

CENTRUM VOOR AGROBIOLOGISCH ONDERZOEK

Bibliotheek CABO-DLO
Bornsesteeg 65
Postbus 14
6700 AA Wageningen



cabo-dlo

DE BEPALING VAN RESERVEKOOHYDRATEN IN GRASSEN

N. Vertregt en W. Verhagen

CABO-verslag nr. 23

15N 105815

januari 1979

CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS



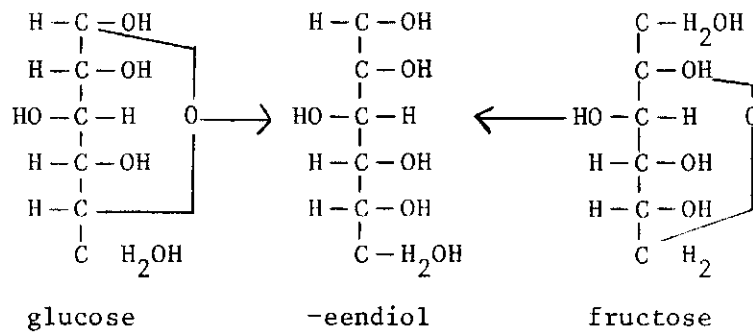
0000 0501 6395

<u>INHOUD</u>	<u>Blz.</u>
Inleiding	5
Analysemethodes	7
Extractie	10
Monstervoorbewerking	10
Samenvatting en conclusie	11
Literatuur	12
Figuur	13
Tabellen	14 t/m 16
Aanhangsel 1. Bepaling van in water oplosbare koolhydraten	17
Aanhangsel 2. Colorimetrische bepaling van in water oplosbare koolhydraten volgens Nelson en Somogyi	19

Inleiding

Reservekoolhydraten (non structural carbohydrates) in planten kunnen eenvoudig gezamenlijk worden bepaald op basis van hun reducerend vermogen, via oxydatie met cupri-ionen in zwak alkalisch milieu.

De toepassingsmogelijkheid van deze analysemethode wordt beperkt doordat verschillende monosacchariden ongelijke hoeveelheden cupri-ionen reduceren. Voor de vele planten die glucose- en fructose-verbindingen (saccharose, fructosanen, zetmeel) als reserve bevatten is de methode echter goed bruikbaar, daar fructose en glucose beide via de overeenkomstige eendiol-verbinding met een ongeveer gelijke efficiency worden geoxydeerd.



Fructosanen, fructosepolymeren met een eindstandige glucosegroep, zijn door verhitten in 0,05 N zwavelzuur te hydrolyseren. Zetmeel is te bepalen na enzymatische hydrolyse met amyloglucosidase van de gesolubiliseerde zetmeelkorrels. Hydrolyse in geconcentreerder zuur milieu leidt tot aantasting van de celwanden, en dus tot te hoge analyse-uitkomsten.

Indien de plant belangrijke hoeveelheden reservekoolhydraten bevat die uit andere monosacchariden dan glucose en fructose zijn opgebouwd dan heeft het in verband met de identificatie voordelen om gaschromatografische analysemethodes toe te passen. Deze methodes hebben echter een geringere nauwkeurigheid.

De voor de reductometrische suikerbepaling van belang zijnde variabelen worden hierna systematisch besproken, met enige nadruk op de invloed van monster voorbereiding en wijze van uitvoering van de analyse op het analyseresultaat. Dit overzicht werd samengesteld om duidelijkheid te verschaffen over de mate waarin het analyseresultaat beïnvloed wordt door de toegepaste methodiek.

Factoren die bepalend zijn voor de keuze van de toe te passen analysetechniek en invloed hebben op de uitkomst zijn:

Monstername

Een monster dient representatief te zijn voor de partij. Van een veldgewas gras moeten boormonsters worden genomen van ca. 500 g. Van afzonderlijke planten kunnen eventueel bladspansjes in bewerking genomen worden.

Monstervoorbereiding

Een groot monster kan in feite slechts door drogen en malen toegankelijk worden gemaakt voor analyse. De techniek van drogen moet zodanig zijn dat het monster zo snel mogelijk een maximum temperatuur van 70 °C bereikt. Overschrijding van deze temperatuur leidt tot de vorming van Maillard-verbindingen, te langzame verhitting tot verademingsverliezen en enzymatische afbraak.

Kleine monsters kunnen eventueel direct worden geëxtraheerd, het is echter niet eenvoudig om vers materiaal kwantitatief te extraheren.

Om verademingsverliezen uit te sluiten moet het monster tot de voorbereiding koel worden bewaard. De mogelijke spreiding in het analyseresultaat ten gevolge van verschillen in voorbereiding is groot.

Extractie

Om enzymatische ontleding te voorkomen wordt vers materiaal geëxtraheerd in kokende alcohol met een eindconcentratie van 70-80%. Fructosanen kunnen slechts geëxtraheerd worden in maximaal 50% alcohol oplossing.

Voor droge monsters is een keuze tussen extractie met alcohol en water mogelijk. Vrij algemeen worden droge monsters met alcohol geëxtraheerd. Dit is een niet noodzakelijke, tijdrovende werkwijze, de alcohol moet bij voorkeur bij maximaal 40 °C worden afgedampt. Aan zure monsters wordt juist voldoende BaCO₃ of CaCO₃ toegevoegd om de extracten neutraal te maken.

Op deze wijze wordt weliswaar hydrolyse van polysacchariden tijdens de extractie vermeden, maar fructosanen vormen onoplosbare verbindingen met barium (De Cugnac, 1931). Bij de hydrolyse ontstaat een storend neerslag van BaSO₄. Hydrolyse met HCl wordt afgeraden omdat het de uitkomsten van de bepaling verlaagt (Van der Plank, 1936). Het gebruik van BaCO₃ moet daarom worden ontraden. Bij neutraal reagerende monsters kan de toevoeging van carbonaten achterwege blijven.

