

DIN 10762**DIN**

ICS 67.180.10

**Untersuchung von Honig –
Bestimmung des Gehaltes an Ethanol –
Enzymatisches Verfahren**

Analysis of honey –
Determination of ethanol content –
Enzymatic method

Analyse du miel –
Dosage d'éthanol –
Méthode enzymatique

Gesamtumfang 11 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	2
1 Anwendungsbereich	2
2 Normative Verweisungen	2
3 Begriffe	3
4 Kurzbeschreibung	3
5 Chemikalien	3
6 Geräte	4
7 Durchführung	5
8 Berechnung	7
9 Zuverlässigkeit des Verfahrens	8
10 Präzision	9
11 Untersuchungsbericht	9
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	10
Literaturhinweise	11

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuss „Honiguntersuchung“ erarbeitet.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an Ethanol in Honig fest.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

DIN 12699:1975, *Laborgeräte aus Glas — Enzymtest — Messpipetten, schnellablaufend, Wartezeit 15 Sekunden, Klasse AS*.

DIN ISO 3696:1991, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen; identisch mit ISO 3696:1987*.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Ethanolgehalt

der nach dieser Norm bestimmte Gehalt an Ethanol in mg je kg der Probe

3.2

Spezifität

Fähigkeit, den nachzuweisenden Analysenstoff zu erkennen, wobei er von ähnlichen Stoffen, Verunreinigungen, Abbauprodukten unterschieden wird

3.3

Empfindlichkeit

Fähigkeit, kleine Veränderungen der Konzentration einer Substanz in dem Prüfmateriale festzustellen

3.4

Nachweisgrenze

derjenige Gehalt, der unter Verwendung der ermittelten Kalibrierfunktion dem kritischen Wert der Messgröße zuzuordnen ist

3.5

Linearität

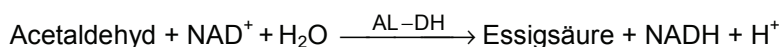
der lineare Bereich ist der Konzentrationsbereich des Analyts, in dem sich die mit dem Verfahren ermittelten Ergebnisse proportional zur Konzentration des Analyts verhalten

4 Kurzbeschreibung

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



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.



Das gebildete NADH ist der Ethanolmenge äquivalent. NADH ist Messgröße und wird spektral-photometrisch bestimmt.

5 Chemikalien

5.1 Allgemeines

Wenn nicht anders angegeben, werden bei der Analyse ausschließlich analysenreine Chemikalien und nur Wasser verwendet, das mindestens der Qualität 3 nach DIN ISO 3696 entspricht.

5.2 Bidestilliertes Wasser

5.3 Carrez-Lösung I

3,60 g Kaliumhexacyanoferrat (II), $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$, werden in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

5.4 Carrez-Lösung II

7,20 g Zinksulfat, $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, werden in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

5.5 Natriumhydroxid-Lösung, $c(NaOH) = 0,1 \text{ mol/l}^{1)}$

5.6 Diphosphat-Pufferlösung

3,33 g Kaliumdiphosphat ($K_4P_2O_7$) werden in 60 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Salzsäure $c(HCl) = 1 \text{ mol/l}^{1)}$ auf pH 9,0 eingestellt, und die Lösung wird mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung ist bei +4 °C aufbewahrt mindestens zwei Monate haltbar.

5.7 β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (β -NAD), freie Säure, $w \geq 98 \%^{2)}$

5.8 Aldehyd-Dehydrogenase (Al-DH)

Aus Hefe, Lyophilisat mit etwa 15 U/mg³⁾. Die Substanz ist bei trockener Lagerung bei +4 °C mindestens sechs Monate stabil.

5.9 Reaktionsgemisch

114 mg β -NAD (5.7) und 3,33 mg Al-DH (5.8), etwa 50 U, werden in 100 ml Diphosphat-Pufferlösung (5.6) unter Rühren gelöst. Die Lösung ist bei +4 °C aufbewahrt einen Tag haltbar.

5.10 Alkohol-Dehydrogenase-Suspension (ADH)

Aus Hefe, $\rho_{ADH} = 30 \text{ mg/ml}^{4)}$ in Ammoniumsulfat-Lösung, $c((NH_4)_2SO_4) = 3,2 \text{ mol/l}^{1)}$ etwa 9 000 U/ml³⁾. Die Alkohol-Dehydrogenase-Lösung ist bei +4 °C aufbewahrt mindestens 4 Monate stabil.

ANMERKUNG Es befinden sich Fertig-Reagenzien im Handel, bei deren Verwendung die Arbeitsvorschriften hinsichtlich Pipettierschema und Volumina der Präparate-Hersteller zu berücksichtigen sind.

6 Geräte

6.1 Übliche Laborgeräte und insbesondere Geräte nach 6.2 bis 6.12.

6.2 Siebe aus nichtrostendem Stahl, Maschenweite 0,5 mm

1) c Stoffmengenkonzentration

2) w Massenanteil

3) Die Enzymaktivität wird in internationalen Einheiten (U) angegeben. 1 U ist die Enzymaktivität, die bei einer Temperatur von 25 °C unter optimalen Bedingungen eine Substanzmenge von 1 μmol Substrat je min umsetzt.

4) ρ Massenkonzentration