobachtungen in unschädliche Metall-ÄDTE-Chelate übergeführt;
- b) diese Chelate sind nach Eintrocknen der Proben leicht löslich.

Vor der Analyse wird die vergiftete Probe schonend zur Trockne gebracht, dann in so viel wässriger Magnesiumchloridlösung aufgenommen, dass die einzelnen Zucker

in einer Konzentration von mindestens $5 \mu\text{Mol/l}$ vorliegen (A). Die Konzentration des Magnesiumchlorids muss so bemessen sein, dass sie gerade dem gewählten Überschuss an ÄDTE (bezogen auf die Wasserhärte der Probe) entspricht; dadurch wird das später für die Hexokinase-Reaktion zuzufügende Mg^{++} wirklich dieser Reaktion zur Verfügung stehen und nicht von ÄDTE gebunden werden. An dieser konzentrierten Probe können die enzymatischen Zuckerbestimmungen nach der leicht modifizierten (vgl. Abschnitt 2.3) Methode von BERGMAYER ausgeführt werden:

1. Fructose und Glucose werden mit Hexokinase und Adenosintriphosphat in Gegenwart von Magnesium in ihre Hexose-6-phosphate übergeführt.
2. Hierauf wird zuerst Tripyridinnucleotid (TPN) in Gegenwart von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch Glucose-6-phosphat zu TPNH reduziert. Die Zunahme der TPNH-Extinktion bei $340 \text{ m}\mu$ lässt direkt auf die vorhandene Glucose schliessen. Nach Abschluss dieser Reaktion wird
3. Phosphoglucose-Isomerase zum Reaktionsgemisch gegeben. Das sich aus Fructose-6-phosphat bildende Glucose-6-phosphat führt erneut zur Produktion von TPNH. Die entsprechende Zunahme der TPNH-Extinktion ermöglicht die Berechnung der Fructose-Konzentration.
4. Zur Bestimmung von Rohrzucker wird ein aliquoter Teil von A zuerst mit Invertase invertiert. Dann werden die gesamte Glucose und die gesamte Fructose gemäss den Punkten 1.–3. bestimmt und die Differenzen (Gesamte Glucose–Glucose) bzw. (Gesamte Fructose–Fructose) gebildet. Die Differenz (Gesamte Glucose–Glucose) entspricht der Saccharose. Ist die Differenz (Gesamte Fructose–Fructose) grösser als der Saccharosewert, so ist auf die Anwesenheit von Raffinose zu schliessen, die ebenfalls von Invertase hydrolysiert wird.

2.1 Probenahme

Vor den Probenahmen wird an dem zu untersuchenden Gewässer eine Wasserhärtebestimmung mit Komplexon III und Eriochromschwarz T bei pH 10 nach SCHWARZENBACH [4] ausgeführt. Die Härte wird zweckmässig als h [Mole Komplexon III pro Liter Probewasser] ausgedrückt; mit Hilfe dieser Zahl wird die Vergiftungsmischung zubereitet: sie besteht aus einer Mischung von 4 Volumina conc. NH_3 und 1 Volumen einer «55 h M Komplexon III» Lösung. Vor der Probenahme werden Plasticflaschen (à t ml Totalvolumen) mit t/10 ml der Vergiftungsmischung beschickt. An der Probestelle werden die Flaschen dann mit Probewasser aufgefüllt und verschlossen; sie sollten nach diesem Verfahren einen Überschuss von etwa 25% an Komplexon III (bezogen auf die Wasserhärte) enthalten, der später (vgl. Abschnitt 2.2) ein einwandfreies Lösen der getrockneten Proben gewährleistet.

2.2 Vorbereitung der Proben zur Analyse

Das Volumen der vergifteten Probe wird gemessen. Das wirkliche Probevolumen erhält man nach Subtraktion des Volumens des Vergiftungsmittels. Hierauf wird die Probe am Rotationsverdampfer (15 mm Hg, Wasserbadtemperatur 50°C) zur Trockne gebracht. Da alle mehrwertigen Metallionen als ÄDTE-Chelate vorliegen, lässt sich der weisse Niederschlag leicht in etwa 20 ml bidestillierten Wassers lösen; die Lösung wird wieder getrocknet. Dieser Schritt muss wiederholt werden bis der Rückstand

einen glasartigen Film bildet, wodurch gewährt ist, dass praktisch alles Ammoniak verdampft wurde. Meistens genügt zweimaliges Eindampfen.