Klaren van het extract

Voor polarimetrische bepalingen worden de extracten met loodacetaat geklaard, de AOAC (1975) past loodacetaat in alle gevallen toe. Voor chemische analyse wordt geklaard met Carrez-oplossingen (zinkferrocyanide) (Schormüller, 1967). De invloed van de klaringsmethodes op het analyseresultaat is nader bestudeerd in verband met het voornemen om de klaring met loodacetaat te vervangen door die met Carrez-oplossingen.

Bepaling van het gehalte aan reducerende suikers in de meetoplossing

Bij CILO en IBS is de methode van Van der Plank (1936) gebruikt, met de daarbij behorende herleidingstabel van ml verbruikt natriumthiosulfaat naar glucose. Het heeft voordelen om met de iets snellere methode volgens Somogyi (1926) te werken, Shaffer-Somogyi (1933) voor de volumetrische analyse en Nelson-Somogyi (1944) voor de colorimetrische analyse. Voor de analyse van veevoerders is binnen de EEG (1971), de methode volgens Luff-Schoorl voorgeschreven. Voor de gewasanalyse is deze methode te omslachtig. De uitkomsten van de verschillende analysemethodes zijn zo goed mogelijk ontkoppeld van invloeden van voorbereiding en klaring.

Berekening van het resultaat

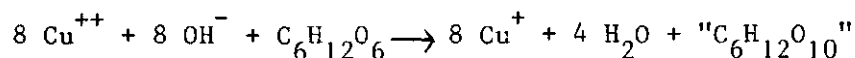
De bij de analyse verbruikte hoeveelheid koper is niet onafhankelijk van de aard en hoeveelheid van de in de meetoplossing aanwezige reducerende suikers en de toegepaste methodiek. Het reducerend vermogen van glucose is ongeveer 10% hoger dan dat van fructose. Voor zetmeelhoudende gewassen is deze benadering vrijwel absoluut juist. Rekening moet worden gehouden met waterafsplitting bij vorming van polysacchariden en de moleculairgewichten van fructose en glucose ($M=180,2$), saccharose ($M=342,3$), zetmeel en fructosanen ($M=(162)_n$).

Om de invloed van de wijze van voorbereiden van monsters op het analyseresultaat te kunnen interpreteren is inzicht in de nauwkeurigheid van de analysemethode noodzakelijk. Daarom volgt eerst een bespreking van de verschillende reductometrische bepalingsmethodes van koolhydraten. Chromatografische en enzymatische bepalingsmethodes zijn buiten beschouwing gelaten.

Analysemethodes

In alkalisch milieu is de eendiol-vorm van aldosen en ketosen overheersend aanwezig. Dit eendiol, dat voor glucose, fructose en mannose dezelfde structuur

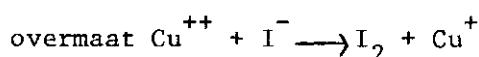
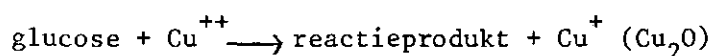
heeft, is labiel en wordt door cupri-ionen geoxideerd. Onder de gebruikelijke reactie-omstandigheden reageert een molecuul glucose met acht cupri-atomen.



"C₆H₁₂O₁₀" is een mengsel van zuren.

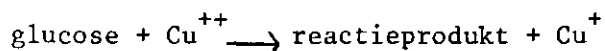
Een strakke standaardisatie van reactie-omstandigheden is noodzakelijk daar het reactieverloop wordt beïnvloed door temperatuur, pH, concentratie van reagentia en de tijd. Bij een lagere, alkalische pH is de reactiesnelheid lager maar de uiteindelijke koperreductie hoger. Van de koperreductiemethode zijn twee methodes van uitvoering vrij algemeen in gebruik.

De methode volgens Luff-Schoorl, EEG-voorschrift voor de veevoederanalyse (1971), uitgaande van 20 g monster, heeft het volgende reactieverloop:

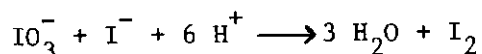


Cu⁺⁺ wordt met citraat complex in oplossing gehouden. Het gevormde I₂ wordt met natriumthiosulfaat getitreerd.

De methode volgens Shaffer-Somogyi (Van der Plank), het AOAC-voorschrift (1975) voor voedingsmiddelenanalyse, gaat uit van 1 g monster en verloopt volgens de volgende vergelijking:



Aan de oplossing wordt een afgemeten hoeveelheid I₂ in de vorm van een IO₃⁻ + I⁻ mengsel toegevoegd.



De overmaat I₂ wordt met natriumthiosulfaat getitreerd. Tartraat wordt toegevoegd om Cu⁺⁺ complex in oplossing te houden. Oxalaat wordt toegevoegd om Cu⁺⁺ tijdens de titratie complex te binden, opdat de reactie $2 \text{ Cu}^{++} + 2 \text{ I}^- \longrightarrow 2 \text{ Cu}^+ + \text{I}_2$ niet verloopt. I⁻ wordt toegevoegd om I₂ in oplossing te houden.

De Luff-Schoorl methode is arbeidsintensief, de werkwijze volgens Shaffer-Somogyi met klaring volgens Carrez vereist de minste handelingen. In het volgende is de methode volgens Luff-Schoorl verder buiten beschouwing gelaten terwijl variaties op de analyse-uitvoering volgens Somogyi met elkaar vergeleken worden.

Somogyi (1926) ontwikkelde een analysemethode waarin een mengreagens werd toegepast. De samenstelling van het reagens is exact gelijk aan het reagens dat jarenlang, in navolging van Van der Plank (1936) door CIL0, IBS en CABO werd gebruikt. Van der Plank voegt het oxalaat na de koperreductie toe, eerdere toevoeging zoals door Somogyi aangegeven, heeft geen zin en stoort de reactie enigszins.

Door Schaffer en Somogyi (1933) werd het tegenwoordig zeer veel toegepaste "Reagens 50" ingevoerd, eveneens met toevoeging van oxalaat na de koperreductie. Dit reagens is iets alkalischer en bevat 15% meer koper, het werd in 1960 door de AOAC als officiële methode opgenomen, zie McDonald, E.J. en B.Y. Foley (1960).

De samenstelling van de genoemde reagentia is weergegeven in tabel 1, onder reductie. Uit tabel 1 blijkt dat de voorschriften slechts in geringe mate verschillen. De voornaamste verschillen betreffen pH en Cu^{++} -concentratie. In het algemeen worden bij de methodes ijktabellen gepubliceerd, die echter uitsluitend gelden bij vergaand gestandaardiseerde uitvoering van de analyses, voor de betreffende methode-variant.

Een overzicht van de ijktabellen is gegeven in figuur 1 en tabel 2.

Het is uiteraard ook mogelijk een vergelijkende analyse met een passende hoeveelheid zuivere glucose uit te voeren, en de resultaten te berekenen ten opzichte van de met deze standaarden verkregen uitkomst. Om de verschillen van de methode van Van der Plank met loodacetaatklaring met de methode van Shaffer-Somogyi met Carrez-klaring te controleren werden een aantal gewasmonsters met de volgende methodes geanalyseerd:

- I De methode Van der Plank, klaring met loodacetaat. Deze methode is lange tijd bij het CILO, IBS en CABO gebruikt;
- II De methode Van der Plank, klaring met Carrez;
- III De methode Shaffer-Somogyi, klaring met Carrez;
- IV De methode Nelson-Somogyi, colorimetrisch, in gebruik voor kleine monsters.

Een aantal gewasmonsters is met de besproken methodes geanalyseerd. In tabel 3 zijn de gemiddelden van de duplobepalingen vermeld, berekend als gram glucose per kilogram droge stof. De reproduceerbaarheid is af te lezen uit de standaardafwijking voor de enkele waarneming, berekend uit de duplobepalingen. Gemiddelden en standaardafwijking zijn ook per gewas bepaald.

De waarden in kolom II (A, B, C) respectievelijk III (A, B) zijn verkregen door dezelfde analyse-uitkomsten op verschillende manieren om te rekenen.

Uit de vergelijking van kolom I met kolom II_A volgt dat de klaringsmethode een duidelijke invloed op de uitkomst van de analyse heeft. De gemiddelde uitkomsten zijn weliswaar gelijk, binnen de gewassen zijn de verschillen significant. Indien de uitkomsten van I en II_A als duplobepalingen worden opgevat, dan is de standaardafwijking tussen deze methodes $S = 8,5$.

Vergelijking van kolom II_A met kolom III_A leidt tot de conclusie dat de resultaten verkregen door toepassing van de CILO-Van der Plank tabel bij de Van der Plank methode afwijken van de resultaten verkregen met de Shaffer-Somogyi methode en tabel.

Uit de vergelijking van kolom II_B met II_C en III_A met III_B volgt dat de Van der Plank en Shaffer-Somogyi methodes bij berekening met de Shaffer-Somogyi tabel en met de glucose-standaard redelijk overeenkomstige uitkomsten geven. De CILO-IBS-Van der Plank tabel geeft 5% te lage uitkomsten. Momenteel wordt een tabel volgens Shaffer-Somogyi gebruikt waarbij voor lagere waarden geëxtrapoleerd is bij methode III, Shaffer-Somogyi met klaring volgens Carrez.

De uitkomsten van de colorimetrische methode volgens Nelson-Somogyi (kolom IV) stemmen overeen met de uitkomsten volgens Shaffer-Somogyi (kolom III). De standaardafwijking van de colorimetrische methode is echter veel groter. Kleine monsters kunnen zonder dat een niveauverschil ontstaat met de Nelson-Somogyi methode worden geanalyseerd.

De uitkomsten verkregen met de geautomatiseerde methode volgens Hagedorn-Jensen (kolom V), in gebruik bij het laboratorium voor Landbouwplantenteelt, liggen ca. 5% lager. Een zelfde verschil wordt gevonden door Weier et al. (1977). Deze methode zou, door oxydatie van meerdere bestanddelen dan alleen reducerende suikers, juist hogere uitkomsten moeten geven (Van der Plank, 1936).

Het verschil in analyse-opbrengst van glucose en fructose is nogal afhankelijk van de reactie-omstandigheden. Omdat gramineëen vaak fructosanen bevatten als reservekoolhydraat is methode III getoetst op glucose en fructose (tabel 4).

De uitkomst van de analyse wordt niet door hydrolyse of waterextractie beïnvloed. Het natriumthiosulfaatverbruik van fructose is 3% hoger dan dat van glucose. De zuiverheid van de gebruikte preparaten was binnen deze afwijking niet te controleren. In tegenstelling hiermee vermelden zowel Van der Plank (1936) als McDonald (1960) en 4% lager natriumthiosulfaatverbruik van fructose dan van glucose.

Uit het voorgaande blijkt dat de reducerende suikerbepaling volgens de methode van Shaffer-Somogyi met een reproduceerbaarheid van 2% is uit te voeren in gedroogde en gemalen monsters.

Extractie

Een aantal monsters *Lolium perenne* werd gescheiden in stoppel en blad. Het suikergehalte werd bepaald na extractie van het verse materiaal met 40% alcohol (eindconcentratie) respectievelijk 80% alcohol en na extractie van de gedroogde monsters met water, 40% alcohol en 80% alcohol. De verse monsters werden gekookt met alcohol onder terugvloeiëkoeling, na afkoelen gemalen in een huishoudmixer en nogmaals gekookt met een tweede portie alcohol. De invloed van deze extractiemethodes op de analyse-uitkomst is gegeven in tabel 5.