Der glasartige Rückstand wird in einem genau gemessenen Volumen einer MgCl_2 -Lösung aufgenommen. Dieses Volumen soll die Menge an MgCl_2 enthalten, die dem bei der Probenahme gewählten Überschuss an Komplexon III (bezogen auf die Wasserhärte, ca. 25%) entspricht (vgl. Fussnote 1 zu Abbildung 1). Das Volumen dieser MgCl_2 -Lösung wird so gewählt, dass die einzelnen Zucker in einer Konzentration von mindestens $5 \mu\text{Mol/l}$ gelöst werden.

2.3 Bestimmung der Zucker

Die enzymatischen Zuckerbestimmungen werden nach BERGMAYER ([2], S. 99 ff., S. 156 ff.) ausgeführt. Diesem Werk sind auch die Detailangaben zu entnehmen. Die Empfindlichkeit der Methode wurde bei unseren Untersuchungen durch eine leichte Modifikation des Bestimmungsansatzes gesteigert:

Bestimmungsansatz nach BERGMAYER ([2], S. 158) für erste Extinktionsmessung

2,65 ml Triäthanolamin-Puffer (0,05 M; pH = 7,6)

0,02 ml Probe

0,31 ml aller anderen benötigten Reagenzien

Modifizierter Bestimmungsansatz für erste Extinktionsmessung

0,50 ml Triäthanolamin-Puffer (0,6 M; pH = 7,6)

2,00 ml Probe (gemäss Abschnitt 2.2 vorbereitet)

0,30 ml aller anderen benötigten Reagenzien

Bei der Berechnung der Resultate muss zusätzlich zu den Angaben von BERGMAYER auch die in Abschnitt 2.2 beschriebene Konzentrierung des Analysengutes berücksichtigt werden.

3. Resultate und Diskussion

3.1 Haltbarkeit der vergifteten Proben

Zwei mit Ammoniak und Komplexon III vergiftete Proben wurden während 5 Tagen bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Von jeder dieser Proben wurden je 5 aliquote Teile zu verschiedenen Zeiten analysiert. Die Abweichungen der Resultate blieben innerhalb der Fehlergrenze (siehe Abschnitt 3.2) der Methode. Das verwendete Vergiftungsmittel gewährt somit eine Haltbarkeit der Proben von mindestens 5 Tagen.

3.2 Reproduzierbarkeit und analytische Ausbeute der Methode

Aus einem mit Melasse verunreinigten Gewässer wurden zu verschiedenen Zeiten zwei Serien zu 9 bzw. 12 Proben gefasst. Jede Probe wurde 3mal nach dem in Abbildung 1 dargestellten Schema analysiert; die Proben enthielten je zwischen 1,0 bis $8,5 \mu\text{Mole/l}$ Fructose, Glucose und Gesamt-Glucose und -Fructose nach Invertierung.

Es zeigte sich, dass die Streuung aus einer Dreifachbestimmung im untersuchten Bereich konzentrationsunabhängig ist; zudem wiesen Glucose und Fructose (vor und nach Invertierung) dieselbe Streuung auf. In Tabelle 1 sind die mittlere quadratische

Abweichung (s), der Streubereich des Einzelwertes (Δx) und der Vertrauensbereich des Mittelwertes aus 3 Einzelwerten ($\Delta \bar{x}$) für die Serien mit 9 bzw. 12 Proben sowie für beide Serien zusammen angegeben. Eine Diskussion dieser statistischen Masszahlen findet sich bei DOERFFEL [5]. Für die aus einer Subtraktion (Total Glucose minus Glucose) erhältlichen Saccharosewerte verdoppeln sich die Werte der Tabelle 1. Die Unterschiede der Streuungen der zwei Serien (zu 9 bzw. 12 Proben) sind statistisch nicht gesichert.