Hoewel de gemiddelde uitkomsten na extractie van vers of gedroogd materiaal gelijk zijn, leidt nadere beschouwing van de resultaten, vermeld in kolom I, II en IV, van de stoppelanalyse vergeleken met de bladanalyse tot de conclusie dat de extractie van verse stoppels niet volledig is en dat bij het drogen van blad ca. 5% van de suikers verloren gaan.

De bemonstering voor de droge-stofbepaling en de suikeranalyse in vers materiaal is zo goed mogelijk gelijktijdig uitgevoerd, zodat het verschil in suikergehalte niet aan een verschil in de berekeningsgrondslag kan worden geweten. Uit de gegevens van kolom V en VI volgt dat bij het drogen van de monsters enige hydrolyse van fructosanen optreedt, zowel in het blad als in de stoppel. Voor een nauwkeurige analyse van monomere en polymere koolhydraten in planten is het daarom noodzakelijk vers materiaal direct te extraheren.

Monstervoorbewerking

Om de invloed van de voorbehandeling op de uitkomst van de analyse na te gaan zijn enkele experimenten uitgevoerd.

1. Twee grote monsters gras zijn elk gesplitst in drie monsters van 800 g, drie van 400 g en drie van 200 g vers materiaal. Deze achttien monsters werden gedroogd bij 70 °C in een droogstoof met geforceerde ventilatie. In de gedroogde monsters werd een suikerbepaling uitgevoerd, in duplo, zowel na extractie met water als na extractie met 40% alcohol.

In alcoholextracten (40%) van de verse monsters werd in vijfvoud een suikerbepaling uitgevoerd in op 2 cm geknipte submonsters en in een huishoudmixer gedesintegreerde submonsters van beide monsters.

In tabel 6 zijn de gemiddelde gehalten opgenomen van telkens drie duplobepalingen per behandeling. Uit de duplobepaling per monster is de standaardafwijking van de analyse berekend, $S = 0,24$. Uit de samengevoegde variaties van de drie monsters per behandeling is de standaardafwijking van de bemonstering berekend, $S = 1,05$. De variatiecoëfficiënt van de bemonstering is dus viermaal zo groot als de variatiecoëfficiënt van de analyse. Er is geen significant verschil tussen de uitkomsten van de suikerbepaling in een water- en een alcoholextract van een droog monster. In verse, goed gedesintegreerde monsters, geeft de suikerbepaling aanzienlijk hogere uitkomsten.

Verschillen in de belasting van de droogbladen, 10 dm² groot, leidden in dit experiment niet tot eenduidige beïnvloeding van het gevonden gehalte. Het drogen geeft wel aanleiding tot een verhoging van de standaardafwijking.

2. In een ander experiment, tabel 7, is wel een duidelijke invloed van de grootte van het monster op het suikerverlies gedurende het droogproces waarneembaar.

Uit een partij goed gemengd gras van ca. 50 kg werden achtereenvolgens 46 monsters van 500 - 1000 g genomen. De oneven genummerde monsters werden bij 70 °C gedroogd in een droogstoof met geforceerde ventilatie, de even monsters werden bij 105 °C gedroogd.

Overbelasting van de droogbladen leidt tot ca. 15 g/kg ds verlies aan suikers tijdens het drogen, boven het "normale", 30 g/kg ds droogverlies (tabel 6). Drogen bij 105 °C geeft een additioneel verlies van ca. 15 g suiker per kg ds. Totaal kan bij onoordeelkundige behandeling van grasmonsters dus zonder meer 60 g suiker per kg ds verloren gaan, bij een suikergehalte van ca. 200 g/kg ds.

In de literatuur zijn meer gegevens over verliezen van suiker tijdens het droogproces te vinden, zie Salo en Kotilainen (1970). Het is duidelijk dat het droogresultaat afhangt van de gevolgde methode en de dimensionering van de droogstoof. Het is van belang zo snel mogelijk te verhitten tot 70 °C en dan bij die temperatuur verder te drogen met geforceerde ventilatie.

Droogvriezen en vacuümdrogen geven eveneens suikerverliezen ten opzichte van alcoholextractie van vers materiaal.

Samenvatting en conclusie

In een aantal vergelijkende analyseseries is de invloed van verschillende werkwijzen bij de monstername, monstervoorbewerking, extractie en reductie op de uitkomst van de reducerende suikerbepaling in grassen onderzocht.

Grote verliezen kunnen optreden na de monstername en tijdens de voorbewerking van het monster. De monsters dienen zo snel mogelijk aan een enzyminactiverende behandeling te worden onderworpen.

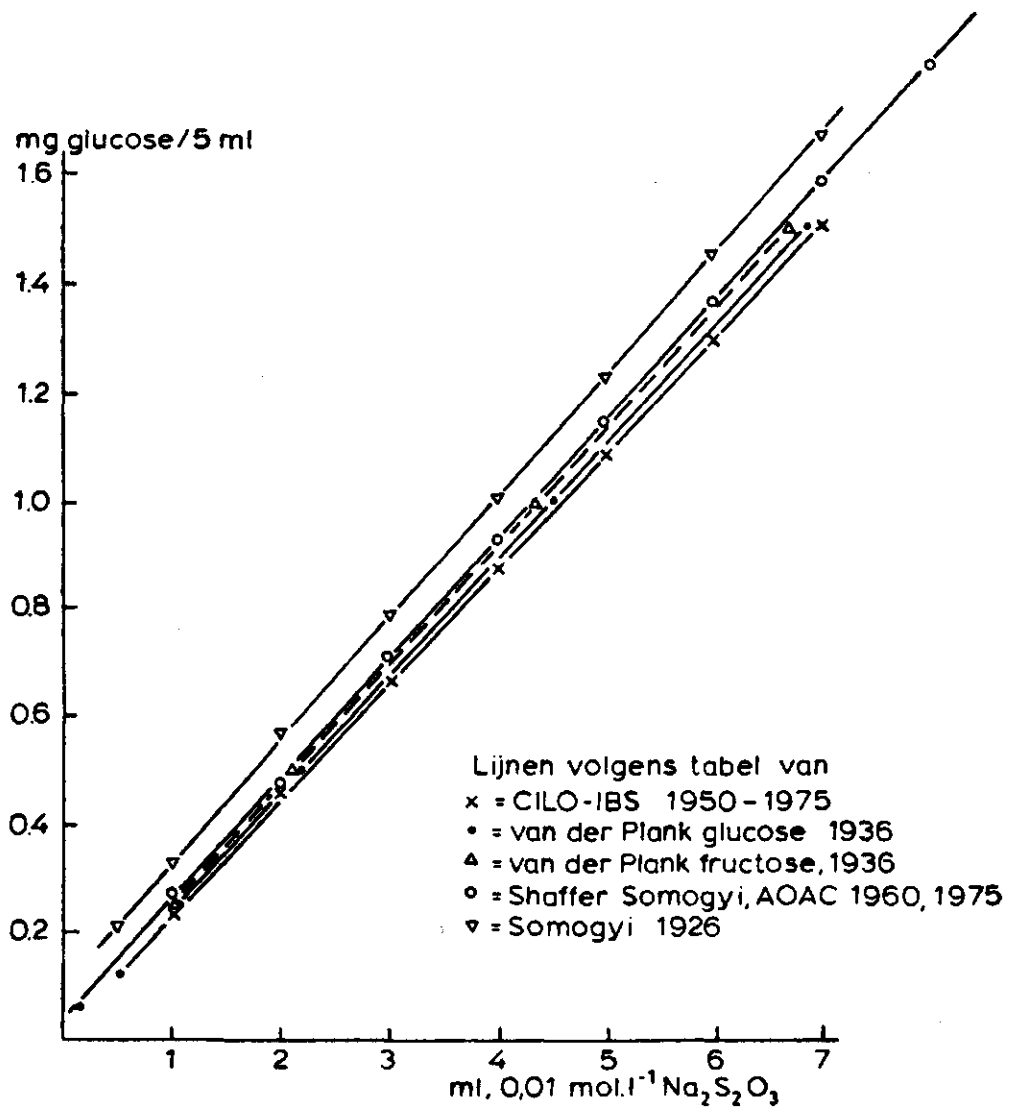
De meest doeltreffende behandeling is opkoken met 50% alcohol, deze werkwijze is tijdrovend en in vele gevallen niet met een representatief vers monster uit te voeren. Een bruikbare methode is drogen van het monster in een voorverwarmde droogstoof met geforceerde circulatie onder zodanige omstandigheden dat het monster snel de maximaal toelaatbare temperatuur van 70 °C bereikt.

De beste werkwijze voor de bepaling van het gehalte aan reducerende suikers is het waterige extract te klaren met Carrez-oplossingen en in het filtraat de suikerbepaling uit te voeren volgens Shaffer en Somogyi.

Literatuur

- AOAC: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12th edition, 1975, Washington.
- BELL, D.J.: Mono and Oligosaccharids and Acidic Monosaccharids Derivatives. In Paech and Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, 1955, vol. II, 1-52.
- BOSMAN, M.S.M.: De bepaling van oplosbare suikers in gras. Gestencilde mededelingen CILO, 1953. 3.
- CUGNAC, A. de: Recherches sur les glucides des Graminées. Ann.Sci.nat.Bot. 13 (1931) 1-.
- HEINZE, P.H. and E.A. MURNEEK: Comparative Accuracy and Efficiency in Determination of Carbohydrates in Plant Material. University of Missouri, Agricultural Experiment Station, Research Bulletin 314, 1940.
- LUFF-SCHOORL: EEG 1971. Analysemethoden voor de bestanddelen van veevoeders. Twaalf Bepalingen van Suikers. Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen, 14^e jaargang, L 155, 12 juli 1971.
- MAN, Th.J. de en J.G. de HEUS: Organische Zuren, fructose en fructosaan in Lolium perenne. Meded. Inst. Moderne Veevoeding "de Schothorst", 1947, 10 pp.
- MAN, Th.J. de en J.G. de HEUS: The Carbohydrates in Grass. Receuil 68 (1949) 43-50.
- MCDONALD, EMMA, J. and B.Y. FOLEY: Reducing sugar methods. Journal of the AOAC. 43 (1960) 645-649.
- NELSON, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153 (1944) 375-380.
- PLANK, J.E. van der: The estimation of sugars in the leaf of mangold (Beta vulgaris). Biochem. J. 30 (1936) 457-483.
- SALO, M.L. and K. KOTILAINEN: Drying of herbage samples for analysis. J. Scient. Agric. Soc. Finland, 42 (1970) 173-179.
- SCHORMÜLLER, J.: Klären und Entfärben der wässrigen Auszüge. In: Handbuch der Lebensmittelchemie II, 2 Springer 1967.
- SCHAFFER, P.A. and M. SOMOGYI: Copper-iodometric reagents for sugar determination. J. Biol. Chem. 100 (1933) 695-713.
- SOMOGYI, M.: J. Biol. Chem. 70 (1926) 607.
- WEIER, K.L., J.B. WILSON and R.J. WHITE: A semi automated procedure for estimating total non structural carbohydrates in grasses and comparison with two other procedures. CSIRO, Division of Tropical Crops and Pastures. Technical Paper no. 20, 1977.