Tabelle 1
*Statistische Masszahlen zur Reproduzierbarkeit der Methode.
Die Proben wurden nach dem in Abbildung 1 dargestellten Schema analysiert. Die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen lagen alle zwischen 1,0 und 8,5 μMol Zucker pro Liter.*

Mass	P	Serie mit 9 Proben [$\mu\text{Mol/l}$]	Serie mit 12 Proben [$\mu\text{Mol/l}$]	Beide Serien zusammen [$\mu\text{Mol/l}$]
s, mittlere quadrat. Abweichung		0,064	0,097	0,084
Δx , Streubereich des Einzelwertes:	95% 99%	0,134 0,184	0,199 0,270	0,170 0,228
$\Delta \bar{x}$, Vertrauens- bereich des Mittelwertes aus 3 Einzelwerten:	95% 99%	0,084 0,120	0,122 0,170	0,101 0,138

Tabelle 2
Analytische Ausbeute der Methode

Unter- suchungs- material	Glucose (Probe nicht invertiert Er- Ge- wartet funden $\mu\text{Mol/l}$ $\mu\text{Mol/l}$ %			Fructose (Probe nicht invertiert) Er- Ge- wartet funden $\mu\text{Mol/l}$ $\mu\text{Mol/l}$ %			Glucose (total, nach Invertierung) Er- Ge- wartet funden $\mu\text{Mol/l}$ $\mu\text{Mol/l}$ %			Fructose (total, nach Invertierung) Er- Ge- wartet funden $\mu\text{Mol/l}$ $\mu\text{Mol/l}$ %		
	$\mu\text{Mol/l}$	$\mu\text{Mol/l}$	%	$\mu\text{Mol/l}$	$\mu\text{Mol/l}$	%	$\mu\text{Mol/l}$	$\mu\text{Mol/l}$	%	$\mu\text{Mol/l}$	$\mu\text{Mol/l}$	%
Dest. Wasser	0,032			0,016			0,024			0,048		
Dest. Wasser + Zucker	1,445			1,380			2,580			2,564		
(= Differenz)	1,413	1,413	100,0	1,364	1,364	100,0	2,556	2,556	100,0	2,516	2,516	100,0
Grundwasser	0,068			0,042			0,029			—0,018		
Grundwasser + Zucker	1,404			1,340			2,581			2,629		
(= Differenz)	1,413	1,336	94,6	1,364	1,298	95,2	2,556	2,552	99,8	2,516	2,647	105,2
Grundwasser mit 10% Abwasser	0,298			0,265			0,507			0,588		
Grundwasser mit 10% Abwasser + Zucker	1,696			1,510			3,150			3,183		
Zucker (= Differenz)	1,413	1,398	98,9	1,364	1,245	91,3	2,556	2,643	103,4	2,516	2,595	103,1

In einem weiteren Versuch wurden bekannte Mengen von Glucose, Fructose und Saccharose zu destilliertem Wasser, zu Grundwasser und zu einer Mischung von Grundwasser und häuslichem Abwasser gegeben und analysiert. Die aus *Doppelbestimmungen* erhaltenen Resultate dieses Versuches sind in Tabelle 2 aufgeführt; es lässt sich leicht prüfen, dass die Abweichungen vom erwarteten Wert in den meisten Fällen innerhalb des Vertrauensbereiches für Dreifachbestimmungen liegen.

Die aus Tabelle 2 ersichtliche Tendenz, dass die Streuung der Methode abnimmt, wenn reine Zucker bestimmt werden, zeigte sich auch in anderen, hier nicht mitge-

Abbildung 1
Arbeitsschema für die Zuckerbestimmung anhand eines Beispiels aus der Praxis

¹⁾ Berechnung der Konzentration der $MgCl_2$ -Lösung:

Zur Bindung der Kationen aus 225 ml Probe werden
auf Grund der komplexometrischen Titration benötigt:
Das Vergiftungsmittel enthält:

0,410 mMole ÄDTE
0,500 mMole ÄDTE
Überschuss: 0,090 mMole ÄDTE

Eine Voruntersuchung ergab, dass die Probe etwa im Verhältnis 30:1 konzentriert werden muss.
225 ml : 30 = 7,5 ml.
0,090 mMole Mg^{++} sind in 7,5 ml einer 0,012 M $MgCl_2$ -Lösung enthalten.

teilten Versuchen. Die bisher durchgeführten Untersuchungen lassen vorläufig weder auf Zufälligkeiten noch auf mögliche Ursachen dieser Tendenz schliessen.