Figuur 1. IJklijnen volgens de bij de verschillende methodes gepubliceerde ijktabellen.



Tabel 1. Vergelijking van de besproken methodes.

		I V.d. Plank	II V.d. Plank Carrez	III Schaffer- Somogyi	IV Nelson- Somogyi
<u>Extractie</u>					
Luchtdroge stof	g	0,5	0,5	0,5	0,5
Ged. water	ml	50	50	50	50
Koken gedurende	min	10	10	10	10
<u>Klaring</u>					
PbAc	mg	800	-	-	-
Aanvullen tot 100	filtraat	50 ml	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	mg	188	-	-	-
Aanvullen	ml	100	-	-	-
K ₄ Fe(CN) ₆ . 3 H ₂ O	mg	-	210	210	210
ZnAc	mg	-	476	476	476
HAc	mg	-	60	60	60
Aanvullen tot	ml	100	100	100	100
Filtreren		+	+	+	+
<u>Hydrolyseren</u>					
ml filtraat		50	50	50	10+40 water
H ₂ SO ₄ aanvullen tot		0,05 N	0,05 N	0,05 N	0,05 N
<u>Reductie</u>					
ml hydrolysaat		5	5	5	1
Reagens	ml	5	5	5	1
Bevattende: Na ₂ CO ₃	mg . ml ⁻¹	20	20	25	24
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	mg . ml ⁻¹	6,56	6,56	7,5	5,8
NaHCO ₃	mg . ml ⁻¹	25	25	20	19,2
K-Na-tartraat	mg . ml ⁻¹	12,1	12,1	25	24
KIO ₃	mg . ml ⁻¹	0,70	0,70	0,72	-
KI	mg . ml ⁻¹	-	-	1,0	-
Na ₂ SO ₄	mg . ml ⁻¹	-	-	-	192
15 min. afkoelen					
Toevoegen	ml	5	5	2	1
Bevattende: KI	mg . ml ⁻¹	10	10	25	-
K-oxalaat	mg . ml ⁻¹	19	19	25	-
H ₂ SO ₄ , 1 N	ml	5	5	5	-
Arsenmolybdaat	ml	-	-	-	1
Titreren met thio		+	+	+	-
Aanvullen tot 25 ml		-	-	-	+
Meten bij 520 nm		-	-	-	+

Tabel 2. Berekening van het glucosegehalte uit het thiosulfaatverbruik bij de reductie van 5 ml reagens met 5 ml glucose-oplossing.

Somogyi (1926)	mg glucose = 0,222 ml 0,01 N thio + 0,12
Van der Plank (1936)	mg glucose = 0,2166 ml 0,01 N thio + 0,015
Shaffer-Somogyi (1933)	mg glucose = 0,2110 ml 0,01 N thio + 0,037
CILO/IBS tabel	mg glucose = 0,2198 ml 0,01 N thio + 0,048

Tabel 3.

Labnrs.	Methode : Klaring : Berekening:	I V.d. Plank loodacetaat V.d. Plank tabel	II A V.d. Plank Carrez V.d. Plank tabel	II B V.d. Plank Carrez Shaff.-Som. tabel	II C V.d. Plank Carrez glucose- standaard	III A Shaff.-Som. Carrez Shaff.-Som. tabel	III B Shaff.-Som. Carrez glucose- standaard	IV Nelson-Som. Carrez glucose- ijkgrafiek	V Hagedorn- Jensen aut.meth. Landbouw- plantenteelt
59281	tarwe	200	208	219	219	210	210	226	217
82	tarwe	179	181	190	188	191	191	195	
83	tarwe	207	222	234	234	243	249	234	235
86	tarwe	199	202	212	212	225	231	216	
	gemiddeld S	196	203 0,9	214	213	217 2,5	220	218 4,6	
61651	bieten	705	693	730	723	739	753	750	738
52	bieten	714	695	739	731	734	740	744	728
53	bietenloof	253	236	246	248	244	251	258	249
54	bietenloof	234	233	244	246	239	244	248	240
	gemiddeld S	477	464 5,4	490	490	489 1,2	497	500 5,4	
61945	mais st.	230	230	242	244	239	245	258	
46	mais kolf	392	374	394	402	392	399	414	390
48	mais st.	246	242	252	256	259	266	249	
49	mais kolf	392	376	396	406	395	412	406	388
63277	mais st.	186	196	207	207	207	212	191	206
	gemiddeld S	289	284 1,9	298	303	298 2,5	307	304 6,0	
63410	gras	180	187	197	197	203	207	209	
11	gras	158	168	179	177	180	182	185	
63624	gras	227	234	244	245	244	251	249	239
38	gras	185	210	218	219	223	229	215	
39	gras	187	182	192	190	202	205	205	201
	gemiddeld S	187	196 2,2	206	206	210 1,6	215	213 2,4	
Totaal	gemiddeld S	282 2,7	282 2,9	297	297	298 2,0	304	302 4,9	

Tabel 4. Invloed van monsterbehandeling op het resultaat van de glucose, fructose en saccharosebepaling.

		Verbruik ml 0,02 N Na ₂ S ₂ O ₃	
		zonder hydrolyse	na hydrolyse
1,000 mg glucose	extractie met water	2,09	2,09
1,000 mg fructose	extractie met water	2,16	2,15
1,000 mg saccharose	extractie met water	—	2,24
1,000 mg glucose	geen voorbehandeling	2,11	2,11
1,000 mg fructose	geen voorbehandeling	2,16	2,16
1,000 mg saccharose	geen voorbehandeling	—	2,20

Tabel 5.

stoppel	vers gewicht	Gehalte aan reducerende suiker, g . kg ⁻¹ droge stof					
		I vers 40% alcohol extract	II droog 40% alcohol extract	III II I	IV droog water extract	V droog 80% alcohol extract	VI vers 80% alcohol extract
1	104	304	342	1,12	340	100	48
2	107	217	387	1,22	387	99,1	47
3	83	367	401	1,09	415	83	40
4	96	339	353	1,04	374	62	58
5	147	148	162	1,09	154	56	34
6	93	303	332	1,10	357	70	36
blad							
1	186	96	86	0,90	81,8	56	39
2	113	161	154	0,96	161	78	50
3	102	215	244	1,13	224	53	56
4	90	291	318	1,09	318	84	50
5	188	168	162	0,96	166	68	62
6	109	291	262	0,90	264	73	69
7	94	380	330	0,87	364	112	74
8	224	84	89	1,06	85,4	46	31
9	144	185	184	0,99	195	63	24
10	123	218	204	0,94	216	66	34
11	85	315	351	0,80	263	62	21
12	166	126	91	0,72	95,2	46	42
13	131	168	139	0,83	150	60	47
14	92	297	259	0,87	278	75	36
gem. totaal		238,6	237,5		244,5	70,6	44,9
gem. blad		213,9	198,1		204,3	67,3	45,4
gem. stoppel		296,2	329,4		337,8	78,3	43,8

Tabel 6. Gemiddelde resultaten van de bepaling van het suikergehalte in twee, in verschillende laagdiktes gedroogde, monsters. Suikergehalte in g . kg⁻¹ vers.

Vers gew.	Droge stof g . kg ⁻¹	Glucose in water-extr. gem. van 3 duplo's	Glucose in 40% alk. extr. gem. van 3 duplo's	Glucose in vers geknipt monster, gemiddelde van 5 bepalingen	Glucose in vers gemalen monster, gemiddelde van 5 bepalingen
L 800 g	151	17,05	17,15	20,8 S = 1,4	22,7 S = 1,4
L 400 g	152,3	16,30	16,30		
L 200 g	156,6	18,05	17,95		
K 800 g	156,5	20,45	20,10	21,2 S = 1,1	23,4 S = 0,6
K 400 g	155,3	18,70	18,50		
K 200 g	156,3	19,05	18,85		

Tabel 7. Samenstelling van 23 submonsters van een partij raagrass, gedroogd bij 70 °C vergeleken met die van 23 monsters gedroogd bij 105 °C en van de 8 grootste en 8 kleinste monsters bij deze behandeling.

	Vers gew. g	Droge stof g . kg ⁻¹ vers	Suiker g . kg ⁻¹ ds	Ruw eiwit 6,25 . N g . kg ⁻¹ ds
Droogtemperatuur 70 °C				
Gemiddeld over totaal	775	136,8	81,8	189
8 grootste monsters	941	139,6	74,1	181
8 kleinste monsters	596	134,7	89,0	192
Droogtemperatuur 105 °C				
Gemiddeld over totaal	754	139,7	64,5	195,5
8 grootste monsters	963	141,9	58,0	198,6
8 kleinste monsters	633	138,2	69,7	195,3

Aanhangsel 1

BEPALING VAN IN WATER OPLOSBARE KOOLHYDRATEN

Beginsel

Uit de te onderzoeken stof worden de in water oplosbare koolhydraten geëxtraheerd. Na onteiwitten en eventueel hydrolyseren wordt het gehalte bepaald volgens Shaffer-Somogyi.

Reagentia

Gebruik gedemineraliseerd water.

1. Carrez I oplossing:
Los 106 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ op in water en vul aan tot 1 liter.
2. Carrez II oplossing:
Los 219,5 g $ZN(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$ en 30 g ijsazijn op in water en vul aan tot 1 liter.
3. "Reagens 50"
Los op in 600 ml ged. water: 25 g Na_2CO_3 anhydr. en 25 g K-Na-tartraat, voeg toe: 75 ml 10% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 20 g $NaHCO_3$, 1 g KJ en een oplossing van 0,7134 g KJO_3 in 200 ml water en vul aan tot 1 liter.
4. Los 2,5 g kaliumjodide en 2,5 g kaliumoxalaat op in 100 ml water. Deze oplossing koud en donker bewaren, wekelijks vers bereiden.
5. Natriumthiosulfaat 0,01 N, dagelijks bereiden uit een gestelde 0,100 N thio-oplossing.
6. Zwavelzuur 1 N.
7. NaOH 10 N.
8. Zwavelzuur 10 N.
9. Zetmeeloplossing (indicator): 1 g oplosbaar zetmeel (Merck 1252) in 100 ml water.
10. Bariumcarbonaat.

Werkwijze

Bepaling van het gehalte reducerende suikers voor hydrolyse:

Weeg van het gedroogde en gemalen monster 1.000 g af in een maatkolf van 100 ml.

Voeg aan zure monsters ca. 1 g $BaCO_3$ en ca. 50 ml water toe.

Kook dit mengsel gedurende 10 minuten in een kokend waterbad en koel hierna af in water.

Voeg 2 ml Carrez I oplossing toe en schud 1 minuut.

Voeg 2 ml Carrez II oplossing toe en schud 1 minuut.

Vul aan tot 100 ml en filtreer door een vouwfilter (Filtmaat I).

Pipetteer 50 ml van het filtraat in een maatkolf van 100 ml.

Neutraliseer met enkele druppels 10 N H_2SO_4 t.o.v. methyloranje.

Voeg enkele druppels fenolftaleïne toe en zoveel 10 N NaOH tot de kleur omslaat van rood via geel naar paars. Voeg hierna zoveel H_2SO_4 1 N toe tot de kleur omslaat naar geel. Vul aan tot 100 ml.

Bepaling van het gehalte reducerende suikers na hydrolyse:

Pipetteer van filtraat I 50 ml in een maatkolf van 100 ml.

Neutraliseer met enkele druppels 10 N H_2SO_4 t.o.v. methyloranje, voeg nu nog 0,25 ml 10 N H_2SO_4 toe en schud om.