3.3 Einfluss hoher Kalzium-Konzentration

Die Wasserhärte des in den beschriebenen Versuchen verwendeten Grundwassers entsprach 1,86 mMolen ÄDTE pro Liter. Dieses Grundwasser wurde vor der eigentlichen Analyse 30mal konzentriert (vgl. Abbildung 1). Versuche mit zuckerhaltigen CaCl_2 -Lösungen, welchen Zusätze an ÄDTE und MgCl_2 gemäss der Fussnote 1 in Abbildung 1 zugefügt wurden, zeigten, dass die konzentrierte Probe bis 125 mMol $\text{Ca}_2^{++}/\text{l}$ enthalten darf. Überschreitet man diese Konzentration, so werden die enzymatischen Reaktionen langsamer vor sich gehen. Denn die Berechnung der Fussnote 1 (Abbildung 1) basiert einzig auf dem qualitativen Grössenunterschied der Komplexbildungskonstanten der ÄDTE mit Mg^{++} einerseits und mit den anderen in Grundwasser zu erwartenden Kationen andererseits ([6]); diese Berechnungsart wird den komplexen multiplen Ionengleichgewichten in der Analysenlösung nur annähernd gerecht. In besonderen Fällen (besonders niedrige Konzentration der Zucker in Gewässern, Zuckerbestimmung in geologischen Proben), wo eine höhere Konzentration mehrwertiger Ionen erwartet wird, dürfte die empirische Festlegung des relativ breiten Mg^{++} -Optimums für die Hexokinase-reaktion der Berechnung vorzuziehen sein. Die Frage der höchsten für die enzymatischen Reaktionen zulässigen Ionenstärke der Analysenlösung ist allerdings noch offen.

4. Zusammenfassung

Die Anwendung der von BERGMAYER mitgeteilten enzymatischen Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose in Gewässern erfordert bei Zuckerkonzentrationen unter 50 $\mu\text{Mol}/\text{l}$ eine spezielle Vorbereitung des Analysengutes, die anhand eines Beispiels beschrieben wird. Reproduzierbarkeit und analytische Ausbeute der Methode werden angegeben. Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, die Methodik auch bei der Untersuchung geologischer Proben einzusetzen.

SUMMARY

Enzymatic analysis of glucose, fructose and sucrose by the method given by BERGMAYER requires a special procedure when these sugars are determined in natural waters at concentrations below 50 $\mu\text{Mol}/\text{l}$. The modified method, its reproducibility and analytical yield are described. The possibility of applying this method also to geological samples is considered.

RÉSUMÉ

Le méthode du dosage enzymatique de la glucose, la fructose et la saccharose, indiquée par BERGMAYER, est modifiée pour les cas où ces sucres doivent être déterminés dans des eaux naturelles à des concentrations inférieures à 50 $\mu\text{Mol}/\text{l}$. On examine la variation statistique et l'exploitation analytique de la méthode modifiée. Celle-ci pourrait également être utilisée pour l'analyse d'échantillons géologiques.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. WUHRMANN, J. RUCHTI, E. EICHENBERGER, *On self-purification in rivers III. Quantitative experiments with pure organic compounds*, 3rd Conf. Internat. Assoc. Wat. Poll. Control, Munich 1966 (in Vorbereitung).
- [2] H.-U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse* (Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse 1962).
- [3] P. KARRER, *Lehrbuch der organischen Chemie*, 13. Aufl. (Georg Thieme, Stuttgart 1959), S. 370.
- [4] G. SCHWARZENBACH, *Die komplexometrische Titration* (Ferdinand Enke, Stuttgart 1956).
- [5] K. DOERFFEL, *Beurteilung von Analysenverfahren und -ergebnissen*, Z. analyt. Chemie 185, 1 (1962).
- [6] J. BJERRUM, G. SCHWARZENBACH, L. GUNNAR, *Stability constants of metal-ion complexes. Part 1: Organic Ligands* (Chemical Society, London 1957).

Separatdruck aus der Schweiz. Zeitschrift für Hydrologie 28, Fasc. 1 (1966)
Herausgegeben mit Unterstützung
der Stiftung der Wirtschaft zur Förderung des Gewässerschutzes in der Schweiz