Plaats de kolf gedurende 30 minuten in een kokend waterbad en koel hierna af. Neutraliseer met 10 N NaOH en 1 N H₂SO₄ t.o.v. fenolftaleïne en vul aan.

Pipetteer 5 ml van de neutrale oplossing in een pyrexbuis 3,1 x 17 cm.

Voeg 5 ml "Reagens 50" toe, schud om en bedek de buis met een porceleinen kroesje, half gevuld met koud ged. water.

Reduceer precies 15 minuten in een kokend waterbad, koel in ca. 2 minuten af in koud stromend water tot beneden 30 °C.

Voeg 2 ml KJ-K-oxalaat-oplossing toe en 10 ml 1 N H₂SO₄, schud om en laat de buis nog 5 minuten in koud water staan en schud nog twee keer om in deze tijd.

Titreer met 0,01 N Na₂S₂O₃ tot lichtbruine kleur, voeg enkele druppels zetmeeloplossing toe en titreer tot omslag (a ml).

Ter correctie verricht men:

1. Een blanco bepaling met dezelfde hoeveelheden reagentia (b ml);
2. Een bepaling van 2.000 mg glucose in 5 ml ged. water.

Berekening:

Indien (b-a) groter is dan 2,5 ml dan bevat de buis 0,2198 . (b-a) + 0,0485 mg glucose.

Indien (b-a) kleiner is dan 2,5 ml dan bevat de buis 0,2344 . (b-a) + 0,0145 mg glucose.

Aanhangsel 2

COLORIMETRISCHE BEPALING VAN IN WATER OPLOSBARE KOOLHYDRATEN
VOLGENS NELSON EN SOMOGYI

Reagentia

Gebruik gedemineraliseerd water.

1. Reagens A:

Los 25 g Na_2CO_3 , 25 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (K-Na-tartraat), 20 g NaHCO_3 , en 200 g Na_2SO_4 anh, op in 800 ml water en verdun tot 1 liter.

2. Reagens B:

Los 30 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ op in ged. water, voeg vier druppels gec. H_2SO_4 toe en vul aan tot 200 ml.

3. Arseenmolybdaat kleurreagens:

Los 25 g $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ op in 450 ml ged. water, voeg 21 ml gec. H_2SO_4 toe en meng.

Los 3 g $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ op in 25 ml ged. water, voeg deze oplossing toe aan de molybdaatoplossing, meng en laat de oplossing 24 tot 28 uur staan bij 37 °C of 25 minuten bij 55 °C.

4. Carrez I oplossing :

Los 10,6 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ op in ged. water en vul aan tot 100 ml.

5. Carrez II oplossing:

Los 23,8 g zinkacetaat $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ op in ged. water, voeg 3 g ijszijn toe en en vul aan tot 100 ml.

6. H_2SO_4 10N.

7. H_2SO_4 1 N.

8. NaOH 10 N.

9. Standaardglucose-oplossing:

Los 250 mg glucose op in 1 liter ged. water (dagelijks vers).

Werkwijze

Extractie en hydrolyse:

Weeg 100 mg van het gedroogde en gemalen monster af in een maatkolf van 50 ml. Voeg ca. 25 ml ged. water toe. Kook gedurende 10 minuten in een kokend waterbad en koel af. Voeg 2 ml Carrez I toe en schud 1 minuut. Voeg 2 ml Carrez toe en schud 1 minuut. Vul aan tot 50 ml en filtreer over een vouwfilter. Pipetteer 40 ml van het filtraat in een maatkolf van 50 ml. Neutraliseer met een à twee druppels 10N H₂SO₄ t.o.v. methylooranje en voeg dan nog 0,25 ml 10 N H₂SO₄ toe en schud om. Plaats de kolf gedurende 30 minuten in een kokend waterbad. Koel hierna af en neutraliseer met 10 N NaOH en 1 N H₂SO₄ t.o.v. fenolftaleïne en vul aan.

Reductie en kleuring:

Meng 25 delen reagens A en 1 deel reagens B. Deze oplossing moet dagelijks vers worden bereid.

Pipetteer 1 ml van het mengreagens (A+B) in een geijkte reageerbuis van 25 ml. Pipetteer daarna 1 ml van de neutrale oplossing in een buis, meng en plaats de buis gedurende precies 20 minuten in een kokend waterbad. Koel af in een waterbad en voeg 1 ml arseenmolybdaat reagens toe. Schud om en vul aan tot 25 ml en schud nogmaals om.

Meet van deze oplossing de extinctie bij 520 nm.

Bepaald het gehalte aan koolhydraten aan de hand van een ijklijn.

Gebruik hiertoe 1 ml van de volgende oplossingen in plaats van 1 ml van de geneutraliseerde oplossing.

Ijklijn:

Pipetteer 0,0 ml standaardglucose-opl. + 1,0 ml ged. water	0 µg glucose
Pipetteer 0,2 ml standaardglucose-opl. + 0,8 ml ged. water	50 µg glucose
Pipetteer 0,4 ml standaardglucose-opl. + 0,6 ml ged. water	100 µg glucose
Pipetteer 0,6 ml standaardglucose-opl. + 0,4 ml ged. water	150 µg glucose
Pipetteer 0,8 ml standaardglucose-opl. + 0,2 ml ged. water	200 µg glucose
Pipetteer 1,0 ml standaardglucose-opl. + 0,0 ml ged. water	250 µg glucose

De ijklijn moeten ten minste eenmaal per dag worden gemeten.

De gemiddelde extinctie was in mei 1977:

µg glucose	E
0	0,000
50	0,100
100	0,200
150	0,300
200	0,400
250	0,500

Literatuur

Nelson, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. I. Biol. Chem. 153 (1944) 375-380.